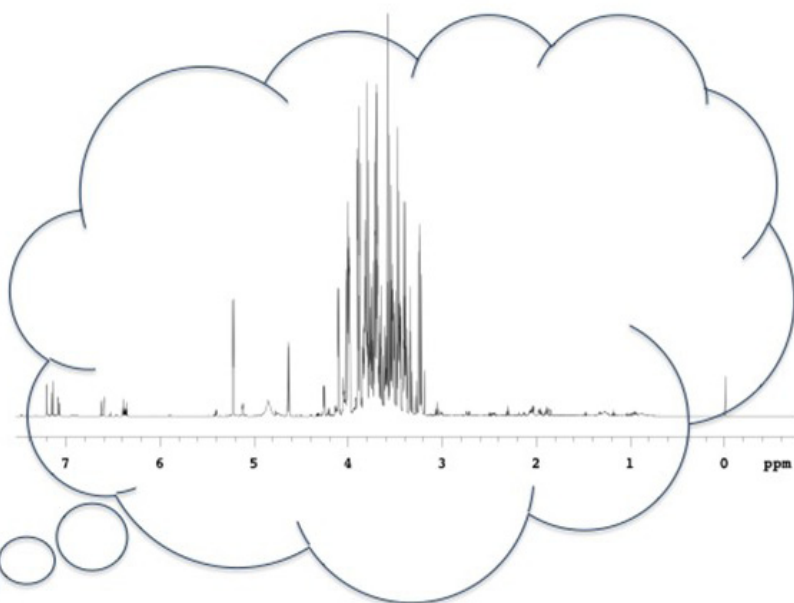


Preparo de Amostras para Análises por Ressonância Magnética Nuclear



ISSN 1679-6543

Maio, 2016

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 113

Preparo de Amostras para Análises por Ressonância Magnética Nuclear

*Lorena Mara Alexandre e Silva
Edy Sousa de Brito
Kirley Marques Canuto
Guilherme Julião Zocolo
Elenilson de Godoy Alves Filho*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2016

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*
Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*
Secretária-administrativa: *Eveline de Castro Menezes*
Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial: *Sérgio César de França Fuck Júnior*

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização: *Rita de Cássia Costa Cid*

Imagem da capa: *Lorena Mara Alexandre e Silva*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

1ª edição

On-line (2016)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Preparo de amostras para análises por ressonância magnética nuclear / Lorena Mara Alexandre e Silva... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2016.

18 p. : il.; 15 cm x 21 cm. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 113).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Padronização de protocolos. 2. RMN quantitativa. 3. Tampão fosfato. I. Silva, Lorena Mara Alexandre e. II. Brito, Edy Sousa de. III. Canuto, Kirley Marques. IV. Zocolo, Guilherme Julião. V. Alves Filho, Elenilson de Godoy. VI. Série.

CDD 538.362

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	8
Resultados e Discussão.....	10
Conclusões.....	16
Referências	17

Preparo de Amostras para Análises por Ressonância Magnética Nuclear

*Lorena Mara Alexandre e Silva*¹
*Edy Sousa de Brito*²
*Kirley Marques Canuto*³
*Guilherme Julião Zocolo*⁴
*Elenilson de Godoy Alves Filho*⁵

Resumo

Diversos protocolos de preparo de amostras para análises por ressonância magnética nuclear (RMN) têm sido propostos, seja ela quantitativa, qualitativa ou para aplicações quimiométricas. Contudo, a necessidade da padronização nesses protocolos é essencial para garantir a rastreabilidade e comparação de dados, independente da data na qual eles foram obtidos. Este trabalho visou à avaliação de aditivos que podem ser utilizados para reduzir problemas relacionado com pH e concentração de íons em solução. Os resultados mostraram que a utilização de tampões foi de suma importância para o preparo de amostras de suco que contêm altas concentrações de ácidos orgânicos, em geral. Em outro resultado, para o preparo de amostras de extrato de plantas com polaridades intermediárias (uso de altas quantidades

¹ Bacharel em Química, Ph.D. em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, lorena.mara@embrapa.br

² Químico industrial, Ph.D. em Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, edy.brito@cnpat.embrapa.br

³ Farmacêutico, Ph.D. em Química de Produtos Naturais, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, kirley.canuto@embrapa.br

⁴ Bacharel em Química, Ph.D. em Química Analítica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, guilherme.zocolo@embrapa.br

⁵ Bacharel em Química, Ph.D. em Química Orgânica, Bolsista de pós-doutorado da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, elenilson.godoy@yahoo.com.br

de metanol), a utilização do tampão não foi satisfatória, portanto não recomendada. Em decorrência desse efeito, foi necessária a adição de EDTA para balancear a carga iônica do meio e, assim, melhorar a resolução do espectro. Com a realização da calibração do equipamento e a construção da curva de calibração do lapachol, verificamos que a qRMN pode ser utilizada para quantificação de substâncias em misturas complexas. Com esses resultados, será possível traçar protocolos de preparos de amostras para as mais diversas matrizes.

Termos para indexação: padronização de protocolos, RMN quantitativa, tampão fosfato.

Sample Preparation for Nuclear Magnetic Resonance Analysis

Abstract

Several protocols of sample preparation for NMR analysis have been proposed, whether for quantitative or qualitative as well as chemometric approaches. However, the requirement for standardization of the protocol is essential to ensure traceability and comparison of data, regardless the date on which they were obtained. Thus, this study aimed the evaluation of additives which may be used to reduce problems related to pH and concentration of ions in solution. It was observed that the use of buffer is important for the preparation of juice sample which comprises high concentrations of organic acids. We also observed that for the preparation of plant extract samples, which have intermediate polarity (use of high amounts of methanol), using buffer is not recommended. However, it is necessary to add EDTA to balance the ionic charge and thereby improving the resolution of the spectrum. Moreover, with the calibration of the NMR and the calibration curve of the lapachol, we find that qRMN might be used for quantification of substances in complex mixtures. Through these results, the protocols for samples preparation for a several type of matrices can be standardized.

Index terms: Standardization protocols, quantitative NMR, phosphate buffer.

Introdução

Um novo desafio que tem surgido para diversas áreas da química analítica é o estudo do metabolismo global de indivíduos, chamado metabolômica. A metabolômica tem como objetivo comparar as diferenças relativas entre os perfis metabólicos de amostras com base nas pequenas moléculas do metabolismo primário (BURGESS et al., 2014). A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é, sem dúvida, uma das técnicas mais importantes para a caracterização de estruturas moleculares em todos os estados físicos da matéria (WINNING et al., 2008).

Assim, devido às suas características – versatilidade da RMN que possibilita a caracterização de diversos compostos presentes em uma mistura complexa, fácil preparo amostral, possibilidade de estudo de amostras intactas em diversos estados físicos (líquido, sólido e de material heterogêneo), bem como sua natureza não destrutiva – a RMN é classificada como uma das mais importantes ferramentas para os estudos qualitativos, quantitativos, de metabolômica, bem como na utilização dos dados como variáveis para análises quimiométricas. Desse modo, a RMN tem sido utilizada para avaliar o metabolismo de plantas (KIM et al., 2011), seres humanos, com análises de fluidos biológicos e tecidos (BECKONERT et al., 2007; KEUN et al., 2011) entre diversas outras aplicações (TENG, 2013; SENA et al., 2005).

Uma importante característica da RMN de ^1H é que a integral do sinal é proporcional ao número de hidrogênio que dá origem a ele, respeitando-se o tempo de espera entre os pulsos de cinco vezes o tempo de relaxação longitudinal (CLARIDGE, 2009). Tal fato possibilita a quantificação por RMN (qRMN) de diversas substâncias em uma mistura complexa de compostos, de maneira rápida e sem a utilização de padrões. Assim, seguindo protocolos específicos para quantificação, que incluem realização de sintonia da sonda, calibração do pulso de 90° , determinação do tempo de relaxação das substâncias presentes e ajuste adequado do campo magnético principal (*shimming*), podem-se obter

acurácias na quantificação da ordem de 2,0%, um limite de acurácia aceitável (MALZ; JANCKE, 2005).

Estabelecer planos de amostragem, preservação e preparação da amostra são os passos mais importantes para o estudo adequado de qualquer matriz, seja ela sólida ou líquida. Tais medidas requerem tempo e planejamento cauteloso antes da coleta de dados, uma vez que qualquer problema pode inviabilizar o uso dos dados obtidos. Elevadas concentrações amostrais, por exemplo, culminam em curtos períodos experimentais, mas podem resultar em uma solução com alta viscosidade, causando o alargamento e perda de resolução para o sinal de RMN de ^1H (CLARIDGE, 2009). Além disso, alguns aspectos ainda devem ser considerados: a) a amostra deve ser solúvel no solvente deuterado adequado; b) normalmente 0,15 mg/mL de material para RMN de ^1H origina um espectro com boa relação sinal/ruído, enquanto 3,85 mg/mL resulta em um espectro de ^{13}C com boa relação sinal/ruído (para sonda direta); c) a solução deve estar livre de partículas, pois elas causam deformação na homogeneidade do campo magnético local alargando os sinais; d) a adição de compostos que resultam em melhora espectral deve ser considerada para que variações oriundas de pH ou íons presentes na solução, por exemplo, sejam minimizadas (ALVES FILHO et al., 2015).

Este trabalho tem como objetivo a descrição de preparo de amostras em geral para análise de qRMN e quimiometria.

Material e Métodos

Este trabalho foi dividido em três estudos. O primeiro visou verificar a variação do pH de soluções de ácido cítrico em água ultrapura e em tampão fosfato 0,4 M. O segundo estudo teve como objetivo observar o efeito do EDTA no espectro de RMN. Na terceira etapa, fez-se um teste visando à consolidação da RMN como uma ferramenta viável para quantificar substâncias em amostras de maneira geral.

Estudo 1 – Efeito do pH no espectro de RMN

Inicialmente, foram preparadas soluções de 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL e 6 mg/mL de ácido cítrico em água Milliq. Em seguida, foram preparadas soluções de mesma concentração em tampão fosfato 0,4 M. O pH dessas soluções foi **medido e avaliado**.

Para avaliar o efeito da variação do pH no espectro de RMN, foram dissolvidos 1 mg e 2 mg de ácido cítrico em 500 μ L de D_2O . Em seguida, as mesmas massas foram dissolvidas em 500 μ L de tampão fosfato 0,4 M em D_2O . Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de 1H), equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (1H - ^{19}F / ^{15}N - ^{31}P), de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”.

Estudo 2 – Efeito do EDTA no espectro de RMN

Preparo da solução estoque de D_2O com TMSP e EDTA

Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de 6,0 mM de TSP-d4 e 6,3 mM de EDTA em D_2O . Para realizar as medidas de uma amostra “real”, pesaram-se 20 mg de pó de guaraná (amostra com alta concentração de íons paramagnéticos), aos quais foram adicionados 420 μ L de metanol deuterado e 180 μ L de solução de TSP-d4/EDTA recém-preparada, deixando a amostra em ultrassom por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e, em seguida, foram obtidos os espectros de RMN.

Estudo 3 – qRMN

Para realizar esse estudo, inicialmente o espectrômetro de RMN foi previamente calibrado utilizando para isso uma solução recém-preparada de 10 mg/mL de sacarose em D_2O . Após a calibração, a capacidade de quantificação do equipamento foi verificada por meio de uma curva de calibração com soluções padrões de lapachol, em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) nas concentrações de 1,8 mg/mL; 5,2 mg/mL; 9,3 mg/mL; 14 mg/mL e 20,3 mg/mL. Os espectros de RMN foram obtidos de maneira

quantitativa, utilizando para tanto um tempo de espera entre cada experimento de 25 s, 8 varreduras, ganho de 10, em janela espectral de 16 ppm com 16K de número de pontos, resultando em um tempo de aquisição de 1,70 s.

Resultados e Discussão

A RMN e, em particular, a RMN de ^1H é uma técnica bastante útil para traçar perfis metabólicos de matrizes complexas, pois possibilita a caracterização simultânea de diversos compostos. Contudo, devido à heterogeneidade das amostras alimentares, o preparo amostral bem como sua padronização é uma etapa crucial para a obtenção de dados confiáveis. A avaliação de parâmetros que possibilitam a obtenção de espectros reprodutíveis é de grande importância. Desse modo, na Tabela 1 estão apresentados os valores de pH obtidos para as soluções de ácido cítrico em água e tampão fosfato 0,4 M.

Tabela 1. Medidas de pH para as soluções de ácido cítrico sem e com tampão.

Amostra (mg/mL)	pH água	pH tampão 0,4M
1	2,75	6,39
2	2,56	6,34
4	2,37	6,28
6	2,29	6,19
8	2,25	6,1

Amostras que apresentam em sua composição diferentes concentrações de grupos ácidos podem causar variações no deslocamento químico no espectro de RMN de hidrogênio. Tais variações são dependentes do pH da solução e ocorrem por causa de alterações no equilíbrio ácido-base da solução. No caso da aplicação de métodos quimiométricos para tratamento dos dados de RMN, por exemplo, essas variações ocasionam a formação de *outlier* e/ou grupos espúrios. Assim, procedimentos para eliminar ou

minimizar variações por causa das diferenças de pH das amostras estão sendo cada vez mais utilizados (del CAMPO et al., 2006; SPRAUL et al., 2009). No caso do ácido cítrico, a protonação dos grupos carboxílicos é altamente dependente do pH da solução (BARTON et al., 2010). Portanto, ao utilizar um tampão fosfato 0,4 M (pH de 6,5), foi possível observar uma maior compensação na mudança da concentração hidrogeniônica livre da solução, elevando o pH desta. Para verificar o efeito do tampão no espectro de RMN, medidas das soluções de ácido cítrico de 1,7 mg/mL e 3,3 mg/mL foram realizadas com e sem a utilização do tampão fosfato. O citrato origina um espectro de RMN de ^1H com um duplete AB, em que cada próton não equivalente do grupo metileno apresenta deslocamentos típicos em 2,54 ppm e 2,68 ppm. A Figura 1 apresenta o espectro de RMN do ácido cítrico com tampão (direita) e sem tampão (esquerda). Na Tabela 2, estão apresentados os valores dos deslocamentos químicos dos sinais, bem como a diferença de deslocamento químico, em ppm e em Hz, que representa a variação do sinal em função do pH.

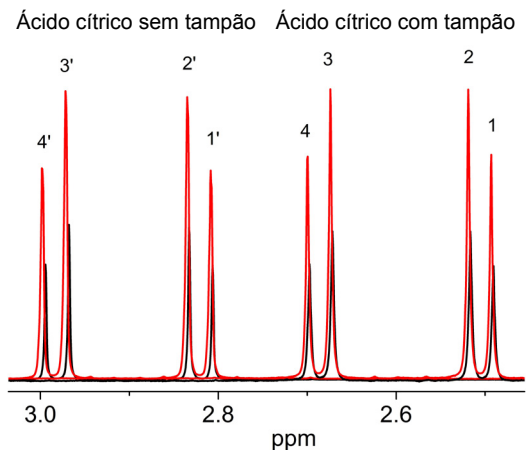


Figura 1. Expansão da região dos hidrogênios metilênicos do ácido cítrico.

De acordo com os dados, observa-se que a utilização da solução tampão reduziu variações nos deslocamentos químicos do ácido cítrico, principalmente nos sinais mais desblindados (3 e 4). Além disso, o conjunto de sinais que apresentavam deslocamento químico em, aproximadamente, 2,92 ppm, deslocou-se para 2,59 ppm quando em

tampão. Esse fato é importante já que a maioria dos bancos de dados de RMN são construídos para as substâncias em sua forma neutra, como é o caso, por exemplo, do *human metabolome database* (HMDB), que apresenta o ácido cítrico em 2,6 ppm¹⁰.

Tabela 2. Valores dos deslocamentos químicos dos sinais do ácido cítrico com e sem tampão e a variação nas soluções de 1,7 mg/mL e 3,3 mg/mL.

Sinal	δ (ppm) da solução 1,7 mg/mL	δ (ppm) da solução 3,3 mg/mL	Δ (ppm)	Δ (Hz)
1	2,4802	2,4827	0,0025	1,5
2	2,5063	2,5088	0,0025	1,5
3	2,6612	2,6636	0,0024	1,38
4	2,6875	2,6896	0,0021	1,26
1'	2,8252	2,8281	0,0029	1,7
2'	2,8519	2,8549	0,003	1,8
3'	2,9869	2,9915	0,0046	2,8
4'	3,0136	3,0182	0,0046	2,8

De acordo com os dados, observa-se que a utilização da solução tampão reduziu variações nos deslocamentos químicos do ácido cítrico, principalmente nos sinais mais desblindados (3 e 4). Além disso, o conjunto de sinais que apresentavam deslocamento químico em, aproximadamente, 2,92 ppm, deslocou-se para 2,59 ppm quando em tampão. Esse fato é importante já que a maioria dos bancos de dados de RMN são construídos para as substâncias em sua forma neutra, como é o caso, por exemplo, do *human metabolome database* (HMDB), que apresenta o ácido cítrico em 2,6 ppm¹⁰.

A utilização de agentes complexantes como o EDTA é importante já que seu uso induz a formação de complexos com os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Trabalhos publicados reportam reduções nas variações dos deslocamentos químicos de metabólitos com propensão à formação

de complexos com íons metálicos (ASIAGO et al., 2008). Contudo, ainda se deve verificar o aparecimento de sinais inerentes ao EDTA tais como: EDTA livre em 3,2 ppm e 3,6 ppm; EDTA complexado com zinco em 2,86 ppm; EDTA complexado com cálcio em 2,57 ppm e 3,13 ppm; EDTA complexado com magnésio em 2,76 ppm e 3,23 ppm. Desse modo, sua utilização foi avaliada, utilizando-se uma amostra de pó de guaraná que contém altas quantidades de íons nas mais diversas formas (dado não publicado). A Figura 2 apresenta os espectros de ^1H RMN do extrato do pó de guaraná antes da adição do EDTA e após a adição do EDTA.

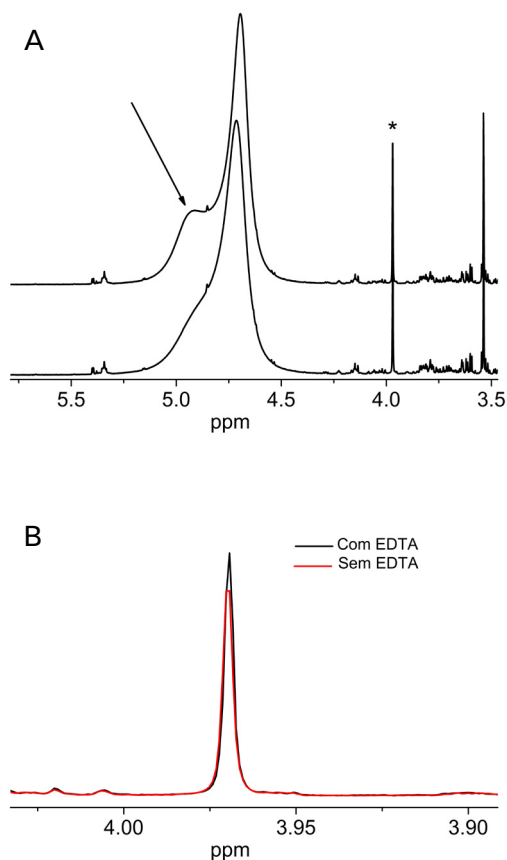


Figura 2. (A) Espectros de ^1H RMN de pó de guaraná antes e após a adição do EDTA e (B) expansão do singlete em 3,96 ppm (asterisco na Figura), o qual demonstra o ganho na resolução.

Íons paramagnéticos como o ferro causam perda de resolução espectral por meio da redução dos tempos de relaxação longitudinal e transversal. Na Figura 2, observa-se que há distorção no sinal da água residual (em torno de 4,8 ppm) do espectro de RMN de ^1H de pó de guaraná obtido sem a utilização do EDTA (seta na figura). Tal distorção foi reduzida após a adição do EDTA à amostra. Portanto, a utilização do EDTA provocou complexação dos íons em solução, proporcionando um ganho na resolução espectral. Outra observação resulta do aumento da relação sinal/ruído, onde antes da adição do EDTA foi de 150,61 e após 155,91.

Para a obtenção dos espectros de RMN para a realização da quimiometria, devem ser tomados diversos cuidados que visam ao ajuste do equipamento. Inicialmente, deve-se realizar o monitoramento da frequência do deutério para efetuar o ajuste do campo magnético principal do RMN. A seguir, é necessário determinar o tempo do pulso de 90 graus, seguido da estimativa do tempo de relaxação longitudinal do núcleos e ajuste do ganho do receptor. Após a obtenção dos parâmetros de aquisição, os dados podem ser coletados com exatamente os mesmos parâmetros, em replicatas biológicas e experimentais, para a avaliação da reprodutibilidade do experimental e do equipamento.

Ademais, ao seguir o protocolo descrito anteriormente, é possível realizar a quantificação dos compostos presentes na mistura. Assim, a capacidade de quantificação do equipamento foi verificada por meio da construção de uma curva de calibração utilizando o sinal em 7,98 ppm oriundo do lapachol. Para tanto, soluções de 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL e 20 mg/mL foram preparadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), sendo inseridos seus valores no eixo x e, no eixo y, a concentração fornecida pelo equipamento. O coeficiente de correlação (R^2) obtido pelo ajuste dos dados foi de 0,9816. Esse valor demonstra que a ^1H -RMN preenche os requisitos para ser utilizada como método para determinações quantitativas de substâncias em misturas em solução com um nível de precisão satisfatório (ajuste linear de 0,9816), além de possibilitar a quantificação de diversos compostos em um único espectro.

Ademais, devido à versatilidade da RMN, que proporciona análise de amostras altamente complexa e em diversos estados físicos da matéria (sólido, líquido, gel e gasoso), não é possível desenvolver um protocolo único para todos os tipos de amostras. Assim, diversos protocolos de RMN têm sido propostos para suco de frutas (SPRAUL et al., 2009; MONAKHOVA et al., 2014), materiais vegetais (KIM et al., 2010), fluidos biológicos (LAURIDSEN et al., 2007), compostos voláteis (NOJIMA et al., 2004), entre outros. Sucos de frutas, por exemplo, apresentam altas concentrações de ácidos orgânicos e, por isso, é indispensável o uso de tampões. Para extrato de plantas, por outro lado, altas proporções de metanol para a preparação do extrato (que é importante para extrair uma maior quantidade de metabólitos) podem causar a precipitação do tampão, como foi observado com 70% de metanol em tampão 0,4 M. Desse modo, cada amostra deve ser cuidadosamente avaliada para que o preparo correspondente seja adequado. Na Figura 3, está apresentado um espectro de RMN de ^1H de um suco de maracujá, que apresenta diversos compostos, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e etanol, realizando-se uma única análise química em um curto período de tempo.

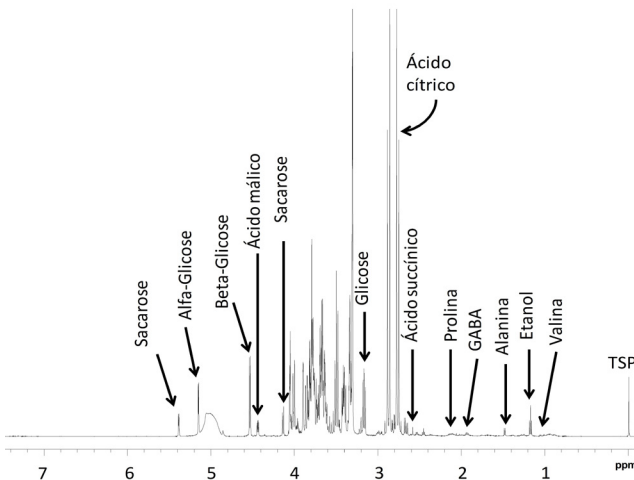


Figura 3. ^1H -RMN da polpa de maracujá.

Conclusões

O preparo de amostra para análises de RMN é uma etapa importante para garantir a reprodutibilidade dos dados experimentais, bem como o desenvolvimento dos métodos quimiométricos e a realização de quantificação. A escolha do procedimento deve ser realizada considerando a natureza da amostra e das substâncias a serem avaliadas. Esse modelo permite realizar a consolidação de protocolos precisos e específicos para cada tipo de amostra (por exemplo, um protocolo para suco, outro para extrato de plantas, etc.) de modo que dados obtidos em épocas diferentes possam ser comparados, sem nenhum prejuízo para a interpretação devida das informações.

Referências

ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; FERREIRA, A. G. Advancements in wastewater characterization through NMR spectroscopy: review. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 53, p. 648-657, 2014.

ASIAGO, V. M.; GOWDA G. A. N.; ZHANG, S.; SHANAIAH, N.; CLARK, J.; RAFTERY, D. Use of EDTA to minimize ionic strength dependent frequency shifts in the ¹H NMR spectra of urine. **Metabolomics**, v. 4, 328-336, 2008.

BARTON, R.H.; WATERMAN, D.; BONNER, F.W.; HOLMES, E.; CLARKE, R.; NICHOLSON, J.K.; LINDON, J.C. The influence of EDTA and citrate anticoagulant addition to human plasma on information recovery from NMR-based metabolic profiling studies. **Molecular Biosystems**, v. 6, p. 215-224, 2010.

BECKONERT, O.; KEUN, H. C.; EBBELS, T. M. D.; BUNDY, J.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2, p. 2692-2703, 2007.

BURGESS, K.; RANKIN, N.; WEIDT, S. Metabolomics. In: **Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine**, San Diego: Elsevier, 2014. Chapter 10, p.181.

CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**, Oxford: Elsevier, 2009.

Del CAMPO, G.; BERREGI, I.; CARACENA, R.; SANTOS, J. I. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, p. 462-468, 2006.

KEUN, H.; ATHERSUCH, T. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Metabolomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 708, p. 321-334, 2011.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 267-275, 2011.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, v. 5, p. 536-549, 2010.

LAURIDSEN, M.; HANSEN, S. H.; JAROSZEWSKI, J. W.; CORNETT, C. Human urine as test material in ¹H NMR-based metabolomics: recommendations for sample preparation and storage. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 1181-1186, 2007.

MALZ, F.; JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 813-823, 2005.

MONAKHOVA, Y. B.; SCHUTZ, B.; SCHAFFER, H.; SPRAUL, M.; KUBALLA, Y.; HAHN, H.; LACHENMEIER, D. W. Validation studies for multicomponent quantitative NMR analysis: the example of apple fruit juice. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 19, p. 17-29, 2014.

NOJIMA, S.; KIEMLE, D. J.; WEBSTER, F. X.; ROELOFS, W. L. Submicro Scale NMR Sample Preparation for Volatile Chemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, p. 2153-2161, 2004.

SENA, M. M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais: aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. **Química Nova**, v. 28, p. 910-920, 2005.

SPRAUL, M.; SCHUTZ, B.; HUMPFER, E.; MORTTER, M.; SCHAFFER, H.; KOSWIG, S.; RINKE, P. Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. S130-S137, 2009.

TENG, Q. NMR-Based metabolomics. **Structural Biology: practical NMR Applications**. New York: Springer, 2013. Cap. 9, p.311-392.

WINNING, H.; LARSEN, F. H.; BRO, R.; ENGELSEN, S. B. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 190, p. 26-32, 2008.

FORSYTHE, I.; HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. **Nucleic Acids Research**, v. 37 (Database issue):D603-10, 2009.

Embrapa

Agroindústria Tropical



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

