

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE

Pigmentos Naturais em Diferentes Variedades de Batatas-doces

Monalisa Santana Coelho de Jesus

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PIGMENTOS NATURAIS EM DIFERENTES VARIEDADES
DE BATATAS-DOCES**

MONALISA SANTANA COELHO DE JESUS

Sob a orientação do Professor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em
Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no
Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos, Área de
Concentração Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ
Junho de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

J58p Jesus, Monalisa Santana Coelho de, 1980-
 Pigmentos Naturais em Diferentes Variedades de
Batatas-doces / Monalisa Santana Coelho de Jesus. -
Rio de Janeiro, 2021.
 192 f.: il.

 Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, 2021.

 1. pigmento natural. 2. antioxidante. 3.
espectrometria de massas. 4. batata-doce. 5.
agricultura orgânica. I. Godoy, Ronoel Luiz de
Oliveira, 1951-, orient. II Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos III. Título.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.”



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TERMO Nº 859/2021 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.056949/2021-20

Seropédica-RJ, 09 de agosto de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MONALISA SANTANA COELHO DE JESUS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de doutora, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Tese APROVADA EM 25/06/2021.

RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODOY (Dr) (orientador)

JOSE LUCENA BARBOSA JUNIOR (Dr) UFRRJ

CARLOS WANDERLEI PILER DE CARVALHO (Dr) EMBRAPA

ANTONIO LUIZ DOS SANTOS LIMA (Dr) IME

ANA CRISTINA MIRANDA SENNA GOUVEA (Dra) UNIRIO

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020.

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 09/08/2021 21:49)

JOSE LUCENA BARBOSA JUNIOR

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Matrícula: 2455049

(Assinado digitalmente em 10/08/2021 10:04)

ANA CRISTINA GOUVEA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 636.674.287-15

(Assinado digitalmente em 10/08/2021 09:06)

CARLOS WANDERLEI PILER DE CARVALHO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 009.412.587-26

(Assinado digitalmente em 18/08/2021 10:29)

ANTONIO LUIS DOS SANTOS LIMA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 905.216.687-00

(Assinado digitalmente em 10/08/2021 09:03)

RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODOY

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 507.802.047-00

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **859**, ano: **2021**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **09/08/2021** e o código de verificação: **4507ab9ff2**

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu esposo Júnior, à memória de meu pai Ademário e à minha mãe Suely, à minha irmã Fábrice, às minhas sobrinhas Lia e Lara aos meus cunhados Raphael e Jamissara, ao meu concunhado Marconi, à minha sogra Odélia e à minha cachorrinha Bella.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, pelo incentivo, orientação, apoio, amizade e por toda a sua imensa generosidade e amor dedicado aos alunos, aos colegas e à sua profissão.

À Dra. Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa e Dr. José Lucena Barbosa Júnior, Lucimar Storck Teixeira e Felipe por todos os esforços dedicados na coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

À Dra. Lourdes Maria Correa Cabral, chefe geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos e ao Dr. Gustavo Ribeiro Xavier, chefe geral da Embrapa Agrobiologia, pelo apoio e confiança.

Aos Drs. José Ivo Baldani e Rosangela Stralio, ex-chefes geral e administrativa da Embrapa Agrobiologia, respectivamente, pela confiança e reconhecimento.

Ao Dr. José Guilherme Marinho Guerra e Dr. José Antônio Azevedo Espíndola pela parceria incentivo e apoio.

Ao Dr. Bruno José Rodrigues Alves, Dr. Robert Michael Boddey, Dr. Segundo Sacramento Urquiaga Caballero e Dra. Claudia Pozzi Jantália da Embrapa Agrobiologia pelo apoio e confiança.

A todos os companheiros de trabalho dos laboratórios da Embrapa, principalmente àqueles da equipe da qual faço parte: Dr. Sidney Pacheco, Dra. Manuela Cristina Pessanha de Araújo Santiago, Ma. Luzimar da Silva de Mattos do Nascimento, Dra. Renata Galhardo Borguini, Dra. Maria de Lourdes Mendes de Souza, Dra. Rosemar Antoniassi, Dr. Humberto Ribeiro Bizzo, Ma. Marianna Ramos dos Anjos, Ma. Alessandra da Silva Teixeira, Dra. Paola Ervatti Gama, Ma. Marcelly Cristina da Silva Santos, pelo apoio e amizade.

A todos os estagiários que passaram pelo Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos e contribuíram para meu trabalho, em especial Giovana Almeida Couto e João Victor Martins Melo.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para tornar meu trabalho e minha vida mais leves e felizes, principalmente nesse período do doutorado.

Aos meus antepassados e todos os seres que contribuíram para a minha caminhada.

À Deus, que tudo sustenta.

O PRAZER DE SERVIR

Toda a natureza é um desejo de serviço.
Serve a nuvem, serve o vento, serve o sulco na terra.
Onde haja uma árvore que plantar, planta-a tu; onde haja um erro a corrigir, corrige-o tu; onde haja uma tarefa que todos recusam, aceita-a tu.
Sê o que afasta a pedra do caminho, o ódio dos corações, as dificuldades dos problemas.
Há a alegria de ser são e a de ser justo, mas há, sobretudo, a formosa, a imensa alegria de servir.
Que triste seria o mundo se tudo já estivesse feito, se não houvesse um roseiral para plantar, uma atitude para tomar!
Que não te atraíam somente os trabalhos fáceis.
É tão belo fazer as tarefas que outros recusam!
Mas não caias no erro de que só se conquistam méritos com grandes trabalhos, há pequenos serviços que são bons serviços: arrumar uma mesa, arrumar uns livros, pentear uma criança.
Aquele que critica, esse é o que destrói.
Sê tu o que serve.
O servir não é tarefa só de seres inferiores.
Deus, que dá o fruto e a luz, serve.
Poder-se-ia chamá-lo assim: Aquele que serve.
E Ele, que tem os olhos fixos em nossas mãos, nos pergunta todo dia: "Serviste hoje? A quem? À árvore, a teu amigo, à tua mãe?"

Gabriela Mistral

RESUMO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* L.), de cultivo rústico, rica em carboidratos e fitoquímicos funcionais, pigmentos naturais, antioxidantes e pró-vitamínicos A, possui grande potencial para levar desenvolvimento social e econômico para as populações mais carentes e distantes dos centros urbanos. Pode auxiliar na prevenção das doenças relacionadas à desnutrição, à avitaminose A e ao estresse oxidativo. É uma opção para impulsionar sistemas de produção orgânicos e gerar alimentos mais saudáveis, com maiores teores de nutrientes e substâncias funcionais, de forma sustentável. Seus pigmentos naturais (carotenoides e antocianinas) podem substituir com vantagens funcionais os corantes sintéticos utilizados em alimentos industrializados. O perfil de carotenoides e antocianinas de muitas variedades de batatas-doces ainda estão sendo publicados em trabalhos recentes, já que muitas destas moléculas ainda não foram elucidadas. O potencial funcional desses fitoquímicos depende de suas estabilidades perante tratamentos térmicos e da biodisponibilidade após o processo digestivo. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e quantificar os carotenoides e antocianinas de quatro variedades de batatas-doces cultivadas em sistema orgânico e avaliar a retenção nas formas de consumo mais comuns. Para isso foram cultivadas quatro variedades de batatas-doces orgânicas, preparadas nas formas *in natura*, cozidas e fritas para avaliação dos teores, retenção e perfis. As técnicas analíticas utilizadas foram espectrofotometria, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Eletrospray (IES-QTdV-EM²). A maior parte dos carotenoides e antocianinas foi identificada e alguns foram detectados pela primeira vez na matriz, como 6 antocianinas aciladas, dentre as 22 detectadas na variedade de pele e polpa roxas, na maioria derivadas de peonidina, justificando a coloração roxa com tonalidade avermelhada, aciladas com ácidos cafeico, *p*-hidroxicinâmico e principalmente ferúlico. Na variedade de pele branca e polpa roxa foram identificadas 14 antocianinas já conhecidas, a maior parte derivada de cianidina, justificando a cor roxa com tonalidade azulada e, aciladas com os mesmos ácidos, principalmente o cafeico. Duas delas diaciladas, raras em batata-doce, derivadas de pelargonidina, só foram identificadas em batata-doce por Lee et al. (2013). Não foram detectadas antocianinas não aciladas. Os perfis das antocianinas dessas batatas-doces as diferenciam de outras variedades. As antocianinas foram estáveis ao cozimento e fritura, que facilitaram a dessorção das mesmas do amido das matrizes durante a extração, resultando em teores três vezes mais altos do que nas batatas-doces *in natura*, indicando que o aquecimento deve ser inserido no preparo delas antes da liofilização, que também aumenta a extração das antocianinas, sem degradá-las. O perfil de carotenoides da cultivar IAPAR 69, de polpa alaranjada devido ao β -caroteno como majoritário (>90%) e zeinoxantina como minoritário apresentou teor total de quase 65 mg 100⁻¹ g⁻¹ em base seca (BS), isomerização após cozimento e fritura com retenções em torno de 55%. A variedade de polpa amarelada, com total de carotenoides não identificados de 2 mg 100⁻¹ g⁻¹ BS, apresentou perfil raro característico de novas xantofilas semelhantes àsquelas encontradas por Maoka et al. (2007), com degradação após cozimento e fritura com retenções em torno de 82%.

Palavras-chave: pigmento natural, antioxidante, espectrometria de massas, batata-doce, agricultura orgânica

ABSTRACT

The sweet potato (*Ipomoea batatas* L.), rustic, rich in carbohydrates, functional phytochemicals, natural pigments, antioxidants and pro-vitamins A, has great potential to bring social and economic development for the most needy and distant of urban centers populations. It can aid in the prevention of diseases related to malnutrition, vitamin A deficiency and oxidative stress. It is an option to boost organic production systems and generate healthier foods with higher levels of nutrients and functional substances in a sustainable way. Their natural pigments (carotenoids and anthocyanins) can replace the synthetic dyes used in industrialized foods with functional advantages. The carotenoids and anthocyanins profile of many sweet potato varieties are still being published in recent works, as many of these molecules have not yet been elucidated. The functional potential of these phytochemicals depends on their stability to heat treatments and bioavailability after the digestive process. The objective of this work was to characterize and quantify the carotenoids and anthocyanins of four varieties of sweet potatoes grown in the organic system and to evaluate retention in the most common forms of consumption. Four organic sweet potato varieties were cultivated for this purpose and prepared in fresh, cooked and fried forms for evaluation of the contents, retention and profiles. The analytical techniques used were spectrophotometry, High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD) and High Resolution Mass Spectrometry with Electrospray Ionization (ESI-QToF-MS²). The carotenoids and anthocyanins present in the studied varieties were quantified and characterized. Most of the carotenoids and anthocyanins were identified and some were detected for the first time in the matrix, such as 6 acylated anthocyanins, among the 22 detected in the variety of purple skin and flesh, most of them derived from peonidin, justifying the purple color with red tint, acylated with caffeic, *p*-hydroxycinnamic and mainly ferulic acids. In the variety of white skin and purple flesh, 14 known anthocyanins have been identified, most of them derived from cyanidin, justifying the purple colour with blue tint and, acylated with the same acids, mainly caffeic. Two of them diacylated, rare in sweet potatoes, derived from pelargonidin were only identified in sweet potatoes by Lee et al. (2013). Unacylated anthocyanins were not detected. The anthocyanin profiles of these sweet potatoes differentiate them from other varieties. Anthocyanins were stable to cooking and frying, which facilitated their desorption from the starch of the matrices during the extraction, resulting in levels three times higher than in fresh sweet potatoes, indicating that heating should be inserted in their preparation before lyophilization, which also increases the extraction of anthocyanins, without degrading them. The carotenoid profile of the IAPAR 69 cultivar, with orange flesh due to β -carotene as a major (> 90%) and zeinoxanthin as a minor presented total contents of almost 65 mg 100⁻¹ g⁻¹ on dry basis (BS) with isomerization after cooking and frying with retentions around 55%. The yellowish flesh variety, with 2 mg 100⁻¹ g⁻¹ BS of unidentified total carotenoids, presented a rare profile characteristic of new xanthophylls similar to those found by Maoka et al. (2007), with degradation after cooking and frying, and retentions around 82%.

Key words: natural pigments, antioxidant, mass spectrometry, sweet potato, organic agriculture

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação estrutural das antocianidinas baseada na Figura 9 e cujas cores encontradas nos vegetais estão sujeitas a variações pelo pH, solvente, presença de metais ou interação com outras substâncias (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).	11
Tabela 2 – Características ópticas de alguns grupos cromóforos. Reproduzida de Martinho (1994).	31
Tabela 3 – Principais características dos métodos de ionização atualmente usados na espectrometria de massa. Tabela adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).	42
Tabela 4 – Gradiente de acetonitrila e ácido fosfórico 1,5 mL L ⁻¹ em água ultrapura utilizados como fase móvel nas análises dos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos livres e após hidrólise das amostras de batata-doce in natura.	56
Tabela 5 – Gradiente de acetonitrila e 5 % de ácido fórmico em água ultrapura utilizados como fase móvel nas análises dos extratos de antocianinas das amostras de batata-doce de polpas roxas.	59
Tabela 34 – Dados de UV/Vis e espectrometria de massas de alta resolução por bombeamento atômico rápido (BAR-EM) obtidos por Maoka et al. (2001) na identificação de 5 novas xantofilas na variedade de batata-doce de polpa amarela “Benimasari”.	75
Tabela 45 - Dados espectrais e cromatográficos obtidos para as antocianinas identificadas na batata doce de pele e polpa roxas.	119
Tabela 46 - Dados espectrais e cromatográficos obtidos para as antocianinas identificadas na batata doce de pele branca e polpa roxa.	131
Tabela 6 - Quantidades colhidas de cada repetição de campo na área central do plantio (3 m x 0,8 m ou equivalente a 2,4 m ²) de acordo com as classificações comerciais: Extra A (251-500 g), Extra (151-250 g), Diversos (80-150 g) e Tubérculos (10-79 g) (CEAGESP, 2003) para a batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela - D.	153
Tabela 7 - Quantidades colhidas de cada repetição de campo na área central do plantio (3 m x 0,8 m ou equivalente a 2,4 m ²) de acordo com as classificações comerciais: Extra A (251-500 g), Extra (151-250 g), Diversos (80-150 g) e Tubérculos (10-79 g) (CEAGESP, 2003) para a batata-doce da variedade de pele branca e polpa roxa- A.	154
Tabela 8 - Quantidades colhidas de cada repetição de campo na área central do plantio (3 m x 0,8 m ou equivalente a 2,4 m ²) de acordo com as classificações comerciais: Extra A (251-500 g), Extra (151-250 g), Diversos (80-150 g) e Tubérculos (10-79 g) (CEAGESP, 2003) para a batata-doce da variedade de pele e polpa roxas - C.	154
Tabela 9 - Quantidades colhidas de cada repetição de campo na área central do plantio (3 m x 0,8 m ou equivalente a 2,4 m ²) de acordo com as classificações comerciais: Extra A (251-500 g), Extra (151-250 g), Diversos (80-150 g) e Tubérculos (10-79 g) (CEAGESP, 2003) para a batata-doce da variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas – B.	154
Tabela 10– Peso seco das batatas-doces da variedade de pele roxa e polpa amarela – D, in natura.	155
Tabela 11– Peso seco das batatas-doces da variedade de pele branca e polpa roxa - A, in natura.	156
Tabela 12– Peso seco das batatas-doces da variedade de pele e polpa roxas - C, in natura.	156
Tabela 13 – Peso seco das batatas-doces da variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas - B, in natura.	156

Tabela 14 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele roxa e polpa amarela – D, cozidas.	157
Tabela 15 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele branca e polpa roxa - A, cozidas.	158
Tabela 16 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele e polpa roxas - C, cozidas.	158
Tabela 17 – Peso seco das batatas-doces da variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas - B, cozidas no vapor por 10 min.	158
Tabela 18 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele roxa e polpa amarela – D, fritas.	159
Tabela 19 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele branca e polpa roxa - A, fritas.	160
Tabela 20 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele e polpa roxas - C, fritas.	160
Tabela 21 – Peso seco das batatas-doces da variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas - B, fritas em imersão por 5 minutos a 190 ° C.	161
Tabela 22 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) da batata-doce da variedade IAPAR 69 in natura.	163
Tabela 23 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) e retenção de carotenoides da batata-doce da variedade IAPAR 69 cozida.	164
Tabela 24 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) e retenção de carotenoides da batata-doce da variedade IAPAR 69 frita.	164
Tabela 25 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar diferenças significativas entre as retenções de carotenoides totais entre os processamentos (cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B com nível de significância $p<0,05$.	165
Tabela 26 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela in natura.	166
Tabela 27 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) e retenção de carotenoides da batata-doce da variedade da variedade de pele roxa e polpa amarela cozida.	166
Tabela 28 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) e retenção de carotenoides da batata-doce da variedade da variedade de pele roxa e polpa amarela frita.	167
Tabela 29 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções de carotenoides totais dos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p<0,05$.	167
Tabela 30 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, todo-trans- β -caroteno e Zeinoxantina em base seca (BS) da batata-doce da variedade IAPAR69 – B in natura.	168
Tabela 31 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, todo-trans- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno e Zeinoxantina em base seca (BS) e retenção de todo-trans- β -caroteno e Zeinoxantina da batata-doce da variedade da variedade IAPAR69 – B cozida.	168
Tabela 32 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, todo-trans- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno e Zeinoxantina em base seca (BS) e retenção de todo-trans- β -caroteno e Zeinoxantina da batata-doce da variedade da variedade IAPAR69 – B frita.	169
Tabela 33 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre os teores de 13-cis- β -caroteno dos processamentos (cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B com significância $p<0,05$.	170

Tabela 35 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, e dos carotenoides não identificados em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela in natura. _____	171
Tabela 36 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, e dos carotenoides não identificados em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela cozida. _____	172
Tabela 37 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, e dos carotenoides não identificados em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela frita. _____	173
Tabela 38 – Carotenoides não identificados nos quatro picos majoritários em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarelada in natura. _____	174
Tabela 39 – Carotenoides não identificados nos quatro picos majoritários em base seca (BS) e suas retenções da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarelada cozida. _____	174
Tabela 40 – Carotenoides não identificados nos quatro picos majoritários em base seca (BS) e suas retenções da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarelada frita. _____	175
Tabela 41 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções do pico 2, não identificado dos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p < 0,05$. _____	177
Tabela 42 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções do pico 4, não identificado, nos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p < 0,05$. _____	178
Tabela 43 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções do pico 5, não identificado, nos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p < 0,05$. _____	178
Tabela 44 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções do pico 7, não identificado, nos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p < 0,05$. _____	179
Tabela 47 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele e polpa roxas in natura. _____	180
Tabela 48 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele e polpa roxas cozida. _____	182
Tabela 49 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele e polpa roxas frita. _____	184
Tabela 50 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele branca e polpa roxa in natura. _____	186
Tabela 51 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele branca e polpa roxa cozida. _____	188
Tabela 52 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele branca e polpa roxa frita. _____	190

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar diferenças significativas entre os rendimentos ($p < 0,05$) e TUKEY para saber quais rendimentos (valores médios em Kg/2,4 m ²) foram diferentes ou iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	153
Quadro 2 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos das variedades in natura e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	155
Quadro 3 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos das variedades cozidas e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,001$. _____	157
Quadro 4 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos das variedades fritas e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	159
Quadro 5 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos dos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela - D e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	161
Quadro 6 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos dos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade de pele branca e polpa roxa - A amarela e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	162
Quadro 7 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos dos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade de pele e polpa roxas - C amarela e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	162
Quadro 8 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos dos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	163
Quadro 9 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores de carotenoides totais entre os processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	165
Quadro 10 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores de carotenoides totais entre os processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	167
Quadro 11 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores de todo-trans- β -caroteno totais dos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	169
Quadro 12 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores de zeinoxantina dos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____	169

Quadro 13 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre os teores do pico 2, não identificado, nos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarelada – D e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _	175
Quadro 14 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre os teores do pico 4, não identificado, nos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarelada – D e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _	176
Quadro 15 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre os teores do pico 5, não identificado, nos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarelada – D e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _	176
Quadro 16 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre os teores do pico 7, não identificado, nos processamentos (in natura, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarelada – D e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _	177
Quadro 17 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele e polpa roxas in natura – C e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _____	181
Quadro 18 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele e polpa roxas cozidas – C e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _____	183
Quadro 19 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele e polpa roxas fritas – C e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _____	185
Quadro 20 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele branca e polpa roxa in natura – A e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _____	187
Quadro 21 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele branca e polpa roxa cozida – A e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _____	189
Quadro 22 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele branca e polpa roxa frita – A e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha<0,05$. _____	191
Quadro 23 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p<0,05$) entre as quantidades de antocianinas pelo método de espectrofotometria de UV/Vis encontradas nos processamentos (in natura, cozida e frita) das variedades de polpa	

roxas – A e C e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$. _____ 192

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quatro variedades de batatas-doces, da esquerda para a direita, na primeira coluna: de pele e polpa alaranjadas (IAPAR 69), na segunda coluna: de pele roxa e polpa amarelada, na terceira coluna: de pele e polpa roxas e na quarta coluna: de pele branca e polpa roxa. Na linha A, as batatas estão inteiras, na linha B as batatas estão sem a pele e na linha C estão suas metades em corte longitudinal.....	4
Figura 2 - Estrutura do Isopreno (unidade construtora dos terpenos), diterpeno, tetraterpeno e alguns carotenoides acíclicos diferenciados pela localização e quantidade de duplas ligações.	6
Figura 3 - Estruturas moleculares de alguns carotenoides cíclicos.	6
Figura 4 - Espectros no Ultravioleta e no Visível do Licopeno e do β -caroteno (PACHECO, 2009).	7
Figura 5 – Espectros (PACHECO, 2009) e estruturas moleculares do β -caroteno, β -criptoxantina e zeaxantina.	7
Figura 6 – Espectros e estruturas moleculares do todo-trans- β -caroteno, 9-cis- β -caroteno e 13-cis- β -caroteno (PACHECO, 2009).	8
Figura 7 - Ilustração do anel β -ionona nos carotenoides pró-vitamínicos A, β -caroteno e β -criptoxantina.	9
Figura 8 - Variedades de batata-doce de pele roxa e polpa amarela (esquerda) pele e polpa alaranjada (direita).	10
Figura 9 - Estrutura base das antocianidinas.	10
Figura 10 - Formas químicas das antocianinas dependentes do pH e reações de degradação. Onde $R_1 = H$ ou sacarídeo e R_2 e $R_3 = H$ ou Metil. Figura adaptada de CASTAÑEDA-OVANDO et al. (2009).	12
Figura 11 - Batatas-doces de pele branca e polpa roxa (esquerda) e de pele e polpa roxas (direita).	13
Figura 12 - Estrutura das antocianinas mais comumente encontradas em batata-doce de polpa roxa, relatadas na literatura.	14
Figura 13 – Exemplos de ácidos fenólicos encontrados na natureza.	15
Figura 14 – Esquematização de um cromatograma obtido por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia em Papel (CP), mostrando os pontos de aplicação de amostras, o nível máximo de fase móvel e a linha de chegada da fase móvel, alcançada pelo eluente que sobe pela placa ou papel pelo fenômeno de capilaridade. Após secagem dos solventes é possível medir as distâncias percorridas pelas manchas correspondentes às substâncias que foram separadas. R_f é a relação entre a distância percorrida pela substância (d_s) sobre a distância percorrida pelo eluente (d_m) e é uma característica que diferencia as substâncias, neste caso, d_{s1} e d_{s2} . Figura obtida de DEGANI et al. (1998).	16
Figura 15 – Colunas de vidro utilizadas no processo de cromatografia de coluna clássica, com eluição sob pressão atmosférica. À esquerda, o esquema da montagem da coluna obtido de DEGANI et al. (1998). À direita, uma fotografia obtida durante o processo de separação de carotenoides de cores diferentes, cedida por Sidney Pacheco, disponível no site www.cromatografialíquida.com.br	17
Figura 16 – Esquema representando a configuração mais simples dos equipamentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de Ultra Eficiência (CLUE), onde: a. reservatório de solvente (eluente); b. bomba; c. injetor manual; d. coluna, e. detector de UV/Vis; f. computador. Figura obtida de DEGANI et al. (1998). Abaixo à esquerda o Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado ao Detector de	

Arranjo de Diodos (DAD) e à direita o Equipamento de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) acoplado ao detector de massas Quadrupolo - Tempo de Voo (QTdV) do Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Fotografias cedidas por Sidney Pacheco.....	18
Figura 17 – Experimentos de Runge feitos em papel de filtro demonstrando a reprodutibilidade da separação da mistura de pigmentos de tecido. Figura obtida de PACHECO et al. (2015).	19
Figura 18 – Representação da radiação eletromagnética (luz) em relação ao campo elétrico. Comprimento de onda (λ) é a distância ente duas oscilações, frequência (f) é o número de oscilações (ondas) por segundo medida em Hertz (Hz). Figura obtida de PASSOS (2020).	22
Figura 19 – Disco de cores que representa a cor do comprimento de onda absorvido por determinada substância quando a luz incide nela e a cor que é percebida pelos olhos humanos para aquela substância, que é a cor complementar refletida, localizada diametralmente oposta a cor absorvida no disco. Figura obtida de MARTINS et al. (20215).	23
Figura 20 – Regiões do espectro eletromagnético mostrando as faixas de comprimentos de onda ou de energias e os tipos de transição (interação) que cada faixa é capaz de causar quando interage com a matéria. O espectro eletromagnético apresenta regiões de Raios γ , Raios x, Ultravioleta (UV), Visível (Vis), Infravermelho (IV), Microondas e Ondas de Rádio. Figura obtida de PASSOS (2020).....	24
Figura 21 – Cubeta com solução de analito vermelho através da qual um feixe de luz branca incide, sendo transmitida a faixa do espectro do visível correspondente a cor vermelha, enquanto as demais cores complementares são absorvidas. Figura obtida de PASSOS (2020).	24
Figura 22 – Esquema de monocromador com grade de difração para a dispersão da radiação. Figura obtida de PASSOS (2020).....	26
Figura 23 – Esquema de tubo fotomultiplicador. Figura obtida de PASSOS (2020).	27
Figura 24 – Esquema de um espectrofotômetro de feixe duplo. Figura obtida de PASSOS (2020).	27
Figura 25 – Esquema da formação de orbitais moleculares na carbonila (C=O), evidenciando a formação da ligação sigma (σ), a formação da ligação pi (π) e os orbitais atômicos com pares de elétrons isolados. Figura obtida de MARTINHO (1994).	28
Figura 26 – Diagrama de níveis de energia dos orbitais moleculares da carbonila (C=O). Figura obtida de MARTINHO (1994).	29
Figura 27 – Representação das transições HOMO→LUMO que ocorrem durante a absorção de energia luminosa por sistemas insaturados sem conjugação e conjugados. Figura obtida de MARTINS (2015).	30
Figura 28 – Exemplo de deslocamento batocrômico na p-rosanilina pela alteração dos seus grupos amina para grupos aminosulfônicos. a) p-rosanilina; b) mistura de p-rosanilina e o seu análogo aminossulfonado; c) análogo aminossulfonado e d) análogo aminossulfonado em maior concentração. Figura obtida de MARTINS (2015).	31
Figura 29 – Antocianidinas, estruturas básicas das antocianinas e as alterações dos seus sistemas conjugados quando em meios de diferentes pH's. Figura obtida de MARTINS (2015).	32
Figura 30 – Estrutura molecular base das betalaínas. Figura obtida de MARTINS (2015).	32
Figura 31 – Esquema de espectrofotômetro de UV/Vis convencional com rede de difração móvel (a) e do espectrofotômetro multicanal com arranjo de fotodiodos (DAD) (b). Figura obtida de JR & PASQUINI (1997).	33

Figura 32 – Componentes básicos de um espectrômetro de massa com fonte de ionização por eletrospray (IES-EM). Figura adaptada de BANERJEE; MAZUMDAR (2012).	35
Figura 33 – Ionização e fragmentação por Ionização por Elétrons (IE). (A) formação de íons positivamente carregados, (B) formação de íons negativamente carregados. Figura adaptada de EL-ANEED; COHEN; BANOUB (2009).	36
Figura 34 – Histograma do crescente número de publicações de trabalhos usando a técnica de ionização por eletrospray (IES) de 1990 até 2009, após a descoberta de Fenn sobre o uso da ionização por eletrospray como fonte de íons na espectrometria de massa (IES-EM) para a análise de biomoléculas em 1989 (informação do ISI Web of Knowledge em 26.06.2011 com o termo “Eletrospray ionization”. Figura adaptada de BANERJEE & MAZUMDAR (2012).	37
Figura 35 – Esquema da ionização por eletrospray (IES) usada como fonte de íons na espectrometria de massa e as teorias da evaporação iônica e da carga residual na formação dos íons. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).	38
Figura 36 – Esquema dos espectrômetros de massa (a) Thermo-Finnigan LCQ Deca com spray axial, (b) Agilent 6410 Triplo Quadupolo para CL-EM no modo spray ortogonal, (c) Waters Micromass Q-TdV Ultima IES-EM. Figura adaptada de BANERJEE & MAZUMDAR (2012).	39
Figura 37 – Representação do espectro de massa obtido por IES-EM no modo positivo. Figura adaptada de BANERJEE & MAZUMDAR (2012).	40
Figura 38 – Processo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (IDLAM). O cristal matriz-analito é bombardeado com um feixe de laser UV que excita a matriz, que por sua vez, transfere a energia para os analitos, resultando na ionização e na dessorção dos analitos, principalmente na forma de espécies unicamente carregadas. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).	41
Figura 39 – Representação do analisador quadrupolo (Q). Quatro barras elétricas paralelas com variadas correntes diretas e potenciais de radio-frequência alternados. Apenas um íon de determinado m/z possuirá a trajetória correta e chegará intacto ao detector. Os demais colidirão com as barras e serão rejeitados. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).	43
Figura 40 – Representação dos analisadores A) Tempo de voo (TdV) e B) Tempo de voo tipo-reflectron (TdV tipo-reflectron). Figura obtida de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).	45
Figura 41 – Comparação de um espectrômetro de massa simples com analisador único (espectrômetro de um estágio) (desenho superior), e um espectrômetro tandem (com dois analisadores: EM_1 e EM_2) (desenho inferior). No espectrômetro de massa de um estágio, os íons formados na fonte são separados no analisador de massa antes de chegar no detector. No espectrômetro tandem, um íon é selecionado no analisador de massa EM_1 , depois é direcionado para a célula de colisão, posteriormente, para o segundo analisador de massa, EM_2 , que separa os íons produtos antes que eles alcancem o detector. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).	46
Figura 42 – Representação de espectrômetro híbrido Q-TdV. A fonte de ionização é por eletrospray (IES) e os três analisadores são: dois quadrupolos (Q_1 e q_2) e um tempo de voo, este último posicionado ortogonalmente aos quadrupolos. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).	47
Figura 43 – Delineamento experimental do plantio das variedades de batatas-doces: A = pele branca e polpa roxa, B = pele e polpa alaranjadas (IAPAR 69), C = pele e polpa roxas, D = pele roxa e polpa amarela.	49

Figura 44 – Fotografias do experimento para cultivo de batatas-doces orgânicas na Fazendinha Agroecológica do Km 47 (Seropédica-RJ), plantado em 08/11/2017 na Gleba 21 e colhido em 03/04/2018. Da esquerda para a direita, Gleba 21, dia anterior a colheita, e as seguintes no dia da colheita.	50
Figura 45 – Batatas-doces após lavadas, secando ao ar em temperatura ambiente para eliminar excesso da água da lavagem, ordenadas por tamanho para serem contadas e classificadas através da pesagem.	50
Figura 46 – Exemplificação da amostragem e preparo das amostras in natura, cozidas, fritas e reserva (congelada).	51
Figura 47 – Fluxograma da microextração de carotenoides.	53
Figura 48 – Fluxograma da extração de carotenoides.	54
Figura 49 – Fluxograma da extração de antocianinas da batata-doce de polpa roxas.	58
Figura 50 – Modelo do cartucho para Extração em Fase Sólida (EFS) preparado manualmente com coluna de vidro (à esquerda o modelo e à direita um exemplo real).	59
Figura 51 – Utilização do cartucho EFS preparado manualmente para concentração e purificação das antocianinas mostrando as 5 etapas: 1- condicionamento, 2-equilíbrio, 3-carregamento, 4-lavagem e 5-eluição.	60
Figura 52 – (a) Quatorze picos separados por CLAE-DAD e coletados manualmente, no comprimento de onda de 525 nm; (b) Cartucho EFS carregado com antocianinas; c) Cartucho EFS virgem e procedimento de extração.	60
Figura 53 – Perfil cromatográfico em 450 nm do extrato em acetona da batata-doce IAPAR 69 in natura, evidenciando os picos do carotenoide majoritário todo-trans- β -caroteno e do carotenoide Zeinoxantina em quantidade menor. Abaixo do cromatograma estão os espectros de UV/Vis dos picos observados.	68
Figura 54 – Perfil cromatográfico em 450 nm do extrato em acetona da batata-doce IAPAR 69 cozida no vapor, evidenciando o carotenoide majoritário todo-trans- β -caroteno, e quantidades menores dos carotenoides Zeinoxantina e 13-cis- β -caroteno. Abaixo do cromatograma estão os espectros de UV/vis dos picos observados.	69
Figura 55 – Perfil cromatográfico em 450 nm do extrato em acetona da batata-doce IAPAR 69 frita, evidenciando o carotenoide majoritário todo-trans- β -caroteno, e quantidades menores dos carotenoides Zeinoxantina e 13-cis- β -caroteno, além de picos muito menores que se confundem com o ruído da linha de base. Abaixo do cromatograma estão os espectros de UV/vis dos picos observados.	69
Figura 56 – Estrutura molecular da Zeinoxantina.	69
Figura 57 – Perfil cromatográfico em 450 nm de carotenoides isolados de fontes vegetais em acetona, com seus respectivos espectros de UV/vis, evidenciando a ordem de eluição e os tempos de retenção (tR). Figura retirada da página 72 da dissertação de Pacheco (2009).	70
Figura 58 – Perfil cromatográfico em 450 nm de todo-trans- β -caroteno e seus isômeros 13-cis- β -caroteno e 9-cis- β -caroteno em acetona, com seus respectivos espectros de UV/vis, evidenciando a ordem de eluição e os tempos de retenção (tR). Figura adaptada da página 61 da dissertação de Pacheco (2009).	71
Figura 59 – Perfil cromatográfico em 450 nm dos extratos em acetona saponificado e não saponificado da batata-doce de pele roxa e polpa amarela, idênticos, com picos de carotenoides não identificados e seus respectivos espectros de UV/vis, evidenciando a ordem de eluição e os tempos de retenção (tR).	73
Figura 60 – Estrutura molecular da xantofila Violaxantina.	74
Figura 61 – Estrutura molecular de 5 novos carotenoides descobertos e identificados por Maoka et al. (2001) em uma cultivar de batata-doce de polpa amarela de nome “Benimasari”, Ipomoea	

batatas LAM, desenvolvida pelo Centro Nacional de Pesquisa em Agricultura da Região de Kyushu Okinawa (Japão). Figura adaptada de Maoka et al. (2001).	74
Figura 62 – Perfil cromatográfico em 450 nm dos extratos em acetona não saponificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela in natura, cozida e frita, com picos de carotenoides não identificados, evidenciando diferenças nos tamanhos dos picos entre os tratamentos.	76
Figura 63 – Espectros de UV/Vis dos picos 1 a 4 de carotenoides não identificados detectados nos extratos não saponificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela in natura, cozida e frita, evidenciando em alguns casos o aparecimento ou o aumento na banda correspondente à isomerização cis na região do UV (abaixo de 400 nm) nos materiais cozidos e fritos.	77
Figura 64 – Espectros de UV/Vis dos picos 5 a 8 de carotenoides não identificados (exceto o pico 8, todo-trans- β -caroteno) detectados nos extratos não saponificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela in natura, cozida e frita, evidenciando em alguns casos o aparecimento ou o aumento na banda correspondente à isomerização cis na região do UV (abaixo de 400 nm) nos materiais cozidos e fritos.	78
Figura 65 – Espectros de UV/Vis dos picos 9 a 11 de carotenoides não identificados detectados nos extratos não saponificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela in natura, cozida e frita.	79
Figura 66 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres em 325 nm da batata doce de pele roxa e polpa amarela - D onde foi observado um derivado de ácido cinâmico (1), provavelmente derivado de ácido cafeico.	81
Figura 67 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da batata doce de pele roxa e polpa amarela - D em 325 nm, onde foram observados os ácidos cafeico (1), p-cumárico (2) e ferúlico (3).	82
Figura 68 – Tempos de retenção (t_R) em minutos (min), espectros de UV/Vis e estruturas moleculares dos padrões de substâncias fenólicas utilizados para identificação por comparação com as substâncias fenólicas livres e hidrolisadas extraídas das variedades de batatas-doce in natura estudadas: Ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzóico, metil-galato, ácido 2,5-dihidroxibenzóico, ácido 4-hidroxifenilacético, catequina, ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido 3-hidroxibenzóico, ácido clorogênico e ácido cafeico.	83
Figura 69 – Tempos de retenção (t_R) em minutos (min), espectros de UV/Vis e estruturas moleculares dos padrões de substâncias fenólicas utilizados para identificação por comparação com as substâncias fenólicas livres e hidrolisadas extraídas das variedades de batatas-doce in natura estudadas: Ácido sirínico, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido 3-fenilático, ácido ferúlico, ácido m-cumárico, ácido sinápico, ácido 3-metoxicinâmico, ácido elágico, rutina, quercetina 3-glicosídeo e ácido 2,4-dimetoxibenzóico.	84
Figura 70 – Tempos de retenção (t_R) em minutos (min), espectros de UV/Vis e estruturas moleculares dos padrões de substâncias fenólicas utilizados para identificação por comparação com as substâncias fenólicas livres e hidrolisadas extraídas das variedades de batatas-doce in natura estudadas: Ácido o-cumárico, ácido p-metoxibenzóico, narirutina, quercetrina, miricetina, naringina, neohesperidina, ácido rosmarínico, hesperidina, morina, quercetina e ácido trans-cinâmico.	85
Figura 71 – Tempos de retenção (t_R) em minutos (min), espectros de UV/Vis e estruturas moleculares dos padrões de substâncias fenólicas utilizados para identificação por comparação com as substâncias fenólicas livres e hidrolisadas extraídas das variedades de batatas-doce in natura estudadas: Luteolina, ácido p-metoxicinâmico, ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico,	

naringenina, apigenina, kaempferol, hesperitina, isorhamnetina, rhamnetina, crisina e galangina.	86
Figura 72 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de ácidos fenólicos e flavonoides livres da folha da batata doce de pele roxa e polpa amarela - D em 325 nm onde foram observados: ácido protocatecuico (1), derivado de ácido fenólico (3), derivados de ácido cinâmico (2, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13), ácido clorogênico (4), rutina (8), isoquercetrina (9).....	88
Figura 73 – Cromatogramas e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da folha da batata doce de pele roxa e polpa amarela - D em 325 nm onde foram observados derivados de ácido cinâmico (1, 8, 9, 10, 12, 14 e 15), derivados de ácido hidroxibenzóico (2 e 3), desconhecidos (4, 5, 6), ácido cafeico (7), ácido p-cumárico (11) e ácido ferúlico	89
Figura 74 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres em 325 nm da batata doce de pele branca e polpa roxa - A onde foram observados dois derivados de ácido cinâmico (1 e 2), um deles provavelmente derivado de ácido cafeico (2).	90
Figura 75 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da batata doce de pele branca e polpa roxa - A em 325 nm onde foram observados ácido cafeico (1), ácido p-cumárico (2), derivados de ácido cinâmico, provavelmente de cafeico (3, 5, 6, 7 e 8) e ácido ferúlico (4).....	91
Figura 76 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de ácidos fenólicos e flavonoides livres da folha da batata doce de pele branca e polpa roxa - A em 325 nm onde foram observados derivados de ácido cinâmico, provavelmente de ácido cafeico (1, 3, 4, 9, 10, 11 e 12), ácido clorogênico (3), flavonoides não identificados (5 e 8), rutina (6) e isoquercetrina (7).	92
Figura 77 – Cromatogramas e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da folha da batata doce de pele branca e polpa roxa - A em 325 nm onde foram observados flavonoides ou ácidos fenólicos não identificados (1, 3, 4, 5, 7, 8, 13 e 14), ácido p-hidroxibenzóico (2), ácido cafeico (6), ácido p-cumárico (9), ácido ferúlico (10) e isoquercetrina (12).....	93
Figura 78 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres em 325 nm da batata doce de pele e polpa roxas - C onde foi observado um derivado de ácido cinâmico (1), provavelmente derivado de ácido cafeico (2).	94
Figura 79 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da batata doce de pele e polpa roxas - C em 325 nm onde foram observados ácido cafeico (1), ácido p-cumárico (3), ácido ferúlico (5) e outros picos não identificados, provavelmente derivados de ácido cinâmico ou flavonoides (2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11).....	95
Figura 80 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD no extrato de ácidos fenólicos e flavonoides livres da folha da batata doce de pele e polpa roxas - C em 325 nm onde foram observados ácido clorogênico (3) e picos não identificados, derivados de ácido cinâmico, provavelmente de ácido cafeico (2, 3, 4 e 5).....	96
Figura 81 – Cromatogramas e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da folha da batata doce de pele e polpa roxas - C em 325 nm onde foram observados ácido p-hidroxibenzóico, ácido cafeico (2), ácido p-cumárico (3), ácido ferúlico (4) e flavonoides ou ácidos fenólicos não identificados (5 e 6).	96

Figura 82 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres em 325 nm da batata doce de pele e polpa alaranjadas IAPAR 69 - B onde foi observado um derivado de ácido cinâmico (1), provavelmente derivado de ácido cafeico.....	97
Figura 83 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da batata doce de pele e polpa alaranjadas IAPAR 69 - B em 325 nm onde foram observados os ácidos cafeico (1) e p-cumárico (2).....	98
Figura 84 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres da folha da batata doce de pele e polpa alaranjadas IAPAR 69 - B em 325 nm onde foram observados os ácidos clorogênico (1) , substâncias não identificadas que parecem ser derivadas de ácido cinâmico ou derivadas de flavonoides (2, 5, 6, 7, 8 e 9), rutina (3) e isoquercetrina (4).....	99
Figura 85 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos obtidos por hidrólise da folha da batata doce de pele e polpa alaranjadas IAPAR 69 - B em 325 nm onde foram observados os ácidos cafeico (1), p-cumárico (2), ferúlico (3), 3-hidroxi-4-metoxicinâmico e substâncias não identificadas que parecem ser derivadas de ácido cinâmico ou derivadas de flavonoides (4, 6 e 7).....	100
Figura 86 – Espectros de UV/Vis de antocianinas do extrato da batata-doce de pele branca e polpa roxa em diferentes pHs. No canto superior direito está um gráfico em escala ampliada da região dos espectros em torno de 530 nm.	101
Figura 87 – Espectros de UV/Vis de antocianinas do extrato da batata-doce de pele e polpa roxas em diferentes pHs. No canto superior direito está um gráfico em escala ampliada da região dos espectros em torno de 530 nm.	102
Figura 88 – Espectros de UV/Vis característicos de antocianinas de rabanete (derivadas de pelargonidina-3-soforosídeo-5-glicosídeo) em tampões pH = 1,0 e pH = 4,5. Figura adaptada de Giusti (2001) na página F1.2.1.	102
Figura 89 – Esquema do processo de separação, isolamento e purificação para a identificação das antocianinas. As setas, de cima para baixo, indicam a ordem das análises realizadas. As antocianinas extraídas da batata-doce de pele e polpa roxas in natura foram separadas por CLAE-DAD para obtenção do cromatograma com quatorze picos em 525 nm. O pico cinco foi coletado manualmente na saída do detector e depois analisado pelo QTDV-EM ² para obter o espectro de massa que permitiu a identificação da estrutura molecular em comparação aos dados publicados por diversos autores. Esse mesmo procedimento foi feito para identificar as antocianinas presentes nos quatorze picos. Figura retirada do artigo publicado com resultados desta tese (JESUS et al., 2020).....	104
Figura 90 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6''-O-p-hidroxibenzoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 1...	105
Figura 91 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, detectada pela primeira vez em batata-doce de polpa roxa, coletada no pico 2.	106
Figura 92 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 3.	106
Figura 93 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6''-O-feruloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 3.	107
Figura 94 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 4.	108
Figura 95 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 6.	108
Figura 96 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6''-O-feruloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 5.	109

Figura 97 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6'',6'''- O-dicafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 5.	109
Figura 98 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6-O-p-hidroxibenzoil-6-O-cafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 6.....	110
Figura 99 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6-O-cafeoil-6-O-feruloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 7...	111
Figura 100 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6''-O-cafeoyl-6'''-O-feruloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 7.	111
Figura 101 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6'',6'''-O-dicafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 8.	112
Figura 102 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, reportada pela primeira vez por Truong (2010) e investigada por He (2016) que este trabalho sugere ser a peonidina 3-O-(6-O-cafeoil-6-O-vaniloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 8.....	112
Figura 103 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6''-O-cafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 8.	113
Figura 104 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 8.	114
Figura 105 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6-O-p-hidroxibenzoil-6-O-cafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo coletada no pico 9.....	115
Figura 106 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da Peonidina 3-O-cafeoil-feruloil soforosídeo-5-O-glicosídeo, coletada no pico 10.....	115
Figura 107 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 10.	116
Figura 108 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da Peonidina 3-O-cumaroil-p-hidroxibenzoil soforosídeo-5-O-glicosídeo, coletada no pico 11.	117
Figura 109 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-feruloil-p-hidroxibenzoil soforosídeo-5-O-glicosídeo, coletada no pico 12.	117
Figura 110 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6-feruloil-6-p-cumaroil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 13.	118
Figura 111 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da Peonidina 3-O-(6'',6'''- O-diferuloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo coletada no pico 14.	119
Figura 112 – Esquema do processo de separação, isolamento e purificação para a identificação das antocianinas executado. As setas, de cima para baixo, indicam a ordem das análises realizadas. As antocianinas extraídas da batata-doce de pele branca e polpa roxa in natura foram separadas por CLAE-DAD para obtenção do cromatograma mostrando onze picos em 525 nm. O pico sete foi coletado manualmente na saída do detector e depois analisado pelo QTDV-EM ² para obter o espectro de massa que permitiu a identificação da estrutura molecular em comparação aos dados publicados por diversos autores. Esse mesmo procedimento foi feito para identificar as antocianinas presentes nos onze picos. Figura retirada do artigo publicado com resultados desta tese (JESUS et al., 2021).	122
Figura 113 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6-O-feruloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 2 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.	123

Figura 114 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6''-feruloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 3 da batata-doce de pele branca e polpa roxa.....	123
Figura 115 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6'',6'''-O-dicafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 4 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.	124
Figura 116 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6''-O-cafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 5 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.	125
Figura 117 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6-O-cafeoil -6-O-p-hidroxibenzoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 5 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.....	125
Figura 118 – - Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6-O-cafeoil-6-O-feruloil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, coletada no pico 7 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.	126
Figura 119 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6-O-cumaroil-6-O-cafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, coletada no pico 8 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.	127
Figura 120 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da pelargonidina 3-O-(6'',6'''-O-dicafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, coletada no pico 8 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.	127
Figura 121 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6'',6'''-O-dicafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, coletada no pico 9 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.	128
Figura 122 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6-O-cafeoil-6-O-feruloil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, coletada no pico 9 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.	128
Figura 123 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6-O-p-cumaroil-6-O-feruloil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, coletada no pico 10 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.....	129
Figura 124 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6-O-feruloil-6-O-cafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, coletada no pico 11 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.	129
Figura 125 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6-O-p-cumaroil-6-O-cafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, coletada no pico 11 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.....	130
Figura 126 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da pelargonidina 3-O-(6-O-cafeoil-6-O-feruloil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, coletada no pico 11 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.....	130
Figura 127 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de antocianinas das batatas-doces de pele e polpa roxas (esquerda) e pele branca e polpa roxa (direita) em 530 nm.	132
Figura 128 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 1 a 5 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele e polpa roxas in natura, cozida e frita.	133
Figura 129 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 6 a 10 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele e polpa roxas in natura, cozida e frita.....	134
Figura 130 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 11 a 15 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele e polpa roxas in natura, cozida e frita.....	135

Figura 131 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 16 a 18 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele e polpa roxas in natura, cozida e frita.....	136
Figura 132 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 1 a 5 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele branca e polpa roxa in natura, cozida e frita.	137
Figura 133 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 6 a 10 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele branca e polpa roxa in natura, cozida e frita.....	138
Figura 134 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 11 a 15 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele branca e polpa roxa in natura, cozida e frita.....	139
Figura 135 – Curva de calibração da cianidina-3-glicosídeo em 520 nm por CLAE-DAD (Área (U.A.) X Concentração (mg mL^{-1})) com a Equação utilizada para o cálculo das concentrações dos extratos de antocianinas de batata-doce em equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por CLAE-DAD.	140

LISTA DE EQUAÇÕES

<i>Equação 1</i>	22
<i>Equação 2</i>	25
<i>Equação 3</i>	25
<i>Equação 4</i>	25
<i>Equação 5</i>	25
<i>Equação 6</i> ..	25
<i>Equação 7</i>	25
<i>Equação 8</i>	25
<i>Equação 9</i> ..	25
<i>Equação 10</i>	25
<i>Equação 11</i>	44
<i>Equação 12</i>	44
<i>Equação 13</i>	52
<i>Equação 14</i>	55
<i>Equação 15</i>	62
<i>Equação 16</i>	62
<i>Equação 17</i>	63
<i>Equação 18</i>	64

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ε - absorvidade molar, expressa em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

λ - comprimento de onda

ω - frequência

π - ligação covalente pi, formada pela interação entre os orbitais atômicos posicionados paralelamente para a formação do orbital molecular

σ - ligação covalente sigma, formada pela sobreposição frontal de orbitais atômicos para formação do orbital molecular

ν - número de onda

π^* - orbital pi antiligante

σ^* - orbital sigma antiligante

A – absorvância

AIF - Analisadores por Injeção em Fluxo (FIA, em inglês)

auxocromos - grupos químicos que quando ligados a cromóforos, alteram a intensidade e o comprimento de onda (λ) de máxima absorção no UV/Vis das moléculas

b – caminho óptico

BAR - ionização por bombardeamento atômico rápido

C – concentração do analito em mol L^{-1}

c – velocidade da luz

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CE - Cromatografia por Exclusão

CFG - Cromatografia por Filtração em Gel

CG – Cromatografia Gasosa

CG-EM – Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa

CGL – Cromatografia Gás-Líquido

CGS – Cromatografia Gás-Sólido

CL – Cromatografia Líquida

CL-EM - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector de Arranjo de Diodos

CLFL - Cromatografia Líquida com Fase Ligada

CLL - Cromatografia Líquido-Líquido

CLUE - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CP - Cromatografia em Papel

CPG – Cromatografia por Permeação em Gel

cromóforos – grupos químicos das moléculas que conferem a propriedade de absorção de energia no UV/Vis

CSC – Cromatografia com Fluido Súper-crítico

CTD - dispositivos de transferência de carga

CTI - Cromatografia por Troca Iônica

Da - Daltons (unidade de medida de massa molecular)

DAC - dissociação ativada por colisão

DAD - Detector de Arranjo de Diodos

DC - corrente elétrica direta

deslocamento batocrômico – deslocamento do comprimento de onda absorvido para um valor maior

deslocamento hipsocrômico – deslocamento do comprimento de onda absorvido para um valor menor

DF - Detector de Fluorescência

DIC - dissociação induzida por colisão

DIR - Detector de Índice de Refração

dm – distância percorrida pelo eluente

DP - Ionização por Dessorção por Plasma

ds – distância percorrida pela substância

E – Energia

efeito hipercrômico – aumento da intensidade de absorção dos comprimentos de onda

efeito hipocrômico - diminuição da intensidade de absorção dos comprimentos de onda

EFS - Extração em Fase Sólida

EM - Detector de massas, espectrômetro de massa ou espectrometria de massa

EM/EM, ou EM² - técnica de acoplamento em série de espectrômetros de massa, em inglês: “tandem mass spectrometry”

f - Frequência

HOMO - orbitais moleculares ligantes

IAPAR 69 – cultivar de batata-doce de pele e polpa alaranjadas desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR)

ICP-AAS - espectrofotômetros de absorção atômica em plasma acoplado indutivamente

IDLAM - Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz

IDLMM - ionização por dessorção a laser melhorada pela matriz

IE – Ionização por Impacto de Elétrons

IES - Ionização por Eletrospray

IES-EM - Ionização por Eletrospray-Espectrometria de Massa

IESD - ionização por eletrospray dessorção

IQ - ionização química

ISLEM - espectrometria de massa de íon secundário líquido

IV – espectro eletromagnético Infravermelho

LUMO - orbitais moleculares antiligantes

m/z - razão massa/carga da molécula

mg – miligrama

mL – mililitros

mm – milímetros

n - elétrons de pares isolados não ligantes

nm – nanômetros

P – energia transmitida através de solução da amostra

P₀ – energia incidente na amostra

pg – pictogramas

Q - analisador de massa tipo quadrupolo

QqQ - triplo quadrupolo, três analisadores do tipo quadrupolos acoplados sequencialmente

QTdV – Detectores de massas Quadrupolo - Tempo de Voo

QTI – analisador quadrupolo com trap iônico

rf ou V- potencial de rádio-frequência

R_f – ds/dm

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

T – transmitância, razão entre energia transmitida pela energia incidente

TdV - analisador de massa do tipo tempo de voo

TF-RCI – analisador de ressonância ciclotrônica iônica com transformada de Fourier

TOM - Teoria dos Orbitais Moleculares

tR – tempo de Retenção

U – potencial elétrico

UV - espectro de luz ultravioleta

UV/Vis – Detector Ultravioleta/Visível

Vis - espectro de luz visível

μm – micrometros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
Objetivo Geral	2
Objetivos específicos	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Agricultura orgânica	3
2.2 Batata-doce	4
2.3 Pigmentos naturais antioxidantes das raízes de batata-doce	5
2.3.1 Carotenoides	5
2.3.2 Carotenoides na batata-doce	10
2.3.3 Antocianinas	10
2.3.4 Antocianinas na batata-doce	13
2.4 Ácidos fenólicos	14
2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	16
2.6 Detectores utilizados na CLAE	21
2.7 Espectroscopia	22
2.8 Espectroscopia Molecular na Região do Ultravioleta Visível e os Detectores de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) e de Arranjo de Diodos (DAD)	27
2.9 Espectrometria de Massa e o Espectrômetro de Alta Resolução	34
2.9.1 Ionização por Eletrospray-Espectrometria de Massa (IES-EM)	37
2.9.2 Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (IDLAM)	40
2.9.3 Analisadores de Massa	43
2.9.4 Analisador Quadrupolo (Q)	43
2.9.5 Analisador Tempo de Vôo (TdV)	44
2.9.6 Espectrometria de Massa Tandem	45
2.9.7 Espectrômetro de Massa Híbrido: Quadrupolo Ortogonal ao Tempo de Vôo (Q-TdV)	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Plantio de Batatas-doces sob Sistema Orgânico	49
3.2 Colheita das Variedades de Batata-doce	50
3.3 Preparo das amostras de batatas-doces <i>in natura</i> para análises químicas	51
3.4 Preparo das amostras de batatas-doces cozidas para análises químicas	51
3.5 Preparo das amostras para análise de batatas-doces fritas	51
3.6 Determinação do Peso Seco	52
3.7 Análise de Carotenoides	52
3.8 Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos	55

3.9	Obtenção de antocianinas purificadas para identificação	57
3.10	Quantificação de Antocianinas Totais por Espectrofotometria UV/Vis e Análise de Perfil e Quantificação por CLAE-DAD	61
3.11	Quantificação de Antocianinas Monoméricas totais pela metodologia do pH diferencial	63
3.12	Análise de varredura para obtenção do espectro de UV/Vis dos extratos de antocianinas das batatas-doces de polpa roxa em diferentes pHs	64
3.13	Tratamento estatístico dos dados brutos	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	Rendimento dos Cultivos de Batatas-doces sob Sistema Orgânico	66
4.2	Peso seco da batatas-doces <i>in natura</i> , cozidas e fritas	66
4.3	Carotenoides totais da batata-doce da variedade IAPAR 69 <i>in natura</i> , cozida e frita	67
4.4	Carotenoides totais da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela <i>in natura</i> , cozida e frita	67
4.5	Análises do perfil e quantificação dos carotenoides identificados na variedade IAPAR 69 <i>in natura</i> , cozida e frita	68
4.6	Análises do perfil e quantificação dos carotenoides não identificados na variedade de pele roxa e polpa amarela <i>in natura</i> , cozida e frita	72
4.7	Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos da polpa e da folha da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela	81
4.8	Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos da polpa e da folha da batata-doce da variedade de pele branca e polpa roxa	90
4.9	Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos da polpa e da folha da batata-doce da variedade de pele e polpa roxas	94
4.10	Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos da polpa e da folha da batata-doce da variedade IAPAR 69	97
4.11	Análise de varredura para obtenção do espectro de UV/Vis dos extratos de antocianinas das batatas-doces de polpa roxa em diferentes pHs	100
4.12	Análises do perfil e identificação das antocianinas isoladas e purificadas da batata-doce de pele e polpa roxas <i>in natura</i> por CLAE-DAD, espectrofotometria UV/Vis e IE-QTDV-EM ²	103
4.13	Análises do perfil e identificação das antocianinas isoladas e purificadas da batata-doce de pele branca e polpa roxa <i>in natura</i> por CLAE-DAD e IE-QTDV-EM ²	121
4.14	Comparação dos perfis e quantificação das antocianinas por CLAE-DAD, quantificação de antocianinas totais por Espectrofotometria UV/Vis e pelo método do pH diferencial das variedades de batatas-doces de polpa roxa <i>in natura</i> , cozida e frita	132
4	CONCLUSÕES	143

5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
6	PUBLICAÇÕES DE ALGUNS RESULTADOS	152
	APÊNDICE A – TRATAMENTO ESTATÍSTICO	153
	A1 - Rendimento dos Cultivos de Batatas-doces sob Sistema Orgânico	153
	A2 - Peso seco da batatas-doces <i>in natura</i> , cozidas e fritas	155
	A3 - Carotenoides totais da batata-doce da variedade IAPAR 69 <i>in natura</i> , cozida e frita	163
	A4 - Carotenoides totais da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela <i>in natura</i> , cozida e frita	166
	A5 - Análises do perfil e quantificação dos carotenoides identificados na variedade IAPAR 69 <i>in natura</i> , cozida e frita	168
	A6 - Análises do perfil e quantificação dos carotenoides não identificados na variedade de pele roxa e polpa amarela <i>in natura</i> , cozida e frita	171
	A7 - Comparação dos perfis e quantificação das antocianinas por CLAE-DAD, quantificação de antocianinas totais por Espectrofotometria UV/Vis e pelo método do pH diferencial das variedades de batatas-doces de polpa roxa <i>in natura</i> , cozida e frita	179

1. INTRODUÇÃO

Há uma crescente demanda por alimentos saudáveis, que contenham substâncias naturais e funcionais, como alternativa aos aditivos sintéticos. Os pigmentos naturais de fontes que possuam longa história de uso sem efeitos adversos são uma alternativa aos corantes sintéticos, pois não possuem limites legais de concentração ou proibições de uso como ocorre no caso dos corantes sintéticos, devido a toxidez, efeitos alergênicos e cancerígenos. Além disso, muitos pigmentos naturais conhecidos, como os carotenoides e as antocianinas são metabólitos secundários de plantas, com inúmeras atividades biológicas. Em geral, apresentam potencial antioxidante capaz de reduzir o risco de doenças degenerativas e, no caso particular dos carotenoides, alguns possuem atividade pró-vitamina A.

Também tem crescido a conscientização da população em relação as formas sustentáveis de produção, que não sejam agressivas ao meio ambiente, que garantam a manutenção dos recursos naturais e de um ambiente saudável para as gerações atuais e futuras, que sejam capazes de prover alimentos, reduzir a pobreza, a fome, a desnutrição e trazer equilíbrio social e econômico. As formas agroecológicas de produção de alimentos, como os sistemas orgânicos, que permitem a regeneração dos recursos naturais sem uso de fertilizantes sintéticos minerais ou agrotóxicos, tem atraído muitos adeptos. Porém, os estudos científicos da parte agrônoma, nutricional e funcional que embasam essas novas formas produtivas ainda são poucos e recentes.

Poucos estudos mostram maiores teores de metabólitos secundários, como os pigmentos naturais, em produtos agroecológicos, comparado àqueles produzidos em sistemas agrícolas convencionais. Sugerindo que na agricultura orgânica, por não usar intensivamente pesticidas, as plantas estariam mais sujeitas ao ataque de pragas, portanto produziriam maiores teores destes fitoquímicos para se protegerem.

As batatas-doces possuem variedades de cores diferentes devido à presença dos pigmentos naturais carotenoides e antocianinas. É um vegetal historicamente consumido em várias culturas, bem aceito, acessível e nutritivo. Recentemente, muitos estudos surgiram em torno da investigação das antocianinas e carotenoides presentes nas batatas-doces e de seus comportamentos em relação às variáveis de processamento (aquecimento, pH, interação com outras substâncias da matriz do alimento), biodisponibilidade, bioacessibilidade, potencial antioxidante e funcionalidades. Há poucos artigos publicados com identificação desses corantes, publicados apenas nos últimos 30 anos e, há novos pigmentos, da classe das antocianinas, ainda sendo descobertos e relatados nesse vegetal. Há apenas 14 trabalhos na base SCOPUS com novas antocianinas relatadas em batata-doce.

Os perfis de pigmentos de duas variedades avaliadas neste trabalho são diferentes daqueles apresentados na literatura, inclusive com substâncias que não haviam sido encontradas anteriormente em batatas-doces, fato que comprova a hipótese de que ainda há novas substâncias para serem estudadas nessas variedades.

As batatas-doces coloridas foram escolhidas como matrizes de estudo neste trabalho, por serem vegetais rústicos, com altos teores de carotenoides e antocianinas, pouco exigentes em relação aos insumos agrícolas (fertilizantes, pesticidas) e condições edafoclimáticas de produção. Portanto, representam uma alternativa para fortalecer a agricultura orgânica e a agricultura familiar, que são formas de produção que atendem as demandas da sociedade citadas anteriormente em relação ao desenvolvimento econômico e social, produção sustentável, alimentos saudáveis e preservação do meio-ambiente.

As variedades coloridas são mais valorizadas regionalmente por agricultores familiares em detrimento da variedade de polpa branca que é mais disseminada no país. As coloridas não

são encontradas nos supermercados dos grandes centros urbanos que são abastecidos por grandes produtores que investem apenas na produção da variedade de polpa branca, pobre em antocianinas e carotenoides, porém de maior produtividade. Portanto, incentivar o cultivo dessas variedades coloridas por agricultores familiares orgânicos é uma forma de preservar a diversidade de vegetais para consumo humano, além da presença da cor e das substâncias funcionais serem diferenciais que agregam valor aos produtos orgânicos.

Apesar dos altos teores de carotenoides e antocianinas nas variedades de batata-doce deste estudo, há fatores que podem favorecer ou impedir que estas substâncias sejam liberadas do alimento, sejam absorvidas após o processo digestivo e que exerçam atividade biológica no organismo humano. Tais fatores estão relacionados com as propriedades químicas desses pigmentos, da matriz do alimento, suas formas de preparo, processo digestivo entre outras. Alguns trabalhos evidenciam que as antocianinas aciladas, do tipo que predominam em algumas variedades de batata-doces, são mais resistentes à degradação durante processamento.

Pelas razões apresentadas, a proposta deste trabalho foi investigar os carotenoides e antocianinas das variedades de batata-doce coloridas escolhidas, cujo perfil ainda não foi completamente elucidado nos trabalhos científicos existentes, e também, o comportamento destas substâncias nas formas de preparo mais consumidas (cozida e frita) comparando com a forma *in natura*, pouco consumida, para obter informações sobre a preservação (Retenção) dessas substâncias.

Para isso os objetivos gerais e específicos deste trabalho foram:

Objetivo Geral

Caracterizar, identificar e quantificar os carotenoides e antocianinas de quatro variedades de batatas-doces cultivadas em sistema orgânico e avaliar a retenção e perfil sob diferentes formas de preparo.

Objetivos específicos

- Cultivar quatro variedades de batatas-doces sob manejo orgânico com delineamento experimental estatístico para obtenção de variações oriundas do cultivo, além de garantir a origem das amostras;
- Adaptar metodologia para extração, separação e quantificação das antocianinas na matriz batata-doce utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) já que, as metodologias existentes para a extração e análise de antocianinas em frutos e mesmo em outras variedades de batatas-doces, após testadas, não foram eficazes para as variedades desta Tese;
- Obter o perfil de ácidos fenólicos e flavonoides das variedades de batatas-doces por CLAE-DAD
- Obter o perfil e quantificação de carotenoides e antocianinas nas variedades de batatas-doces (*in natura*, cozidas e fritas) por CLAE-DAD, utilizando metodologia conhecida para os carotenoides, e a metodologia adaptada na etapa anterior para as antocianinas dessa matriz;
- Separar e purificar os carotenoides e antocianinas não identificados através da técnica da CLAE-DAD e submetê-los à Espectrometria de Massas de Alta Resolução para obtenção e espectros com as massas exatas das moléculas e fragmentos e comparação com os espectros de massas disponíveis na literatura para identificar ou sugerir estruturas químicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agricultura orgânica

A agricultura orgânica é um processo produtivo agroecológico sustentável, que busca a organicidade e sanidade da produção de alimentos vivos para garantir a saúde dos seres humanos. Ela usa e desenvolve tecnologias apropriadas à realidade local de solo, topografia, clima, água, radiações e biodiversidade. A agricultura orgânica não utiliza agrotóxicos, preserva a qualidade da água usada na irrigação e não polui o solo nem o lençol freático. Além disso, a agricultura orgânica usa manejo mínimo do solo assegurando sua estrutura e fertilidade, prevenindo erosões e degradação, contribuindo para promover e restaurar biodiversidade. As práticas da agricultura orgânica, assim como as demais sob a denominação de biológica, ecológica, biodinâmica, agroecológica e natural, comprometidas com a sustentabilidade local da espécie humana na terra, todas simplesmente nomeadas ou conhecidas como agricultura alternativa ou orgânica, empregam:

- Adubação verde através de leguminosas fixadoras de nitrogênio;
- Adubação orgânica com uso de compostagem da matéria orgânica (que pela fermentação elimina micro-organismos como fungos e bactérias patogênicos, eventualmente existentes em esterco de origem animal) desde que provenientes da própria região;
- Minhocultura, geradora de húmus com diferentes graus de fertilidade; manejo mínimo e adequado do solo com plantio direto e curvas de níveis para assegurar sua estrutura, fertilidade e porosidade;
- Manejo da vegetação nativa, como cobertura morta, rotação de culturas e cultivos protegidos para controle da luminosidade, temperatura, umidade, pluviosidade e intempéries;
- Uso racional da água de irrigação seja por gotejamento ou demais técnicas econômicas de uso da água, de acordo com a realidade local de topografia, clima, variação climática e hábitos culturais de sua população.

A agricultura orgânica é uma das formas agroecológicas de produção, assim como a agricultura biodinâmica, a agricultura natural, a agrofloresta, a permacultura entre outros sistemas produtivos.

A Agroecologia é um conceito ou disciplina científica de uma prática agrícola associada a um movimento social e político que une os conhecimentos científicos, populares e tradicionais de agricultores familiares ou comunidades indígenas e camponesas. A agroecologia preconiza a mitigação da degradação ambiental, social e política causada pelo modelo econômico vigente. É a passagem da maneira convencional de produzir, com agrotóxicos e outros contaminantes, para novas maneiras de fazer agricultura, com tecnologias de base ecológica. A agroecologia surgiu há mais de 50 anos com a preocupação pela preservação dos recursos naturais e com os critérios de sustentabilidade, para garantir a preservação do solo, dos recursos hídricos, da vida silvestre, dos ecossistemas naturais e garantia da segurança alimentar. A agroecologia é baseada nas dinâmicas da natureza e na sucessão natural a qual permite que se restaure a fertilidade do solo sem o uso de fertilizantes minerais e que se cultive sem uso de agrotóxicos. (SILVA, 2010).

A agroecologia condena a produção centrada na monocultura, a dependência de insumos químicos e a alta mecanização, a concentração de terras produtivas, a exploração do trabalhador rural e o consumo não local da respectiva produção. Ela preconiza a resistência da agricultura

familiar, pois é baseada na pequena propriedade, na mão de obra familiar, sistemas produtivos adaptados às condições locais e em redes regionais de produção e distribuição de alimentos. É uma alternativa de vida e consumo que respeita as formas de vida, o meio ambiente, a interação homem-natureza e a saúde de ambos. Transforma o espaço físico sem causar impactos ambientais. A agroecologia sistematiza e consolida os saberes empíricos, tradicionais ou científicos para a realização de uma agricultura ambientalmente sustentável, economicamente eficiente e socialmente justa (SILVA, 2010).

2.2 Batata-doce

A batata-doce (Figura 1) é a raiz tuberosa da espécie botânica *Ipomoea batatas* L. (família Convolvulaceae), nativa dos Andes e cultivada na América do Sul há séculos. Apesar de ser um alimento consumido *in natura*, cozido, assado ou frito, é uma alternativa para a elaboração de alimentos industrializados para celíacos e também como pigmento natural com capacidade para aumentar a funcionalidade nutricional dos alimentos devido à presença de substâncias bioativas com potencial antioxidante.

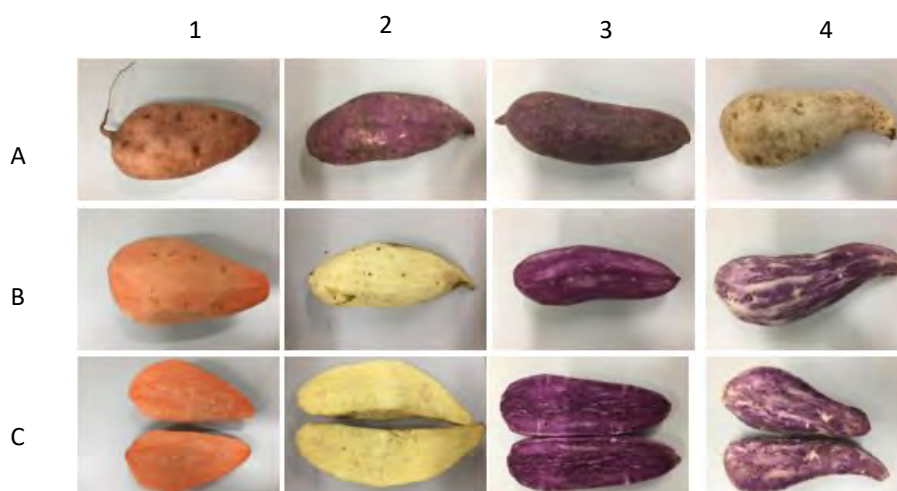


Figura 1 - Quatro variedades de batatas-doces, da esquerda para a direita, na primeira coluna: de pele e polpa alaranjadas (IAPAR 69), na segunda coluna: de pele roxa e polpa amarelada, na terceira coluna: de pele e polpa roxas e na quarta coluna: de pele branca e polpa roxa. Na linha A, as batatas estão inteiras, na linha B as batatas estão sem a pele e na linha C estão suas metades em corte longitudinal.

As batatas-doces são muito utilizadas no Japão na forma de farinha, em substituição à farinha de trigo e corantes artificiais na fabricação de pães, massas, sucos, bebidas fermentadas e produtos de confeitaria (SHAN et al., 2012). É um alimento nutricionalmente valioso devido ao alto teor de carboidratos, aminoácidos, fibras, vitaminas e alta atividade antioxidante, que supera o de outras hortaliças de consumo comum no mundo (KIM et al., 2012; DENG et al., 2013; RUMBAOA; CORNAGO; GERONIMO, 2009).

Além disso, é uma cultura industrialmente importante e de alto rendimento muito utilizada no combate à fome, amplamente consumida na Ásia e na África, com variedades de cores e diversos conteúdos nutricionais, como as de polpa branca, creme, amarela, laranja e púrpura, com diferentes quantidades de carotenoides, antocianinas e ácidos fenólicos, incluindo os ácidos clorogênicos. Tem atraído atenção devido ao conteúdo de substâncias bioativas

antioxidantes, principalmente carotenoides que dão cor às variedades de polpa amarela ou alaranjada, e as antocianinas, responsáveis pela coloração naquelas de polpa roxa (KIM et al., 2015; TEOW et al., 2007; WANG; CLIFFORD; SHARP, 2008).

Embora suas raízes sejam as partes mais consumidas, as suas folhas e caules também são comestíveis. O conteúdo de nutrientes e fitoquímicos funcionais varia em função do genótipo, condições edafoclimáticas e tipos de cultivo, parte da planta e tipo de processamento. Os carboidratos estão predominantes nas raízes, variando de 42,4 % a 77,3%; seguido de fibras, que variam de 1,9 a 6,4%; proteínas, de 1,3 a 9,5%; cinzas, de 1,1 a 4,9% e lipídeos, de 0,2 a 3,0% da matéria seca. Já nas folhas, o conteúdo de carboidratos, fibras, proteínas, cinzas e lipídeos variam de 42,0-61,3%; 5,9-14,3%; 3,7-31,1%; 1,5-14,7% e 0,3-5,3% da matéria seca, respectivamente. O amido de batata-doce possui tamanhos que variam de 2 a 45µm e formatos arredondados, poligonais, ovais ou semi-ovais com conteúdo de amilose que varia de 0 a 34,16%. O conteúdo de açúcares é em torno de 3,8%, onde predominam sacarose, maltose e glicose (WANG; NIE; ZHU, 2016).

2.3 Pigmentos naturais antioxidantes das raízes de batata-doce

O estudo de pigmentos naturais é uma área muito ativa atualmente devido ao crescente interesse na substituição de corantes sintéticos com efeitos tóxicos como alergias, reações inflamatórias intestinais, desordens imunológicas e neurológicas principalmente em crianças. Já que o aumento do consumo de corantes sintéticos está relacionado a alterações comportamentais, como agressividade, déficits de atenção e hiperatividade (VOJDANI; VOJDANI, 2015).

Os carotenoides e as antocianinas estão entre os pigmentos vegetais mais utilizados pela indústria alimentícia (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Como estas substâncias estão presentes em grandes quantidades em muitas variedades de batata-doce, este vegetal tem elevado potencial para uso na área de corantes alimentícios.

2.3.1 Carotenoides

Os carotenoides são substâncias lipossolúveis geralmente compostas de oito unidades do isopreno. São tetraterpenos cujas duplas ligações conjugadas conferem cor, desde o amarelo, passando pelo laranja até o vermelho (Figuras 2 e 3). Podem formar anéis no início e/ou no final da cadeia. Quanto maior a quantidade de ligações duplas conjugadas, menor a energia necessária para as transições eletrônicas entre orbitais moleculares, portanto, maior o comprimento de onda de máxima absorção no espectro visível. Os carotenoides com menor número de ligações duplas conjugadas são amarelados e conforme cresce o número de ligações duplas conjugadas, a coloração se torna alaranjada ou avermelhada (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

e máximos de absorção em comprimentos de onda abaixo de 400 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A presença de ciclização nas extremidades dificulta a transferência de elétrons π por impedimento estérico, já que, tira do plano da parte linear da molécula os elétrons da ligação dupla no anel. Como consequência, ocorre deslocamento hipsocrômico (redução dos comprimentos de onda de máxima absorvância) e ocorre alargamento das bandas bem como efeito hipocrômico (redução da intensidade das absorvâncias). Por isso, o carotenoide cíclico β -caroteno (Figura 3) com anéis nas extremidades, apesar de possuir o mesmo número de carbonos e 11 ligações duplas conjugadas que o carotenoide acíclico licopeno (Figura 2), possui comprimento de onda de máxima absorção em 450 nm com cor amarelo alaranjado e bandas largas e não tão bem separadas, enquanto o licopeno, possui máxima absorção em 470 nm, com cor vermelha e bandas finas e mais separadas (Figura 4) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

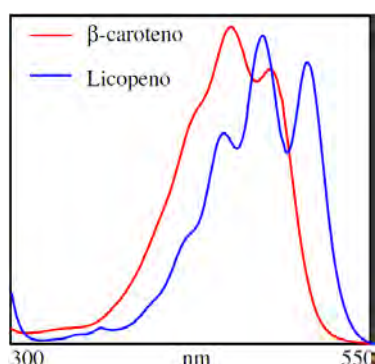


Figura 4 - Espectros no Ultravioleta e no Visível do Licopeno e do β -caroteno (PACHECO, 2009).

A presença de carbonilas não conjugadas nas moléculas de carotenoides não altera seus espectros, assim como ocorre com a presença dos substituintes hidroxilas e metoxilas, como mostrado na Figura 5 para β -caroteno, β -criptoxantina e Zeaxantina. Porém, a presença de carbonilas conjugadas com as demais ligações duplas da molécula resulta em deslocamento batocrômico (para maiores comprimentos de onda) e em alargamento das bandas que tendem a não mais se separarem em três picos bem definidos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

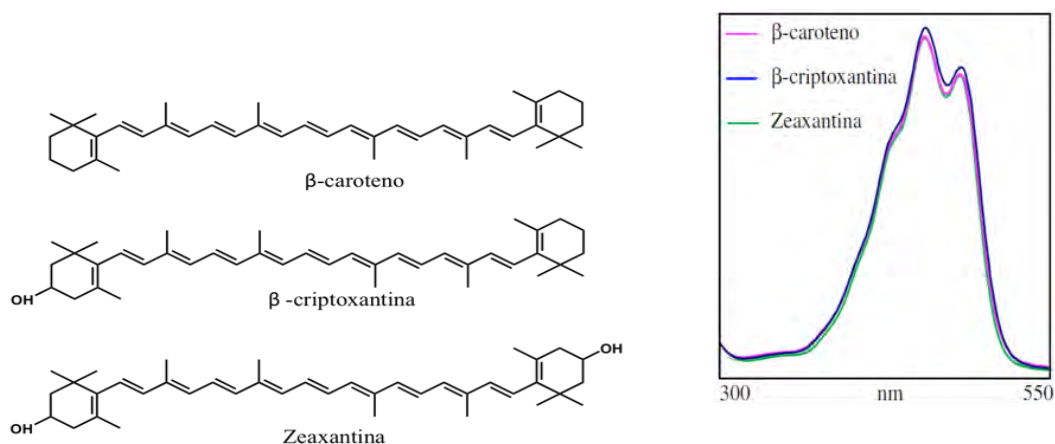


Figura 5 – Espectros (PACHECO, 2009) e estruturas moleculares do β -caroteno, β -criptoxantina e zeaxantina.

A isomerização *cis* causa deslocamento hipsocrômico e efeito hipocrômico, além de introduzir bandas referentes à isomerização *cis* no espectro na região ultravioleta ou em região próxima que serão mais intensas quanto mais próxima do centro da molécula a dupla ligação *cis* se localizar, como mostrado na Figura 6 para o *todo-trans*- β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno e 13-*cis*- β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

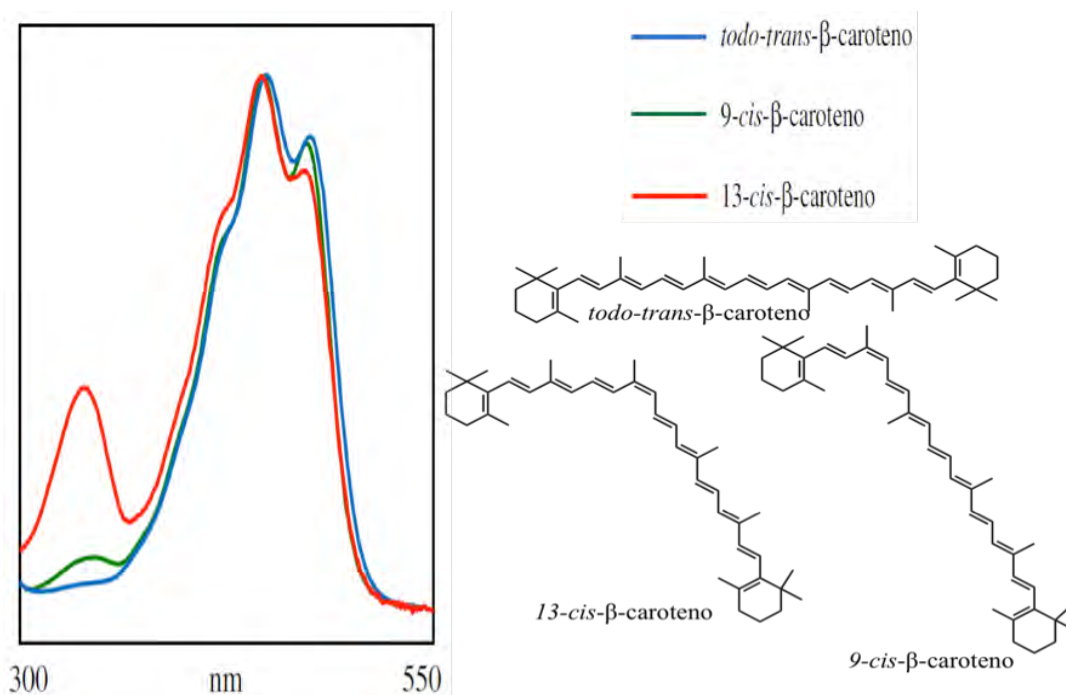


Figura 6 – Espectros e estruturas moleculares do *todo-trans*- β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno e 13-*cis*- β -caroteno (PACHECO, 2009).

Os espectros de absorção nas regiões do ultravioleta e do visível possuem praticamente os mesmos máximos de absorção nos solventes hexano, éter de petróleo, éter di-etílico, metanol, etanol e acetonitrila e mais altos 2-3 nm em acetona, 10-20 nm em clorofórmio e em diclorometano (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os carotenoides são biosintetizados por vegetais e micro-organismos, mas não são sintetizados por animais e, na natureza são mais encontrados com todas as ligações duplas na forma *trans* (por isso, alguns autores, quando querem diferenciar formas isômeras *cis* de formas isômeras que só possuem ligações duplas na forma *trans* utilizam o termo *todo-trans*, que vem do inglês, *all-trans*, para designar o carotenoide que possui todas as ligações duplas de sua estrutura molecular na configuração *trans*), de maior estabilidade (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Na natureza já foram identificados mais de 600 carotenoides, porém na dieta humana, apenas 40 são comumente encontrados, sendo o *todo-trans*- β -caroteno o mais abundante nos alimentos (RAO, 2007). Nos vegetais estão localizados nos cloroplastos associados a proteínas e auxiliam na fotossíntese e nos cromoplastos onde se depositam na forma cristalina ou na forma de gotas oleosas. Os carotenoides das folhas dos vegetais são geralmente luteína (45%), β -caroteno (25-30%), violaxantina (15%) e neoxantina (15%) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os carotenoides são classificados em carotenos, quando em sua estrutura molecular possuem apenas átomos de carbono e hidrogênio; ou xantofilas, quando sua estrutura molecular possui pelo menos um átomo de oxigênio na forma de hidroxila, cetona, epóxi, metoxila ou

ácido carboxílico. São suscetíveis à degradação por incidência de luz, temperatura e oxidantes durante o processamento dos alimentos que os contém e, até mesmo durante etapas de análise, causando descoloração e inativação das atividades biológicas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os teores de carotenoides nos vegetais variam em função do genótipo, parte do vegetal, estágio de maturação, condições edafoclimáticas, tipo de cultivo e armazenamento pós-colheita. Cultivos em climas mais quentes, com maior incidência de luz ou sem uso de defensivos estão relacionados com teores de carotenoides mais elevados. As temperaturas altas durante o cultivo têm maior influência no aumento da biosíntese de carotenoides do que a influência de genótipos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Alguns carotenoides têm função pró-vitáminica A, desde que são transformados em retinol, retinal ou ácido retinóico, que são as formas da vitamina A. Apenas os carotenoides que possuem o anel β -ionona em uma das extremidades, sem nenhuma substituição e, pelo menos 11 carbonos na cadeia polienica podem ser convertidos em vitamina A. O β -caroteno possui um anel β -ionona sem substituições em cada uma de suas extremidades e pode dar origem a duas moléculas de vitamina A, já a β -criptoxantina, possui apenas um anel β -ionona sem substituições e dá origem a apenas uma molécula de retinol (Figura 7).

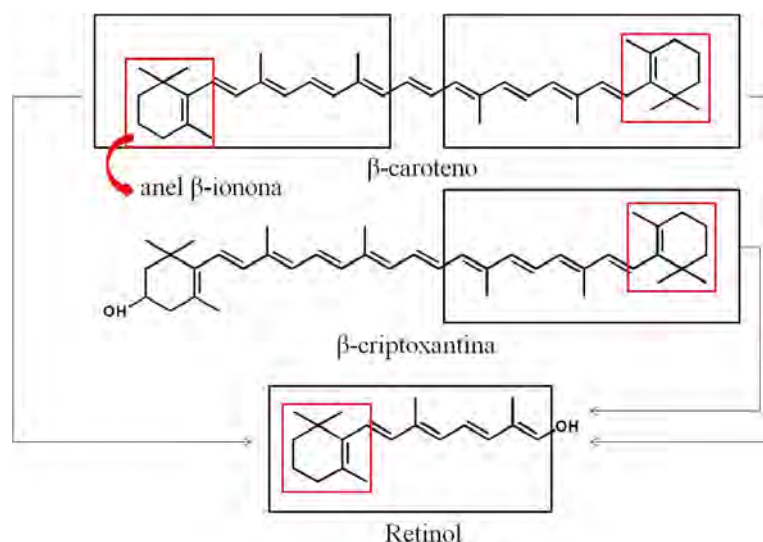


Figura 7 - Ilustração do anel β -ionona nos carotenoides pró-vitáminicos A, β -caroteno e β -criptoxantina.

Todos os carotenoides possuem atividade antioxidante, principalmente devido à capacidade de reagir com oxigênio singlete e com radicais livres. A sua atividade antioxidante está relacionada a atividades biológicas benéficas à saúde, na redução do risco de doenças degenerativas como cânceres, catarata, degeneração macular e doenças cardiovasculares; embora outros mecanismos também já foram relatados como responsáveis pelas atividades biológicas (KAO; KAO, 2007; KADIAN; GARG, 2012).

O estado da arte na análise de carotenoides, desde 1995, quando foi desenvolvida a fase reversa C_{30} , é a separação, identificação e quantificação por CLAE-DAD utilizando colunas com esta fase reversa polimérica. O fato das cadeias poliméricas serem mais longas nas fases estacionárias C_{30} , em relação às fases reversas C_{18} , utilizadas no passado, proporciona melhor separação entre os carotenoides e inclusive separa seus isômeros geométricos, o que não era possível nas fases C_{18} . Com a C_{30} é possível separar completamente nove formas *cis-trans* de luteína, cinco de β -criptoxantina, seis de β -caroteno, quatro de zeaxantina, dezoito de licopeno com resolução, seletividade e retenção únicas e jamais alcançada em nenhuma fase reversa C_{18} (PACHECO, 2009; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

2.3.2 Carotenoides na batata-doce

Dentre as variedades de batatas-doces brancas, amareladas e alaranjadas, o conteúdo de carotenoides das raízes varia de 0,4 a 75,5µg/g no material fresco. O carotenoide majoritário é o *trans*-β-caroteno e os minoritários são xantofilas, luteína e zeaxantina. As variedades de polpa alaranjada, como a ilustrada na Figura 8, possuem as maiores concentrações de *todo-trans*-β-caroteno, alcançando até 128,5 mg.100g⁻¹ do material seco (WANG; NIE; ZHU, 2016) e são excelentes fontes de pró-vitamina A (ISLAM, 2016).



Figura 8 - Variedades de batata-doce de pele roxa e polpa amarela (esquerda) pele e polpa alaranjada (direita).

2.3.3 Antocianinas

As antocianinas são corantes naturais presentes em flores, frutos, folhas e raízes, solúveis em água e de grande interesse devido a ampla faixa de cores (laranja, rosa, vermelho, roxo e azul) e os efeitos benéficos à saúde que apresentam (antioxidantes). Tem grande potencial para aplicação nas áreas alimentícia, farmacêutica e cosmética. Seu uso ainda é restrito devido a dificuldades de extração, purificação e baixa estabilidade em alguns casos. Devido ao enorme potencial das antocianinas há muitos trabalhos em diferentes áreas que desenvolvem técnicas analíticas para extrair, separar, purificar, identificar, aplicações alimentícias e investigações de vegetais como possíveis fontes desses corantes naturais (TSUDA, 2012; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; GIUSTI; WROLSTAD, 2003).

As antocianidinas (Figura 9) são a estrutura básica das antocianinas. As antocianidinas consistem em um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) que contém um oxigênio com três ligações, formando um cátion. Este heterociclo também está ligado a um terceiro anel aromático (B). Esta estrutura básica também é conhecida como cátion flavílium (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

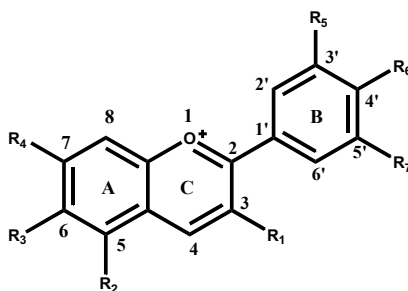


Figura 9 - Estrutura base das antocianidinas.

As cores das antocianinas são devidas às estruturas ressonantes do íon flavílium. As antocianinas se diferenciam pelos substituintes na estrutura básica (antocianidinas), que podem ser hidroxilas, metoxilas ou hidrogênios (Tabela 1). Além disso, geralmente possuem diferentes açúcares ligados em posições diversas na estrutura base (antocianidina). Ainda, nesses açúcares podem estar ligados ácidos carboxílicos aromáticos ou alifáticos. Os ácidos também podem estar ligados diretamente na estrutura das antocianidinas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Tabela 1 – Identificação estrutural das antocianidinas baseada na Figura 9 e cujas cores encontradas nos vegetais estão sujeitas a variações pelo pH, solvente, presença de metais ou interação com outras substâncias (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Antocianidina	Abreviação	Substituintes e posições de substituição							Cores encontradas nos vegetais
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	
Apigenidina	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	não reportada
Arrabidina	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OMe	não reportada
Aurantidinina	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	não reportada
Capensidinina	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Azul-vermelho
Carajurina	Cj	H	H	OH	OH	H	OMe	OMe	não reportada
Cianidina	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Laranja-vermelho
Delfinidina	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Azul-vermelho
Europinidina	Eu	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Azul-vermelho
Hirsurtidina	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Azul-vermelho
3'-HydroxyAb	3'-OHAb	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe	não reportada
6-HydroxCy	6-OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Vermelho
6-HydroxDp	6-OHDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Azul-vermelho
6-HydroxPg	6-OHPg	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	não reportada
Luteolina	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	não reportada
Malvidina	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Azul-vermelho
5-MetilCy	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Laranja-vermelho
Pelargonidina	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	não reportada
Peonidina	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Laranja-vermelho
Petudinina	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Azul-vermelho
Pulchelidina	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Azul-vermelho
Ricionidina A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H	não reportada
Rosinidina	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Vermelho
Tricetidina	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Vermelho

Mais de 600 diferentes antocianinas e 23 antocianidinas já foram identificadas na natureza, mas apenas seis antocianidinas são encontradas em vegetais vasculares (vegetais superiores, que se diferenciam dos inferiores por possuírem sistema vascular de transporte de nutrientes): Pelargonidina (Pg), Peonidina (Pn), Cianidina (Cy), Malvidina (Mv), Petunidina (Pt) e Delfinidina (Dp) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; GIUSTI; WROLSTAD, 2003).

Os glicosídeos derivados das antocianidinas não metiladas (Cy, Dp e Pg) são as antocianinas mais comumente encontradas nas folhas, frutos e flores. A distribuição das seis antocianidinas mais comuns nas frutas e vegetais é: 50% de Cy, 12% de Dp, 12% de Pg, 12% de Pn, 7% de Pt e 7% de Mv (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; GIUSTI; WROLSTAD, 2003).

Os glicosídeos derivados de antocianidinas mais comuns são 3-monosídeos (quando um monossacarídeo está ligado na posição 3 da antocianidina), 3-biosídeos (quando um dissacarídeo está ligado na posição 3 da antocianidina), 3,5- e 3,7-diglucosídeos. A presença de derivados do tipo 3-glucosídeo é 2,5 vezes mais frequente do que os 3,5-diglicosídeos. A antocianina mais comum é o derivado glicosídico Cy-3-glucosídeo (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; GIUSTI; WROLSTAD, 2003).

As antocianinas isoladas são muito instáveis e susceptíveis à degradação, com perda da coloração e atividades. Os fatores que afetam sua estabilidade e cor são: pH, temperatura, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solvente e a presença de enzimas, flavonoides, proteínas e íons metálicos. Daí a grande relevância dos estudos da estabilidade nas aplicações alimentícias como uso alternativo aos corantes artificiais (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; GIUSTI; WROLSTAD, 2003).

As cores de soluções de sais do íon flavílium variam dependendo do solvente e da concentração. Em solventes próticos a coloração é avermelhada devido a prevalência da presença de monômeros estabilizados pelo solvente. Em solventes apróticos a coloração é amarelada, devido à predominância de dímeros, já que o solvente não estabiliza a carga dos íons. Além disso, o aumento da concentração de sais flavílium favorece a coloração avermelhada (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

As antocianinas podem ser encontradas em diferentes formas químicas que dependem do pH da solução (Figura 10). No pH 1, o cátion flavílium (vermelho) é a forma predominante e contribui para as colorações avermelhadas e roxas. No pH entre 2 e 4, as formas quinoidais azuis são as espécies predominantes. No pH entre 5 e 6 apenas duas espécies incolores são observadas: a pseudobase carbinol e a chalcona. Nos valores de pH acima de 7, as antocianinas sofrem degradação, dependendo dos grupos substituintes. Nos valores de pH entre 4 e 6, quatro formas estruturais de antocianinas coexistem: o cátion flavílium, a base quinoidal anidra, a base carbinol incolor e a chalcona amarelada (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

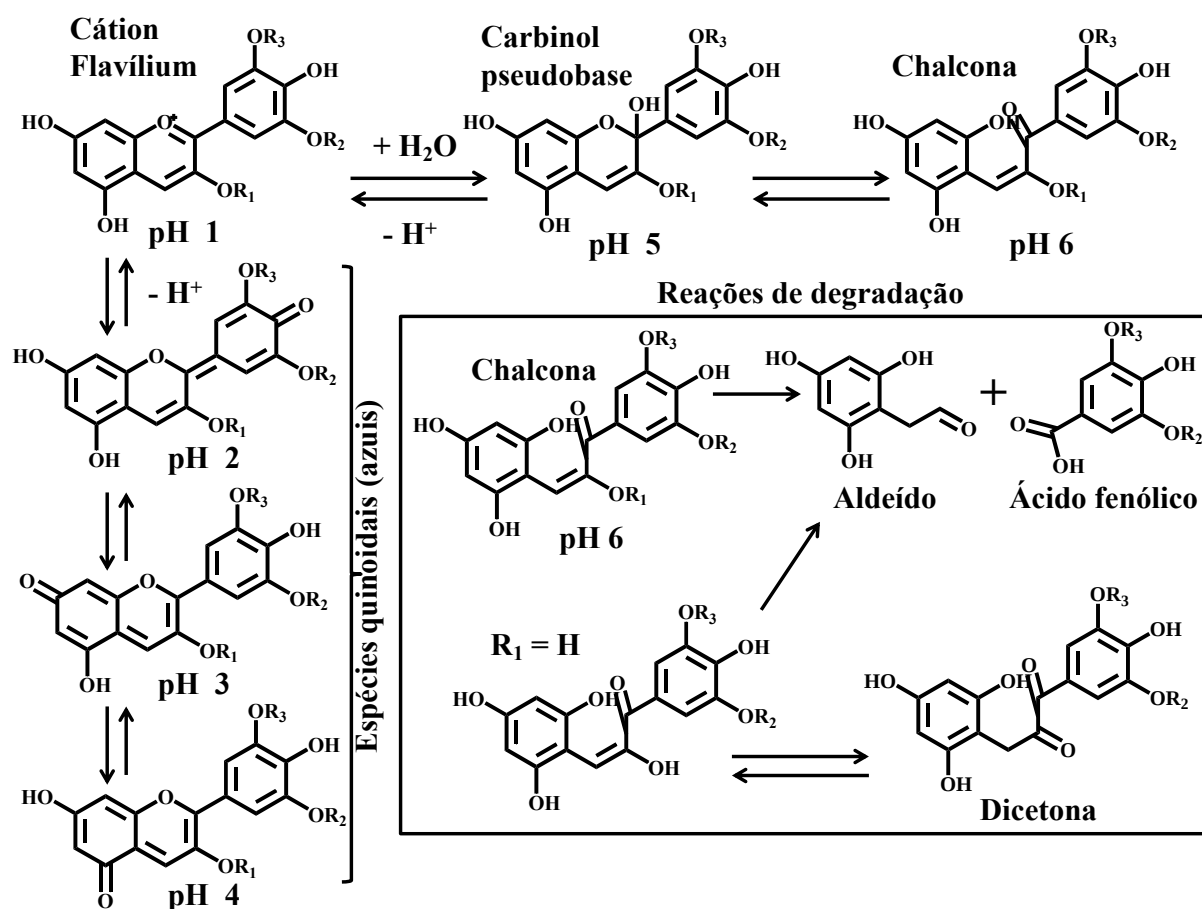


Figura 10 - Formas químicas das antocianinas dependentes do pH e reações de degradação. Onde $R_1 = H$ ou sacarídeo e R_2 e $R_3 = H$ ou Metil. Figura adaptada de CASTAÑEDA-OVANDO et al. (2009).

O consumo de antocianinas está associado à redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer entre outras doenças metabólicas degenerativas, ao melhor funcionamento do cérebro e da visão, ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antidiabética, antiobesidade, atividades neuro e hepato-protetoras, anti-hipertensivas, anti-hiperglicêmicas (WALLACE, 2011; TSUDA, 2012; HOU, 2003; SMERIGLIO et al 2016; GIUSTI & WROLSTAD, 2003).

O estado da arte na análise de antocianinas é extração com solventes polares como metanol, etanol, adicionados de água, por serem os mais eficientes. Além disso as soluções extratoras são levemente ácidas de modo a aumentar a eficiência da extração, preservar a estabilidade das antocianinas e evitar hidrólise. Embora não sejam muito seletivas pois extraem outras substâncias polares como açúcares e ácidos orgânicos. Por essa razão, é necessária uma etapa de purificação ou concentração das antocianinas, geralmente usando Extração em Fase Sólida (EFS) com cartuchos com fases estacionárias C_{18} ou Sephadex. As análises para separação, quantificação e identificação são realizadas através das técnicas de CLAE-DAD (com colunas C_{18}) e espectrometria de massas ou Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e 1H . Essas duas últimas são as mais usadas para identificação, principalmente na ausência de padrões de referência comerciais para as antocianinas estudadas.

2.3.4 *Antocianinas na batata-doce*

O conteúdo de antocianinas nas raízes das variedades de batata-doce de polpa roxa varia de 32 a 1390 mg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por 100g do material seco (WANG; NIE; ZHU, 2016).

As variedades batata-doce de polpa roxa como as da Figura 11 possuem maiores teores de antocianinas aciladas, o que proporciona maior estabilidade quando comparada às antocianinas com baixos níveis de acilação, como aquelas presentes em frutos vermelhos. Elas são apenas parcialmente degradadas quando as batatas são submetidas a aquecimento, já que as acilações protegem a molécula (KIM, 2015). Mais uma razão que justifica o uso industrial desta variedade para substituição de corantes sintéticos, cujas antocianinas, além de bioativas, seriam mais resistentes aos processamentos.



Figura 11 - Batatas-doces de pele branca e polpa roxa (esquerda) e de pele e polpa roxas (direita).

As antocianinas nas batatas-doces de polpa roxa são geralmente encontradas na forma de glicosídeo (com glicose ligada à antocianidina). Um total de 39 antocianinas já foram identificadas nas raízes de variedades de batata-doce de polpa roxa (GRAS et al., 2017). São na maioria glicosídeos de cianidina e peonidina, mono- ou di-acilados com os ácidos fenólicos: caféico, ferúlico, hidroxibenzóico e outros derivados de ácido cinâmico e benzóico. Em poucos casos foram encontradas antocianinas derivadas de delfinidina, malvidina e pelargondina

(WANG; NIE; ZHU, 2016). As estruturas das antocianinas mais comumente encontradas em batata-doce de polpa roxa estão na Figura 12.

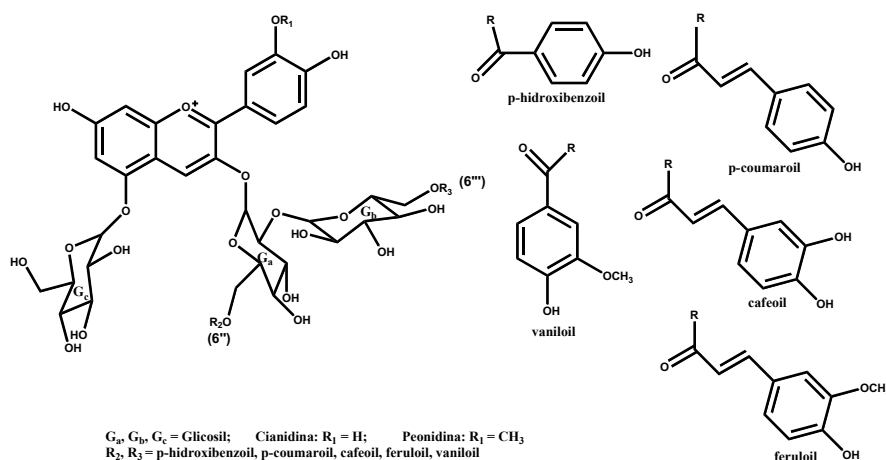


Figura 12 - Estrutura das antocianinas mais comumente encontradas em batata-doce de polpa roxa, relatadas na literatura.

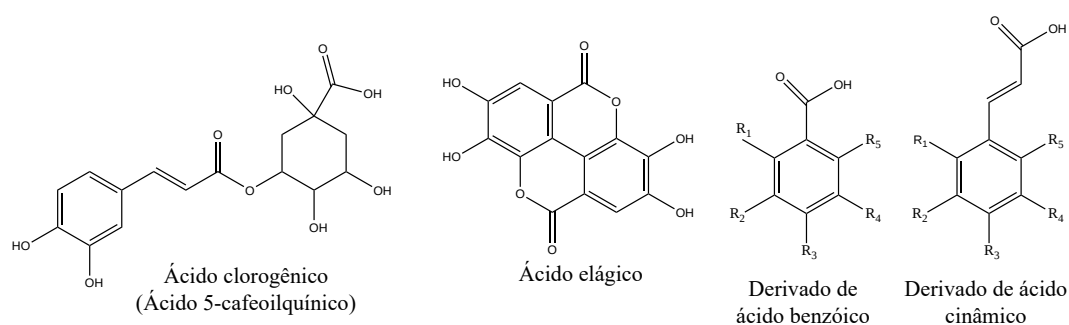
2.4 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos fazem parte da estrutura das antocianinas presentes em variedades de batatas-doces, que são na maior parte aciladas com estes ácidos. Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários das plantas e fungos presentes em flores, frutos, grãos, folhas, talos em quantidades variadas, dependendo da espécie, da variedade e da maturação (RASHMI; NEGI, 2020).

O estudo dos ácidos fenólicos em legumes e verduras são negligenciados devido aos seus teores relativamente menores quando comparados a outras partes das plantas. Os vegetais mais coloridos apresentam maiores teores de ácidos fenólicos quando comparados com suas variedades sem pigmentos. São produzidos para a proteção das plantas aos raios UV e a ataques de insetos, vírus e bactérias e em alguns casos, para inibir o crescimento de plantas competidoras (HELENO et al., 2015; RASHMI; NEGI, 2020).

Os ácidos fenólicos conferem, sabor, adstringência e interferem na cor dos corantes entre outras características organolépticas dos alimentos. São estudados pelos benefícios dietéticos para a saúde e por suas funcionalidades como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antialérgicos, antitrombóticos, cardioprotetores, antidiabéticos e anticâncer. Além disso, são usados como aditivos alimentícios para prolongar a vida de prateleira agindo para a retenção de cor, retardar o crescimento microbiano e inibir a oxidação lipídica (RASHMI; NEGI, 2020).

Os ácidos fenólicos são classificados como derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, sendo estes últimos mais prevalentes na natureza. Entre os derivados de ácido hidroxibenzóico, cuja estrutura molecular básica possui um anel benzênico hidroxilado ligado a um carbono (C6-C1), os principais são os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, salicílico, elágico, gentísico, protocatecúico, siríngico e vanílico. Entre os derivados de ácido hidroxicinâmico, cuja estrutura molecular básica possui um anel benzênico hidroxilado ligado a uma cadeia linear com 3 carbonos e uma instauração (C6-C3), os principais são os ácidos cumárico, cinâmico, cafeico, ferúlico, sinápico, isoferúlico e *p*-hidroxicinâmico. Os derivados de ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico se diferenciam pelas substituições no anel aromático (Figura 13) (HELENO et al., 2015; RASHMI; NEGI, 2020).



Substituições	Derivado de ácido benzóico	Derivado de ácido cinâmico
R ₁ =OH, R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =H	Ácido salicílico	Ácido <i>o</i> -cumárico
R ₁ =R ₂ =H, R ₃ =OH, R ₄ =R ₅ =H	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	Ácido <i>p</i> -cumárico
R ₁ =R ₂ =H, R ₃ =R ₄ =OH, R ₅ =H	Ácido protocatecúico	Ácido cafeico
R ₁ =H, R ₂ =OCH ₃ , R ₃ =OH, R ₄ =R ₅ =H	Ácido vanílico	Ácido ferúlico
R ₁ =H, R ₂ =R ₃ =OCH ₃ , R ₄ =R ₅ =H	Ácido verátrico	-
R ₁ =H, R ₂ =R ₃ =R ₄ =OH, R ₅ =H	Ácido gálico	-
R ₁ =OH, R ₂ =H, R ₃ =H, R ₄ =OH, R ₅ =H	Ácido gentístico	-
R ₁ =H, R ₂ =OCH ₃ , R ₃ =OH, R ₄ =OCH ₃ , R ₅ =H	Ácido sirínico	Ácido sinápico
R ₁ =OH, R ₂ =R ₃ =H, R ₄ =HSO ₃ , R ₅ =H	Ácido 5-sulfosalicílico	-

Figura 13 – Exemplos de ácidos fenólicos encontrados na natureza.

Estão presentes nos vegetais na forma ligada (esterificada) com açúcares ou ácidos orgânicos ou ligados a constituintes celulares. Raramente são encontrados livres nos vegetais e, quando ocorre, costuma ser artefato, por efeito de processamentos de alimentos ou de processos de extração durante as análises, que promovem hidrólise enzimática ou química, com algumas exceções como as frutas vermelhas, cebolas e rabanete preto. Os ácidos hidroxicinâmicos, principalmente cafeico e o ferúlico se ligam ao ácido quínico para formar outra classe de ácidos fenólicos, a dos ácidos clorogênicos, que estão presentes em muitos vegetais (HELENO et al., 2015; RASHMI; NEGI, 2020).

Os ácidos cafeico e clorogênicos do tipo cafeoil-quínicos são majoritários nas folhas da batata-doce e são atribuídas a eles atividades anticâncer de colon e estômago. Os ácidos fenólicos presentes nos vegetais estão em maiores quantidades nas formas integrais do que nas descascadas. Eles sofrem degradação em muitos processos em intensidades que variam de acordo com a estrutura química, com maiores perdas nos processos térmicos. Portanto é importante conhecer os benefícios de cada ácido fenólico, as fontes de vegetais e as formas de preparo que resultam em maior retenção e maiores biodisponibilidades para potencializar seus efeitos benéficos à saúde através do consumo dos tipos de vegetais, nas quantidades e forma de preparo mais adequados (RASHMI; NEGI, 2020).

2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Cromatografia é o método físico-químico de separação atualmente mais utilizado nos laboratórios para a separação de misturas complexas através da distribuição entre uma fase móvel e uma estacionária. A separação ocorre quando as substâncias componentes da mistura possuem maior ou menor afinidade pelas fases móvel ou estacionária. A fase estacionária pode ser sólida, líquida ou gel e, pode ficar disposta em uma coluna (tubo) ou sobre superfícies planas, caracterizando as técnicas, respectivamente, por cromatografia em coluna ou cromatografia planar. Já a fase móvel tem a função de passar através da fase estacionária carreando os componentes da mistura. Após o processo de separação, pode ser feita a detecção, quantificação e identificação das substâncias mais diversas, já que os equipamentos de cromatografia possuem detectores de diferentes tipos e seletividade (COLLINS et al., 1982).

As afinidades entre os analitos e as fases móvel e estacionária são baseadas em fenômenos físicos ou ligações fracas reversíveis, que não modificam permanentemente a estrutura das moléculas, estabelecidas entre os analitos e as fases. As interações ou afinidades com a fase estacionária podem ser por partição, adsorção, exclusão, imunoafinidade, troca iônica entre outros, ou alguns deles ocorrendo simultaneamente, que envolvem atração eletrostática, ligações de hidrogênio ou iônicas, interações dipolo-dipolo e interações de Van Der Waals (COLLINS et al., 1982; DEGANI et al., 1998; MALDANER & JARDIM, 2009).

Já as interações ou afinidades entre os analitos e a fase móvel não são por adsorção ou exclusão, mas podem também ser baseadas em atração eletrostática, ligações de hidrogênio ou iônicas, interações dipolo-dipolo e interações de Van Der Waals (COLLINS et al., 1982; DEGANI et al., 1998; MALDANER & JARDIM, 2009).

Na cromatografia planar, que se subdivide em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia em Papel (CP) só são utilizadas fases móveis líquidas (Figura 14). Nas técnicas de cromatografia em coluna a fases móveis podem ser gases (CG) ou líquidos (CL) ou fluidos super-críticos (CSC). Na cromatografia gasosa (CG), a fase estacionária pode ser sólida (CGS) ou líquida (CGL) (DEGANI et al., 1998).

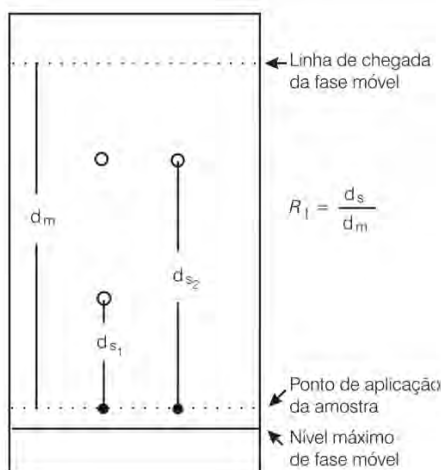


Figura 14 – Esquematização de um cromatograma obtido por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia em Papel (CP), mostrando os pontos de aplicação de amostras, o nível máximo de fase móvel e a linha de chegada da fase móvel, alcançada pelo eluente que sobe pela placa ou papel pelo fenômeno de capilaridade. Após secagem dos solventes é possível medir as distâncias percorridas pelas manchas correspondentes às substâncias que foram separadas. R_f é a relação entre a distância percorrida pela substância (d_s) sobre a distância percorrida pelo eluente (d_m) e é uma característica que diferencia as substâncias, neste caso, d_{s1} e d_{s2} . Figura obtida de DEGANI et al. (1998).

Na cromatografia líquida em coluna, dependendo da fase estacionária e do tipo de interação dela com os analitos, há mais cinco classificações possíveis: cromatografia por adsorção, Cromatografia Líquido-Líquido (CLL) ou partição, Cromatografia Líquida com Fase Ligada (CLFL), Cromatografia por Troca Iônica (CTI) e Cromatografia por Exclusão (CE), esta última subdividida em Cromatografia por Filtração em Gel (CFG) e por Permeação em Gel (CPG) (COLLINS et al., 1982; DEGANI et al., 1998).

A Cromatografia Líquida em coluna é subdividida em três grupos de acordo com a técnica: a cromatografia líquida clássica, feita em colunas de vidro e sob pressão atmosférica (Figura 15); a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Figura 16), feita sob alta pressão (até 6.000 psi) com o uso de bombas de alta pressão para bombear a fase móvel e a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) (Figura 16), feita sob pressões ainda mais altas (maiores que 15.000 psi) e com bombas de ultra pressão (COLLINS et al., 1982; DEGANI et al., 1998, MALDANER & JARDIM, 2009).

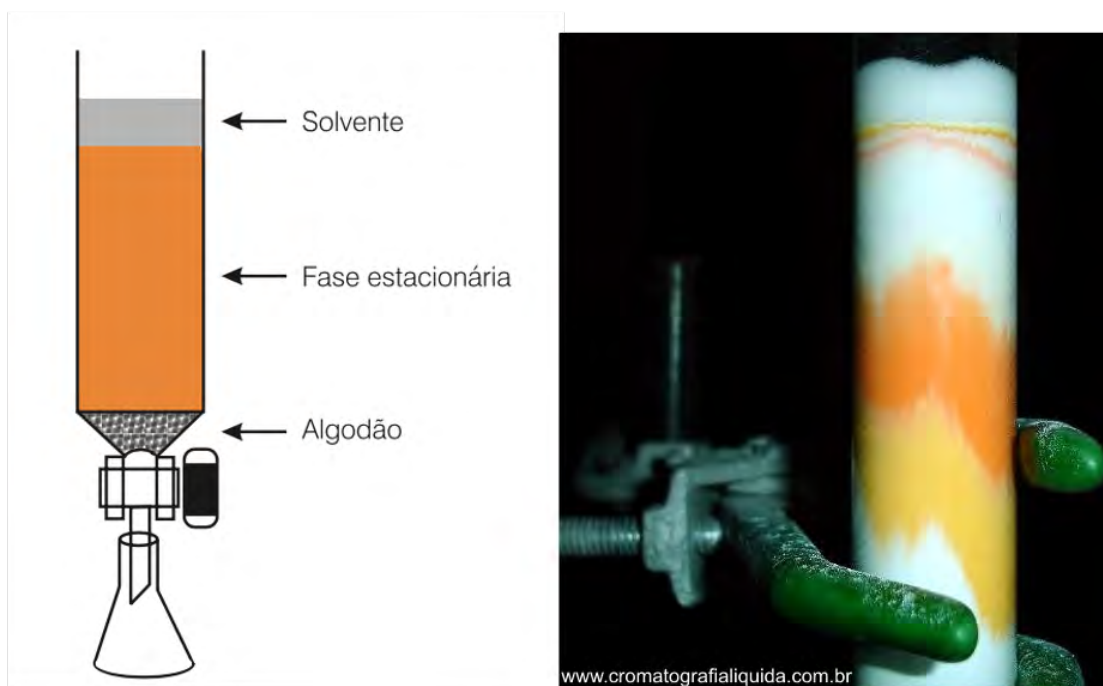


Figura 15 – Colunas de vidro utilizadas no processo de cromatografia de coluna clássica, com eluição sob pressão atmosférica. À esquerda, o esquema da montagem da coluna obtido de DEGANI et al. (1998). À direita, uma fotografia obtida durante o processo de separação de carotenoides de cores diferentes, cedida por Sidney Pacheco, disponível no site www.cromatografialiquida.com.br.

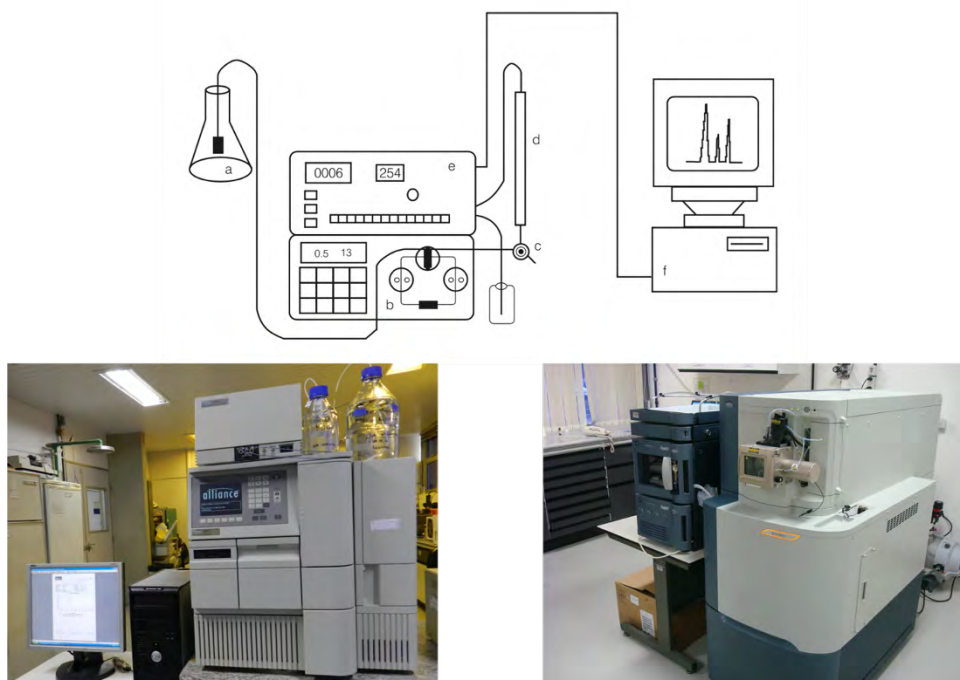


Figura 16 – Esquema representando a configuração mais simples dos equipamentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de Ultra Eficiência (CLUE), onde: a. reservatório de solvente (eluente); b. bomba; c. injetor manual; d. coluna, e. detector de UV/Vis; f. computador. Figura obtida de DEGANI et al. (1998). Abaixo à esquerda o Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado ao Detector de Arranjo de Diodos (DAD) e à direita o Equipamento de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) acoplado ao detector de massas Quadrupolo - Tempo de Voo (QTdV) do Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Fotografias cedidas por Sidney Pacheco.

Na CLAE e na CLUE as colunas são feitas de material resistente a altas pressões, já que a técnica requer bombas de alta pressão, que possibilitam fluxo rápido da fase móvel através da coluna. A separação de misturas complexas ocorre em poucos minutos como por exemplo amostras de urina com mais de 200 analitos, com alta resolução é alcançada. Permite a detecção, a quantificação e a identificação dos analitos com erros menores que um por cento, alta exatidão e sensibilidades ao nível de picogramas (pg), graças a enorme variedade de detectores que podem ser acoplados aos sistemas. Também é possível a coleta das frações dos analitos de forma manual junto a saída do detector ou de forma automatizada com coletores de frações (COLLINS et al., 1982).

A CLAE e a CLUE são muito versáteis, pois possibilitam a análise de grande variedade de tipos de analitos, orgânicos e inorgânicos com massas moleculares de 18 a 6 milhões de daltons, em amostras sólidas, líquidas ou gasosas. A CLAE é a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada nas indústrias química e farmacêutica (MALDANER; JARDIM, 2009). Os sistemas são automatizados, permitem uma alta produtividade para os laboratórios, porém possuem custo elevado de aquisição e manutenção e necessitam de operadores bastante qualificados, com treinamentos longos (6 a 12 meses) e anos de experiência (COLLINS et al., 1982).

A invenção da cromatografia líquida é atribuída ao botânico russo M.S. Tswett através de registro da publicação de um relatório em 1903. Porém, desde o ano 77 de nossa era, na Roma antiga, há registros de experimentos envolvendo cromatografia líquida pelo historiador

romano Caio Plínio Segundo (23-79), que já utilizava cromatografia em papiro para detectar fraudes no sal de cobre conhecido como “verdigris”. Em anos seguintes, por outros cientistas como Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) que sugeriu o preparo de águas desmineralizadas em filtros de areia. Já Carlo Matteucci (1811-1868), reproduziu o experimento de Berzelius, filtrando águas salinas em tubos contendo areia e comprovando que a densidade da água que percolava era menor do que a densidade da água antes do processo. Ele sugeriu que o fenômeno da existência de água doce em fontes originárias do mar ocorreria através da percolação da água do mar pelo solo (PACHECO et al., 2015).

Friedlieb Ferdinand Runge (1795-1867) deixou diversos livros e manuscritos raros com seus cromatogramas em papel separando misturas de pigmentos para a indústria têxtil (Figura 17). Cristian Friedrich Schonbein (1799-1868), Friedrich Goppelsroeder (1837-1919) fizeram experimentos muito simples mesmo sem entendimento de muitos dos conceitos de cromatografia que hoje são amplamente difundidos (PACHECO et al., 2015).

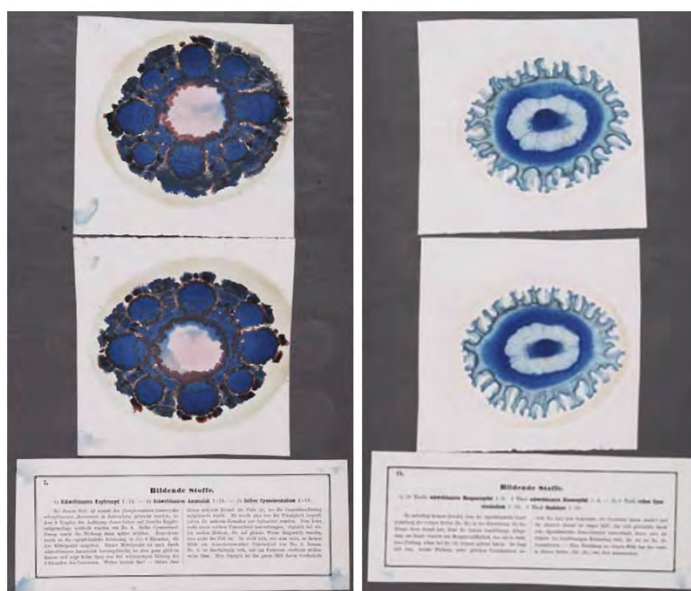


Figura 17 – Experimentos de Runge feitos em papel de filtro demonstrando a reprodutibilidade da separação da mistura de pigmentos de tecido. Figura obtida de PACHECO et al. (2015).

Mikhail Semenovitch Tswett (1872-1919) foi o primeiro a publicar trabalhos explicando os princípios de adsorção na cromatografia como fenômeno físico reversível dependente da natureza do adsorvente, do solvente utilizado e das substâncias a serem separadas e prevendo sua utilidade na separação de toda sorte de substâncias, inclusive as incolores, dando nome de cromatografia para a técnica e de cromatograma para o resultado. Comprovou a separação de pigmentos vegetais e a existência das clorofilas A e B, além de especificar substâncias adsorventes e suas propriedades como por exemplo o tamanho e superfície dos grãos. Ele também citou em seus trabalhos a possibilidade de modificação da composição dos eluentes durante a análise para aprimorar a separação, uma alusão ao que hoje chamamos de modo de eluição gradiente, que atualmente é muito utilizado, enquanto no passado, no início do desenvolvimento da cromatografia, as eluições isocráticas (com a composição de eluente constante ao longo da corrida) eram predominantes (PACHECO et al., 2015).

Arne Wilhelm Kaurin Tiselius (1902-1971) foi o primeiro a acoplar um sistema de detecção não visual por incorporação de cubeta e sistema para leitura ótica, ao aparato cromatográfico para a detecção e quantificação dos componentes separados e, também

introduziu a cromatografia por deslocamento. Stig Melker Claesson (1917-1988) acoplou um sistema para a introdução pressurizada da fase móvel. Mas somente em 1958 foi publicada a primeira descrição do equipamento de cromatografia líquida com eluição por gradiente utilizando bombas com pistões de aço no lugar de pressurizar os frascos eluente com ar e, sistema de derivatização pós-coluna, de detecção por fotometria e de registrador automático, para a separação e análise de aminoácidos elaborado por Willian Howard Stein (1911-1980) e Stanford Moore (1913-1982) (PACHECO et al., 2015).

Entre 1949 e 1952, S. M. Patridge publicou uma série de documentos descrevendo o uso de resinas de troca iônica para a separação de substâncias orgânicas, incluindo os aminoácidos. Em 1945 a companhia americana DOW lançou uma resina de troca catiônica, a DOENEX 50, que se popularizou no tratamento de água industrial e foi utilizada por Moore e Stein para aprimorar ainda mais a análise e isolamento de aminoácidos e da enzima pancreática ribonuclease. Estes últimos, com genialidade inventiva, deixaram muitas contribuições para o desenvolvimento da análise de aminoácidos por cromatografia líquida em coluna e dividiram o prêmio Nobel de Química em 1972 com Christian B. Anfinsen por elucidarem a sequência de aminoácidos da enzima ribonuclease (PACHECO et al., 2015).

Antes de 1968, os sistemas cromatográficos líquidos automatizados eram montados pelos próprios pesquisadores, com componentes disponíveis no mercado e eram chamados de cromatógrafos líquidos de alta “pressão”. Em 1969 começaram a surgir as primeiras instrumentações fabricadas por empresas para venda, chamados de cromatógrafos líquidos de alta “performance”, com preços muito mais altos do que o dos já difundidos cromatógrafos gasosos, o que levou a serem apelidados de cromatógrafos líquidos de alto “preço”. Posteriormente, ironicamente apelidados de cromatógrafos líquidos de alta “paciência” pelas dificuldades de adaptação dos usuários de cromatógrafos gasosos, que agora tinham que se adaptar com paciência e dedicação aos novos equipamentos e a nova técnica que incluía mais parâmetros para controlar como a interação dos analitos com a fase móvel durante a separação, que não ocorre na cromatografia gasosa, onde o gás de arraste é inerte. Também com a sofisticação das bombas, as bolhas no solvente e muitos cuidados adicionais quando comparada à cromatografia gasosa que apresentava maior simplicidade (PACHECO et al., 2015).

A partir de 1960, com o crescente uso da técnica CLAE, as fases estacionárias foram sendo cada vez mais aprimoradas e diversificadas. No início, a fase estacionária mais utilizada era a sílica com partículas que tinham tamanhos variáveis entre 40-50 μm , a chamada fase “normal”. Os tamanhos das partículas foram ficando cada vez menores e com formatos e porosidades específicos à medida que as técnicas de produção desses materiais foi evoluindo, o que proporcionava separações cada vez mais eficientes, com altas resoluções e, em tempos menores. O tamanho das partículas passou a ter 15-20 μm e logo 10-3 μm . Também surgiram partículas revestidas com líquidos para a cromatografia por partição líquido-líquido, mas logo caíram em desuso pois não eram estáveis como na cromatografia gasosa, já que os solventes acabavam por diluir e carrear o revestimento líquido para fora da coluna acarretando problemas de reprodutibilidade (PACHECO et al., 2015).

Surgiram técnicas de revestimento de partículas esféricas de sílica com uma gama de substâncias e técnicas de modificações químicas das fases estacionárias, que possibilitaram obter colunas robustas e de grande seletividade como as de fase reversa C_8 e C_{18} , que poderiam trabalhar com fases móveis aquosas. Outras alternativas de modificações com grupos funcionais variados para diversas aplicações tanto de fases reversas (apolares) quanto em fases polares, como polímeros e grupos funcionais para aplicações de troca iônica, colunas quirais e muitas outras surgiram. Inclusive a C_{30} , capaz de separar isômeros *cis* e *trans* dos carotenoides, substâncias com cadeias carbônicas com comprimento de 40 carbonos e que não se separavam em C_{18} , cuja extensão da cadeia carbônica, inferior à dos carotenoides não era ideal para

interagir com todo o comprimento das moléculas e separá-las completamente (PACHECO et al., 2015).

A diminuição do tamanho das partículas das fases estacionárias chegou ao tamanho de 1,5 µm, na década de 1990, o que proporcionou a diminuição do tamanho das colunas que antes, com partículas de 5 µm eram de 25-30 cm de comprimento, com 4,6 mm de diâmetro interno (8.000-10.000 pratos/15 cm de coluna) e puderam ser reduzidas para 5-6 cm de comprimento, com 1,0-2,1 mm de diâmetro interno, maior número de pratos teóricos (25.000 pratos/15 cm de coluna) e tempos de análise 4 vezes menores, com menores fluxos e consumo de solventes. Porém, a diminuição das partículas da fase estacionária exigia pressões de trabalhos maiores e, consequentemente nova geração de equipamentos, com injetores, detectores e bombas mais sofisticadas e capazes de trabalhar a pressões e velocidades mais altas, volumes internos menores e altas taxas de aquisição. Surgiu assim, a nova geração de equipamentos para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que é o estado da arte em técnicas de separação. O primeiro equipamento comercial capaz de trabalhar nessas condições de alta pressão (maiores que 15.000 psi) foi o *Acquity* (UPLC™) da marca Waters Corporation (PACHECO et al., 2015; MALDANER; JARDIM, 2009).

Surgiram colunas monolíticas com partículas cilíndricas altamente porosas (macroporos de 2 µm e mesoporos de 13 nm) feitas a partir de sílica ou materiais poliméricos com eficiências comparáveis aos materiais particulados de 3-3,5 µm, mas com maiores permeabilidades, o que permitia uso de vazões de fluxo mais altas sem aumento de pressão. Porém, as colunas monolíticas, além de serem restritas a um fabricante (MERCK), possuíam diâmetro interno alto (3,0 e 4,6 mm), não sendo compatíveis com espectrômetros de massas, consumindo grandes volumes de solventes e com pouca estabilidade química, limitada a faixa de pH de 2-8 (MALDANER; JARDIM, 2009).

2.6 Detectores utilizados na CLAE

Como a cromatografia é uma técnica para a separação de misturas complexas muito abrangente, ou seja, aplicada a diversas classes de substâncias químicas, mesmo aquelas incolores, surgiu a necessidade de detectores específicos para detecção, quantificação e identificação dos analitos após a separação cromatográfica.

Os detectores são acoplados aos cromatógrafos líquidos de alta eficiência após a saída da coluna e devem ser sensíveis aos analitos que passam através dele sem sofrer interferências dos eluentes que carregam os analitos ou quaisquer substâncias presentes que não sejam de interesse na análise.

Os detectores recebem o sinal daquelas substâncias as quais é sensível na proporção das concentrações das mesmas e transformam em sinal elétrico que é enviado a um registrador ou a um computador. Os registros são feitos na forma de picos, já que as substâncias ao eluírem na coluna sofrem dispersão na fase móvel de modo que são mais diluídas nas fronteiras do início e final da eluição e mais concentradas na porção central, formando os topos dos picos. Os detectores não devem ser sensíveis aos eluentes utilizados de modo que quando apenas os eluentes passam por ele o sinal detectado/emitado é de baixíssima intensidade, chamado de linha base, a partir da qual surgem os picos, formando o resultado da corrida cromatográfica que chamamos de cromatograma.

A especificidade, a seletividade, a sensibilidade e a aplicação dos detectores estão relacionadas com os grupos funcionais ou propriedades físicas dos analitos e dos eluentes utilizados. Os detectores mais comumente utilizados na CLAE por serem sensíveis a muitas classes de substâncias químicas são: Detector de Índice de Refração (DIR), Detector de UV/Vis, Detector de Arranjo de Diodos (DAD), Detector de Fluorescência (DF) e os detectores de

massas (EM), sendo estes últimos mais complexos, e apresentados sob diferentes configurações.

2.7 Espectroscopia

Definimos espectroscopia como as interações que ocorrem entre qualquer tipo de radiação e a matéria. Muitos fenômenos naturais envolvem espectroscopia, por exemplo o aquecimento causado pela incidência de alguns tipos de radiações em certos materiais, as cores das plantas e objetos que vemos, incluindo o próprio mecanismo da visão (OLIVEIRA, 2001).

O tipo de fenômeno está relacionado com a frequência (f) e energia (E) da radiação que interage com a matéria. As radiações do espectro de luz visível (Vis) e ultravioleta (UV) de determinada energia, causam transições eletrônicas, enquanto radiações de menor energia acarretam vibrações (variações na distância entre os átomos ou entre ângulos), rotações e translações nas moléculas a depender da geometria molecular (OLIVEIRA, 2001).

A luz é uma forma de radiação eletromagnética, que ora se comporta como energia ou matéria (fótons), propagando-se como ondas (Figura 18), com propriedades como comprimento de onda (λ), frequência (f), amplitude e velocidade ($c = 2,99792 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$) (OLIVEIRA, 2001). Denominamos de espectrofotometria a técnica espectroscópica que utiliza a luz como fonte de radiação para determinar características qualitativas e quantitativas de espécies químicas (PASSOS, 2020).

Entre os tipos de interações que ocorrem (físicas e químicas) entre a radiação eletromagnética e a matéria (molécula), a emissão e a absorção são aquelas que definem os princípios de técnicas e funcionamento de equipamentos como espectrofotômetros. A frequência (f) é determinada pela Equação 1 (PASSOS, 2020).

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad \text{Equação 1}$$

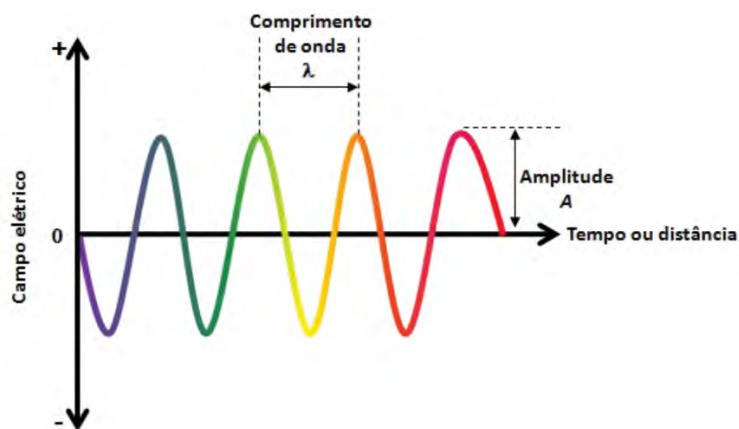


Figura 18 – Representação da radiação eletromagnética (luz) em relação ao campo elétrico. Comprimento de onda (λ) é a distância entre duas oscilações, frequência (f) é o número de oscilações (ondas) por segundo medida em Hertz (Hz). Figura obtida de PASSOS (2020).

Há outros fenômenos que ocorrem quando a luz interage com a matéria, além da absorção e emissão. Pode ocorrer a reflexão e a refração. Na absorção, comprimentos de onda com energia específica são absorvidos por determinada matéria (substância) e os demais comprimentos de onda são refletidos, sendo observada a cor referente aos comprimentos de onda complementares refletidos. Quando todos os comprimentos de onda da luz são absorvidos,

gera-se a ausência de luz ou a cor preta para a substância. Quando toda a luz que incide na substância é refletida, ocorre a cor branca para a substância, que representa a mistura de todos os comprimentos de onda visíveis da luz (MARTINS et al., 2015). A Figura 19, mostra um disco de cores, onde cada cor (comprimento de onda) absorvida por uma substância, mostra a cor diametralmente oposta no disco como a cor complementar que é refletida e, portanto, percebida pelos olhos humanos como a cor da substância.

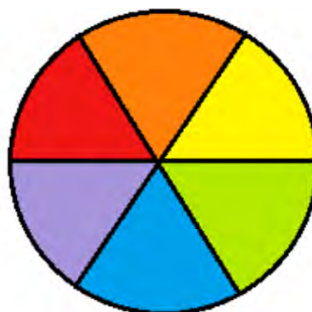


Figura 19 – Disco de cores que representa a cor do comprimento de onda absorvido por determinada substância quando a luz incide nela e a cor que é percebida pelos olhos humanos para aquela substância, que é a cor complementar refletida, localizada diametralmente oposta a cor absorvida no disco. Figura obtida de MARTINS et al. (2015).

Quando toda a luz, ou a maior parte atravessa um material sem que haja suficiente reflexão ou absorção este material tende a ser incolor e translúcido como a água e o vidro. Mas, geralmente, ocorre um desvio na trajetória dos raios de luz quando atravessa um material sem sofrer absorção ou reflexão, sendo observado um pequeno desvio no ângulo das direções de propagação. Este desvio na direção da trajetória de propagação da luz quando ela atravessa um meio material é chamado de refração (MARTINS et al., 2015).

Nesse fenômeno, o ângulo de desvio depende da diferença de velocidade de propagação da luz nos meios que ela atravessa e, também do comprimento de onda e das propriedades da matéria que compõe cada meio, como por exemplo a densidade. Podemos observar a refração no arco-íris ou no prisma, onde cada comprimento de onda da luz é desviado para um ângulo diferente, sendo possível observar as cores que a compõem. Nestes exemplos, ocorre a passagem da luz que se propaga pelo ar (meio menos denso) através do prisma ou de gotículas de água (arco-íris), que são mais densos e, portanto, diminuem a velocidade de propagação. Ainda, a velocidade de propagação é proporcional a cada comprimento de onda, fazendo com que cada comprimento de onda sofra ângulos de difração diferentes. Os comprimentos de onda maiores terão maior ângulo de difração, enquanto comprimentos de onda menores terão menores ângulos de difração (MARTINS et al., 2015).

A espectrofotometria inicialmente usava a cor de uma solução e a intensidade dessa cor para identificação da espécie química e determinação de sua concentração, respectivamente. Foi chamada por essa razão de colorimetria e era baseada na passagem de luz branca através da solução colorida na qual se desejava determinar a identidade e/ou concentração da substância colorida presente (PASSOS, 2010).

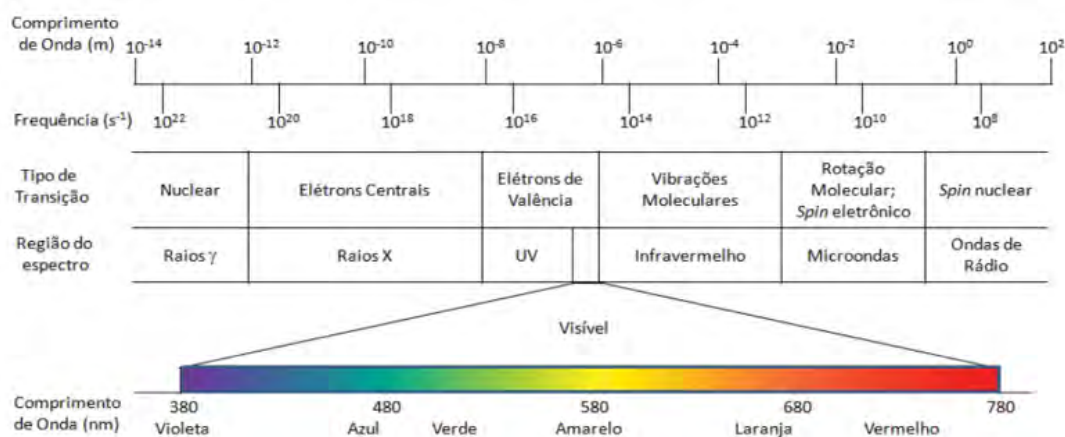


Figura 20 – Regiões do espectro eletromagnético mostrando as faixas de comprimentos de onda ou de energias e os tipos de transição (interação) que cada faixa é capaz de causar quando interage com a matéria. O espectro eletromagnético apresenta regiões de Raios γ , Raios x, Ultravioleta (UV), Visível (Vis), Infravermelho (IV), Microondas e Ondas de Rádio. Figura obtida de PASSOS (2020).

A luz branca visível (Vis) emitida por lâmpadas comuns de tungstênio (que emitem na faixa de 320 – 2400 nm), composta por uma gama de radiações (de 380 a 780 nm) que inclui as cores entre o violeta, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho (Figura 20) atravessa a solução de coloração vermelha (Figura 21), por exemplo, cujas moléculas de cor vermelha absorvem as radiações nas cores complementares (amarelo e azul) (OLIVEIRA, 2001).

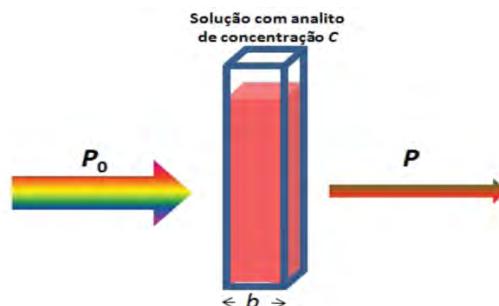


Figura 21 – Cubeta com solução de analito vermelho através da qual um feixe de luz branca incide, sendo transmitida a faixa do espectro do visível correspondente a cor vermelha, enquanto as demais cores complementares são absorvidas. Figura obtida de PASSOS (2020).

Sendo assim, quanto maior a concentração de moléculas vermelhas na solução, mais as luzes verdes são absorvidas e maior é a intensidade da cor vermelha da solução (Figura 21) (PASSOS, 2010).

O mesmo ocorre com soluções incolores de moléculas capazes de absorver em comprimentos de onda do espectro de ultravioleta (UV), na faixa de 180 a 380 nm. Apenas, nestes casos, é necessário utilizar fontes de radiação que emitem na faixa do UV (ex.: lâmpadas de deutério, que emitem na faixa de 160 - 380 nm) ou em ambas as faixas de UV e Vis (ex.: lâmpadas de xenônio, que emitem na faixa de 200 - 1000 nm). Basta para tal que as moléculas possuam um grupo cromóforo, ou seja, um grupo funcional capaz de absorver a energia eletromagnética (PASSOS, 2010).

No caso das faixas UV-Vis, a energia absorvida é utilizada para excitar elétrons da camada de valência, que se elevam a estados de maior energia e posteriormente liberam a

energia absorvida para retornar ao estado fundamental. Podem ser medidas a energia absorvida, através da técnica de espectroscopia de absorção, ou a energia emitida pela técnica chamada de espectroscopia de emissão ou fotoluminescência (PASSOS, 2010).

A absorção da radiação eletromagnética pelas moléculas altera sua energia. Se analisarmos a radiação como partículas (Fótons), quando os fótons atingem as moléculas eles transferem sua energia (E) para elas e se desintegram. A energia (E) é absorvida pelas moléculas e é diretamente proporcional a frequência dos fótons (f), de acordo com a Equação 2, ou inversamente proporcional ao comprimento de onda (λ), de acordo com a Equação 3, ou proporcional ao número de onda (ν), de acordo com a Equação 4, onde todas as equações são relacionadas com a constante de Planck ($h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$) (OLIVEIRA, 2001).

$$E = h f \quad \text{Equação 2}$$

$$E = h \frac{c}{\lambda} \quad \text{Equação 3}$$

$$E = h c \nu \quad \text{Equação 4}$$

O número de onda (ν) é o inverso do comprimento de onda (λ), como na Equação 5. É o número de comprimentos de onda pela distância, muito utilizado em espectroscopia na faixa do Infravermelho na unidade cm^{-1} ou na unidade internacional m^{-1} (PASSOS, 2010).

$$\nu = \frac{1}{\lambda} \quad \text{Equação 5}$$

Na espectroscopia de absorção, a energia absorvida (ou Absorvância (A)) de uma solução está relacionada com a energia transmitida (aquela que atravessa a solução (T)) através da Equação 6. A transmitância (T) é expressa como a razão entre a energia transmitida através da solução da amostra (P) e a energia incidente na amostra (P_0) (Figura 20), de acordo com a Equação 7 ou, pode ser expressa como transmitância percentual, através da Equação 8. Assim, a absorvância (A) pode ser escrita como na Equação 9 (OLIVEIRA, 2001).

$$A = -\log T \quad \text{Equação 6}$$

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{Equação 7}$$

$$\%T = \frac{P}{P_0} 100 \quad \text{Equação 8}$$

$$A = \log \frac{P_0}{P} \quad \text{Equação 9}$$

E quando 0% de radiação é absorvida, $P = P_0 = 1$, ocorre 100% de transmitância. Já quando ocorre 99% de transmitância, a absorvância é 1%. Essa técnica está submetida à Lei de Absorção, ou Lei de Lambert-Beer, da Equação 10, que determina quanto a absorvância (A) depende da concentração do analito (C) em mol L^{-1} , do caminho óptico (b), que é a largura da cubeta em cm (em geral padronizado para 1 cm) e da absortividade molar (ϵ) expressa em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que é uma propriedade física de cada substância que possui um grupo cromóforo (OLIVEIRA, 2001).

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad \text{Equação 10}$$

Há algumas limitações que afetam Lei de Lambert-Beer, como por exemplo soluções muito concentradas dos analitos, maiores que $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, onde a distância entre as moléculas é pequena e umas afetam a distribuição de cargas da outra, afetando a linearidade da absorvância x concentração. Soluções de analitos preparadas na presença de eletrólitos também podem sofrer desvios por interferências nas cargas (OLIVEIRA, 2001).

Além disso, os analitos podem não estar completamente convertidos na forma de uma única espécie absorvente. Ainda, podem ocorrer desvios instrumentais como flutuação da fonte, variação da resposta de detectores e interferência de radiação refletida dentro do equipamento.

Como raramente as substâncias a serem analisadas são as únicas presentes na solução da amostra preparada para a leitura no espectrofotômetro, há a necessidade de eliminar a contribuição dos interferentes. Neste caso é utilizado o monocromador, mais eficiente do que os filtros usados em equipamentos antigos, para a seleção de comprimentos de onda específicos nos quais apenas os analitos interajam (PASSOS, 2010).

Os equipamentos que usam filtros no lugar de monocromadores são mais simples e robustos, porém não permitem a escolha de qualquer comprimento de onda dentro de um espectro contínuo, não permitindo a varredura com obtenção do espectro do analito, já que os filtros são específicos para selecionarem comprimentos de onda ou faixas fixas.

Os monocromadores direcionam a luz policromática através de espelho para uma grade de difração. Esta, por sua vez, separa a luz nos seus diferentes comprimentos de onda, enviando a outro espelho que direcionará o feixe para a fenda de saída em direção ao detector. A seleção do comprimento de onda ocorre através da rotação da grade de difração, permitindo a escolha do comprimento de onda desejado dentro do espectro contínuo emitido pela fonte, permitindo a obtenção de espectro por varredura do analito, como ilustrado na Figura 22 (PASSOS, 2010).

Os detectores são transdutores como fototubos, fotomultiplicadores, fotodiodos de silício e arranjo de fotodiodos, capazes de transformar o sinal eletromagnético (fótons) em sinal elétrico. Entre a fenda e o detector, é posta a cubeta contendo a solução da amostra para efetuar a leitura.

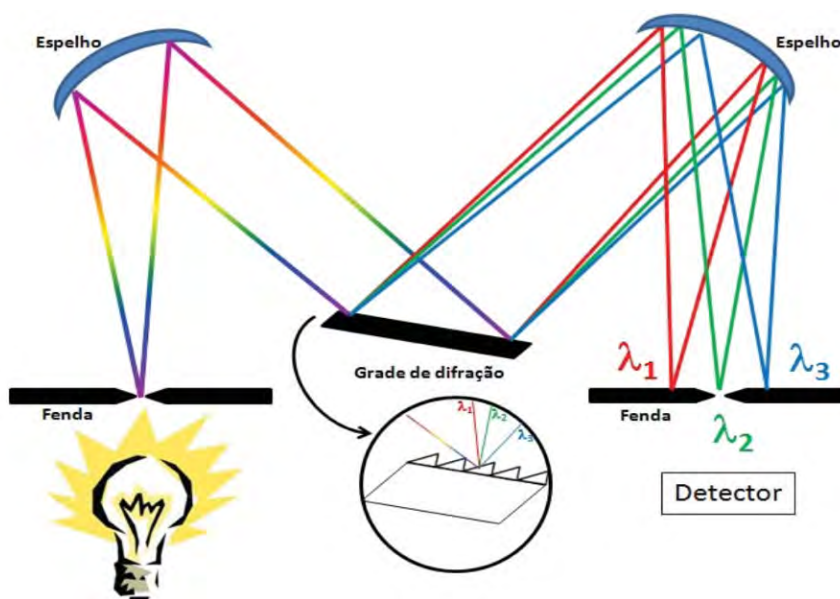


Figura 22 – Esquema de monocromador com grade de difração para a dispersão da radiação. Figura obtida de PASSOS (2020).

Nos fototubos e nos tubos fotomultiplicadores, uma camada de material fotoemissor sobre a superfície côncava de um fotocátodo, emite elétrons quando irradiado com luz de

energia apropriada. Os fotoelétrons na presença de um eletrodo carregado positivamente produzem uma fotocorrente que pode ser amplificada e medida. O tubo fotomultiplicador (Figura 23) apresenta muitos eletrodos em sequência, os chamados dinodos, tornando-o mais sensível que o fototubo (PASSOS, 2010).

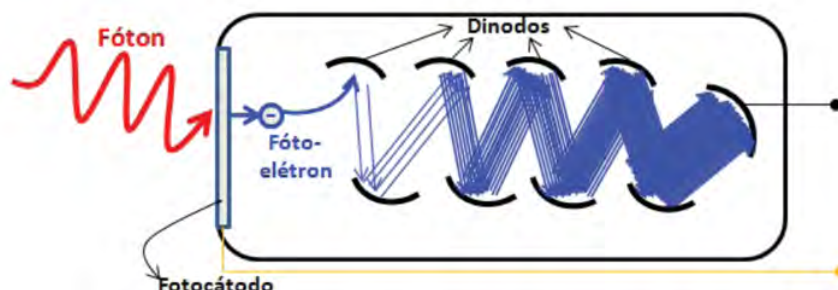


Figura 23 – Esquema de tubo fotomultiplicador. Figura obtida de PASSOS (2020).

Os instrumentos analíticos para espectroscopia de absorção, emissão e fluorescência, como os chamados espectrofotômetros e fotômetros são semelhantes quer sejam desenhados para radiação UV/Vis ou IV. Geralmente apresentam uma fonte de radiação estável, um seletor de comprimento de onda, um ou vários recipientes para amostra, um detector de radiação e uma unidade de processamento do sinal. Abaixo, a Figura 24 mostra um esquema de um espectrofotômetro de feixe duplo (PASSOS, 2010).

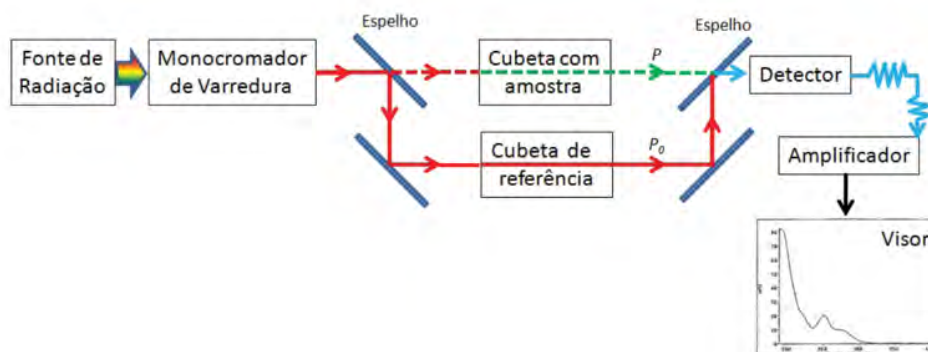


Figura 24 – Esquema de um espectrofotômetro de feixe duplo. Figura obtida de PASSOS (2020).

2.8 Espectroscopia Molecular na Região do Ultravioleta Visível e os Detectores de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) e de Arranjo de Diodos (DAD)

As transições de spin nucleares que ocorrem na Ressonância Magnética Nuclear (RMN) correspondem a comprimentos de onda na região das ondas de rádio do espectro eletromagnético. As transições vibracionais (estiramento e deformação angular nas moléculas) correspondem a comprimentos de onda na região do Infravermelho (IV). Já as transições rotacionais correspondem a energias na região do espectro eletromagnético das micro-ondas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A Espectroscopia Molecular na Região do Ultravioleta-Visível (UV/Vis) é baseada na absorção de energia nestas faixas para que os elétrons de orbitais atômicos ou de orbitais moleculares ligantes (HOMO) mudem para orbitais moleculares antiligantes (LUMO), ou seja

passem por transições eletrônicas, indo de um estado de baixa energia para um estado de energia mais elevada (OLIVEIRA, 2001).

Nas substâncias orgânicas, a maior parte das ligações são covalentes, ou seja, com compartilhamento de elétrons entre os átomos envolvidos. Podem ser do tipo sigma (σ) com sobreposição frontal de orbitais atômicos para formação do orbital molecular, ou do tipo pi (π), onde a interação entre os orbitais atômicos ocorre apenas entre orbitais atômicos posicionados paralelamente para a formação do orbital molecular de acordo com a Teoria dos Orbitais Moleculares (TOM). Há ainda a possibilidade de moléculas com átomos cujos orbitais atômicos não participam de ligações e possuem pares isolados de elétrons. A Figura 25 ilustra as possibilidades envolvidas na carbonila ($C=O$) (MARTINHO, 1994).

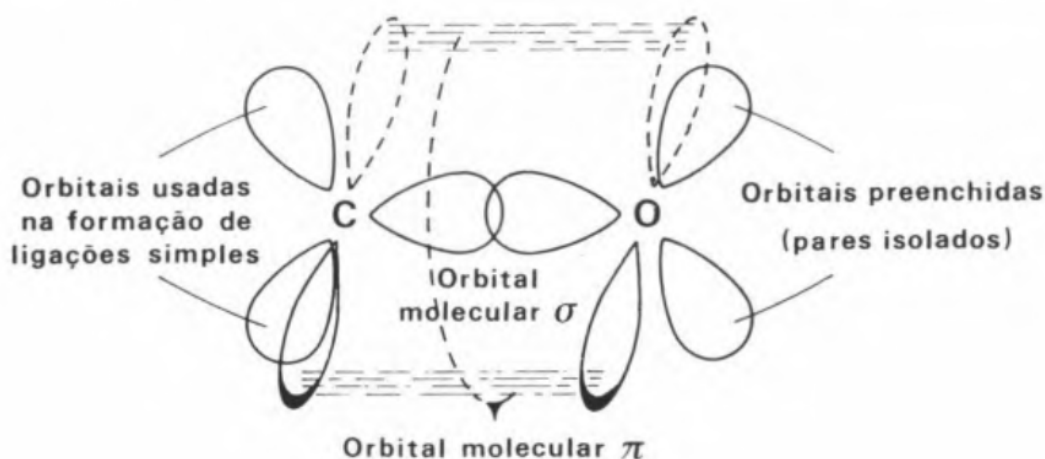


Figura 25 – Esquema da formação de orbitais moleculares na carbonila ($C=O$), evidenciando a formação da ligação sigma (σ), a formação da ligação pi (π) e os orbitais atômicos com pares de elétrons isolados. Figura obtida de MARTINHO (1994).

As ligações sigma (σ) são mais estáveis, portanto, de menor energia pois há maior sobreposição dos orbitais atômicos na formação do orbital molecular. Este tipo de sobreposição sigma (σ), ocorre somente uma vez entre dois átomos. Sendo assim, as ligações simples sempre serão tipo sigma (σ); enquanto nas ligações duplas, uma será do tipo sigma (σ) e outra do tipo pi (π) e; nas ligações triplas, uma será do tipo sigma (σ) e as outras duas do tipo pi (π) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Quando ocorre a absorção de radiação luminosa pelas moléculas, promovendo a excitação de elétrons para níveis de maior energia, os elétrons da ligação sigma (σ), por exemplo necessitam de maior energia para serem promovidos ao orbital sigma antiligante (σ^*), enquanto aqueles elétrons das ligações pi (π) necessitam de menores energias para serem promovidos para orbitais pi antiligantes (π^*). Já os elétrons de pares isolados não ligantes (n), estão níveis energéticos superiores aos elétrons das ligações sigma (σ) e pi (π) e mais próximos dos orbitais antiligantes π e π^* , portanto, podem ser promovidos para orbitais do tipo sigma antiligante (σ^*) ou pi antiligantes (π^*) (MARTINHO, 1994).

O diagrama de níveis de energia dos orbitais moleculares e atômicos na molécula da carbonila, na Figura 26, ilustra as transições possíveis e as diferenças de energia necessárias. A ordem crescente de energia necessária para as transições é $n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$. Por exemplo, a energia necessária para a transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$, a mais alta, é a energia fornecida no comprimento de onda (λ) de 150 nm. As energias envolvidas nas demais transições são menores

e são fornecidas por comprimentos de onda maiores, já que, a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda (λ) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

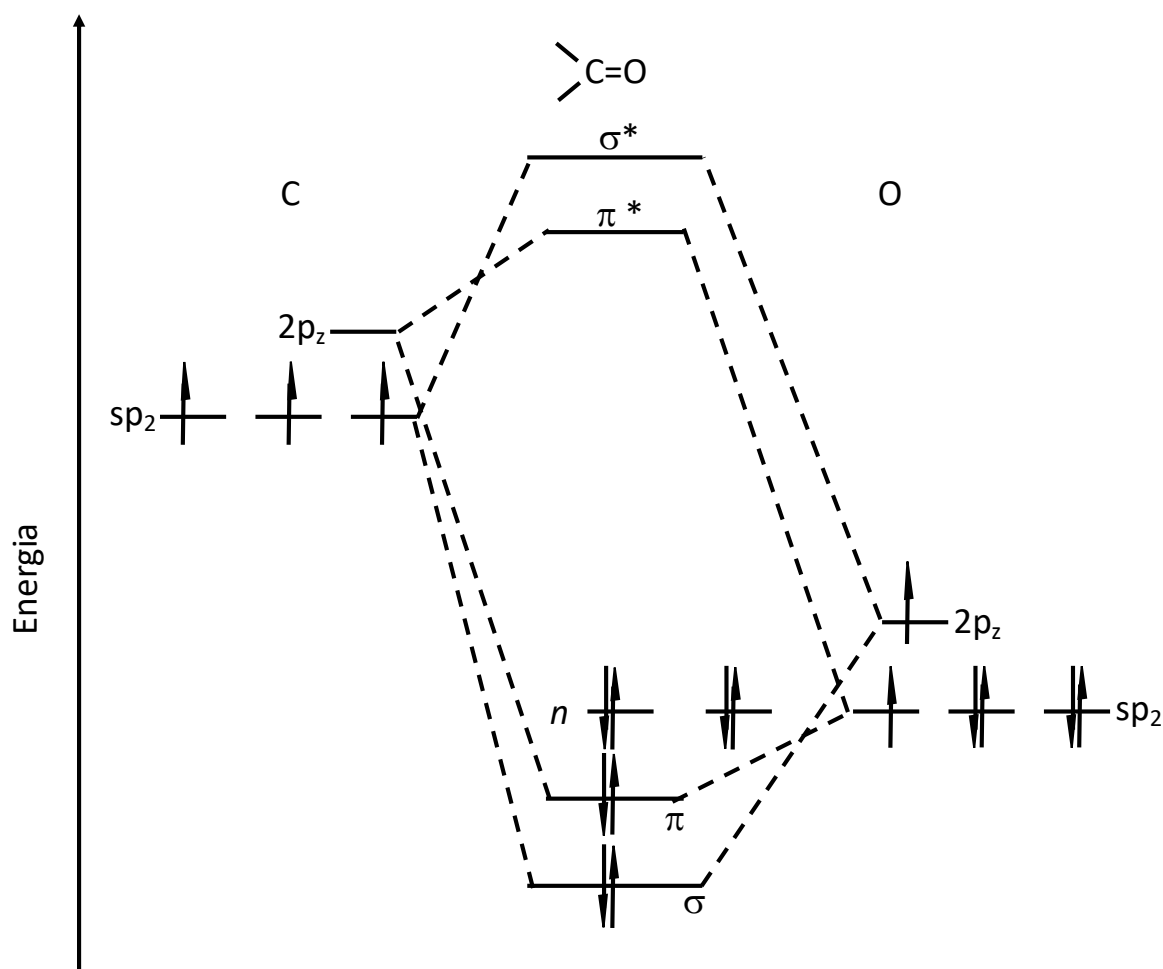


Figura 26 – Diagrama de níveis de energia dos orbitais moleculares da carbonila (C=O). Figura obtida de MARTINHO (1994).

As transições $n \rightarrow \sigma^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, ocorrem nas faixas de comprimento de onda (λ) de 150 a 250 nm e englobam substâncias saturadas contendo heteroátomos ou haletos e, substâncias insaturadas (hidrocarbonetos), respectivamente. Já as transições $n \rightarrow \pi^*$ ocorrem na faixa de comprimento de onda (λ) de 200 a 700 nm, são aquelas de menor energia e ocorrem nas substâncias orgânicas que apresentam grupos orgânicos, geralmente insaturados, com C=C, C=O e -NO₂, e são as mais analisadas por espectroscopia UV/Vis (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Nas substâncias orgânicas insaturadas, quanto maior o número de ligações duplas conjugadas (separadas por apenas uma ligação simples σ), onde os elétrons ficam deslocalizados (livres para se movimentar no sistema conjugado), menor a energia requerida para as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, e maior o comprimento de onda máximo de absorção e, portanto, maior a chance de a substância apresentar coloração. A Figura 27 ilustra como as transições nos sistemas mais conjugados requerem menos energia do que os sistemas menos conjugados ou com apenas uma insaturação. Quanto menor a energia requerida na transição HOMO $\rightarrow$ LUMO, maior o comprimento de onda da radiação absorvida e mais próximo do visível é a transição, conferindo cor as substâncias, como ocorre com os carotenoides com mais de 11 conjugações (MARTINS et al., 2015).

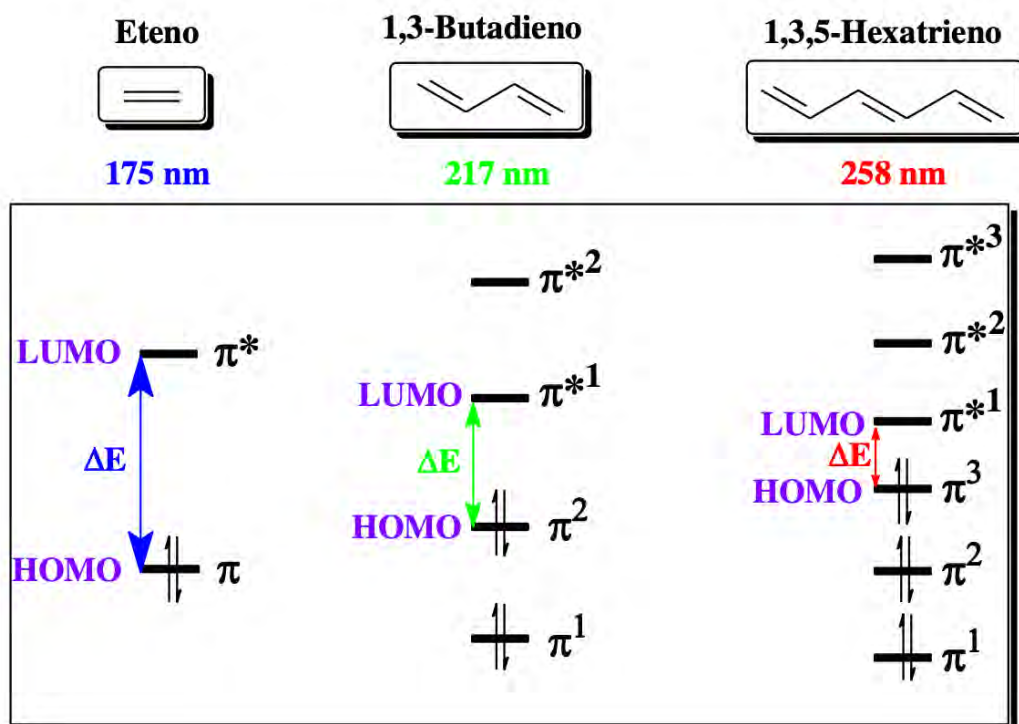


Figura 27 – Representação das transições HOMO→LUMO que ocorrem durante a absorção de energia luminosa por sistemas insaturados sem conjugação e conjugados. Figura obtida de MARTINS (2015).

O valor da energia envolvido nas transições eletrônicas é dependente do solvente. Solventes polares estabilizam mais os orbitais não ligantes (n) do que os orbitais antiligantes π^* , provocando deslocamento das bandas $n \rightarrow \pi^*$ para maiores energias. Já nas transições $\pi \rightarrow \pi^*$, os solventes polares estabilizam mais os orbitais π^* , do que os orbitais π , fazendo com que a energia necessária nessa transição seja menor (MARTINHO, 1994).

Estes grupos orgânicos que conferem às moléculas a propriedade de absorção no UV/Vis são chamados cromóforos. Também há os grupos que quando ligados a cromóforos, alteram a intensidade e o comprimento de onda (λ) de máxima absorção no UV/Vis das moléculas, estes são chamados auxocromos. Os grupos auxocromos podem deslocar o comprimento de onda absorvido para um valor maior (deslocamento batocrômico) ou para um comprimento de onda menor (deslocamento hipsocrômico). Podem também aumentar intensidade de absorção dos comprimentos de onda (efeito hiperacrômico) ou diminuir a intensidade de absorção dos comprimentos de onda (efeito hipocrômico) (MARTINS et al., 2015).

Um exemplo de deslocamento batocrômico por grupos auxocromos é a *p*-rosanilina, cujo comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) é em 539 nm, porém quando seus grupos amina são modificados para aminosulfônicos o comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) passa a ser 591 nm. A mistura de cromóforos e a concentração deles no meio modificam as cores observadas. A Figura 28 mostra as estruturas moleculares da *p*-rosanilina e sua molécula modificada pela inserção dos grupos aminosulfônicos, além de efeitos da mistura de cromóforos e de suas concentrações. A Tabela 2, exemplifica alguns grupos cromóforos e suas características como os seus comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}) e as transições envolvidas (MARTINS et al., 2015).



Figura 28 – Exemplo de deslocamento batocrômico na *p*-rosanilina pela alteração dos seus grupos amina para grupos aminosulfônicos. a) *p*-rosanilina; b) mistura de *p*-rosanilina e o seu análogo aminossulfonado; c) análogo aminossulfonado e d) análogo aminossulfonado em maior concentração. Figura obtida de MARTINS (2015).

Tabela 2 – Características ópticas de alguns grupos cromóforos. Reproduzida de Martinho (1994).

Cromóforo	Exemplo	Solvente	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ (1 L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Transição
Alceno	C ₆ H ₁₃ CH=CH ₂	n-heptano	177	13.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
			178	10.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alcino	C ₅ H _n C≡C-CH ₃	n-heptano	196	2.000	-
			225	160	-
	(CH ₃) ₂ C=O		186	1.000	$n \rightarrow \sigma^*$
			280	16	$n \rightarrow \pi^*$
Carbonila	(CH ₃)HC=O	n-hexano	180	<1.000	$n \rightarrow \sigma^*$
			293	12	$n \rightarrow \pi^*$
Carboxila	(CH ₃)COOH	Etanol	204	41	$n \rightarrow \pi^*$
Amida	(CH ₃)CONH ₂	Água	214	60	$n \rightarrow \pi^*$
Azo	CH ₃ N=NCH ₃	Etanol	339	5	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	CH ₃ NO ₂	Isooctano	280	22	$n \rightarrow \pi^*$
Nitroso	C ₄ H ₉ NO	Éter etílico	300	100	-
			665	20	$n \rightarrow \pi^*$
Nitrato	C ₂ H ₅ ONO ₂	Dioxano	270	12	$n \rightarrow \pi^*$

As antocianinas, pigmentos naturais presentes em frutos e flores possuem diversidade de cores não apenas pela presença de diferentes grupos auxocromos, mas também devido à variação do sistema conjugado com a variação do pH de suas soluções. Em geral apresentam coloração rosa avermelhada em pH ácido e colorações azuladas em pH neutro ou alcalino. A Figura 29 mostra a variação ocorrida no sistema conjugado das antocianidinas, estrutura base das antocianinas, com a mudança de pH.

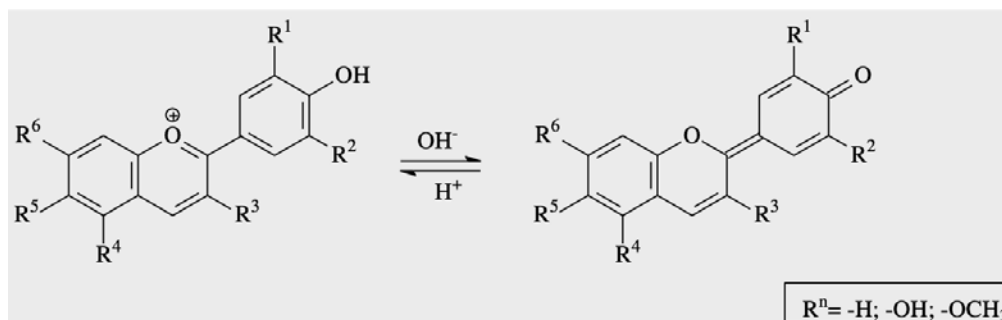


Figura 29 – Antocianidinas, estruturas básicas das antocianinas e as alterações dos seus sistemas conjugados quando em meios de diferentes pH's. Figura obtida de MARTINS (2015).

As betalainas também são pigmentos naturais responsáveis pelas cores de flores e frutos, como por exemplo a beterraba, a pitiaia rosa e os Bouganvilles, com flores, brancas, amarelas, lajanjas, rosas, vermelhas e roxas, cuja variação na coloração ocorre em função de pequenas variações na estrutura molecular, especificamente pela variação dos grupos acil-oligoglicosídeos. A Figura 30 mostra a estrutura base das betalainas.

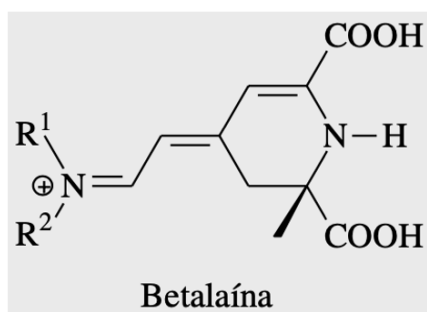


Figura 30 – Estrutura molecular base das betalainas. Figura obtida de MARTINS (2015).

Os sistemas ópticos usados em espectroscopia podem ser classificados como multiplexados, quando um único detector recebe informações simultâneas codificadas, padronizadas que, posteriormente são transformadas por métodos matemáticos em informações espectrais com ou sem sistemas dispersivos, como transformadas de Hadamard, ou não dispersivos, como transformadas de Fourier. Há também os sistemas não-multiplexados que podem empregar um detector, chamados de monocanais ou temporais que monitoram sequencialmente as intensidades de radiação do espectro eletromagnético e aqueles que empregam vários detectores, chamados de multicanais ou especiais, que monitoram simultaneamente vários comprimentos de onda (JR; PASQUINI, 1997).

Os não-multiplexados podem ser dispersivos, empregando rede de difração, e não-dispersivos, empregando filtros ou diodos emissores de luz. Os espectrofotômetros monocanais usam rede de difração rotatória e como detector uma fotomultiplicadora (PMT) fixada na fenda de saída do monocromador. Os multicanais têm geralmente um monocromador fixo e empregam como detectores filmes fotográficos, arranjo de fotomultiplicadoras, dispositivos de

transferência de carga (CTD) e arranjos de fotodiodos (PDA em inglês ou DAD em português) (JR; PASQUINI, 1997).

Os instrumentos multicanais, devido à simultaneidade na aquisição de dados proporcionam uma análise mais rápida quando a razão sinal/ruído é constante ou em um aumento na razão sinal/ruído quando o tempo da análise é fixado. Eles podem ser desenvolvidos com uso de arranjos de fotomultiplicadoras como nos espectrofotômetros de absorção atômica em plasma acoplado indutivamente (ICP-AAS), de leitura direta, porém, as fotomultiplicadoras empregadas embora muito sensíveis, com ampla faixa dinâmica e curto tempo de resposta, trazem alguns inconvenientes incompatíveis com um detector multicanal verdadeiro, já que as fotomultiplicadoras, embora miniaturizadas, exigem uma distância mínima entre elas que requerem grande dispersão da radiação eletromagnética, o que limita o número de canais do instrumento. Por essa razão, os espectrofotômetros de leitura direta são feitos para aplicações específicas para certos comprimentos de onda, não sendo muito versáteis (JR; PASQUINI, 1997).

Os espectrofotômetros com arranjos lineares de fotodiodos representaram um grande avanço para a espectrofotometria UV/Vis, quando comparados com aqueles com fotomultiplicadoras e redes de difração (monocromadores) móveis (Figura 31) (JR; PASQUINI, 1997).

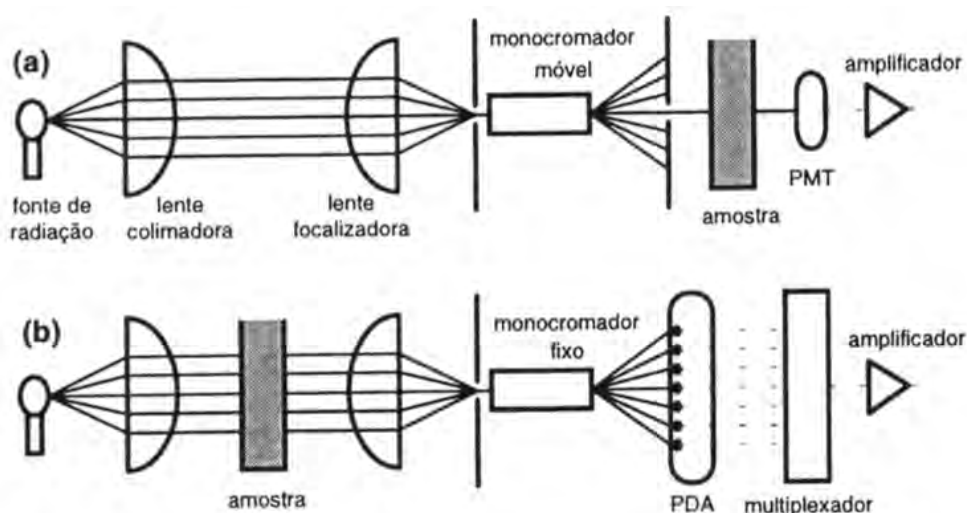


Figura 31 – Esquema de espectrofotômetro de UV/Vis convencional com rede de difração móvel (a) e do espectrofotômetro multicanal com arranjo de fotodiodos (DAD) (b). Figura obtida de JR & PASQUINI (1997).

O DAD possui sistema de óptica reversa, onde a rede de difração (monocromador) fica entre a amostra e o detector e não entre a fonte de radiação e a amostra como no UV/Vis convencional com monocromador móvel. Assim, no DAD a radiação policromática passa através da amostra e depois é dispersa no monocromador fixo nos diferentes comprimentos de onda monitorados simultaneamente pelos diodos do arranjo. Com as vantagens de aquisição de espectros em milissegundos sem distorções, medindo os comprimentos de onda com alta repetibilidade, já que o tempo da análise não depende da velocidade de movimento do monocromador. Apenas ocorre que no DAD não podem ser eliminados por meio de filtros a radiação espúria e também não há como compensar por meio de feixes duplos (como no UV/Vis convencional com monocromador móvel) as instabilidades da fonte e dos detectores. Mas os problemas como aquecimento e fotodegradação associados à incidência de radiação policromática sobre a amostra são minimizados com o uso de obturadores ou filtros. O DAD é

recomendado para o uso em conjunto com sistemas com sinais transientes como Analisadores por Injeção em Fluxo (FIA, em inglês, ou AIF, em português), CLAE, CLUE e na diferenciação de compostos que absorvem em comprimentos de onda muito próximos. Embora, nos casos em que os tempos de análises não são críticos, o desempenho dos espectrofotômetros de UV/Vis convencionais é superior, já que são mais sensíveis pela presença da fotomultiplicadora (JR; PASQUINI, 1997).

2.9 Espectrometria de Massa e o Espectrômetro de Alta Resolução

A espectrometria de massa é uma técnica analítica poderosa para aplicações qualitativas e quantitativas. Desde que o primeiro espectrômetro de massa foi desenvolvido, em 1912, apenas para a análise de moléculas inorgânicas pequenas, a técnica tem evoluído e, hoje, todos os tipos de moléculas biológicas podem ser analisados por essa técnica, praticamente sem nenhuma limitação de massa. As pesquisas na área de proteômica, por exemplo, são cada vez mais dependentes da espectrometria de massa (EM). A possibilidade de analisar moléculas biológicas como proteínas por EM foi alcançada, graças ao desenvolvimento de técnicas de ionização suaves como a Ionização por Eletrospray (IES) e Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (IDLAM) capazes de ionizar biomoléculas. A IES tem a facilidade de poder ser utilizada acoplada a técnicas de separação e a IDLAM analisa íons isolados carregados de peptídeos e proteínas, o que minimiza a complexidade dos espectros (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

Os analisadores quadrupolo (Q) e tempo de voo (TdV) são os mais empregados e podem ser usados juntos (QTdV) na técnica chamada em inglês de “tandem mass spectrometry”, ou EM/EM, ou EM², quando dois ou mais analisadores são usados sequencialmente para separar os íons. O QTdV, particularmente proporciona espectrômetros de alta resolução, que permite a determinação das razões *carga/massa* dos íons detectados com precisão de quatro casas decimais e erros muito pequenos, com variações apenas na última casa decimal, o que permite diferenciar íons moleculares e fragmentos com diferenças de pesos moleculares muito pequenas em razão de diferentes composições atômicas ou isotópicas (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

A espectrometria de massa é baseada na formação de íons carregados positivamente ou negativamente em fase gasosa e na separação destes íons por campo elétrico ou magnético através das suas diferentes razões *massa/carga* (m/z). No espectro de massa, o eixo x representa os valores de m/z , enquanto o eixo y indica o total de íons detectados. O espectro de massa fornece muitas informações importantes sobre as substâncias analisadas, como a sua estrutura, pureza, composição e fragmentação. A Figura 32 mostra os componentes básicos de um espectrômetro de massa com fonte de ionização por eletrospray (IES) (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

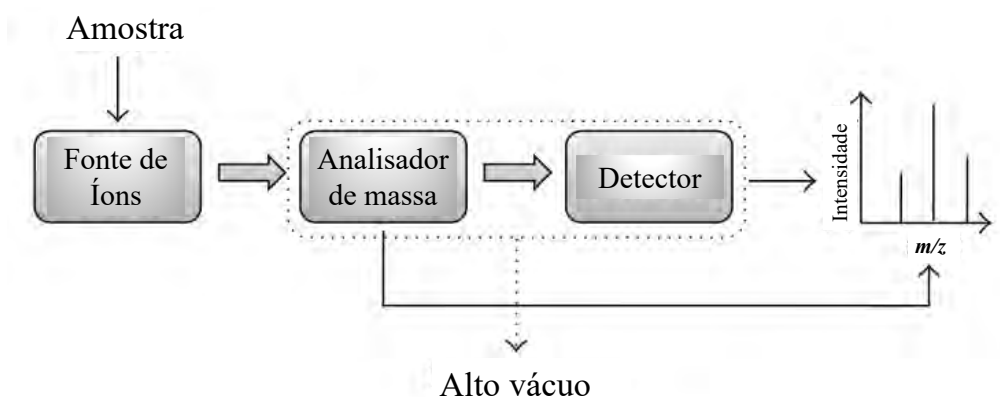


Figura 32 – Componentes básicos de um espectrômetro de massa com fonte de ionização por eletrospray (IES-EM). Figura adaptada de BANERJEE; MAZUMDAR (2012).

O primeiro espectrômetro de massa foi inventado em 1913 por Joseph John Thomson, professor de física experimental na Universidade de Cambridge, que demonstrou a utilidade da técnica para a química analítica. A sua invenção foi baseada nas primeiras demonstrações da técnica em 1898 por Wilhelm Wien, onde íons positivos foram defletidos por imposição de campos elétricos e magnéticos. Este último, foi precedido pelo físico Eugen Goldstein, em 1886, que descobriu um novo tipo de radiação que concluiu tratar-se apenas de partículas carregadas positivamente (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Os primeiros espectrômetros de massa comerciais para detectar substâncias orgânicas surgiram em 1940 por demanda da indústria de petróleo. A possibilidade de acoplamento de equipamentos de cromatografia gasosa à espectrometria de massa (CG-EM), em 1952, expandiu o interesse pela técnica pela área da bioquímica. A cromatografia gasosa separava compostos biológicos termicamente estáveis como ácidos graxos, esteroides e carboidratos. Mas o primeiro equipamento CG-EM foi criado por Holms e Morrell em 1957. O uso dos espectrômetros de massa acoplados a cromatógrafos gasosos era limitado a moléculas volatilizáveis de baixo peso molecular (<1000 Daltons (Da)). A técnica de ionização convencionalmente usada era o Ionização por Elétrons (IE), que é muito severa e resulta na destruição de moléculas biológicas complexas como as proteínas, nucleotídeos e carboidratos (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

Com a introdução de técnicas de ionização suaves, a espectrometria de massa foi acoplada a outras técnicas de separação, como a CLAE-EM e a eletroforese capilar (EC-EM) e começou a ser utilizada para estudos proteômicos (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

A fonte de íons é o portão de entrada do espectrômetro de massa, a partir de onde a amostra é introduzida independente da maneira (por acoplamentos à CG ou CLAE ou, por injeção direta). Depois de passar pela fonte de íons as outras partes do espectrômetro são analisador e detector. Há muitas técnicas de ionização disponíveis para uso como fonte de íons dos espectrômetros de massa.

O método tradicional é a ionização por impacto de elétrons (IE), que utiliza um feixe de elétrons para o processo de ionização e opera apenas sob vácuo enquanto os analitos estão em fase gasosa. Um feixe de elétrons (cargas negativas) é formado a partir de um filamento metálico aquecido (ex. tungstênio) e esses elétrons são acelerados eletricamente em direção à colisão com a amostra vaporizada, causando a incorporação ou a expulsão de elétrons dos analitos e a subsequente formação de ânions ou cátions radicais. Essas condições não são apropriadas para moléculas grandes como em muitos materiais biológicos. A IE, junto com a ionização química (IQ) é na maioria das vezes usada com equipamentos CG-EM. A Figura 33

ilustra como ocorre a formação dos íons e fragmentos no IE (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

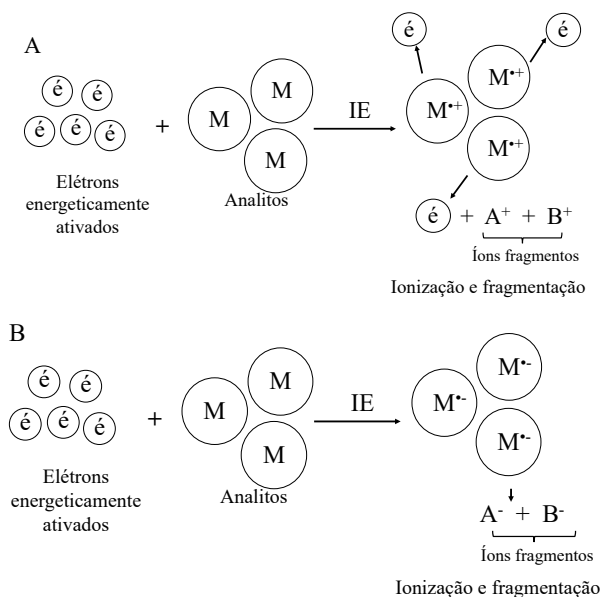


Figura 33 – Ionização e fragmentação por Ionização por Elétrons (IE). (A) formação de íons positivamente carregados, (B) formação de íons negativamente carregados. Figura adaptada de EL-ANEED; COHEN; BANOUB (2009).

Devido às limitações associadas com a IE, métodos como a IQ e ionização por dessorção por plasma (DP) foram introduzidos em 1966 e 1974, respectivamente. Ambas as técnicas resultam, predominantemente, na formação de íons protonados e desprotonados, que são mais estáveis do que os íons radicais formados durante as análises por IE-EM. A IQ depende da interação entre elétrons e moléculas neutras, como metano, resultando na formação de íons que interagirão com os analitos, produzindo espécies protonadas. Como na IE, esse método possui limitações de massa (<1000 Da pela dificuldade de volatilização) e requer amostras com características específicas com relação à estabilidade térmica e volatilidade. A IQ, entretanto, é melhor do que a IE quanto à produção de íons moleculares. Mesmo assim, tanto a IQ quanto a IE não são capazes de ionizar as mais importantes e termicamente instáveis substâncias biológicas polares (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

A ionização por DP, por outro lado é uma das mais recentes técnicas de ionização suaves aplicáveis na análise de biomoléculas, incluindo aquelas de pesos moleculares superiores a 100.000 Da. O termo suave significa que uma quantidade mínima de energia é transferida aos analitos durante o processo de ionização. A ionização DP foi introduzida depois da elaboração de métodos para a ionização de campo e dessorção por campo. As técnicas de ionização suaves foram se desenvolvendo e substituindo as técnicas antigas. As técnicas de ionização suaves que surgiram foram bombardeamento atômico rápido (BAR), espectrometria de massa de íon secundário líquido (ISLEM), ionização por dessorção a laser assistida por matriz (IDLAM) e a ionização por eletrospray (IES) (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

A IDLAM e a IES revolucionaram o uso da espectrometria de massa e facilitou o estudo de substâncias biológicas, como glicoconjugados, proteínas e DNA. A importância do desenvolvimento da IDLAM e da IES foi globalmente reconhecida quando os seus inventores Koichi Tanaka da Shimadzu Corp. em Kyoto (Japão) e John Fenn, da Virgínia Commonwealth University, em Richmond (USA), dividiram o Prêmio Nobel de Química em 2002. Em seu

discurso na premiação, Fenn disse: “Há alguns anos atrás a idéia de fazer proteínas e polímeros voarem através de ionização por eletrospray parecia tão improvável como fazer um elefante voar, mas hoje essa é uma parte padrão nos espectrômetros de massa”. Apesar disso, muitos dos créditos dados pelo desenvolvimento da IDLAM deveriam também ser dados a Michael Karas e Franz Hillen Kamp, que desenvolveram as idéias das técnicas de dessorção a laser. A Figura 34 mostra como as publicações com uso de IES aumentaram no período de 1990 até 2009 (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

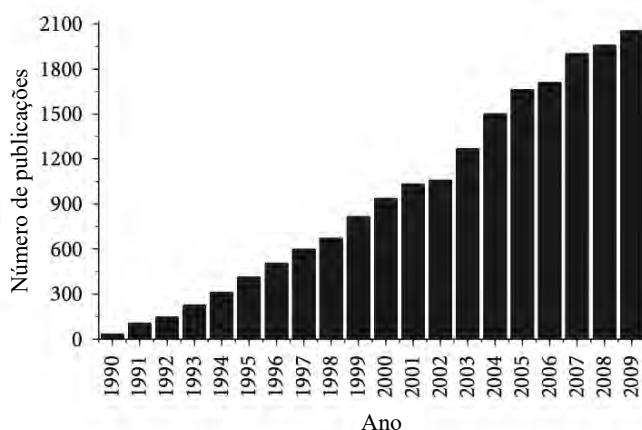


Figura 34 – Histograma do crescente número de publicações de trabalhos usando a técnica de ionização por eletrospray (IES) de 1990 até 2009, após a descoberta de Fenn sobre o uso da ionização por eletrospray como fonte de íons na espectrometria de massa (IES-EM) para a análise de biomoléculas em 1989 (informação do ISI Web of Knowledge em 26.06.2011 com o termo “Eletrospray ionization”. Figura adaptada de BANERJEE & MAZUMDAR (2012).

2.9.1 Ionização por Eletrospray-Espectrometria de Massa (IES-EM)

O desenvolvimento da ionização por eletrospray teve início em 1960 com o trabalho de Dole e colaboradores, que introduziram com sucesso um polímero de poliestireno (peso molecular aproximado de 51.000 Da) numa fase gasosa como uma espécie carregada. Nesta técnica as amostras são geralmente solubilizadas em tampão ou solvente e introduzidas no espectrômetro de massa na forma de spray. Essa técnica foi ligada ao analisador de massa tipo quadrupolo e foi otimizada significativamente nos anos 80. A IES-EM é usada para estudos qualitativos e quantitativos de uma grande variedade de substâncias não-voláteis e termicamente instáveis como compostos inorgânicos simples até moléculas biológicas complexas (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Na IES-EM a amostra deve ser solúvel preferencialmente em um solvente polar, que pode ser introduzido, sob pressão atmosférica, dentro da fonte de ionização através de uma agulha. Como a amostra é constantemente borrifada na forma de spray, um alto potencial elétrico é aplicado na agulha (3-4 Kv), resultando na formação de gotas altamente carregadas. As gotas carregadas são eletricamente direcionadas e vaporizadas através da introdução de um gás neutro e aquecido (nitrogênio). Sob essas condições, as gotas se dividem em gotas que se repelem e ficam cada vez menores enquanto a força repulsiva (ou força coulombica) entre os íons na superfície aumenta.

As forças repulsivas se tornam maiores do que a tensão superficial do solvente, resultando na dessorção dos íons para a fase gasosa. Essa teoria da formação dos íons na IES é chamada método da evaporação iônica e acredita-se que ela favorece a formação de íons com baixas razões *massa/carga* (m/z). Uma teoria alternativa explica a formação de íons com altas

m/z , é o modelo de carga residual, que envolve a evaporação contínua do solvente acompanhada pelas divisões das gotas até que um único íon (provavelmente multicarregado) é formado no final desse processo (quando o solvente é completamente evaporado). A Figura 35 ilustra os diferentes mecanismos propostos na formação dos íons (sem fragmentação) durante o processo de IES (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

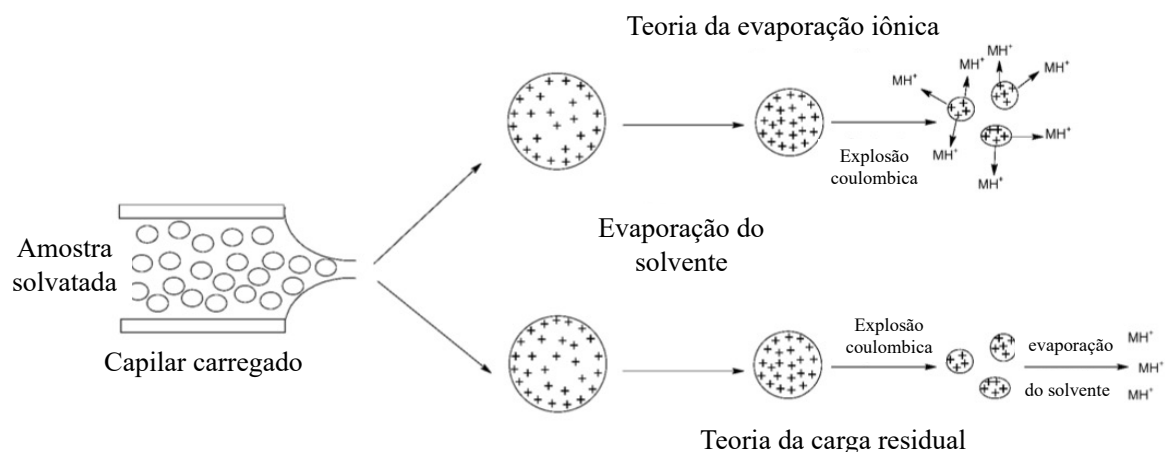


Figura 35 – Esquema da ionização por eletrospray (IES) usada como fonte de íons na espectrometria de massa e as teorias da evaporação iônica e da carga residual na formação dos íons. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).

A IES resolveu os problemas inerentes ao estudo de moléculas grandes de proteínas por EM e as performances da técnica foram aprimoradas através do acoplamento da cromatografia líquida (CL-EM). Na IES desenvolvida pelo grupo pioneiro de Fenn, as amostras eram injetadas com fluxo de $2-20 \mu L \min^{-1}$, com produção de gotas de $1-2 \mu m$ de diâmetro, que era um problema quando as amostras biológicas eram limitadas. Após esforços de outros pesquisadores, foi possível obter tecnologias de nanospray, que operam em fluxos muito reduzidos de $20-50 nL \min^{-1}$ e gotas de $200 nm$ de diâmetro. Com o nanospray, não só o problema da obtenção de fluxos menores foi resolvido, mas também o mecanismo de formação de íons foi aprimorado principalmente para análises de biomoléculas complexas. A técnica de ESI continua sendo investigada e aprimorada para novas aplicações. A Figura 36, por exemplo ilustra algumas modificações na geometria e direcionamento do spray em fontes de IES-EM/EM que contornam o problema de entupimento de capilares e filtros com moléculas neutras e não voláteis (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

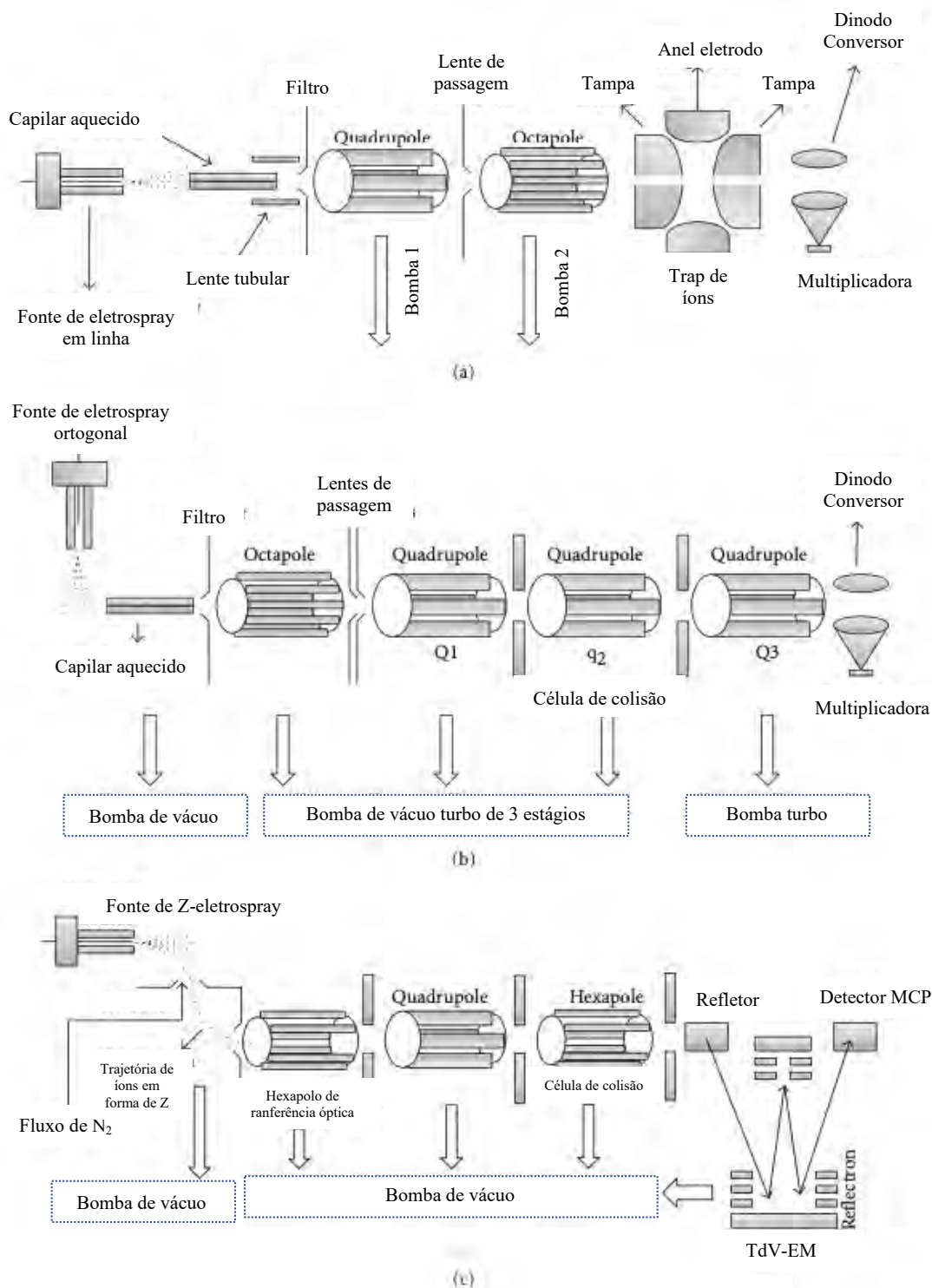


Figura 36 – Esquema dos espectrômetros de massa (a) Thermo-Finnigan LCQ Deca com spray axial, (b) Agilent 6410 Triplo Quadrupolo para CL-EM no modo spray ortogonal, (c) Waters Micromass Q-TdV Ultima IES-EM. Figura adaptada de BANERJEE & MAZUMDAR (2012).

Na IES, quando o modo de ionização é positivo (o tubo capilar responsável pela formação do spray é mantido com potencial positivo) as cargas dos íons geralmente são formadas por protonação (algumas vezes metalação também), mas no modo de ionização negativo (quando o tubo capilar responsável pela formação do spray é mantido com potencial negativo) as cargas dos íons são formadas por desprotonação do analito. Como os solventes

polares geralmente utilizados para solvatar os analitos (água, metanol, acetonitrila, etc.) estão sujeitos a muitos tipos de reações redox, no modo positivo por exemplo a água pode perder elétrons liberando H^+ e O_2 ($2H_2O = O_2 + 4H^+ + 2e^-$), enquanto no modo negativo a água ganha elétrons e libera OH^- e H_2 ($2H_2O + 2e^- = H_2 + 2OH^-$). Uma vez que as cargas dos analitos ocorrem por transferência de prótons, as espécies iônicas detectadas não são os verdadeiros íons moleculares (que são formados pela perda ou ganho de um elétron), mas sim moléculas protonadas ou desprotonadas. Quando soluções puras de analito são submetidas a IES, todos os picos que aparecem no espectro de IES-EM representam as espécies moleculares intactas com variações nas cargas como na Figura 37, onde o eixo vertical representa a abundância relativa das espécies multiplamente carregadas do mesmo analito e o eixo horizontal representa a razão m/z dos analitos multiplamente carregado. O chamado pico base é geralmente o mais intenso e com 100 % de abundância relativa (pico n^+ como na Figura 37) (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

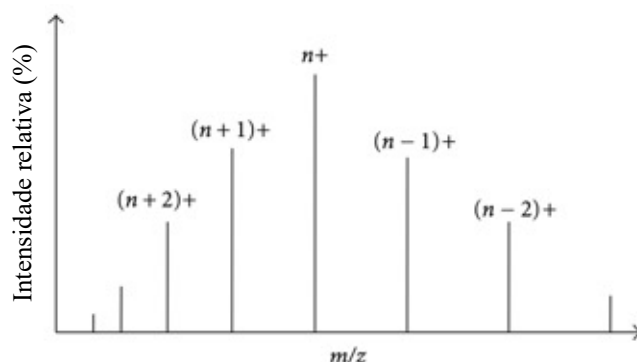


Figura 37 – Representação do espectro de massa obtido por IES-EM no modo positivo. Figura adaptada de BANERJEE & MAZUMDAR (2012).

2.9.2 Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (IDLAM)

A IDLAM é a principal fonte de ionização usada atualmente no sequenciamento de proteínas, DNA, lipídeos e glicoconjugados e na pesquisa em proteômica juntamente com a IES. Na IDLAM, os íons são dessorvidos de uma matriz sólida. Primeiro uma amostra é solubilizada no solvente apropriado e homogeneizado com uma quantidade de uma matriz apropriada em excesso. Depois, essa mistura é colocada numa placa e seca ao ar (ou sob nitrogênio). Dessa forma os componentes da amostra são co-cristalizados junto com a matriz. Os componentes da amostra são levados à fase gasosa através da incidência de um feixe de elétrons (geralmente um laser de nitrogênio no comprimento de onda de 337 nm), que atinge a matriz cristalizada com a amostra, levando a absorção da energia do laser pela matriz e a subsequente dessorção e ionização dos analitos na amostra (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

A IDLAM inicialmente funcionava sob vácuo, porém em 2000, foi desenvolvida a técnica para pressão atmosférica (PAIDLAM). Esta forma de funcionamento reduziu o custo, facilitou a operação e aumentou a produção comercial de espectrômetros com as fontes de íons intercambiáveis IDLAM e IES. O mecanismo da formação dos íons na IDLAM não é completamente entendido e a escolha da matriz específica é principalmente feita de maneira experimental ou influenciada pelo modo de ionização (positiva ou negativa). Matrizes básicas são mais eficazes no modo negativo, enquanto as matrizes ácidas são mais eficazes no modo

positivo. A Figura 38 ilustra o processo de formação dos íons durante a IDLAM-EM (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

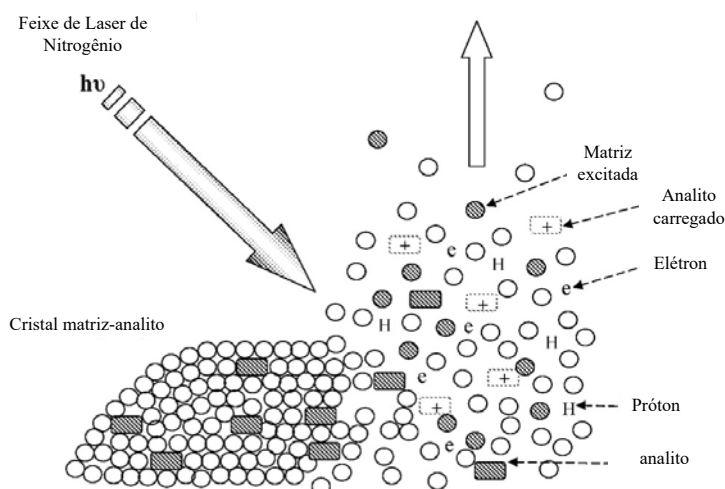


Figura 38 – Processo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (IDLAM). O cristal matriz-analito é bombardeado com um feixe de laser UV que excita a matriz, que por sua vez, transfere a energia para os analitos, resultando na ionização e na dessorção dos analitos, principalmente na forma de espécies unicamente carregadas. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).

Tanto a IDLAM quanto a IES são técnicas analíticas muito sensíveis que utilizam analitos em concentrações picomolares. Uma das principais diferenças entre a IDLAM e a IES é o estado no qual as amostras são introduzidas na fonte de íons. A IES usa amostras solvatadas que são injetadas no instrumento enquanto a IDLAM usa amostras no estado sólido. Quando acoplada a CL é possível usar a IES para medidas quantitativas. Apesar do fato da IES ter maior reprodutibilidade do que a IDLAM, deve ser considerado que a abundância relativa de vários íons na IES não representa a concentração da amostra. Por isso, soluções de padrões (quando o objetivo é quantificação) devem ser preparadas para uma calibração adequada, preferencialmente com uso de análogos isotópicos do analito. Houve algumas tentativas de expansão do uso da IDLAM em medidas quantitativas e também acoplado a CL. Porém, a heterogeneidade dos cristais da amostra na matriz impediu o êxito dessas tentativas. A qualidade dos espectros na IDLAM pode ser muito influenciada pela posição do feixe de laser e, o operador deve identificar o spot com o cristal de amostra que pode produzir o espectro mais informativo (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Tentativas de acoplamento da IDLAM à CL são, até certo ponto, relacionadas com a robustez da IDLAM na presença de sais e/ou detergentes. Em contraste, quando a IES é usada, contaminantes adsorvidos nos tubos nos quais a amostra é infundida (injetada) através da agulha podem competir com o analito e influenciar os resultados. Estes problemas não ocorrem no IDLAM porque os analitos podem se separar das impurezas durante a ionização da mesma forma que escapam da matriz.

Finalmente, a IES tende a produzir espécies multiplamente carregadas das biomoléculas como proteínas e peptídeos. Essa é a razão pela qual a IES pode, teoricamente, ter faixas de massa ilimitadas, porque proteínas muito grandes podem aparecer em m/z massa mais baixas. A IDLAM tende a produzir íons unicamente carregados e esse fenômeno é muito importante para a identificação de íons moleculares de proteínas, carboidratos e lipídeos. Karas e colaboradores criaram a hipótese de que na IDLAM a neutralização de espécies multiplamente carregadas ocorre devido à produção de elétrons neutralizantes durante o processo de

fotoionização e, assim, os íons com carga única são chamados de “sobreviventes sortudos” (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009). A Tabela 3 resume as características e compara os métodos de ionização mais comuns.

Tabela 3 – Principais características dos métodos de ionização atualmente usados na espectrometria de massa. Tabela adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).

Técnica de Ionização	Natureza dos analitos	Introdução da amostra	Faixa de massa (Da)	Descrição
Ionização por Elétrons (IE)	Voláteis; termicamente estáveis	Cromatografia gasosa ou sonda líquida	<1000	Método de ionização drástico; principalmente para detecção de fragmentos
Ionização química (IQ)	Voláteis; termicamente estáveis	Cromatografia gasosa ou sonda líquida	<1000	Método de ionização suave; principalmente para detecção de íons moleculares
Bombardeamento Atômico Rápido (BAR)	Compostos organometálicos	Cromatografia líquida ou injeção direta	<5000, faixa ótima: 200-2000	Método de ionização suave; requer uma matriz
Ionização por Dessorção a Laser com Matriz Assistida por Matriz (IDLAM)	Biomoléculas (proteínas, DNA, glycoconjugados)	Amostra cocrystalizada junto a uma matriz	Pode ir acima de 500.000	Método de ionização muito suave; para detecção de íons com carga única
Ionização por Eletrospray (IE)	Compostos Orgânicos e inorgânicos	Cromatografia líquida ou injeção direta	Desde massas muito pequenas a massas extraordinariamente altas	Método de ionização muito suave; para detecção de íons múltiplamente carregados

Outras técnicas continuam a surgir a partir da IDLAM e da IES. A ionização por dessorção a laser melhorada pela matriz (IDLMM), por exemplo foi um desenvolvimento da IDLAM e combina o poder da IDLAM com a seletividade da técnica do chip de proteína. Ela tem sido otimizada para o diagnóstico de câncer e descoberta de biomarcadores. Mais recentemente, uma fonte de ionização por eletrospray dessorção (IESD) foi desenvolvida e o espectro de massa pode ser obtido de uma amostra no seu ambiente nativo (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

2.9.3 Analisadores de Massa

Os analisadores de massa são a parte dos instrumentos onde os íons são separados baseado nos seus valores de m/z . No espectrômetro, a separação dos íons é geralmente direcionada eletricamente, apesar de alguns analisadores tradicionais, chamados setores magnéticos, empregarem campos magnéticos que influenciam a separação. Similar ao processo de ionização em termos de metodologias disponíveis, há numerosos sistemas que podem separar íons baseados nos valores de m/z . Atualmente, quatro analisadores principais são largamente usados pelos espectroscopistas de massa. São eles: o quadrupolo (Q), o quadrupolo trap iônico (QTI), o tempo de voo (TdV), e o ressonância ciclotrônica iônica com transformada de Fourier (TF-RCI). Esses analisadores variam em tamanho, preço, resolução, faixa de massa e, habilidade para realizar acoplamentos (EM/EM). O QTI é capaz de realizar múltiplas análises (EMⁿ), o TF-RCI é muito poderoso na obtenção de medidas acuradas de massa (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

2.9.4 Analisador Quadrupolo (Q)

O princípio do analisador de massa quadrupolo (Q), foi primeiramente descrito na década de 50 pelo físico vencedor do Prêmio Nobel, Paul Wolfgang. Seu filtro de íons foi apropriado para acoplamento em sistemas (CG-EM). Esse analisador é composto por quatro barras paralelas tubulares, como na Figura 39. Uma corrente direta (DC) e um potencial (U) é aplicado em duas das barras enquanto as outras duas barras estão ligadas a um potencial de rádio-frequência (rf), chamada de V. Os íons formados na fonte, são impulsionados através do quadrupolo através de um campo elétrico em torno de 5 Kv. Um íon carregado positivamente, por exemplo, se moverá na direção da barra negativamente carregada. Entretanto, a polaridade é alternada e o íon muda seu caminho antes de colidir com a barra. Nessa situação, os íons seguem uma trajetória oscilatória complexa de acordo com valores de V, U e frequência (ω). Somente íons dentro da estreita faixa de trabalho de m/z , resistirão até o final do caminho até o detector. Alguns íons seguirão trajetórias erradas e colidirão com uma das barras. A rampa de V, U e ω podem resultar na transmissão de vários íons com diferentes m/z até o detector (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

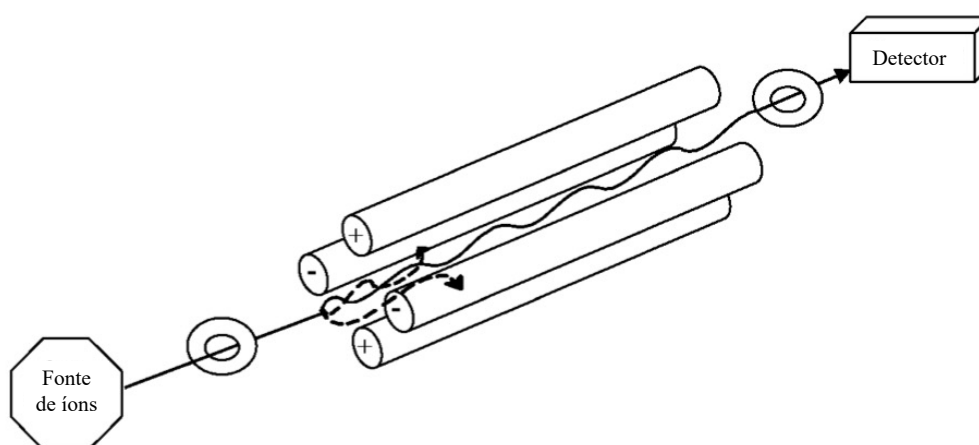


Figura 39 – Representação do analisador quadrupolo (Q). Quatro barras elétricas paralelas com variadas correntes diretas e potenciais de radio-frequência alternados. Apenas um íon de determinado m/z possuirá a trajetória correta e chegará intacto ao detector. Os demais colidirão com as barras e serão rejeitados. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).

As vantagens dos analisadores quadrupolo são: baixo custo, pequenos tamanhos, robustez e fácil manutenção. O quadrupolo possui limitada capacidade em termos de faixa de massa de trabalho (geralmente <4000 Da), baixo poder de resolução e possibilidade de realizar análises EM/EM. O poder de resolução pode ser aumentado pelo acoplamento a outros analisadores como três quadrupolos no triplo quadrupolo (QqQ) e acoplado ao TdV (QTdV). Um único quadrupolo acoplado a outro analisador no espectrômetro de massa funciona como um focalizador de íons que guia os íons através de outros componentes do equipamento. Essa função pode ser otimizada com hexapolos e octapolos. Porém, não podem funcionar como filtros de íons (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

2.9.5 Analisador Tempo de Vôo (TdV)

Esse método de separação de íons é um dos mais simples e apesar de ter sido descrito em meados do século 20, só foi usado nos anos 90 quando redescoberto. O TdV é baseado no voo livre de moléculas ionizadas em um tubo de 1-2 m antes de alcançar o detector. A Figura 40 A, mostra dois íons formados ao mesmo tempo na fonte (A_1 e A_2), com as mesmas cargas, porém com diferentes massas, sendo a de $A_1 < A_2$, assim A_1 alcançará primeiro o detector. A principal vantagem do TdV é que todos os íons formados atingirão o detector (diferente dos analisadores quadrupolo ou setor magnético). A equação que correlaciona m/z com o tempo total de voo (t_v) é a seguinte:

$$m/z = t_v^2 \frac{2 E s}{(2s + x)} \quad \text{Equação 11}$$

Onde E é a voltagem aplicada, s é o comprimento da região de aceleração do íon e x é o comprimento da região de voo livre. Teoricamente E , s e x são fixos e a equação acima pode ser simplificada para:

$$m/z = K t_v^2 \quad \text{Equação 12}$$

Onde K é o fator de calibração. Nesta equação fica explícita a relação direta entre m/z e o tempo de voo (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

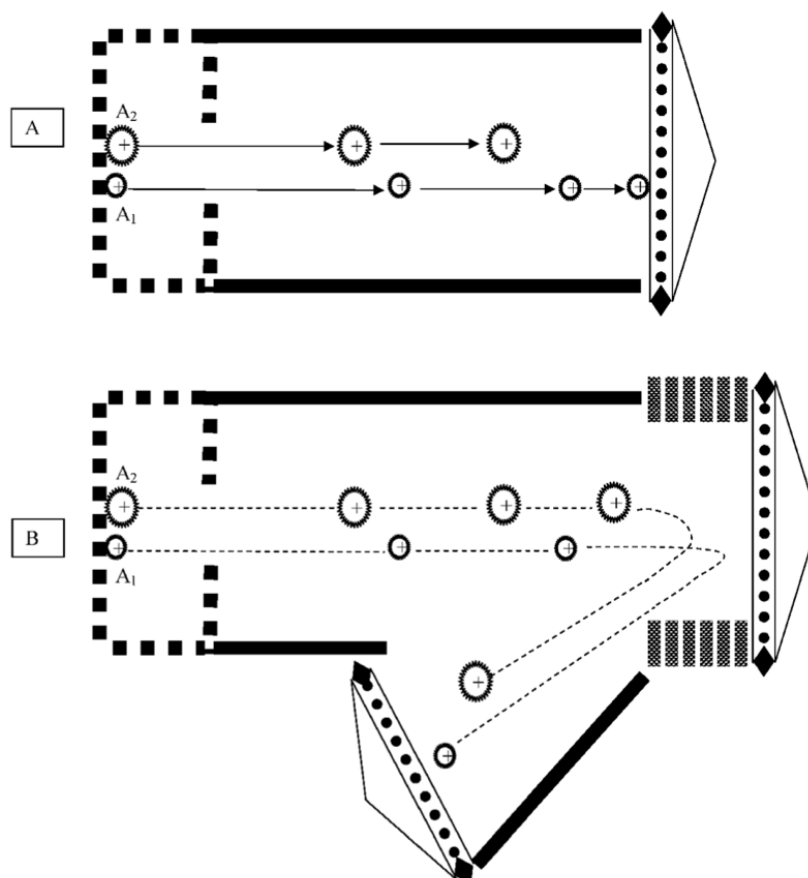


Figura 40 – Representação dos analisadores A) Tempo de voo (TdV) e B) Tempo de voo tipo-reflectron (TdV tipo-reflectron). Figura obtida de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).

O TdV tem a vantagem de detectar uma ampla faixa de massa. A linearidade do tubo influencia no seu poder de resolução, porque os íons que entram no TdV possuem diferentes energias cinéticas (KE) que influenciarão na resolução e na medida da m/z do íon molecular. O desenvolvimento do TdV tipo-reflectron, foi feito através da inserção de um recurso óptico iônico que muda o caminho dos íons dentro do TdV, como na Figura 40 B. Íons com alta KE penetram profundamente no espelho de íons e depois serão repelidos melhorando a resolução do espectro de TdV. Um outro fator importante é o comprimento do tubo porque os íons no TdV tipo-reflectron estão viajando num comprimento maior, o que melhora a resolução e a acurácia das medidas de massa já que aumenta o tempo de voo. Os TdV tipo-reflectron possuem dois detectores, um atrás do espelho e outro ao final do caminho dos íons. Devido ao fato do reflectron resultar em perda de íons, o operador deve decidir entre maior resolução ou sensibilidade. Devido à natureza do TdV, ele é largamente usado acoplado à fonte IDLAM (IDLAM-TdV). O TdV também pode ser eficiente quando acoplado a fonte IES em instrumentos híbridos ou ortogonais TdV, capazes de realizar análises múltiplas de EM/EM. Essas fontes de ionização em conjunto com analisadores de massa como o TdV permitem a detecção de macromoléculas que estão acima da faixa de mega Daltons (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

2.9.6 Espectrometria de Massa Tandem

Ambos os equipamentos simples com apenas um analisador de massa como o IES-EM e IDLAM-EM são valiosos para a determinação dos íons moleculares e podem fornecer sob

certas circunstâncias, informações estruturais. Essas circunstâncias referem-se à indução da fragmentação na fonte de íons como as dissociações pós-fonte e as fragmentações na fonte, nos casos da IDLAM e IES, respectivamente. As técnicas de Espectrometria de massas Tandem (a palavra Tandem em inglês significa posicionar objetos uns atrás dos outros, desta forma significa o acoplamento de analisadores) baseiam-se no isolamento de uma específica m/z (íon precursor), que pode ser submetido a dissociação e produção de fragmentos (íons produtos). O trabalho do usuário é resolver o quebra-cabeças criado no espectro de EM/EM, revelando informações sobre a estrutura molecular do analito (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

Para alcançar esse objetivo, múltiplos analisadores de massa podem ser conectados em série onde um íon isolado é produzido no primeiro analisador e segue para a fragmentação na célula de colisão, onde o último analisador separa os íons fragmentos com base nos seus valores de m/z . A Figura 41 ilustra as diferenças entre um espectrômetro de massa simples, com um único analisador e espectrômetros com múltiplos analisadores do tipo tandem, ou EM/EM. Várias combinações de analisadores de massas podem ser feitas usando setores magnéticos, Q e TdV. Esses instrumentos EM/EM são considerados tandem no espaço porque as análises são feitas em diferentes analisadores de massa e em diferentes espaços. Tandem no tempo, porém, se refere a instrumentos com trap (armadilha), onde todos os íons são descartados exceto aquele que é selecionado por sua m/z para seguir para fragmentação no mesmo espaço. Estes instrumentos incluem o íon trap quadrupolo (ITQ) e o FT-EM, que possuem apenas um analisador e mesmo assim são capazes de realizar múltiplas análises do tipo EMⁿ, que são poderosas ferramentas em estudos estruturais. Foi demonstrado, por exemplo, que a intensidade do íon é a única limitação nas análises EMⁿ feitas através de um ITQ (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

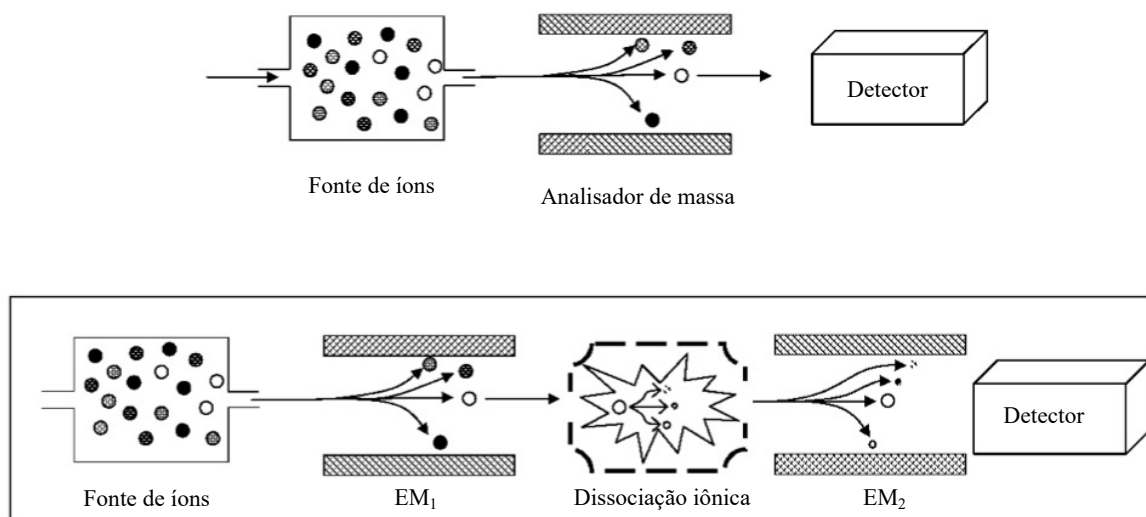


Figura 41 – Comparação de um espectrômetro de massa simples com analisador único (espectrômetro de um estágio) (desenho superior), e um espectrômetro tandem (com dois analisadores: EM₁ e EM₂) (desenho inferior). No espectrômetro de massa de um estágio, os íons formados na fonte são separados no analisador de massa antes de chegar no detector. No espectrômetro tandem, um íon é selecionado no analisador de massa EM₁, depois é direcionado para a célula de colisão, posteriormente, para o segundo analisador de massa, EM₂, que separa os íons produtos antes que eles alcancem o detector. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).

Um dos espectrômetros de massa do tipo tandem no espaço mais usados é o triplo quadrupolo (QqQ), introduzido em 1970, onde o q refere-se à célula de colisão (um quadrupolo apenas de rf). O íon selecionado para a EM/EM é filtrado no primeiro quadrupolo e é submetido à colisão. A colisão resultará na transferência de energia cinética, causando a fragmentação do íon. Esse processo é chamado dissociação ativada por colisão (DAC) ou dissociação induzida por colisão (DIC). A DIC pode ser dividida em alta e baixa energia. A de baixa energia é associada ao QqQ e Q-TdV. A DIC com alta energia é observada em instrumentos de setor magnético que operam com altos potenciais de aceleração (em keV), onde a fragmentação por direcionamento de cargas é dominante. O potencial de aceleração é menor que 100 eV no caso de DIC com baixa energia e as perdas neutras são o principal mecanismo onde ácidos graxos, por exemplo, são fragmentados. A DIC não é o único processo para fragmentação do íon precursor. Métodos alternativos foram desenvolvidos e incluem por exemplo dissociação induzida na superfície e dissociação induzida pela captura de elétrons (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Em um espectrômetro de massa QqQ, três quadrupolos estão conectados, porém somente EM/EM com diferentes analisadores são chamados espectrômetros de massa híbridos. Um dos mais usados, capazes de análises com baixa energia do tipo DIC é o Q-TdV.

2.9.7 Espectrômetro de Massa Híbrido: Quadrupolo Ortogonal ao Tempo de Vôo (Q-TdV)

O espectrômetro QTdV foi descrito pela primeira vez em 1996 como um meio de combinar a habilidade de varredura do quadrupolo e o poder de resolução do TdV. Essa configuração de instrumento pode fornecer alta qualidade de informações de forma simples no espectro de massa do tipo EM, assim como do tipo EM/EM. A Figura 42 mostra um diagrama representativo do QTdV. O instrumento é composto de dois analisadores do tipo quadrupolo conectados em sequência a um analisador TdV posicionado ortogonalmente aos quadrupolos, o que explica o nome dado ao instrumento: espectrômetro de massa QTdV ortogonal.

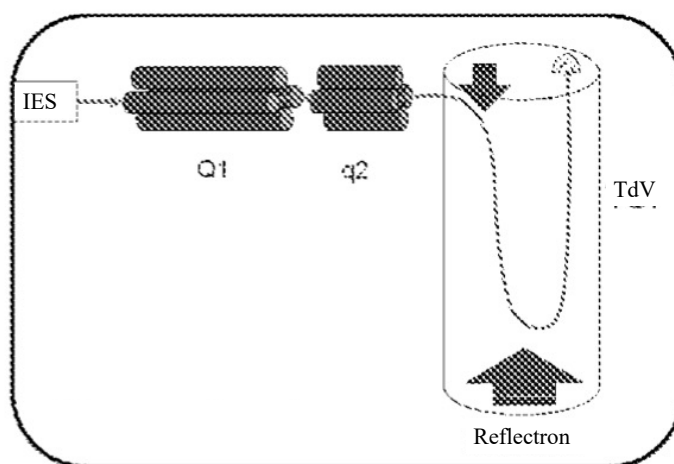


Figura 42 – Representação de espectrômetro híbrido Q-TdV. A fonte de ionização é por eletrospray (IES) e os três analisadores são: dois quadrupolos (Q₁ e q₂) e um tempo de vôo, este último posicionado ortogonalmente aos quadrupolos. Figura adaptada de EL-ANEED, COHEN & BANOUB (2009).

Os instrumentos QTdV normalmente incluem um quadrupolo antes do Q₁, com a função de focalizar íons e proporcionar o resfriamento dos íons na colisão e assim melhorar a qualidade

do feixe de íons. Esse quadrupolo é normalmente chamado de Q_0 . E opera apenas no modo rf, assim como o Q_2 , que é a célula de colisão onde ocorre a fragmentação de baixa energia DIC. O Q_1 por outro lado é a parte do instrumento que filtra os íons usada durante as análises EM/EM (CHERNUSHEVICH; LOBODA; THOMSON, 2001; EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Todos os quadrupolos operam apenas no modo rf durante as análises do tipo EM (estágio simples). Devido aos papéis cruciais do Q_1 e Q_2 durante as análises EM/EM, esses instrumentos também são chamados QqTdV, onde o primeiro Q é referente ao quadrupolo separador de massa e o segundo q se refere ao quadrupolo com a função de célula de colisão (quadrupolos ou hexapolos que funcionam somente no modo rf). Em alguns modelos comerciais os quadrupolos Q_0 e Q_2 são substituídos por hexapolos funcionando com os mesmos princípios e apenas no modo rf, já que os campos de radio-frequência criam um potencial que permite o confinamento radial e axial dos íons precursores e íons fragmentos através do amortecimento colisional de seus movimentos (moléculas neutras de gases reduzem o espalhamento de energia e o diâmetro do feixe de íons o que resulta numa melhor transmissão para os demais quadrupolos). Geralmente, o Q_1 é usado para a varredura de íons enquanto o TdV detecta a corrente de íons apenas no momento de ajustes e calibração do Q_1 (CHERNUSHEVICH; LOBODA; THOMSON, 2001; EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

No modo EM/EM, Q_1 opera como filtro de massa para transmitir apenas o íon parente de interesse. Os íons são acelerados para uma energia de 20 a 200 eV antes de entrarem na célula de colisão Q_2 , onde são submetidos à dissociação induzida por colisão (DIC) após algumas colisões com moléculas de gás neutras (argônio ou nitrogênio). Os íons fragmentos resultantes assim como os íons parentes remanescentes são resfriados colisionalmente e direcionados. Essa etapa é a mais importante no QqTdV do que nos triplos quadrupolos porque o TdV é mais sensível à qualidade do feixe de íons que chega do que o Q_3 no triplo quadrupolo (CHERNUSHEVICH; LOBODA; THOMSON, 2001).

Uma das maiores vantagens do Q-TdV é a possibilidade de acoplamento com ambas as fontes de íons IES ou IDLAM com pouca manipulação na configuração. Devido à limitação inerente ao quadrupolo em termos de faixa de massa, há dificuldade na injeção ortogonal de íons grandes com carga única no TdV. Outras vantagens são a facilidade de operação, alta resolução, alta acurácia nas massas e sensibilidade até 100 vezes maior quando comparado ao triplo quadrupolo. Entretanto, instrumentos QqQ ainda são muito utilizados tanto em análises quantitativas como para a varredura de íons precursores, onde os íons parentes de um fragmento específico podem ser identificados. Nessas análises com o QqQ o último quadrupolo é fixo e o primeiro é o de varredura. Essa funcionalidade não pode ser obtida tão eficientemente nos instrumentos QqTdV quanto nos QqQ (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Plantio de Batatas-doces sob Sistema Orgânico

As ramas de batata-doce das variedades mostradas na Figura 1, foram doadas de agricultor convencional de batata-doce da área rural de Cachoeiras de Macacu-RJ (Coordenadas geográficas: 22°37'56.88"S, 42°48'31.24"O). Exceto a IAPAR 69 (cultivar obtida do Instituto Agrônômico do Paraná). Foram multiplicadas na Gleba 21-A do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), conhecido como Fazendinha Agroecológica do Km 47, em Seropédica-RJ (Coordenadas geográficas: 22°45'13.18"S, 43°40'25.25"O), sob condições orgânicas de cultivo. A área do plantio apresentou as seguintes condições nas análises químicas do solo: 0,86 % de carbono orgânico, 0,0 Cmolc dm⁻³ de alumínio, 3,08 Cmolc dm⁻³ de cálcio, 4,17 Cmolc dm⁻³ de H+Al, 239,10 mg L⁻¹ de K, 1,27 Cmolc dm⁻³ de magnésio, 0,11 % de nitrogênio, 90,87 mg L⁻¹ de fósforo e pH = 6,5.

Posteriormente à multiplicação para a obtenção da quantidade necessária para a montagem do experimento no campo, as ramas foram colhidas e plantadas de acordo com o delineamento experimental da Figura 43, onde uma área de 25 m x 21 m foi dividida em 4 blocos separados por intervalos de 1 m. Nos blocos, foram distribuídos ao acaso, quatro repetições de plantio de cada uma das quatro variedades. Os blocos continham quatro áreas retangulares de 5,0 m x 4,0 m. Cada área retangular com 3 leiras de 5 m de comprimento e 0,8 m de largura, distanciadas a cada 0,8 m. Nas leiras de cada área retangular foram plantadas ramas de 0,3 m, espaçadas por 0,3 m. As fotos da Figura 44 mostram a área do plantio, a área da colheita e as batatas colhidas.

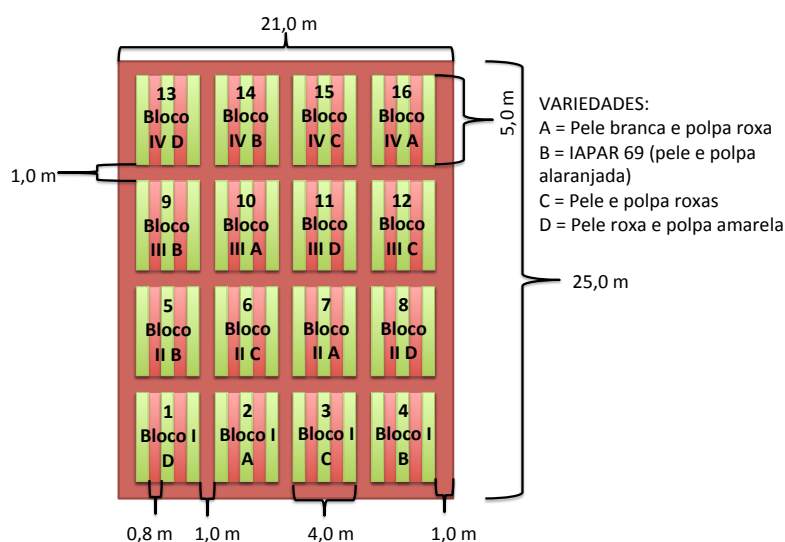


Figura 43 – Delineamento experimental do plantio das variedades de batatas-doces: A = pele branca e polpa roxa, B = pele e polpa alaranjadas (IAPAR 69), C = pele e polpa roxas, D = pele roxa e polpa amarela.



Figura 44 – Fotografias do experimento para cultivo de batatas-doces orgânicas na Fazendinha Agroecológica do Km 47 (Seropédica-RJ), plantado em 08/11/2017 na Gleba 21 e colhido em 03/04/2018. Da esquerda para a direita, Gleba 21, dia anterior a colheita, e as seguintes no dia da colheita.

A adubação foi feita no mesmo dia do plantio com 200 g m⁻¹ de Bokashi (Matéria orgânica e micro-organismos), 22 g m⁻¹ de termofosfato e 4 kg m⁻¹ de sulfato de potássio. Também foi utilizado um sistema de irrigação por gotejamento.

3.2 Colheita das Variedades de Batata-doce

A colheita do experimento foi feita após 5 meses de cultivo, apenas nos três metros da leira central de cada bloco (repetição), deixando um metro de cada uma das extremidades e as leiras vizinhas sem colher, conforme mostrado na fotografia da Figura 44 (a segunda, da esquerda para a direita).

As batatas colhidas foram lavadas e secas ao ar em temperatura ambiente, apenas para eliminar o excesso de água da lavagem (Figura 45), contadas, separadas, pesadas e classificadas segundo classificação comercial: Extra A (251-500 g), Extra (151-250 g), Diversos (80-150 g) e Tubérculos (10-79 g) (CEAGESP, 2003).



Figura 45 – Batatas-doces após lavadas, secando ao ar em temperatura ambiente para eliminar excesso da água da lavagem, ordenadas por tamanho para serem contadas e classificadas através da pesagem.

3.3 Preparo das amostras de batatas-doces *in natura* para análises químicas

Após a etapa anterior, de cada leira colhida (amostragem da repetição de campo), foram escolhidas 3 batatas-doces entre aquelas de tamanho Extra e Diversos. Essas batatas foram descascadas e divididas em quatro partes iguais através de cortes longitudinais. De cada uma das três batatas foi separado apenas 1/4, que juntos formaram a amostra de batatas-doces *in natura* para as análises químicas. As amostras foram trituradas em multiprocessador, pesadas em balança analítica e guardadas congeladas em sacos plásticos hermeticamente fechados (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

3.4 Preparo das amostras de batatas-doces cozidas para análises químicas

De cada uma das três batatas foi separado outro 1/4, que juntos foram cortados em pedaços de aproximadamente 1x1 cm e formaram a amostra para cozimento sob vapor por 10 min. Após resfriar (em temperatura ambiente), foram triturados em multiprocessador, pesadas em balança analítica e guardadas congeladas em sacos plásticos hermeticamente fechados. A amostragem e o preparo das amostras foram feitos conforme RODRIGUEZ-AMAYA (2001).

3.5 Preparo das amostras para análise de batatas-doces fritas

De cada uma das três batatas foi separado outro 1/4, que juntos foram cortados em pedaços de aproximadamente 1x1 cm e formaram a amostra para fritura em óleo de soja por imersão em fritadeira elétrica a 190 °C por 5 min. Após resfriar (em temperatura ambiente), foram triturados em multiprocessador, pesadas em balança analítica e guardadas congeladas em sacos plásticos hermeticamente fechados até a realização das análises. O 1/4 restante das três batatas foi acondicionado em sacos plásticos hermeticamente fechados e congelados para uma eventual necessidade. O procedimento de preparo das amostras *in natura*, cozidas e fritas está ilustrado na Figura 46 abaixo.

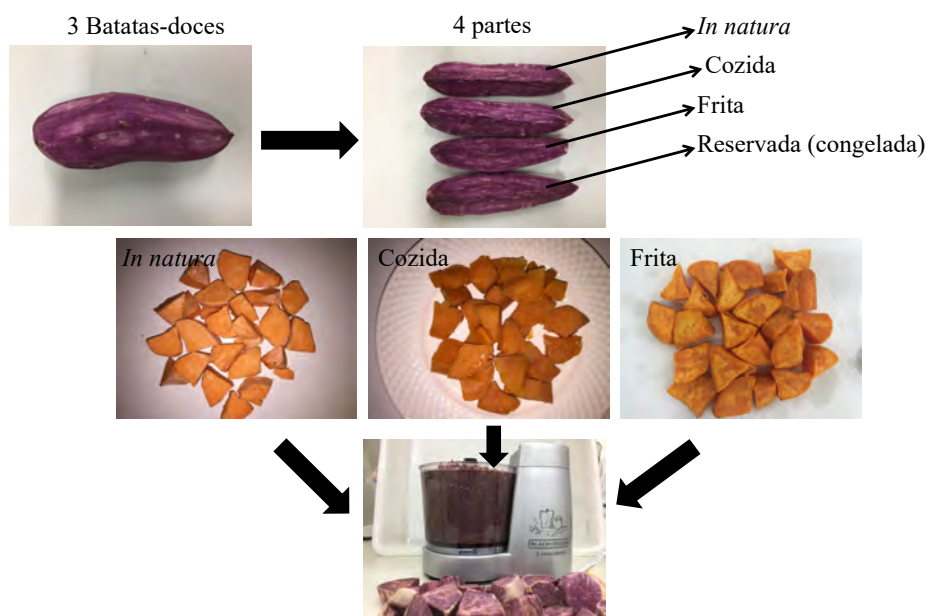


Figura 46 – Exemplificação da amostragem e preparo das amostras *in natura*, cozidas, fritas e reserva (congelada).

3.6 Determinação do Peso Seco

Para que as quantificações de carotenoides e antocianinas dos materiais *in natura*, cozidos e fritos preparados conforme descrito acima pudessem ser comparados, foi necessário determinar o peso seco deles. Para isso, cerca de 2 g de cada uma das amostras foram pesados em placa de petri, identificadas com caneta de retro com o nome das amostras. Previamente à adição das amostras nas placas de petri, as mesmas foram pesadas. As placas contendo as amostras foram colocadas para secar em estufa com ventilação a 65 °C por 4 horas.

Após esse período, foram colocadas em dessecador vedado sob vácuo contendo esferas de sílica desidratada até atingirem a temperatura ambiente. Após o equilíbrio de temperatura, as placas foram retiradas do dessecador e pesadas. Este ciclo de secagem em estufa, resfriamento em dessecador e pesagem foi repetido por três vezes, até que o peso do conjunto amostra + placa de petri não variasse mais (pelo menos na primeira casa decimal), evidenciando que as amostras já estavam desidratadas.

Todo o procedimento de secagem foi realizado quantitativamente, em ambiente seco, com auxílio de luvas e pinças, sem contato direto com todo material para evitar erros gravimétricos. As pesagens foram realizadas em balança analítica Shimadzu AY220 com sensibilidade ao 0,1 mg, e os pesos com as quatro casas decimais foram registrados. Esse procedimento de determinação do peso seco foi realizado para todas as amostras em duplicata.

Ao final do terceiro ciclo, foi realizado o seguinte cálculo para a obtenção do Peso seco (%):

$$\text{Peso seco (\%)} = \frac{(P_s - P_p) \times 100}{P_a} \quad \text{Equação 13}$$

Onde:

P_s = Peso da amostra seca + placa de petri;

P_p = Peso da placa de petri;

P_a = Peso do material úmido.

3.7 Análise de Carotenoides

As análises de carotenoides nas amostras da cultivar IAPAR 69 foram realizadas através de adaptação do método descrito por PACHECO et al. (2014), com a quantificação de carotenoides totais por espectrofotometria a 450 nm e o perfil por CLAE-DAD, após micro-extração, já que os teores de carotenoides nessa cultivar são elevados o suficiente para permitir o uso dessa metodologia, mais rápida, econômica, limpa e eficiente.

A metodologia, descrita no fluxograma da Figura 47, consistiu em extrair a partir de 50 mg do material vegetal triturado (descongelado), através de maceração com 1 mL de acetona e aproximados 200 mg de sílica (Celite®545, 0,02-0,1 mm de tamanho de partícula) em microtubo (tipo eppendorf) com capacidade para 2 mL, com auxílio de bastão de vidro para romper as células vegetais e facilitar a extração. Após a maceração, o material seguiu para micro-centrifuga por 1 min (rotação de 6.000 rpm) para a decantação do material sólido, e separação do sobrenadante (acetona), que foi recolhido em bureta (capacidade de 25 mL) contendo 10 mL de água ultrapura e 5 mL de éter de petróleo (todos os reagentes de grau CLAE-UV). A maceração com acetona, a centrifugação e a transferência do sobrenadante para a bureta foram repetidas até a extração completa dos carotenoides, que pode ser observada pela total descoloração do resíduo sólido decantado. Todas as transferências foram quantitativas.

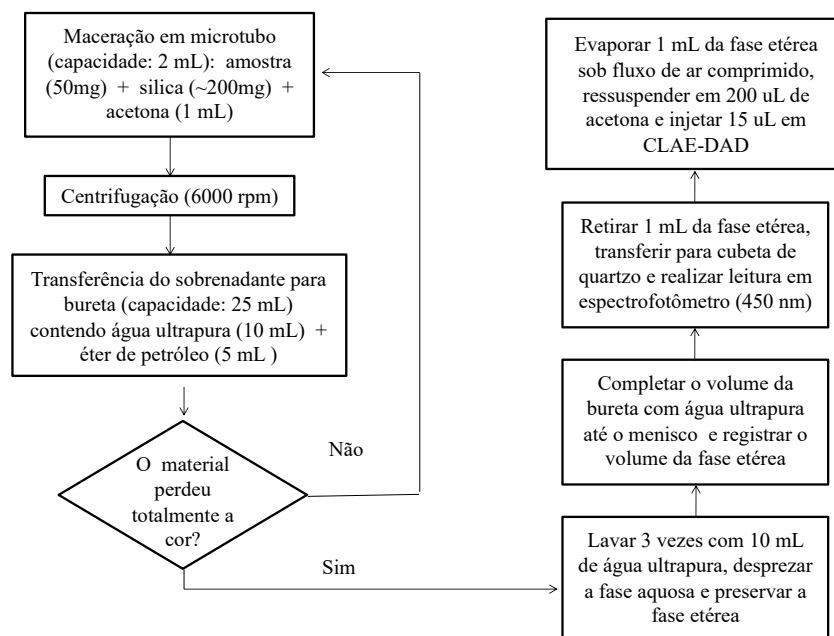


Figura 47 – Fluxograma da microextração de carotenoides.

Após a etapa de extração, o sobrenadante recolhido na bureta foi lavado três vezes com aproximadamente 10 mL de água, que foi descartada através da torneira da bureta sem desprezar a fase orgânica imiscível (éter de petróleo). Nesse processo, os carotenoides extraídos com a acetona foram transferidos para a fase de éter de petróleo e a acetona foi lavada e desprezada, já que é solúvel em água e o éter de petróleo insolúvel. Completou-se o volume da bureta com água ultrapura até a marcação do volume zero e realizou-se a leitura do volume de éter de petróleo (fase que contém os carotenoides extraídos). Essa fase orgânica foi então recolhida para uma cubeta e a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. O perfil foi determinado por CLAE-DAD (Waters 2695 com o detector de arranjo de fotodiodos 2996 PDA (Waters, USA)), a partir da secagem sob fluxo de ar comprimido de 1 mL desse extrato em éter de petróleo, cujo resíduo foi solubilizado em 200 uL de acetona.

Para a variedade de pele roxa e polpa amarelada, cujos teores de carotenoides são bem mais baixos, não é recomendada a micro-extração descrita acima. Para essa matriz então, utiliza-se uma adaptação do método de extração descrito por RODRIGUEZ-AMAYA (2001), cujo fluxograma está na Figura 48, que consistiu em macerar 10 g do material vegetal triturado (descongelado) em grau contendo 2 g de sílica em pó fino e 5 mL de acetona com auxílio de pestilo. Adicionou-se 20 mL de acetona ao material macerado e transferiu-se quantitativamente para funil com placa de vidro sinterizado seguido de filtração à vácuo. O procedimento de maceração foi repetido com nova adição de acetona e filtração até a total extração dos carotenoides (que coincidiu com a descoloração do material sólido).

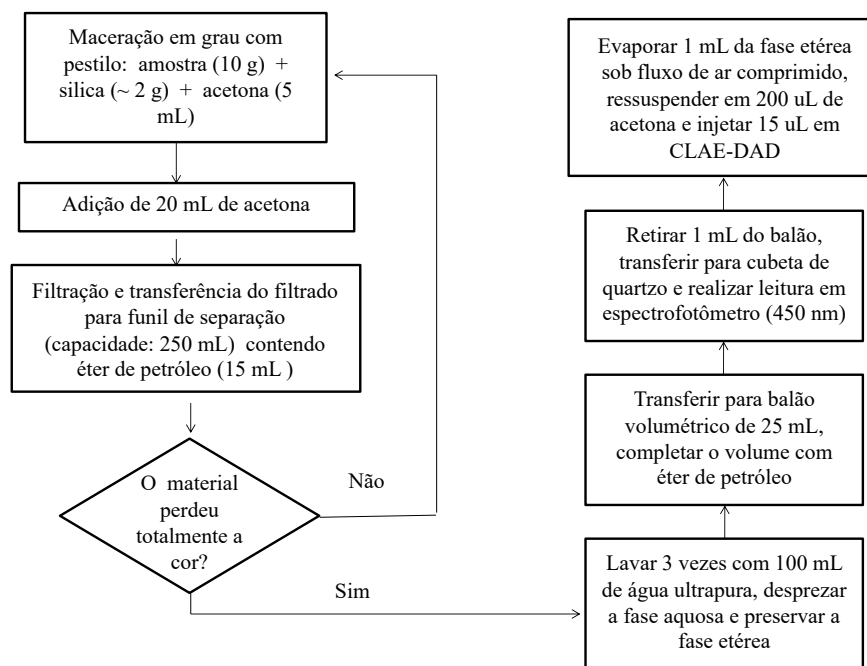


Figura 48 – Fluxograma da extração de carotenoides.

O extrato em acetona filtrado foi adicionado a funil de separação com capacidade para 250 mL, contendo 15 mL de éter de petróleo. A fase orgânica do funil foi lavada três vezes com 100 mL de água ultrapura, que foi desprezada e a fase orgânica recolhida quantitativamente em balão volumétrico de 25 mL após filtração em papel de filtro com aproximados 1 g de sulfato de sódio (para absorver a umidade). O volume do balão foi completado com éter de petróleo, também filtrado na sequência no mesmo apparatus para que qualquer resíduo do extrato retido no papel de filtro e no sulfato de sódio fosse transferido quantitativamente. Uma alíquota desse extrato seguiu para leitura em espectrofotômetro a 450 nm e outra alíquota de 5 mL foi seca sob fluxo de ar comprimido e o resíduo solubilizado em 200 uL de acetona e seguiu para análise do perfil de carotenoides por CLAE-DAD.

Ambos os procedimentos descritos foram realizados em duplicata, em ambiente com pouca luminosidade, temperatura ambiente abaixo de 25 °C e de forma rápida para evitar oxidação dos carotenoides e erros altos nas análises, cujos coeficientes de variação, de acordo com as normas da qualidade do laboratório, permitiam variações de até 5 % entre as duplicatas.

As análises em CLAE-DAD para determinação do perfil dos carotenoides foram realizadas conforme PACHECO et al. (2014). O extrato em acetona teve o volume de 15 uL injetado em sistema CLAE-DAD com coluna C₃₀ (S-3 Carotenoid, 4.6 mm x 250 mm, YCM), com temperatura do forno de 33 °C, fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e utilizando como fase móvel o gradiente de eluição iniciando no tempo zero com 80% de metanol e 20% de éter metil-*t*-butílico, subindo para 25% de éter metil-*t*-butílico até 0,5 min, em seguida subindo para 85% de éter metil-*t*-butílico até 15 min, subindo para 90% de éter metil-*t*-butílico até 15,05 min, mantendo até 16,50 min com 90% de éter metil-*t*-butílico, voltando para a condição inicial (80 % de metanol e 20% de éter metil-*t*-butílico) até 16,55 min, que foi mantida constante até 28 min. Os carotenoides foram identificados através do tempo de retenção e do espectro de absorção no UV/Vis em comparação com o perfil dos respectivos padrões.

Para o cálculo da quantidade de carotenoides totais, baseado em equivalentes de β-caroteno, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Carotenoides totais em equivalentes de } \beta\text{-caroteno (mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}) = \frac{A \times V \times 10^6}{a_{1\%}^{1\text{cm}} \times M}$$

Equação 14

Onde,

A = Leitura de absorvância obtida no espectrofotômetro a 450 nm;

V = Volume total do extrato etéreo (mL);

M = Massa de amostra (g)

$a_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Coeficiente de absorção do β -caroteno = 2592 ($100^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Já o cálculo de cada carotenoide após separação por CLAE-DAD foi realizado com base nas porcentagens de área do pico de cada um em relação ao valor calculado para Carotenoides totais na etapa anterior (em equivalentes de β -caroteno).

No caso de amostras onde os carotenoides se encontram ligados (esterificados) a outras substâncias, ou quando há suspeita, geralmente nos casos em que após a análise por CLAE-DAD não é possível identificar os picos dos carotenoides ou seus tempos de retenção estão deslocados para regiões onde apareceriam se fossem carotenoides específicos ligados a outras moléculas, há necessidade de proceder uma etapa de saponificação do extrato etéreo obtido, antes da leitura do volume final e das quantificações por espectrofotometria e por CLAE-DAD.

Para isso, a fase etérea é transferida para frasco âmbar com rolha esmerilhada ou tampa, onde é adicionado o mesmo volume aproximado de solução de hidróxido de potássio 10% p/v em metanol. A mistura é mantida em repouso durante aproximadamente 16 horas, tempo em que ocorre a saponificação com a liberação dos carotenóides ligados. Após essa etapa de saponificação, o extrato é lavado com água ultrapura (normalmente, 4 lavagens são suficientes) em bureta. Só então registra-se o volume final da fase etérea e as leituras espectrofotométricas bem como secagem da amostra para concentração e solubilização em acetona para análise por CLAE-DAD (PACHECO, 2009).

No caso da batata-doce de pele roxa e polpa amarela, os picos não foram identificados quando comparados aos carotenoides mais comumente encontrados em vegetais. Então, foi necessário proceder com a etapa de saponificação, apenas com algumas repetições de amostras de campo escolhidas ao acaso, para verificar se a dificuldade na identificação dos carotenoides poderia ter ocorrido porque os mesmos encontravam-se ligados a outras moléculas. Como nas amostras saponificadas não houve diferença no perfil cromatográfico dos extratos saponificados e não-saponificados, constatou-se que eram carotenoides livres e não identificados. Sendo assim, as repetições de campo das amostras desta variedade foram extraídas e analisadas sem a etapa de saponificação para posterior análise de quantificação e perfil de carotenoides.

3.8 Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos

O procedimento para a extração e identificação dos flavonóides e ácidos fenólicos livres e hidrolisados foi feito em duplicata seguindo o procedimento de NASCIMENTO et al. (2017).

Para a extração dos flavonoides e ácidos fenólicos livres as amostras das batatas-doces *in natura* foram pesadas (1g) em tubo de centrífuga, tipo “falcon”, com tampa rosca de 50 mL. Adicionou-se 4 mL de metanol:água (50:50; v/v; pH 2). A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto. Os tubos foram colocados em agitador com aproximadamente 120 rpm, à temperatura ambiente, por 1 h. Após foram centrifugados a 6000 rpm por 5 minutos.

O primeiro sobrenadante foi recolhido e o procedimento foi repetido adicionando-se desta vez ao resíduo sólido 4 mL de solução de acetona:água (70:30; v/v) no lugar da solução de metanol: água (50:50; v/v; pH 2).

O segundo sobrenadante foi recolhido e reservado. Volumes iguais de ambos os sobrenadantes foram homogeneizados e transferidos para microtubos tipo “eppendorf” e centrifugados por 5 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para vial de 1,5 mL para posterior injeção em CLAE-DAD.

Já para o caso da identificação daqueles flavonóides e ácidos fenólicos ligados a outras substâncias no resíduo da matriz foi necessário a realização de hidrólises ácida e básica para romper estas ligações e liberar os compostos para que pudessem ser extraídos e analisados. Ao resíduo sólido obtido foi adicionado 5 mL de solução NaOH 2 mol L⁻¹ contendo 1% de ácido ascórbico e 10 mmol L⁻¹ de EDTA. Os tubos foram mantidos por 60 minutos a 60 °C durante a hidrólise básica.

Sem resfriar a solução foi adicionado 1,5 mL de HCl 6M e os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos e em seguida resfriados até a temperatura ambiente. Após frios foram centrifugados por 10 minutos a 2700 rpm.

Todo o sobrenadante foi recolhido e homogeneizado a 6,5 mL de acetato de etila com auxílio de vortex por 30 segundos e em seguida por 5 minutos no ultrassom. Após, foi feita centrifugação a 6000 rpm por 5 min. Foram adicionadas 5 gotas de solução saturada de NaCl (solução aquosa de NaCl~30%) para quebrar a emulsão formada. O sobrenadante foi reservado e o procedimento foi repetido com nova alíquota de 6,5 mL de acetato de etila.

As fases orgânicas provenientes das duas extrações foram homogeneizadas e evaporadas até a secura sob fluxo de ar comprimido.

O resíduo foi solubilizado em 2 mL da mistura metanol:água (80:20, v/v) e foi levado ao ultrassom por 5 minutos. Em seguida centrifugado por 2 min a 6.000 rpm, e filtrado através de membrana filtrante de 0,45 µm, para posterior injeção em CLAE-DAD.

Para a análise por CLAE-DAD foram utilizadas as seguintes condições: Waters 2695 com o detector de arranjo de fotodiodos 2996 PDA (Waters, USA), colunas C₁₈ 2,4 µm (4,6 x 50mm) e C₁₈ 2,4 µm (4,6 x 100mm) em série, detector de arranjo de fotodiodos: varredura 210 a 600 nm, temperatura da coluna: 40 °C, volume de injeção: 5 µL, fluxo: 1,2 mL/min, tempo de corrida de 30 min. A fase móvel foi um gradiente de A: ácido fosfórico 1,5 mL L⁻¹ em água e B: acetonitrila, conforme a Tabela 4 abaixo:

Tabela 4 – Gradiente de acetonitrila e ácido fosfórico 1,5 mL L⁻¹ em água ultrapura utilizados como fase móvel nas análises dos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos livres e após hidrólise das amostras de batata-doce *in natura*.

Acetonitrila	Tempo de corrida (minutos)
5,0%	0 - 6
12,0%	6 - 8
12,0%	8 - 12
12,0 – 20,0%	12 - 18
20,0 – 30,0%	18 - 22
30,0 – 60,0%	22 – 23
60,0%	23 – 25
60,0 – 5,0%	25 – 26
5,0%	26 -30

A identificação dos flavonoides e dos ácidos fenólicos presentes nos extratos foi realizada por comparação de tempo de retenção (tR) e espectros de UV/Vis dos padrões injetados nas mesmas condições e preparados na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ em metanol:água (80:20, v/v).

Os cromatogramas foram observados nos comprimentos de onda entre 200-600 nm para detecção dos picos dos diferentes flavonoides e ácidos fenólicos. Os flavonoides e os ácidos fenólicos cujas soluções-padrões foram preparadas, injetadas e tiveram seus tR's e espectros UV/Vis utilizados na comparação com aqueles flavonoides e ácidos fenólicos encontrados nas amostras foram: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzóico, metil-galato, ácido 2,5-dihidroxibenzóico, ácido 4-hidroxifenilacético, catequina, ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido 3-hidroxibenzóico, ácido clorogênico e ácido cafeico, ácido siríngico, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido 3-fenilático, ácido ferúlico, ácido m-cumárico, ácido sinápico, ácido 3-metoxicinâmico, ácido elágico, rutina, quercetina 3-glicosídeo e ácido 2,4-dimetoxibenzóico, ácido o-cumárico, ácido p-metoxibenzóico, narirutina, quercetrina, miricetina, naringina, neohesperidina, ácido rosmarínico, hesperidina, morina, quercetina e ácido trans-cinâmico, luteolina, ácido p-metoxicinâmico, ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico, naringenina, apigenina, kaempferol, hesperitina, isorhamnetina, rhamnetina, crisina e galangina.

Todos os espectros dos picos rastreados nestes comprimentos de onda foram obtidos de 200 a 600 nm.

3.9 Obtenção de antocianinas purificadas para identificação

As antocianinas presentes nas variedades de polpa roxa foram diferentes daquelas relatadas na literatura para variedades de polpa roxa. Por isso, foi necessário separar e purificar quantidades suficientes de cada uma delas para identificá-las através do estudo dos espectros de QTDV-EM/EM e dos espectros de UV/Vis. E também para usar como padrão analítico nas análises futuras.

Os procedimentos de extração apresentados na literatura para as variedades de polpa roxa estudadas não foram eficientes para a extração das antocianinas na quantidade necessária para purificar e realizar análises de espectrometria de massas para a identificação. Desta forma, foi necessário desenvolver uma nova metodologia para extração e análise por CLAE-DAD. Os solventes orgânicos utilizados nos trabalhos consultados (PUERTOLAS et al, 2013; YOSHINAGA, YAMAKAWA, NAKATANI, 1999; 2000; ODAKE et al, 1992; GODA et al, 1997; TERAHARA et al, 1997; 2000; TRUONG et al, 2010; 2011; MONTILLA et al, 2010; YING et al, 2011; LEE et al, 2013; XU et al, 2015; HE et al, 2016; HU et al, 2016; WANG et al, 2017; ZHU et al, 2017) não foram eficazes na extração das antocianinas da batata-doce de pele e polpa roxas. As antocianinas ficaram aderidas ao amido e não migraram para as soluções extratoras, que permaneciam incolores mesmo após maceração, agitação, aquecimento, uso de ultrassom e tempo de extração nas tentativas realizadas. A solução encontrada, que fez com que as antocianinas fossem liberadas do amido e migrassem para a solução extratora, foi utilizar como solvente de extração água ultrapura com 0,25% de ácido fórmico e realizar extrações sucessivas até que o resíduo de amido fosse liberando a cor roxa para a solução.

A polpa de três batatas de cada uma das duas variedades de polpa roxa *in natura* foi moída, congelada e liofilizada em Liofilizador L101 LIOTOP. O material liofilizado foi macerado em grau com pestilo até obtenção de pó fino. 30,0 g desse pó foi extraído durante 30 min sob agitação a 40 °C, com 300 ml de água ultrapura contendo 0,25% de ácido fórmico, seguido por centrifugação e filtração do sobrenadante. O procedimento foi repetido três vezes até não se observar coloração rosa mais intensa no solvente (Figura 49). O volume total (900

mL) do extrato obtido foi concentrado por EFS utilizando o cartucho de coluna de vidro manualmente montado contendo uma fina camada de 2 mm de espessura de lã de vidro na saída e adicionando outra camada idêntica de lã de vidro no topo da coluna logo acima da fase estacionária C₁₈ conforme a Figura 50. O cartucho foi pré-condicionado com 100 mL de metanol, equilibrado com 100 mL de água ultrapura, carregado com o extrato (900 mL) e lavado com 100 mL de água ultrapura com auxílio de vácuo, com a coluna encaixada em kitassato através de rolha de borracha, conforme mostrado na Figura 50. As antocianinas retidas foram eluídas com 30 mL de acetonitrila com ácido fórmico a 5%, coletadas e reservadas para separação por CLAE-DAD.

O mesmo procedimento foi realizado separadamente para as duas variedades de polpa roxa. Como o perfil cromatográfico de antocianinas delas foi diferente, quando comparados por CLAE-DAD, foi necessário a separação, o isolamento e purificação das antocianinas de ambas as variedades para posterior identificação por QTDV-EM/EM.

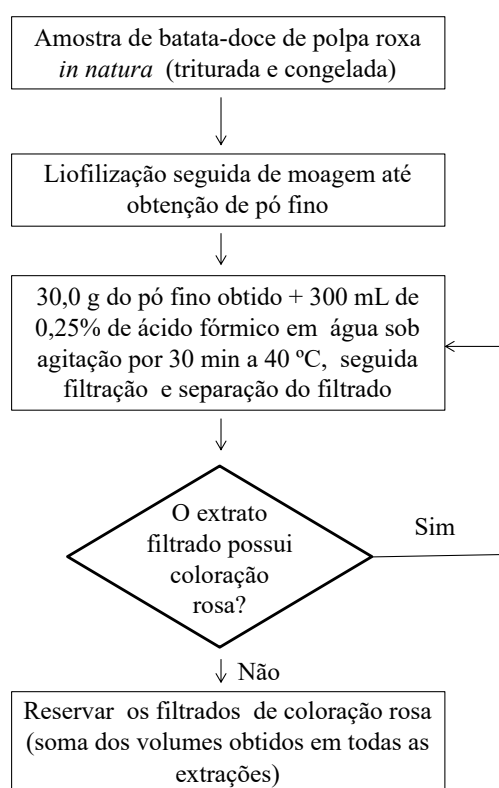


Figura 49 – Fluxograma da extração de antocianinas da batata-doce de polpa roxas.

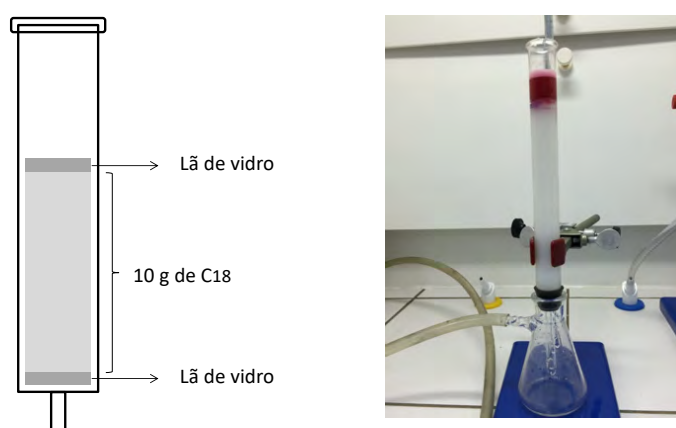


Figura 50 – Modelo do cartucho para Extração em Fase Sólida (EFS) preparado manualmente com coluna de vidro (à esquerda o modelo e à direita um exemplo real).

A solução obtida na etapa anterior foi injetada em sistema CLAE-DAD, coluna BDS Hypersil C18 (100 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,4 μm , Thermo Scientific). A temperatura do forno da coluna foi de 35 $^{\circ}\text{C}$, o volume de injeção foi de 30 μL com fluxo de fase móvel de 1,0 mL min^{-1} . O gradiente de eluição iniciou com 90% de água ultrapura com 5% de ácido fórmico (A) e 10% de acetonitrila (B) passando para 86% A em 12 min, indo para 80% A em 3 min, permanecendo por 3 min, então indo para 90% A em 2 min e permanecendo por 2 min com na Tabela 5. Quatorze picos com absorção máxima em torno de 525 nm e 330 nm foram coletados manualmente na saída do detector para a variedade de pele e polpa roxas enquanto cinco picos foram coletados para a variedade de pele branca e polpa roxa. As condições da análise por CLAE-DAD foram adaptadas da literatura (LEE et al, 2012). O equipamento utilizado foi o módulo de separação Waters 2695 com o detector de arranjo de fotodiodos 2996 PDA (Waters, USA), os cromatogramas foram adquiridos de 200 to 600 nm.

Tabela 5 – Gradiente de acetonitrila e 5 % de ácido fórmico em água ultrapura utilizados como fase móvel nas análises dos extratos de antocianinas das amostras de batata-doce de polpas roxas.

Acetonitrila - B (%)	5% ácido fórmico - A (%)	Tempo de corrida (min.)
10	90	0
14	86	12
20	80	15
20	80	18
10	90	20
10	90	22

As injeções foram repetidas vinte vezes até se obter quantidade suficiente para as análises de caracterização por EM/EM. As antocianinas separadas nos picos coletados foram concentradas por EFS em cartuchos de fase reversa SEP-PAK TM C₁₈ com 0,5 g de fase reversa condicionados com 1 mL de acetonitrila, equilibrados com 1 mL de água ultrapura, carregados com a amostra coletada diluída duas vezes com água ultrapura, lavados com 1 mL de água ultrapura e depois eluído com 3 mL de acetonitrila com 5% de ácido fórmico (como nas Figuras

51 e 52, em escala reduzida, já que as quantidades de massa de amostra e de C₁₈ utilizadas no cartucho eram menores). As amostras foram secas sob fluxo de ar comprimido, solubilizadas em 500 µL de acetonitrila e analisadas por Ionização por Eletrospray, com Analisadores de Espectrometria de Massa por Quadrupolo e Tempo de Vôo (IES-QTdV-EM/EM) (Synapt G1 da marca Waters, USA), com IES no modo positivo e QTdV nas seguintes condições: energias do capilar, cone de amostragem e cone de extração de 3.0 kV, 50.0 V e 3.0 V, respectivamente; temperatura da fonte de 80 °C, temperatura do gás de dessolvatação e fluxo do gás de dessolvatação de 250 °C e 500 L h⁻¹ e fluxo de gás de 25 L h⁻¹ (nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e de secagem). Dependendo da molécula em análise, a energia de colisão usada no trap e no transfer variaram de 25 to 35 V.

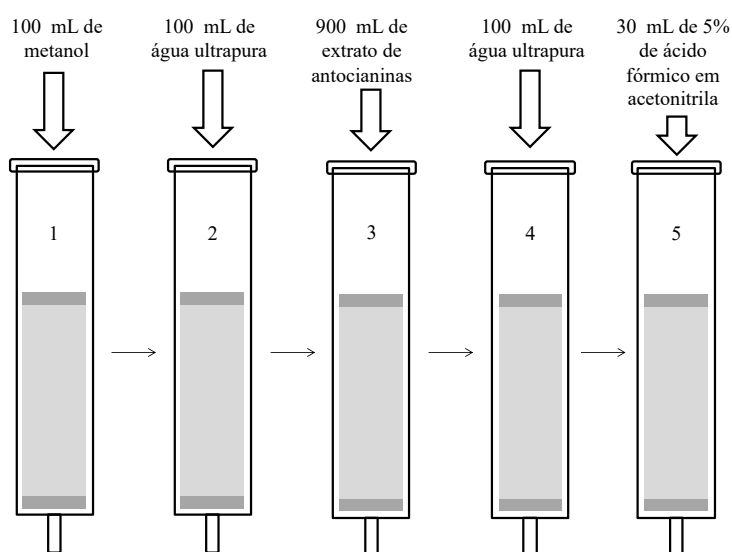


Figura 51 – Utilização do cartucho EFS preparado manualmente para concentração e purificação das antocianinas mostrando as 5 etapas: 1- condicionamento, 2-equilíbrio, 3-carregamento, 4-lavagem e 5-eluição.

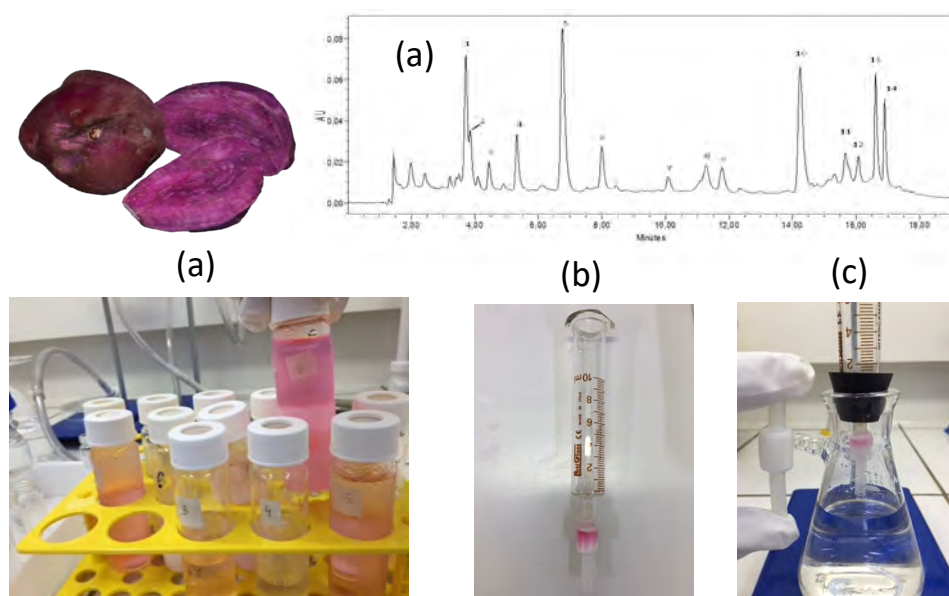


Figura 52 – (a) Quatorze picos separados por CLAE-DAD e coletados manualmente, no comprimento de onda de 525 nm; (b) Cartucho EFS carregado com antocianinas; (c) Cartucho EFS virgem e procedimento de extração.

Os espectros de absorção no UV/Vis e de fragmentação no IES-QTdV-EM/EM juntamente com a ordem de eluição e tempos de retenção na CLAE-DAD foram comparados com aqueles disponíveis na literatura para variedades de batata-doce de polpa roxa, para a identificação das antocianinas.

3.10 Quantificação de Antocianinas Totais por Espectrofotometria UV/Vis e Análise de Perfil e Quantificação por CLAE-DAD

Para as variedades de polpas roxas, o material congelado (*in natura*, cozida e frita) foi liofilizado em Liofilizador L101 LIOTOP e em seguida macerado em grau com auxílio de pestilo até obtenção de pó fino. A partir desse material, as análises foram realizadas em duplicata, da forma como foi explicado anteriormente, reduzindo apenas a escala de análise (de preparativa para analítica), já que o objetivo agora é analítico e não obtenção de quantidades purificadas das antocianinas para elucidação estrutural. Então, a extração foi feita a partir de 1,0 g do material liofilizado em pó, durante 30 min sob agitação a 40 °C em banho-maria com agitação, com 5 mL de água ultrapura contendo 2,5% de ácido fórmico em tubos tipo falcon de 50 mL, seguido por centrifugação (6500 rpm por 5 min) e recolhimento quantitativo do extrato em balão volumétrico de 25 mL. O procedimento foi repetido cinco vezes, quando não se observou coloração rosa no solvente. O balão teve seu volume completado com 2,5% de ácido fórmico.

Uma alíquota desse extrato foi transferida (1,5 mL) para microtubo de 1,5 mL (tipo eppendorf), centrifugado (10.000 rpm por 10 min) e levado para leituras em espectrofotômetro para a determinação da concentração de antocianinas totais por equivalente de cianidina-3-glicosídeo por leitura direta em espectrofotômetro UV/Vis em 530 nm em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. As leituras foram diretas para as variedades *in natura*. Já as cozidas e as fritas foram previamente diluídas 6 vezes antes das leituras com solução 2,5% ácido fórmico (100 µL do extrato + 500 µL de solução 2,5% ácido fórmico).

Outra alíquota de 10,00 mL do extrato foi liofilizada e o resíduo suspenso em 1,00 mL de 2,5% de ácido fórmico em microtubos de 1,5 mL (tipo eppendorf) e centrifugado (10.000 rpm por 10 min) para as análises de perfil e quantificação por CLAE-DAD, nas quais foram injetados 40 µL do sobrenadante no caso dos extratos das batatas-doces *in natura* e 20 µL no caso das batatas-doces cozidas e fritas. A metodologia utilizada para a análise CLAE-DAD foi a mesma descrita no item anterior: 3.9 Obtenção de antocianinas purificadas para identificação.

O cálculo da concentração de antocianinas totais por espectrofotometria UV/Vis foi feito por equivalentes de cianidina-3-glicosídeo através da determinação da absorvidade molar (ϵ) da antocianina cianidina-3-glicosídeo e do uso da Lei de Lambert-Beer. Um padrão concentrado de antocianina cianidina-3-glicosídeo foi diluído vinte vezes em 0,1 mol L⁻¹ de HCl, com concentração determinada em espectrofotômetro de UV/Vis utilizando o valor de absorvidade molar conhecido $\epsilon = 25740$ em 0,1 N HCl a 520 nm e em pH=1,0 (GIUSTI & WROLSTAD, 2001) e aplicando os valores na Lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon l c$$

Equação 10

onde **A** é a absorvância, ϵ é a absorvidade molar, **l** é o caminho ótico (1 cm) e **c** é a concentração (mol L⁻¹).

Conhecendo a concentração da solução acima, foi preparada outra solução do padrão concentrado de cianidina-3-glicosídeo na mesma concentração, ou seja, diluindo vinte vezes

em 2,5% de ácido fórmico. Em seguida, foi feita leitura da absorvância no comprimento de onda de 530 nm e, o valor obtido foi novamente substituído na Equação 10, junto com a concentração determinada anteriormente, para obter o valor de ϵ em 2,5% de ácido fórmico em 530 nm e em pH = 2, já que nestas condições, as antocianinas das batatas-doces estudadas apresentam as maiores intensidades de cor e as maiores absorvâncias. Com o valor de ϵ para a cianidina-3-glicosídeo em 2,5% de ácido fórmico em 530 nm e em pH = 2 calculado nesta etapa, foi possível determinar a concentração de antocianinas totais (em equivalentes de cianidina-3-glicosídeo) para todos os extratos nas amostras *in natura*, cozidas e fritas, por espectrofotometria UV/Vis pela Equação 15.

$$\text{Equivalentes de cianidina-3-glicosídeo (mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}) = \frac{A}{\epsilon_{\text{Cy-3-gli}}} \times \text{FD} \times \frac{V_{\text{extrato}}}{1000} \times \frac{100}{M_{\text{BS}}} \times \text{MM}_{\text{Cy-3-gli}} \times 1000 \quad \text{Equação 15}$$

Onde:

A = absorvância;

$\epsilon_{\text{Cy-3-gli}}$ = absortividade molar da cianidina-3-glicosídeo;

FD = fator de diluição (volume final da solução de extrato diluído/volume inicial de extrato concentrado);

V_{extrato} = Volume total do extrato de antocianina obtido (volume do balão volumétrico) utilizado na extração quantitativa;

M_{BS} = massa (g) de amostra de batata-doce de polpa roxa (*in natura*, cozida ou frita) liofilizada e pulverizada em grau com pestilo;

$\text{MM}_{\text{Cy-3-gli}}$ = peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g mol⁻¹).

Observação: FD nas amostras *in natura* foi 1, enquanto nas amostras cozidas e fritas foi 6.

Em seguida foram preparadas soluções em 2,5% de ácido fórmico (pH = 2) utilizadas nos 6 pontos de calibração para o método CLAE-DAD, nas seguintes concentrações: 2,0 x 10⁻⁶; 4,0 x 10⁻⁶; 8,0 x 10⁻⁶; 1,20 x 10⁻⁵; 1,60 x 10⁻⁵ e 2,0 x 10⁻⁵ g mL⁻¹.

Para o cálculo das concentrações das soluções analisadas por CLAE-DAD, as áreas de todos os picos de antocianinas foram somadas e o resultado foi substituído no valor Y, da equação da reta do tipo Y = **ax + b**, obtida através da curva de calibração, onde Y é o valor da área, x o valor da concentração (g mL⁻¹), **a** o coeficiente angular e **b** o coeficiente linear incluídos na Equação 16.

$$\text{Equivalentes de cianidina-3-glicosídeo (mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}) = \frac{(Y-b)}{a} \times \text{FD} \times \frac{V_{\text{extrato}}}{10} \times \frac{100}{M_{\text{BS}}} \times 1000 \quad \text{Equação 16}$$

FD = fator de diluição (volume de injeção do método CLAE-DAD (40 µL)/volume real injetado (µL));

V_{extrato} = Volume total do extrato de antocianina obtido (volume do balão volumétrico) utilizado na extração quantitativa;

M_{BS} = massa (g) de amostra de batata-doce de polpa roxa (*in natura*, cozida ou frita) liofilizada e pulverizada em grau com pestilo;

Observação: O FD nas amostras *in natura* foi 1, já que o volume real injetado foi de 40 µL enquanto nas amostras cozidas e fritas FD foi 2, já que o volume real injetado foi de 20 µL.

3.11 Quantificação de Antocianinas Monoméricas totais pela metodologia do pH diferencial

O mesmo extrato usado na Quantificação de Antocianinas Totais por Espectrofotometria UV/Vis (alíquota de 1,5 mL do extrato de volume final de 25,00 mL centrifugada) foi levado para quantificação antocianinas monoméricas totais pela metodologia do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

A metodologia do pH diferencial consiste em determinar a concentração de antocianinas monoméricas a partir de soluções em pH 1,0, no qual as antocianinas se apresentam em sua forma colorida (laranja, vermelho, rosa ou roxa) e também no pH 4,5, no qual as antocianinas se apresentam em sua forma incolor, mesmo na presença de formas poliméricas degradadas ou outros interferentes.

Para isso foi necessário usar um tampão de cloreto de potássio, com pH = 1,0, e um tampão de acetato de sódio pH = 4,5, ambos preparados e com o pHs ajustados no dia da análise.

Para o tampão de cloreto de potássio 0,025 mol L⁻¹, pH = 1,0, foi adicionado em um bécher 1,86 g de KCl e 980 mL de água ultrapura sob agitação em placa agitadora magnética e com o eletrodo do pH-metro mergulhado na solução. O pH foi ajustado para 1,0 com gotas de HCl concentrado. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e o volume foi completado com água ultrapura.

Para o tampão de acetato de sódio 0,4 mol L⁻¹, pH = 4,5, foi adicionado a um bécher 54,43 g de CH₃CO₂Na.3H₂O e 960 mL de água ultrapura sob agitação em placa agitadora magnética e com o eletrodo do pH-metro mergulhado na solução. O pH foi ajustado para 4,5 com gotas de ácido acético concentrado. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e o volume foi completado com água ultrapura.

A partir dos mesmos extratos preparados para injeção em CLAE-DAD (nos quais foram feitos a partir da liofilização de 10,00 mL do extrato original e depois reconstituição em 1 mL de 2,5% ácido fórmico) foram preparadas duas soluções para cada amostra: uma de pH = 1,00 e outra de pH = 4,5. Para tal, os extratos foram diluídos na proporção de 1:9 (100 µL do extrato: 900 µL do tampão) no caso das batatas *in natura* e 1:19 (50 µL do extrato: 950 µL do tampão) no caso das batatas-doces cozidas e fritas. As soluções tamponadas foram reservadas em microtubos por 15 minutos até o início da leitura das absorvâncias em espectrofotômetro. Para cada solução nos dois diferentes pHs foram realizadas duas leituras, uma a 530 nm e outra a 700 nm. As leituras foram realizadas dentro de uma hora para evitar que após esse tempo as soluções sofressem degradação. O espectrofotômetro foi zerado com água ultrapura em cada comprimento de onda antes das leituras.

Em seguida, a absorvância corrigida de cada amostra foi calculada conforme Equação 17.

$$A_{\text{corrigida}} = (A_{\lambda 530} - A_{\lambda 700})_{\text{pH}1,0} - (A_{\lambda 530} - A_{\lambda 700})_{\text{pH}4,5} \quad \text{Equação 17}$$

onde:

$A_{\text{corrigida}}$ = absorvância corrigida para substituir na lei de Lambert-Beer;

$A_{\lambda 530}$ = absorvância lida em 530 nm;

$A_{\lambda 700}$ = absorvância lida em 700 nm

Em seguida, o valor obtido para $A_{\text{corrigida}}$ foi substituído na Equação 18 para o cálculo da concentração em base seca de batata-doce:

$$\text{Antocianina monomérica total (equiv. de cianidina-3-glicosídeo (mg 100}^{-1} \text{ g}^{-1})) = \frac{A_{\text{corrigida}}}{\epsilon_{\text{Cy-3-gli}}} \times \text{FD} \times \frac{V_{\text{extrato}}}{1000} \times \frac{100}{M_{\text{BS}}} \times \text{MM}_{\text{Cy-3-gli}} \times 1000 \quad \text{Equação 18}$$

Onde:

$A_{\text{corrigida}}$ = absorvância corrigida para substituir na lei de Lambert-Beer (calculada na Equação 17);

$\epsilon_{\text{Cy-3-gli}}$ = absortividade molar da cianidina-3-glicosídeo;

FD = fator de diluição (volume final da solução de extrato tamponado/volume inicial de extrato concentrado);

V_{extrato} = Volume total do extrato de antocianina obtido (volume do balão volumétrico) utilizado na extração quantitativa;

M_{BS} = massa (g) de amostra de batata-doce de polpa roxa (*in natura*, cozida ou frita) liofilizada e pulverizada em grau com pestilo;

$\text{MM}_{\text{Cy-3-gli}}$ = peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g mol⁻¹).

3.12 Análise de varredura para obtenção do espectro de UV/Vis dos extratos de antocianinas das batatas-doces de polpa roxa em diferentes pHs

Para cada uma das duas variedades de batata-doce de polpa roxa, foram escolhidos ao acaso um dos extratos obtidos na análise do perfil e quantificação de antocianinas por Espectrofotometria UV/Vis. Foi utilizado 10 mL de cada extrato. Os extratos foram colocados em bécheres com eletrodo de pH-metro mergulhado na solução, sob agitação em agitador magnético com adição de gotas de HCl diluído ou de gotas de hidróxido de sódio diluído para ajustar o pH aproximadamente entre pHs 1 a 9. Em cada pH escolhido, foram lidas as absorvâncias dentro da faixa de comprimentos de onda de 200 a 700 nm, em pontos diferentes a cada 20 nm. Os dados foram plotados em gráfico Intensidade (UA) X Comprimento de onda (nm), onde foi possível observar os comprimentos de onda de máximos de absorção (λ_{max}) dos extratos, que corresponde ao comportamento das antocianinas presentes. Com isso determinou-se o comprimento de onda de maior sensibilidade em cada pH e a estabilidade das cores observadas nos diferentes pHs. Observou-se também se os pHs empregados de forma genérica na determinação de antocianinas monoméricas pelo método do pH diferencial não foram adequados para as antocianinas dos extratos das batatas-doces deste trabalho. Esse procedimento foi realizado para investigar o motivo de diferentes resultados obtidos através das metodologias empregadas na quantificação das antocianinas nesses extratos (quantificação de antocianinas por CLAE-DAD, por espectrofotometria UV/Vis e pelo método do pH diferencial).

3.13 Tratamento estatístico dos dados brutos

Todos os dados brutos de pesagens, contagens, peso seco e quantificações de carotenoides e antocianinas foram tratados através de planilhas no programa Excel (Microsoft Office) e também no programa de estatística R. Os programas foram utilizados nos cálculos de

médias, desvio padrão, coeficientes de variação, comparação entre médias para avaliação de resultados com ou sem diferenças significativas com confiança de 95%, usando teste de Student para comparação entre dois resultados ou ANOVA e Tukey para comparação entre três ou mais, usando alfa e $p < 0,05$. Estes dados estão organizados em quadros e tabelas no APÊNDICE A – TRATAMENTO ESTATÍSTICO, para consulta opcional dos dados brutos e cálculos realizados, já que os resultados que trazem as informações após tratamento estatístico estão apresentados e explicados no texto no item 4 Resultados e Discussão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos Cultivos de Batatas-doces sob Sistema Orgânico

As diferenças nos rendimentos entre as variedades comparadas certamente é uma questão das diferenças genéticas entre as variedades, já que todas foram cultivadas sob as mesmas condições. Entre as repetições das mesmas variedades nos quatro blocos, notou-se que houve maior variação no rendimento dentro de algumas variedades que pode ter sido causado por ataque de lagartas que se concentraram mais dentro da repetição 11 Bloco III-D e nas repetições próximas como a 8 Bloco II-D e a 10 Bloco III-A.

Nas Tabelas 6 a 9, do APÊNDICE A estão as quantidades das variedades de batata-doce colhidas nas áreas centrais do plantio de cada repetição de campo (3 x 0,8 m da leira central de cada repetição), com as classificações comerciais: Extra A, Extra, Diversos e Tubérculos. As variedades que apresentaram maiores rendimentos nas condições do experimento foram a IAPAR 69 - B (de pele e polpa alaranjadas) com 26,21 t ha⁻¹ e a variedade de pele e polpa roxas - C, com 24,86 t ha⁻¹, com resultados que não foram significativamente diferentes. As variedades de pele branca e polpa roxa -A com rendimentos de 11,06 t ha⁻¹ e a de pele roxa e polpa amarela -D com 9,03 t ha⁻¹ foram as que renderam menos, porém os rendimentos de ambas não foram significativamente diferentes. A comparação das diferenças e significâncias foram feitas com alfa e $p < 0,05$ por estatísticas ANOVA e Tukey no programa R, vide Quadro 1 do APÊNDICE A.

O rendimento brasileiro da produção de batata-doce, estimado em 2009 por Melo et al. (2009) foi de 11,51 t ha⁻¹. Sendo assim, os rendimentos de todas as variedades testadas foram bastante promissores e competitivos, levando em consideração que o cultivo foi orgânico, sem uso de pesticidas e outros insumos geralmente usados na agricultura convencional, que contribui majoritariamente na estimativa do rendimento nacional. Com a vantagem de apresentar menores impactos ambientais e menores custos, já que o sistema orgânico para a produção das batatas-doces utilizado neste trabalho não teve o custo dos insumos geralmente empregados na agricultura convencional.

4.2 Peso seco da batatas-doces *in natura*, cozidas e fritas

Nas tabelas 10 até 21 do APÊNDICE A estão os valores das pesagens e cálculos para a obtenção do Peso seco (%) para todas as variedades de batatas-doces *in natura*, cozidas e fritas, respectivamente. Os valores obtidos apresentaram coeficientes de variação menores que 6,4% incluindo as variações do campo e de laboratório. Os valores dos pesos secos das amostras *in natura* foram significativamente diferentes, exceto para as variedades de polpas roxas, cujos valores não apresentaram diferenças significativas com nível de significância $p < 0,05$ (Quadro 2 do APÊNDICE A). O mesmo comportamento foi observado com o peso seco das batatas-doces cozidas e fritas (Quadros 3 e 4 do APÊNDICE A).

Os valores médios dos pesos secos para as batatas-doces *in natura*, cozidas e fritas cujos cálculos estão apresentados do APÊNDICE A nas tabelas de 10 a 21 e foram: 40,90% (Tabela 10), 38,76% (Tabela 14), e 55,68% (Tabela 18), para a variedade de pele roxa e polpa amarela; 31,10 % (Tabela 11), 31,33% (Tabela 15), e 43,21% (Tabela 19), para a de pele branca e polpa roxa; 30,55% (Tabela 12), 30,50% (Tabela 16), e 44,71% (Tabela 20), para a de pele e polpa roxas e 25,66% (Tabela 13), 26,52% (Tabela 17), e 38,12% (Tabela 21), para a IAPAR 69. Em

todos os casos, foi possível observar que o processo de fritura acarreta principalmente a desidratação e absorção de óleo, com aumento do peso seco em todas as amostras fritas em relação as amostras *in natura* e cozidas. Já o processo de cozimento a vapor, não causou alterações significativas de hidratação ou desidratação das amostras em relação às amostras *in natura*. Em todas as variedades esse comportamento foi idêntico, o peso seco não apresentou diferença significativa entre amostras cozidas e *in natura*. Apenas o peso seco das amostras fritas apresentou alteração significativa (Quadros 5, 6, 7 e 8 do APÊNDICE A).

4.3 Carotenoides totais da batata-doce da variedade IAPAR 69 *in natura*, cozida e frita

O teor de carotenoides totais da batata-doce da variedade IAPAR 69 *in natura*, que em média foi de $65.276 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em base seca (Tabela 22 do APÊNDICE A) ficou dentro da faixa prevista na literatura para batatas de polpa amarelada, que é de até $128.500 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ do material seco (WANG, NIE, ZHU, 2016).

Já os teores nelas cozidas e fritas foram menores, de $36.902 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ (Tabela 23 do APÊNDICE A) e $29.942 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ (Tabela 24 do APÊNDICE A), respectivamente, sem diferença significativa (Quadro 9 do APÊNDICE A).

As retenções dos carotenoides totais foram 59% (Tabela 23 do APÊNDICE A) e 47% (Tabela 24 do APÊNDICE A), para cozidas e fritas, respectivamente, sem diferenças significativas (Tabela 25 do APÊNDICE A) mostrando que há perdas de carotenoides devido aos processamentos, porém não houve diferença significativa entre os processos de cozimento e fritura.

As quantidades de carotenoides retidas após os processos de cozimento e fritura ainda são muito relevantes seja em termos de potencial antioxidante ou pró-vitâmico A.

4.4 Carotenoides totais da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita

O teor de carotenoides totais da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela *in natura*, que em média foi de $2.257 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em base seca (Tabela 26 do APÊNDICE A), equivalente a $9,233 \mu\text{g } \text{g}^{-1}$ em base úmida e ficou dentro da faixa prevista na literatura para batatas de polpa amarelada, que é de 0,4 a $75,5 \mu\text{g } \text{g}^{-1}$ no material fresco (WANG, NIE, ZHU, 2016).

Já os teores nesta variedade cozida e frita foram bem menores, de $1.750 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ (Tabela 27 do APÊNDICE A) e $1.833 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ (Tabela 28 do APÊNDICE A), respectivamente, sem diferença significativa (Quadro 10) assim como ocorreu com a variedade IAPAR 69.

As retenções dos carotenoides totais foram 80% (Tabela 27 do APÊNDICE A) e 83% (Tabela 28 do APÊNDICE A), para cozidas e fritas, respectivamente, sem diferenças significativas (Tabela 29 do APÊNDICE A) mostrando que há perdas de carotenoides devido aos processamentos, porém não houve diferença significativa entre os processos de cozimento e fritura. As retenções foram bem menores na IAPAR 69 (59% e 47% na IAPAR 69 cozida e frita, respectivamente) do que na variedade de pele roxa e polpa amarela, evidenciando maior estabilidade dos carotenoides presentes nesta variedade.

Os teores de carotenoides totais da variedade de pele roxa e polpa amarela são muito mais baixos do que os teores da IAPAR 69, com perfil de carotenoides majoritariamente do tipo xantofilas, sem atividade pró-vitâmica A, porém com potencial para antioxidantes. Tais

xantofilas, são mais resistentes à degradação pelos processos de cozimento e fritura quando comparados aos carotenoides pró-vitâmicos-A da IAPAR 69.

4.5 Análises do perfil e quantificação dos carotenoides identificados na variedade IAPAR 69 *in natura*, cozida e frita

As Figuras 53, 54 e 55 mostram os cromatogramas e os espectros do perfil de carotenoides encontrado na cultivar IAPAR 69 *in natura*, cozida e frita, respectivamente. Essa variedade apresentou majoritariamente teores de β -caroteno maiores que 90% no material *in natura*, como previsto na literatura para batatas-doces de polpa alaranjada. Também apresentou quantidades de zeinoxantina (Figura 56) em torno de 5%. A literatura prevê a presença de xantofilas como carotenoides minoritários, porém relata a zeaxantina ou β -criptoxantina como os mais comuns em batatas-doces de polpa alaranjada e não a zeinoxantina (WANG; NIE; ZHU, 2016; KIM et al, 2015).

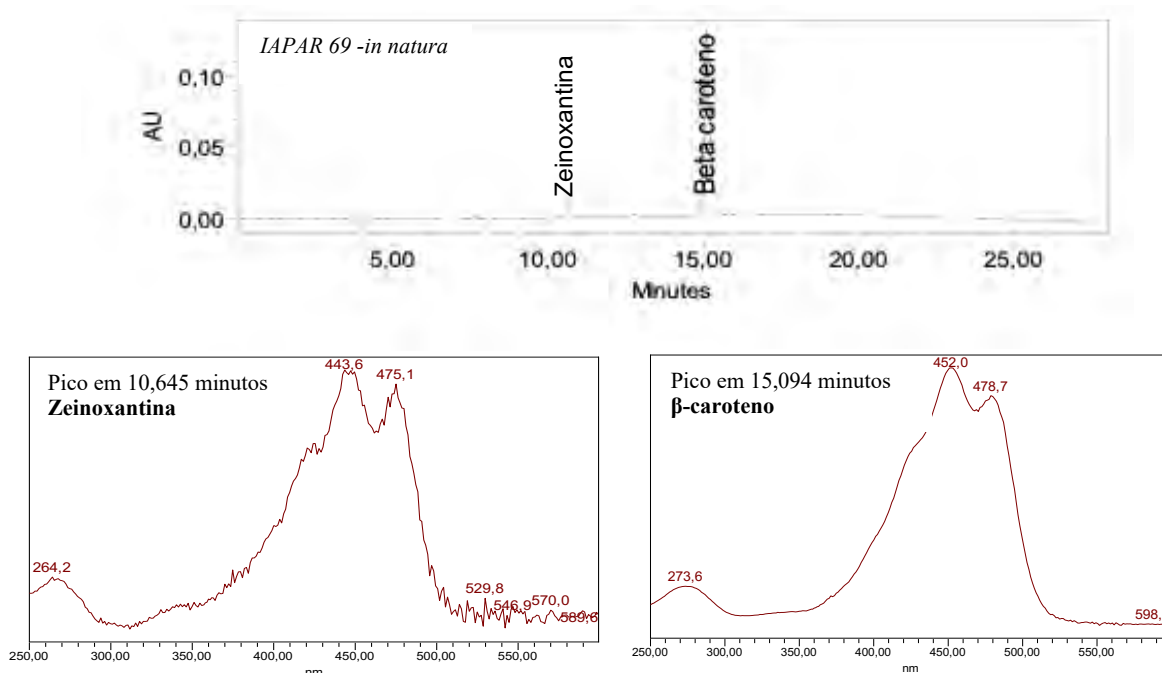


Figura 53 – Perfil cromatográfico em 450 nm do extrato em acetona da batata-doce IAPAR 69 *in natura*, evidenciando os picos do carotenoide majoritário todo-*trans*- β -caroteno e do carotenoide Zeinoxantina em quantidade menor. Abaixo do cromatograma estão os espectros de UV/Vis dos picos observados.

Nos materiais cozidos e fritos, pelos cromatogramas (Figuras 54 e 55) pode ser observada a ocorrência de degradação térmica com isomerização evidenciada pela redução dos picos da zeinoxantina e todo-*trans*- β -caroteno e aumento na proporção de 13-*cis*- β -caroteno. Além disso, foram observados muitos picos menores (com áreas inferiores a 1%) que se confundiram com o ruído da linha base e não foi possível identificação porque suas concentrações muito baixas não possibilitaram a obtenção de bons espectros de UV/Vis.

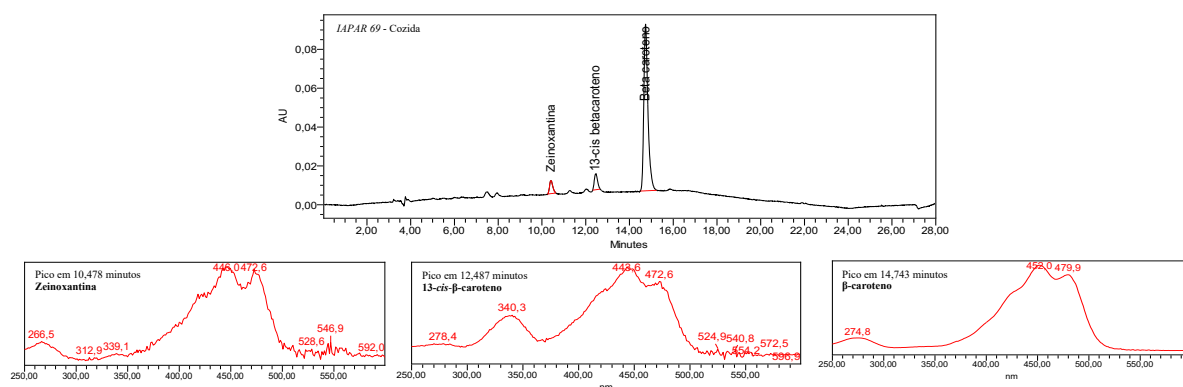


Figura 54 – Perfil cromatográfico em 450 nm do extrato em acetona da batata-doce IAPAR 69 cozida no vapor, evidenciando o carotenoide majoritário todo-*trans*-β-caroteno, e quantidades menores dos carotenoides Zeinoxantina e 13-*cis*-β-caroteno. Abaixo do cromatograma estão os espectros de UV/vis dos picos observados.

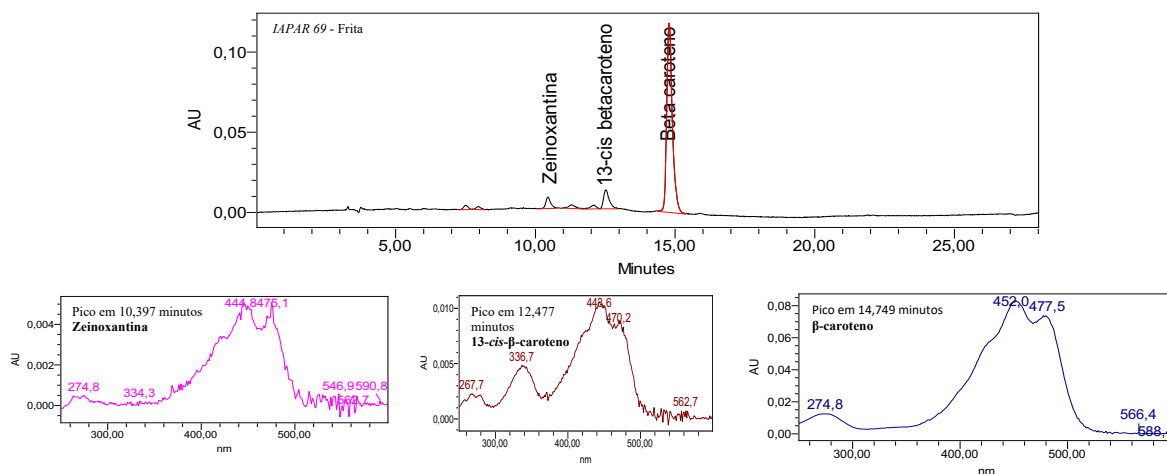


Figura 55 – Perfil cromatográfico em 450 nm do extrato em acetona da batata-doce IAPAR 69 frita, evidenciando o carotenoide majoritário todo-*trans*-β-caroteno, e quantidades menores dos carotenoides Zeinoxantina e 13-*cis*-β-caroteno, além de picos muito menores que se confundem com o ruído da linha de base. Abaixo do cromatograma estão os espectros de UV/vis dos picos observados.

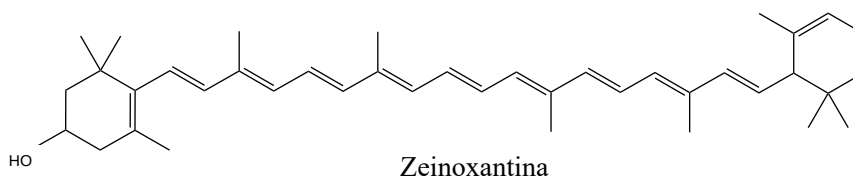


Figura 56 – Estrutura molecular da Zeinoxantina.

O todo-*trans*-β-caroteno, a zeinoxantina e o 13-*cis*-β-caroteno foram identificados através da comparação dos tempos de retenção (tR) e dos espectros de padrões analíticos destas

substâncias conforme o método de Pacheco (2014). As Figuras 57 e 58 mostram o perfil cromatográfico com os espectros dos padrões de carotenoides na metodologia desenvolvida por Pacheco (2009, 2014), onde a ordem de eluição, tempo de retenção (tR) e espectros de padrões de carotenoides de fontes vegetais permitiram a identificação dos carotenoides nas matrizes de batata-doce deste trabalho.

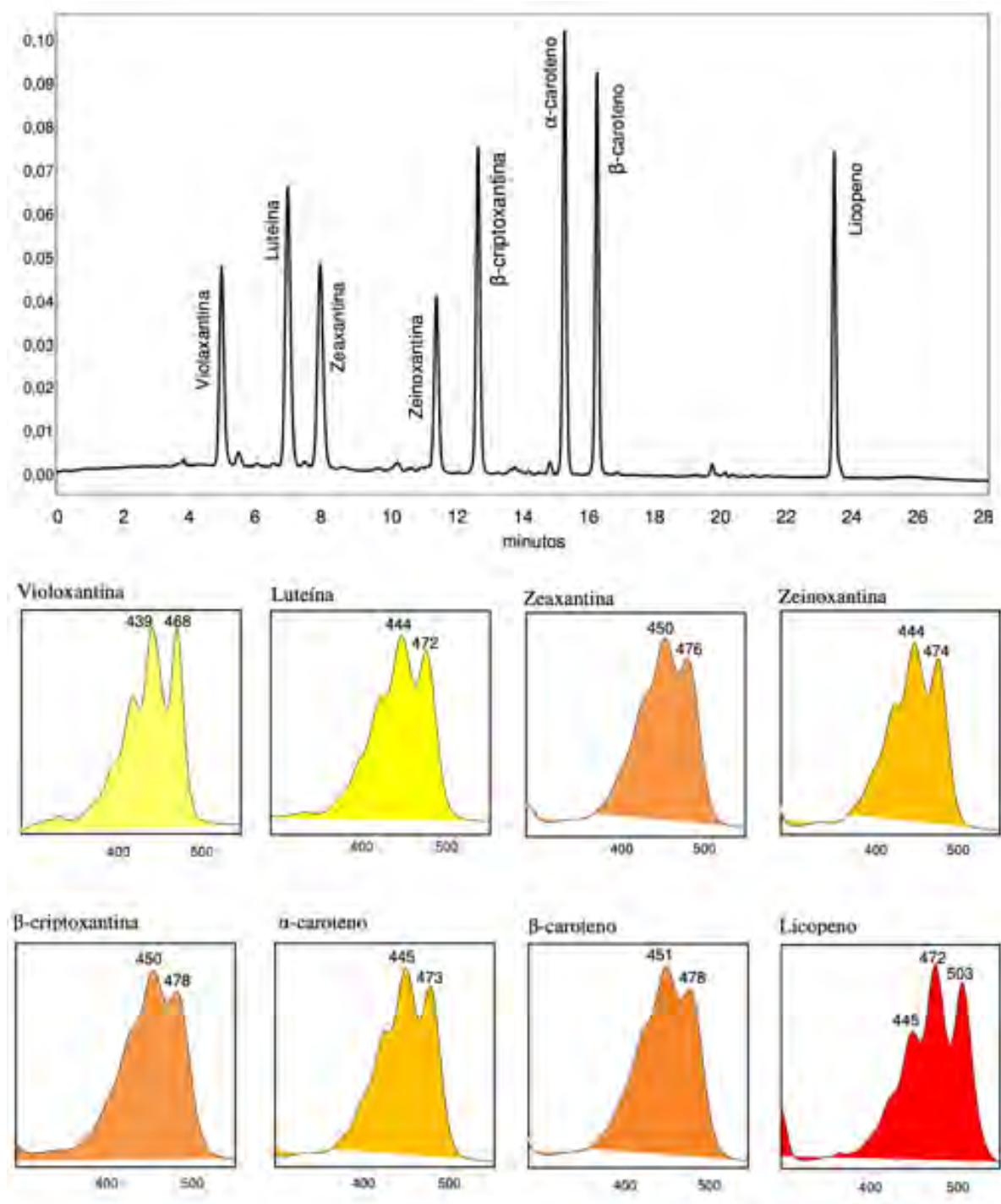


Figura 57 – Perfil cromatográfico em 450 nm de carotenoides isolados de fontes vegetais em acetona, com seus respectivos espectros de UV/vis, evidenciando a ordem de eluição e os tempos de retenção (tR). Figura retirada da página 72 da dissertação de Pacheco (2009).

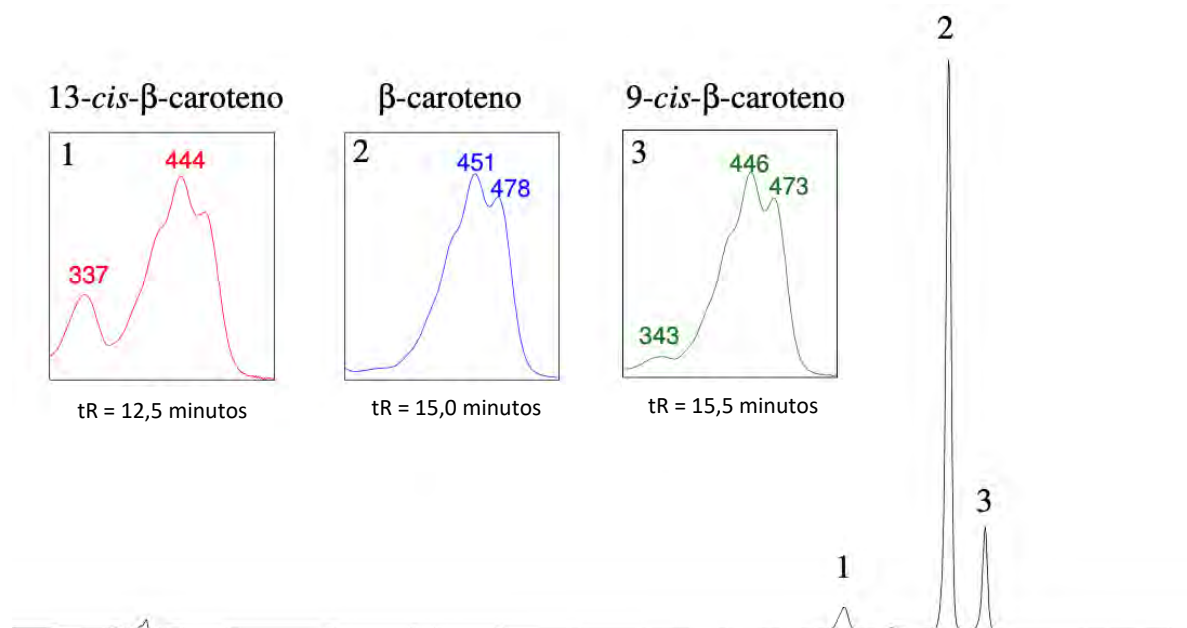


Figura 58 – Perfil cromatográfico em 450 nm de todo-*trans*-β-caroteno e seus isômeros 13-*cis*-β-caroteno e 9-*cis*-β-caroteno em acetona, com seus respectivos espectros de UV/vis, evidenciando a ordem de eluição e os tempos de retenção (tR). Figura adaptada da página 61 da dissertação de Pacheco (2009).

As Tabelas 30, 31, 32 do APÊNDICE A mostram as quantidades médias de carotenoides totais em base seca (BS) obtidas nas duplicatas de laboratório para as variedades IAPAR 69, *in natura*, cozidas e fritas, respectivamente. Os coeficientes de variação (CV) das duplicatas de laboratório não foram apresentados porque foram sempre menores que 5%, enquanto as médias, desvios padrões e CV das repetições de campo, nas quais os erros das análises laboratoriais já estão incluídos, foram apresentados.

O teor médio do todo-*trans*-β-caroteno na IAPAR 69 *in natura* foi de $59.276 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em base seca (Tabela 30 do APÊNDICE A), enquanto nela cozida foi de $27.834 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ com 48% de retenção (Tabela 31 do APÊNDICE A). Já o teor médio do todo-*trans*-β-caroteno nela frita foi de $29.622 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em base seca com 52% de retenção (Tabela 32 do APÊNDICE A). Foi possível constatar redução do teor de todo-*trans*-β-caroteno devido aos processos de cozimento e fritura, sem diferença significativa entre eles (Quadro 11 do APÊNDICE A) como ocorreu com os teores de carotenoides totais.

O teor médio da Zeinoxantina na IAPAR 69 *in natura* foi de $4.398 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em base seca (Tabela 30 do APÊNDICE A), enquanto nela cozida foi de $1.888 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ com 45% de retenção (Tabela 31 do APÊNDICE A). Já o teor médio da Zeinoxantina nela frita foi de $1.758 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em base seca com 42% de retenção (Tabela 32 do APÊNDICE A). Foi possível constatar redução do teor de Zeinoxantina devido aos processos de cozimento e fritura, sem diferença significativa entre eles (Quadro 12 do APÊNDICE A) como ocorreu com os teores de carotenoides totais e de todo-*trans*-β-caroteno.

O 13-*cis*-β-caroteno não foi detectado na amostra *in natura* da variedade IAPAR69, já que é um produto da degradação do tipo isomerização, provocado pelo aquecimento. Na amostra cozida o teor médio de 13-*cis*-β-caroteno foi de $2.559 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em base seca (Tabela 31 do APÊNDICE A), enquanto nela frita foi de $3.209 \mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ (Tabela 32 do APÊNDICE A). Não houve diferença significativa entre os teores de 13-*cis*-β-caroteno que apareceram

devido aos processos de cozimento ou fritura (Tabela 33 do APÊNDICE A).

A presença da zeinoxantina, mesmo em quantidades muito pequenas é inédita para esta cultivar IAPAR 69, já que nenhum trabalho obteve essa identificação. O comportamento dos carotenoides presentes nessa variedade frente aos processamentos de cozimento e fritura apresentou perdas devido à isomerização do carotenoide majoritário todo-*trans*- β -caroteno à 13-*cis*- β -caroteno. Provavelmente há outros produtos da degradação térmica dos dois carotenoides presentes que não foram identificados por estarem em quantidades muito pequenas.

Há perdas em torno de 50% devido à degradação térmica dos carotenoides da IAPAR 69, porém sem diferença entre os processos de cozimento e fritura, restando ainda quantidades suficientes para suprir a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitamina A ou Equivalentes de Retinol (600 $\mu\text{g}/\text{dia}$) (RODRIGUEZ-AMAYA; 2001) com a ingestão de apenas 64 g dessa batata-doce frita, cuja presença do óleo usado na fritura facilita a bioacessibilidade dos carotenoides.

4.6 Análises do perfil e quantificação dos carotenoides não identificados na variedade de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita

Os resultados das análises por CLAE-DAD dos extratos da variedade da batata-doce de pele roxa e polpa amarela *in natura* mostraram um perfil de carotenoides completamente diferente da variedade IAPAR 69, com muitos carotenoides não identificados, cujos picos não coincidiram em tR e nem em espectros de UV/Vis com os padrões de carotenoides mais comuns em vegetais alimentícios, estudados no Laboratório de Cromatografia Líquida (LCLAE) da Embrapa Agrodústria de Alimentos, onde esta tese foi desenvolvida. Para verificar se poderia estar ocorrendo a presença de carotenoides conhecidos, porém ligados a outras moléculas presentes na matriz, o que poderia acarretar mudanças nos tR's e nos espectros de UV/Vis, foi realizada a saponificação de algumas amostras, com a intenção de hidrolisar essas moléculas ligadas e obter os carotenoides livres para análise.

Os cromatogramas obtidos para os extratos saponificado e não-saponificado estão na Figura 59 juntamente com os espectros de UV/Vis de cada pico, que foram idênticos, comprovando que os carotenoides realmente não estavam ligados a outras moléculas da matriz e que realmente não podem ser identificados simplesmente pela técnica CLAE-DAD sem os padrões específicos. Quando comparados com os carotenoides mais encontrados em vegetais alimentícios, já apresentados na Figura 57, apenas foi possível identificar o pico 8 como todo-*trans*- β -caroteno, porém numa concentração muito baixa, que dificultou a obtenção de um espectro de boa qualidade, já que o ruído ficou muito intenso.

A posição dos picos mais intensos no cromatograma, dos carotenoides majoritários (picos 4 e 5), na região de carotenoides mais polares, é um indício de que eles são oxigenados como as xantofilas numa forma de ligação que dificulta as transições eletrônicas, já que o efeito foi diminuição dos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}). É possível que as ligações com o oxigênio estejam na forma de epóxidos, ou que estejam substituindo uma ligação dupla no anel β -ionona, o que diminuiria o número de ligações duplas conjugadas causando a redução dos λ_{max} , como na violaxantina (Figuras 57 e 60).

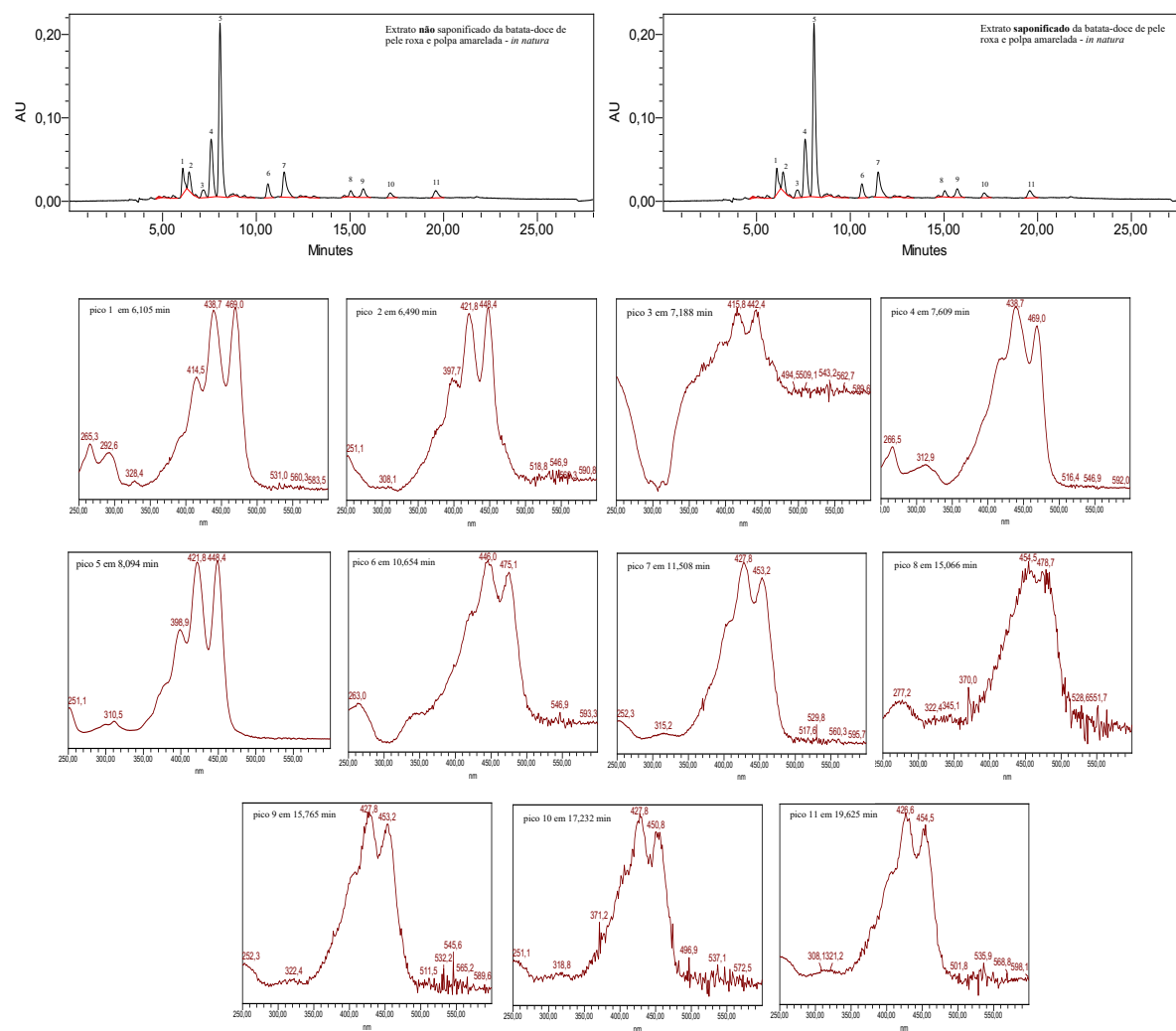


Figura 59 – Perfil cromatográfico em 450 nm dos extratos em acetona saponificado e não saponificado da batata-doce de pele roxa e polpa amarela, idênticos, com picos de carotenoides não identificados e seus respectivos espectros de UV/vis, evidenciando a ordem de eluição e os tempos de retenção (tR).

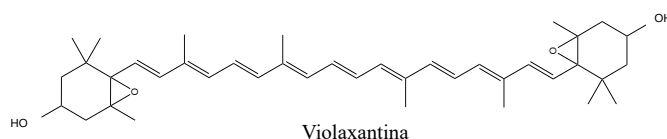


Figura 60 – Estrutura molecular da xantofila Violaxantina.

Maoka et al. (2007) já haviam constatado que apesar de variedades de batata-doce de polpa amarela serem bastante consumidas no Japão, seus carotenoides ainda não haviam sido identificados. Logo, a presença desses carotenoides não identificados são evidências de que essas moléculas podem ser carotenoides raros e ainda não relatados em batata-doce. Maoka et al. (2007) isolaram e identificaram 5 novos carotenoides e outros 7 já conhecidos, que nomearam de Ipomoexantinas (Figura 61 e Tabela 34), em uma cultivar de polpa amarela chamada “Benimasari” com espectros muito semelhantes àqueles obtidos para os carotenoides da variedade de polpa amarela investigada neste trabalho.

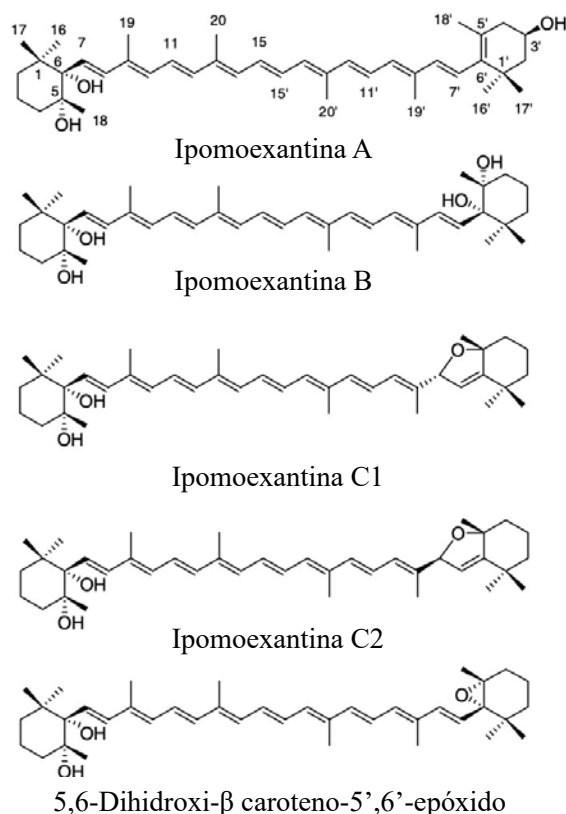


Figura 61 – Estrutura molecular de 5 novos carotenoides descobertos e identificados por Maoka et al. (2001) em uma cultivar de batata-doce de polpa amarela de nome “Benimasari”, *Ipomoea batatas* LAM, desenvolvida pelo Centro Nacional de Pesquisa em Agricultura da Região de Kyushu Okinawa (Japão). Figura adaptada de Maoka et al. (2001).

Suspeita-se que os carotenoides detectados nesta variedade sejam as mesmas xantofilas identificadas por Maoka et al. (2007) ou, novas xantofilas com estruturas análogas. A identificação destes carotenoides necessita que eles sejam isolados, purificados e analisados por espectrometria de massa de alta resolução, assim como foi feito para as antocianinas nesta tese,

além de análises de ressonância nuclear. Essas análises não foram realizadas neste trabalho. Entre as novas xantofilas descobertas e identificadas por Maoka et al. (2007) e os outros 7 carotenoides identificados, a ordem de eluição em C₃₀ foi: neocromo, auroxantina, ipomoeaxantina B, ipomoeaxantina A, β-criptoxantina 5,8; 5',8'-diepóxido, β -criptoxantina 5,8; 5',8'-diepóxido (isômero *cis*), ipomoeaxantina C1 e C2 (co-eluíram), β -criptoxantina 5',8'-epóxido (isômero *cis*), β -criptoxantina 5',8'-epóxido, β -caroteno 5,8; 5',8'-diepóxido, β -caroteno 5,8-epóxido e β -caroteno.

Tabela 6 – Dados de UV/Vis e espectrometria de massas de alta resolução por bombeamento atômico rápido (BAR-EM) obtidos por Maoka et al. (2001) na identificação de 5 novas xantofilas na variedade de batata-doce de polpa amarela “Benimasari”.

Xantofila	Fórmula Molecular	Íon molecular (M ⁺)	λ _{max} (nm)
Ipomoeaxantina A	C ₄₀ H ₅₈ O ₃	586,4386	420, 444, 472
Ipomoeaxantina B	C ₄₀ H ₆₀ O ₄	604,4486	415, 438, 468
Ipomoeaxantina C1	C ₄₀ H ₅₈ O ₃	586,4386	398, 420, 448
Ipomoeaxantina C2	C ₄₀ H ₅₈ O ₃	586,4386	398, 420, 448
5,6-Dihidroxi- β -caroteno-5',6'-epóxido	C ₄₀ H ₅₈ O ₃	586,4386	398, 420, 448

Na Figura 62 estão comparados os cromatogramas dos extratos não saponificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita, idênticos, exceto pela diminuição da proporção dos picos dos carotenoides majoritários (picos 4 e 5) devido aos processos de cozimento e fritura e aumento na proporção dos picos 2 e 7. Observou-se que os processamentos causaram o aparecimento de picos muito pequenos que se confundiram com a linha base sem a possibilidade de obtenção de espectros de UV/Vis nítidos.

Provavelmente, os carotenoides gerados na degradação térmica (isomerização) são esses picos pequenos que surgiram como ruído na linha base nos cromatogramas das batatas-doces cozidas e fritas. Nas Figuras 63, 64 e 65, observa-se a comparação dos espectros de UV/Vis de todos os 11 picos detectados nos extratos da batata-doce de pele roxa e polpa amarela, mostrando que no geral não ocorreu alteração nos λ_{max} deles, nem de seus tR's.

Porém, os espectros dos picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 dos materiais cozidos e fritos (Figuras 63 e 64) apresentaram o aumento ou o aparecimento de uma banda nova em seus espectros, na região de UV entre 290-312 nm, que é a região correspondente ao aparecimento de ligações *cis*, que dificultam as transições eletrônicas entre as conjugações (já que aumentam a distância entre os orbitais), necessitando de maiores energias, fornecidas por λ menores. É uma evidência de que, os carotenoides resultantes da isomerização por degradação térmica durante o cozimento e fritura não foram separados por esse método cromatográfico e co-eluem com os carotenoides originais da batata-doce *in natura* nos picos 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8. Este comportamento não ocorreu nos demais picos de 9 a 11, cujos espectros foram sempre iguais independente do processamento.

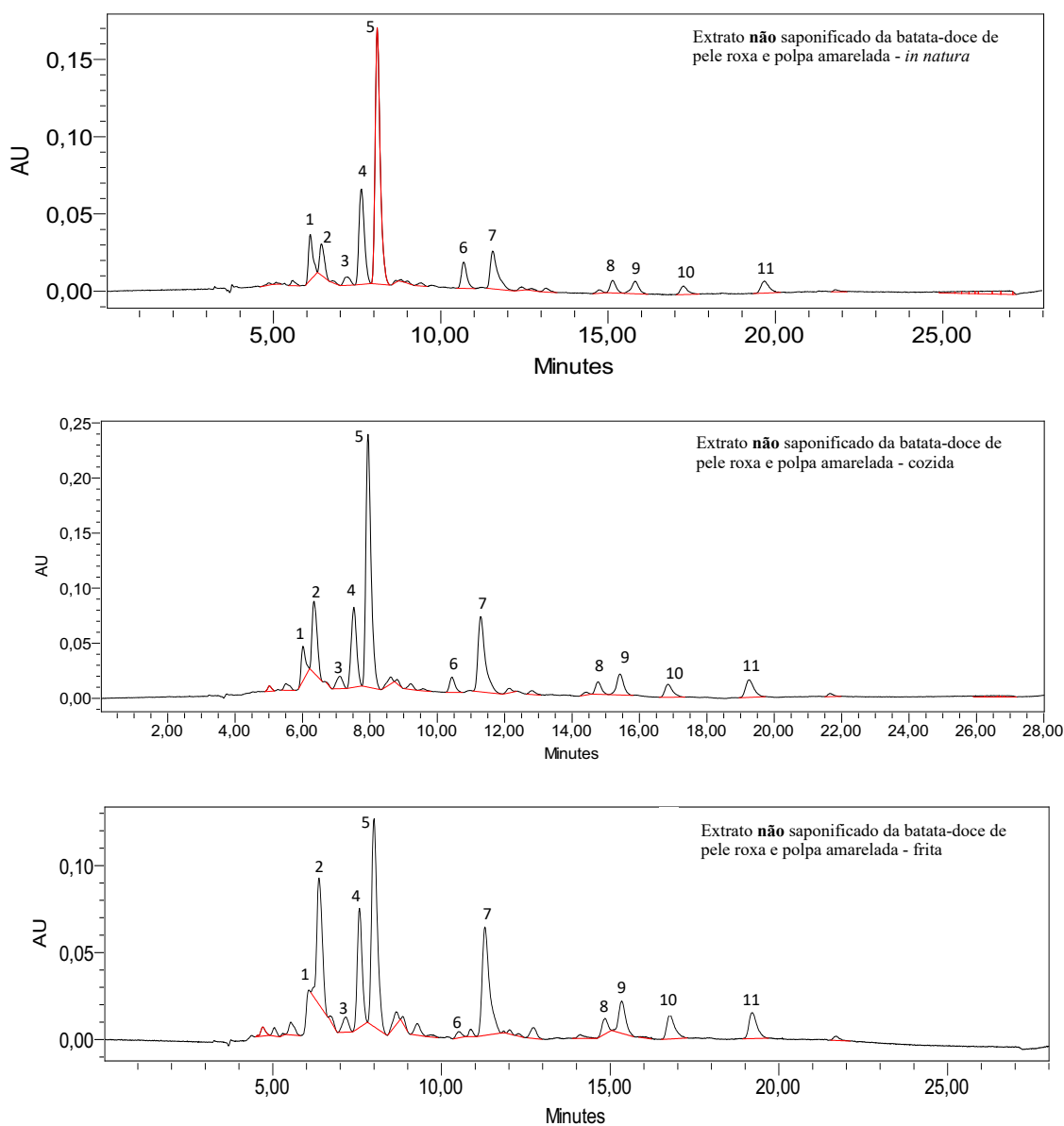


Figura 62 – Perfil cromatográfico em 450 nm dos extratos em acetona não saponificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita, com picos de carotenoides não identificados, evidenciando diferenças nos tamanhos dos picos entre os tratamentos.

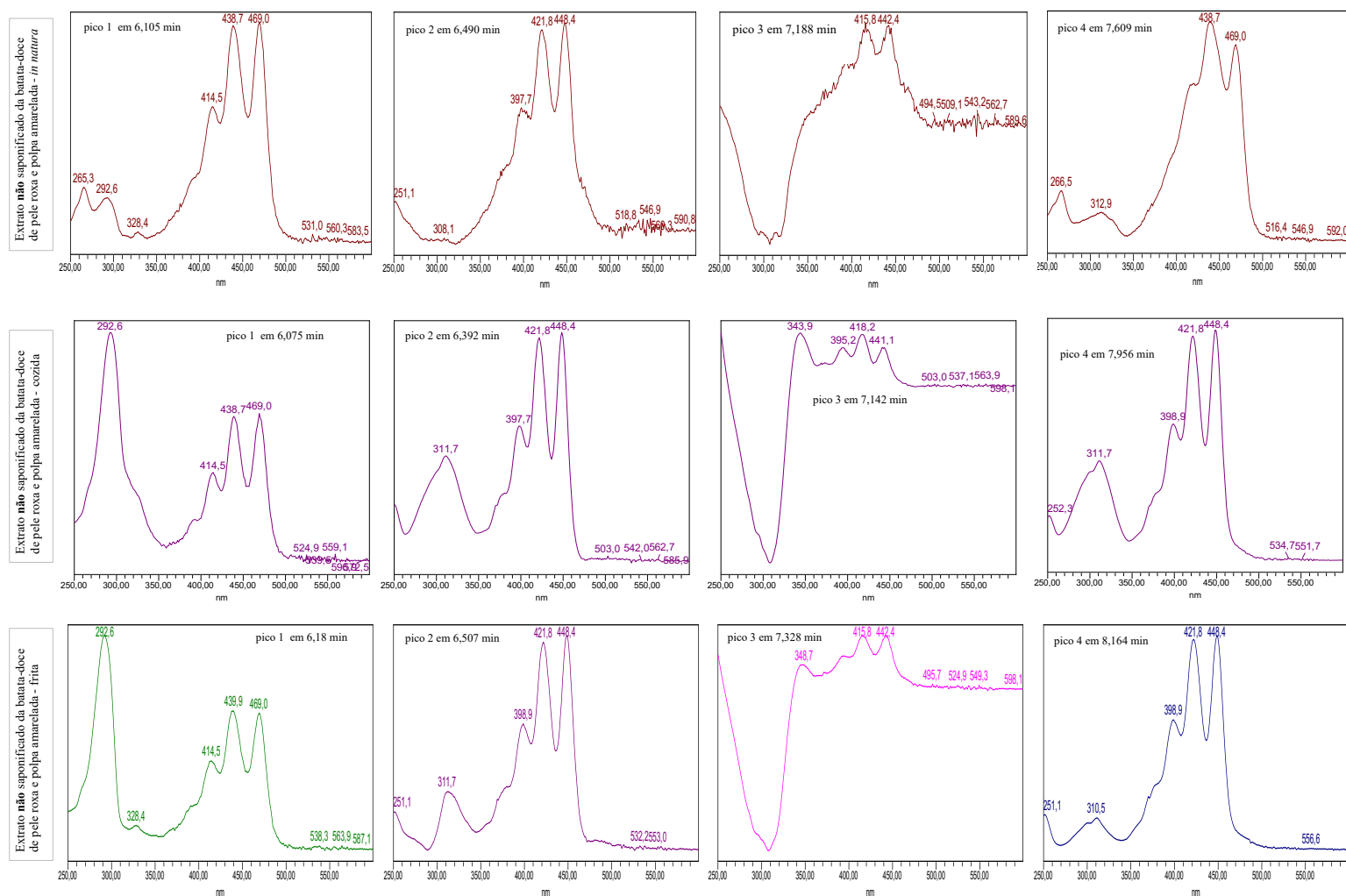


Figura 63 – Espectros de UV/Vis dos picos 1 a 4 de carotenoides não identificados detectados nos extratos não saponificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita, evidenciando em alguns casos o aparecimento ou o aumento na banda correspondente à isomerização *cis* na região do UV (abaixo de 400 nm) nos materiais cozidos e fritos.

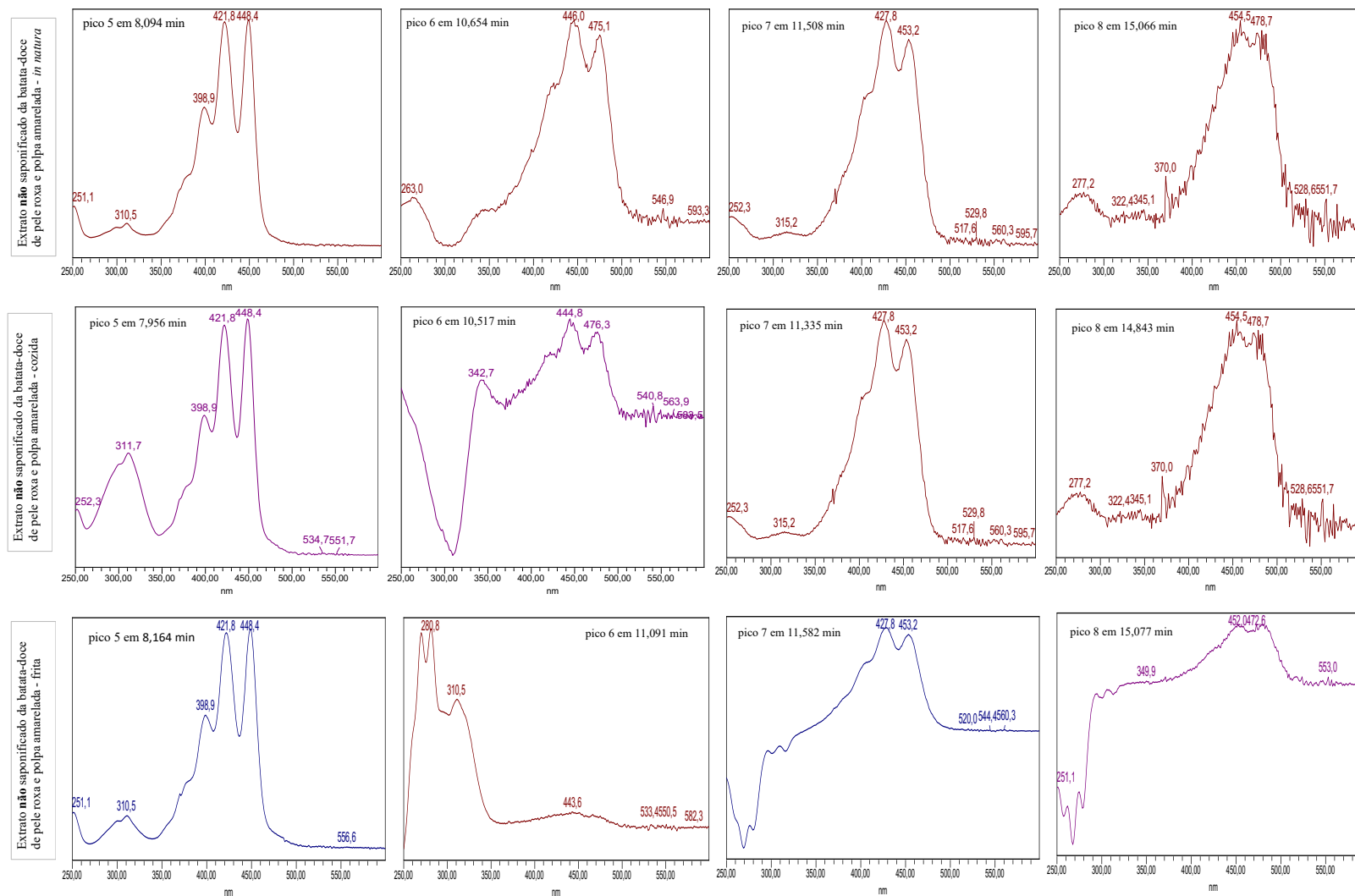


Figura 64 – Espectros de UV/Vis dos picos 5 a 8 de carotenoides não identificados (exceto o pico 8, *todo-trans*- β -caroteno) detectados nos extratos não saponificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita, evidenciando em alguns casos o aparecimento ou o aumento na banda correspondente à isomerização *cis* na região do UV (abaixo de 400 nm) nos materiais cozidos e fritos.

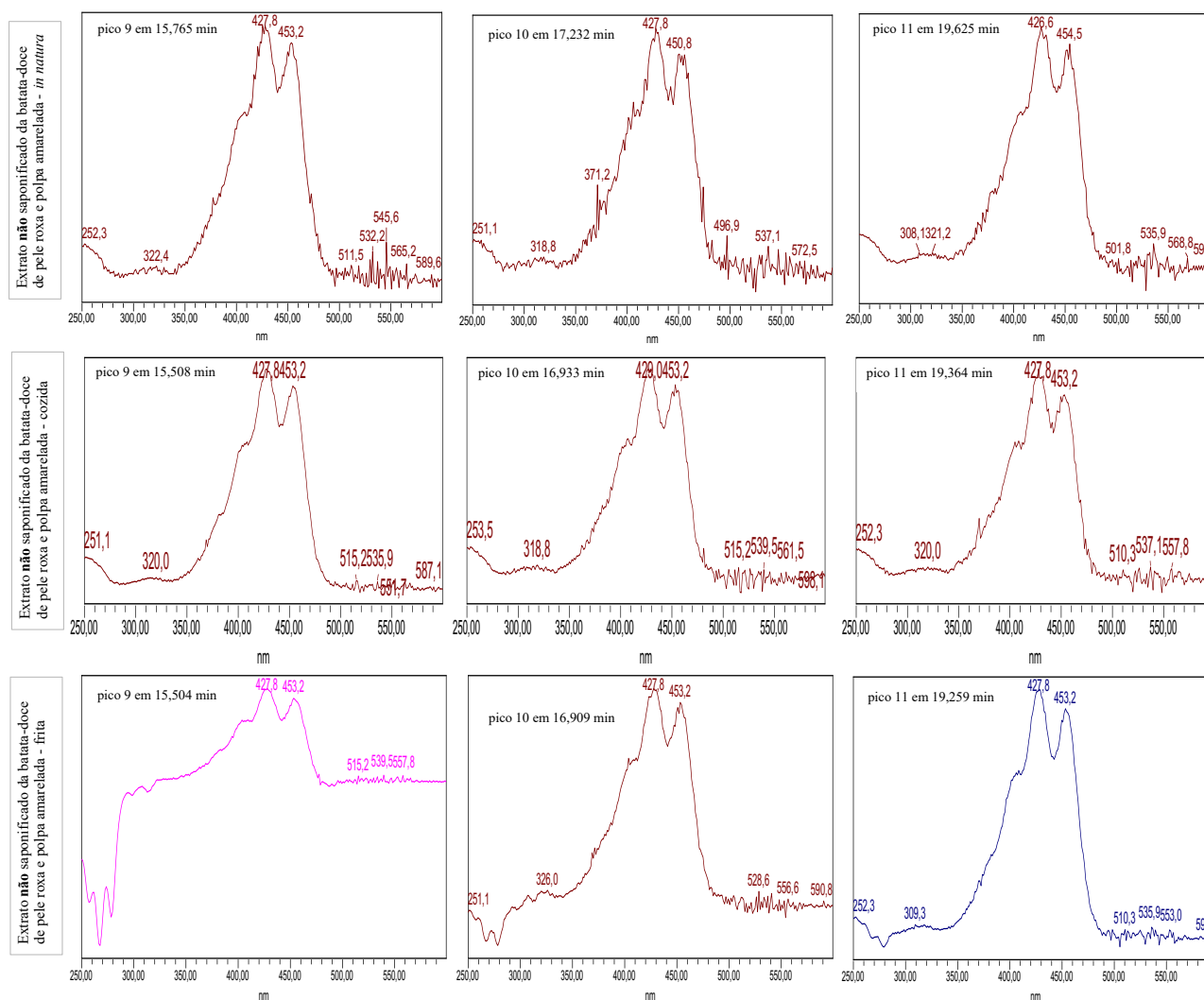


Figura 65 – Espectros de UV/Vis dos picos 9 a 11 de carotenoides não identificados detectados nos extratos não saponificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita.

As Tabelas 35, 36 e 37 do APÊNDICE A mostram os teores de carotenoides totais e também os cálculos para os teores de cada um dos carotenoides nos picos não identificados da batata-doce de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita, respectivamente.

Para simplificar a avaliação nessa variedade e evitar os erros de análise de concentrações muito baixas nos picos minoritários, embora estejam calculados os teores de todos os carotenoides dos picos de 1 a 11, a discussão dos resultados considera apenas o comportamento dos carotenoides majoritários, dos picos 2, 4, 5 e 7 nas Tabelas 38 (*in natura*), 39 (cozida) e 40 (frita) do APÊNDICE A.

Ao contrário do comportamento dos teores de carotenoides totais, já apresentados anteriormente (*in natura*: 2257 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, cozida: 1750 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, frita: 1833 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, com perdas nos processamentos, porém sem diferença significativa entre cozimento e fritura), os teores dos carotenoides dos picos 2 e 7 aumentaram com os processos de cozimento e fritura, com retenções sempre maiores que 100%.

No caso do pico 2, os teores foram de 111, 203 e 298 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS para as batatas-doces *in natura*, cozidas e fritas, respectivamente, significativamente diferentes (Quadro 13 do APÊNDICE A) e com retenções de 220% para o cozimento e 318% para a fritura, também significativamente diferentes (Tabela 41 do APÊNDICE A).

No caso do pico 7, os teores foram de 208, 258 e 320 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS para as batatas-doces *in natura*, cozidas e fritas, respectivamente, com diferenças significativas apenas entre os materiais fritos e *in natura* (Quadro 16 do APÊNDICE A), com retenções de 126% para o cozimento e 156% para a fritura, sem diferenças significativas (Tabela 44 do APÊNDICE A).

Entretanto, como avaliado anteriormente através dos espectros de UV/Vis desses picos, pode ser constatado que, na realidade não houve aumento da concentração desses carotenoides, mas sim o aparecimento de novos carotenoides devido à isomerização, com transformação de ligações duplas conjugadas *trans* em *cis*, nas amostras cozidas e fritas, que co-eluem com os carotenoides originalmente presentes na amostra *in natura*.

Já o comportamento dos picos 4 e 5 foram semelhantes aos carotenoides totais desta variedade de pele roxa e polpa amarela e da cultivar IAPAR 69. No caso do pico 4, os teores foram de 389, 208 e 226 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS para as batatas-doces *in natura*, cozidas e fritas, respectivamente, com perdas sem diferenças significativas nos materiais cozidos e fritos (Quadro 14 do APÊNDICE A) e com retenções de 55% para o cozimento e 59% para a fritura, também sem diferenças significativas (Tabela 42 do APÊNDICE A).

No caso do pico 5, os teores foram de 985, 516 e 462 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS para as batatas-doces *in natura*, cozidas e fritas, respectivamente, com perdas sem diferenças significativas nos materiais cozidos e fritos (Quadro 15 do APÊNDICE A), com retenções de 55% para o cozimento e 50% para a fritura, sem diferenças significativas (Tabela 43 do APÊNDICE A).

Houve degradação com redução dos teores de carotenoides totais nas duas variedades, a de pele roxa e polpa amarela e a IAPAR 69 devido aos processos de cozimento e fritura, sem diferença significativa entre os processos. A cultivar IAPAR 69, com teores de carotenoides muito superiores aos teores da variedade de pele roxa e polpa amarela apresentou degradação mais acentuada, com retenções em torno de 50 % enquanto a de pele roxa e polpa amarela teve retenções em torno de 80%. Isso se deveu à diferença entre os perfis de carotenoides completamente diverso entre elas, mostrando que a IAPAR 69 com o carotenoide majoritário β -catoreno (>90%) está mais susceptível à isomerização térmica, enquanto a outra, com carotenoides provavelmente do tipo xantofilas, são mais resistentes à degradação.

4.7 Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos da polpa e da folha da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela

Na Figura 66 está o cromatograma do extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres na polpa da batata-doce de pele roxa e polpa amarela com apenas um pico de concentração muito baixa referente a um derivado de ácido cinâmico não identificado, já que seu espectro de UV/Vis é semelhante aos espectros de derivados de ácido cinâmico ou cafeico.

O seu espectro de UV/Vis e tR foram comparados aos espectros de UV/Vis e tR's obtidos para padrões de flavonoides e ácidos fenólicos injetados nas mesmas condições apresentados com suas estruturas moleculares nas Figuras 82 a 85. Entretanto, não houve nenhuma coincidência de tR e espectro de UV/Vis, assim não foi possível identificar esse derivado de ácido cinâmico dentre os padrões disponíveis para comparação nesse trabalho.

É esperado que os flavonoides e ácidos fenólicos na polpa de batatas-doces encontrem-se majoritariamente ligados a outras substâncias, por isso não foram observadas grandes quantidades de picos de elevada concentração no extrato de flavonoides e fenólicos livres. Os tipos majoritários de polifenólicos geralmente encontrados em batata-doce são os ácidos clorogênicos, principalmente derivados de ácido cafeico e os diglicosídeos de ácido cafeico (WANG; NIE; ZHU, 2016; ZHAO et al., 2014).

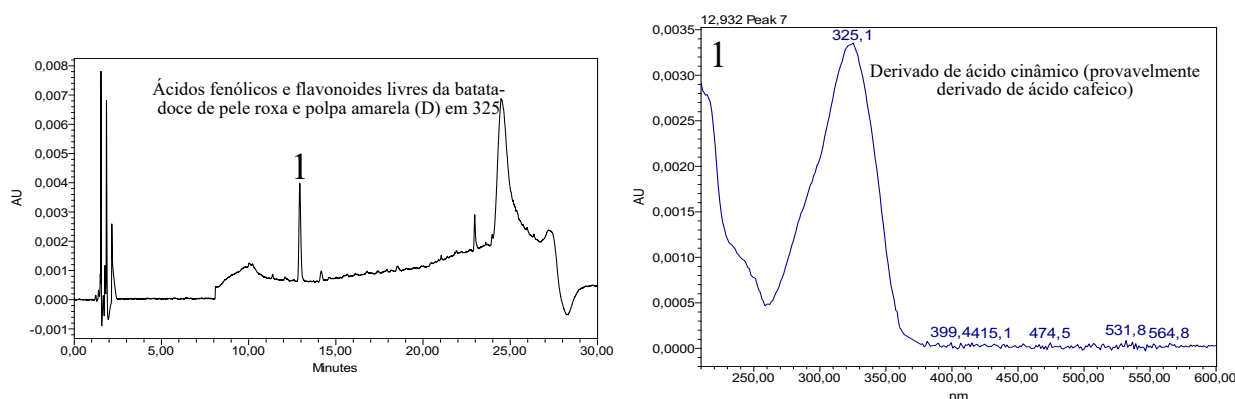


Figura 66 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres em 325 nm da batata doce de pele roxa e polpa amarela - D onde foi observado um derivado de ácido cinâmico (1), provavelmente derivado de ácido cafeico.

Já o extrato de flavonoides e ácidos fenólicos após a hidrólise da batata-doce de pele roxa e polpa amarela apresentou uma maior quantidade de picos (3 picos, chamados 1, 2 e 3), como era esperado e, dessa vez em concentrações mais altas, para os quais foi possível a obtenção de bons espectros de UV/Vis (Figura 67).

Os três picos tiveram seus espectros de UV/Vis e tR's comparados àqueles dos padrões injetados nas mesmas condições (Figuras 68 a 71) e coincidiram com os padrões de ácido cafeico (Pico1) da Figura 68, ácido *p*-cumárico (Pico2) e ácido ferúlico (Pico3) da Figura 69.

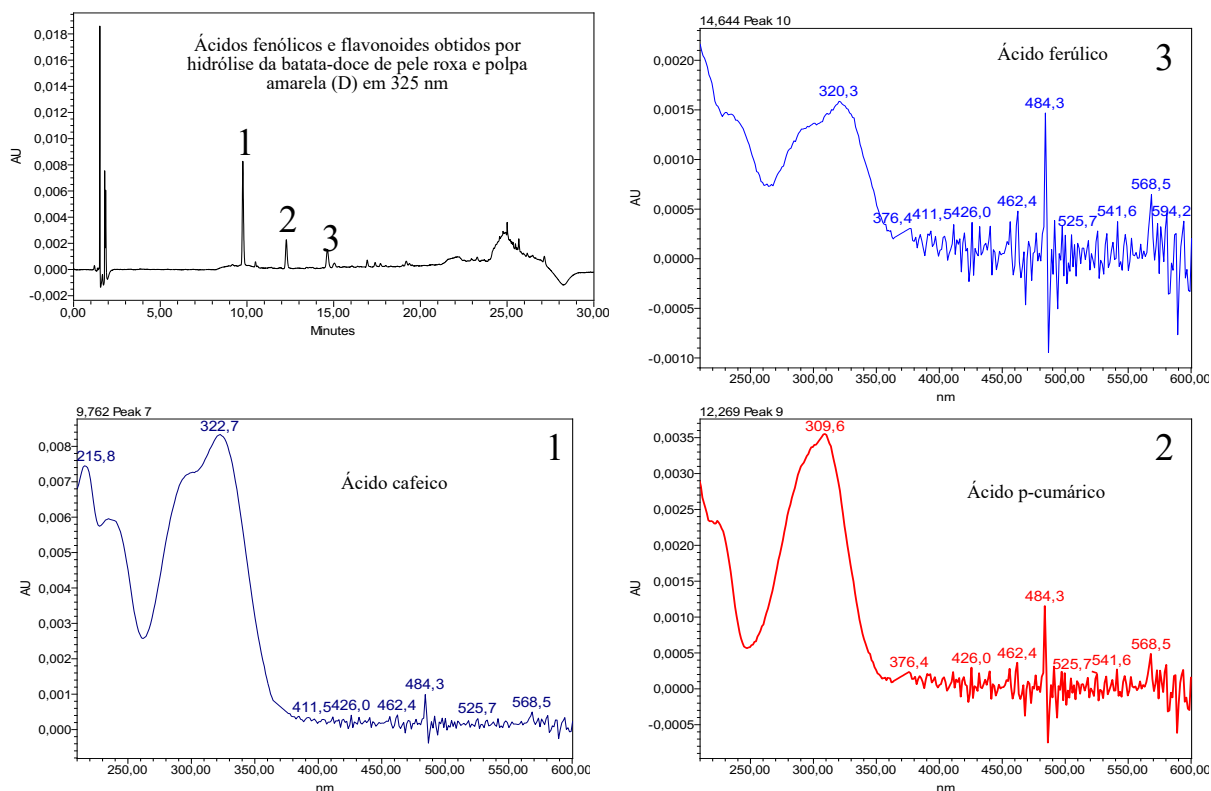


Figura 67 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da batata doce de pele roxa e polpa amarela - D em 325 nm, onde foram observados os ácidos cafeico (1), p-cumárico (2) e ferúlico (3).

Foi possível confirmar, como era esperado, que os ácidos fenólicos na polpa dessa variedade encontram-se ligados a outras substâncias, já que só foram detectados após a hidrólise. Não foi detectado nenhum flavonoide na polpa dessa variedade e, o ácido fenólico majoritário detectado foi o ácido cafeico, tal como esperado.

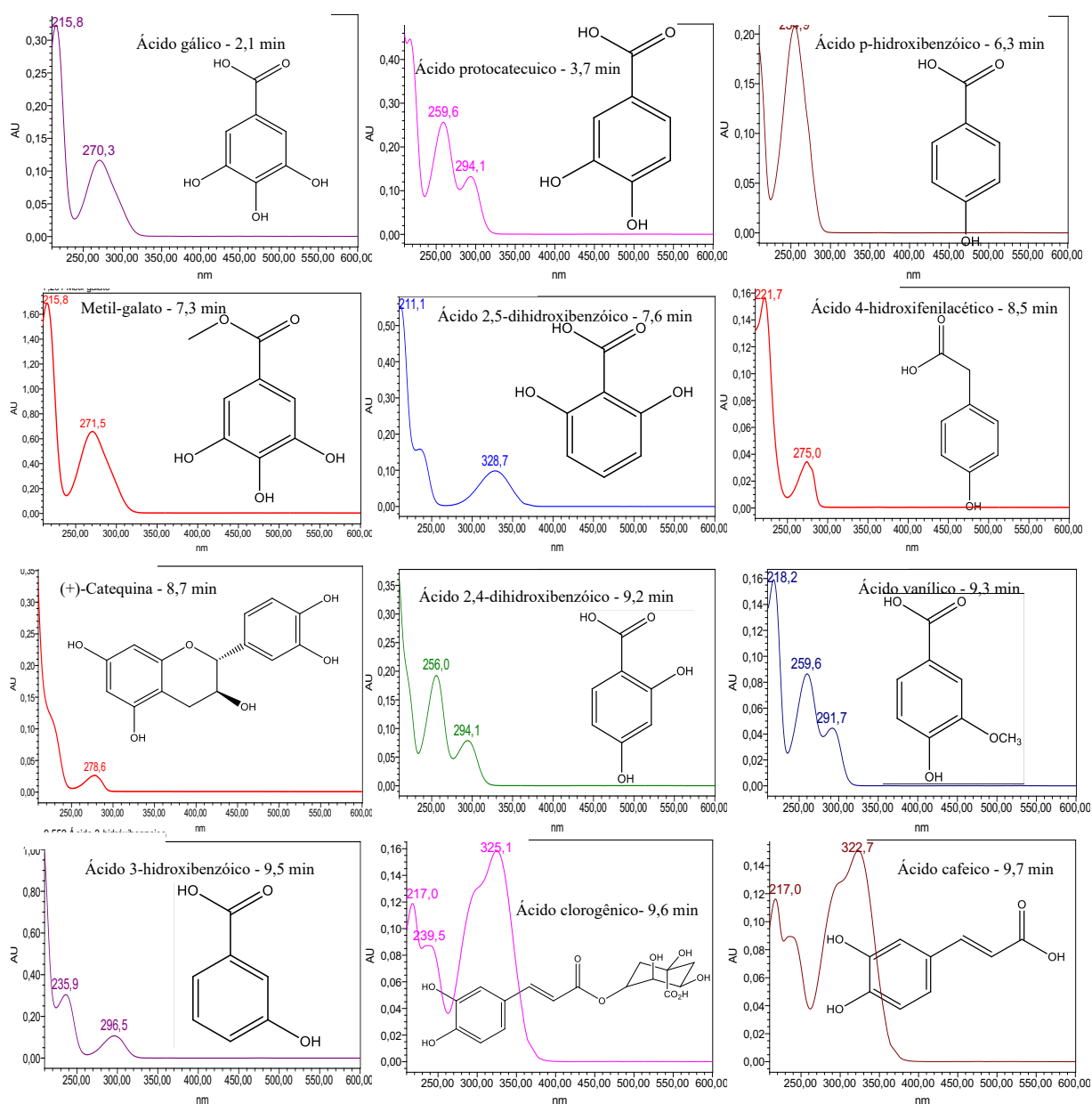


Figura 68 – Tempos de retenção (t_R) em minutos (min), espectros de UV/Vis e estruturas moleculares dos padrões de substâncias fenólicas utilizados para identificação por comparação com as substâncias fenólicas livres e hidrolisadas extraídas das variedades de batatas-doce *in natura* estudadas: Ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzoico, metil-galato, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxifenilacético, catequina, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido 3-hidroxibenzoico, ácido clorogênico e ácido cafeico.

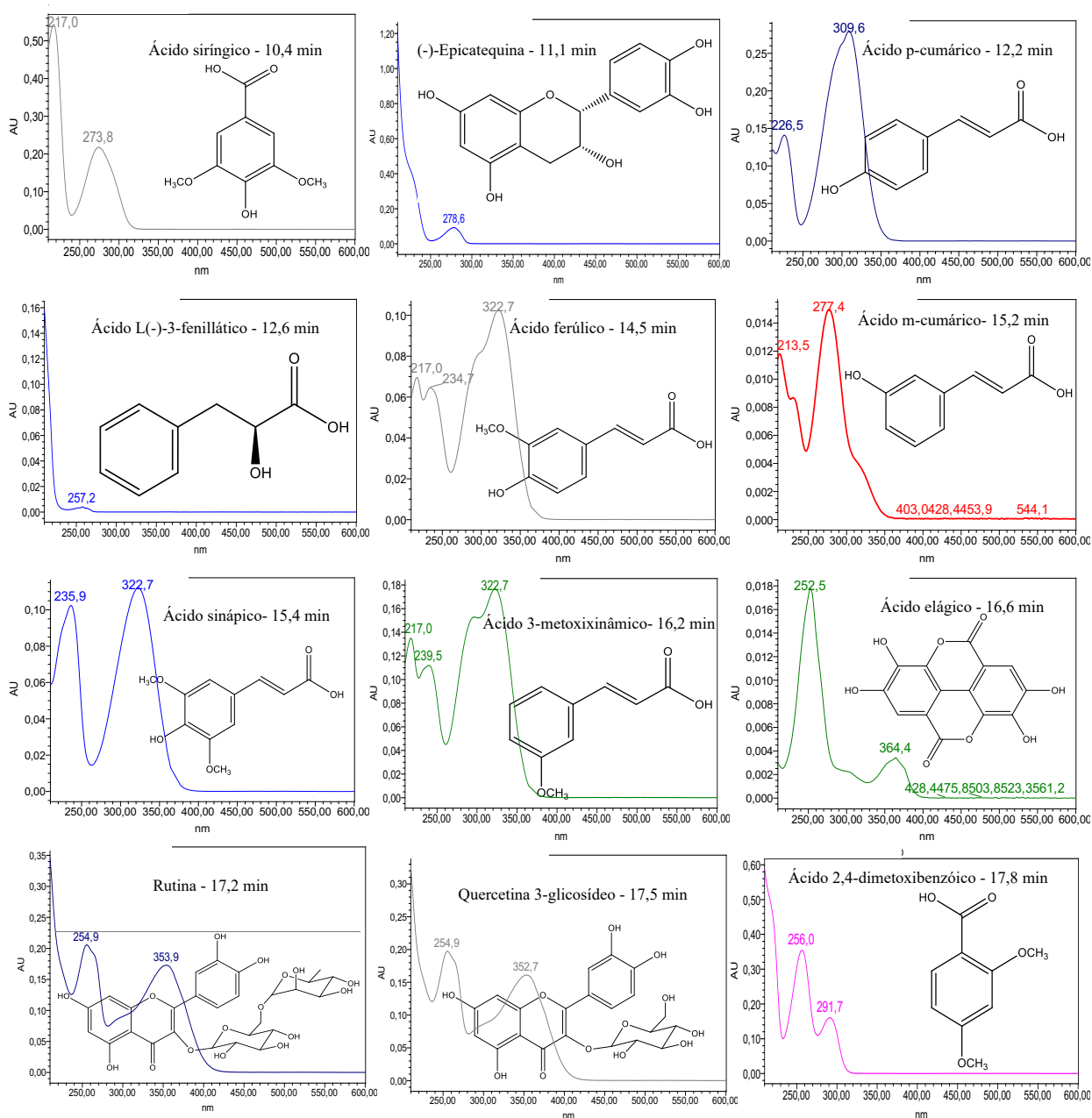


Figura 69 – Tempos de retenção (t_R) em minutos (min), espectros de UV/Vis e estruturas moleculares dos padrões de substâncias fenólicas utilizados para identificação por comparação com as substâncias fenólicas livres e hidrolisadas extraídas das variedades de batatas-doce *in natura* estudadas: Ácido siríngico, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido 3-fenilático, ácido ferúlico, ácido m-cumárico, ácido sinápico, ácido 3-metoxicinâmico, ácido elágico, rutina, quercetina 3-glicosídeo e ácido 2,4-dimetoxibenzoico.

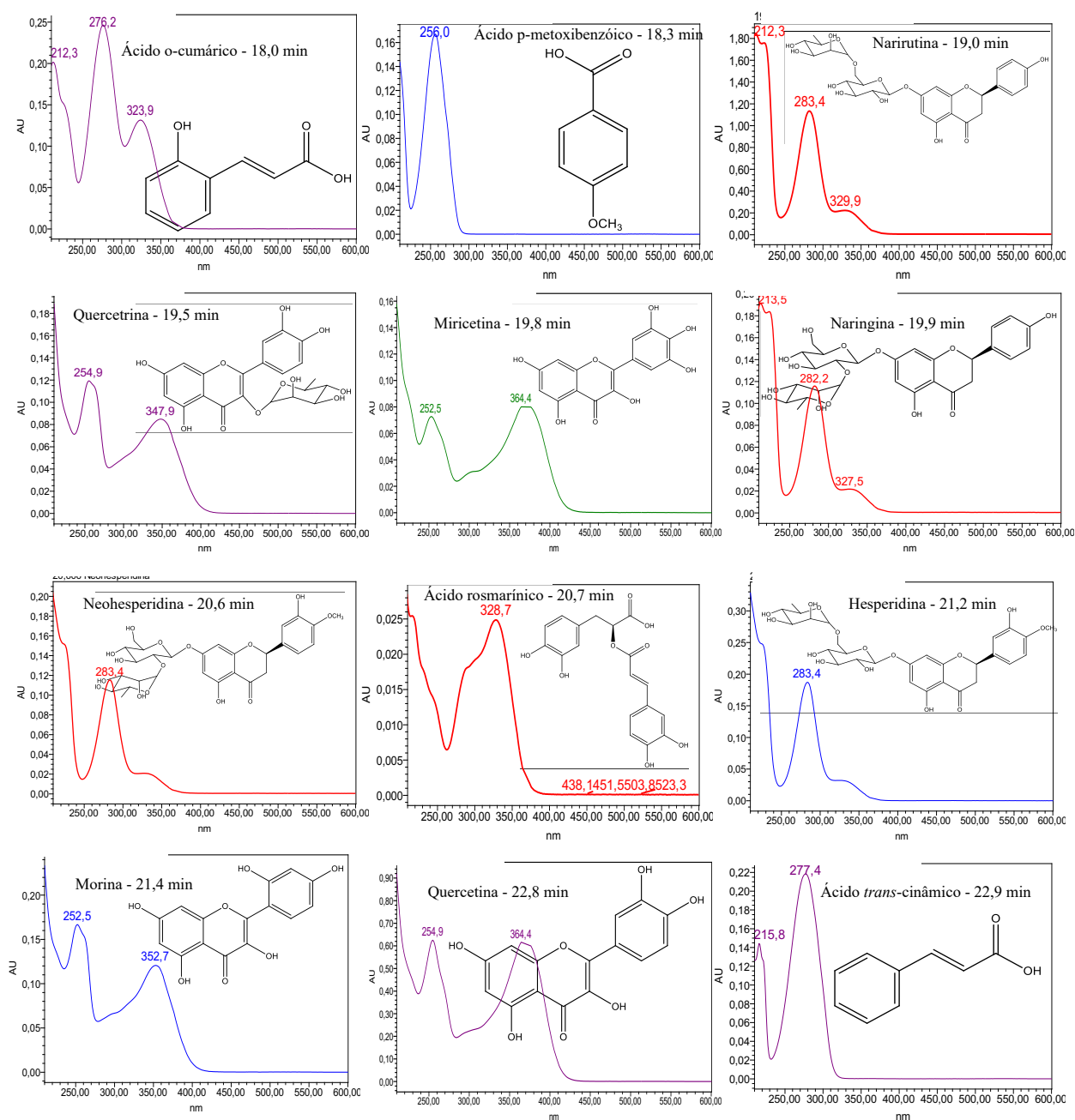


Figura 70 – Tempos de retenção (t_R) em minutos (min), espectros de UV/Vis e estruturas moleculares dos padrões de substâncias fenólicas utilizados para identificação por comparação com as substâncias fenólicas livres e hidrolisadas extraídas das variedades de batatas-doce *in natura* estudadas: Ácido o-cumárico, ácido p-metoxibenzoico, narirutina, quercetrina, miricetina, naringina, neohesperidina, ácido rosmarínico, hesperidina, morina, quercetina e ácido *trans*-cinâmico.

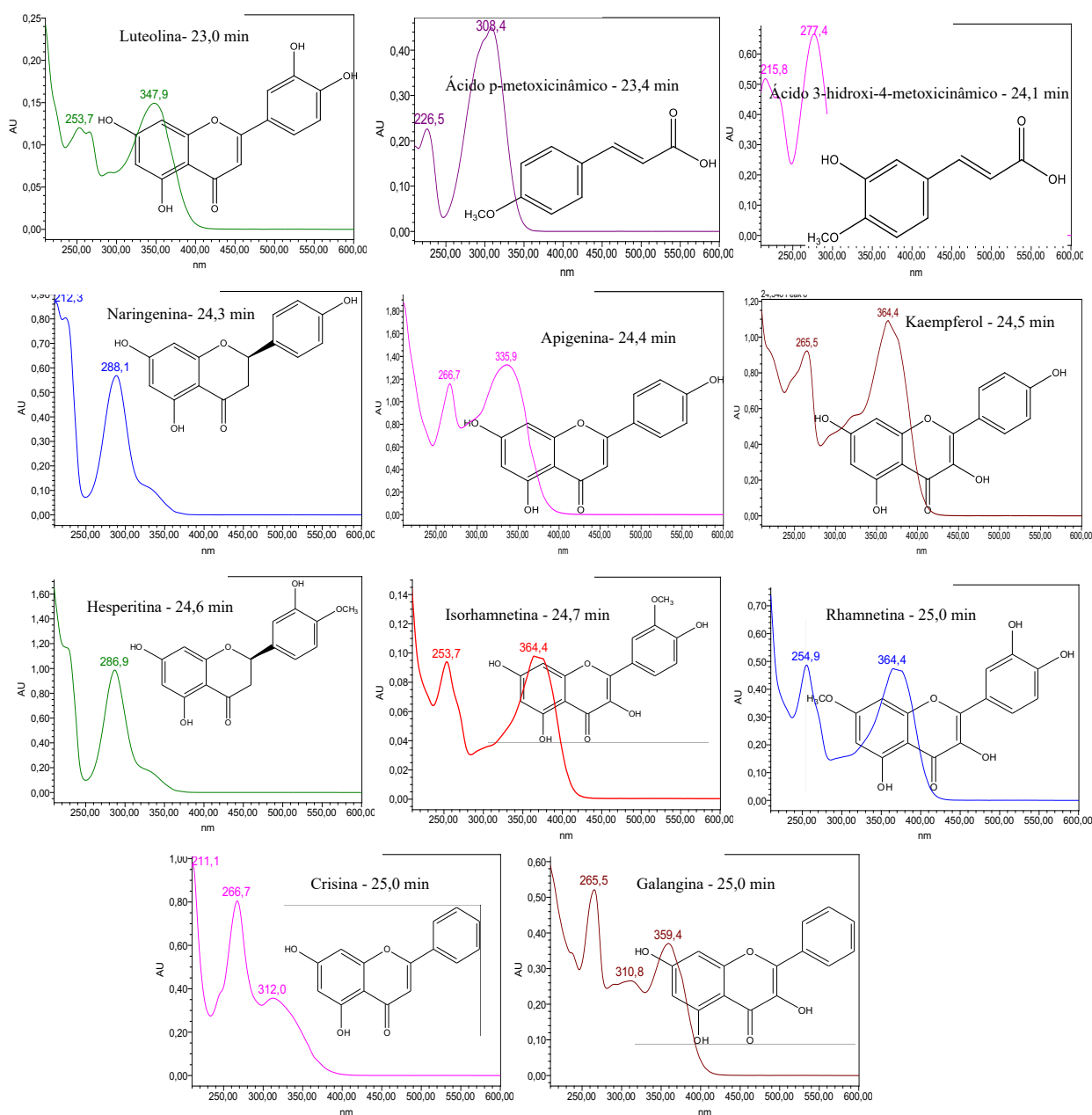


Figura 71 – Tempos de retenção (t_R) em minutos (min), espectros de UV/Vis e estruturas moleculares dos padrões de substâncias fenólicas utilizados para identificação por comparação com as substâncias fenólicas livres e hidrolisadas extraídas das variedades de batatas-doce *in natura* estudadas: Luteolina, ácido p-metoxicinâmico, ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico, naringenina, apigenina, kaempferol, hesperitina, isorhamnetina, rhamnetina, crisina e galangina.

O extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres na folha da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela, diferente da polpa, apresentou uma grande quantidade de picos bem concentrados (11 Picos) em seu cromatograma para os quais foi possível obter bons espectros de UV/Vis (Figura 72).

Através da comparação dos t_R 's e dos espectros de UV/Vis desses picos com aqueles obtidos para os padrões apresentados nas Figuras 68 a 71 foi possível identificar alguns

flavonoides e ácidos fenólicos como os ácidos protocatecúico (Pico 1) e clorogênico (Pico 4), rutina (Pico 8) e isoquercetrina (Pico 9). O ácido clorogênico (Pico 4) estava presente em grande proporção e os majoritários (Picos 10 e 11) não foram identificados assim como outros picos minoritários com espectros que indicam que a maioria é derivada de ácido cafeico e o Pico 3 derivado de ácido fenólico.

Era esperado que o extrato das folhas fosse mais rico em flavonoides e ácidos fenólicos livres, quando comparado ao extrato das polpas. Espera-se majoritariamente ácidos clorogênicos, derivados de ácido cafeico, quercetina, miricetina, kaempferol e luteolina, com quantidades mais altas nas folhas das variedades de polpa roxa (WANG; NIE; ZHU, 2016, ZHAO et al., 2014).

Já o extrato hidrolisado da folha dessa variedade (Figura 73) apresentou uma grande quantidade de ácido cafeico (Pico 7), o majoritário, entre outros como os ácidos hidroxibenzóico (Pico 2), *p*-cumárico (Pico 11), ferúlico (Pico 13) e muitos derivados de ácido cinâmico e outras substâncias com espectros característicos de ácidos fenólicos, que não foram identificados quando comparados com os padrões das Figuras 68 a 71.

Zheng e Clifford (2008) e outros autores (ZHAO et al., 2014) já haviam comprovado em batatas-doces cultivadas na China e na Tanzânia, que entre os ácidos clorogênicos, estavam presentes em grandes quantidades nas folhas e nos talos, majoritariamente os derivados de cafeico (cafeoilquínicos) que eram os únicos tipos presentes nos talos e não eram encontrados na polpa.

Nessa variedade de batata-doce de pele roxa e polpa amarela, que não possui antocianinas em sua polpa, pela presença de quantidades muito pequenas de ácidos fenólicos na polpa hidrolisada, praticamente sem ácidos fenólicos livres na polpa, suspeita-se que estes ácidos estejam originalmente presentes na forma de glicosídeos. Tanto na folha quanto na polpa hidrolisadas o ácido fenólico majoritário é o cafeico.

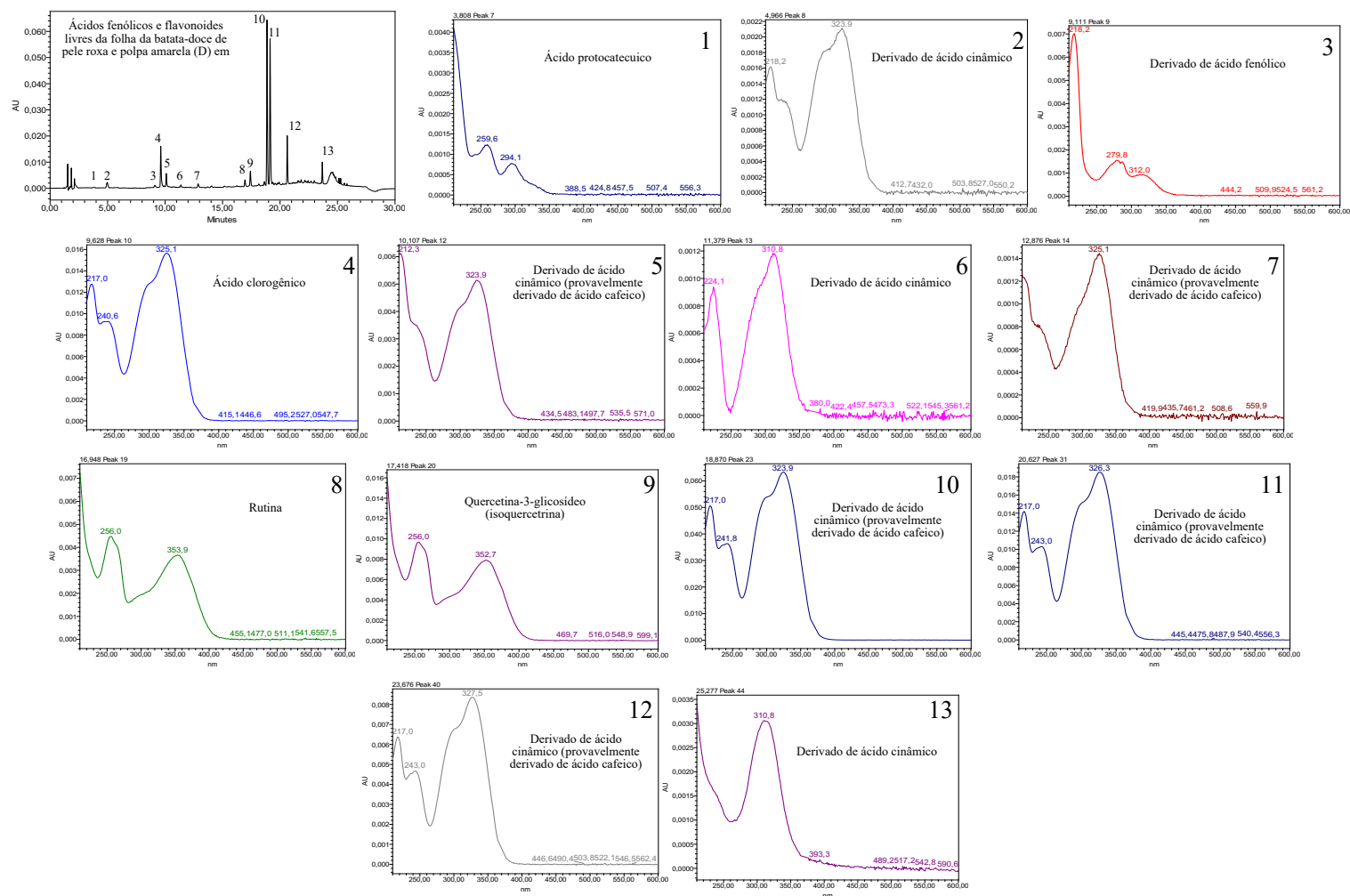


Figura 72 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de ácidos fenólicos e flavonoides livres da folha da batata doce de pele roxa e polpa amarela - D em 325 nm onde foram observados: ácido protocatecuico (1), derivado de ácido fenólico (3), derivados de ácido cinâmico (2, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13), ácido clorogênico (4), rutina (8), isoquercetrina (9).

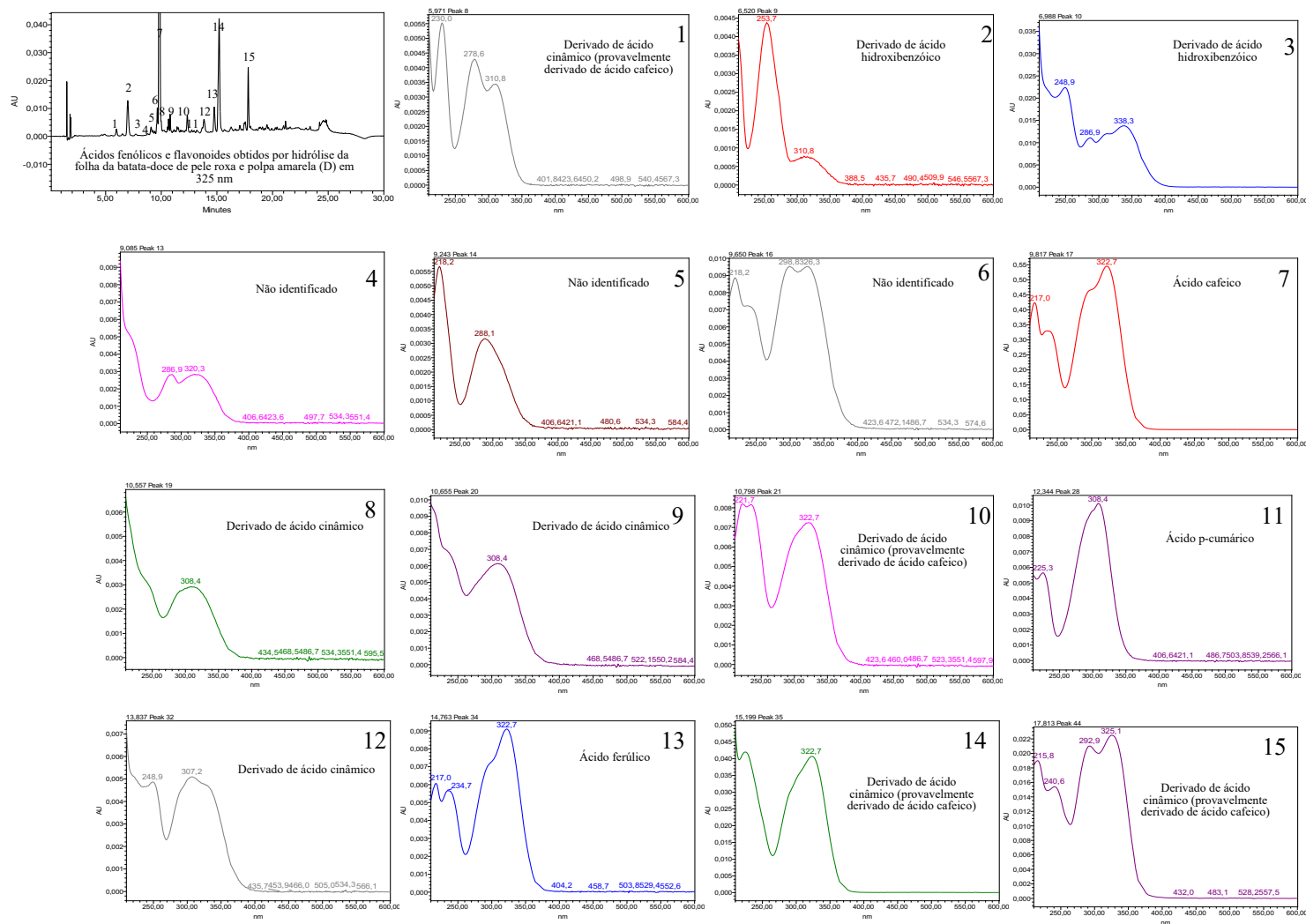


Figura 73 – Cromatogramas e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da folha da batata doce de pele roxa e polpa amarela - D em 325 nm onde foram observados derivados de ácido cinâmico (1, 8, 9, 10, 12, 14 e 15), derivados de ácido hidroxibenzóico (2 e 3), desconhecidos (4, 5, 6), ácido cafeico (7), ácido p-cumárico (11) e ácido ferúlico

4.8 Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos da polpa e da folha da batata-doce da variedade de pele branca e polpa roxa

A variedade de batata-doce de pele branca e polpa roxa, como na variedade descrita anteriormente, apresentou extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres muito pobre (Figura 74), com apenas dois picos (Pico 1 e 2) para os quais foi possível obtenção de bons espectros de UV/Vis característicos de derivados de ácido cinâmico que quando comparados com os padrões (Figuras 68 a 71) não foi possível a identificação já que, não coincidem em tR's e nem em espectros UV/Vis.

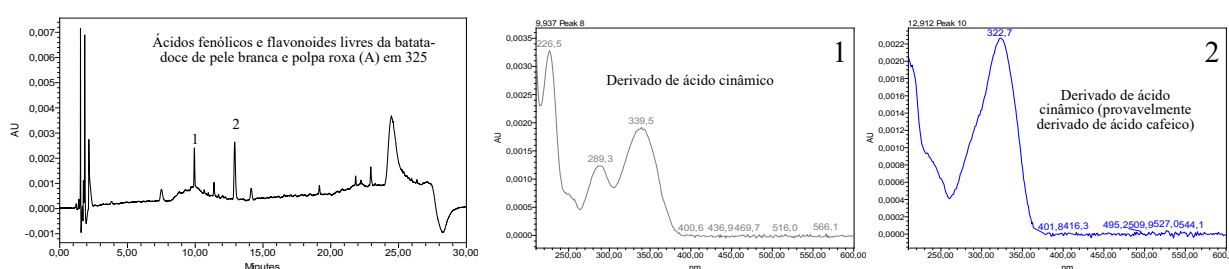


Figura 74 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres em 325 nm da batata doce de pele branca e polpa roxa - A onde foram observados dois derivados de ácido cinâmico (1 e 2), um deles provavelmente derivado de ácido cafeico (2).

O extrato hidrolisado de flavonoides e ácidos fenólicos da batata-doce da variedade de pele branca e polpa roxa (Figura 75) também apresentou majoritariamente ácido cafeico e também foi possível identificar os ácidos *p*-cumárico e ferúlico com quantidades menores e outros ácidos minoritários com quantidades bem inferiores e espectros de derivados de ácido cinâmico, muito semelhantes ao espectro de UV/Vis do ácido cafeico. O extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres da folha da variedade de pele branca e polpa roxa (Figura 76), quando comparados aos padrões (Figuras 68 a 71), tiveram o ácido clorogênico (Pico2), rutina (Pico 6) e isoquercetrina (Pico 7) identificados.

Os demais picos, incluindo os majoritários (Picos 9 e 10) apresentaram características de derivados de ácido cafeico ou flavonoides, porém não puderam ser identificados.

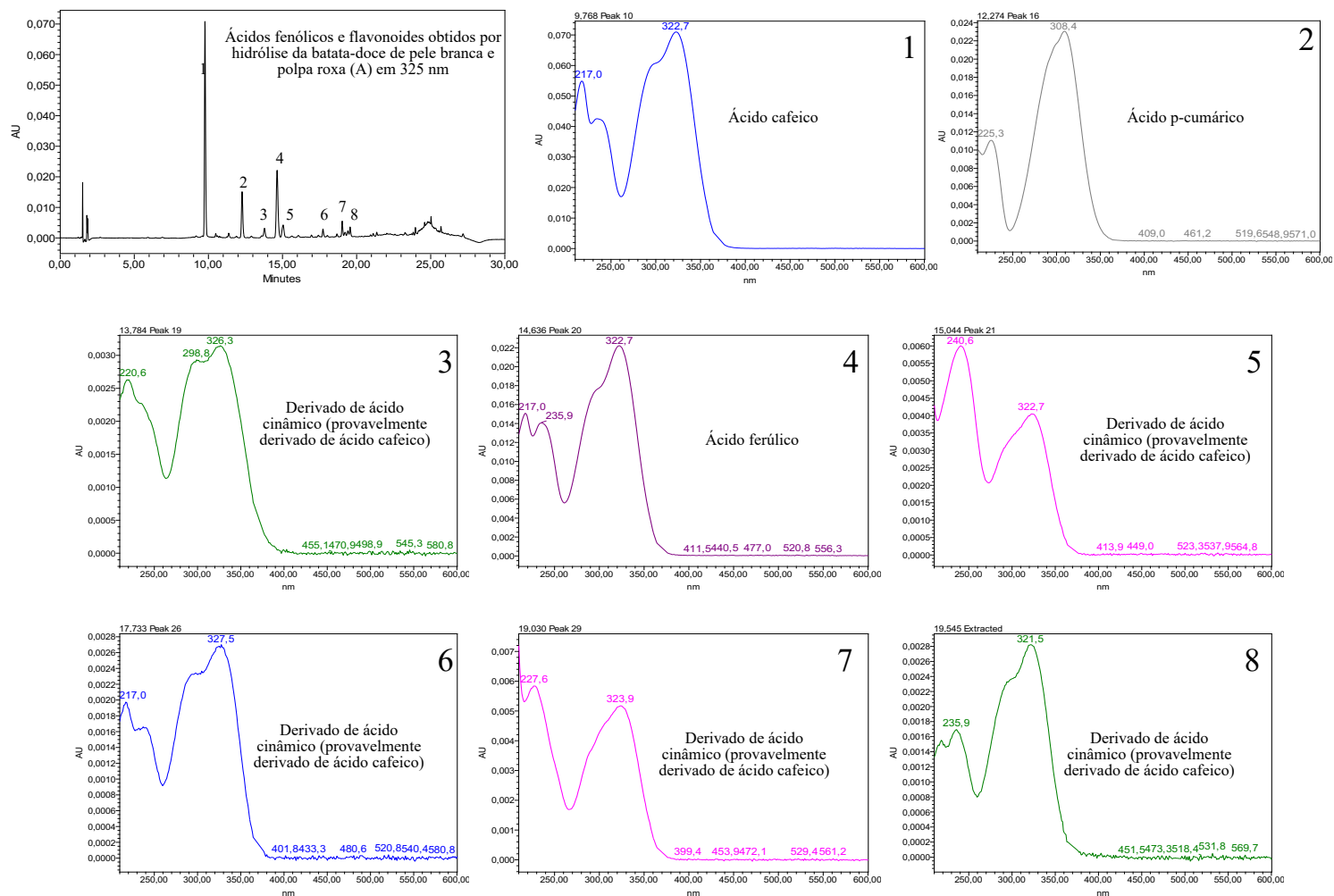


Figura 75 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da batata doce de pele branca e polpa roxa - A em 325 nm onde foram observados ácido cafeico (1), ácido p-cumárico (2), derivados de ácido cinâmico, provavelmente de cafeico (3, 5, 6, 7 e 8) e ácido ferúlico (4)

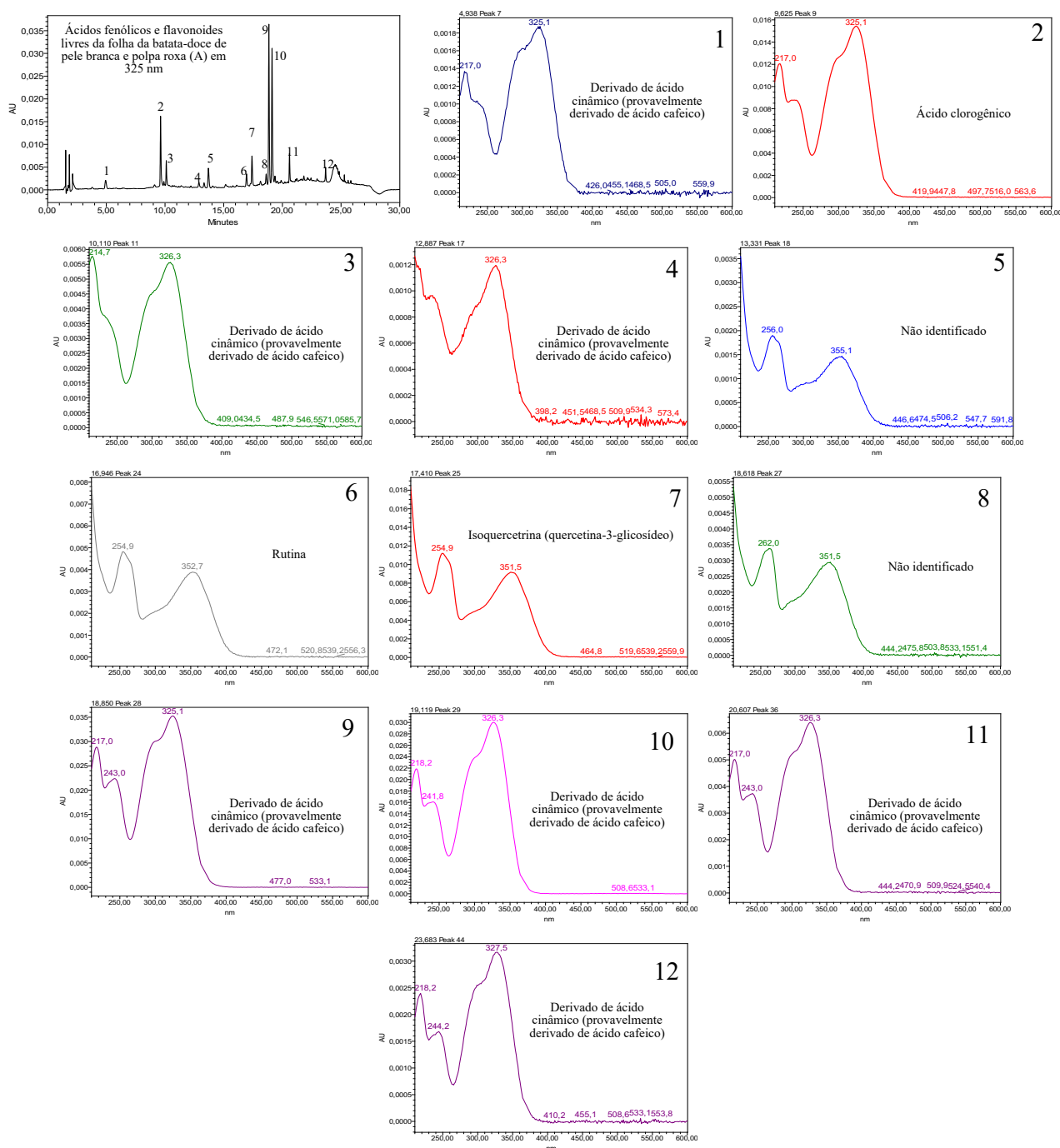


Figura 76 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de ácidos fenólicos e flavonoides livres da folha da batata doce de pele branca e polpa roxa - A em 325 nm onde foram observados derivados de ácido cinâmico, provavelmente de ácido cafeico (1, 3, 4, 9, 10, 11 e 12), ácido clorogênico (3), flavonoides não identificados (5 e 8), rutina (6) e isoquercetrina (7).

O extrato de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise das folhas da batata-doce de pele branca e polpa roxa, como na variedade anterior (pele roxa e polpa amarela) resultou em um cromatograma (Figura 77) onde o pico majoritário, presente numa quantidade muito mais

alta, foi o ácido cafeico (Pico 6). Embora também foram detectados os picos dos ácidos p-hidroxibenzóico (Pico 2), p-cumárico (Pico 9), ferúlico (Pico 10) e da isoquercetrina (Pico 12) entre outros derivados de ácido cafeico, em quantidades bem menores. Quantidades maiores de ácidos fenólicos e flavonoides são esperados em variedades de polpa roxa em comparação as demais variedades como ocorreu nessa variedade quando comparada a anterior (WANG; NIE; ZHU, 2016; ZHENG; CLIFFORD, 2008).

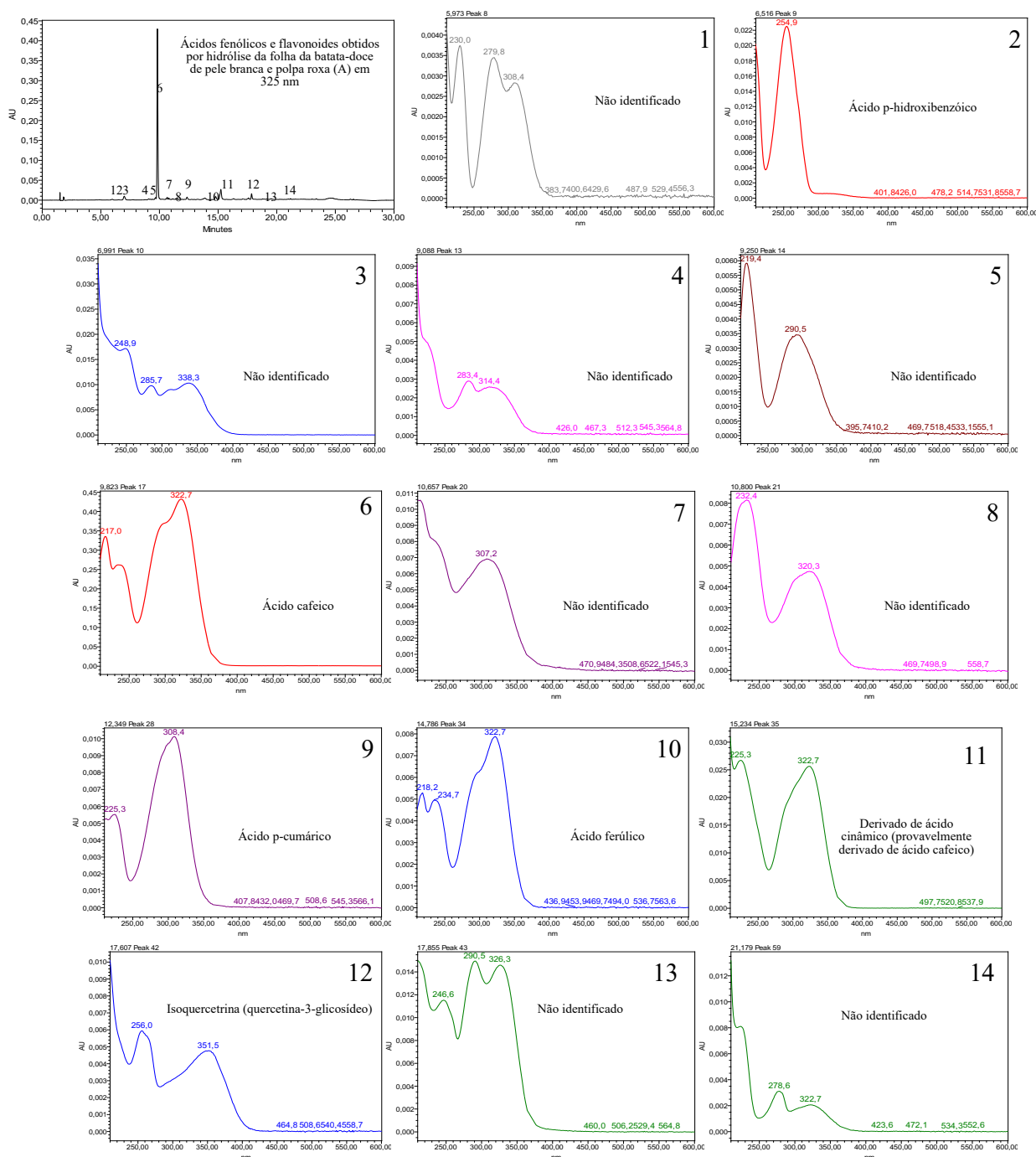


Figura 77 – Cromatogramas e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da folha da batata doce de pele branca e polpa roxa - A em 325 nm onde foram observados flavonoides ou ácidos fenólicos não

identificados (1, 3, 4, 5, 7, 8, 13 e 14), ácido p-hidroxibenzóico (2), ácido cafeico (6), ácido p-cumárico (9), ácido ferúlico (10) e isoquercetrina (12).

Em relação às quantidades encontradas na polpa da variedade anterior (pele roxa e polpa amarela), foram encontradas maiores quantidades de ácidos fenólicos e maior diversidade também e, como as quantidades foram muito maiores na polpa hidrolisada, que é rica em antocianina, espera-se que esses ácidos estejam ligados nas moléculas das antocianinas e não apenas na forma de glicosídeos. Assim como na variedade anterior, o ácido fenólico majoritário tanto na polpa quanto na folha hidrolisada é o ácido cafeico.

4.9 Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos da polpa e da folha da batata-doce da variedade de pele e polpa roxas

O extrato da batata-doce da variedade de pele e polpa roxas (Figura 78), assim como nas variedades anteriores (pele roxa e polpa amarela e pele branca e polpa roxa) apresentou um pico (Pico 1) com pequena quantidade de um derivado de ácido cinâmico, provavelmente ácido cafeico, que não foi possível ser identificado já que seu tR e espectro não coincidiram com nenhum dos padrões apresentados nas Figuras 68 a 71.

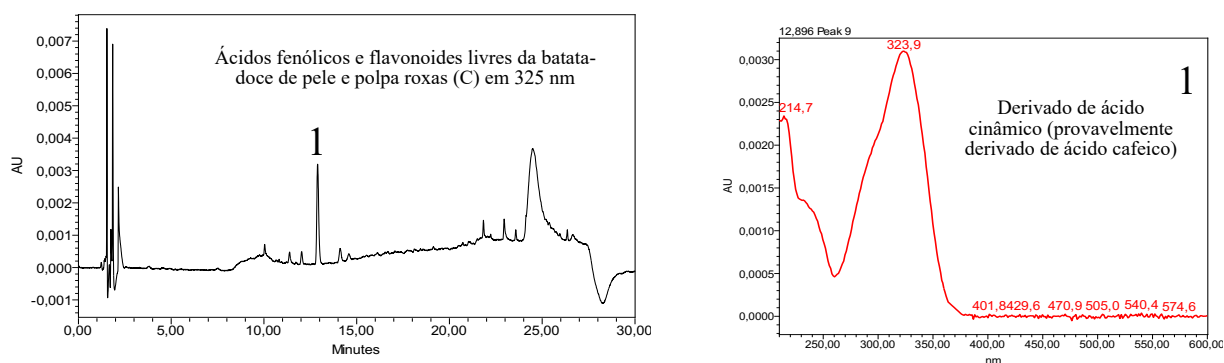


Figura 78 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres em 325 nm da batata doce de pele e polpa roxas - C onde foi observado um derivado de ácido cinâmico (1), provavelmente derivado de ácido cafeico (2).

O cromatograma do extrato de flavonoides e ácidos fenólicos obtidos por hidrólise da batata-doce de pele e polpa roxas (Figura 79), assim como as demais variedades já apresentadas anteriormente, apresentou muitos picos, onde os majoritários foram identificados, como o ácido cafeico (Pico 1) e o ácido ferúlico (Pico 5) entre outros minoritários como o ácido *p*-cumárico (Pico 3) e muitos não identificados quando comparados aos padrões (Figuras 68 a 71). Uma característica marcante e que diferencia essa variedade das demais foi a grande quantidade de ácido ferúlico após a hidrólise, que é uma característica da presença de substâncias, como por exemplo antocianinas ligadas a este ácido.

O extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres das folhas da batata-doce da variedade de pele e polpa roxas (Figura 80) apresentou ácidos fenólicos, provavelmente derivados de ácido cafeico entre os picos majoritários (Picos 3 e 4) e os minoritários, porém não foram identificados, já que seus tR's e espectros de UV/Vis não coincidiram com aqueles dos padrões

das Figuras 68 a 71. O ácido clorogênico foi identificado em um dos picos minoritários (Pico 1).

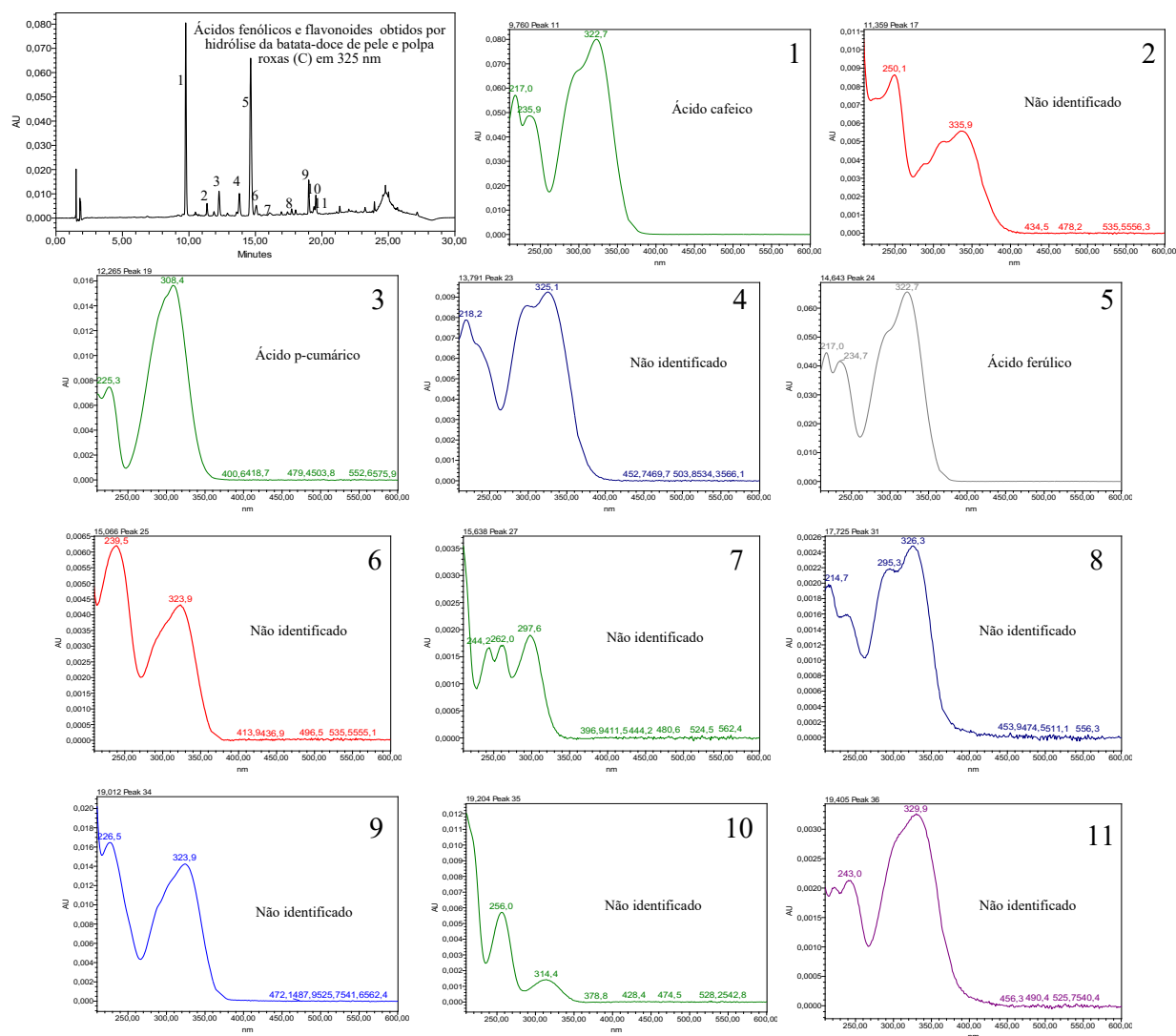


Figura 79 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da batata doce de pele e polpa roxas - C em 325 nm onde foram observados ácido cafeico (1), ácido p-cumárico (3), ácido ferúlico (5) e outros picos não identificados, provavelmente derivados de ácido cinâmico ou flavonoides (2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

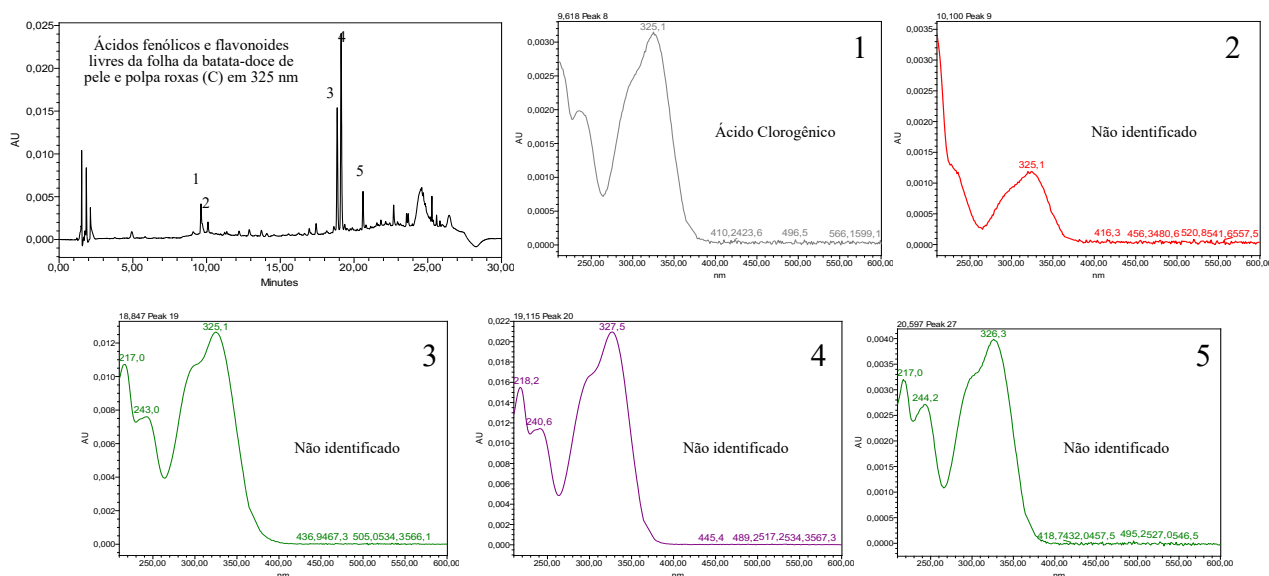


Figura 80 – Cromatograma e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD no extrato de ácidos fenólicos e flavonoides livres da folha da batata doce de pele e polpa roxas - C em 325 nm onde foram observados ácido clorogênico (3) e picos não identificados, derivados de ácido cinâmico, provavelmente de ácido cafeico (2, 3, 4 e 5).

Já o extrato de flavonoides e ácidos fenólicos obtidos após a hidrólise da folha da batata-doce da variedade de pele e polpa roxas (Figura 81) apresentou alta quantidade do pico majoritário ácido cafeico (Pico 2) assim como nas demais variedades já apresentadas anteriormente e os picos minoritários do ácido *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, ferúlico entre outros não identificados quando comparados aos padrões nas Figuras 68 a 71.

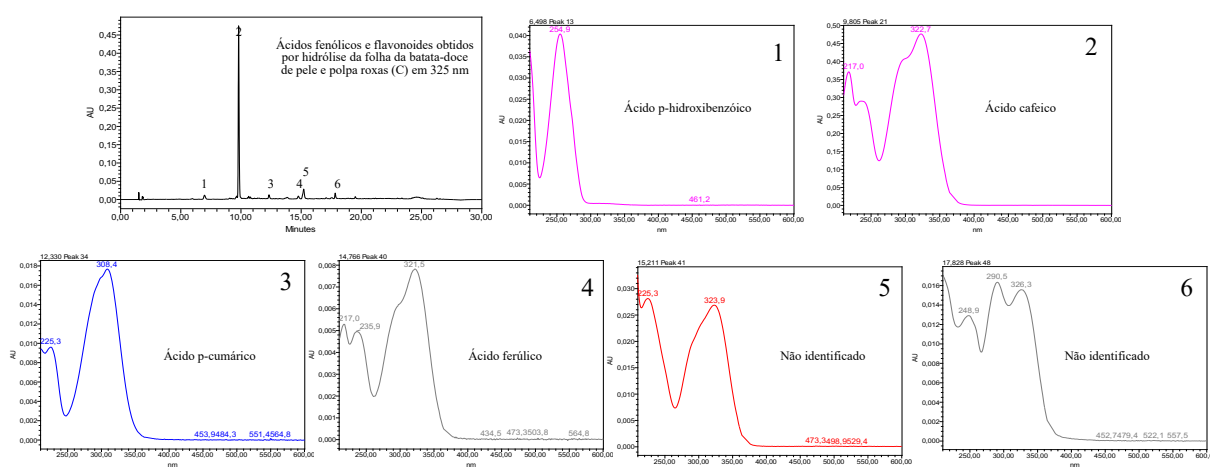


Figura 81 – Cromatogramas e espectros de UV/Vis dos picos obtidos por CLAE-DAD nos extratos de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da folha da batata doce de pele e polpa roxas - C em 325 nm onde foram observados ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido cafeico (2), ácido *p*-cumárico (3), ácido ferúlico (4) e flavonoides ou ácidos fenólicos não identificados (5 e 6).

A presença dos ácidos fenólicos derivados de cinâmico, clorogênico e benzoico nos extratos obtidos após a hidrólise são evidências de que esses ácidos estavam ligados a outras moléculas presentes na matriz incluindo as antocianinas aciladas das variedades de polpa roxas, que serão investigadas mais profundamente ainda neste trabalho. A análise dos ácidos fenólicos e flavonoides aqui apresentadas fornecem informações importantes para a identificação das antocianinas, já que indicam que provavelmente serão encontradas antocianinas aciladas principalmente com os ácidos cafeico, majoritariamente encontrado após hidrólise nas variedades de batata-doce de polpas roxas. Sendo que, nesta variedade de pele e polpa roxas, o ácido ferúlico também está presente em quantidade equivalente ao ácido cafeico, portanto, espera-se para esta variedade uma grande quantidade de antocianinas aciladas com ácido ferúlico.

4.10 Identificação de flavonoides e ácidos fenólicos da polpa e da folha da batata-doce da variedade IAPAR 69

O extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres da batata-doce da cultivar IAPAR 69 (Figura 82) apresentou uma quantidade muito baixa de apenas um pico de derivado de ácido cafeico no qual foi possível obtenção de um bom espectro de UV/Vis que não foi identificado quando comparado aos padrões apresentados nas Figuras 68 a 71.

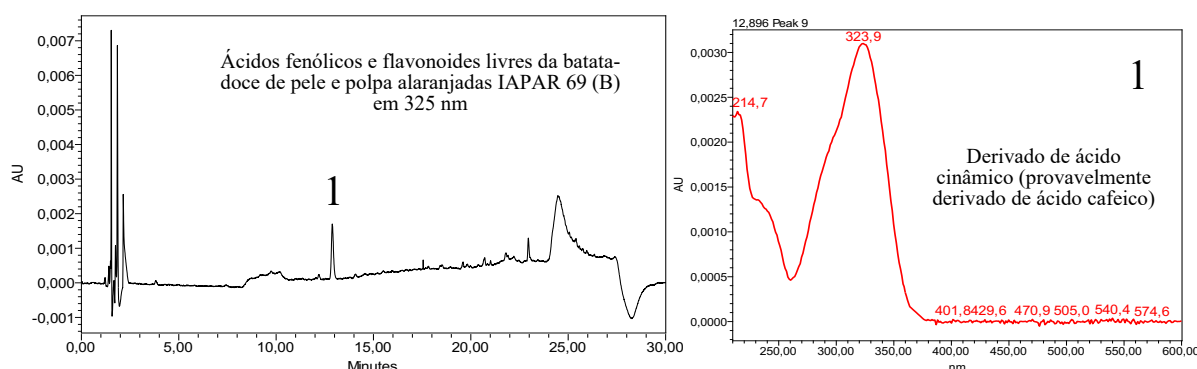


Figura 82 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres em 325 nm da batata doce de pele e polpa alaranjadas IAPAR 69 - B onde foi observado um derivado de ácido cinâmico (1), provavelmente derivado de ácido cafeico.

O extrato de flavonoides e ácidos fenólicos obtidos após a hidrólise da batata-doce dessa cultivar (Figura 83) apresentou como picos majoritários o ácido cafeico (Pico 1) e o ácido *p*-cumárico (Pico 2) quando comparados aos padrões (Figuras 68 a 71).

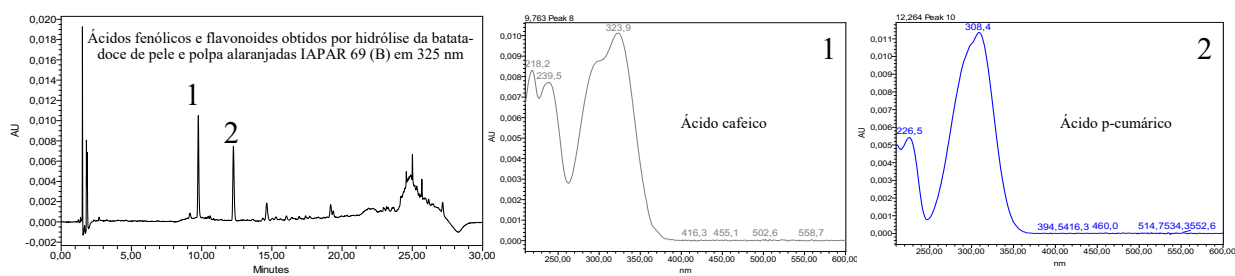


Figura 83 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos após hidrólise da batata doce de pele e polpa alaranjadas IAPAR 69 (B) em 325 nm onde foram observados os ácidos cafeico (1) e p-cumárico (2).

O extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres da folha da batata-doce da cultivar IAPAR 69 (Figura 84) com altas concentrações quando comparado com o extrato da polpa, apresentou o ácido clorogênico (Pico 1), rutina (Pico 3), isoquercetrina (Pico 4) entre outros picos minoritários e majoritários que não foram identificados quando comparados aos padrões (Figuras 68 a 71).

O extrato de flavonoides e ácidos fenólicos obtidos após a hidrólise da folha da batata-doce dessa cultivar (Figura 85) apresentou como pico majoritário alta concentração do ácido cafeico (Pico 1) e, entre os minoritários, em quantidades bem inferiores os ácidos *p*-cumárico (Pico 2), ferúlico (Pico 3), 3-hidroxi-4-metoxicinâmico (Pico 5) entre outros ácidos derivados de cafeico e flavonoides, quando comparados aos padrões (Figuras 68 a 71).

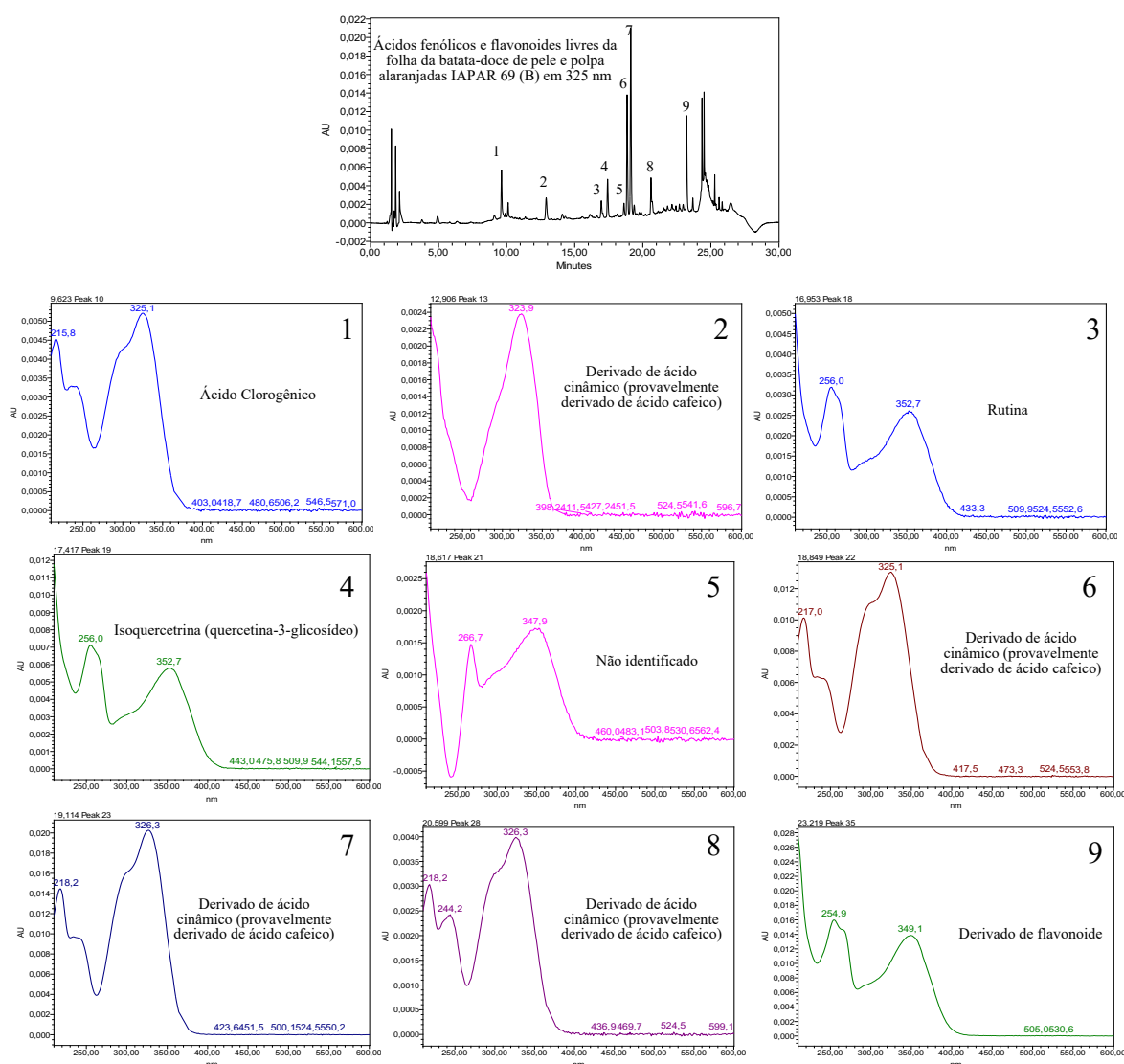


Figura 84 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos livres da folha da batata doce de pele e polpa alaranjadas IAPAR 69 - B em 325 nm onde foram observados os ácidos clorogênico (1), substâncias não identificadas que parecem ser derivadas de ácido cinâmico ou derivadas de flavonoides (2, 5, 6, 7, 8 e 9), rutina (3) e isoquercetrina (4).

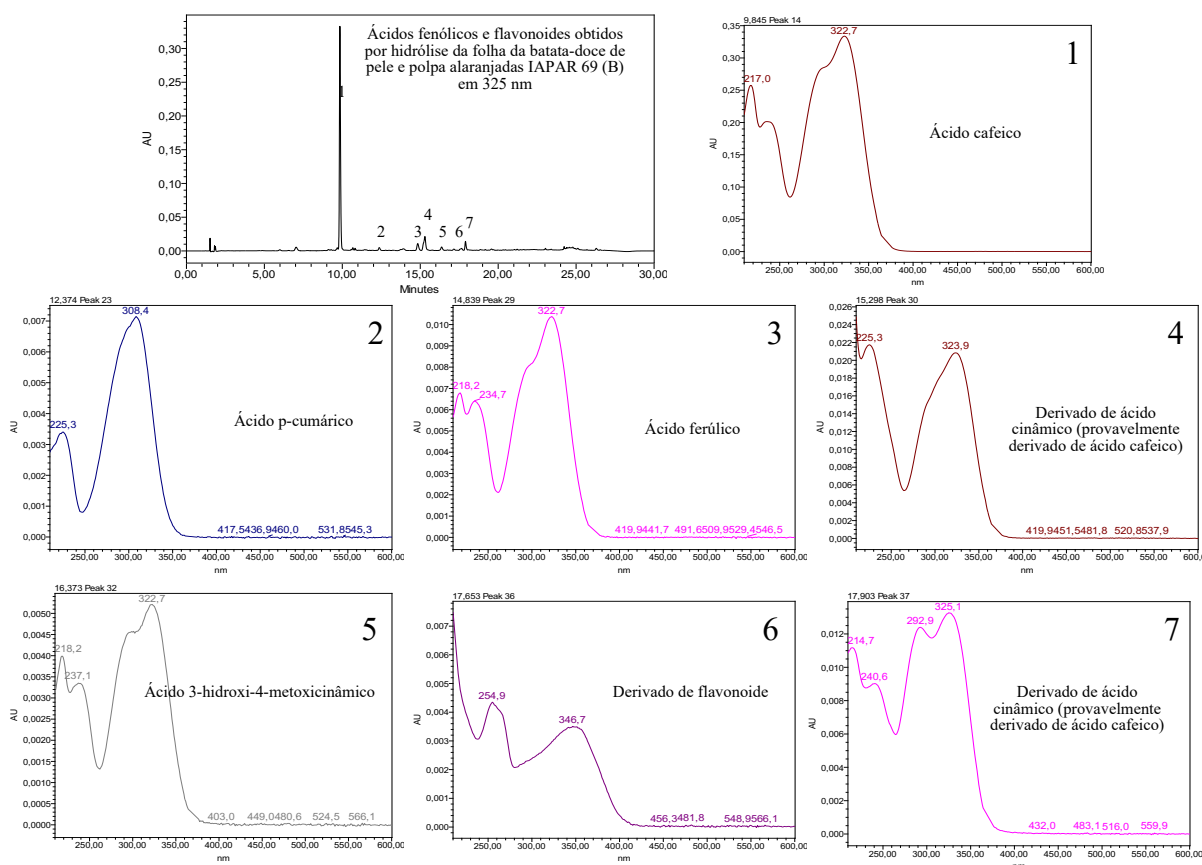


Figura 85 – Cromatograma e espectro de UV/Vis do pico obtido por CLAE-DAD no extrato de flavonoides e ácidos fenólicos obtidos por hidrólise da folha da batata doce de pele e polpa alaranjadas IAPAR 69 - B em 325 nm onde foram observados os ácidos cafeico (1), *p*-cumárico (2), ferúlico (3), 3-hidroxi-4-metoxicinâmico e substâncias não identificadas que parecem ser derivadas de ácido cinâmico ou derivadas de flavonoides (4, 6 e 7).

Como esta cultivar não apresenta antocianinas na sua polpa, os ácidos fenólicos encontrados após a hidrólise, mesmo que em quantidades muito pequenas, devem estar originalmente ligados na forma de glicosídeos.

4.11 Análise de varredura para obtenção do espectro de UV/Vis dos extratos de antocianinas das batatas-doces de polpa roxa em diferentes pHs

Os espectros das Figuras 86 e 87 mostram que o comprimento de onda de maior absorção ($\lambda_{\max}$) das antocianinas das batatas-doces roxas é 530 nm entre os pHs 1 a 4,5 para a variedade de pele branca e polpa roxa (Figura 86) e entre 1,0 e 5,0 para a variedade de pele e polpa roxas (Figura 87). Os espectros das Figuras 86 e 87 evidenciam ainda que trabalhar neste comprimento de onda de 530 nm e com soluções de antocianinas dessas batatas-doces de polpa roxa no pH = 2,3 proporciona melhor detecção pois nestas condições há maior intensidade de absorção, portanto maior sensibilidade para a quantificação.

Os espectros das Figuras 86 e 87 mostram que as antocianinas das batatas-doces de polpas roxas estudadas possuem comportamento diferente daquele previsto pela metodologia

do pH diferencial de Giusti e Wrolstad (2001), baseada nos espectros da Figura 88, que considera o comportamento das antocianinas, em geral, semelhantes àquelas encontradas em rabanete (derivadas de pelargonidina-3-soforosídeo-glicosídeo). Mas há uma diferença sutil, que impacta na quantificação, acarretando subestimação dos teores de antocianinas quando comparados com teores obtidos por outras metodologias usadas neste estudo (CLAE-DAD e espectrofotometria de UV/Vis).

Ocorre que nos espectros de Giusti e Wrolstad (2001) da Figura 88, no pH = 4,5 as antocianinas já estão totalmente incolores e o pH = 1,0 é considerado como aquele no qual as antocianinas estão com a maior intensidade de cor (no comprimento de onda de maior absorção). Já as antocianinas das batatas-doces estudadas no pH=4,5 ainda apresentam coloração rosa, que acarreta um valor alto de absorvância nesse tampão, que é usado para corrigir o valor lido no tampão pH= 1,0, através da subtração da leitura em pH = 4,5, acarretando um valor de $A_{\text{corrigida}}$ menor.

Espera-se na metodologia de Giusti e Wrolstad (2001), que a única coloração rosa restante na solução em pH = 4,5 seja de interferentes e não mais de antocianinas, pois supõem-se que estas, em geral, já estejam na sua forma incolor neste pH. Na Equação 17 usada no cálculo de $A_{\text{corrigida}}$, no pH = 1,0 elas não apresentam a maior intensidade de cor rosa como ocorreria no pH = 2,3. Desta forma, os valores de absorvância não estão obtidos nas condições que proporcionariam maior intensidade, acarretando subestimação dos teores, já que a concentração de antocianinas numa solução é diretamente proporcional à intensidade de absorção.

O valor calculado para ϵ da cianidina-3-glicosídeo em 2,5% de ácido fórmico em 530nm pela Equação 10 foi 25526, enquanto o valor tabelado por Giusti e Wrolstad (2001) é $\epsilon = 25740$ em 0,1 N HCl a 520 nm e em pH=1,0.

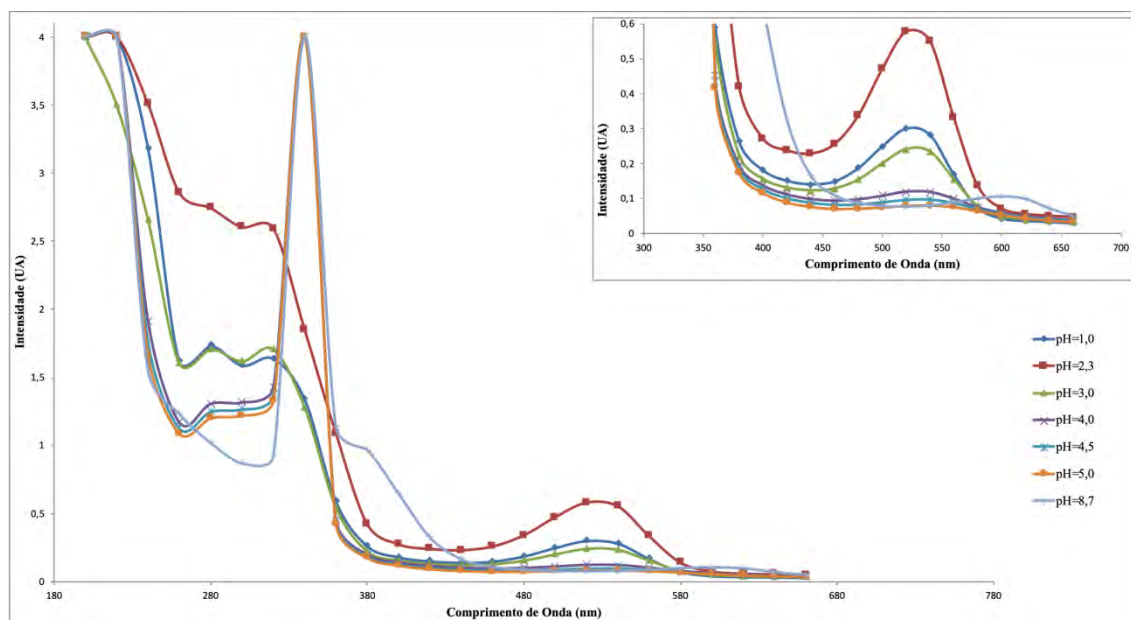


Figura 86 – Espectros de UV/Vis de antocianinas do extrato da batata-doce de pele branca e polpa roxa em diferentes pHs. No canto superior direito está um gráfico em escala ampliada da região dos espectros em torno de 530 nm.

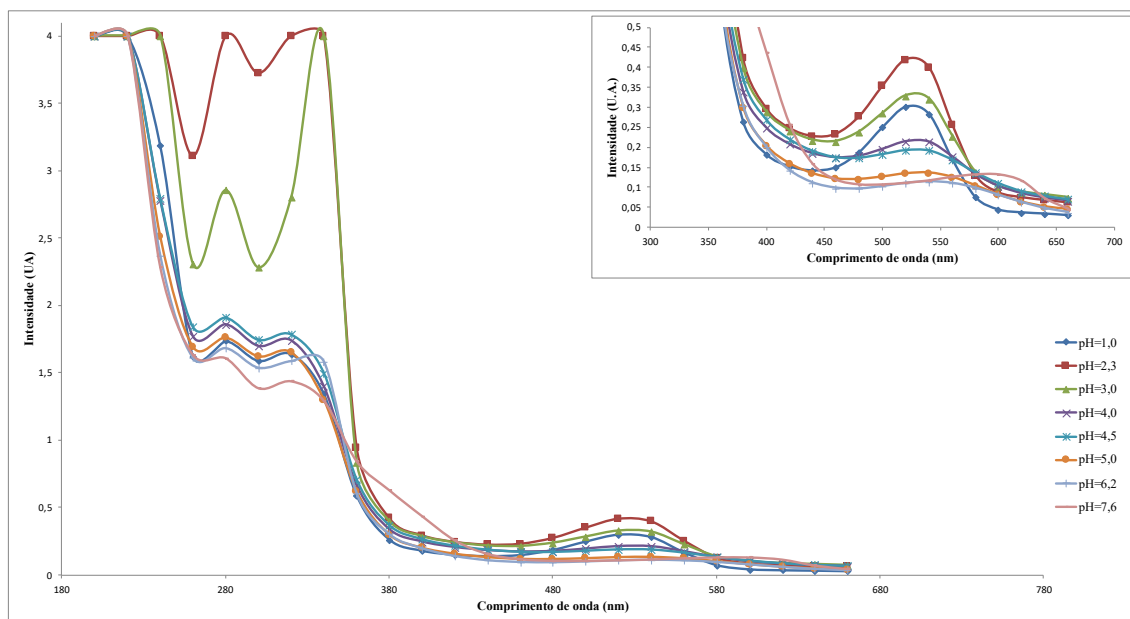


Figura 87 – Espectros de UV/Vis de antocianinas do extrato da batata-doce de pele e polpa roxas em diferentes pHs. No canto superior direito está um gráfico em escala ampliada da região dos espectros em torno de 530 nm.

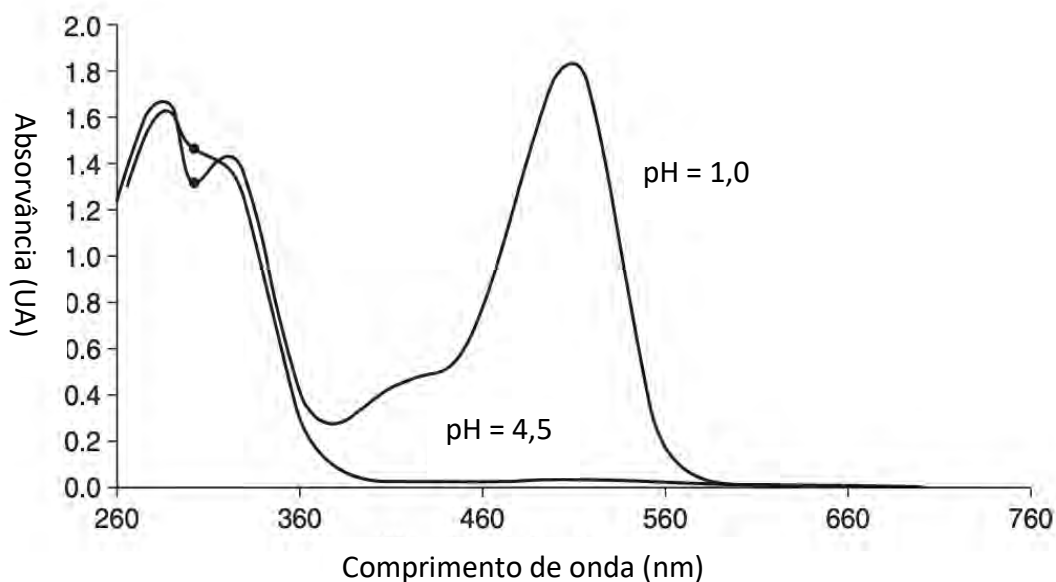


Figura 88 – Espectros de UV/Vis característicos de antocianinas de rabanete (derivadas de pelargonidina-3-soforosídeo-5-glicosídeo) em tampões pH = 1,0 e pH = 4,5. Figura adaptada de Giusti (2001) na página F1.2.1.

O método de Giusti e Wrolstad (2001) não é o mais adequado para a quantificação de antocianinas totais nos extratos de batata-doce de polpas roxas das variedades estudadas por não utilizar os pH's mais apropriados tanto para obtenção de coloração mais intensa, que seria o pH=2,3 e não o pH=1 indicado no método, quanto na obtenção de solução incolor que seria o pH=6 e não o pH=4,5 indicado no método.

4.12 Análises do perfil e identificação das antocianinas isoladas e purificadas da batata-doce de pele e polpa roxas *in natura* por CLAE-DAD, espectrofotometria UV/Vis e IE-QTDV-EM²

Os resultados dos espectros de massas de alta resolução (MS²) das antocianinas das batatas-doces de polpa roxas apresentam três possibilidades principais: a perda da glicose ligada na posição 5 da antocianidina, a perda da soforose na posição 3 da antocianidina (maior probabilidade) (Tian et al., 2005), e a perda de ambas, como na Figura 89, que apresenta um esquema do processo realizado para a separação, isolamento e purificação para a identificação das antocianinas.

A fragmentação com a ruptura da ligação glicosídica dentro da estrutura da soforose e com ruptura da ligação entre os ácidos aromáticos e a soforose é negligenciável (probabilidade muito baixa) (Tian et al., 2005). Portanto, os fragmentos com m/z de 287 $[C_{15}H_{11}O_6]^+$ e 449 $[C_{21}H_{21}O_{11}]^+$ originam-se da cianidina e da cianidina monoglicosilada, enquanto os fragmentos com m/z 301 $[C_{16}H_{13}O_6]^+$ e 463 $[C_{22}H_{23}O_{11}]^+$ originam-se da peonidina e da peonidina monoglicosilada. A perda da soforose acilada, que é a reação preferencial, explica a alta intensidade do pico referente a esse fragmento quando comparada à intensidade do pico referente à perda da glicose.

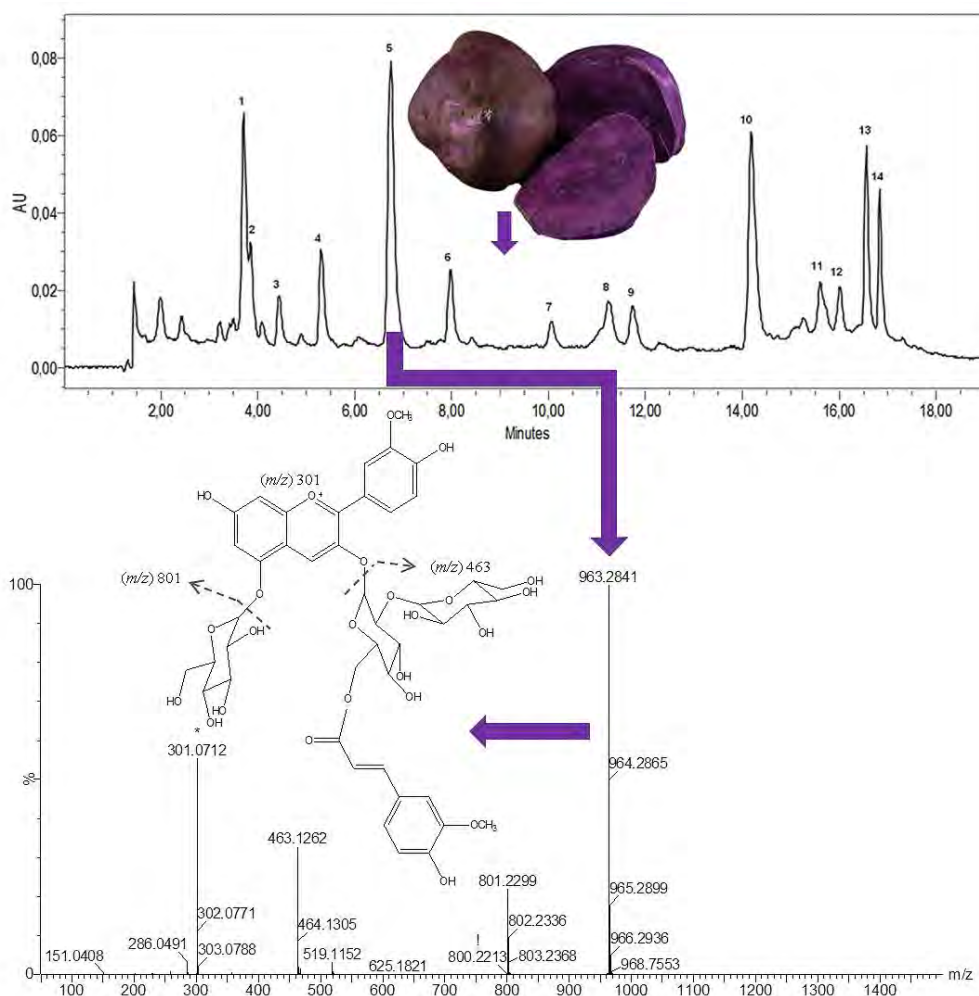


Figura 89 – Esquema do processo de separação, isolamento e purificação para a identificação das antocianinas. As setas, de cima para baixo, indicam a ordem das análises realizadas. As antocianinas extraídas da batata-doce de pele e polpa roxas *in natura* foram separadas por CLAE-DAD para obtenção do cromatograma com quatorze picos em 525 nm. O pico cinco foi coletado manualmente na saída do detector e depois analisado pelo QTDV-EM² para obter o espectro de massa que permitiu a identificação da estrutura molecular em comparação aos dados publicados por diversos autores. Esse mesmo procedimento foi feito para identificar as antocianinas presentes nos quatorze picos. Figura retirada do artigo publicado com resultados desta tese (JESUS et al., 2020).

Os radicais glicosil e acil nas antocianinas sempre ocupam as posições já confirmadas em estudos prévios (Figura 12) através da espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear (RMN) (GODA et al., 1997; MONTILLA et al., 2010; ODAKE et al., 1992; QIU et al., 2009; TERAHARA et al., 1999; TERAHARA et al., 2000; TERAHARA et al., 2004; YING et al., 2011; ZHANG et al., 2018).

Uma antocianina foi observada no pico 1, com íon molecular (M^+) de razão massa/carga (m/z) 907,2524, que corresponde a $M^+=[C_{41}H_{47}O_{23}]^+$. Apesar do pico 1 não ter sido completamente separado do pico 2 (Figura 89) e por essa razão não ser possível diferenciá-los pelos seus espectros de UV/Vis, que estão sobrepostos, foi possível distingui-los através da seleção de seu íon moleculares precursor (m/z 907) para em seguida obter o espectro de massas

de alta resolução (EM^2) específico dessa molécula (Figura 90), sem interferências de outras moléculas presentes no pico 1 e 2.

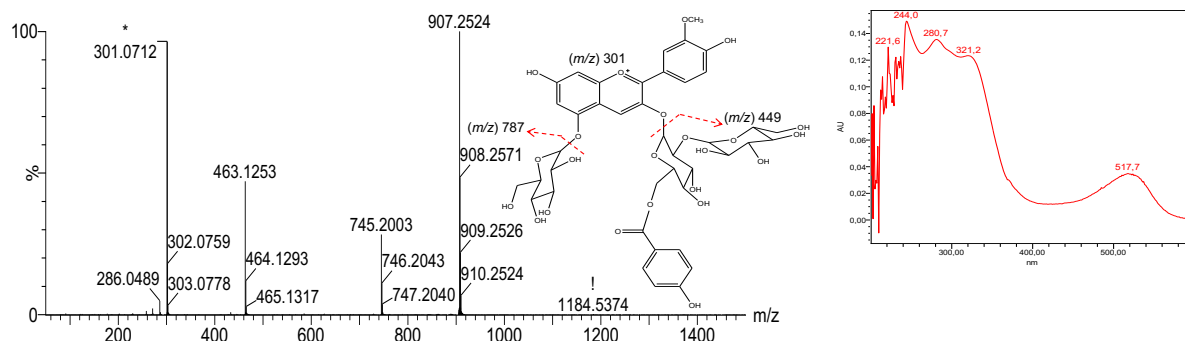


Figura 90 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-*O*-(6''-*O*-*p*-hidroxibenzoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 1.

O espectro de UV/Vis desse pico é típico de antocianina mono-acilada com ambas as bandas de máximo de absorção correspondentes à antocianina (518 nm) e ao derivado de ácido (281 nm) muito intensas. Essa é a antocianina mais polar presente no extrato da batata doce de pele e polpa roxas, pois foi a primeira antocianina a eluir no cromatograma. Devido à presença do fragmento m/z 301,0712 [Peonidina] $^+$, ela é derivada de peonidina. Os fragmentos detectados m/z 745,2003 ($C_{35}H_{37}O_{18}$), resultante da perda do radical glicosil [M-glicosil] $^+$, e o fragmento m/z 463,1253, mais intenso do que o anterior, resultante da perda do radical soforosil ligado ao radical acil.

Quando a acilação ocorre no carbono da posição 6'' do soforosil (Figura 12), como nesse caso, a intensidade do pico [M-acil-sophorosil] $^+$ é muito menor do que dos picos do M^+ e da [antocianidina] $^+$, apesar de ser sempre mais intenso do que o pico do fragmento [M-glicosil] $^+$, evidenciando que a reação da perda do soforosil ocorre em maior proporção do que a perda do glicosil como mostrado Lee et al. (2013). Quando a acilação ocorre no carbono da posição 6''' do soforosil (Figure 12), o pico do fragmento [M-acil-soforosil] $^+$ se torna muito mais intenso, ultrapassando ou se igualando em intensidade aos picos do M^+ , do fragmento [M-glicosil] $^+$ e da [antocianidina] $^+$ (Lee et al., 2013). O radical acyl corresponde à fórmula molecular do *p*-hidroxibenzoil, [M-*p*-hidroxibenzoil-soforosil] $^+$ com m/z 463,1253. Assim, foi possível identificar esta substância como peonidina 3-*O*-(6''-*O*-*p*-hidroxibenzoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, como previamente identificado em outros estudos (HE et al., 2016; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2019a,b,c; YANG et al., 2019; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; WANG et al., 2017; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017).

No pico 2 (Figura 91), uma antocianina não identificada foi detectada pela primeira vez em batata doce de pele e polpa roxas, com M^+ m/z 1179,3862 (ion precursor do EM^2 m/z 1179) e fragmentos m/z 1119,3651; 973,3016; 841,2552; 737,2061; 605,1586; 505,1393 e 301,0712 [Peonidina] $^+$.

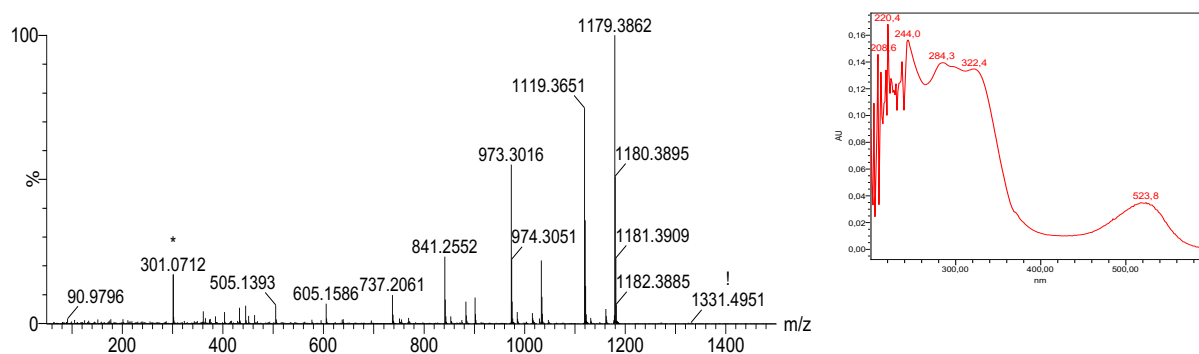


Figura 91 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, detectada pela primeira vez em batata-doce de polpa roxa, coletada no pico 2.

Duas antocianinas foram observadas no pico 3 com espectros de UV/Vis típicos de mono-acilação com derivados de ácidos hidroxicinâmicos. Só foi possível distingui-los através da seleção de seus íons precursores por EM². Uma antocianina não identificada foi detectada pela primeira vez em batata doce de pele e polpa roxas com M⁺ *m/z* 909,2081 (íon precursor MS² *m/z* 909), com fragmentos 729,1376; 627,1047; 567,0831; 393,0292; 367,0496; 349,0400; 301,0712 [Peonidina]⁺ (Figura 92).

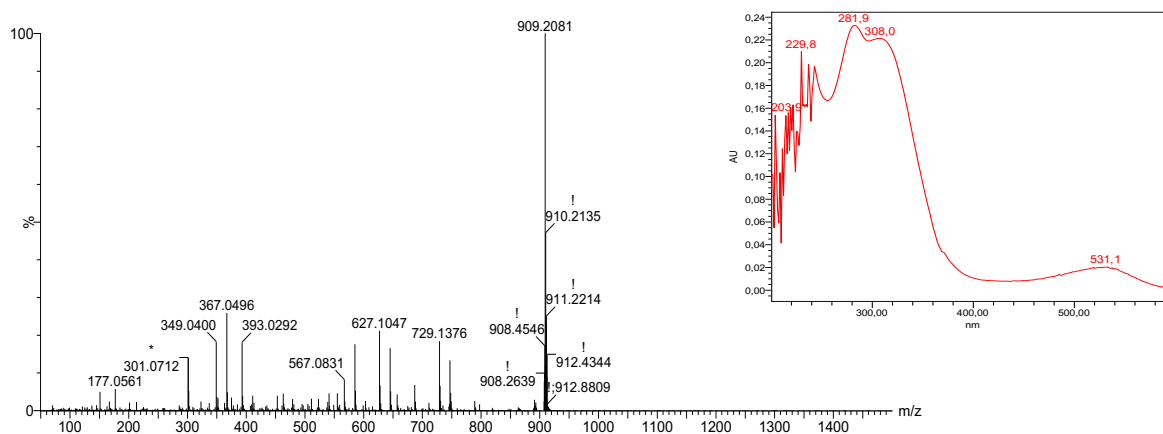


Figura 92 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 3.

A outra antocianina detectada no pico 3 foi a de M⁺ *m/z* 949,2623 (íon precursor EM² *m/z* 949), correspondente a M⁺=[C₄₃H₄₉O₂₄]⁺, fragmentos *m/z* 787,2089 [M-glicosil]⁺ (C₃₇H₃₉O₁₉), *m/z* 449,1082 [M-feruloil-soforosil]⁺ e *m/z* 287,0556 [Cianidina]⁺ (Figura 93). Esta era a cianidina 3-*O*-(6''-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, previamente estudada (HE

et al., 2016; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; OLIVEIRA, 2019b; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; WANG et al., 2017; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017), acilada com feruloyl na posição 6'', já que a intensidade do m/z 449 [M-feruloil-soforosil]⁺ só é maior do que a intensidade do m/z 787,2089 (LEE et al., 2013).

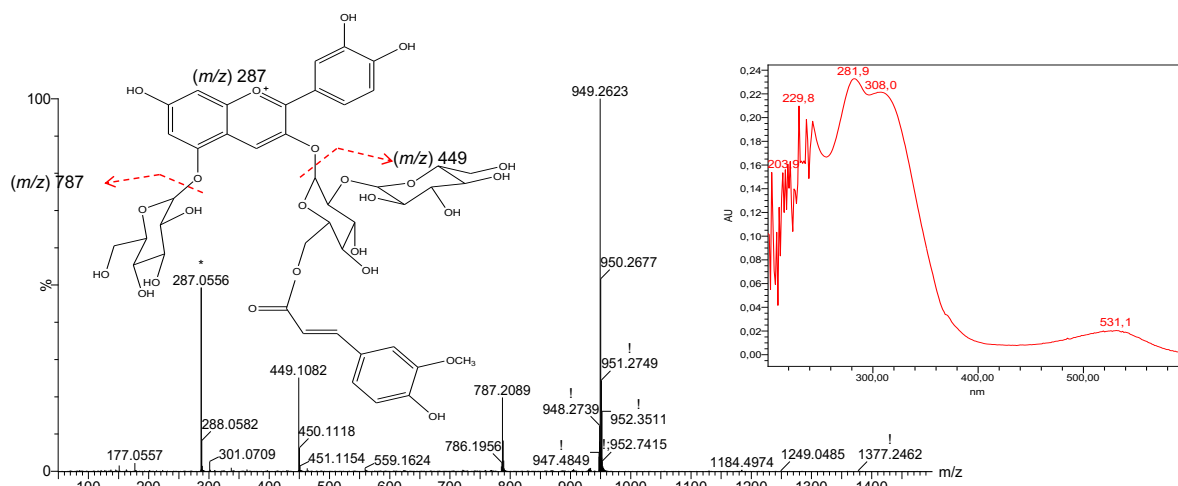


Figura 93 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6''-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 3.

Nos picos 4 e 6 uma antocianina foi detectada para cada pico, ambas com M⁺ e fragmentos similares (íons precursores EM² m/z 961). A primeira, do pico 4, com M⁺ m/z 961,3010 e fragmentos m/z 801,2238; 519,1119; 463,1236 e 301,0712 [Peonidina]⁺ (Figura 94). A segunda, do pico 5 com M⁺ m/z 961,2571 e fragmentos m/z 801,2265; 463,1237 e 301,0712 [Peonidina]⁺ (Figura 95). Ambas isômeras derivadas de peonidina foram detectadas pela primeira vez em batata doce de pele e polpa roxas.

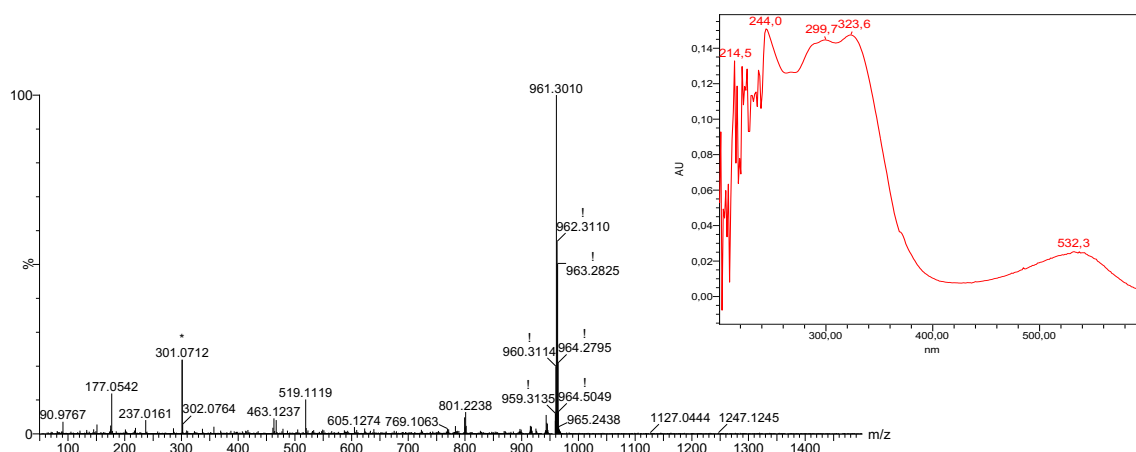


Figura 94 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 4.

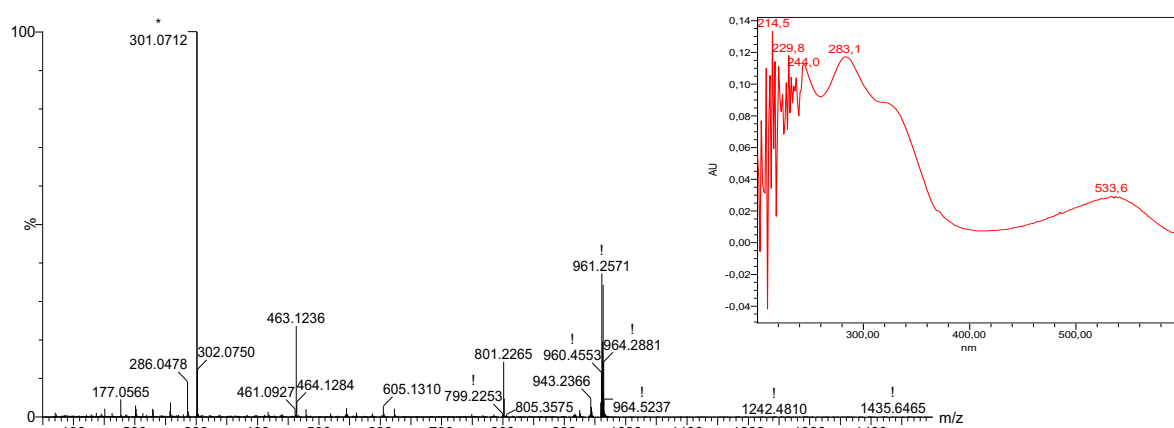


Figura 95 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 6.

No pico 5 duas antocianinas foram detectadas com intensas bandas de derivado de ácido hidroxicinâmico no espectro de UV/Vis e com íons precursores EM^2 m/z 963 e 1097. Uma com M^+ m/z 963,2841 (Figura 96) e fragmentos m/z 801,2299 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{38}H_{41}O_{19}$), 463,1262 $[M\text{-feruloil-soforosil}]^+$ e 301,0712 $[Peonidina]^+$ foram observados, identificados como $M^+=[C_{44}H_{51}O_{24}]^+$, peonidina 3-*O*-(6'-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, previamente caracterizados (HU et al., 2016; JIE et al., 2013; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2019b; TIAN et al., 2005; TREUONG et al., 2010; WANG et al., 2017; XU et al., 2005; YANG et al., 2019; ZHU et al., 2017), onde os radicais feruloil, de acordo com a intensidade dos fragmentos m/z 463,1262 $[M\text{-feruloil-soforosil}]^+$, mais intensos apenas que o fragmento $[M\text{-glicosil}]^+$, localizam-se na posição 6'' (LEE et al., 2013). A outra

antocianina (Figura 97), com M^+ m/z 1097.2838, correspondente a $M^+=[C_{51}H_{53}O_{27}]^+$, com fragmentos m/z 935,2285 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{45}H_{43}O_{22}$), 449,1088 $[M\text{-dicafeoil-soforosil}]^+$ e 287,0556 $[Cianidina]^+$, identificado como cianidina 3-*O*-(6'',6'''- *O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo como já identificada em outros estudos (GRASS et al., 2017; HE et al., 2016; ISLAM et al., 2002; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; TERAHARA et al., 1999; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; WANG et al., 2017, YANG et al., 2019; YOSHINAGA; TANAKA; NAKATANI, 2000).

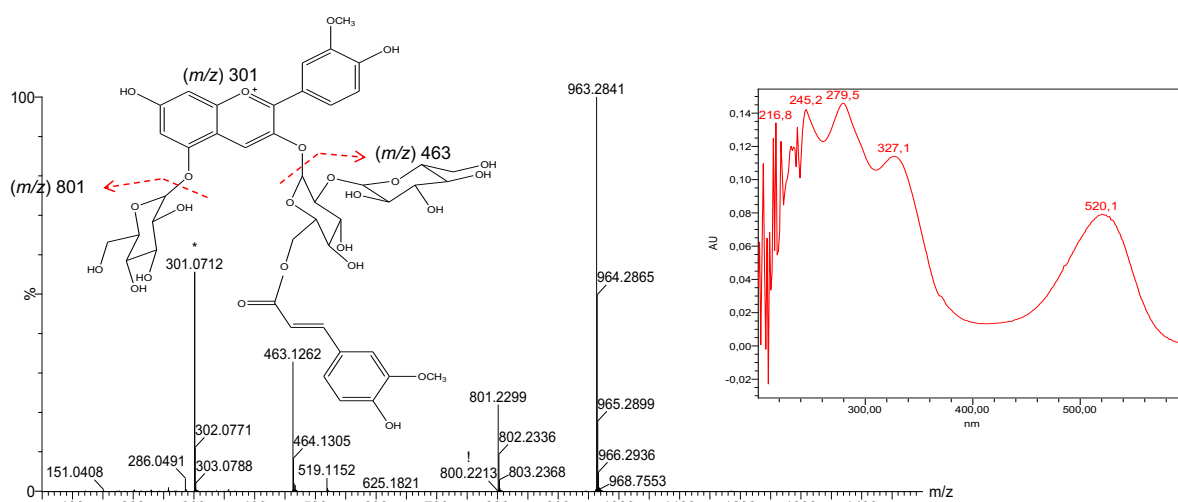


Figura 96 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-*O*-(6''-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 5.

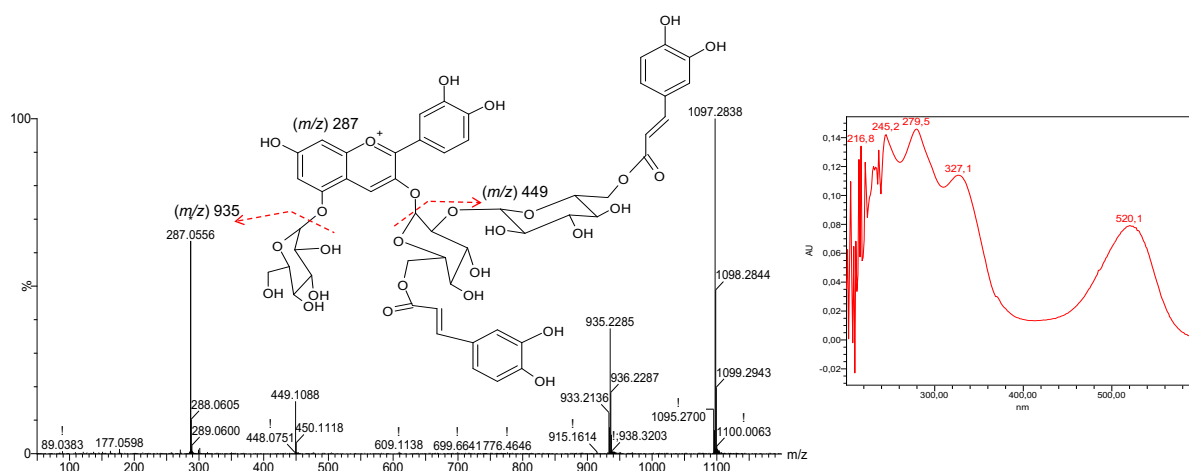


Figura 97 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 5.

No pico 6 foi possível observar duas antocianinas distintas separadas através da seleção de seus íons precursores para EM², aquela reportada anteriormente aqui com m/z 961 e outra com m/z 1055. Esse pico mostrou uma banda intensa no espectro de UV/Vis, indicativa de derivado de ácido hidroxicinâmico. A antocianina com M^+ m/z 1055,2709 $M^+=[C_{49}H_{51}O_{26}]^+$, com fragmentos m/z 893,2127 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{43}H_{41}O_{21}$), 449,1088 $[M\text{-}p\text{-hidroxibenzoil-cafeoil-soforosil}]^+$ e 287,0556 $[Cianidina]^+$, identificada como cianidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-hidroxibenzoil-6-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 98), como em outros estudos (HE et al., 2016; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; OLIVEIRA, 2019B; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; TERAHARA et al., 1999; TRUONG et al., 2010; WANG et al., 2017; XU et al., 2015; YANG et al., 2019; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000; ZHU et al., 2017).

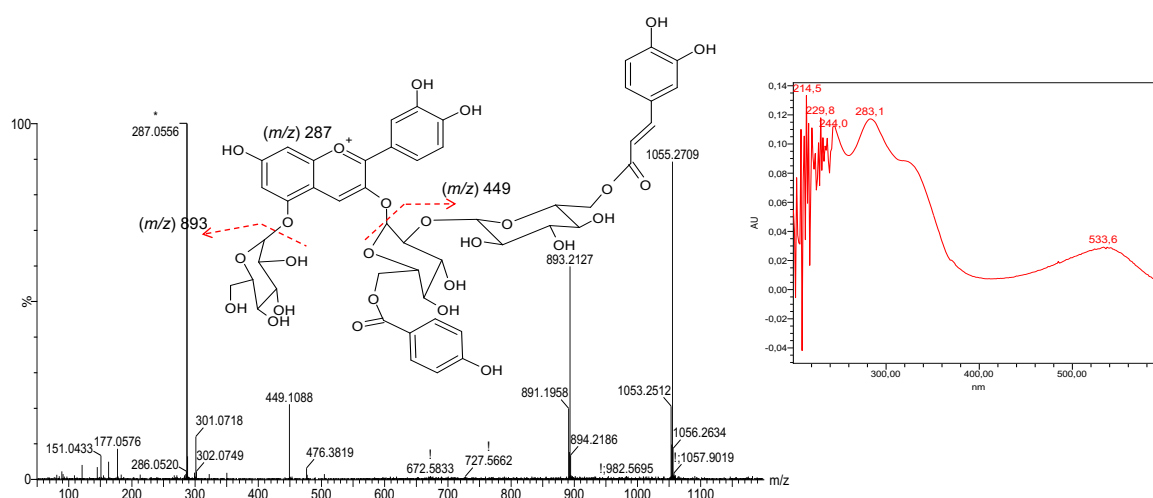


Figura 98 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-hidroxibenzoil-6-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 6.

No pico 7, com intensa banda de derivado de ácido hidroxicinâmico no espectro UV/Vis como em antocianinas di-aciladas, duas antocianinas foram observadas. Uma com M^+ m/z 1111,2947; correspondente ao $M^+=[C_{52}H_{55}O_{27}]^+$ (íon precursor EM² m/z 1111), fragmentos 949,2388 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{46}H_{45}O_{22}$), 463,1076 $[M\text{-cafeoil-feruloil-soforosil}]^+$ e 287,0556 $[Cianidina]^+$ foi identificada como cianidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 99) como outros autores fizeram (HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; TERAHARA et al., 1999; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000). A outra antocianina com M^+ m/z 1125,3098 que corresponde a $M^+=[C_{53}H_{57}O_{27}]^+$, e fragmentos m/z 963,2556 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{47}H_{47}O_{22}$); 463,1238 $[M\text{-cafeoil-feruloil-soforosil}]^+$ e 301,0712 $[Peonidina]^+$ foi identificada como peonidina 3-*O*-(6''-*O*-cafeoyl-6'''-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figure 100) como em estudos anteriores (HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; ODAKE et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2019b, TERAHARA et al., 1999; TRUONG et al.,

2010, 2012; WANG et al., 2017; XU et al., 2015; YANG et al., 2019; YING et al., 2011; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000; ZHANG et al., 2018; ZHU et al., 2017).

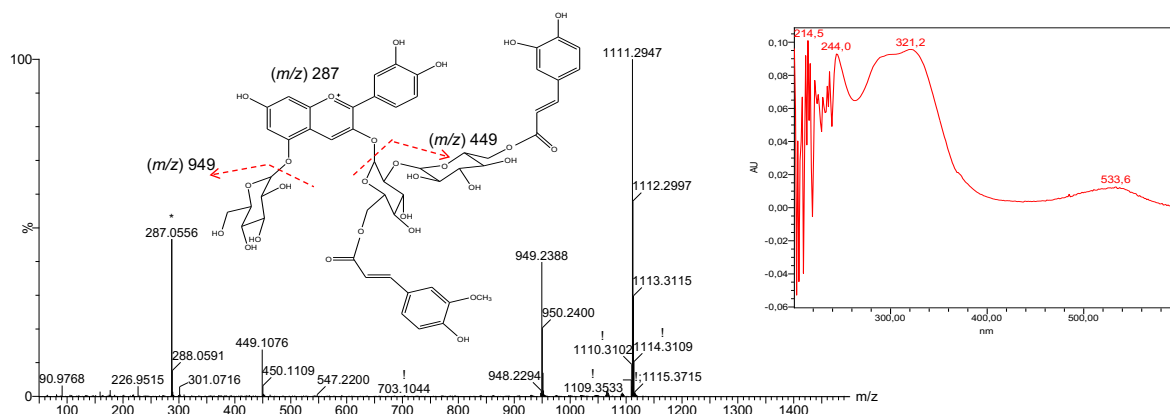


Figura 99 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 7.

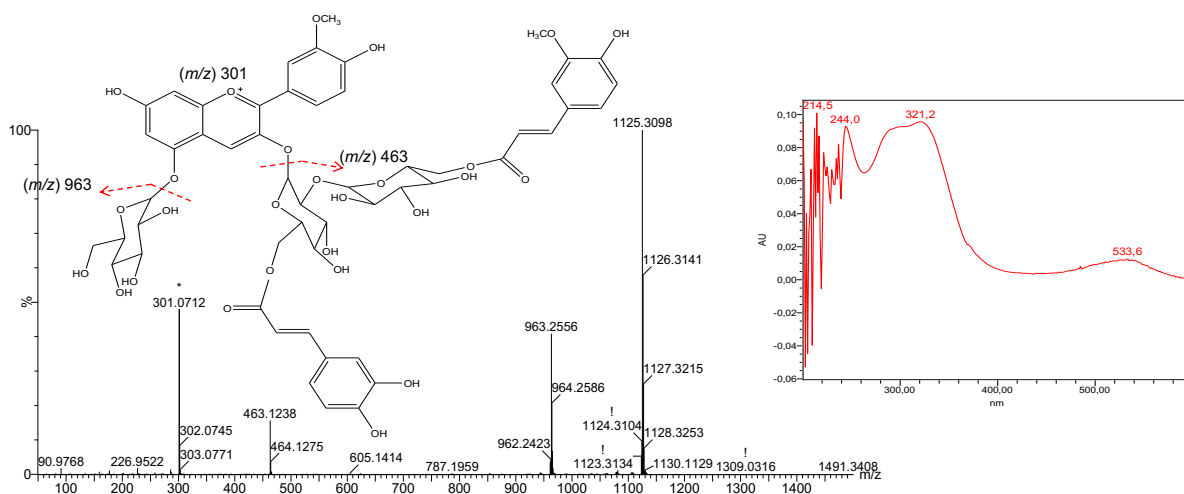


Figura 100 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-*O*-(6''-*O*-cafeoyl-6'''-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 7.

No pico 8, com uma intensa banda de ácido cafeico no espectro de UV/ Vis como é comum em antocianinas di-aciladas, quatro antocianinas distintas foram observadas através da seleção de seus íons precursores por EM²: m/z 1111, 1099, 949 e 963. A primeira apresentou M^+ m/z 1111,3011, que corresponde a $M^+=[C_{52}H_{55}O_{27}]^+$, com fragmentos m/z 949,2415 [M -glicosil]⁺ ($C_{46}H_{45}O_{22}$), 463,1253 [M -dicafeoil- soforosil]⁺ e 301,0712 [Peonidina]⁺, identificada como peonidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figure 101) como em outros trabalhos (GRASS et al., 2017; HE et al., 2016; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; LEE et al., 2013; MONTILA et al., 2010; OLIVEIRA et al, 2019b; TERAHARA et al.,

1999; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; YANG et al., 2019; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000; WANG et al., 2017).

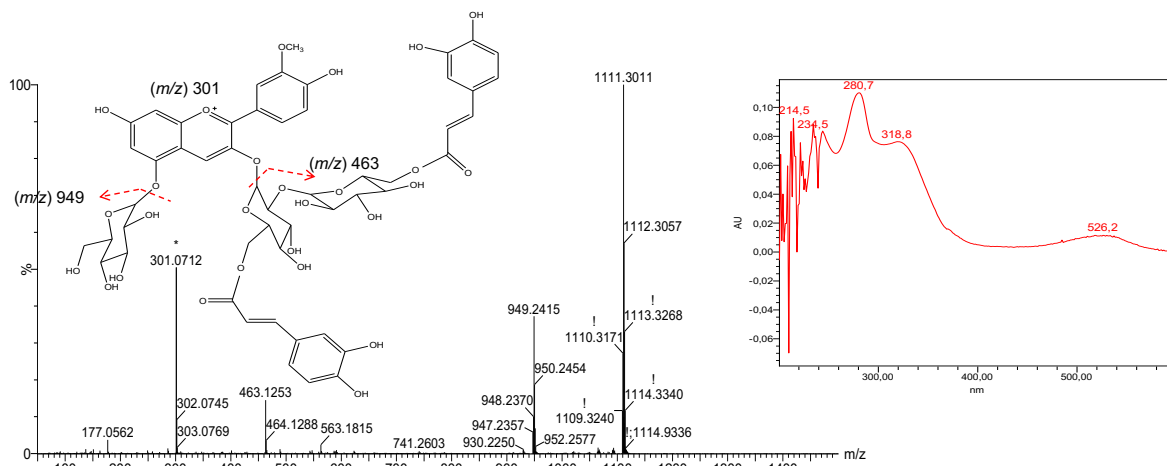


Figura 101 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 8.

A segunda antocianina com M^+ m/z 1099,3037; correspondente a $M^+=[C_{51}H_{55}O_{27}]^+$, com fragmentos 937,2398 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{45}H_{45}O_{22}$); 463,1247 $[M\text{-cafeoil-vaniloil-soforosil}]^+$ e 301,0712 $[Peonidina]^+$, era a peonidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-vaniloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 102), reportado pela primeira vez por Truong et al. (2010) que detectou a mesma fragmentação e com identificação sugerida por He et al. (2016).

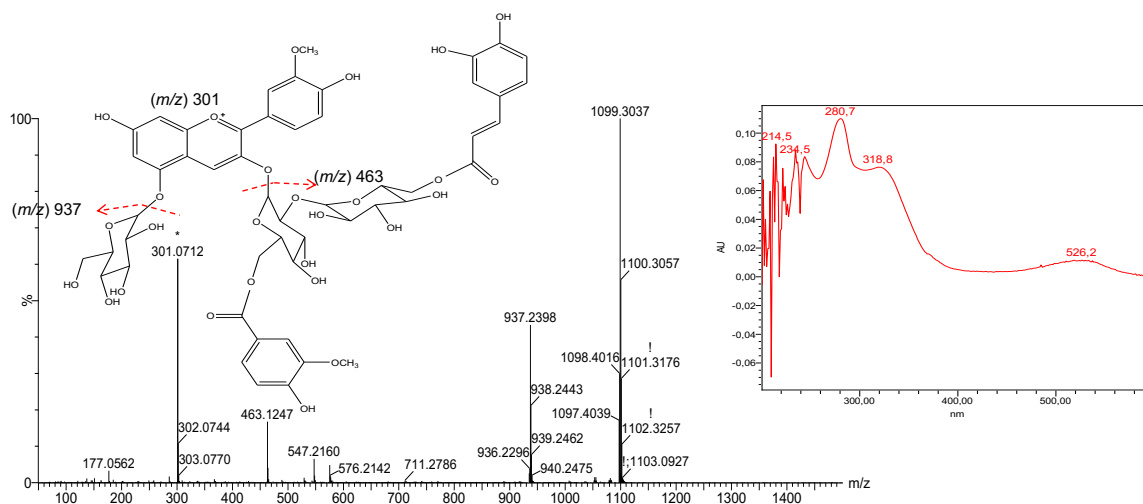


Figura 102 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, reportada pela primeira vez por Truong (2010) e investigada por He (2016) que este trabalho sugere ser a peonidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-vaniloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 8.

A terceira com M^+ m/z 949,2988, que corresponde a $M^+=[C_{43}H_{49}O_{24}]^+$, com fragmentos 787,2139 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{37}H_{39}O_{19}$); 463,1235 $[M\text{-cafeoil-soforosil}]^+$ e m/z 301,0712 $[Peonidina]^+$, foi identificada como peonidina 3-*O*-(6''-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 103), com o cafeoil no carbono 6'' como em outros estudos (GODA et al., 1997; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2019b; QIU et al., 2009; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; WANG et al., 2017; YANG et al., 2019; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017).

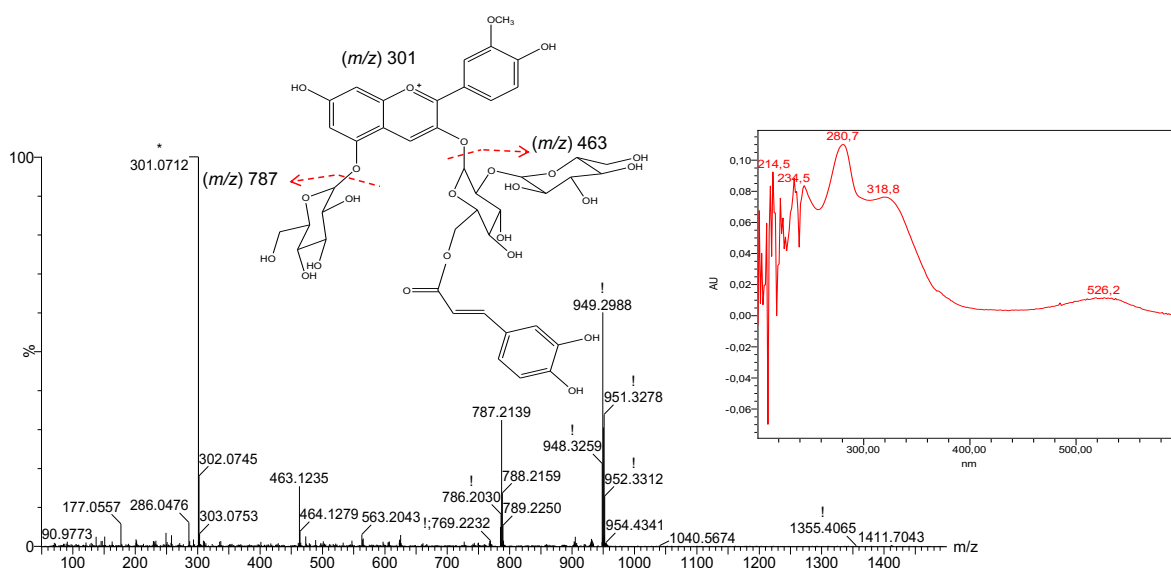


Figura 103 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-*O*-(6''-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 8.

A quarta antocianina apresentou M^+ m/z 963,3345; que corresponde a $M^+=[C_{44}H_{51}O_{24}]^+$, com fragmentos m/z 801,2732 $[M\text{-glicosil}]^+$; 639,2275; 579,2079; 513,1323 e 301,0712 $[Peonidina]^+$ (Figura 104), não foi identificada, já que apresentou fragmentos diferentes daqueles de antocianina conhecida com o mesmo M^+ m/z reportada em outros trabalhos (HU et al., 2016; JIE et al., 2013; LEE et al., 2013; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; WANG et al., 2017; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017).

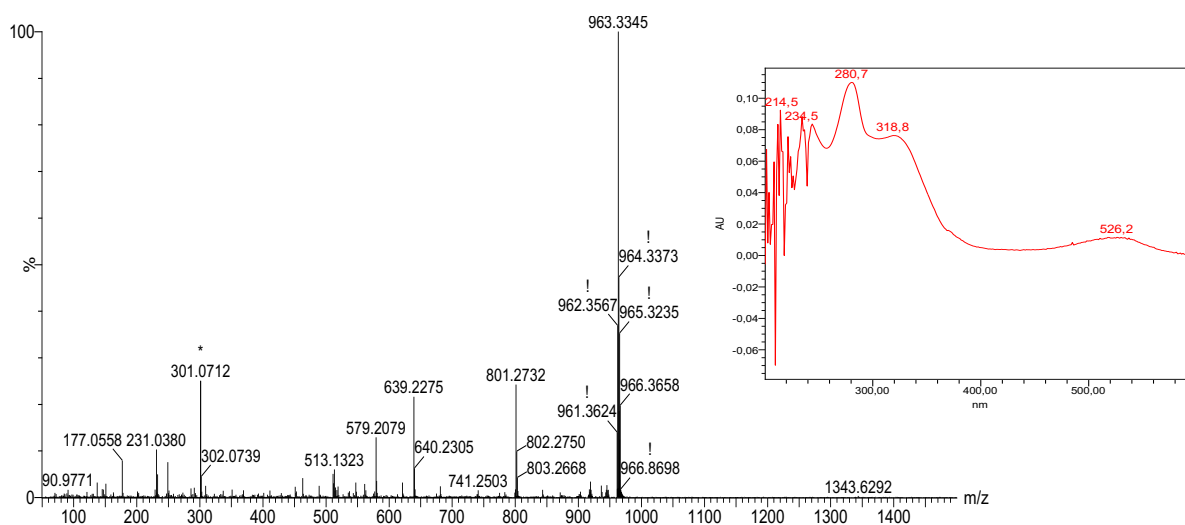


Figura 104 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 8.

No pico 9, com intensas bandas de ácidos cafeico e *p*-hidroxibenzoico no espectro de UV/Vis como ocorre em antocianinas di-aciladas, uma antocianina com M^+ m/z 1069,2830 (Figura 105), relacionada a $M^+=[C_{50}H_{53}O_{26}]^+$ (ion precursor EM^2 m/z 1069), fragmentos 907,2289 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{44}H_{43}O_{21}$) que corresponde à perda de uma unidade de glicose (ligada ao carbono da posição 5 da antocianina) como é característico em batatas-doces de polpa roxa, mas nunca correspondente à perda de uma unidade de ácido cafeico, que também possui -162 amu como afirmado equivocadamente por Oliveira et al. (2019a).

Também foram observados os outros fragmentos 463,1239 $[M\text{-cafeoil-}p\text{-hidroxibenzoil-soforosil}]^+$ e 301,0712 $[Peonidina]^+$ que possibilitaram a identificação da peonidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-hidroxibenzoil-6-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (GRASS et al., 2017; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2019a,b,c; TERAHARA et al., 1999; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; XU et al., 2015; YANG et al., 2019; YING et al., 2011; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000; ZHANG et al., 2018; ZHU et al., 2017).

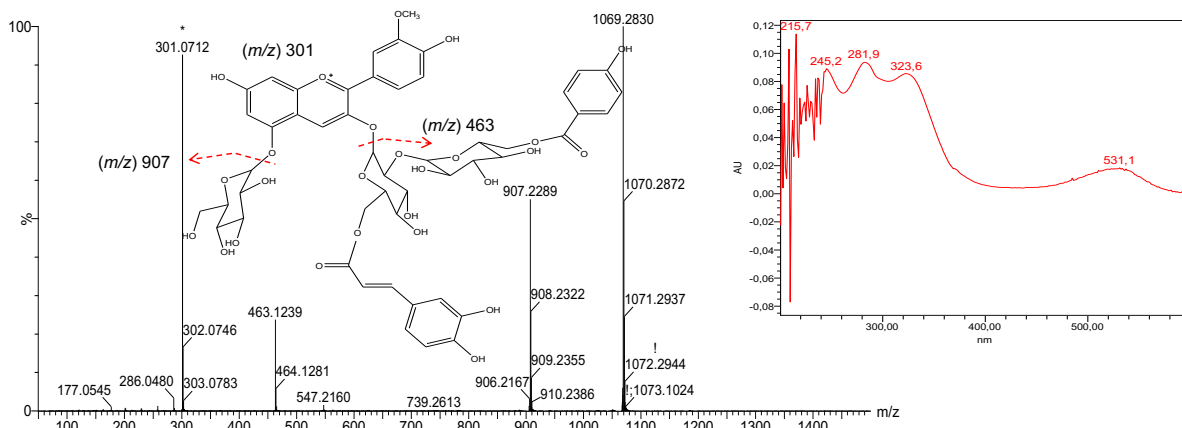


Figura 105 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-O-(6-O-p-hidroxibenzoil-6-O-cafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo coletada no pico 9.

No pico 10, com intensa banda de derivado de ácido hidroxicinâmico no espectro de UV/Vis como é característico de antocianinas di-aciladas, duas antocianinas foram detectadas (íons precursores para EM² m/z 1123 e 1125). Uma com M^+ m/z 1125,3123 que corresponde a $M^+=[C_{53}H_{57}O_{27}]^+$, e fragmentos m/z 963,2538 [M-glicosil]⁺ ($C_{47}H_{47}O_{22}$); 463,1229 [M-feruloil-cafeoil-soforosil]⁺ e 301,0712 [Peonidina]⁺ identificada como peonidina 3-O-(6-O-feruloil-6-O-cafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo (Figura 106), similar à antocianina encontrada no pico 7, provavelmente porque os radicais feruloil e cafeoil nesta antocianina trocaram de posições.

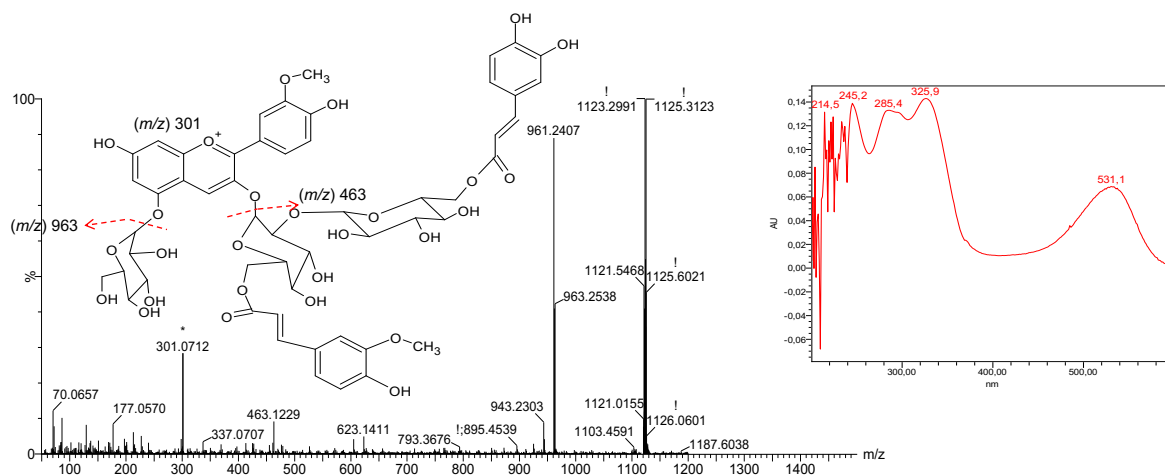


Figura 106 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da Peonidina 3-O-cafeoil-feruloil soforosídeo-5-O-glicosídeo, coletada no pico 10.

A outra antocianina, a qual foi detectada pela primeira vez em batata-doce de polpa roxa, com M^+ m/z 1123,2932 e fragmentos m/z 961,2393 [M-glicosil] $^+$; 943,2283; 605,1298; 479,0979; 301,0712 [Peonidina] $^+$ (Figura 107). Zhu et al. (2017) detectaram um M^+ m/z 1123 similar, com alguns fragmentos idênticos, porém não detectaram o fragmento [Peonidina] $^+$, não sendo possível portanto afirmar que se trata da mesma substância.

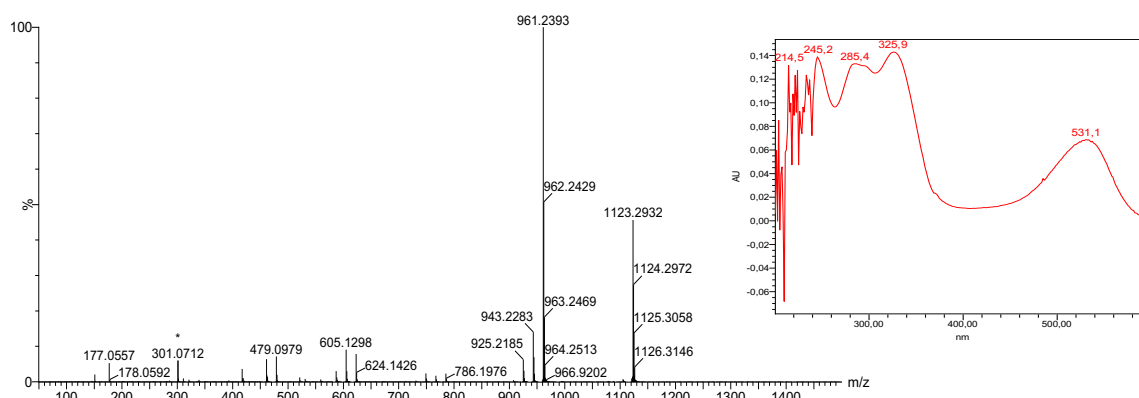


Figura 107 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis de antocianina desconhecida, coletada no pico 10.

No pico 11, uma antocianina foi observada com intensa banda de derivado de ácidos hidroxibenzóico e cumárico e banda de menor intensidade correspondente a antocianina, características de di-acilação. Ela possuía M^+ m/z 1053,2903 (íon precursor para EM^2 m/z 1053), que corresponde a $M^+=[C_{50}H_{53}O_{25}]^+$, com fragmentos 891,2363 [M-glicosil] $^+$ ($C_{44}H_{43}O_{20}$); 463,1245 [M-coumaroil-*p*-hidroxibenzoil-soforosil] $^+$ e 301,0712 [Peonidina] $^+$, identificada como peonidina 3-*O*-(6-*O*-coumaroil-6-*O*-*p*-hidroxibenzoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 108), recentemente descrita por Wang et al. (2017).

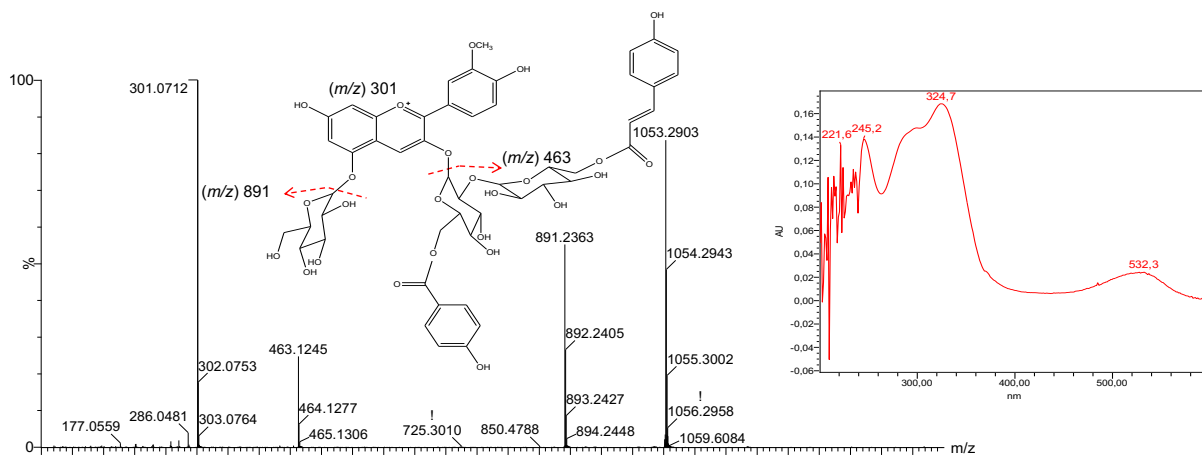


Figura 108 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da Peonidina 3-*O*-cumaroil-*p*-hidroxibenzoil soforosídeo-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 11.

No pico 12, uma antocianina foi observada com intensa banda de ácidos ferúlico e *p*-hidroxibenzoico no espectro de UV/ Vis como esperado para o caso de antocianinas di-aciladas (Figura 109), com M^+ m/z 1083,3026 (íon precursor para EM^2 m/z 1083), que corresponde a $M^+=[C_{51}H_{55}O_{26}]^+$, com fragmentos 921,2470 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{45}H_{45}O_{21}$); 463,1245 $[M\text{-}p\text{-hidroxibenzoil-feruloil-soforosil}]^+$ e 301,0712 $[Peonidina]^+$, identificada como peonidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-hidroxibenzoil-6-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 109). Ela foi reportada pela primeira vez por Truong et al. (2010), identificada por Wang et al. (2017) e por Zhu et al. (2017).

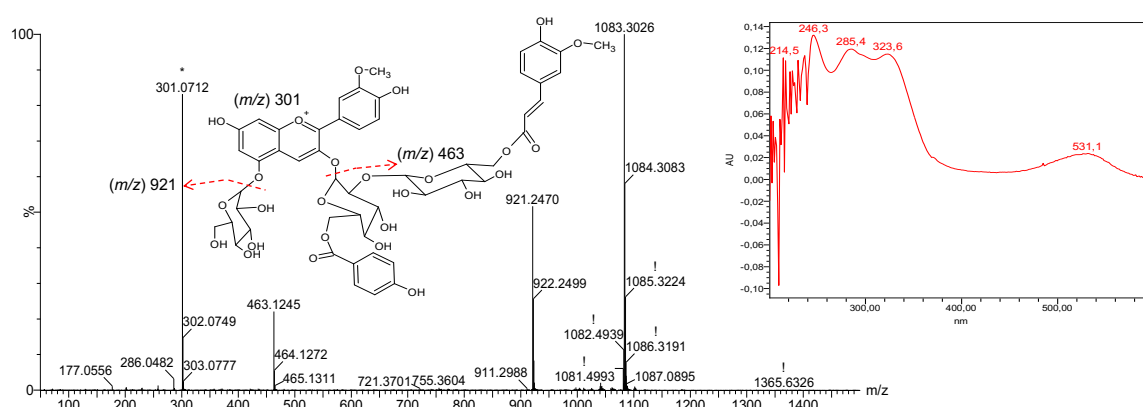


Figura 109 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-*O*-feruloil-*p*-hidroxibenzoil soforosídeo-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 12.

No pico 13 uma antocianina foi observada com intensa banda dos ácidos cumárico e ferúlico nos espectros UV/ Vis, característica de di-acilação, M^+ m/z 1109,3230 (íon precursor

para EM² m/z 1109), que corresponde a $M^+=[C_{53}H_{57}O_{26}]^+$, fragmentos 947,2606 [M-glicosil]⁺ (C₄₇H₄₇O₂₁); 463,1236 [M-coumaroil-feruloil-soforosil]⁺ e 301,0712 [Peonidina]⁺ identificada como peonidina 3-*O*-(6-feruloil-6-*p*-cumaroil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 110), como Tian et al. (2005) identificaram.

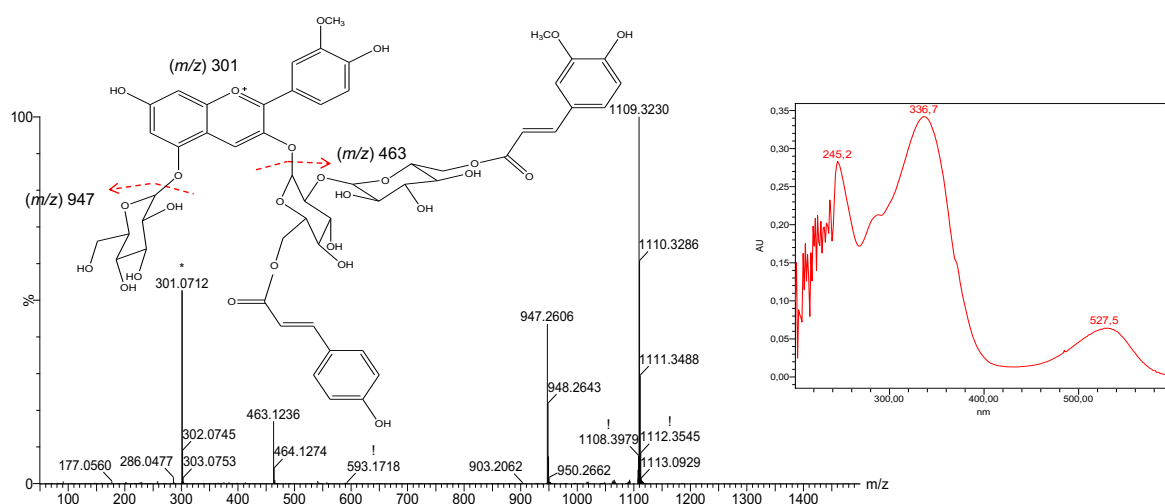


Figura 110 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-*O*-(6-feruloil-6-*p*-cumaroil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 13.

Finalmente, no pico 14 uma antocianina foi observada com intensa banda de ácido ferúlico no espectro de UV/Vis, característica de di-acilação, $M^+ m/z$ 1139,3292 (íon precursor para EM² m/z 1139), que corresponde a $M^+=[C_{54}H_{59}O_{27}]^+$, com fragmentos 977,2733 [M-glicosil]⁺ (C₄₈H₄₉O₂₂), 463,1246 [M-diferuloil-soforosil]⁺ e 301,0712 [Peonidina]⁺ identificada como Peonidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-diferuloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 111), como identificada por Wang (2017).

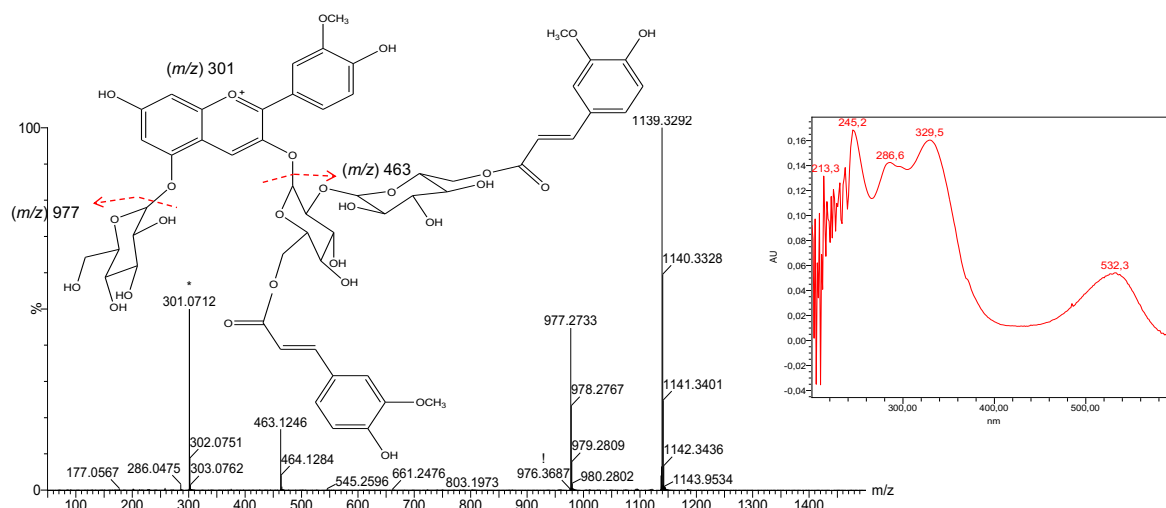


Figura 111 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da Peonidina 3-*O*-(6'',6'''- *O*-diferuloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo coletada no pico 14.

Em algumas antocianinas investigadas acima não foi possível indicar as posições exatas dos radicais (derivados de ácidos cinâmicos ou hidroxibenzóico) ligados nos carbonos 6'' ou 6''' do soforosil (Figure 12) porque nenhuma análise de RMN foi realizada neste trabalho ou em estudos disponíveis na literatura. A tabela 45 resume as informações cromatográficas e espectrais (UV/Vis e EM²) das antocianinas detectadas na batata-doce de pele e polpa roxas.

Tabela 7 - Dados espectrais e cromatográficos obtidos para as antocianinas identificadas na batata doce de pele e polpa roxas.

No. Antocianina	No. Pico	t _R (min)	M ⁺ (m/z)	íons fragmentos (m/z)	λ _{UV/Vis} max (nm)	Composto / Formula Molecular
1	1	3.62	907,2524	745,2003 463,1253 301,0712 1119,3651 973,3016 973,3016	280, 321, 518	Peonidina 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - <i>p</i> -hidroxibenzoil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₄₁ H ₄₇ O ₂₃
2	2	3.76	1179,3862	841,2552 737,2061 601,1586 505,1393 301,0712	284, 322, 524	Antocianina não identificada (Derivada de Peonidina)*
3	3	4.33	949,2623	787,2089 449,1082 287,0556 729,1376 627,1047 567,0831	282, 308, 531	Cianidina 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -feruloil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₄₃ H ₄₉ O ₂₄
4	3	4.33	909,2081	393,0292 367,0496 349,0400 301,0712	282, 308, 531	Antocianina não identificada (Derivada de Peonidina)*

Tabela 45 – Continuação.

No. Antocianina	No. Pico	t _R (min)	M ⁺ (m/z)	íons fragmentos (m/z)	λ _{UV/Vis} max (nm)	Composto / Formula Molecular
5	4	5.18	961,3010	801,2238 519,1119 463,1237 301,0712	300, 324, 532	Antocianina não identificada (Derivada de Peonidina)*
6	5	6.62	963,2841	801,2299 463,1262 301,0712	280, 327, 520	Peonidina 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -feruloil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₄₄ H ₅₁ O ₂₄
7	5	6.62	1097,2838	935,2285 449,1088 287,0556	280, 327, 520	Cianidina 3- <i>O</i> -(6'',6'''- <i>O</i> -dicafeoil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₅₁ H ₅₃ O ₂₇
8	6	7.86	961,2571	801,2265 463,1236 301,0712	283, 320, 534	Antocianina não identificada (Derivada de Peonidina)*
9	6	7.86	1055,2709	893,2127 449,1088 287,0556	283, 320, 534	Cianidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -cafeoil-6- <i>O</i> - <i>p</i> - hidroxibenzoil soforosídeo)-5- <i>O</i> - glicosídeo / C ₄₉ H ₅₁ O ₂₆
10	7	9.92	1111,2947	949,2388 449,1076 287,0556	280, 321, 534	Cianidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -cafeoil-6- <i>O</i> - feruloil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₅₂ H ₅₅ O ₂₇
11	7	9.92	1125,3098	963,2556 463,1238 301,0712	280, 321, 534	Peonidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -cafeoil-6- <i>O</i> - feruloil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₅₃ H ₅₇ O ₂₇
12	8	11.11	1111,3011	949,2415 463,1253 301,0712	281, 319, 526	Peonidina 3- <i>O</i> -(6'',6'''- <i>O</i> -dicafeoil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₅₂ H ₅₅ O ₂₇
13	8	11.11	1099,3037	937,2398 463,1247 301,0712	281, 319, 526	Peonidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -cafeoil-6- <i>O</i> - vaniloil soforosídeo)-5- <i>O</i> - glicosídeo / C ₅₁ H ₅₅ O ₂₇
14	8	11.11	949,2988	787,2139 463,1235 301,0712	281, 319, 526	Peonidina 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -cafeoil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₄₃ H ₄₉ O ₂₄
15	8	11,11	963,3345	801,2732 639,2275 579,2079 513,1323 301,0712	281, 319, 526	Antocianina não identificada (Derivada de Peonidina)*
16	9	11,66	1069,2830	907,2289 463,1239 301,0712 961,2393	282, 324, 531	Peonidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -cafeoil-6- <i>O</i> - <i>p</i> - hidroxibenzoil soforosídeo)-5- <i>O</i> - glicosídeo / C ₅₀ H ₅₃ O ₂₆
17	10	14,12	1123,2932	943,2283 605,1298 479,0979 301,0712	285, 326, 531	Antocianina não identificada (Derivada de Peonidina)*
18	10	14,2	1125,3123	963,2538 463,1229 301,0712	285, 326, 531	Peonidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -cafeoil-6- <i>O</i> - feruloil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₅₃ H ₅₇ O ₂₇
19	11	15,59	1053,2903	891,2363 463,1245 301,0712	280, 325, 532	Peonidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -cumaroil-6- <i>O</i> - <i>p</i> -hidroxibenzoil soforosídeo)-5- <i>O</i> - glicosídeo / C ₅₀ H ₅₃ O ₂₅
20	12	16,00	1083,3026	921,2470 463,1245 301,0712	285, 324, 531	Peonidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> - hidroxibenzoil -6- <i>O</i> -feruloil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₅₁ H ₅₅ O ₂₆
21	13	16,56	1109,3230	947,2606 463,1236 301,0712	280, 337, 528	Peonidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -feruloil-6- <i>O</i> - cumaroil soforosídeo)-5- <i>O</i> - glicosídeo / C ₅₃ H ₅₇ O ₂₆
22	14	16,84	1139,3292	977,2733 463,1246 301,0712	287, 330, 532	Peonidina 3- <i>O</i> -(6'',6'''- <i>O</i> -diferuloil soforosídeo)-5- <i>O</i> -glicosídeo / C ₅₄ H ₅₉ O ₂₇

t_R – tempo de retenção

*detectada pela primeira vez em batata-doce de pele e polpa roxas

A principal característica dessa variedade de batata-doce de pele e polpa roxas é a presença de derivados de peonidina entre a maior parte das suas antocianinas, que justifica sua tonalidade roxa tendendo para o rosa intenso. As antocianinas majoritárias são peonidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, peonidina 3-*O*-(6''-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, cianidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo e peonidina 3-*O*-(6''-*O*-*p*-hidroxibenzoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo. Além disso, outra característica importante que também diferencia essa variedade de outras de polpa roxa é a presença de grande número de acilações com ácido ferúlico nas suas antocianinas bem próximo da quantidade de acilações com ácido cafeico.

4.13 Análises do perfil e identificação das antocianinas isoladas e purificadas da batata-doce de pele branca e polpa roxa *in natura* por CLAE-DAD e IE-QTDV-EM²

A coluna cromatográfica que havia sido utilizada nas análises de antocianinas para a separação e análise do perfil na variedade de pele e polpa roxas foi danificada e teve que ser substituída por uma idêntica do mesmo fabricante. Desta forma, não foi possível utilizar a mesma coluna para as próximas análises cujos resultados serão discutidos a partir daqui. Infelizmente, houve alterações nos tempos de retenção e nas separações das antocianinas nas análises apresentadas daqui em diante, já que, desde o início do desenvolvimento das análises, a coluna anteriormente utilizada já não era nova, portanto já não apresentava as mesmas condições de uma coluna nova.

A Figura 112 apresenta um esquema do processo de extração, separação, isolamento e purificação para a identificação da antocianina coletada no pico 7 da batata-doce da variedade de pele branca e polpa roxa. Todo o processo para a identificação das antocianinas presentes em cada um dos picos separados foi realizado de forma semelhante, assim como foi feito com a batata-doce da variedade de pele e polpa roxas descrita anteriormente. As estruturas das antocianinas identificadas nessa variedade possuem a mesma estrutura molecular característica de antocianinas de batata-doce (Figura 12) e com o mesmo tipo de fragmentação com quebras nas ligações com a soforose e com a glicose exatamente como explicado anteriormente.

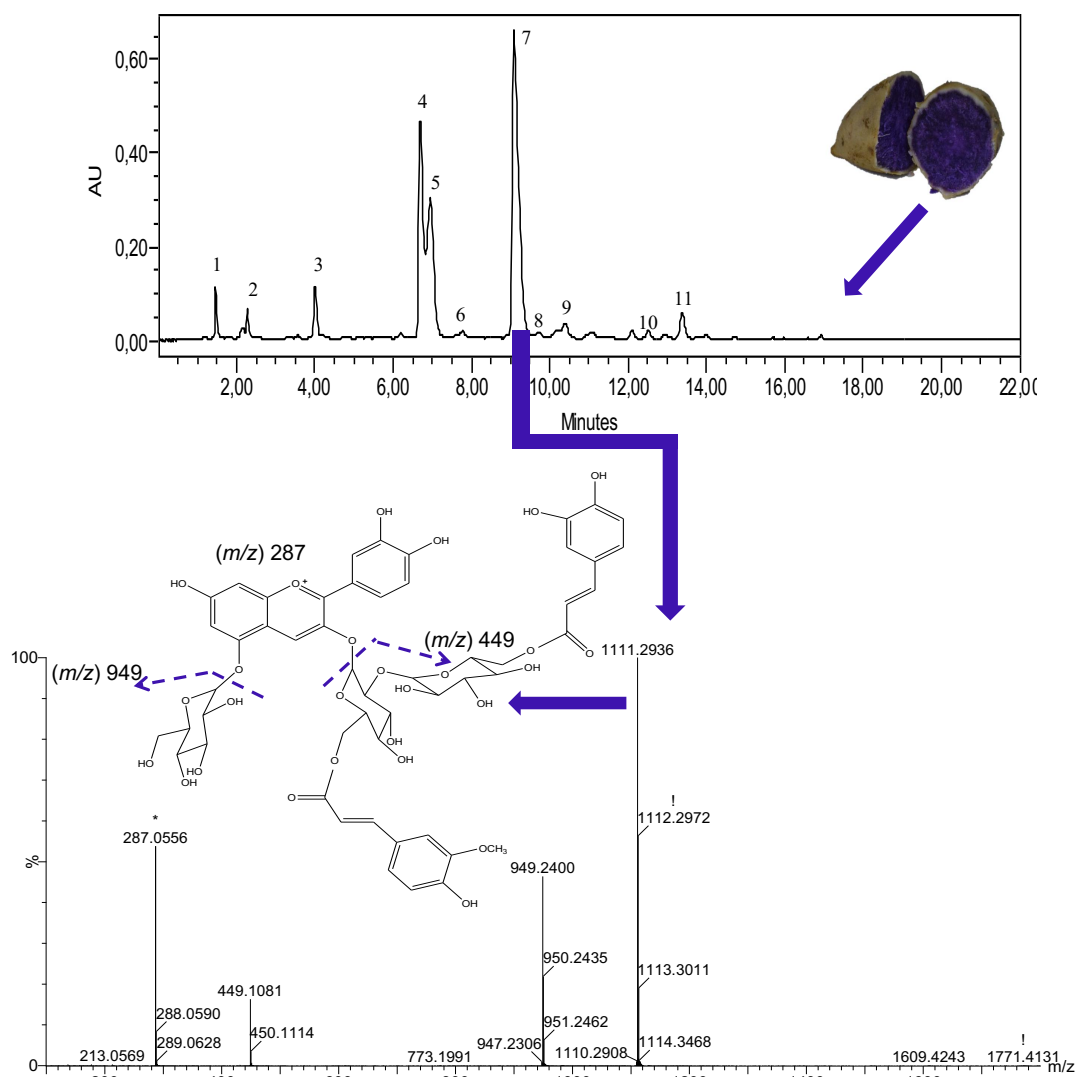


Figura 112 – Esquema do processo de separação, isolamento e purificação para a identificação das antocianinas executado. As setas, de cima para baixo, indicam a ordem das análises realizadas. As antocianinas extraídas da batata-doce de pele branca e polpa roxa *in natura* foram separadas por CLAE-DAD para obtenção do cromatograma mostrando onze picos em 525 nm. O pico sete foi coletado manualmente na saída do detector e depois analisado pelo QTDV-EM² para obter o espectro de massa que permitiu a identificação da estrutura molecular em comparação aos dados publicados por diversos autores. Esse mesmo procedimento foi feito para identificar as antocianinas presentes nos onze picos. Figura retirada do artigo publicado com resultados desta tese (JESUS et al., 2021).

A antocianina coletada no pico 1 não foi identificada porque a quantidade coletada foi insuficiente para as análises de QTDV-EM².

A antocianina coletada no pico 2 foi a de M⁺ m/z 935,2457 (ion precursor EM² m/z 935), correspondente a M⁺= $[C_{42}H_{47}O_{24}]^+$, fragmentos m/z 773,1924 [M-glicosil]⁺ (C₃₆H₃₇O₁₉), m/z 449,1084 [M-cafeoil-soforosil]⁺ e m/z 287,0556 [Cianidina]⁺ (Figura 113). Esta era a cianidina 3-O-(6-O'''-cafeoil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, previamente estudada (GRASS et al., 2017; HE et al., 2016; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; LEE et al., 2013; LUO et al., 2018; MONTILLA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2019b; TERAHARA et al., 2004; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; WANG et al., 2017; YOSHINAGA,

TANAKA, NAKATANI, 2000; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017), com o ácido cafeico na posição 6''', já que a intensidade do m/z 449 [M-feruloil-soforosil]⁺ é próxima da intensidade do m/z 773,1924 e do M⁺ m/z 935,2457 enquanto a intensidade do íon m/z 287 é muito mais alta (LEE et al., 2013).

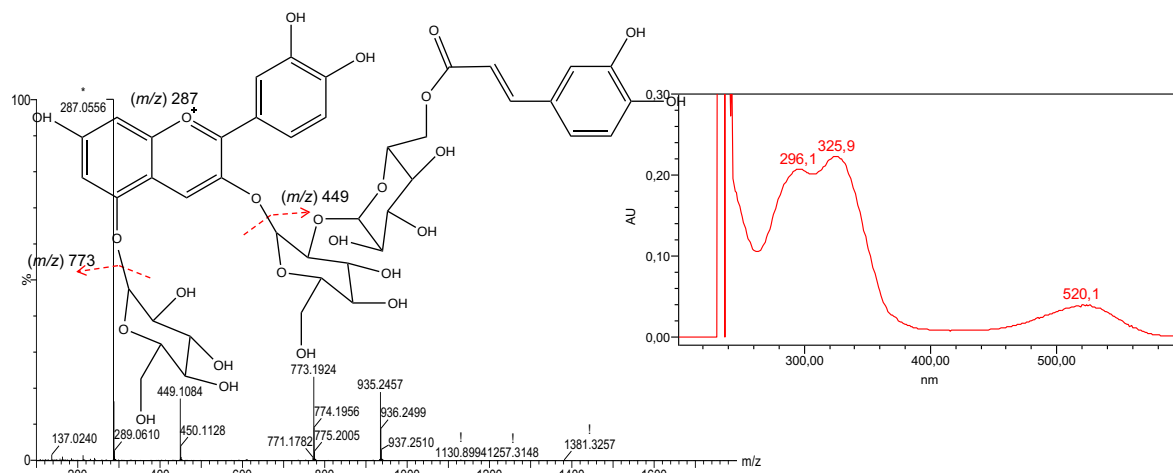


Figura 113 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6-O-feruloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 2 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

A antocianina detectada no pico 3 (Figura 114) foi a de M⁺ m/z 949,2604 (ion precursor EM² m/z 949), correspondente a M⁺=[C₄₃H₄₉O₂₄]⁺, fragmentos m/z 787,2113 [M-glicosil]⁺ (C₃₇H₃₉O₁₉), m/z 449,1113 [M-feruloil-soforosil]⁺ e m/z 287,0556 [Cianidina]⁺ (Figura 114), identificada como cianidina 3-O-(6''-O-feruloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, como na variedade anterior e como outros autores também identificaram (HE et al., 2016; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2019b; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; WANG et al., 2017; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017), acilada com feruloyl na posição 6'', já que a intensidade do m/z 449 [M-feruloil-soforosil]⁺ só é maior do que a intensidade do m/z 787,2113 e do (Lee et al., 2013).

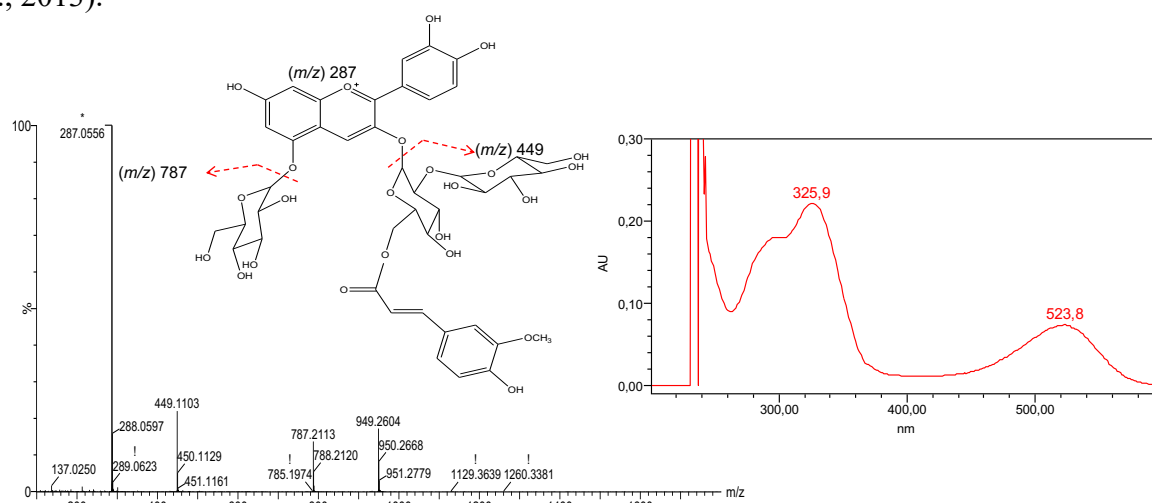


Figura 114 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-O-(6''-feruloil soforosídeo)-5-O-glicosídeo, coletada no pico 3 da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

A antocianina isolada no pico 4 (Figura 115), com M^+ m/z 1097.2778, correspondente a $M^+=[C_{51}H_{53}O_{27}]^+$, com fragmentos m/z 935,2229 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{45}H_{43}O_{22}$), 449,1082 $[M\text{-dicafeoil-soforosil}]^+$ e 287,0556 $[Cianidina]^+$, foi identificada como cianidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo como na variedade anterior (GRASS et al., 2017; HE et al., 2016; ISLAM et al., 2002; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; TERAHARA et al., 1999; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; WANG et al., 2017; YANG et al., 2019; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000).

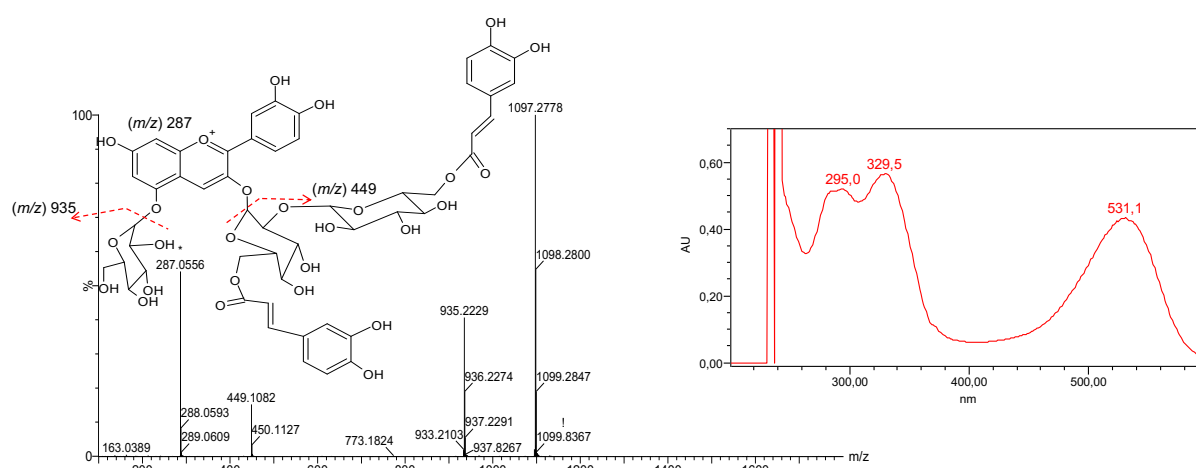


Figura 115 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 4 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

No pico 5 foi possível observar duas antocianinas distintas separadas através da seleção de seus íons precursores para EM², uma com m/z 935, isômera daquela identificada no pico 2 e outra com m/z 1055. Esse pico mostrou uma banda intensa no espectro de UV/Vis, indicativa de derivado de ácido hidroxicinâmico. A antocianina de M^+ m/z 935,2429 (ion precursor EM² m/z 935), correspondente a $M^+=[C_{42}H_{47}O_{24}]^+$, fragmentos m/z 773,1910 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{36}H_{37}O_{19}$), m/z 449,1080 $[M\text{-cafeoil-soforosil}]^+$ e m/z 287,0556 $[Cianidina]^+$ (Figura 116). Esta era a cianidina 3-*O*-(6-*O''*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, que desta vez apresenta o ácido cafeico na posição 6'', como previamente estudada (GRASS et al., 2017; HE et al., 2016; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; LEE et al., 2013; LUO et al., 2018; MONTILLA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2019b; TERAHARA et al., 2004; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010, 2012; WANG et al., 2017; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017). O ácido cafeico na posição 6'' a torna mais apolar do que aquela na qual o ácido cafeico está na posição 6''' (identificada no pico 2), o que explica a ordem de eluição entre estes isômeros, como constataram Lee et al. (2013).

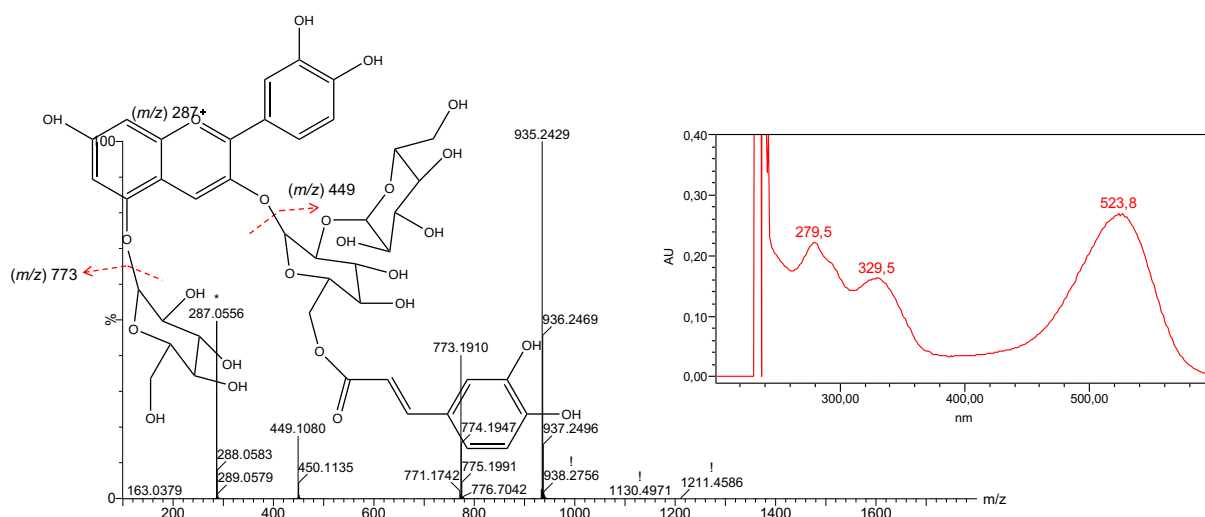


Figura 116 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6''-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 5 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

A outra antocianina identificada no pico 5 com M^+ m/z 1055,2670 $M^+=[C_{51}H_{53}O_{27}]^+$, com fragmentos m/z 893,2119 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{45}H_{43}O_{22}$), 449,1065 $[M\text{-}p\text{-hidroxibenzoil-cafeoil-soforosil}]^+$ e 287,0556 $[Cianidina]^+$, identificada como cianidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-hidroxibenzoil-6-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 117), como na variedade anterior e em outros estudos (HE et al., 2016; HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2019b; TERAHARA et al., 1999; TRUONG et al., 2010; WANG et al., 2017; YANG et al., 2019; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017).

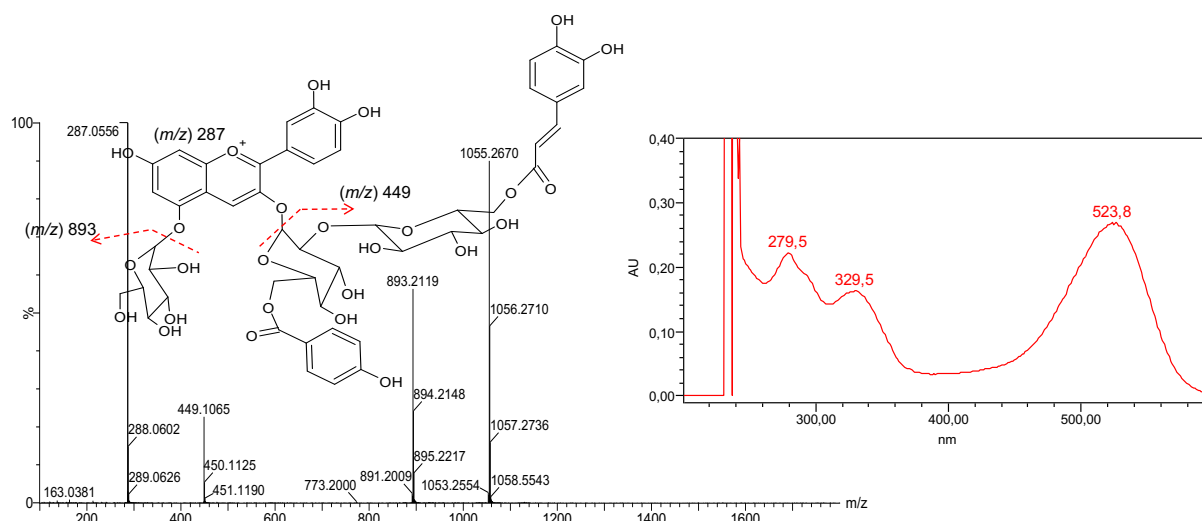


Figura 117 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil -6-*O*-*p*-hidroxibenzoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 5 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

A antocianina coletada no pico 6 não foi identificada porque a quantidade coletada foi insuficiente para as análises de QTdV-EM²

No pico 7, com intensa banda de derivado de ácido hidroxicinâmico no espectro UV/Vis como em antocianinas di-aciladas, uma antocianina foi observada com M⁺ *m/z* 1111,2936; correspondente ao M⁺=[C₅₂H₅₅O₂₇]⁺ (íon precursor EM² *m/z* 1111), fragmentos 949,2400 [M-glicosil]⁺ (C₄₆H₄₅O₂₂), 449,1081 [M-cafeoil-feruloyl-soforosil]⁺ e 287,0556 [Cianidina]⁺ foi identificada como cianidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 118) como na variedade anterior e como outros autores fizeram (HU et al., 2016; ISLAM et al., 2002; JIE et al., 2013; LEE et al., 2013; MONTILLA et al., 2010; TERAHARA et al., 1999; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010; YANG et al., 2019; YOSHINAGA, TANAKA, NAKATANI, 2000; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017).

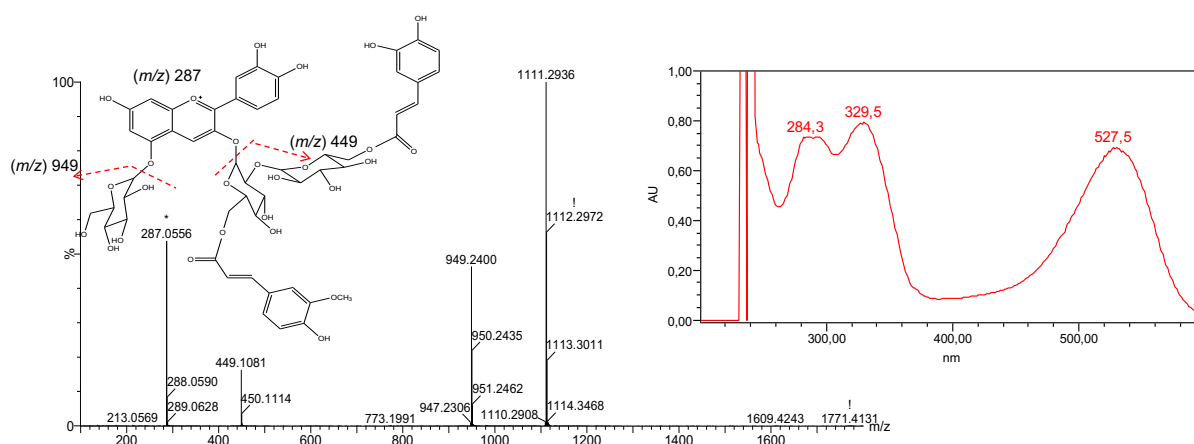


Figura 118 – - Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-feruloil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 7 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

No pico 8 com intensa banda de derivado de ácido hidroxicinâmico no espectro UV/Vis como em antocianinas di-aciladas, duas antocianinas foram identificadas com o mesmo M⁺ *m/z* 1081,2853, que corresponde a C₅₁H₅₃O₂₆ e o mesmo fragmento *m/z* 919,2318 [M-glicosil]⁺ (C₄₅H₄₃O₂₁), porém com outros fragmentos de diferentes *m/z*. Não foi possível separá-las na EM², pois possuem o mesmo íon precursor (*m/z* 1081), porém seus fragmentos se distinguem no mesmo espectro já que se originam de antocianidinas diferentes. Uma das antocianinas possuía além dos fragmentos já citados, os fragmentos específicos *m/z* 449,1078 [M-*p*-cumaroil-cafeoil-soforosil]⁺ e 287,0556 [Cianidina]⁺, identificada como cianidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil-6-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 119), que também foi detectada em batata-doce e em apenas três publicações (TERAHARA et al., 2004; TIAN et al., 2005; TRUONG et al., 2010).

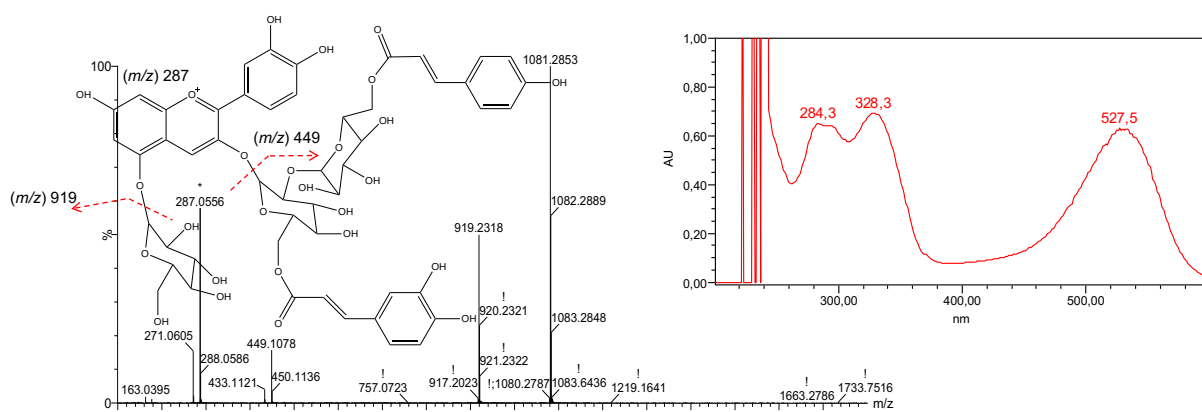


Figura 119 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6-*O*-cumaroil-6-*O*-cafeoil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 8 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

A outra antocianina possuía além dos fragmentos já citados, os fragmentos específicos m/z 433,1121 [M-dicafeoil-soforosil]⁺ e 271,0605 [Pelargonidina]⁺, identificada como Pelargonidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 120), detectada em batata-doce pela primeira vez por Lee et al. (2013).

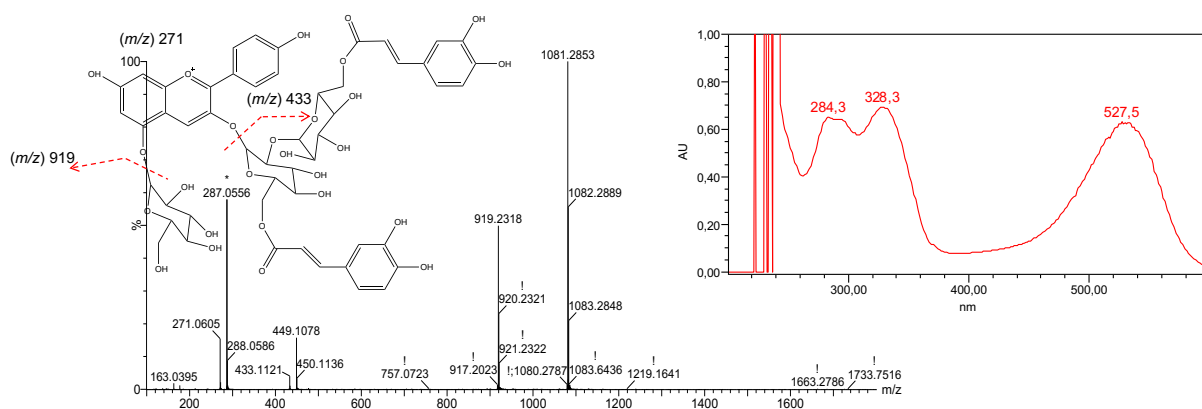


Figura 120 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da pelargonidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 8 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

Duas antocianinas foram identificadas no pico 9, ambas com M⁺ m/z 1111,2953, que corresponde a M⁺=[C₅₂H₅₅O₂₇]⁺ e fragmentos m/z 949,2413 [M-glicosil]⁺ (C₄₆H₄₅O₂₂) porém com outros fragmentos de diferentes m/z . Não foi possível separá-las na EM², pois possuem o mesmo íon precursor (m/z 1111), porém seus fragmentos se distinguem no mesmo espectro já que se originam de antocianidinas diferentes. Uma delas com os fragmentos m/z 463,1266 [M-dicafeoil-soforosil]⁺ e 301,0712 [Peonidina]⁺, foi identificada como peonidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figure 121) como na variedade de batata-doce anterior.

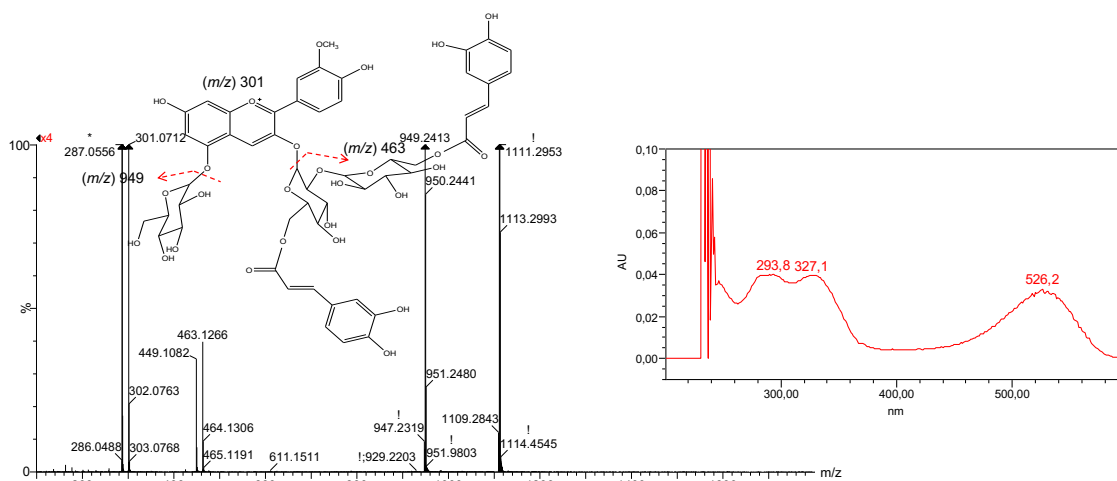


Figura 121 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 9 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

A outra antocianina com os fragmentos 449,1082 [M-cafeoil-feruloyl-soforosil]⁺ e 287,0556 [Cianidina]⁺ foi identificada como cianidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 122) que diferente daquela de mesmo M⁺ encontrada no pico 7, provavelmente porque deve ter os ácidos cafeico e ferúlico em posições trocadas assim como ocorreu na variedade anterior.

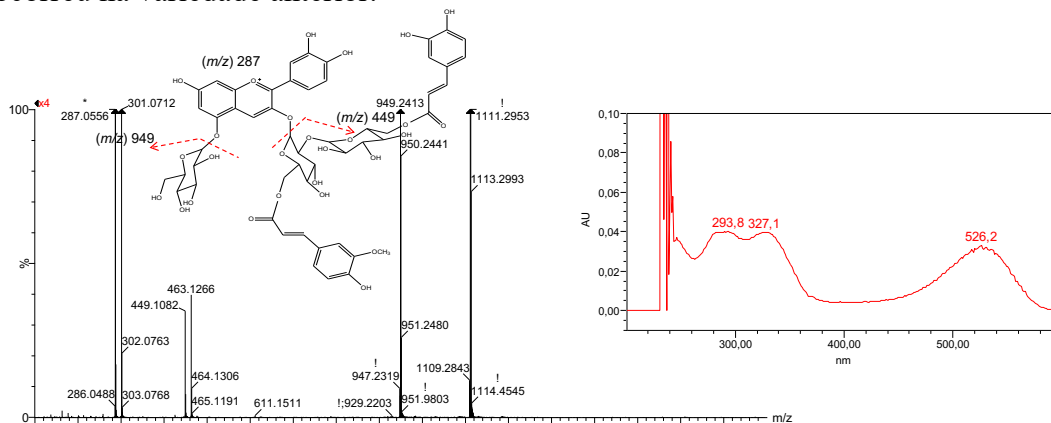
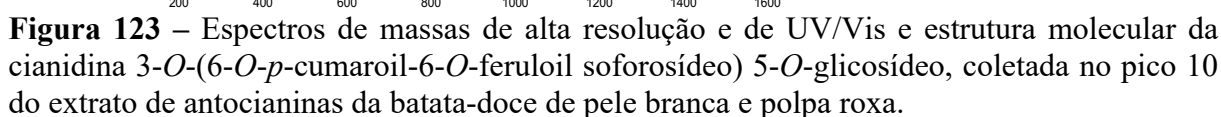
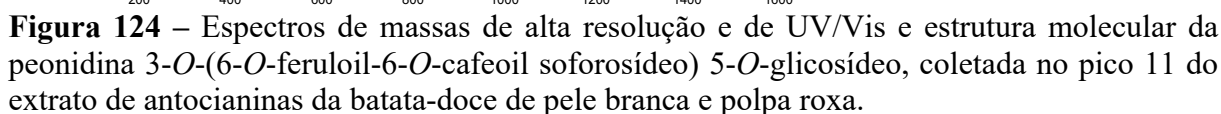


Figura 122 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da cianidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-feruloil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 9 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

Uma antocianina foi identificada no pico 10 (Figura 123), com espectro de UV/Vis característico de diacilação com ácidos derivados de cinâmico, com M⁺ *m/z* 1095,2661, que corresponde a M⁺= $[C_{52}H_{55}O_{26}]^+$ (ion precursor EM² *m/z* 1095), fragmentos 933,2448 [M-glicosil]⁺ (C₄₆H₄₅O₂₁), 449,1069 [M-cumaroil-feruloyl-soforosil]⁺ e 287,0556 [Cianidina]⁺ foi identificada como cianidina 3-*O*-(6-*O*-cumaroil-6-*O*-feruloil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo como em Tian et al. (2005).



A antocianina com $M^+ m/z$ 1125,3073 que corresponde a $M^+=[C_{53}H_{57}O_{27}]^+$, e fragmentos m/z 963,2545 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{47}H_{47}O_{22}$); 463,1237 $[M\text{-feruloil-cafeoil-soforosil}]^+$ e 301,0712 $[Peonidina]^+$ foi identificada como peonidina 3-*O*-(6-*O*-feruloil-6-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo (Figura 124), similar à antocianina identificada na variedade anterior.



Já as duas antocianinas com M^+ m/z 1095,2893, que corresponde a $M^+=[C_{52}H_{55}O_{26}]^+$ e fragmentos m/z 933,2413 $[M\text{-glicosil}]^+$ ($C_{46}H_{45}O_{21}$) porém com outros fragmentos de diferentes m/z não foram separadas na EM², porém foram distinguidas, já que se originam de antocianidinas diferentes. Uma delas com os fragmentos m/z 463,1244 $[M\text{-cumaroil-cafeoil-soforosil}]^+$ e 301,0712 $[Peonidina]^+$, foi identificada como peonidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil-6-*O*-cafeoil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo (Figura 125) como fizeram os autores Lee et al. (2013) e Wang et al. (2017).

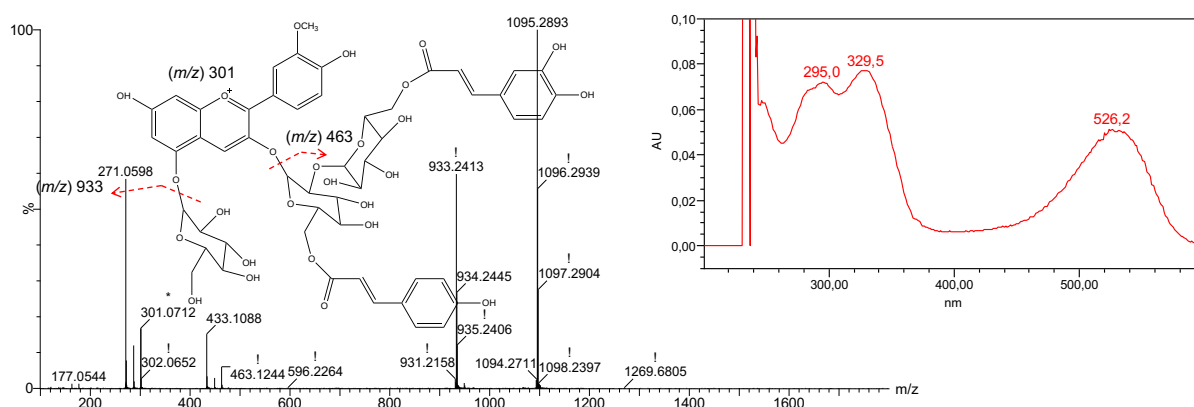


Figura 125 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da peonidina 3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil-6-*O*-cafeoil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 11 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

A outra antocianina com os fragmentos m/z 433,1088 $[M\text{-feruloil-cafeoil-soforosil}]^+$ e 271,07598 $[Pelargonidina]^+$, foi identificada como pelargonidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-feruloil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo (Figura 126) como fizeram pela primeira vez Lee et al. (2013).

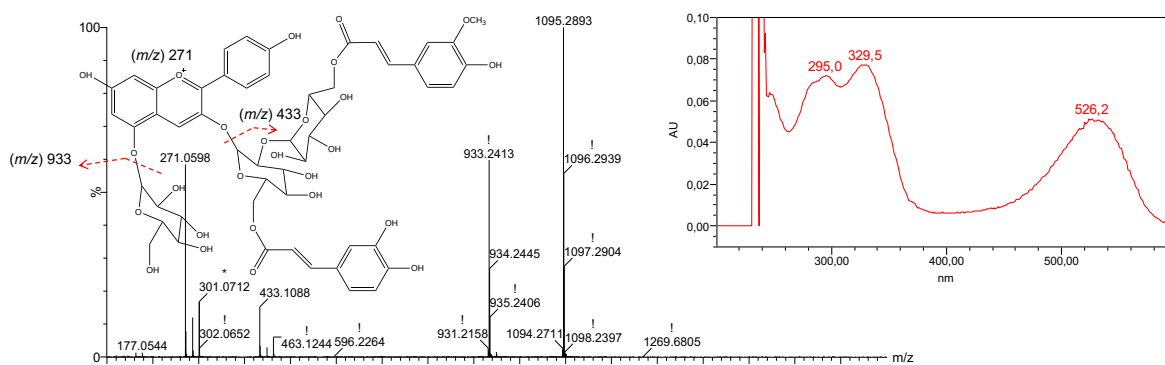


Figura 126 – Espectros de massas de alta resolução e de UV/Vis e estrutura molecular da pelargonidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-feruloil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo, coletada no pico 11 do extrato de antocianinas da batata-doce de pele branca e polpa roxa.

A tabela 46 resume as informações cromatográficas e espectrais (UV/Vis e MS²) das antocianinas detectadas na batata-doce de pele branca e polpa roxa. A principal característica dessa variedade de batata-doce de pele branca e polpa roxa, que a diferencia das demais variedades de polpa roxa é a predominância de derivados de cianidina entre as suas antocianinas, que explica a coloração roxa com tonalidade azulada. As majoritárias são cianidina 3-O-(6-O-cafeoil-6-O-feruloil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, cianidina 3-O-(6'',6'''-O-dicafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo, cianidina 3-O-(6-O-cafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo e cianidina 3-O-(6-O-cafeoil -6-O-p-hidroxibenzoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo. Além disso, as antocianinas dessa variedade são na maior parte aciladas com ácido cafeico. A presença minoritária de antocianinas derivadas de pelargonidina é bastante raro em batatas-doces de polpa roxa, portanto, é um diferencial marcante dessa variedade.

Tabela 8 - Dados espectrais e cromatográficos obtidos para as antocianinas identificadas na batata doce de pele branca e polpa roxa.

No. Antocianina	No. Pico	t _R (min)	M ⁺ (m/z)	ions fragmentos (m/z)	λ _{UV/Vis} max (nm)	Composto / Formula Molecular
1	2	2,21	935,2457	773,1924; 449,1084; 287,0556	296, 326, 520	Cianidina 3-O-(6-O'''-cafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo / C ₄₂ H ₄₇ O ₂₄
2	3	3,83	949,2604	787,2113; 449,1103; 287,0556	299, 326, 524	Cianidina 3-O-(6''-O-feruloil soforosídeo) 5-O-glicosídeo / C ₄₃ H ₄₉ O ₂₄
3	4	6,25	1097,2778	935,2229; 449,1082; 287,0556	295, 330, 531	Cianidina 3-O-(6'',6'''-O-dicafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo / C ₅₁ H ₅₃ O ₂₇
4	5	6,52	935,2429	773,1910; 449,1080; 287,0556	280, 330, 524	Cianidina 3-O-(6-O-cafeoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo / C ₄₂ H ₄₇ O ₂₄
5	5	6,52	1055,2670	893,2119; 449,1065; 287,0556	280, 330, 524	Cianidina 3-O-(6-O-cafeoil -6-O-p-hidroxibenzoil soforosídeo) 5-O-glicosídeo / C ₄₉ H ₅₁ O ₂₆
6	7	8,51	1111,2936	949,2400; 449,1081; 287,0556	284, 330, 528	Cianidina 3-O-(6-O-cafeoil-6-O-feruloil soforosídeo) 5-O-glicosídeo / C ₅₂ H ₅₅ O ₂₇
7	8	9	1081,2853	919,2318; 449,1078; 287,0556	284, 328, 528	Cianidina 3-O-(6-O-p-cumaroil-6-O-cafeoil soforosídeo) 5- glicosídeo / C ₅₁ H ₅₃ O ₂₆
8	8	9	1081,2853	919,2318; 443,1121; 271,0605	284, 328, 528	Pelargonidina 3-O-(6'',6'''-O-dicafeoil soforosídeo) 5-glicosídeo / C ₅₁ H ₅₃ O ₂₆
9	9	9,75	1111,2953	949,2413; 463,1266; 301,0712	294, 327, 526	Peonidina 3-O-(6'',6'''-O-dicafeoil soforosídeo 5-glicosídeo / C ₅₂ H ₅₅ O ₂₇
10	9	9,75	1111,2953	949,2413; 449,1082; 287,0556	294, 327, 526	Cianidina 3-cafeoil feruloil soforosídeo 5-glicosídeo / C ₅₂ H ₅₅ O ₂₇
11	10	11,79	1095,2961	933,2448; 449,1069; 287,0556	295, 326, 526	Cianidina 3-O-(6-O-p-cumaroil-6-O-feruloil soforosídeo 5-glicosídeo / C ₅₂ H ₅₅ O ₂₆
12	11	12,65	1125,3073	963,2545; 463,1237; 301,0712	295, 330, 526	Peonidina 3-feruloil cafeoil soforosídeo 5-glicosídeo / C ₅₃ H ₅₇ O ₂₇
13	11	12,65	1095,2893	933,2413; 463,1244; 301,0712	295, 330, 526	Peonidina 3-p-cumaroil cafeoil soforosídeo 5- glicosídeo / C ₅₂ H ₅₅ O ₂₆
14	11	12,65	1095,2893	933,2413; 433,1088; 271,0598	295, 330, 526	Pelargonidina 3-cafeoil feruloil soforosídeo 5- glicosídeo / C ₅₂ H ₅₅ O ₂₆

t_R – tempo de retenção

4.14 Comparação dos perfis e quantificação das antocianinas por CLAE-DAD, quantificação de antocianinas totais por Espectrofotometria UV/Vis e pelo método do pH diferencial das variedades de batatas-doces de polpa roxa *in natura*, cozida e frita

A Figura 127 mostra uma comparação dos perfis cromatográficos das antocianinas das batatas-doces das duas variedades de polpas roxas estudadas que foram obtidos nas mesmas condições cromatográficas para as amostras *in natura*, cozidas e fritas. Houve diferença entre os perfis das duas variedades, como já havia sido apresentado anteriormente, devido às diferenças nas antocianinas encontradas entre as variedades. Não houve diferenças entre os perfis de cada uma das variedades conforme os processamentos, embora pode ser observado que os materiais cozidos e fritos apresentam picos de maior intensidade (mais concentrados) do que os materiais *in natura*.

Em relação aos perfis apresentados anteriormente nas etapas de identificação das antocianinas por IES-QTdV-EM², o único perfil que teve variações de separação e de tempos de retenção foi o da batata-doce de pele e polpa roxas, já que após aquela etapa de identificação das antocianinas nessa variedade, houve substituição da coluna cromatográfica, como explicado anteriormente.

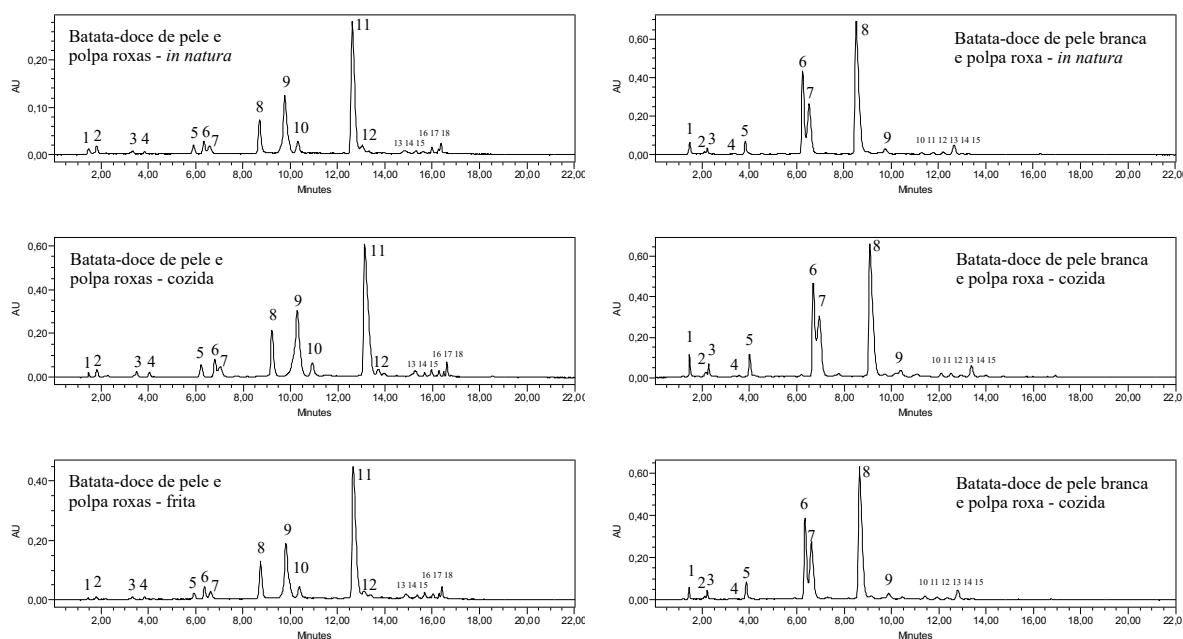


Figura 127 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de antocianinas das batatas-doces de pele e polpa roxas (esquerda) e pele branca e polpa roxa (direita) em 530 nm.

Para confirmar que realmente não houve alterações nas antocianinas durante os processos de cozimento e fritura, cada um dos picos detectados nos cromatogramas das amostras *in natura*, cozidas e fritas das duas variedades de polpa roxa estudadas, tiveram seus espectros de UV/Vis comparados. Os espectros estão apresentados nas Figuras de 128 a 131 para a variedade de pele e polpa roxas. Já os espectros da variedade de pele branca e polpa roxa estão apresentados nas Figuras 132 a 134. Pode ser verificado que os espectros não foram alterados entre as amostras *in natura*, cozidas e fritas.

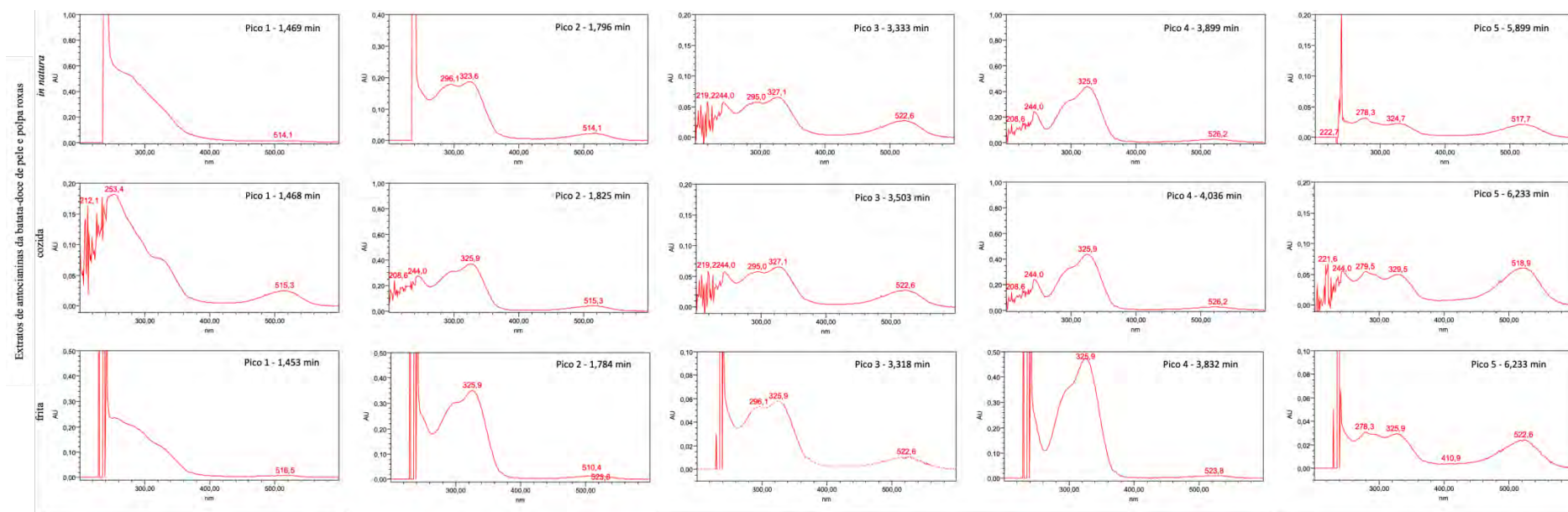


Figura 128 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 1 a 5 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele e polpa roxas *in natura*, cozida e frita.

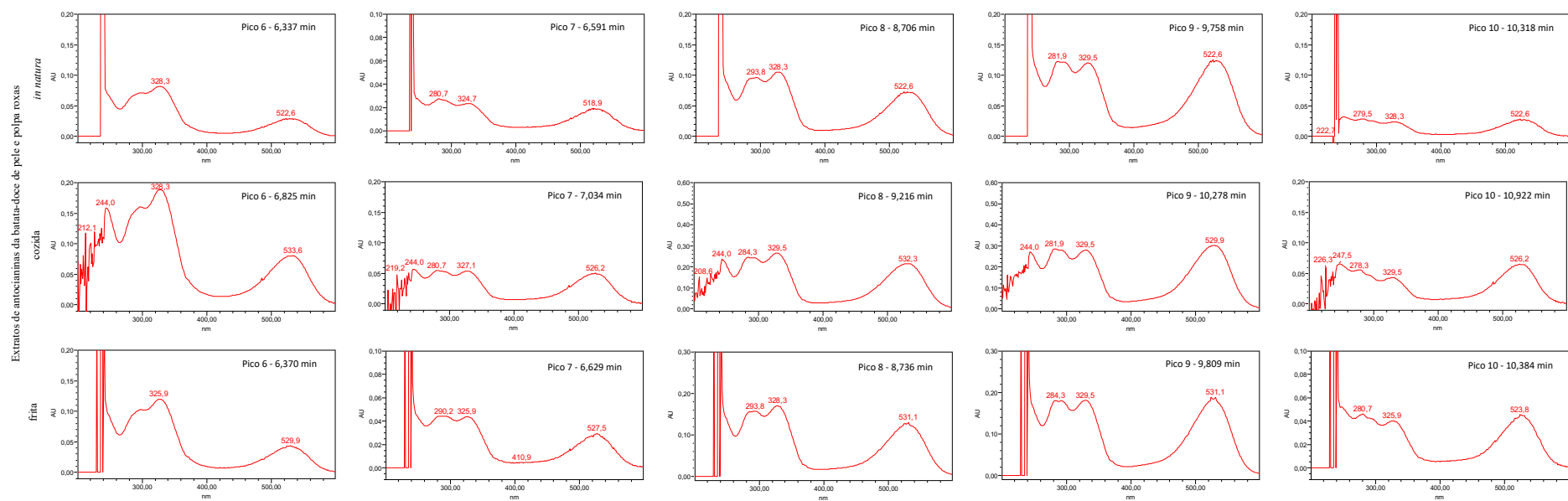


Figura 129 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 6 a 10 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele e polpa roxas *in natura*, cozida e frita.

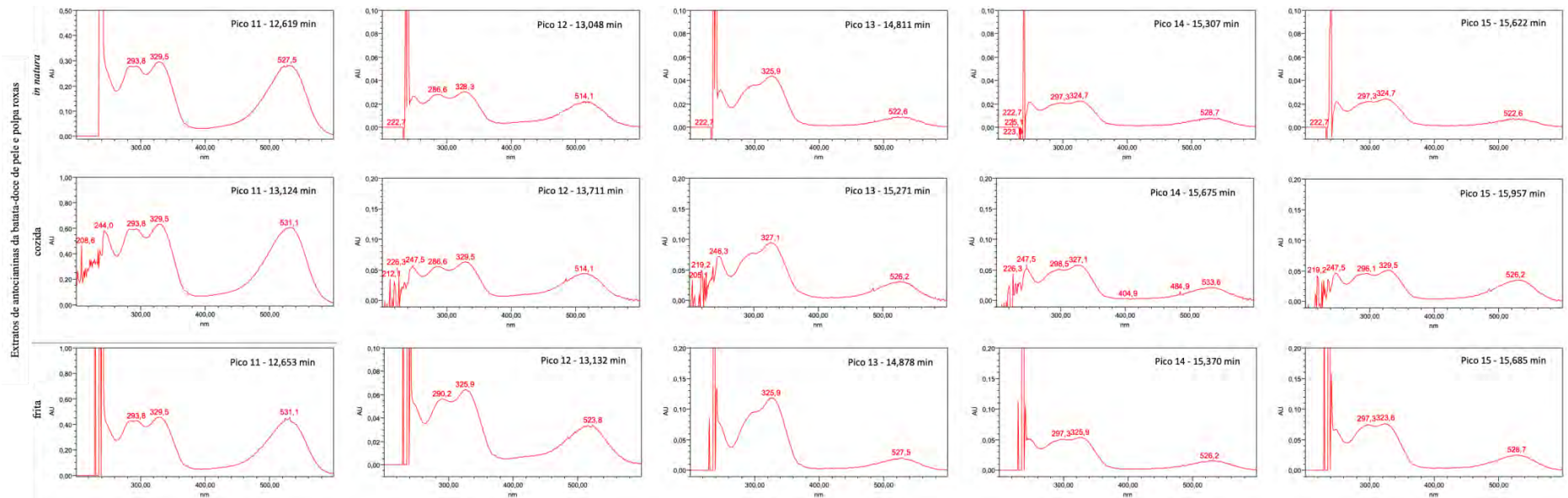


Figura 130 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 11 a 15 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele e polpa roxas *in natura*, cozida e frita.

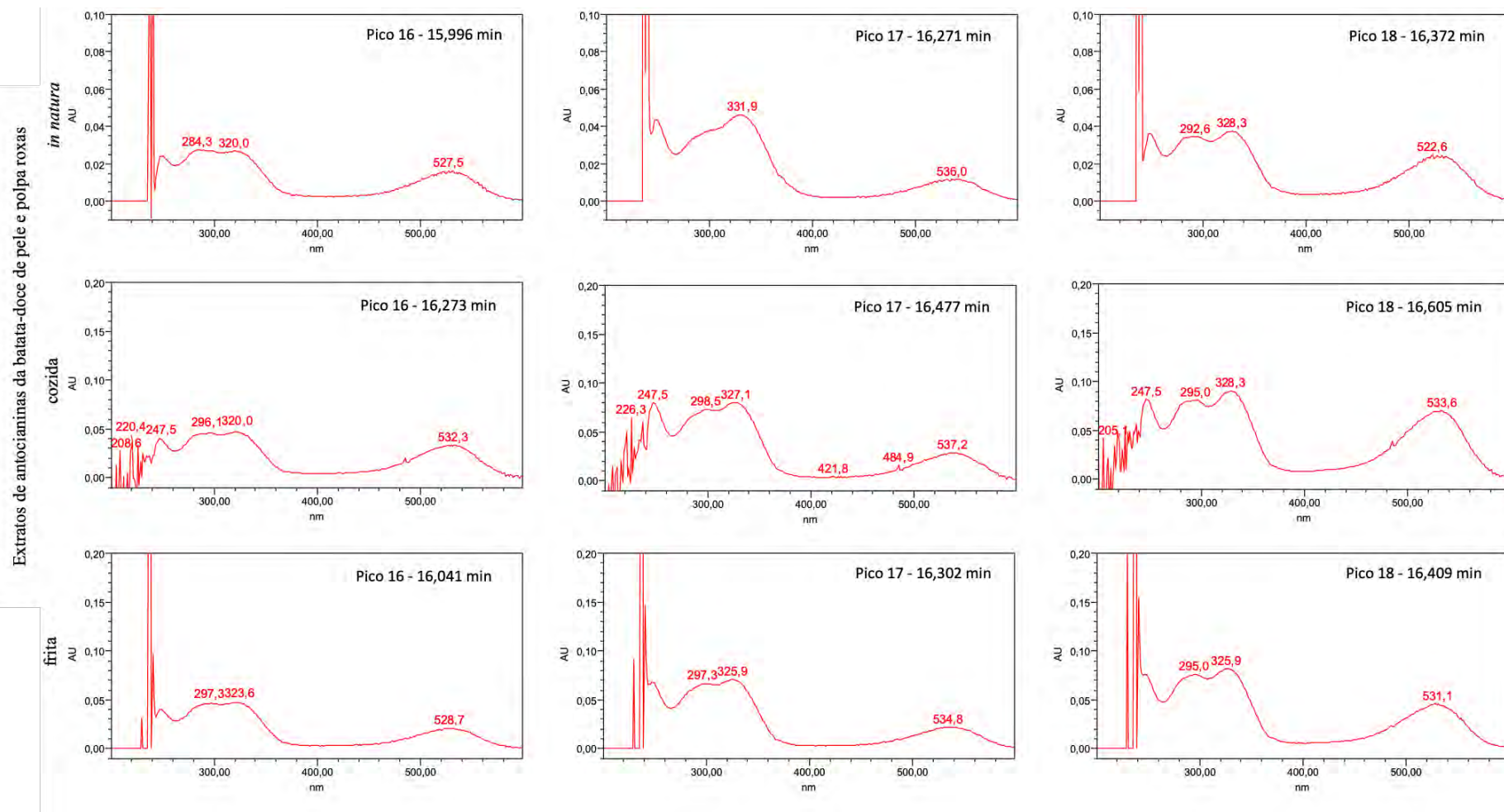


Figura 131 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 16 a 18 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele e polpa roxas *in natura*, cozida e frita.

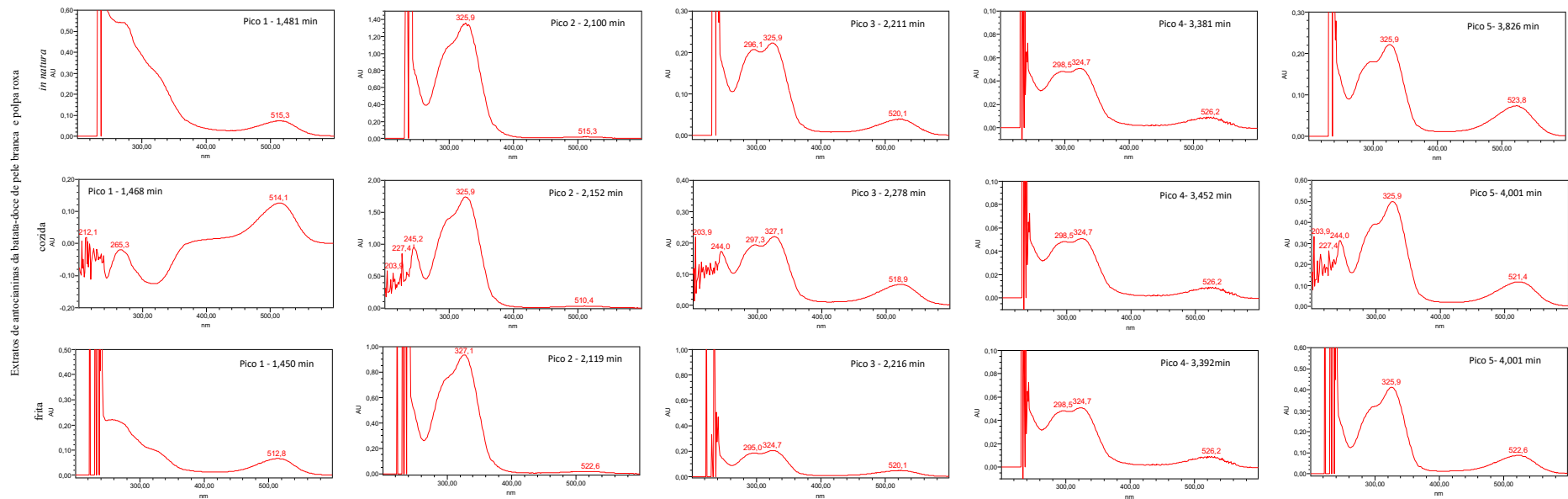


Figura 132 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 1 a 5 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele branca e polpa roxa *in natura*, cozida e frita.

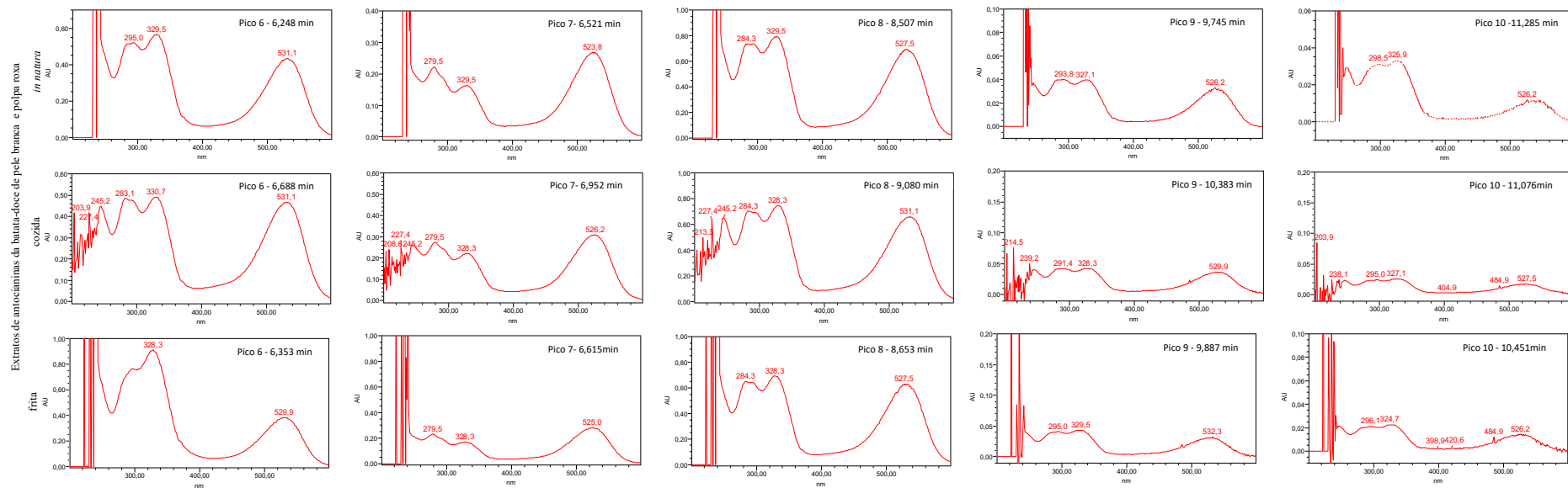


Figura 133 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 6 a 10 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele branca e polpa roxa *in natura*, cozida e frita.

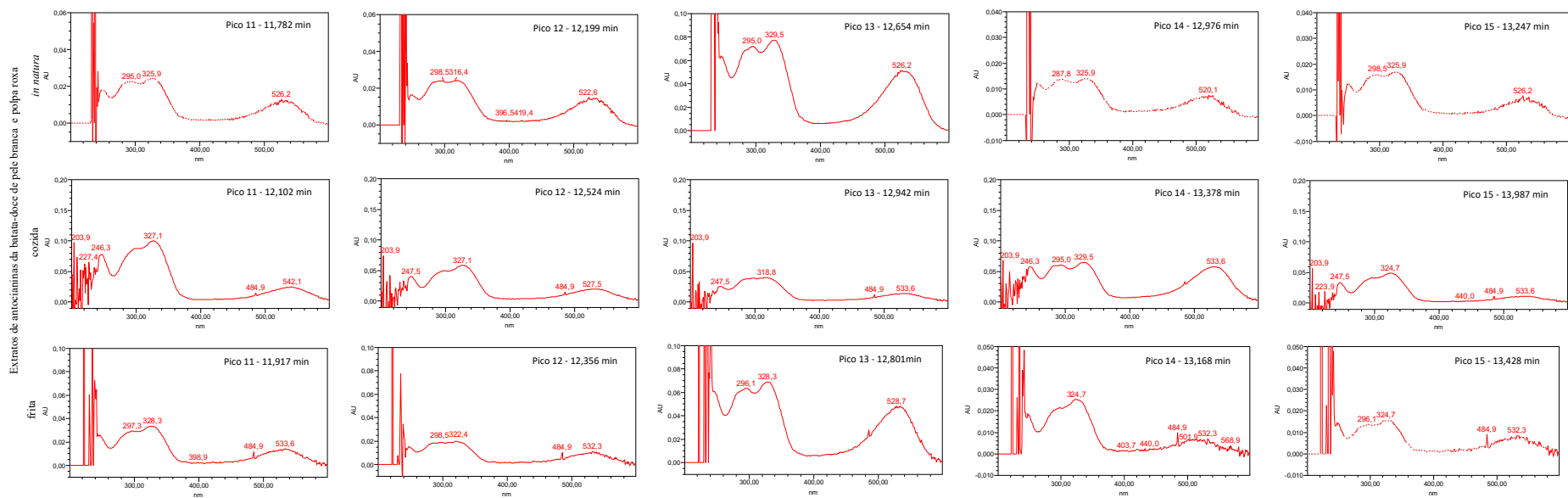


Figura 134 – Espectros UV/Vis obtidos por CLAE-DAD dos picos de 11 a 15 de antocianinas dos extratos das batatas-doces de pele branca e polpa roxa *in natura*, cozida e frita.

A Figura 135 apresenta a curva de calibração construída com o padrão de cianidina-3-glicosídeo para quantificação das antocianinas por CLAE-DAD, na qual a soma das áreas dos picos das antocianinas foram substituídas em Y para os cálculos de concentração.

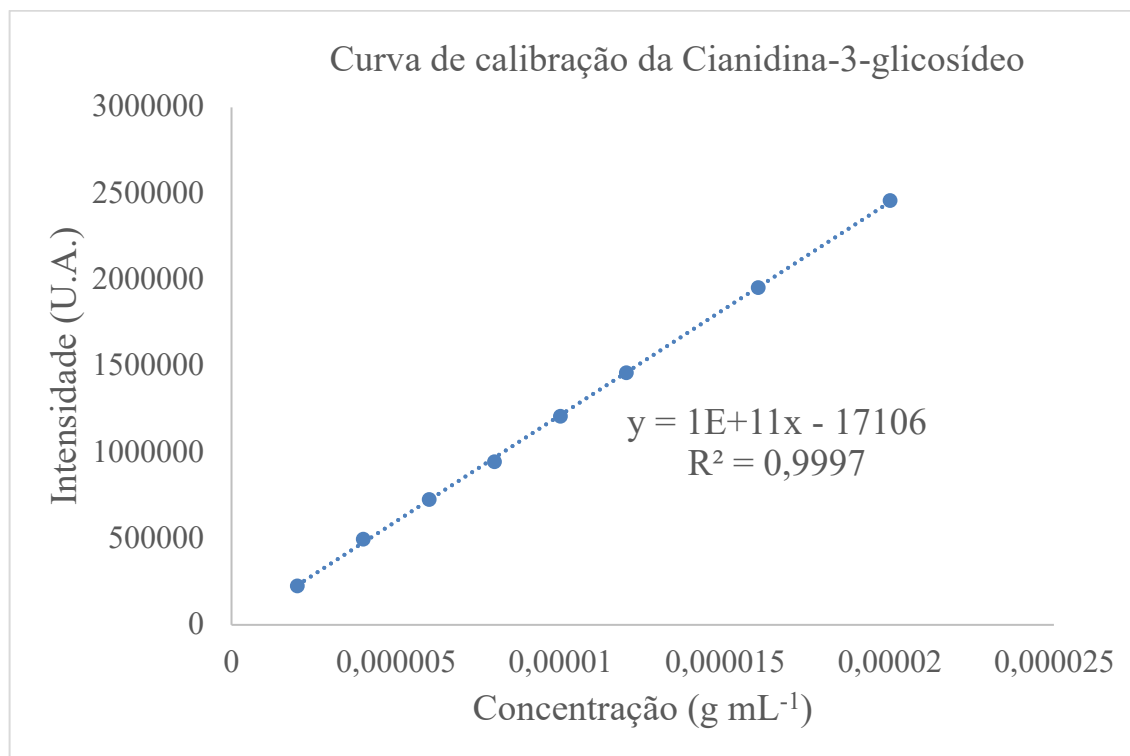


Figura 135 – Curva de calibração da cianidina-3-glicosídeo em 520 nm por CLAE-DAD (Área (U.A.) X Concentração (mg mL⁻¹)) com a Equação utilizada para o cálculo das concentrações dos extratos de antocianinas de batata-doce em equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por CLAE-DAD.

A Tabela 47 do APÊNDICE A mostra os valores das concentrações de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo obtidas através dos métodos de leitura em espectrometria UV/Vis, do pH diferencial e por CLAE-DAD para as amostras da variedade de batatas-doce de pele e polpa roxas *in natura*. Para o método da espectrometria UV/Vis a média de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo foi de 27,47 mg 100⁻¹ g⁻¹ em BS, enquanto pelo pH diferencial foi de 11,44 mg 100⁻¹ g⁻¹ em BS e por CLAE-DAD foi 13,32 mg 100⁻¹ g⁻¹ em BS, sendo estes dois últimos sem diferença significativa (Quadro 17). O método de espectrometria UV/Vis apresentou resultado maior do que o dobro dos demais métodos. Isso ocorre devido a dois erros que subestimam os valores.

O primeiro erro, foi explicado anteriormente, ocorre no método do pH diferencial no qual as leituras foram realizadas conforme o método em pHs genéricos que, de acordo com o método, devem ser utilizados para antocianinas de modo geral. Porém, as antocianinas da batata-doce das variedades estudadas possuem pHs ideais para as leituras diferentes daqueles indicados na metodologia do pH diferencial, como explicado no subitem 4.11. Sendo assim, as leituras foram realizadas no pH 1,0 e 4,5 esperando a maior intensidade de cor das antocianinas no pH 1,0 e nenhuma coloração referente a antocianinas no pH 4,5. Ocorre que, nas antocianinas das batatas-doces de polpas roxas estudadas, o pH no qual ocorre a maior

intensidade de cor é 2,3 enquanto apenas acima do pH 6 elas perdem a cor. Desta forma, os resultados obtidos foram subestimados.

Já no método CLAE-DAD a subestimação ocorreu devido à grande quantidade de antocianinas minoritárias cujos picos separados possuem intensidades muito baixas e ficam fora da faixa linear da curva de calibração obtida, muitas vezes se perdendo quando confundidos com os ruídos da linha base. O resultado foi obtido a partir da soma de todas as áreas dos picos das antocianinas detectadas, porém ainda assim foram subestimados, já que ocorre perda de sensibilidade, com curvas de inclinações mais suaves, quando se trabalha com concentrações em faixas menores. O que mostra que o erro da subestimação é grande quando o cálculo é realizado por DAD pelo somatório de áreas em faixas inferiores à curva de calibração.

Neste caso, o ideal para a quantificação de antocianinas totais foi o método da espectrometria UV/Vis. O método do pH diferencial poderia não ter apresentado resultados tão diferentes se utilizado nos pH's ideais para as antocianinas de batata-doce. E, o método CLAE-DAD só pode ser usado nos casos em que os picos das antocianinas separadas ficam dentro da faixa da curva de calibração, mesmo antes de serem somados.

A Tabela 48 do APÊNDICE A mostra os valores das concentrações de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo obtidas através dos métodos de leitura em espectrometria UV/Vis, do pH diferencial e por CLAE-DAD para as amostras da variedade de batata-doce de pele e polpa roxas cozidas. Para o método da espectrometria UV/Vis a média de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo foi de $92,46 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, enquanto pelo pH diferencial foi de $55,85 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS e por CLAE-DAD foi $67,75 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, sendo estes dois últimos sem diferença significativa (Quadro 18 do APÊNDICE A).

A Tabela 49 do APÊNDICE A mostra os valores das concentrações de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo obtidas através dos métodos de leitura em espectrometria UV/Vis, do pH diferencial e por CLAE-DAD para as amostras da variedade de batatas-doce de pele e polpa roxas fritas. Para o método da espectrometria UV/Vis a média de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo foi de $87,91 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, enquanto pelo pH diferencial foi de $34,35 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS e por CLAE-DAD foi $33,11 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, sendo estes dois últimos sem diferença significativa (Quadro 19 do APÊNDICE A).

Os mesmos erros explicados anteriormente ocorreram para as quantificações realizadas através dos métodos do pH diferencial e por CLAE-DAD nas amostras *in natura* cozidas e fritas das duas variedades de batata-doce de polpa roxa.

Para a variedade de pele branca e polpa roxa *in natura*, a Tabela 50 do APÊNDICE A mostra que para o método da espectrometria UV/Vis a média de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo foi de $27,44 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, enquanto pelo pH diferencial foi de $13,23 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS e por CLAE-DAD foi $24,88 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, sendo estes dois últimos diferentes significativamente enquanto os dois primeiros valores não foram diferentes significativamente (Quadro 20 do APÊNDICE A).

Para a variedade de pele branca e polpa roxa cozida, a Tabela 51 do APÊNDICE A mostra que para método da espectrometria UV/Vis a média de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo foi de $91,71 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, enquanto pelo pH diferencial foi de $50,26 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS e por CLAE-DAD foi $68,08 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, sendo apenas os valores dos métodos da espectrometria UV/Vis e pH diferencial significativamente diferentes (Quadro 21 do APÊNDICE A).

Para a variedade de pele branca e polpa roxa frita, a Tabela 52 do APÊNDICE A mostra que para o método da espectrometria UV/Vis a média de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo foi de $105,35 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, enquanto pelo pH diferencial foi de $44,72 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS e por CLAE-DAD foi $55,86 \text{ mg } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, sendo que estes dois últimos valores não foram diferentes significativamente (Quadro 22 do APÊNDICE A).

Sabendo dos problemas que causaram a subestimação dos resultados de antocianinas totais pelos métodos do pH diferencial e por CLAE-DAD, considerou-se correto comparar os resultados obtidos apenas pelo método da espectrofotometria UV/Vis, que se mostrou mais apropriado para os casos das variedades de batata-doce estudadas. Sendo assim, o Quadro 23 do APÊNDICE A apresenta o resultado dessa comparação, evidenciando que os resultados de antocianinas totais em equivalentes de cianidina-3-glicosídeo não foram significativamente diferentes nas amostras *in natura* de ambas as variedades. Também, os resultados para ambas as variedades cozidas e fritas não foram significativamente diferentes, embora foram bem mais altos (3 vezes maiores) do que aqueles das amostras *in natura*.

Os teores esperados de antocianinas em variedades de batata-doce de polpa roxa variam de 32 a 1390 mg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por 100 g do material seco (WANG; NIE; ZHU, 2016). Sendo assim, os teores encontrados para as variedades de pele roxa e de pele branca *in natura*, 27,47 e 27,44 mg 100⁻¹ g⁻¹ em BS, respectivamente, ficaram abaixo do esperado. Porém isso ocorreu devido à dificuldade de extração das antocianinas no material *in natura*, mesmo depois do processo de liofilização, que facilita a extração, porém observou-se que grande parte das antocianinas ficam retidas no amido e não são esgotadas mesmo após vários ciclos de extração. Esse problema não ocorreu com os materiais que passaram por cozimento ou fritura antes da liofilização.

Ficou evidente que os teores de antocianinas totais aumentaram muito em função do cozimento e fritura. Durante a extração dos materiais cozidos e fritos foi notável a facilidade na extração com maior liberação das antocianinas adsorvidas ou ligadas ao amido em comparação aos materiais *in natura*. Os processos de cozimento e fritura, pela gelatinização do amido podem ter substituído as antocianinas adsorvidas ao amido por moléculas de água, tornando-as livres para a extração. Lemos, Aliyu e Hungerford (2015) observaram também o aumento de teores de antocianinas em amostras de Purple Majesty potato (*Solanum tuberosum*) após processos de cozimento em água, em forno, em micro-ondas e à vapor quando comparados ao material cru. Os autores também perceberam maior facilidade na extração das antocianinas após cozimento e atribuíram o fenômeno ao rompimento celular com maior liberação das antocianinas.

Durante os processos de extração, ao perceber essa característica foram testadas extrações utilizando aquecimento brando para tentar extrair mais antocianinas dos materiais *in natura*, cozidos e fritos, após a liofilização. Porém, em temperaturas mais altas do que 40 °C ocorre a gelatinização do amido com aumento brusco da viscosidade dos materiais tornando inviável o trabalho com as soluções, sem aumento da liberação das antocianinas para a solução. Percebeu-se que após o processo de liofilização, as antocianinas são extraídas com maior facilidade, porém no material *in natura*, ainda permanecia uma grande quantidade adsorvida no amido, mesmo após vários ciclos de extração, impossibilitando a extração total. Os autores citados também liofilizaram suas amostras cruas e cozidas antes da extração com solução de metanol:água 50%.

Ao analisar os resultados não foi possível observar transformações, degradações ou perdas de antocianinas devido ao cozimento ou fritura, já que os teores aumentaram devido a estes processamentos. O mais provável é que não tenha ocorrido perdas e degradações, já que os perfis cromatográficos dos materiais e os espectros de UV/Vis dos picos não se alteraram após os processamentos.

Sendo assim, já que as antocianinas destas variedades de batatas-doces são estáveis ao aquecimento da forma como foram submetidas nos processos de cozimento e fritura, pode ser sugerido um novo método para a extração mais eficiente e completa das antocianinas em batatas-doces de polpa roxa *in natura*, que inclua uma etapa de cozimento dos materiais antes da liofilização para facilitar a desorção das antocianinas do amido.

4 CONCLUSÕES

Este estudo gerou informações agronômicas do cultivo de quatro variedades de batata-doce coloridas sob o manejo orgânico, que são ainda muito escassas, além de informações inéditas acerca da elucidação estrutural dos pigmentos investigados e, finalmente, do comportamento dessas substâncias diante das formas de consumo e o grande potencial para uso como corante natural com propriedades funcionais (antioxidante e pró-vitâmicas) em substituição aos corantes sintéticos.

As variedades que apresentaram maiores rendimentos neste cultivo orgânico foi a IAPAR 69 com 26,21 t ha⁻¹ e a batata-doce de pele e polpa roxas, com 24,86 t ha⁻¹, com resultados que não foram significativamente diferentes. A variedade de pele branca e polpa roxa com rendimento de 11,06 t ha⁻¹ e a de pele roxa e polpa amarela com 9,03 t ha⁻¹ não foram significativamente diferentes. Apenas as variedades roxas tiveram rendimentos de cultivo de batata-doce um pouco abaixo da média brasileira em 2009, que foi de 11,51 t ha⁻¹ de acordo com Melo et al. (2009). O que comprova que o cultivo orgânico dessas quatro variedades estudadas possui condições de competir com os convencionais, com as vantagens de ser orgânico e possuir os pigmentos naturais antioxidantes.

Os valores médios dos pesos secos para as batatas-doces *in natura* das quatro variedades variaram entre 40,90% para a variedade de pele roxa e polpa amarela a mais rica em matéria seca; 31,10 para a de pele branca e polpa roxa; 30,55% para a de pele e polpa roxas e 25,66% para a IAPAR 69. O processo de fritura acarreta desidratação e absorção de óleo com aumento do peso seco em todas as amostras fritas em relação as amostras *in natura* e cozidas. Já o processo de cozimento a vapor, não causou alterações significativas na hidratação das amostras em relação às amostras *in natura*.

A variedade IAPAR 69 *in natura* obteve em seu perfil de carotenoides apenas o majoritário todo-*trans*- β -caroteno com 59.276 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS e o minoritário Zeinoxantina com 4.398 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ em BS, sendo a presença deste último um diferencial inédito em relação às batatas de polpa alaranjada relatadas na literatura disponível. Foi possível constatar redução do teor de ambos os carotenoides devido aos processos de cozimento e fritura, sem diferença significativa entre eles, com surgimento de 13-*cis*- β -caroteno como evidência da isomerização térmica.

Os carotenoides da batata-doce de pele roxa e polpa amarela apresentou 11 carotenoides. Entre os minoritários foi identificado o todo-*trans*- β -caroteno. Os demais não foram identificados e possuíam características de xantofilas que podem ser os carotenoides chamados de Ipomoeaxantinas entre outras xantofilas identificadas em uma variedade com as mesmas características, chamada de “Benimasari”, bastante consumida no Japão, porém com muitos carotenoides ainda sem identificação e apenas um trabalho com identificações (Maoka et al., 2007). Seria necessário o isolamento e análises por RMN além das análises por IES-QTdV-EM² para identificá-los. Já os teores nesta variedade *in natura*, cozida e frita foram bem menores do que na IAPAR 69, com 2.257 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$, 1.750 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$ e 1.833 $\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$, em BS, respectivamente, com retenções maiores que 80% após cozimento e fritura, sem diferença entre os processos. Com provável isomerização térmica, cujos isômeros não foram separados dos carotenoides originais nos cromatogramas.

As antocianinas identificadas na batata-doce de pele e polpa roxas eram derivadas de peonidina. As majoritárias foram peonidina 3-*O*-(6''-*O*-feruloil soforosídeo)-*O*-5-glicosídeo, peonidina 3-*O*-(6-*O*-feruloil-6-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, cianidina 3-*O*-(6'',6'''-

O-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo e peonidina 3-*O*-(6''-*p*-hidroxibenzoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo.

Uma característica marcante das variedades de batata-doce de polpas roxas estudadas foi a ausência de antocianinas não aciladas, diferente de todas as batatas-doces estudadas em outros trabalhos. As características únicas destas variedades de batata-doce com perfis únicos de antocianinas bem como a presença de antocianinas nunca antes detectadas, auxiliam na identificação dessas variedades e são uma evidência de que são de variedades geneticamente diferente daquelas estudadas nos trabalhos disponíveis na literatura.

Foi possível constatar que a maior parte das antocianinas identificadas na batata-doce de pele branca e polpa roxa eram derivadas de cianidina, diferente da variedade estudada anteriormente. Este fato explica também a diferença nas tonalidades de roxo das polpas das variedades. A variedade de pele e polpa roxas cuja maior parte das antocianinas presentes derivaram da peonidina, apresenta coloração roxa com tonalidade avermelhada. Já esta variedade de pele branca e polpa roxa, cuja maior parte das antocianinas derivaram de cianidina, apresenta coloração roxa com tonalidade azulada.

As antocianinas majoritárias encontradas nessa variedade de batata-doce de pele branca e polpa roxa foram cianidina 3-*O*-(6-*O*-feruloil-6-*O*-cafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, cianidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo, cianidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo, cianidina 3-*O*-(6-*O*-cafeoil-6-*O*-*p*-hidroxibenzoil soforosídeo) 5-*O*-glicosídeo.

Em ambas as variedades de polpa roxa estudadas, a maior parte das antocianinas eram diaciladas com os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-hidroxibenzóico. Sendo que aquela de pele e polpa roxas apresentou mais acilações com ácido ferúlico em suas antocianinas do que esta variedade de pele branca e popa roxa. As análises dos ácidos fenólicos obtidos por hidrólise das batatas já indicavam maiores quantidades de ácido ferúlico na variedade de pele e polpa roxas.

As antocianinas minoritárias encontradas na variedade de pele branca e polpa roxa Pelargonidina 3-*O*-(6'',6'''-*O*-dicafeoil soforosídeo)-5-*O*-glicosídeo e Pelargonidina 3-cafeoil feruloil soforosídeo 5- glicosídeo só foram encontradas e identificadas em uma publicação e em uma única variedade de batata-doce chamada de Borami (Lee et al, 2013). As antocianinas aciladas com ácido *p*-cumárico identificadas aqui foram encontradas em batatas-doces por poucos autores. As antocianinas detectadas em batata-doce pela primeira vez nesse trabalho devem ser investigadas por outras técnicas para identificação estrutural que permitam a elucidação de suas estruturas moleculares. A detecção dessas antocianinas mostra que os estudos existentes ainda são insuficientes para descrever todas as antocianinas das variedades de batatas-doces de polpas roxas.

O cultivo orgânico não teve influência na biossíntese das antocianinas e carotenoides uma vez que os mesmos pigmentos majoritários também foram encontrados em batatas-doces de cultivo convencional estudadas nos trabalhos utilizados como referência. Não foi possível determinar se o cultivo orgânico teve influência na quantidade de antocianinas e carotenoides em relação ao cultivo convencional, já que as quantidades obtidas destes pigmentos estavam dentro das faixas relatadas na literatura para cultivo convencional.

As antocianinas das variedades de batata-doce de polpa roxa se mostraram resistentes aos processos de cozimento e fritura, que facilitaram a desorção das antocianinas do amido, aumentando a eficiência do processo de extração, fenômeno que também deve representar uma vantagem em termos digestivos, pois da mesma forma que facilitou a extração com solução aquosa ácida, provavelmente facilitará a liberação da matriz nos fluidos digestivos. E, como não foi observada degradação pelo aquecimento no cozimento ou na fritura, sugere-se que uma etapa de aquecimento (cozimento) anterior a liofilização seja incluída nos métodos de extração de antocianinas dessas matrizes *in natura*, possibilitando a completa extração do material que, ficaria adsorvido no amido na falta desta etapa.

Finalmente, as variedades de batata-doce estudadas nesta Tese, apresentam potencial promissor para serem utilizados como ingredientes funcionais para a indústria brasileira, como alternativa ao uso de corantes sintéticos. As antocianinas apresentaram-se completamente estáveis aos processos térmicos, com manutenção da cor e das suas propriedades. Já os carotenoides, apresentaram perda parcial de cor e degradação aos tratamentos térmicos, porém com retenções ainda significativas que garantiriam a preservação de cor e de propriedades antioxidantes e pró-vitamínicas em níveis desejáveis nos alimentos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, Article ID 282574, 2012.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.

CEAGESP. **N842-Normas de Classificação – Programa Brasileiro para a Modernização da Horticultura**. São Paulo, v. 1, n. 1, PBMH, 2003;

CHERNUSHEVICH, I.V.; LOBODA, A.V.; THOMSON, B.A. An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, p. 849-865, 2001.

COLLINS, C.H.; MANFREDI, A.L.P.; VALENTE, A.L.P.; MURTA, A.L.M.; MCNAIR, H.M. O que é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova**, Abril, 1983.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na Escola**, 7 (maio), 1998.

DENG, G.-F.; LIN, X.; XU, X.-R.; GAO, L.-L.; XIE, J.-F.; LI, H.-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **Journal of Functional Foods**, n. 5, pg. 260-266, 2013.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Eletrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analysers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, p. 210-230, 2009.

GIORI, F. **Adaptação de metodologia de digestão in vitro e determinação da bioacessibilidade in vitro de β -caroteno em três variedades de batata doce de polpa alaranjada**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 2010;

GIUSTI, M. M; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 217–225, 2003.

GIUSTI, M. M; WROLSTAD, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy**, F1.2.1-F1.2.13, Copyright ©, John Wiley & Sons, Inc., 2001.

GODA, Y.; SHIMIZU, T.; KATO, Y.; NAKAMURA, M.; MAITANI, T.; YAMADA, T.; TERAHARA, N.; YAMAGUCHI, M. Two Acylated anthocyanins from purple sweet potato. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 183-186, 1997.

GRAS, C. C.; NEMETZ, N.; CARLE, R.; SCHWEIGGERT, R. M. Anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and their color modulation by the addition of phenolic acids and food-grade phenolic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 235, p. 265-274, 2017.

HE, W.; ZENG, M.; CHEN, J.; JIAO, Y.; NIU, F.; TAO, G.; ZHANG, S.; QIN, F.; HE, Z. Identification and Quantitation of Anthocyanins in Purple-Fleshed Sweet Potatoes Cultivated in China by UPLC-PDA and UPLC-QTOF MS/MS. *J. Agric. Food Chemistry*, v. 64, p. 171-177, 2016.

HELENO, S.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

HOU, D.-X. Potential Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Anthocyanins. **Current Molecular Medicine**, v. 3, p. 149-159, 2003.

HU, Y.; DENG, L.; CHEN, J.; ZHOU, S.; LIU, S.; FU, Y.; YANG, C.; LIAO, Z.; CHEN, M. An analytical pipeline to compare and characterize the anthocyanins antioxidant activities of purple sweet potato cultivars. **Food Chemistry**, v. 194, p. 46-54, 2016.

ISLAM, S. N., NUSRAT, T., BEGUM, P., AHSAN, M. Carotenoids and β -carotene in orange fleshed sweet potato: A possible solution to vitamin A deficiency. **Food Chemistry**, v. 199, p. 628-631, 2016.

JIE, L.; XIAO-DING, L.; YUN, Z.; ZHENG-DONG, Z.; ZHI-YA, Q.; MENG, L.; SHAO-HUA, Z.; SHUO, L.; MENG, W.; LU, Q. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1429-1434, 2013.

JR, I.M.R.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, 1997.

KADIAN, S. S.; GARG, M. Pharmacological Effects of Carotenoids: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**; v. 3, n. 1, p. 42-48, 2012.

KIM, H.J.; PARK, W. S.; BAE, J.-Y.; KANG, S. Y.; YANG, M. H.; LEE, S.; LEE, H.-S.; KWAK, S.-S.; AHN, M.-J. Variations in the carotenoid and anthocyanin contents of Korean cultural varieties and home-processed sweet potatoes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 188-193, 2015.

KIM, J.-M.; PARK, S.-J.; LEE, C.-S.; REN, C.; KIM, S.-S.; SHIM, M. Functional Properties of Different Korean Sweet Potato Varieties. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 20, n. 6, p. 1501-1507, 2012.

LEE, M. J.; PARK, J. S.; CHOI, D. S.; JUNG, M. Y. Characterization and Quantitation of Anthocyanins in Purple-Fleshed Sweet Potatoes Cultivated in Korea by HPLC-DAD and HPLC-ESI/QTOF MS/MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 3148–3158, 2013.

LEMOS, M.A; ALIYU, M.M.; HUNGERFORD, G. Influence of cooking on the levels of bioactive compounds in Purple Majesty potato observed via chemical and spectroscopic means. **Food Chemistry**, v. 173, p. 462-467, 2015.

LUO, C.L.; ZHOU, Q.; YANG, Z.W.; WANG, R.D.; ZHANG, J.L. Evaluation of structure and bioprotective activity of key high molecular weight acylated anthocyanin compounds isolated from the purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No.8). **Food Chemistry**, v. 241, p. 23-31, 2018.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O Estado da Arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MAOKA, T.; AKIMOTO, N.; ISHIGURO, K.; YOSHINAGA, M.; YOSHIMOTO, M. Carotenoids with a 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-b-end group, from yellow sweet potato “Benimasari”, *Ipomoea batatas* LAM. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1740-1745, 2007.

MARTINHO, J.M.G. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível. **Química**, 52, 1994.

MARTINS, G.B.C.; SUCUPIRA, R.R.; SUAREZ, P.A.Z. a Química e as Cores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1508-1534, 2015.

MONTILLA, E. C.; HILLEBRAND, S.; BUTSCHBACH, D.; BALDERMANN, S.; WATANABE, N.; WINTERHALTER, P. Preparative Isolation of Anthocyanins from Japanese Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Varieties by High-Speed Countercurrent Chromatography. **J. Agric. Food Chem**, v. 58, p. 9899–9904, 2010.

NASCIMENTO, L. S. M.; SANTIAGO, M. C. P. A.; OLIVEIRA, E. M. M.; BORGUINI, R. G.; BRAGA, E. E. O.; MARTINS, V. C. ; PACHECO, S.; SOUZA, M. C.; GODOY, R. L. O. Characterization of Bioactive Compounds in *Eugenia brasiliensis*, Lam. (Grumixama). **Nutrition and Food Technology: open Access**, v. 3, n. 3, 1-7, 2017.

ODAKE, K.; TERAHARA, N.; SAITO, N.; TOKIS, K.; HONDA, T. Chemical Structures of Two Anthocyanins from Purple Sweet Potato, *Ipomoea Batatas*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 2127-2130, 1992.

OLIVEIRA, H.; BASÍLIO, N.; PINA, F.; FERNANDES, I.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Purple-fleshed sweet potato acylated anthocyanins: Equilibrium network and photophysical properties. **Food Chemistry**, v. 288, p. 386–394, 2019a.

OLIVEIRA, H.; PEREZ-GRAGÓRIO, R.; FREITAS, V.; MATEUS, N.; FERNANDES, I. Comparison of the in vitro gastrointestinal bioavailability of acylated and non-acylated anthocyanins: Purple-fleshed sweet potato vs red wine. **Food Chemistry**, v. 276, p. 410–418, 2019b.

OLIVEIRA, H.; ROMA-RODRIGUES, C.; SANTOS, A.; VEIGAS, B.; BRÁS, N.; FARIA, A.; CALHAU, C.; FREITAS, V.; BAPTISTA, P.V.; MATEUS, N.; FERNANDES, A.R.; FERNANDES, I. GLUT1 and GLUT3 involvement in anthocyanin gastric transport- Nanobased targeted approach. **Scientific Reports**, v. 9, n. 789, p. 1-14, 2019c.

OLIVEIRA, L.F.C. Espectroscopia Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova da Escola**, 4 (maio), 2001.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e estudo de validação para ensaio de carotenoides por cromatografia líquida**. Dissertação, mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L. S. M.; GODOY, R. L. O. História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, v. 7 n. 4, p. 1225-1271, 2015.

PACHECO, S.; PEIXOTO, F. M.; BORGUINI, R. G.; NASCIMENTO, L. S. M.; BOBEDA, C. R. R.; SANTIAGO, M. C. P. A.; GODOY, R. L. O. Microscale extraction method for HPLC carotenoid analysis in vegetable matrices. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 416-419, 2014.

PASSOS, E.A. **Aula 2: Espectrofotometria de Absorção Molecular na Região do UV/Vis**. <https://docplayer.com.br/13995052-Aula-2-espectrofotometria-de-absorcao-molecular-na-regiao-do-uv-vis-elisangela-de-andrade-passos.html>. Acessado em 26 de dezembro 2020;

PUERTOLAS, E.; CREGENZÁN, O.; LUENGO, E.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1330–1336, 2013.

QIU, F.; LUO, J.; YAO, S.; MA, L.; KONG, L. Preparative isolation and purification of anthocyanins from purple sweet potato by highspeed counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 2146 – 2151, 2009

RAO, A.V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 207–216, 2007

RASHMI, H.B.; NEGI, P.S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. **Food Research International**, v. 136, p. 1-14, 2020.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. 1ª Ed., Washington D.C., ILSI PRESS, 2001;

RUMBAOA, R. G. O.; CORNAGO, D. F.; GERONIMO, I. M. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1133–1138, 2009.

SHAN, S.; ZHU, K.-X.; PENG, W.; ZHOU, H.-M. Physicochemical Properties and Salted Noodle-making Quality of Purple Sweet Potato Flour and Wheat Flour Blends. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 709–716, 2012.

SILVA, L.A.V. **Palestra de Agroecologia**. Vértices, Campos dos Goytacazes, RJ, v. 12, n. 3, p.199-201, 2010.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 Ed., Porto Alegre, Bookman, 2002.

SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 1265–1286, 2016.

TEOW, C. C.; TRUONG, V.-D.; MCFEETERS, R. F.; THOMPSON, R. L.; PECOTA, K. V.; YENCHO, G. C. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. **Food Chemistry**, v. 103, p. 829-838, 2007.

TERAHARA, N.; KONCZAK-ISLAM, I.; NAKATANI, M.; YAMAKAWA, O.; GODA, Y.; HONDA, T. Anthocyanins in callus induced from purple storage root of *Ipomoea batatas* L. **Phytochemistry**, v. 54, p. 919-922, 2000.

TERAHARA, N.; KONCZAK-ISLAM, I.; ONO, H.; YOSHIMOTO, M.; YAMAKAWA, O. Characterization of acylated anthocyanins in callus induced from storage root of purple-fleshed sweet potato, *Ipomoea batatas* L. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p. 279–286, 2004.

TERAHARA, N.; SHIMIZU, T.; KATO, Y.; NAKAMURA, M.; MAITANI, T.; YAMAGUCHI, M.; GODA, Y. Six Diacylated Anthocyanins from the Storage Roots of Purple Sweet Potato, *Ipomoea batatas*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 63, n. 8, p. 1420-1424, 1999.

TIAN, Q.; KONCZAK, I.; SCHWARTZ, S.J. Probing Anthocyanin Profiles in Purple Sweet Potato Cell Line (*Ipomoea batatas* L. Cv. Ayamurasaki) by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6503-6509, 2005.

TRUONG, V. D.; HUA, Z.; THOMPSON, R.L.; YENCHO, G.C.; PECOTA, K.V. Pressurized liquid extraction and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, p. 96–103, 2012.

TRUONG, V.-D., DEIGHTON, N.; THOMPSON, R. T., MCFEETERS, R. F., DEAN, L. O.; PECOTA, K. V.; YENCHO, G. C. Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweet potatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. **J. Agric. Food Chem**, v. 58, p. 404–410, 2010.

TSUDA, T. Anthocyanins as Functional Food Factors - Chemistry, Nutrition and Health Promotion. **Food Science Technology Research**, v. 18, n. 3, p. 315 – 324, 2012.

VOJDANI, A; VOJDANI, C. Immune reactivity to food Coloring. **Alternative Therapies in Health & Medicine**, v. 21, n. S1, p. 52-63, 2015.

WALLACE, T. C. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. **Advances in Nutrition**, v. 2, p. 1–7, 2011.

WANG, L.; ZHAO, Y.; ZHOU, Q.; LUO, C.-L.; DENG, A.-P.; ZHANG, Z.-C.; J.-L. Characterization and hepatoprotective activity of anthocyanins from purple sweet potato

(*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No. 8). **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 607-618, 2017.

WANG, S.; NIE, S.; ZHU, F. Chemical constituents and health effects of sweet potato. **Food Research International**, v. 89, p. 90-116, 2016.

WANG, Y.; LIU, F.; CAO, X.; CHEN, F.; HU, X.; LIAO, X. Comparison of high hydrostatic pressure and high temperature short time processing on quality of purple sweet potato nectar. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 326-334, 2012.

WANG, Z.; CLIFFORD, M. N.; SHARP, P. Analysis of chlorogenic acids in beverages prepared from Chinese health foods and investigation, *in vitro*, of effects on glucose absorption in cultures Caco-2 cells. **Food Chemistry**, v. 108, p. 369-373, 2008.

XU, J.; SU, X.; LIM, S.; GRIFFIN, J.; CAREY, E.; KATZ, B.; TOMICH, J.; SMITH, J. S.; WANG, W. Characterization and stability of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato P40. **Food Chemistry**, v. 186, p. 90-96, 2015.

YANG, Z.-W.; TANG, C.-E.; ZHANG, J.-L.; ZHOU, Q.; ZHANG, Z.-C. Stability and antioxidant activity of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No.8) subjected to simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 2604-2614, 2019.

YING, L.; JIA-YING, L.; JING, L.; MI-LU, L.; ZHONG-HUA, L. Preparative Separation of Anthocyanins from Purple Sweet Potatoes by High-Speed Counter-Current Chromatography. **Chin. J. Anal. Chem.**, v. 39, n. 6, p. 851-856, 2011.

YOSHINAGA, M.; YAMAKAWA, O.; NAKATANI, M. Changes in Anthocyanin Content and Composition of Developing Storage Root of Purple-Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Breeding Science**, v. 50, p. 59-64, 2000.

YOSHINAGA, M.; YAMAKAWA, O.; NAKATANI, M. Genotypic Diversity of Anthocyanin Content and Composition in purple-Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Breeding Science**, v. 49, p. 43-47, 1999.

ZHANG, J.L.; LUO, C.L.; ZHOU, Q.; ZHANG, Z.C. Isolation and identification of two major acylated anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No. 8) by UPLC-QTOF-MS/MS and NMR. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1932-1941, 2018.

ZHAO, J.-G.; YAN, Q.-Q.; XUE, R.-Y.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.-Q. Isolation and identification of colourless caffeoyl compounds in purple sweet potato by HPLC-DAD-ESI/MS and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 161, p. 22-26, 2014.

ZHU, Z.; GUAN, Q.; KOU BAA, M.; BARBA, F. J.; ROOHINEJAD, S.; CRAVOTTO, G.; YANG, X.; LI, S.; HE, J. HPLC-DAD-ESI-MS² analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction. **Food Chemistry**, v. 215, p. 391-400, 2017.

6 PUBLICAÇÕES DE ALGUNS RESULTADOS

- JESUS, M.S.C.; SANTIAGO, M.C.P.A.; PACHECO, S.; GOUVÊA, A.C.M.S.; NASCIMENTO, L.S.M.; BORGUINI, R.G.; GUERRA, J.G.M.; ESPINDOLA, J.A.; GODOY, R.L.O. Acylated anthocyanins from organic purple-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) produced in Brazil. *Scientia Agricola*. v.78, n.4, e20190309, 2021.
- MELO, J.V.M.; JESUS, M.S.C.; SANTIAGO, M.C.P.A.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L.S.M.; GUERRA, J.G.M.; BORGUINI, R.G.; BARBOSA, M.I.M.J.; GODOY, R.L.O. Determinação da retenção de carotenoides em batata-doce orgânica (*Ipomoea batatas* L.) cozida e frita. Resumo submetido para o IVJFPQ (UFRRJ), 2018.
- JESUS, M.S.C.; GUERRA, J.G.M.; ESPINDOLA, J.A.A.; PACHECO, S.; BORGUINI, R.G.; GODOY, R.L.O. Teor de Carotenoides de três variedades de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) cultivadas sob sistemas de produção orgânico e convencional. Resumo expandido. VI Congresso Latino-Americano, X Congresso Brasileiro, V Seminário do DF e Entorno – Agroecologia, 2017.
- JESUS, M.S.C.; PACHECO, S.; SANTIAGO, M.C.P. A. ; NASCIMENTO, L.S.M. ; BORGUINI, R.G. ; AGUIAR, L.A. ; ESPINDOLA, J.A.A. ; GUERRA, J.G.M. ; GODOY, R.L.O. Influence of boiling on the dry matter contents and on the carotenoids retention of yellow fleshed cassava roots. In: 12º Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos, 2017.
- JESUS, M.S.C.; MARTINS, V.C.; SANTIAGO, M.C.P.A.; GOUVEA, A.C.M.S.; BODDEY, R.M.; GUERRA, J.G.M.; ESPINDOLA, J.A.A.; PEREIRA, H.M.G.; GODOY, R.L.O. Characterization of Acylated Anthocyanins from Storage Root of Purple-Fleshed Sweet Potato, *Ipomoea batatas* L., from Organic Farming, by HPLC-PDA and ESI-QTOF-MS. In: 1st IBERO-AMERICAN CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY- 13th UppCON and BrMASS- 2016 is English, RIO DE JANEIRO, 2016.
- JESUS, M.S.C.; MARTINS, V.C.; SANTIAGO, M.C.P.A.; GOUVEA, A.C.M. S.; BODDEY, R.M.; GUERRA, J.G.M.; ESPINDOLA, J.A.A.; PEREIRA, H.M. G.; GODOY, R. L. O. Study of Anthocyanins from Organic Farming Storage Root of Purple-Fleshed Sweet Potato, *Ipomoea batatas* L. In: 1st IWBC International Workshop Bioactive Compounds: from food science to human nutrition, Campinas, 2016.
- JESUS, M.S.C.; PACHECO, S.; GUERRA, J.G.M.; ESPINDOLA, J.A.A.; PEREIRA, H.M.G.; GODOY, R.L.O. Estudo das Antocianinas de Batata-doce Roxa (*Ipomoea batatas* L.) de Cultivo Orgânico. In: Semana Científica Johanna Döbereiner (SCJD), Seropédica. Anais da Semana Científica Johanna Döbereiner, 2016.
- JESUS, M.S.C.; PACHECO, S.; GUERRA, J.G.M.; ESPINDOLA, J.A.A.; PEREIRA, H.M.G.; GODOY, R.L.O. Influência da Adição de Óleo na Biodisponibilidade de Carotenóides de batata doce orgânica. In: Semana Científica Johanna Döbereiner (SCJD), Seropédica. Anais da Semana Científica Johanna Döbereiner, 2016.

APÊNDICE A – TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A1 - Rendimento dos Cultivos de Batatas-doces sob Sistema Orgânico

Quadro 1 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar diferenças significativas entre os rendimentos ($p < 0,05$) e TUKEY para saber quais rendimentos (valores médios em Kg/2,4 m²) foram diferentes ou iguais com nível de significância alfa $< 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Variedade	3	55.95	18.65	17.76	0.000104

Residuals	12	12.60	1.05		
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ' '
Study: anova.rendimento ~ "Variedade"					
HSD Test for Producao					
Mean Square Error: 1.050122					
Variedade, means					
	Producao	std	r	Min	Max
A	2.65425	0.3274786	4	2.305	2.935
B	6.29000	0.8154447	4	5.215	7.180
C	5.96600	1.1901207	4	4.650	7.219
D	2.16750	1.4184175	4	0.755	3.545
Alpha: 0.05 ; DF Error: 12					
Critical Value of Studentized Range: 4.19866					
Minimum Significant Difference: 2.151298					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Producao	groups			
B	6.29000	a			
C	5.96600	a			
A	2.65425	b			
D	2.16750	b			

Tabela 9 - Quantidades colhidas de cada repetição de campo na área central do plantio (3 m x 0,8 m ou equivalente a 2,4 m²) de acordo com as classificações comerciais: Extra A (251-500 g), Extra (151-250 g), Diversos (80-150 g) e Tubérculos (10-79 g) (CEAGESP, 2003) para a batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela - D.

Classificação	Batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela - D													TOTAL	
	Extra A			Extra		Diversos		Tubérculos							
Amostras	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	
1 Bloco I-D	1,295	4	0,324	1,235	6	0,206	0,750	8	0,094	0,265	5	0,053	3,545	23	
8 Bloco II-D	0	0	0,000	0,555	3	0,185	0,330	3	0,110	0,265	9	0,029	1,150	15	
11 Bloco III-D	0	0	0,000	0,325	2	0,163	0,415	3	0,138	0,015	1	0,015	0,755	6	
13 Bloco IV-D	1,040	3	0,347	1,570	3	0,523	0,360	4	0,090	0,250	5	0,050	3,220	15	
Total	2,335	7	0,334	3,685	14	0,263	1,855	18	0,103	0,795	20	0,040	8,670	59	
%		26,9			42,5			21,4			9,2		Rendimento médio (t ha ⁻¹)	9,031	

Tabela 10 - Quantidades colhidas de cada repetição de campo na área central do plantio (3 m x 0,8 m ou equivalente a 2,4 m²) de acordo com as classificações comerciais: Extra A (251-500 g), Extra (151-250 g), Diversos (80-150 g) e Tubérculos (10-79 g) (CEAGESP, 2003) para a batata-doce da variedade de pele branca e polpa roxa- A.

Classificação	Batata-doce da variedade de pele branca e polpa roxa - A													TOTAL	
	Extra A		Extra		Diversos		Tubérculos								
Amostras	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Pk	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (Kkg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	
2 Bloco I-A	1,775	7	0,254	1,025	6	0,171	0,095	1	0,095	0,037	5	0,007	2,932	19	
7 Bloco II-A	0,970	2	0,485	1,280	7	0,183	0,195	1	0,195	0,000	0	0,000	2,445	10	
10 Bloco III-A	0,975	3	0,325	0,635	3	0,212	0,410	4	0,103	0,285	6	0,048	2,305	16	
16 Bloco IV-A	1,255	3	0,418	0,575	3	0,192	0,635	6	0,106	0,470	9	0,052	2,935	21	
Total	4,975	15	0,332	3,515	19	0,185	1,335	12	0,111	0,792	20	0,040	10,617	66	
%		46,9			33,1			12,6			7,5		Rendimento médio (t ha ⁻¹)	11,059	

Tabela 11 - Quantidades colhidas de cada repetição de campo na área central do plantio (3 m x 0,8 m ou equivalente a 2,4 m²) de acordo com as classificações comerciais: Extra A (251-500 g), Extra (151-250 g), Diversos (80-150 g) e Tubérculos (10-79 g) (CEAGESP, 2003) para a batata-doce da variedade de pele e polpa roxas - C.

Classificação	Batata-doce da variedade de pele e polpa roxas - C													
	Extra A		Extra		Diversos		Tubérculos		TOTAL					
Amostras	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.
3 Bloco I-C	0,265	1	0,265	0,520	3	0,173	2,265	28	0,081	1,600	27	0,059	4,650	59
6 Bloco II-C	2,265	11	0,206	0,690	2	0,345	3,059	26	0,118	1,205	31	0,039	7,219	70
12Bloco III-C	1,135	4	0,284	0,520	3	0,173	2,305	20	0,115	1,350	33	0,041	5,310	60
15 Bloco IV-C	1,465	4	0,366	2,355	12	0,196	1,655	15	0,110	1,210	30	0,040	6,685	61
Total	5,13	20	0,257	4,085	20	0,204	9,284	89	0,104	5,365	121	0,044	23,864	250
%		21,5			17,1			38,9			22,5		Rendimento médio (t ha ⁻¹)	24,858

Tabela 12 - Quantidades colhidas de cada repetição de campo na área central do plantio (3 m x 0,8 m ou equivalente a 2,4 m²) de acordo com as classificações comerciais: Extra A (251-500 g), Extra (151-250 g), Diversos (80-150 g) e Tubérculos (10-79 g) (CEAGESP, 2003) para a batata-doce da variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas – B.

Classificação	Batata-doce da variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas - B													
	Extra A		Extra		Diversos		Tubérculos		TOTAL					
Amostras	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.	Peso médio (kg)	Peso (kg)	Quant.
4 Bloco I-B	1,225	4	0,306	0,975	5	0,195	1,580	13	0,122	1,435	38	0,038	5,215	60
5 Bloco II-B	2,165	5	0,433	0,715	4	0,179	2,870	22	0,130	1,43	34	0,042	7,180	65
9 Bloco III-B	2,645	7	0,378	1,495	8	0,187	1,730	15	0,115	0,635	18	0,035	6,505	48
14 Bloco IV-B	0,425	1	0,425	2,075	11	0,189	2,070	17	0,122	1,69	40	0,042	6,260	69
Total	6,46	17	0,380	5,26	28	0,188	8,250	67	0,123	5,19	130	0,040	25,16	242
%		25,7			20,9			32,8			20,6		Rendimento médio (t ha ⁻¹)	26,208

A2 - Peso seco da batatas-doces *in natura*, cozidas e fritas

Quadro 2 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos das variedades *in natura* e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Variedade	3	489.2	163.08	165	5.11e-10 ***	
Residuals	12	11.9	0.99			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ' '	1

Study: anova.pesoseco ~ "Variedade"

HSD Test for Peso_seco

Mean Square Error: 0.9885413

Variedade, means

	Peso_seco	std	r	Min	Max
A	31.09926	1.4625570	4	28.95310	32.09866
B	25.66293	0.7357450	4	24.97260	26.65091
C	30.55497	0.6078342	4	29.93181	31.30207
D	40.90318	0.9509515	4	39.82745	41.72427

Alpha: 0.05 ; DF Error: 12

Critical Value of Studentized Range: 4.19866

Minimum Significant Difference: 2.087268

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Peso_seco	groups
D	40.90318	a
A	31.09926	b
C	30.55497	b
B	25.66293	c

Tabela 13– Peso seco das batatas-doces da variedade de pele roxa e polpa amarela – D, *in natura*.

Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	variedade de pele roxa e polpa amarela - D			Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)
				1° pesagem (g)	2° pesagem (g)	3° pesagem (g)				
1.1	42,4070	2,0005	44,4075	43,2203	43,2171	43,2229	1,1846	0,8159	40,78	40,38
1.2	41,9381	2,0016	43,9397	42,7269	42,7426	42,7382	1,2015	0,8001	39,97	
8.1	41,1697	2,0028	43,1725	42,0166	41,9926	42,0078	1,1647	0,8381	41,85	41,72
8.2	48,4451	2,0011	50,4462	49,2925	49,2655	49,2776	1,1686	0,8325	41,60	
11.1	33,4514	2,0017	35,4531	34,3048	34,2787	34,2866	1,1665	0,8352	41,72	41,68
11.2	41,3890	2,0029	43,3919	42,2384	42,2126	42,2230	1,1689	0,8340	41,64	
13.1	41,1051	2,0024	43,1075	41,9112	41,8930	41,9068	1,2007	0,8017	40,04	39,83
13.2	41,2487	2,0049	43,2536	42,0611	42,0345	42,0430	1,2106	0,7943	39,62	
				média						40,90
				desvio padrão						0,95
				Cv (%)						2,32

Tabela 14– Peso seco das batatas-doces da variedade de pele branca e polpa roxa - A, *in natura*.

Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	variedade de pele branca e polpa roxa - A			Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)
				1º pesagem (g)	2º pesagem (g)	3º pesagem (g)				
2.1	31,7498	2,0001	33,7499	32,3704	32,3598	32,3667	1,3832	0,6169	30,84	31,39
2.2	57,0462	2,0028	59,0490	57,6878	57,6875	57,6860	1,3630	0,6398	31,95	
7.1	34,3118	2,0026	36,3144	34,8924	34,8850	34,8820	1,4324	0,5702	28,47	28,95
7.2	32,6279	2,0025	34,6304	33,2281	33,2168	33,2173	1,4131	0,5894	29,43	
10.1	37,5235	2,0029	39,5264	38,1637	38,1524	38,1585	1,3679	0,6350	31,70	31,95
10.2	35,1630	2,0020	37,1650	35,8185	35,8080	35,8076	1,3574	0,6446	32,20	
16.1	51,2865	2,0047	53,2912	51,9496	51,9342	51,9359	1,3553	0,6494	32,39	32,10
16.2	49,9575	2,0045	51,9620	50,6077	50,5978	50,5950	1,3670	0,6375	31,80	
				média						31,10
				desvio padrão						1,46
				Cv (%)						4,70

Tabela 15– Peso seco das batatas-doces da variedade de pele e polpa roxas - C, *in natura*.

Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	variedade de pele e polpa roxas - C			Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)
				1º pesagem (g)	2º pesagem (g)	3º pesagem (g)				
3.1	43,8583	2,0075	45,8658	44,4826	44,4709	44,4740	1,3918	0,6157	30,67	30,77
3.2	37,3265	2,0025	39,3290	37,9511	37,9500	37,9447	1,3843	0,6182	30,87	
6.1	30,6349	2,0007	32,6356	31,2436	31,2333	31,2343	1,4013	0,5994	29,96	29,93
6.2	33,4932	2,0024	35,4956	34,1010	34,0884	34,0920	1,4036	0,5988	29,90	
12.1	53,4730	2,0025	55,4755	54,0858	54,0775	54,0776	1,3979	0,6046	30,19	30,22
12.2	50,5269	2,0011	52,5280	51,1427	51,1245	51,1320	1,3960	0,6051	30,24	
15.1	33,0337	2,0046	35,0383	33,6655	33,6499	33,6559	1,3824	0,6222	31,04	31,30
15.2	40,1196	2,0006	42,1202	40,7641	40,7466	40,7511	1,3691	0,6315	31,57	
				média						30,55
				desvio padrão						0,61
				Cv (%)						1,99

Tabela 16 – Peso seco das batatas-doces da variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas - B, *in natura*.

Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas - B			Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)
				1º pesagem (g)	2º pesagem (g)	3º pesagem (g)				
4.1	40,7481	2,0069	42,7550	41,2814	41,2804	41,2804	1,4746	0,5323	26,52	26,65
4.2	43,2298	2,0061	45,2359	43,7729	43,7636	43,7670	1,4689	0,5372	26,78	
5.1	33,0487	2,0034	35,0521	33,5505	33,5450	33,5458	1,5063	0,4971	24,81	24,97
5.2	33,3958	2,0018	35,3976	33,9041	33,8950	33,8989	1,4987	0,5031	25,13	
9.1	34,7389	2,0030	36,7419	35,2514	35,2403	35,2451	1,4968	0,5062	25,27	25,26
9.2	33,2642	2,0030	35,2672	33,7759	33,7661	33,7700	1,4972	0,5058	25,25	
14.1	50,6663	2,0038	52,6701	51,2025	51,1872	51,1885	1,4816	0,5222	26,06	25,77
14.2	58,3383	2,0034	60,3417	58,8611	58,8495	58,8486	1,4931	0,5103	25,47	
				média						25,66
				desvio padrão						0,74
				Cv (%)						2,87

Quadro 3 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos das variedades cozidas e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,001$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Variedade	3	313.1	104.4	87	2.07e-08 ***
Residuals	12	14.4	1.2		
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ' ' 1
Study: anova.pesosecoco cozida ~ "Variedade"					
HSD Test for Peso_seco					
Mean Square Error: 1.199602					
Variedade, means					
Peso_seco	std	r	Min	Max	
A 31.32536	1.3348015	4	29.68445	32.93074	
B 26.51520	0.5321333	4	26.08653	27.22164	
C 30.49857	0.3204089	4	30.10368	30.79186	
D 38.75933	1.6220001	4	36.49781	40.01760	
Alpha: 0.05 ; DF Error: 12					
Critical Value of Studentized Range: 4.19866					
Minimum Significant Difference: 2.299319					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Peso_seco	groups			
D	38.75933	a			
A	31.32536	b			
C	30.49857	b			
B	26.51520	c			

Tabela 17 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele roxa e polpa amarela – D, cozidas.

variedade de pele roxa e polpa amarela - D											
Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	1° pesagem (g)	2° pesagem (g)	3° pesagem (g)	4° pesagem (g)	Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)
1.1	30,6347	2,0605	32,6952	31,4215	31,3879	31,3896	31,3901	1,3051	0,7554	36,66	36,50
1.2	34,7383	2,0680	36,8063	35,5350	35,4892	35,4948	35,4897	1,3166	0,7514	36,33	
8.1	41,1696	2,0589	43,2285	42,1310	41,9788	41,9817	41,9772	1,2513	0,8076	39,22	38,67
8.2	33,3972	2,0435	35,4407	34,5030	34,1818	34,1791	34,1762	1,2645	0,7790	38,12	
11.1	49,9615	2,0097	51,9712	50,8688	50,7579	50,7630	50,7609	1,2103	0,7994	39,78	40,02
11.2	50,5331	2,0145	52,5476	51,6815	51,3589	51,3479	51,3441	1,2035	0,8110	40,26	
13.1	53,0650	2,0858	55,1508	53,9200	53,8876	53,8949	53,8923	1,2585	0,8273	39,66	39,85
13.2	52,6559	2,0210	54,6769	53,6340	53,4610	53,4640	53,4650	1,2119	0,8091	40,03	
média desvio padrão Cv (%)											38,76 1,62 4,18

Tabela 18 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele branca e polpa roxa - A, cozidas.

Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	variedade de pele branca e polpa roxa - A				Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)	
				1º pesagem (g)	2º pesagem (g)	3º pesagem (g)	4º pesagem (g)					
2.1	33,4932	2,0296	35,5228	34,4651	34,1660	34,1320	34,1259	1,3969	0,6327	31,17	31,15	
2.2	49,8744	2,0555	51,9299	50,9590	50,6118	50,5195	50,5142	1,4157	0,6398	31,13		
7.1	41,2501	2,0660	43,3161	42,2740	41,9290	41,8594	41,8648	1,4513	0,6147	29,75	29,68	
7.2	34,3109	2,0560	36,3669	35,3190	34,9967	34,9252	34,9198	1,4471	0,6089	29,62		
10.1	50,6662	2,0142	52,6804	51,6567	51,3581	51,3112	51,3046	1,3758	0,6384	31,69	31,54	
10.2	49,7482	2,0658	51,8140	50,7160	50,4350	50,4017	50,3964	1,4176	0,6482	31,38		
16.1	50,9377	2,0569	52,9946	52,0113	51,7180	51,6265	51,6175	1,3771	0,6798	33,05	32,93	
16.2	50,5302	2,0450	52,5752	51,6290	51,2960	51,2118	51,2012	1,3740	0,6710	32,81		
				média								31,33
				desvio padrão								1,33
				Cv (%)								4,26

Quadro 4 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos das variedades fritas e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Variedade	3	655.9	218.62	37.29	2.32e-06 ***
Residuals	12	70.3	5.86		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.pesosecofrita ~ "Variedade"					
HSD Test for Peso_seco					
Mean Square Error: 5.862396					
Variedade, means					
Peso_seco	std	r	Min	Max	
A 43.21141	1.689561	4	41.78171	45.47128	
B 38.11628	0.929773	4	37.03241	39.04856	
C 44.70751	2.283894	4	42.46298	47.82779	
D 55.67859	3.809767	4	52.16511	59.52482	
Alpha: 0.05 ; DF Error: 12					
Critical Value of Studentized Range: 4.19866					
Minimum Significant Difference: 5.082979					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Peso_seco	groups			
D	55.67859	a			
C	44.70751	b			
A	43.21141	b			
B	38.11628	c			

Tabela 21 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele roxa e polpa amarela – D, fritas.

variedade de pele roxa e polpa amarela - D											
Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	1° pesagem (g)	2° pesagem (g)	3° pesagem (g)	4° pesagem (g)	Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)
1.1	30,6356	2,0284	32,6640	31,7141	31,7002	31,6912	31,6895	0,9745	1,0539	51,96	52,17
1.2	34,7389	2,0396	36,7785	35,8304	35,8115	35,8070	35,8071	0,9714	1,0682	52,37	
8.1	41,1703	2,0958	43,2661	42,4399	42,4192	42,4081	42,4103	0,8558	1,2400	59,17	59,52
8.2	33,3964	2,0807	35,4771	34,6711	34,6498	34,6426	34,6424	0,8347	1,2460	59,88	
11.1	49,9568	2,0570	52,0138	51,1848	51,1661	51,1581	51,1577	0,8561	1,2009	58,38	58,37
11.2	50,5310	2,0032	52,5342	51,7255	51,7032	51,6945	51,7001	0,8341	1,1691	58,36	
13.1	53,0640	2,0215	55,0855	54,1415	54,1222	54,1174	54,1171	0,9684	1,0531	52,09	52,65
13.2	52,6510	2,0024	54,6534	53,7406	53,7241	53,7163	53,7165	0,9369	1,0655	53,21	
média											55,68
desvio padrão											3,81
Cv (%)											6,84

Tabela 22 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele branca e polpa roxa - A, fritas.

Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	variedade de pele branca e polpa roxa - A				Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)
				1º pesagem (g)	2º pesagem (g)	3º pesagem (g)	4º pesagem (g)				
2.1	33,4928	2,0484	35,5412	34,4370	34,4235	34,4143	34,4128	1,1284	0,9200	44,91	45,47
2.2	49,8728	2,0841	51,9569	50,8533	50,8404	50,8313	50,8321	1,1248	0,9593	46,03	
7.1	41,2503	2,0332	43,2835	42,1168	42,1042	42,0960	42,0946	1,1889	0,8443	41,53	41,78
7.2	34,3098	2,0346	36,3444	35,1887	35,1749	35,1675	35,1651	1,1793	0,8553	42,04	
10.1	50,6645	2,0587	52,7232	51,5551	51,5415	51,5296	51,5328	1,1904	0,8683	42,18	42,07
10.2	49,7478	2,0134	51,7612	50,6152	50,6037	50,5939	50,5925	1,1687	0,8447	41,95	
16.1	50,9339	2,0675	53,0014	51,8643	51,8643	51,8412	51,8440	1,1574	0,9101	44,02	43,53
16.2	50,5274	2,0409	52,5683	51,4273	51,4133	51,4049	51,4057	1,1626	0,8783	43,03	
média											43,21
desvio padrão											1,69
Cv (%)											3,91

Tabela 23 – Peso seco das batatas-doces da variedade de pele e polpa roxas - C, fritas.

Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	variedade de pele e polpa roxas - C				Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)
				1º pesagem (g)	2º pesagem (g)	3º pesagem (g)	4º pesagem (g)				
3.1	58,3387	2,0217	60,3604	59,3339	59,3181	59,3080	59,3107	1,0497	0,9720	48,08	47,83
3.2	37,5222	2,0493	39,5715	38,5216	38,5065	38,4990	38,4972	1,0743	0,9750	47,58	
6.1	33,0489	2,0061	35,0550	33,9953	33,9801	33,9735	33,9739	1,0811	0,9250	46,11	44,77
6.2	33,4510	2,0702	35,5212	34,3707	34,3571	34,3501	34,3499	1,1713	0,8989	43,42	
12.1	50,5571	2,0714	52,6285	51,4897	51,4745	51,4664	51,4651	1,1634	0,9080	43,84	43,77
12.2	51,2863	2,0042	53,2905	52,1852	52,1690	52,1628	52,1624	1,1281	0,8761	43,71	
15.1	40,1199	2,0101	42,1300	40,9977	40,9859	40,9771	40,9780	1,1520	0,8581	42,69	42,46
15.2	33,0337	2,0165	35,0502	33,9064	33,8928	33,8871	33,8854	1,1648	0,8517	42,24	
média											44,71
desvio padrão											2,28
Cv (%)											5,11

Tabela 24 – Peso seco das batatas-doces da variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas - B, fritas em imersão por 5 minutos a 190 ° C.

Repetição	Recipiente (g)	Amostra (g)	Recipiente + amostra (g)	variedade IAPAR 69 de pele e polpa alaranjadas - B				Umidade (g)	Peso seco (g)	Peso seco %	Média das duplicatas (%)
				1º pesagem (g)	2º pesagem (g)	3º pesagem (g)	4º pesagem (g)				
4.1	41,3901	2,0223	43,4124	42,2094	42,1955	42,1855	42,1837	1,2287	0,7936	39,24	38,71
4.2	41,1049	2,0802	43,1851	41,9253	41,9130	41,9808	41,8991	1,2860	0,7942	38,18	
5.1	53,4733	2,0049	55,4782	54,2867	54,2764	54,2584	54,2572	1,2210	0,7839	39,10	39,05
5.2	39,7476	2,0078	41,7554	40,5591	40,5469	40,5338	40,5306	1,2248	0,7830	39,00	
9.1	32,6267	2,0078	34,6345	33,4066	33,3946	33,3852	33,3829	1,2516	0,7562	37,66	37,67
9.2	50,6671	2,0550	52,7221	51,4635	51,4511	51,4417	51,4415	1,2806	0,7744	37,68	
14.1	33,2617	2,0108	35,2725	34,0193	34,0085	33,9955	33,9927	1,2798	0,7310	36,35	37,03
14.2	50,7603	2,0071	52,7674	51,5431	51,5318	51,5195	51,5172	1,2502	0,7569	37,71	
média											38,12
desvio padrão											0,93
Cv (%)											2,44

Quadro 5 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos dos processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela - D e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Processamento	2	678.9	339.4	56.42	8.09e-06***	
Residuals	9	54.1	6.0			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ' '	1

Study: anova.pesosecoprocessamento ~ "Processamento"

HSD Test for Peso_seco

Mean Square Error: 6.016505

Processamento, means

	Peso_seco	std	r	Min	Max
Dcozida	38.75933	1.6220001	4	36.49781	40.01760
Dfrita	55.67859	3.8097666	4	52.16511	59.52482
Dinnatura	40.90318	0.9509515	4	39.82745	41.72427

Alpha: 0.05 ; DF Error: 9

Critical Value of Studentized Range: 3.948492

Minimum Significant Difference: 4.842542

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Peso_seco	groups
D frita	55.67859	a
D <i>in natura</i>	40.90318	b
D cozida	38.75933	b

Quadro 6 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos dos processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade de pele branca e polpa roxa - A amarela e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	384.0	192.02	85.02	1.43e-06***
Residuals	9	20.3	2.26		
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ' ' 1

Study: anova.pesosecoprocessamentoA ~ "Processamento"

HSD Test for Peso_seco

Mean Square Error: 2.258461

Processamento, means

	Peso_seco	std	r	Min	Max
A cozida	31.32536	1.334801	4	29.68445	32.93074
A frita	43.21141	1.689561	4	41.78171	45.47128
A <i>in natura</i>	31.09926	1.462557	4	28.95310	32.09866

Alpha: 0.05 ; DF Error: 9

Critical Value of Studentized Range: 3.948492

Minimum Significant Difference: 2.966932

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Peso_seco	groups
A frita	43.21141	a
A cozida	31.32536	b
A <i>in natura</i>	31.09926	b

Quadro 7– Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos dos processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade de pele e polpa roxas - C amarela e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	536.3	268.1	141.4	1.59e-07 ***
Residuals	9	17.1	1.9		
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ' ' 1

Study: anova.pesosecoprocessamentoC ~ "Processamento"

HSD Test for Peso_seco

Mean Square Error: 1.896098

Processamento, means

	Peso_seco	std	r	Min	Max
C cozida	30.49857	0.3204089	4	30.10368	30.79186
C frita	44.70751	2.2838938	4	42.46298	47.82779
C <i>in natura</i>	30.55497	0.6078342	4	29.93181	31.30207

Alpha: 0.05 ; DF Error: 9

Critical Value of Studentized Range: 3.948492

Minimum Significant Difference: 2.718515

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Peso_seco	groups
C frita	44.70751	a
C <i>in natura</i>	30.55497	b
C cozida	30.49857	b

Quadro 8 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pesos secos dos processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B e TUKEY para saber quais pesos secos foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Processamento	2	387.2	193.60	343.9	3.16e-09 ***	
Residuals	9	5.1	0.56			
Signif. codes:	0 ‘***’	0.001 ‘**’	0.01 ‘*’	0.05 ‘.’	0.1 ‘ ’	1

Study: anova.pesosecoprocessamentoB ~ "Processamento"

HSD Test for Peso_seco

Mean Square Error: 0.5629881

Processamento, means

	Peso_seco	std	r	Min	Max
B cozida	26.51520	0.5321333	4	26.08653	27.22164
B frita	38.11628	0.9297730	4	37.03241	39.04856
B <i>in natura</i>	25.66293	0.7357450	4	24.97260	26.65091

Alpha: 0.05 ; DF Error: 9

Critical Value of Studentized Range: 3.948492

Minimum Significant Difference: 1.481327

Treatments with the same letter are not significantly different.

	Peso_seco	groups
B frita	38.11628	a
B cozida	26.51520	b
B <i>in natura</i>	25.66293	b

A3 - Carotenoides totais da batata-doce da variedade IAPAR 69 *in natura*, cozida e frita

Tabela 25 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) da batata-doce da variedade IAPAR 69 *in natura*.

Repetição	Volume final (mL)	Massa (g)	Absorvância	Carotenoides totais (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BU	Média das duplicatas (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BU	Desvio padrão	CV (%)	Média das duplicatas do peso seco (%)	Média das duplicatas (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS
4.1	13,20	0,1580	0,654	21079	20936	203,4	1,0	26,65	78555
4.2	13,00	0,1580	0,655	20792					
5.1	10,70	0,152	0,698	18982	18634	492,3	2,6	24,97	74616
5.2	10,00	0,154	0,728	18285					
9.1	9,90	0,1408	0,474	12858	13076	308,3	2,4	25,26	51762
9.2	9,60	0,1549	0,556	13294					
14.1	10,00	0,1487	0,555	14399	14474	104,7	0,7	25,77	56173
14.2	10,70	0,1538	0,542	14548					
				Média					
				Desvio padrão					
				CV (%)					

Tabela 26 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) e retenção de carotenoides da batata-doce da variedade IAPAR 69 cozida.

Repetição	Volume final (mL)	Massa (g)	Absorvância	Carotenoides totais ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Desvio padrão	CV (%)	Média das duplicatas do peso seco (%)	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção (%)
4.1	10,00	0,1523	0,312	7904	7637	377,2	4,9	27,22	28054	36
4.2	10,00	0,1539	0,294	7370						
5.1	10,50	0,151	0,435	11693	12025	468,7	3,9	26,09	46095	62
5.2	10,00	0,151	0,482	12356						
9.1	10,20	0,1506	0,414	10818	11101	400,9	3,6	26,63	41688	81
9.2	10,00	0,1508	0,445	11385						
14.1	10,20	0,1533	0,313	8035	8300	375,0	4,5	26,12	31772	57
14.2	10,00	0,1527	0,339	8565						
				Média					36902	59
				Desvio padrão					8407	18
				CV (%)					22,8	31,4

Tabela 27 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) e retenção de carotenoides da batata-doce da variedade IAPAR 69 frita.

Repetição	Volume final (mL)	Massa (g)	Absorvância	Carotenoides totais ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Desvio padrão	CV (%)	Média das duplicatas do peso seco (%)	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção (%)
4.1	10,30	0,1542	0,398	10257	10636	536,9	5,0	38,71	27476	35
4.2	10,00	0,1555	0,444	11016						
5.1	10,70	0,151	0,558	15305	15413	152,0	1,0	39,05	39471	53
5.2	10,50	0,151	0,577	15520						
9.1	10,00	0,1533	0,395	9941	10274	471,1	4,6	37,67	27271	53
9.2	10,50	0,1520	0,398	10607						
14.1	10,50	0,1585	0,360	9201	9462	369,0	3,9	37,03	25550	45
14.2	11,00	0,1567	0,359	9723						
				Média					29942	47
				Desvio padrão					6411	8
				CV (%)					21,4	18,1

Quadro 9 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores de carotenoides totais entre os processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	2.803e+09	1.401e+09	14.59	0.0015**
Residuals	9	8.644e+08	9.604e+07		
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ' ' 1

Study: anova.carotenoidetotalB ~ "Processamento"

HSD Test for carotenoide

Mean Square Error: 96044480

Processamento, means

	carotenoide	std	r	Min	Max
B cozida	36902.21	8406.690	4	28054.17	46094.77
B frita	29942.05	6411.282	4	25549.86	39471.30
B <i>in natura</i>	65276.36	13279.928	4	51761.70	78555.08

Alpha: 0.05 ; DF Error: 9

Critical Value of Studentized Range: 3.948492

Minimum Significant Difference: 19348.06

Treatments with the same letter are not significantly different.

	carotenoide	groups
B <i>in natura</i>	65276.36	a
B cozida	36902.21	b
B frita	29942.05	b

Tabela 28 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar diferenças significativas entre as retenções de carotenoides totais entre os processamentos (cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B com nível de significância $p < 0,05$.

	<i>B cozida</i>	<i>B frita</i>
Média	58,647	46,5
Variância	339,79	71
Observações	4	4
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	1,1975	
P(T<=t) uni-caudal	0,1486	
t crítico uni-caudal	2,1318	
P(T<=t) bi-caudal	0,2972	
t crítico bi-caudal	2,7764	

A4 - Carotenoides totais da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita

Tabela 29 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela *in natura*.

Repetição	Volume final (mL)	Massa (g)	Absorvância	Carotenoides totais ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Desvio padrão	CV (%)	Média das duplicatas do peso seco (%)	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS
1.1	1,80	0,3554	0,389	760	753	9,4	1,2	40,38	1866
1.2	1,80	0,3580	0,385	747					
8.1	50,00	5,004	0,253	975	973	2,8	0,3	41,72	2333
8.2	50,00	5,005	0,252	971					
11.1	3,00	0,3795	0,333	1016	993	32,5	3,3	41,68	2381
11.2	2,90	0,3808	0,330	970					
13.1	50,00	4,9922	0,246	951	974	33,7	3,5	39,83	2447
13.2	50,00	4,9854	0,258	998					
				Média					2257
				Desvio padrão					265
				CV (%)					11,7

Tabela 30 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) e retenção de carotenoides da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela cozida.

Repetição	Volume final (mL)	Massa (g)	Absorvância	Carotenoides totais ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Desvio padrão	CV (%)	Média das duplicatas do peso seco (%)	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção (%)
1.1	50,00	5,0720	0,202	768	751	24,5	3,3	36,50	2057	110
1.2	50,00	5,0750	0,193	734						
8.1	25,00	5,018	0,434	834	821	18,9	2,3	38,67	2123	91
8.2	25,00	5,004	0,419	808						
11.1	25,00	5,0680	0,319	607	624	23,7	3,8	40,02	1559	65
11.2	25,00	5,0588	0,336	641						
13.1	25,00	5,0549	0,257	490	502	16,5	3,3	39,85	1260	51
13.2	25,00	5,0687	0,270	514						
				Média					1750	80
				Desvio padrão					412	26
				CV (%)					23,6	32,9

Quadro 10 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores de carotenoides totais entre os processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	590735	295368	3.205	0.0889
Residuals	9	829346	92150		
Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1					

Tabela 31 – Cálculos dos teores de carotenoides totais em base úmida (BU) e em base seca (BS) e retenção de carotenoides da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela frita.

Repetição	Volume final (mL)	Massa (g)	Absorvância	Carotenoides totais ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BU	Desvio padrão	CV (%)	Média das duplicatas do peso seco (%)	Média das duplicatas ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção (%)
1.1	25,00	5,0508	0,535	1022	1000	30,1	3,0	52,17	1918	103
1.2	25,00	5,0829	0,516	979						
8.1	25,00	5,048	0,599	1144	1108	51,2	4,6	59,52	1862	80
8.2	25,00	5,066	0,563	1072						
11.1	25,00	5,0352	0,611	1170	1164	8,5	0,7	58,37	1995	84
11.2	25,00	5,0542	0,607	1158						
13.1	25,00	5,0524	0,440	840	821	26,9	3,3	52,65	1559	64
13.2	25,00	5,0279	0,418	802						
				Média					1833	83
				Desvio padrão					191	16
				CV (%)					10,4	19,4

Tabela 32 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções de carotenoides totais dos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p < 0,05$.

	<i>D frita</i>	<i>D cozida</i>
Média	82,52	79,6
Variância	257,47	687
Observações	4	4
Hipótese de diferença de média	0	
gl	5	
Stat t	0,1928	
P(T<=t) uni-caudal	0,4273	
t crítico uni-caudal	2,015	
P(T<=t) bi-caudal	0,8547	
t crítico bi-caudal	2,5706	

A5 - Análises do perfil e quantificação dos carotenoides identificados na variedade IAPAR 69 *in natura*, cozida e frita

Tabela 33 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, todo-*trans*-β-caroteno e Zeinoxantina em base seca (BS) da batata-doce da variedade IAPAR69 – B *in natura*.

Repetição	Carotenoides Totais Médio (μg 100 g ⁻¹) BS	todo- <i>trans</i> -β-caroteno (%)	todo- <i>trans</i> -β-caroteno Médio (μg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Zeinoxantina (%)	Zeinoxantina Médio (μg 100 g ⁻¹) BS
4.1	78555	91,16	71293	6,82	5452
4.2		90,35		7,06	
5.1	74616	90,52	67822	6,36	4742
5.2		91,27		6,35	
9.1	51762	91,06	47209	6,68	3504
9.2		91,35		6,86	
14.1	56173	90,59	50780	6,52	3896
14.2		90,21		7,35	
Média	65276	90,81	59276	6,75	4398
Desvio padrão	13280	0,45	12045	0,35	872
CV (%)	20,3	0,49	20	5,14	20

Tabela 34 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, todo-*trans*-β-caroteno, 13-*cis*-β-caroteno e Zeinoxantina em base seca (BS) e retenção de todo-*trans*-β-caroteno e Zeinoxantina da batata-doce da variedade da variedade IAPAR69 – B cozida.

Repetição	Carotenoides Totais Médio (μg 100 g ⁻¹) BS	todo- <i>trans</i> -β-caroteno (%)	todo- <i>trans</i> -β-caroteno Médio (μg 100 g ⁻¹) BS	Retenção de todo- <i>trans</i> -β-caroteno (%)	13- <i>cis</i> -β-caroteno (%)	13- <i>cis</i> -β-caroteno (μg 100 g ⁻¹) BS	Zeinoxantina (%)	Zeinoxantina Médio (μg 100 g ⁻¹) BS	Retenção de Zeinoxantina (%)
4.1	28054	69,18	20345	28,54	7,29	2091	5,15	1509	27,69
4.2		75,86			7,62		5,61		
5.1	46095	71,82	34857	51,39	5,83	3247	4,16	2226	46,95
5.2		79,42			8,26		5,50		
9.1	41688	81,01	32677	69,22	7,13	2916	5,47	2201	62,81
9.2		75,76			6,86		5,09		
14.1	31772	74,12	23457	46,19	6,03	1981	5,22	1616	41,47
14.2		73,54			6,44		4,95		
Média	36902	75,09	27834	48,84	6,93	2559	5,14	1888	44,73
Desvio padrão	8406	3,85	7024	16,74	0,82	620	0,46	379	14,53
CV (%)	22,78	5,13	25	34,28	11,79	24	8,89	20	32,48

Tabela 35 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, todo-*trans*-β-caroteno, 13-*cis*-β-caroteno e Zeinoxantina em base seca (BS) e retenção de todo-*trans*-β-caroteno e Zeinoxantina da batata-doce da variedade da variedade IAPAR69 – B frita.

Repetição	Carotenoides Totais Médio (μg 100 g ⁻¹) BS	todo- <i>trans</i> -β-caroteno (%)	todo- <i>trans</i> -β-caroteno Médio (μg 100 g ⁻¹) BS	Retenção de todo- <i>trans</i> -β-caroteno (%)	13- <i>cis</i> -β-caroteno (%)	13- <i>cis</i> -β-caroteno (μg 100 g ⁻¹) BS	Zeinoxantina (%)	Zeinoxantina Médio (μg 100 g ⁻¹) BS	Retenção de Zeinoxantina (%)
4.1	28054	76,00	21237	29,79	9,47	2859	4,70	1218	22,33
4.2		75,40			10,91		3,98		
5.1	46095	79,54	36659	54,05	8,72	4174	4,91	2229	47,00
5.2		79,52			9,39		4,76		
9.1	41688	85,51	34768	73,65	7,26	3235	5,34	2228	63,59
9.2		81,29			8,26		5,35		
14.1	31772	80,90	25823	50,85	8,26	2567	4,38	1357	34,83
14.2		81,65			7,90		4,16		
Média	36902,21	79,98	29622	52,08	8,77	3209	4,70	1758	41,94
Desvio padrão	8406,69	3,23	7320	17,96	1,13	699	0,51	546	17,60
CV (%)	22,78	4,04	25	34,48	12,94	22	10,77	31	41,97

Quadro 11 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores de todo-*trans*-β-caroteno totais dos processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância alfa $< 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	2.495e+09	1.247e+09	15.09	0.00133 **
Residuals	9	7.440e+08	8.267e+07		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.betacaroteno ~ "Processamento"					
HSD Test for betacaroteno					
Mean Square Error: 82665177					
Processamento, means					
	betacaroteno	std	r	Min	Max
Bcozida	27834.02	7024.283	4	20344.89	34856.86
Bfrita	29621.64	7319.978	4	21237.01	36659.17
Binnatura	59276.06	12044.621	4	47209.26	71292.66
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 17949.92					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	betacaroteno	groups			
Binnatura	59276.06	a			
Bfrita	29621.64	b			
Bcozida	27834.02	b			

Quadro 12 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores de zeinoxantina dos processamentos (*in natura*, cozida e

frita) da variedade IAPAR69 – B e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	17721279	8860640	22.12	0.000336 ***
Residuals	9	3605709	400634		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.zeinoxantina ~ "Processamento"					
HSD Test for zeinoxantina					
Mean Square Error: 400634.4					
Processamento, means					
	zeinoxantina	std	r	Min	Max
Bcozida	1888.105	378.6638	4	1509.314	2226.377
Bfrita	1757.779	546.4495	4	1217.551	2228.682
Binnatura	4398.353	871.7281	4	3504.267	5451.723
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 1249.613					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	zeinoxantina	groups			
Binnatura	4398.353	a			
Bcozida	1888.105	b			
Bfrita	1757.779	b			

Tabela 36 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre os teores de 13-*cis*- β -caroteno dos processamentos (cozida e frita) da variedade IAPAR69 – B com significância $p < 0,05$.

	<i>Bcozida</i>	<i>Bfrita</i>
Média	2558,75	3208,75
Variância	384633,5833	488854,9167
Observações	4	4
Hipótese de diferença de média	0	
gl	6	
Stat t	-1,39096037	
P(T<=t) uni-caudal	0,106814292	
t crítico uni-caudal	1,943180281	
P(T<=t) bi-caudal	0,213628585	
t crítico bi-caudal	2,446911851	

A6 - Análises do perfil e quantificação dos carotenoides não identificados na variedade de pele roxa e polpa amarela *in natura*, cozida e frita

Tabela 37 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, e dos carotenoides não identificados em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela *in natura*.

Amostra	Carotenoides Totais Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 1 (%)	Pico 1 Médio (µg 100 ⁰ g ⁻¹) BS	Pico 2 (%)	Pico 2 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 3 (%)	Pico 3 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 4 (%)	Pico 4 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 5 (%)	Pico 5 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 6 (%)	Pico 6 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 7 (%)	Pico 7 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 8 (%)	Pico 8 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 9 (%)	Pico 9 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 10 (%)	Pico 10 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 11 (%)	Pico 11 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	
1.1	1866	6,32		4,77		1,77		16,39		40,95		4,58		8,99		2,41		3,00		1,99		3,19		60
1.2		6,70	121	4,81	89	1,65	32	16,82	310	41,39	768	4,88	88	8,85	166	2,48	46	2,97	56	1,69	34	3,20		
8.1	2333	5,64	141	4,48	109	2,57	49	16,23	386	43,15	1015	3,86	93	9,06	213	1,78	43	3,00	72	1,71	41	2,95		70
8.2		6,43		4,83		1,62		16,90		43,86		4,11		9,21		1,88		3,19		1,82		3,02		
11.1	2381	8,00	204	5,43	132	0,00	0	18,25	457	41,47	1025	5,34	129	10,20	222	7,95	172	2,92	35	0,00	0	0,00		0
11.2		9,13		5,64		0,00		20,12		44,64		5,50		8,44		6,52		0,00		0,00		0,00		
13.1	2447	5,50	136	4,62	114	1,46	35	16,15	402	41,00	1025	4,29	105	9,25	230	1,46	37	3,74	92	2,80	68	3,68		91
13.2		5,63		4,73		1,44		16,71		42,80		4,32		9,55		1,53		3,74		2,72		3,75		
Média das repetições de campo	2257	6,67	151	4,91	111	1,31	29	17,20	389	42,41	958	4,61	104	9,19	208	3,25	74	2,82	64	1,59	36	2,47		55
Desvio padrão das repetições de campo	265	1,28	37	0,40	17	0,88	21	1,35	61	1,41	127	0,59	18	0,52	28	2,52	65	1,19	24	1,07	28	1,55		39
CV (%) das repetições de campo	11,7	19,23	24	8,21	16	67,36	71	7,86	16	3,31	13	12,70	18	5,65	14	77,36	88	42,13	38	67,33	78	62,79		71

Tabela 38 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, e dos carotenoides não identificados em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela cozida.

Amostra	Carotenoides Totais Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 1 (%)	Pico 1 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 2 (%)	Pico 2 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 3 (%)	Pico 3 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 4 (%)	Pico 4 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 5 (%)	Pico 5 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 6 (%)	Pico 6 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 7 (%)	Pico 7 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 8 (%)	Pico 8 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 9 (%)	Pico 9 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 10 (%)	Pico 10 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 11 (%)	Pico 11 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS
1.1	2057	4,06	93	7,00	197	0,00	0	8,21	221	24,27	596	0,00	40	9,79	253	3,52	92	2,75	67	0,00	0	3,45	82
1.2		4,95		12,12		0,00		13,29		33,62		3,91	40	14,84		5,38		3,76		0,00		4,53	
8.1	2123	3,94	84	9,77	207	2,06	44	11,73	249	35,25	748	2,27	48	14,59	310	2,00	42	3,96	84	2,73	58	3,96	84
8.2		3,94		9,77		2,06		11,73		35,25		2,27	48	14,59		2,00		3,96		2,73		3,96	
11.1	1559	1,94	30	15,05	247	1,50	23	13,47	207	26,74	404	1,19	18	16,15	255	2,77	44	4,95	81	3,55	56	3,01	50
11.2		1,89		16,69		1,40		13,15		25,04		1,11	18	16,55		2,83		5,41		3,69		3,36	
13.1	1260	3,27	39	13,47	162	1,46	22	12,36	154	25,38	316	1,56	20	16,34	213	2,52	31	4,99	65	3,63	47	4,47	57
13.2		2,94		12,28		2,01		12,09		24,75		1,64	20	17,45		2,41		5,30		3,83		4,61	
Média das repetições de campo	1750	3,37	61	12,02	203	1,31	22	12,00	208	28,79	516	1,74	32	15,04	258	2,93	52	4,39	74	2,52	40	3,92	68
Desvio padrão das repetições de campo	412	1,07	31	3,13	35	0,85	18	1,68	40	4,98	194	1,14	15	2,36	40	1,11	27	0,93	10	1,61	27	0,60	17
CV (%) das repetições de campo	23,6	31,86	51	26,03	17	65,18	81	14,01	19	17,29	38	65,17	47	15,70	15	37,75	51	21,11	13	63,93	68	15,30	26

Tabela 39 – Cálculos dos teores de carotenoides totais, e dos carotenoides não identificados em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarela frita.

Amostra	Carotenoides Totais Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 1 (%)	Pico 1 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 2 (%)	Pico 2 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 3 (%)	Pico 3 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 4 (%)	Pico 4 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 5 (%)	Pico 5 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 6 (%)	Pico 6 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 7 (%)	Pico 7 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 8 (%)	Pico 8 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 9 (%)	Pico 9 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 10 (%)	Pico 10 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS	Pico 11 (%)	Pico 11 Médio (µg 100 ⁻¹ g ⁻¹) BS
1.1	1918	3,18	51	10,61	285	1,79	28	11,90	235	33,05	634	1,16	21	13,10	312	1,95	28	2,39	56	3,31	73	5,01	112
1.2		2,15		19,09		1,10		12,65		16,25		0,99		19,49		1,01		3,41		4,30		6,69	
8.1	1862	1,55	32	15,00	360	1,99	31	12,46	217	25,55	389	0,74	10	16,99	353	1,95	27	4,81	75	4,18	76	4,47	96
8.2		1,93		23,67		1,39		10,83		16,19		0,32		20,89		0,90		3,26		3,99		5,82	
11.1	1995	1,41	30	14,22	291	2,20	42	12,39	248	27,33	527	0,86	16	15,48	324	1,88	38	4,21	90	3,98	81	4,23	87
11.2		1,55		15,00		1,99		12,46		25,55		0,74		16,99		1,95		4,81		4,18		4,47	
13.1	1559	1,20	17	16,36	257	1,27	19	13,27	204	19,65	298	0,67	11	18,45	292	1,82	28	4,59	76	4,68	74	6,05	92
13.2		1,04		16,63		1,18		12,93		18,56		0,68		18,96		1,74		5,20		4,77		5,73	
Média das repetições de campo	1833	1,75	33	16,32	298	1,61	30	12,36	226	23,70	462	0,77	14	17,54	320	1,65	30	4,09	74	4,17	76	5,31	97
Desvio padrão das repetições de campo	191	0,68	14	3,82	44	0,43	9	0,74	19	5,87	148	0,25	5	2,46	25	0,44	5	0,97	14	0,45	4	0,89	11
CV (%) das repetições de campo	10,4	38,85	43	23,42	15	26,48	31	5,97	9	24,77	32	32,23	35	14,03	8	26,44	18	23,72	19	10,89	5	16,78	11

Tabela 40 – Carotenoides não identificados nos quatro picos majoritários em base seca (BS) da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarelada *in natura*.

Amostra	Pico 2 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Pico 4 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Pico 5 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Pico 7 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS
1.1	89	310	768	166
1.2				
8.1	109	386	1015	213
8.2				
11.1	132	457	1025	222
11.2				
13.1	114	402	1025	230
13.2				
Média das repetições de campo ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	111	389	958	208
Desvio padrão das repetições de campo ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) BU	17	61	127	28
CV (%) das repetições de campo	16	16	13	14

Tabela 41 – Carotenoides não identificados nos quatro picos majoritários em base seca (BS) e suas retenções da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarelada cozida.

Amostra	Pico 2 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção do Pico 2 (%)	Pico 4 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção do Pico 4 (%)	Pico 5 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção do Pico 5 (%)	Pico 7 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção do Pico 7 (%)
1.1	197	220,06	221	71,38	596	77,52	253	152,23
1.2								
8.1	207	191,00	249	64,44	748	73,74	310	145,35
8.2								
11.1	247	187,71	207	45,42	404	39,37	255	114,85
11.2								
13.1	162	141,82	154	38,32	316	30,81	213	92,56
13.2								
Média das repetições de campo ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	203	185,1	208	54,9	516	55,4	258	126,2
Desvio padrão das repetições de campo ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) BU	35	32,3	40	15,6	194	23,7	40	27,7
CV (%) das repetições de campo	17	17,5	19	28,4	38	42,8	15	22,0

Tabela 42 – Carotenoides não identificados nos quatro picos majoritários em base seca (BS) e suas retenções da batata-doce da variedade de pele roxa e polpa amarelada frita.

Amostra	Pico 2 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção do Pico 2 (%)	Pico 4 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção do Pico 4 (%)	Pico 5 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção do Pico 5 (%)	Pico 7 Médio ($\mu\text{g } 100^{-1} \text{ g}^{-1}$) BS	Retenção do Pico 7 (%)
1.1	285	318,62	235	75,97	634	82,50	312	187,75
1.2								
8.1	360	331,51	217	56,11	389	38,29	353	165,48
8.2								
11.1	291	221,11	248	54,25	527	51,44	324	145,92
11.2								
13.1	257	224,84	204	50,81	298	29,06	292	126,80
13.2								
Média das repetições de campo ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	298	274,0	226	59,3	462	50,3	320	156,5
Desvio padrão das repetições de campo ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)								
BU	44	59,2	19	11,3	148	23,3	25	26,1
CV (%) das repetições de campo	15	21,6	9	19,1	32	46,4	8	16,7

Quadro 13 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores do pico 2, não identificado, nos processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarelada – D e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	70168	35084	30.55	9.73e-05 ***
Residuals	9	10334	1148		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.picodois ~ "Processamento"					
HSD Test for Picodois					
Mean Square Error: 1148.266					
Processamento, means					
	Picodois	std	r	Min	Max
Dcozida	203.4269	35.08800	4	162.21696	247.4062
Dfrita	298.3376	43.67804	4	257.17161	359.9600
Dinnatura	111.0365	17.48877	4	89.37997	131.8057
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 66.89944					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Picodois	groups			
Dfrita	298.3376	a			
Dcozida	203.4269	b			
Dinnatura	111.0365	c			

Quadro 14 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores do pico 4, não identificado, nos processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarelada – D e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	79338	39669	21.08	0.000402 ***
Residuals	9	16937	1882		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.picoquatro ~ "Processamento"					
HSD Test for Picoquatro					
Mean Square Error: 1881.852					
Processamento, means					
	Picoquatro	std	r	Min	Max
Dcozida	207.9246	39.86518	4	154.0274	248.9976
Dfrita	226.0718	19.35606	4	204.2406	247.8493
Dinnatura	388.7672	60.67675	4	309.8443	456.8551
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 85.64343					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Picoquatro	groups			
Dinnatura	388.7672	a			
Dfrita	226.0718	b			
Dcozida	207.9246	b			

Quadro 15 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores do pico 5, não identificado, nos processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarelada – D e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	593618	296809	11.75	0.0031 **
Residuals	9	227391	25266		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.picocinco ~ "Processamento"					
HSD Test for Picocinco					
Mean Square Error: 25265.67					
Processamento, means					
	Picocinco	std	r	Min	Max
Dcozida	515.8034	194.0636	4	315.8033	748.2664
Dfrita	461.9070	148.4765	4	297.8638	633.8117
Dinnatura	958.3528	126.8504	4	768.2199	1025.2749
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 313.8099					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Picocinco	groups			
Dinnatura	958.3528	a			
Dcozida	515.8034	b			
Dfrita	461.9070	b			

Quadro 16 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os teores do pico 7, não identificado, nos processamentos (*in natura*, cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarelada – D e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Processamento	2	25321	12660	12.51	0.00252 **
Residuals	9	9111	1012		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.picosete ~ "Processamento"					
HSD Test for Picosete					
Mean Square Error: 1012.31					
Processamento, means					
	Picosete	std	r	Min	Max
Dcozida	257.7098	39.75541	4	212.8664	309.7080
Dfrita	320.1446	25.42461	4	291.6275	352.6063
Dinnatura	207.8613	28.46099	4	166.4445	229.9822
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 62.81424					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Picosete	groups			
Dfrita	320.1446	a			
Dcozida	257.7098	ab			
Dinnatura	207.8613	b			

Tabela 43 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções do pico 2, não identificado dos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p < 0,05$.

	<i>D cozida</i>	<i>D frita</i>
Média	185,148572	274,021134
Variância	1045,6396	3504,28884
Observações	4	4
Hipótese de diferença de média	0	
gl	5	
Stat t	-2,6350897	
P(T<=t) uni-caudal	0,0231244	
t crítico uni-caudal	2,01504837	
P(T<=t) bi-caudal	0,04624881	
t crítico bi-caudal	2,57058184	

Tabela 44 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções do pico 4, não identificado, nos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p < 0,05$.

	<i>D cozida</i>	<i>D frita</i>
Média	54,8902375	59,2855192
Variância	242,543607	128,604588
Observações	4	4
Hipótese de diferença de média	0	
gl	5	
Stat t	-0,4562922	
P(T<=t) uni-caudal	0,33365769	
t crítico uni-caudal	2,01504837	
P(T<=t) bi-caudal	0,66731537	
t crítico bi-caudal	2,57058184	

Tabela 45 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções do pico 5, não identificado, nos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p < 0,05$.

	<i>D cozida</i>	<i>D frita</i>
Média	55,3574688	50,3222737
Variância	562,497953	544,66428
Observações	4	4
Hipótese de diferença de média	0	
gl	6	
Stat t	0,30264999	
P(T<=t) uni-caudal	0,38618731	
t crítico uni-caudal	1,94318028	
P(T<=t) bi-caudal	0,77237463	
t crítico bi-caudal	2,44691185	

Tabela 46 – Estatística calculada no programa Excel: Teste T (duas amostras com variâncias desiguais) para avaliar se há diferenças significativas entre as retenções do pico 7, não identificado, nos processamentos (cozida e frita) da variedade de pele roxa e polpa amarela – D com significância $p < 0,05$.

	<i>D cozida</i>	<i>D frita</i>
Média	126,245275	156,487759
Variância	768,271439	683,613071
Observações	4	4
Hipótese de diferença de média	0	
gl	6	
Stat t	-1,5873819	
P(T<=t) uni-caudal	0,08176194	
t crítico uni-caudal	1,94318028	
P(T<=t) bi-caudal	0,16352389	
t crítico bi-caudal	2,44691185	

A7 - Comparação dos perfis e quantificação das antocianinas por CLAE-DAD, quantificação de antocianinas totais por Espectrofotometria UV/Vis e pelo método do pH diferencial das variedades de batatas-doces de polpa roxa *in natura*, cozida e frita

Tabela 47 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele e polpa roxas *in natura*.

Amostra	Massa (g)	Leitura em 530 nm	Concentração por espectrofotometria UV/Vis (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Leitura em 530 nm em pH 1	Leitura em 700 nm em pH 1	Leitura em 530 nm pH 4,5	Leitura em 700 nm pH 4,5	Acorrigida	Concentração pelo método do pH diferencial (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Soma das áreas dos picos em 530 nm	Concentração por CLAE-DAD (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)
3.1	1,0856	0,555	22,49				0,394	0,020	0,171	0,021	0,224	9,08					11,38			
3.2	1,0610	0,530	21,98	22,23	0,36	1,64	0,374	0,019	0,162	0,020	0,213	8,83	8,95	0,17	1,94	6110238	11,29	11,33	0,06	0,53
6.1	1,0375	0,779	33,03				0,582	0,020	0,244	0,021	0,339	14,38					11,50			
6.2	1,0997	0,828	33,12	33,08	0,06	0,20	0,610	0,019	0,259	0,022	0,354	14,16	14,27	0,15	1,06	5905290,5	10,80	11,15	0,50	4,49
12.1	1,0954	0,516	20,72				0,375	0,018	0,164	0,026	0,219	8,80					12,04			
12.2	1,0681	0,539	22,20	21,46	1,04	4,87	0,378	0,022	0,164	0,023	0,215	8,86	8,83	0,04	0,48	5874204,5	12,20	12,12	0,12	0,96
15.1	1,0641	0,808	33,41				0,586	0,019	0,268	0,021	0,320	13,23					18,69			
15.2	1,0451	0,779	32,79	33,10	0,43	1,31	0,603	0,018	0,268	0,021	0,338	14,23	13,73	0,71	5,14	6448165	18,67	18,68	0,01	0,07
Média das repetições de campo				27,47									11,44					13,32		
Desv. Pad. das repetições de campo				6,50									2,96					3,60		
CV (%) das repetições de campo				23,65									25,85					26,99		

Quadro 17 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele e polpa roxas *in natura* – C e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
metodo	2	613.9	306.93	14.4	0.00157 **
Residuals	9	191.9	21.32		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.metodopeleroxainnatura ~ "metodo"					
HSD Test for antocianinastotais					
Mean Square Error: 21.31671					
metodo, means					
	antocianinas totais	std	r	Min	Max
CLAEDAD	13.3200	3.598083	4	11.15	18.68
pHdiferencial	11.4450	2.958891	4	8.83	14.27
UVVis	27.4675	6.499915	4	21.46	33.10
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 9.115098					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Antocianinas totais	groups			
UVVis	27.4675	a			
CLAEDAD	13.3200	b			
pHdiferencial	11.4450	b			

Tabela 48 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele e polpa roxas cozida.

Amostra	Massa (g)	Leitura em 530 nm	Concentração por espectrofotometria UV/Vis (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Leitura em 530 nm em pH 1	Leitura em 700 nm em pH 1	Leitura em 530 nm pH 4,5	Leitura em 700 nm pH 4,5	Acorrigida	Concentração pelo método do pH diferencial (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Soma das áreas dos picos em 530 nm	Concentração por CLAE-DAD (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)					
3.1	1,1022	0,362	86,70	86,37	0,46	0,53	0,988	0,014	0,357	0,012	0,629	50,21	49,42	1,12	2,28	18076868	66,42	64,48	2,74	4,25					
3.2	1,1473	0,374	86,05				0,988	0,011	0,356	0,013	0,634	48,62				17718366	62,54								
6.1	1,1060	0,435	103,82				1,421	0,016	0,437	0,013	0,981	78,04				20796135	76,16								
6.2	1,0710	0,405	99,82	101,82	2,83	2,78	1,298	0,012	0,414	0,014	0,886	72,79	75,42	3,72	4,93	19488293	73,70	74,93	1,74	2,32					
12.1	1,1040	0,368	87,99				0,955	0,011	0,364	0,012	0,592	47,18				17747477	65,10								
12.2	1,0022	0,351	92,45				0,932	0,011	0,342	0,013	0,592	51,97				16572921	66,97								
15.1	1,0376	0,357	90,82	91,43	0,86	0,94	0,932	0,012	0,365	0,011	0,566	48,00	48,99	1,40	2,85	16868301	65,84	65,54	0,42	0,64					
15.2	1,0124	0,353	92,04				0,930	0,012	0,363	0,020	0,575	49,97				16311761	65,25								
Média das repetições de campo				92,46									55,85			67,75									
Desv. Pad. das repetições de campo				6,60									13,05			4,83									
CV (%) das repetições de campo				7,14									23,36			7,13									

Quadro 18 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele e polpa roxas cozidas – C e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
metodo	2	2789.7	1394.9	17.64	0.000769 ***
Residuals	9	711.5	79.1		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.metodopeleroxaczida ~ "metodo"					
HSD Test for antocianinastotais					
Mean Square Error: 79.05911					
metodo, means					
	antocianinastotais	std	r	Min	Max
CLAEDAD	67.7475	4.832304	4	64.48	74.93
pHdiferencial	55.8525	13.047379	4	48.99	75.42
UVVis	92.4600	6.602429	4	86.37	101.82
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 17.55405					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Antocianinas totais	groups			
UVVis	92.4600	a			
CLAEDAD	67.7475	b			
pHdiferencial	55.8525	b			

Tabela 49 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele e polpa roxas fritas.

Amostra	Massa (g)	Leitura em 530 nm	Concentração por espectrofotometria UV/Vis (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Leitura em 530 nm em pH 1	Leitura em 700 nm em pH 1	Leitura em 530 nm pH 4,5	Leitura em 700 nm pH 4,5	Acorrigida	Concentração pelo método do pH diferencial (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Soma das áreas dos picos em 530 nm	Concentração por CLAE-DAD (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)		
3.1	1,0259	0,347	89,28	90,97	2,39	2,63	0,669	0,053	0,246	0,047	0,417	35,76	36,91	1,62	4,39	8342482	32,90	34,96	2,92	8,35		
3.2	1,0312	0,362	92,66				0,711	0,054	0,26	0,049	0,446	38,06				9435873	37,03					
6.1	1,0212	0,424	109,60				0,778	0,057	0,32	0,049	0,45	38,77				9646609	38,23					
6.2	1,0242	0,402	103,61	106,60	4,24	3,97	0,800	0,059	0,309	0,049	0,481	41,32	40,05	1,80	4,50	9630572	38,05	38,14	0,12	0,33		
12.1	1,0034	0,316	83,13	87,34	5,95	6,81	0,699	0,047	0,253	0,036	0,435	38,15	37,92	0,31	0,82	9325555	37,61	39,67	2,92	7,36		
12.2	1,0035	0,348	91,54				0,705	0,044	0,263	0,032	0,43	37,70				10349060	41,74					
15.1	1,009	0,273	71,42	66,72	6,65	9,96	0,466	0,047	0,194	0,038	0,263	22,93	22,52	0,59	2,64	4862269	19,47	19,67	0,29	1,45		
15.2	1,0513	0,247	62,02				0,477	0,058	0,195	0,04	0,264	22,10				5170141	19,87					
Média das repetições de campo				87,91								34,35				33,11						
Desv. Pad. das repetições de campo				16,41								8,00				9,17						
CV (%) das repetições de campo				18,67								23,28				27,71						

Quadro 19 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele e polpa roxas fritas – C e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
metodo	2	7830	3915	28.14	0.000134 ***
Residuals	9	1252	139		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.metodopeleroxafrita ~ "metodo"					
HSD Test for antocianinastotais					
Mean Square Error: 139.1276					
metodo, means					
	antocianinastotais	std	r	Min	Max
CLAEDAD	33.1100	9.172252	4	19.67	39.67
pHdiferencial	34.3500	7.994527	4	22.52	40.05
UVVis	87.9075	16.411588	4	66.72	106.60
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 23.2867					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Antocianinas totais	groups			
UVVis	87.9075	a			
pHdiferencial	34.3500	b			
CLAEDAD	33.1100	b			

Tabela 50 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele branca e polpa roxa *in natura*.

Amostra	Massa (g)	Leitura em 530 nm	Concentração por espectrofotometria UV/Vis (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Leitura em 530 nm em pH 1	Leitura em 700 nm em pH 1	Leitura em 530 nm em pH 4,5	Leitura em 700 nm em pH 4,5	Acorrigida	Concentração pelo método do pH diferencial (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Soma das áreas dos picos em 530 nm	Concentração por CLAE-DAD (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)
2.1	1,0301	0,558	23,83	23,78	0,07	0,30	0,462	0,021	0,192	0,024	0,273	11,66	10,85	1,15	10,62	13683906	26,89	25,54	1,92	7,51
2.2	1,0789	0,582	23,73				0,419	0,017	0,173	0,017	0,246	10,03				12887664	24,18			
7.1	1,0161	0,841	36,41	37,06	0,91	2,45	0,702	0,018	0,298	0,022	0,408	17,67	17,52	0,20	1,15	15169811	30,23	30,74	0,73	2,37
7.2	1,0480	0,898	37,70				0,707	0,022	0,297	0,026	0,414	17,38				16177702	31,26			
10.1	1,0288	0,590	25,23	25,96	1,04	4,00	0,574	0,018	0,226	0,026	0,356	15,22	14,30	1,31	9,17	10298696	20,26	20,92	0,94	4,51
10.2	1,0365	0,629	26,70				0,518	0,018	0,207	0,022	0,315	13,37				11057821	21,59			
16.1	1,0448	0,549	23,12	22,94	0,24	1,06	0,408	0,024	0,171	0,023	0,236	9,94	10,26	0,45	4,42	10653154	20,63	22,33	2,40	10,74
16.2	1,0355	0,536	22,77				0,428	0,020	0,187	0,028	0,249	10,58				12291526	24,03			
Média das repetições de campo				27,44									13,23					24,88		
Desv. Pad. das repetições de campo				6,54									3,37					4,36		
CV (%) das repetições de campo				23,83									25,47					17,51		

Quadro 20 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele branca e polpa roxa *in natura* – A e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
metodo	2	458.6	229.30	9.407	0.00624 **
Residuals	9	219.4	24.37		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.metodopelebrancainnatura ~ "metodo"					
HSD Test for antocianinastotais					
Mean Square Error: 24.37487					
metodo, means					
	antocianinas totais	std	r	Min	Max
CLAEDAD	24.8825	4.357342	4	20.92	30.74
pHdiferencial	13.2325	3.368198	4	10.26	17.52
UVVis	27.4350	6.541669	4	22.94	37.06
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 9.747034					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Antocianinas totais	groups			
UVVis	27.4350	a			
CLAEDAD	24.8825	a			
pHdiferencial	13.2325	b			

Tabela 51 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele branca e polpa roxa cozida.

Amostra	Massa (g)	Leitura em 530 nm	Concentração por espectrofotometria UV/Vis (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Leitura em 530 nm em pH 1	Leitura em 700 nm em pH 1	Leitura em 530 nm pH 4,5	Leitura em 700 nm pH 4,5	Acorrigida	Concentração pelo método do pH diferencial (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Des v. Pad	CV (%)	Soma das áreas dos picos em 530 nm	Concentração por CLAE-DAD (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)
2.1	1,0080	0,336	87,99	88,28	0,41	0,47	0,920	0,022	0,344	0,016	0,570	49,76	49,14	0,87	1,76	17144862	68,88	67,77	1,58	2,33
2.2	1,0371	0,348	88,57				0,904	0,013	0,334	0,015	0,572	48,53				17069181	66,65			
7.1	1,0790	0,473	115,71	115,8	0,15	0,13	1,244	0,013	0,472	0,016	0,775	63,20	63,63	0,61	0,96	23883775	89,67	88,06	2,28	2,59
7.2	1,0383	0,456	115,93				1,174	0,014	0,424	0,02	0,756	64,07				22158081	86,44			
10.1	1,0606	0,352	87,61	89,42	2,56	2,86	0,936	0,014	0,345	0,025	0,602	49,94	48,81	1,60	3,28	17266675	65,93	65,30	0,89	1,37
10.2	1,0851	0,375	91,22				0,939	0,015	0,354	0,018	0,588	47,68				17326867	64,67			
16.1	1,0856	0,300	72,95	73,34	0,56	0,76	0,757	0,011	0,31	0,036	0,472	38,26	39,44	1,67	4,24	13199412	49,22	51,21	2,81	5,49
16.2	1,0310	0,288	73,74				0,744	0,012	0,277	0,021	0,476	40,62				13548550	53,20			
Média das repetições de campo				91,71									50,26					68,08		
Desv. Pad. das repetições de campo				17,66									9,99					15,18		
CV (%) das repetições de campo				19,26									19,87					22,30		

Quadro 21 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele branca e polpa roxa cozida – A e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
metodo	2	3460	1730.1	8.082	0.00978 **
Residuals	9	1927	214.1		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.metodopelebrancacozida ~ "metodo"					
HSD Test for antocianinastotais					
Mean Square Error: 214.0629					
metodo, means					
	antocianinas totais	std	r	Min	Max
CLAEDAD	68.085	15.183562	4	51.21	88.06
pHdiferencial	50.255	9.986426	4	39.44	63.63
UVVis	91.715	17.661237	4	73.34	115.82
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 28.88497					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Antocianinas totais		groups		
UVVis	91.715		a		
CLAEDAD	68.085		ab		
pHdiferencial	50.255		b		

Tabela 52 - Quantificação de antocianinas por espectrofotometria UV/Vis, pelo método do pH diferencial e por CLAE-DAD da batatas-doces de pele branca e polpa roxa frita.

Amostra	Massa (g)	Leitura em 530 nm	Concentração por espectrofotometria UV/Vis (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Leitura em 530 nm em pH 1	Leitura em 700 nm em pH 1	Leitura em 530 nm pH 4,5	Leitura em 700 nm pH 4,5	Acorrigida	Concentração pelo método do pH diferencial (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)	Soma das áreas dos picos em 530 nm	Concentração por CLAE-DAD (mg de equivalentes de Cy-3-gli 100 ⁻¹ g ⁻¹ de amostra em BS)	Média	Desv. Pad	CV (%)
2.1	1,0389	0,48	121,96	117,96	5,66	4,80	0,874	0,080	0,487	0,195	0,502	42,52	43,95	2,03	4,61	13709981	53,43	52,98	0,64	1,21
2.2	1,0470	0,452	113,96				0,909	0,075	0,348	0,054	0,540	45,38				13582306	52,52			
7.1	1,0714	0,487	119,98				1,074	0,068	0,411	0,043	0,638	52,40				18035759	68,18			
7.2	1,0703	0,457	112,71	116,35	5,14	4,42	1,065	0,058	0,41	0,047	0,644	52,94	52,67	0,39	0,73	17972451	68,01	68,09	0,12	0,18
10.1	1,0903	0,414	100,23				0,911	0,047	0,347	0,042	0,559	45,11				15561508	57,79			
10.2	1,0495	0,414	104,13	102,18	2,76	2,70	0,896	0,050	0,343	0,045	0,548	45,94	45,53	0,59	1,29	14997436	57,86	57,83	0,05	0,08
16.1	1,1174	0,353	83,39				0,764	0,050	0,284	0,037	0,467	36,77				12314847	44,61			
16.2	1,0873	0,356	86,43	84,91	2,15	2,53	0,744	0,047	0,282	0,038	0,453	36,66	36,72	0,08	0,22	11941607	44,46	44,54	0,11	0,25
Média das repetições de campo				105,35									44,72					55,86		
Desv. Pad. das repetições de campo				15,36									6,54					9,83		
CV (%) das repetições de campo				14,58									14,64					17,60		

Quadro 22 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as quantificações de antocianinas totais realizadas pelos métodos de análise por UV/Vis, pH diferencial e CLAE-DAD, para as batatas-doces de pele branca e polpa roxa frita – A e TUKEY para saber quais resultados foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
metodo	2	8333	4166	33.3	6.93e-05 ***
Residuals	9	1126	125		

Study: anova.metodopelebrancafrita ~ "metodo"					
HSD Test for antocianinastotais					
Mean Square Error: 125.133					
metodo, means					
	antocianinas totais	std	r	Min	Max
CLAEDAD	55.8600	9.830066	4	44.54	68.09
pHdiferencial	44.7175	6.543482	4	36.72	52.67
UVVis	105.3500	15.360714	4	84.91	117.96
Alpha: 0.05 ; DF Error: 9					
Critical Value of Studentized Range: 3.948492					
Minimum Significant Difference: 22.08448					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	Antocianinas totais		groups		
UVVis	105.3500		a		
CLAEDAD	55.8600		b		
pHdiferencial	44.7175		b		

Quadro 23 – Estatística calculada no programa R: ANOVA para avaliar se há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as quantidades de antocianinas pelo método de espectrofotometria de UV/Vis encontradas nos processamentos (*in natura*, cozida e frita) das variedades de polpa roxas – A e C e TUKEY para saber quais teores foram diferentes e quais foram iguais com nível de significância $\alpha < 0,05$.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
processamento	5	24567	4913	31.17	2.91e-08 ***
Residuals	18	2838	158		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Study: anova.processamentospolparoxauvvis ~ "processamento"					
HSD Test for antocianinastotais					
Mean Square Error: 157.6409					
processamento, means					
	antocianinastotais	std	r	Min	Max
pelebrancacozida	91.7150	17.661237	4	73.34	115.82
pelebrancafrita	105.3500	15.360714	4	84.91	117.96
pelebrancainnatura	27.4350	6.541669	4	22.94	37.06
peleroxacozida	92.4600	6.602429	4	86.37	101.82
peleroxafrita	87.9075	16.411588	4	66.72	106.60
peleroxainnatura	27.4675	6.499915	4	21.46	33.10
Alpha: 0.05 ; DF Error: 18					
Critical Value of Studentized Range: 4.49442					
Minimum Significant Difference: 28.21487					
Treatments with the same letter are not significantly different.					
	antocianinas totais	groups			
pelebrancafrita	105.3500	a			
peleroxacozida	92.4600	a			
pelebrancacozida	91.7150	a			
peleroxafrita	87.9075	a			
peleroxainnatura	27.4675	b			
pelebrancainnatura	27.4350	b			