

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Hebert Vinicius Pereira

**Espectrometria de massas com ionização por *paper spray*  
combinada a métodos quimiométricos para identificação de  
falsificações em cervejas**

Belo Horizonte

2016

UFMG/ ICEx/ DQ. 1165<sup>a</sup>

D. 642<sup>a</sup>

HEBERT VINICIUS PEREIRA

**Espectrometria de massas com ionização por paper spray  
combinada a métodos quimiométricos para identificação de  
falsificações em cervejas**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Química do  
Instituto de Ciências Exatas da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais como requisito parcial para  
a obtenção do grau de Mestre em  
Química – Química Analítica.

Belo Horizonte

2016

P426e           Pereira, Hebert Vinicius  
2016            Espectrometria de massas com ionização por paper  
D               spray combinada a métodos quimiométricos para  
               identificação de falsificações em cervejas  
               [manuscrito] / Hebert Vinicius Pereira. 2016.  
               81f : il.

                  Orientador: Evandro Piccin.  
                  Coorientador: Marcelo Martins de Sena.

                  Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
                  Minas Gerais. Departamento de Química.

                  1. Cerveja - Teses 2. Espectrometria de massa -  
                  Teses 3. Alimentos - Adulteração e inspeção -  
                  Teses. 4. Análise multivariada - Teses 5. Análise  
                  discriminante - Teses I. Piccin, Evandro,  
                  Orientador II. Sena, Marcelo Martins de,  
                  Coorientador III. Título.

CDU 043

**"Espectrometria de Massas com Ionização por Paper Spray Combinada a Métodos Quimiométricos para Identificação de Falsificações em Cervejas"**

**Hebert Vinicius Pereira**

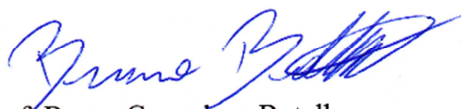
Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Prof. Evandro Piccin - Orientador  
UFMG



Prof. Marcelo Martins de Sena - Coorientador  
UFMG



Prof. Bruno Gonçalves Botelho  
UNI-BH



Prof. Patterson Patricio de Souza  
CEFET-MG

Belo Horizonte, 27 de julho de 2016.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha família, em especial a minha mãe Manoelina e ao meu pai Clayton, que sempre lutaram pelo meu bem-estar e sempre acreditaram em mim.

À minha namorada Daiane por compartilhar todo seu amor e carinho durante essa difícil jornada.

Aos meus amigos “bocós” que sempre estarão no meu coração independente das circunstâncias que a vida nos impõe.

Ao professor Dr. Evandro Piccin pelos conselhos, incentivo e pela grande oportunidade oferecida de ser um de seus alunos.

Ao professor Dr. Marcelo Martins de Sena pela ótima parceria, ajuda e por compartilhar todo seu entusiasmo em relação à quimiometria.

Ao professor Dr. Rodinei Augusti por me oferecer parte de seus conhecimentos e experiências, além de todo o suporte para “domar” o espectrômetro de massas.

Aos colegas alunos de doutorado, mestrado e iniciação científica que me acolheram em seus grupos de pesquisa (quimiometria, espectrometria de massas - lab.167 e LAMS) e tornaram essa etapa da minha vida muito mais prazerosa.

Aos professores Patterson Patrício de Souza (CEFET-MG), Bruno Gonçalves Botelho (UNI-BH) por aceitarem o convite para compor a banca da minha defesa e pelas suas contribuições para o enriquecimento dessa dissertação.

À CAPES pelo financiamento da minha bolsa de mestrado.

À UFMG, ICEX, Departamento de Química e Secretaria de Pós-Graduação em Química pelo intenso trabalho de seus colaboradores e por oferecer as melhores condições possíveis para o desenvolvimento desse e de outros trabalhos.

Muito obrigado a todos vocês!

...There's more to see than can ever be  
seen, more to do than can ever be done...

*Circle of life - Elton John*

## RESUMO

A autenticidade de alimentos tem sido uma preocupação constante em todo o mundo devido, principalmente, aos potenciais riscos à saúde dos consumidores e danos econômicos significativos causados por fraudes e adulterações. Casos de falsificação de cervejas têm ocorrido no Brasil por meio da troca de rótulos e tampas de garrafas de marcas de baixo valor comercial, pelos de cervejas que apresentam maior preço e volume de comércio. Essas fraudes dificilmente são percebidas pelos consumidores devido à similaridade das características sensoriais dessas cervejas. Métodos para detecção dessas fraudes não estão prontamente disponíveis para os órgãos fiscalizadores. Na literatura são descritas metodologias que abordam o problema de autenticidade de cervejas, mas a grande maioria é voltada para a diferenciação de estilos cervejeiros distintos. Nesse trabalho, a espectrometria de massas com a ionização por *paper spray* (PS-MS) combinada a ferramentas quimiométricas foi utilizada na diferenciação entre cervejas de diferentes marcas comercializadas no Brasil, em um contexto forense que objetiva a detecção de falsificações. Um total de 141 amostras (distribuídas entre diferentes lotes de fabricação) do estilo *Standard American Lager*, pertencentes a 3 marcas de maior valor comercial e 5 marcas de menor valor comercial, foi analisado por PS-MS no modo positivo, resultando em espectros de massas reprodutíveis contendo padrões de sinais característicos de adutos de sódio e potássio de malto-oligossacarídeos. As amostras foram então classificadas utilizando a análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O método de seleção dos preditores ordenados (OPS) foi utilizado para otimização do modelo supervisionado, selecionando as variáveis mais preditivas. Para a validação dessa metodologia, foram calculadas figuras de mérito (FOM) de veracidade e precisão. O modelo otimizado resultou na classificação correta de todas as amostras e valores perfeitos das FOM (100% de confiabilidade, 100% de exatidão, 100% acordância e 100% de concordância). O método apresentou potencial para ser aplicado em rotinas de laboratórios de fiscalização e perícia para detecção de cervejas falsificadas.

**Palavras-chave:** Autenticidade de cervejas, espectrometria de massas com ionização por *paper spray*, análise de alimentos, análise forense, análise discriminante por mínimos quadrados parciais e seleção de preditores ordenados.

## ABSTRACT

### **Paper spray mass spectrometry combined with chemometric methods to identification of counterfeit beer**

Food authenticity has been a worldwide concern because of the potential health risks for consumers and important economic losses caused by fraud and adulteration. In Brazil, several cases of beer counterfeiting have been registered, in which the labels and bottle caps of beers with lower commercial prices were switched by labels and caps of beers that have higher prices and trade volume. These frauds are not easily perceived by consumers due to similarity of the sensory characteristics of these beers. Currently, methods for detecting these frauds are not readily available for the regulatory agencies. On the other hand, the literature describes many methodologies for determining the authenticity of beers. However, most of them are focused on the differentiation of beers belonging to different styles. In this work, paper spray mass spectrometry (PS-MS) combined with chemometric tools were applied for the first time in a forensic context to a fast and effective differentiation of beers. A total of 141 samples of Standard American Lagers (distributed in different batches), belonging to three brands with higher market prices and five brands with lower market prices, were analyzed in the positive ion mode of PS-MS, resulting in reproducible mass spectra. The most intense signals obtained in the beer's fingerprints were identified as sodium and potassium adducts of malto-oligosaccharides. The *fingerprints* were classified using principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The ordered predictors selection method (OPS) was used to variable selection, thus optimizing the supervised model. Figures of merit (FOM) were calculated in order to assess the trueness and accuracy of the developed method. The optimized model provided the correct classification of all samples with perfect results of FOM (100% reliability, 100% accuracy, 100% accordance and 100% concordance). The method has the potential to be employed in routine laboratories for detecting counterfeit beers.

**Key-words:** Beer authenticity, paper spray mass spectrometry, food analysis, forensic analysis, partial least squares discriminant analysis and ordered predictors selection.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Apreensão de cervejas falsificadas em Sete Lagoas (MG). .....	2
Figura 2 – Apreensão de cervejas falsificadas em São Paulo (SP).....	3
Figura 3 – Ilustração do mecanismo das enzimas $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ ) e $\beta$ -amilase ( $\beta$ ) para hidrólise do amido.....	11
Figura 4 - Composição média de um lúpulo comercial.....	13
Figura 5 – Preço médio ponderado calculado de garrafas de cervejas retornáveis (600 mL) no estado de Minas Gerais.....	18
Figura 6 – Diagrama simplificado de um Espectrômetro de massas.....	22
Figura 7 – Fonte de ionização <i>paper spray</i> : (A) Desenho esquemático do aparato utilizado e (B) Visualização da formação do <i>spray</i> no substrato com auxílio de um <i>laser</i> .....	26
Figura 8 - Distribuição do tamanho das gotículas em no <i>spray</i> por PS-MS.....	27
Figura 9 – Efeitos da geometria do papel e do potencial aplicado em análises PS-MS: A) Variação dos diâmetros do cone de Taylor, B) Variação da intensidade dos sinais com o potencial aplicado, C) Variação da corrente com o potencial aplicado, D) Campo elétrico calculado para o papel com ângulo de 60° e E) Variação do campo elétrico. ....	28
Figura 10 – Interpretação geométrica da PCA: A) representação das amostras simuladas em função de suas variáveis Var 1, Var 2 e Var 3 e B) representação dos escores das componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2), obtidas a partir da combinação linear das variáveis originais na análise PCA. ...	32
Figura 11 – Princípio da análise PLS-DA: A) representação dos conjuntos de variáveis espectrais ( <b>X</b> ) e categóricas ( <b>y</b> ) e B) discriminação das amostras de acordo com as classes pré-definidas pela função discriminante determinada pelo método PLS-DA.....	34
Figura 12 – Ilustração do método OPS: A) construção do vetor informativo, B) diferenciação das variáveis segundo a atribuição dada pelo vetor informativo selecionado, C) ordenamento das variáveis diferenciadas, D) definição dos subconjuntos formados pela janela de variáveis e seus incrementos e E) definição do subconjunto de variáveis ideal segundo critérios do método OPS ( $R_{CV}$ , RMSECV e número de variáveis selecionadas). ....	40

Figura 13 – Exemplo de curva ROC. ....	43
Figura 14 – Marcas das cervejas estudadas.....	46
Figura 15 - Aparato instrumental utilizado para obtenção dos espectros PS-MS: A) modelo LCQ FLEET da Thermo Fisher com analisador do tipo <i>ion trap</i> e B) Detalhes da fonte de ionização <i>paper spray</i> .....	47
Figura 16 – Espectros representativos obtidos por PS-MS no estudo de cervejas brasileiras: (A) modo positivo e (B) modo negativo.....	50
Figura 17 – Replicatas de espectros PSMS no modo positivo de cervejas (marca Antarctica): A) primeira replicata, B) segunda replicata e C) terceira replicata...	52
Figura 18- Espectros PS(+)-MS das cervejas estudadas nesse trabalho e que têm sido envolvidas em casos de falsificação: A) Antarctica, B) Brahma, C) Skol, D) Cintra, E) Glacial, F) Crystal, G) Lokal e H) A Outra. ....	54
Figura 19 – Detecção de <i>outliers</i> : valores de $T^2$ de Hotelling <i>versus</i> resíduos Q.....	57
Figura 20 - Escores de CP1 e CP2.....	58
Figura 21 - Pesos da CP1 (A) e CP2 (B).....	59
Figura 22 – Valores previstos pelo modelo PLS-DA <sub>completo</sub> . ....	60
Figura 23 – VIP escores do modelo PLS-DA <sub>completo</sub> . ....	61
Figura 24 – Curva ROC do modelo PLS-DA <sub>completo</sub> . ....	62
Figura 25 – Respostas do método OPS: RMSECV, $R_{CV}$ e $N^{\circ}$ de variáveis.....	63
Figura 26 – Valores previstos pelo modelo PLS-DA após aplicação do OPS.....	64
Figura 27 – VIP <i>scores</i> do modelo PLS-DA. ....	65
Figura 28 – Curva ROC do modelo PLS-DA OPS.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Enzimas atuantes durante o processo de mosturação. ....	10
Tabela 2 – Adjuntos Cervejeiros amiláceos. ....	12
Tabela 3 – Adjuntos Cervejeiros açucarados. ....	12
Tabela 4 – Configuração típica da tabela de contingência. ....	41
Tabela 5 – Fabricantes, marcas e número de amostras das cervejas adquiridas. ....	45
Tabela 6 – Sinais Referentes aos malto-oligossacarídeos detectados nos espectros PS-MS, nos modos positivo e negativo. ....	53
Tabela 7 – Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA <sub>completo</sub> . ....	62
Tabela 8 – Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA OPS. ....	65

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Aditivos cervejeiros permitidos pela RDC 65 para a produção de cervejas. ....	15
Quadro 2 – Composição informada no rótulo das cervejas analisadas por PS-MS.....	55
Quadro B1 – Coadjuvantes permitidos pela RDC 64 para produção de cervejas.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

% ps - Peso seco percentual

ACO - Acordância

ACO<sub>m</sub> - Acordância média

CI - Ionização química (*Chemical Ionization*)

Con - Confiabilidade

CONC - Concordância

Corr **X-y** - Vetor correlação entre **X** e **y**

CovProc - Vetor procedimentos de covariância (*Covariance Procedures Vector*)

CP - Componente Principal

EI - Ionização por elétrons (*Electron Ionization*)

ESI - Ionização por *electrospray* (*Electrospray Ionization*)

Esp - Especificidade ou taxa de verdadeiros negativos

Exa - Exatidão

FN - Falsos negativos

FOM - Figura de mérito (*Figure of Merit*)

FP - Falsos positivos

LOA - Vetor pesos (*Loadings Vector*)

*m/z* - Razão massa-carga

MS - Espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*)

MS/MS - Espectrometria de massas sequencial (*Tandem Mass Spectrometry*)

NAS - Vetor sinal analítico líquido (*Net Analyte Signal Vector*)

NiPLS - Métodos por mínimos quadrados parciais não-iterativos (*Non Iterative Partial Least Squares*)

OPS - Método de seleção dos preditores ordenados (*Ordered Predictor Selection*)

PCA - Análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*)

PLS-DA - Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*)

PS-MS - Espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (*Paper Spray mass spectrometry*)

$R_{CV}$  - Coeficiente de correlação da validação cruzada (*Cross Validation Correlation Coefficient*)

Reg - Vetor regressão

RMSECV - Raiz quadrada do erro quadrático médio da validação cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation*)

ROC - Curva de receptores característicos operacionais (*Receiver Operating Characteristic Curve*)

Sen - Sensibilidade ou taxa de verdadeiros positivos

siPLS - Mínimos quadrados parciais em intervalos sinérgicos (*Synergic Interval Partial Least Squares*)

SqREs - Vetor resíduos (*Squared Residuals Vector*)

Stn - Vetor razão sinal-ruído (*Signal-to-Noise Ratio Vector*)

TFN - Taxa de falsos negativos

TFP - Taxa de falsos positivos

VIP - Vetor importância da variável na projeção (*Variable Importance in Projection Vector*)

VN - Verdadeiros negativos

VP - Verdadeiros positivos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	OBJETIVOS .....	5
1.2	JUSTIFICATIVA .....	5
<b>2</b>	<b>CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>7</b>
2.1	CERVEJA.....	7
2.1.1	Fabricação e química da cerveja .....	8
2.1.2	Mercado mundial e brasileiro de cervejas .....	16
2.1.3	Métodos para autenticação de cervejas.....	18
2.2	ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	22
2.2.1	Fontes de ionização ambiente .....	23
2.2.2	Fonte de Ionização por <i>paper spray</i> .....	25
2.3	QUIMIOMETRIA .....	31
2.3.1	Análise de componentes principais (PCA) .....	31
2.3.2	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) .....	34
2.3.3	Seleção dos preditores ordenados (OPS).....	39
2.3.4	Validação de métodos qualitativos .....	41
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>45</b>
3.1	AMOSTRAS .....	45
3.2	MATERIAIS E REAGENTES .....	46
3.3	INSTRUMENTAÇÃO .....	46
3.4	MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS .....	48
3.4.1	Modelo PCA .....	48
3.4.2	Modelos PLS-DA.....	48
3.4.3	OPS .....	49



3.4.4	Figuras de mérito para validação dos modelos PLS-DA.....	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
4.1	PS-MS DE CERVEJAS BRASILEIRAS.....	50
4.2	MODELOS QUIMIOMÉTRICOS .....	57
4.2.1	Análise de componentes principais (PCA) .....	57
4.2.2	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) .....	60
4.2.3	Método de seleção de variáveis dos preditores ordenados (OPS) .....	63
4.2.4	Modelo PLS-DA após a seleção de variáveis pelo método OPS .....	64
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXO A .....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO B .....</b>	<b>81</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A autenticidade e integridade de produtos alimentícios é uma preocupação constante por parte dos órgãos competentes, devido aos potenciais riscos à saúde provocados pelo consumo em condições inapropriadas. Além disso, diversos impactos econômicos podem ser ocasionados pela perda de arrecadação de impostos e pelos efeitos causados à imagem de empresas, uma vez que sua(s) marca(s) podem ser diretamente associadas a casos de adulteração de alimentos pelos consumidores.

Apesar do grande empenho dos órgãos de fiscalização para coibir práticas dessa natureza, diversos casos envolvendo a adulteração e falsificações de alimentos são rotineiramente noticiados na imprensa. Alimentos tais como carnes, leites e derivados, bebidas alcoólicas, mel, café, azeites, entre outros, são manipulados ilicitamente por criminosos que buscam lucros indevidos a partir da mudança nas propriedades físicas e químicas ou na descaracterização das embalagens desses produtos.<sup>1</sup>

A ineficácia ou até mesmo inexistência de métodos apropriados para monitoramento da qualidade e propriedades dos alimentos por parte dos órgãos competentes se torna um entrave para o desenvolvimento dos processos investigativos. Esse fato encoraja a prática desses crimes que, por vezes, acabam não sendo alvos das punições previstas pela legislação brasileira. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos sensíveis, rápidos e precisos é importante para que esses sejam utilizados em fiscalizações que abordem a autenticidade dos alimentos comercializados no país e, desse modo, contribuir para a coibição dessas práticas.<sup>1</sup>

A cerveja é a bebida alcoólica de maior consumo no Brasil e é um alvo frequente de quadrilhas de falsificadores. As discrepâncias de valores, volumes de vendas, homogeneidade das características sensoriais das cervejas e grande semelhança dos vasilhames das cervejas produzidas pela empresa líder do mercado em relação às bebidas dos demais fabricantes na mesma faixa de preços de mercado servem como incentivos para a prática desse crime.

O método utilizado pelos falsificadores é bastante simples. O primeiro passo é a retirada dos rótulos de garrafas retornáveis (600 mL) de cervejas de marcas de baixo valor, deixando-as submersas em água. Em seguida, as tampas dessas garrafas são removidas e descartadas. Por fim, tampas e rótulos das cervejas com maior valor comercial são colocados no lugar dos elementos previamente retirados. Portanto, a falsificação de cervejas praticada no Brasil consiste, na maior parte dos casos, na simples violação das embalagens

de cervejas.<sup>2</sup> Em alguns casos de apreensões noticiados pela imprensa também foram relatadas suspeitas de misturas do conteúdo das garrafas entre marcas diferentes e diluições com água.<sup>3</sup>

Essa prática não requer o uso de equipamentos caros ou elaborados. As cervejas de menor valor comercial são adquiridas legalmente das fábricas e os insumos utilizados para falsificação (rótulos e as tampas das cervejas das marcas mais caras) podem sofrer desvios durante o transporte para as fábricas, ser produzidos em fábricas clandestinas ou até retirados de garrafas já consumidas. A rentabilidade dessa prática é bastante alta - pode chegar a até 100% de lucro por garrafa comercializada – quando considerado o elevado número de garrafas que geralmente é comercializado (milhares de garrafas por semana).<sup>2</sup> Essa rentabilidade pode ser exemplificada a partir da observação da Figura 1, que retrata uma apreensão realizada em 2014 no estado de Minas Gerais, na qual foram confiscados 48 mil engradados de cervejas falsificadas, além de um equipamento sofisticado utilizado para a substituição de tampas das garrafas.<sup>4</sup>



Fonte: Divulgação Policia Militar de Minas Gerais.<sup>4</sup>

Figura 1 – Apreensão de cervejas falsificadas em Sete Lagoas (MG).

O manejo inadequado dessas garrafas durante o processo de falsificação também expõe o produto a condições de elevados riscos de contaminação por microrganismos patógenos. De fato, a troca das tampas é realizada em ambientes

impróprios para manipulação de alimentos devido à falta de assepsia (Fig. 2).<sup>5</sup> Também há relatos veiculados pela imprensa em que os rótulos e tampas das cervejas são retiradas do lixo.<sup>2</sup>



Fonte: Hélio Torchi – Folha Press.<sup>5</sup>

Figura 2 – Apreensão de cervejas falsificadas em São Paulo (SP).

Essa prática só é possível devido à padronização dos vasilhames reutilizáveis (600 mL), por medida econômica, por parte das principais empresas do mercado de cerveja do Brasil. Como consequência, os únicos elementos disponibilizados aos consumidores para a diferenciação das marcas desse produto são os rótulos e as tampas das garrafas, os quais podem ser facilmente adulterados.

Apreensões de cervejas falsificadas já foram noticiadas em todas as regiões do país, mas os estados de Minas Gerais, Goiás e São Paulo, juntamente com o Distrito Federal, se destacam pelo alto volume de ocorrências. Dentre esses casos, pode-se destacar a “operação gelada” que foi deflagrada em 2014 em três cidades da região central do estado de Minas Gerais (Várzea da Palma, Curvelo e Santana do Pirapama). Essa operação desarticulou uma grande estrutura utilizada para falsificação e comercialização de garrafas de cervejas falsas.<sup>6</sup>

A legislação brasileira já dispõe de dispositivos que buscam coibir práticas de falsificação e/ou comercialização de alimentos adulterados, inclusive para bebidas alcoólicas como a cerveja (Anexo A).<sup>7-9</sup> Entretanto, para que os artifícios prescritos por essas leis

sejam aplicados adequadamente, necessita-se que os métodos investigativos utilizados pelos órgãos competentes tenham a capacidade de gerar evidências confiáveis para embasar todo o processo criminal.

Nos casos de apreensões de cervejas falsificadas provenientes de grandes esquemas de fraude, diversas evidências podem ser encontradas a partir da análise de elementos diretamente associados com o exercício desse crime, tais como: provas testemunhais, presença de resíduos de rótulos, tampas, equipamentos ou grande mistura de garrafas de cervejas de marcas diversas.

Entretanto, muitas dessas provas já não estão mais presentes quando esses engradados contendo as garrafas falsificadas deixam o local onde são produzidas. Consequentemente, as bebidas falsas dificilmente são identificadas nos pontos de comercialização, pois há indisponibilidade de grande parte dos elementos que comprovam esse tipo de prática nesses locais. Esse é um dos motivos que encoraja o desenvolvimento de novos métodos analíticos para detectar esse tipo de fraude.

Diversos métodos para averiguação da autenticidade de cervejas vêm sendo propostos na literatura. Entretanto, grande parte desses trabalhos propõe resolver problemas que não se correlacionam com o problema de falsificações de cervejas do Brasil, pois abordam majoritariamente a diferenciação de estilos de cervejas. A eficácia de tais métodos ainda não foi comprovada para análise de cervejas com perfis sensoriais semelhantes.

Além disso, muitos desses métodos apresentam limitações práticas que os inviabilizam para implantação em grande parte dos laboratórios de perícia do Brasil. Problemas tais como preparos de amostras dispendiosos e o emprego simultâneo de duas ou mais técnicas analíticas se mostram como entraves para o emprego imediato desses métodos nos laboratórios competentes para esse tipo de fiscalização no país.

Portanto, o desenvolvimento e validação de métodos analíticos alternativos que sejam facilmente implementados para análises de cervejas em laboratórios brasileiros se torna necessário. Nesse trabalho, foi proposto um método analítico passível de ser aplicado como ferramenta investigativa para casos de falsificação de cervejas. Para isso, foi utilizada a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* combinada com a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

## 1.1 Objetivos

Avaliar o desempenho da espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS), como uma técnica rápida, simples, e de baixo custo, combinada a métodos quimiométricos para a diferenciação de marcas de cervejas brasileiras que estão constantemente envolvidas em casos de falsificações. Os objetivos específicos desse trabalho estão listados a seguir:

- I. Otimizar as condições instrumentais para o uso do espectrômetro de massas com a fonte de ionização por *paper spray* para obtenção de *fingerprints* representativos para as marcas de cervejas abordadas nesse estudo.
- II. Classificar as cervejas de acordo com seus valores de mercado, submetendo os seus espectros obtidos por PS-MS a métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões: análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).
- III. Avaliar o emprego do método OPS (seleção dos preditores ordenados) para seleção de variáveis, otimização e melhora na interpretação do modelo supervisionado PLS-DA.
- IV. Validar os modelos PLS-DA pela determinação de suas figuras de mérito de maneira a avaliar as suas veracidade e precisão.

## 1.2 Justificativa

A espectrometria de massas com a ionização por *paper spray* proporciona o desenvolvimento de métodos rápidos, simples e de baixo custo para a determinação da composição química de amostras com matrizes complexas por meio da obtenção de “impressões digitais químicas” (*fingerprints*).

Entretanto, a grande quantidade de informações contidas nesses espectros e, por vezes, o elevado número de amostras analisadas requerem a aplicação de métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões para melhor visualização e interpretação dos resultados.

Dessa forma, a PS-MS em conjunto com métodos quimiométricos tem bastante potencial para ser utilizada para o desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de

auxiliar os órgãos competentes na fiscalização e investigação de práticas de falsificações de cervejas, assim como de outras bebidas alcoólicas.

## 2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Cerveja

A cerveja é a bebida alcoólica produzida a partir da fermentação de açúcares provenientes do malte de cevada com a adição de lúpulo. Ela surgiu em cerca de 8000 A.C e sua descoberta é creditada aos povos que habitavam a região da Suméria, pioneiros no emprego de técnicas de cultivos de grãos para a alimentação. Desde então, a cerveja teve influência no desenvolvimento econômico e cultural de diversos povos no decorrer da história, o que explica a atual demanda de consumo dessa bebida em todo mundo.<sup>10</sup>

O modo utilizado para sua produção se modificou drasticamente desde sua descoberta. Na antiguidade, a cerveja era fabricada a partir da mistura de grãos com água em recipientes de cerâmica. Essa mistura era fermentada por microrganismos presentes no próprio ambiente e consumida diretamente nos frascos utilizados para fermentação com auxílio de canudos para retenção dos sólidos. A cerveja nessa época era base da alimentação desses povos e era utilizada como moeda de troca em alguns casos.<sup>10</sup>

Na Europa medieval, a cerveja começou a ser moldada na forma como é conhecida atualmente em decorrência de estudos práticos desenvolvidos por padres e monges nos mosteiros e pelo surgimento das primeiras cervejarias comerciais. A partir desses esforços, novas técnicas de produção e ingredientes começaram a ser introduzidos, tais como os processos de baixa fermentação e a utilização do lúpulo.<sup>10</sup>

A partir do século 18, os esforços para desenvolvimento de novos maquinários aliados à revolução científica resultaram em grandes mudanças nas estruturas das cervejarias, as quais passaram a atender maior demanda e produzir volumes até então nunca imaginados.<sup>11</sup>

A cerveja consumida no Brasil até meados do século XIX era importada dos países europeus, o que foi incentivado pela chegada de Dom João VI e da família real portuguesa ao país. No final desse mesmo século, começaram a surgir as primeiras indústrias nacionais: Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia (1888) e a Companhia Antarctica Paulista (1891).<sup>11</sup>

Desde então, outras cervejarias surgiram, o que contribuiu para a atual configuração do setor. Nos últimos anos, têm se observado mudança gradual no perfil de consumo de cervejas do Brasil devido à inserção e expansão de microcervejarias regionais. Essas fabricantes utilizam de matérias-primas alternativas na produção de cervejas, o que



resulta em uma maior diversidade de sabores e estilos dessa bebida. Esse mercado se encontra em expansão e estima-se que aproximadamente 400 cervejarias estejam em funcionamento em todo o país.<sup>12</sup>

Um fato que exemplifica a expansão desse mercado são os processos de aquisição de cervejarias premiadas e consolidadas no nicho de mercado das cervejas artesanais por algumas das grandes cervejarias que dominam o mercado brasileiro dessas bebidas, tais como a Brasil Kirin e a Ambev.<sup>12</sup>

Devido à diversidade de empresas e a expansão do mercado, regulamentos foram propostos para definir os padrões de qualidade exigidos no território nacional. Atualmente, a produção de cervejas no Brasil segue os critérios impostos pelo Decreto nº 6.871, de 4 de Junho de 2009, que regulamentou a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994. Esse decreto dispõe de requisitos a serem obedecidos para a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.<sup>13</sup>

### **2.1.1 Fabricação e química da cerveja**

A fabricação da cerveja é um processo complexo que envolve diversas etapas e requer condições operacionais extremamente controladas para obtenção de um produto de boa qualidade. Existe uma grande diversidade de técnicas e processos para sua produção. O processo descrito a seguir é um breve resumo das etapas de produção dessa bebida utilizado pelas grandes indústrias.

Uma matéria-prima importante para a produção de cerveja é o malte. Esse insumo é produzido a partir dos grãos de cevada (*Hordeum vulgare L.*) em indústrias especializadas ou, em menor extensão, nas próprias cervejarias. Os grãos da cevada possuem alta concentração de amido (amilopectina e amilose) e nutrientes que serão disponibilizados com maior facilidade no mosto cervejeiro após o processo de maltagem.<sup>11</sup>

Para obtenção do malte, a cevada é condicionada em tanques contendo água e oxigenação em níveis controlados, de modo a promover o início de sua germinação. Posteriormente, esses grãos são transferidos para ambientes onde a temperatura, umidade e oxigenação favorecem o processo germinativo, até o momento em que o poder diastático do malte (concentração de enzimas hidrolíticas produzidas durante a germinação) atinja o padrão exigido para que o processo de mosturação ocorra adequadamente. A produção do malte é finalizada com a secagem dos grãos para que ocorra a interrupção da germinação

com o propósito de se preservar a maior quantidade de amido possível e para conferir cores, aromas e sabores característicos.<sup>11</sup>

O processo de produção de cerveja pelas indústrias se inicia com a moagem dos grãos de malte. Essa matéria-prima é processada em equipamentos capazes de esmagá-los de modo a expor o endosperma (rico em amido) ao mesmo tempo em que se preservam as cascas dos grãos. Isso é importante, porque essas cascas serão posteriormente utilizadas para a filtragem do mosto no término da mosturação.<sup>11</sup>

A composição química da água utilizada na mosturação influencia na qualidade da cerveja e, por isso, ela passa por um processo de padronização antes do seu uso nas grandes indústrias. A presença de certos sais pode influenciar no controle do pH, além de alterar a percepção do sabor e a formação de espuma da bebida final.<sup>11</sup>

Na etapa de mosturação, os maltes moídos são pesados e misturados com a água cervejeira. Essa mistura passará por aquecimento em tanques para promover a extração das substâncias solúveis e as reações enzimáticas que solubilizarão os componentes insolúveis do malte por meio de reações hidrolíticas. Esses compostos servirão como nutrientes e fontes de açúcares para o processo de fermentação e contribuirão para definição de certas características da cerveja, tais como corpo, densidade da espuma, sabor e cor.<sup>11</sup>

O controle da temperatura do mosto durante a etapa da mosturação tem grande impacto na ação de hidrólise de macromoléculas (tais como proteínas, lipídeos e amido) devido à ação das enzimas oriundas do malte.<sup>14</sup> A Tabela 1 mostra algumas das enzimas que atuam no mosto durante a etapa de mosturação e suas condições ótimas de temperatura e pH.

Um exemplo da importância do controle da temperatura nesse processo pode ser dado a partir da descrição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase. Elas são responsáveis pela hidrólise das moléculas de amilopectina e amilose para gerar os malto-oligossacarídeos que serão posteriormente fermentados e que definirão o corpo da cerveja.

Cada uma dessas enzimas atua de maneira específica sobre as moléculas que compõe o amido em condições ótimas pH e temperatura ligeiramente distintas. A  $\alpha$ -amilase atua em uma faixa de temperatura mais alta e é responsável pela quebra de moléculas de amido em quaisquer ligações glicosídicas  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4), o que resultará na formação de oligossacarídeos com número de unidades de glicose distintos. Já a  $\beta$ -amilase atua em uma faixa de temperatura mais baixa em relação à  $\alpha$ -amilase e tem papel na quebra ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4), localizadas apenas nas extremidades das moléculas de

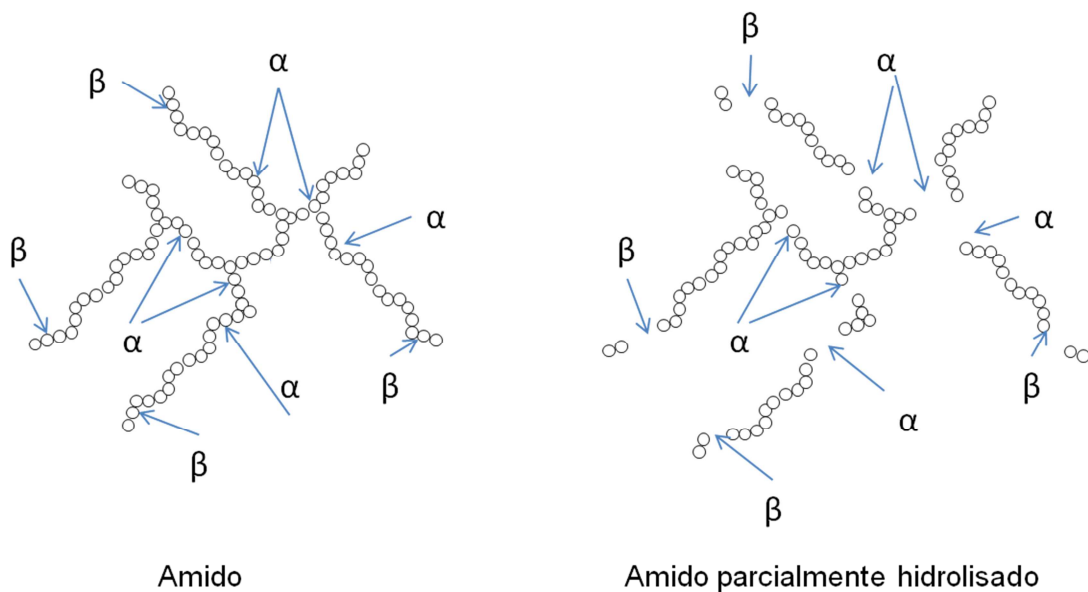
amido, que resultará na formação de açúcares com apenas duas unidades de glicose (maltose).<sup>14</sup>

Tabela 1 – Enzimas atuantes durante o processo de mosturação.

Enzimas	Condições Ótimas na mosturação	
	Temperatura (°C)	pH
$\beta$ -glucano solubilase	62-65	6,8
Endo 1-3- $\beta$ -glucanase	<60	4,6
Endo 1-4- $\beta$ -glucanase	40-45	4,5 - 4,8
Exo- $\beta$ -glucanase	<40	4,5
Endopeptidase	45-50	3,9 - 5,5
Carboxipeptidase	50	4,8 - 4,6
Aminopeptidase	45	7,0 - 7,2
Dipeptidase	45	8,8
$\alpha$ - amilase	65-75	5,6 - 5,8
$\beta$ - amilase	60-65	5,4 - 5,6
Maltase	35-40	6,0
Limite dextrinase	55-65	5,1
Lipase	55-65	6,8 - 7,0
Lipoxigenase	45-55	6,5 - 7,0
Polifenol oxidase	60-65	6,5 - 7,0
Peroxidase	>60	6,2
Fosfatases	50-54	5,0

Fonte: Adaptado de KUNZE, W.<sup>14</sup>

A Figura 3 ilustra o mecanismo de ação dessas enzimas na hidrólise do amido. A extensão pela qual cada uma dessas enzimas irá atuar é definida a partir das definições de temperatura impostas por cada fabricante durante a mosturação. Para fabricação de cervejas nas quais se deseja altos teores alcoólicos ou sabores adocicados são empregadas condições de mosturação que favoreçam a ação da enzima  $\beta$ -amilase para que a liberação de açúcares com menores cadeias glicosídicas seja favorecida durante a hidrólise do amido. Em contraste, para a fabricação de cervejas com corpo elevado e baixo teor alcoólico, deve-se impor condições que favoreçam a atuação da enzima  $\alpha$ -amilase em relação à  $\beta$ -amilase.<sup>14</sup>



Fonte: Adaptado de KUNZE, W.<sup>14</sup>

Figura 3 – Ilustração do mecanismo das enzimas  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ ) e  $\beta$ -amilase ( $\beta$ ) para hidrólise do amido.

A definição das rampas de aquecimento durante a mosturação também será influenciada pela composição e quantidade de adjuntos cervejeiros utilizados na obtenção do mosto. Os adjuntos são utilizados como fontes alternativas de carboidratos e permitidos por lei. Eles substituem parte do malte durante a produção de cerveja com o propósito de conferir características sensoriais específicas a cerveja e/ou redução de custos de produção.<sup>11</sup>

A Legislação brasileira impõe limites sobre a quantidade de adjuntos que podem ser empregados na fabricação da cerveja. Esses insumos podem ser adicionados até que sua concentração total alcance 45% do extrato original do mosto.<sup>13</sup> Os principais adjuntos utilizados são o milho, arroz, cana-de-açúcar, trigo e aveia, nas suas formas amiláceas (*in natura*) ou processadas (açúcares e xaropes). Nos últimos anos, as cervejas mais consumidas no Brasil vêm utilizando o xarope de milho de alta maltose como adjunto cervejeiro.<sup>11</sup> As Tabelas 2 e 3 apresentam uma relação dos adjuntos comumente utilizados e suas composições químicas médias em peso seco percentual (% ps).<sup>15</sup>

Tabela 2 – Adjuntos Cervejeiros amiláceos.

	Extrato (% ps)	Proteínas (% ps)	Lipídeos (% ps)
“Gritz” de milho *	90	9,5	0,9
“Gritz” de arroz *	92	7,5	0,6
Farinha de trigo	86	8,5	0,76
Cevada torrada	72	14,5	1,6
Flocos de milho	83	9,5	0,9

\* Gritz – Grãos higienizados e selecionados moídos.

Fonte: Adaptado de HOUGH, J. S.<sup>15</sup>

Tabela 3 – Adjuntos Cervejeiros açucarados.

	Glicose (% ps)	Frutose (% ps)	Sacarose (% ps)	Maltose e Maltotriose (% ps)	Açúcares não fermentáveis (% ps)
Açúcar comum	0	0	100	0	0
Açúcar invertido	50	50	0	0	0
Xarope de alta glicose	43	0	0	37	20
Xarope alta maltose	3	0	0	72	25

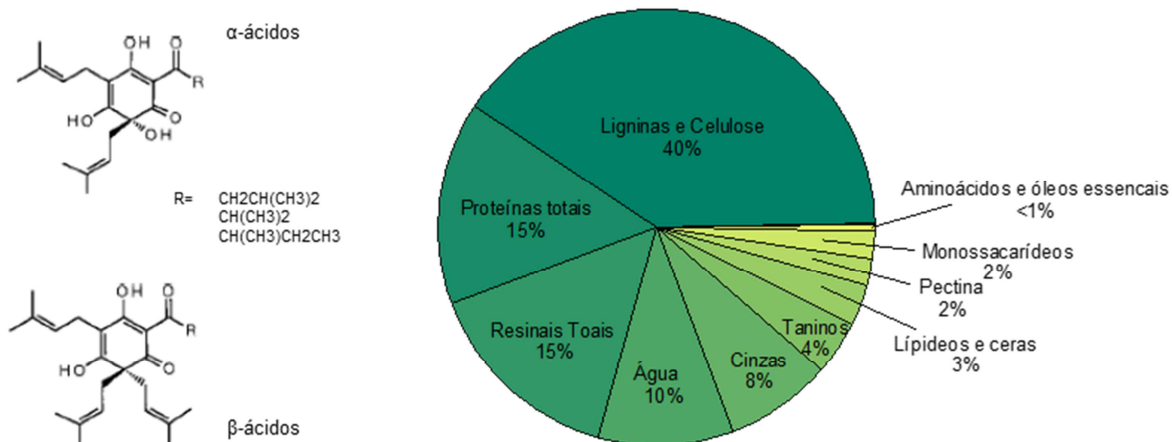
Fonte: Adaptado de HOUGH, J. S.<sup>15</sup>

Ao final da etapa de mosturação, o mosto cervejeiro é aquecido a aproximadamente 75°C para desnaturação de proteínas de alta massa molecular. Esses resíduos serão posteriormente retidos pelas cascas do malte durante o processo de filtração. O controle da temperatura durante a filtração também é importante para prevenir a extração de compostos da casca que conferem sabores indesejáveis e que possam causar a turvação das cervejas, tais como taninos.<sup>11</sup>

O mosto após ser filtrado passará então para a etapa de fervura para que ocorra a diminuição da carga microbiana da mistura. Desse modo, a contaminação por microrganismos presentes no ambiente é evitada. Nesse processo, acentua-se o sabor e a

cor da cerveja devido às reações de caramelização dos açúcares e também ocorre a adição do lúpulo.<sup>11</sup>

O lúpulo consiste nas flores femininas de uma planta perene (*Humulus lupulos*), que contém óleos essenciais e resinas responsáveis pelos aromas (florais, ervas, amadeirados, picantes entre outros) e amargor da cerveja. Esse ingrediente também atua como agente bacteriostático do mosto e como estabilizante da espuma da cerveja.<sup>11</sup> A composição média de um lúpulo comercial está ilustrada na Figura 4, na qual se observa a alta concentração das resinas que contêm os alfa e beta ácidos (15%).



Fonte: Adaptado de HOUGH, J. S.<sup>15</sup>

Figura 4 - Composição média de um lúpulo comercial.

A etapa de fervura também é importante para a coagulação de proteínas de alto peso molecular, que podem causar o posterior turvamento da cerveja quando resfriada. No final desse processo, os sólidos suspensos no mosto fervido são separados. Em seguida, o mosto é rapidamente resfriado e oxigenado antes de ser transferido para o fermentador. Esse processo é feito por meio de trocadores de calor que evitam o contato direto da solução resfriada com o ar, de maneira a prevenir a contaminação por bactérias e leveduras selvagens.<sup>11</sup>

A etapa da fermentação se inicia a partir do momento em que as leveduras cervejeiras são inoculadas dentro do fermentador. Antes de sua inoculação, as cepas de leveduras são cultivadas de modo restrito dentro de cada cervejaria para que suas linhagens se preservem (livres de contaminações e mutações). A quantidade de leveduras

empregadas será determinada pelas características do mosto obtido nas etapas anteriores.<sup>11</sup>

As leveduras cervejeiras podem ser de dois tipos: leveduras de alta fermentação (*Saccharomyces cerevisie*), responsáveis por produzir cervejas do tipo *Ale*, e de baixa fermentação (*Saccharomyces uvarium* ou *Saccharomyces carlsbenges*), utilizadas na produção de cervejas do tipo *Lager*. As cervejas *Lagers* são as mais consumidas no Brasil e no mundo. As leveduras *Lagers* produzem cervejas estáveis do ponto de vista sensorial por produzir baixas concentrações de compostos *off-flavors* que podem conferir aromas desagradáveis a cerveja. De modo geral, a fermentação de *Lagers* ocorre a baixas temperaturas (8 a 12°C) e dura cerca de 10 dias, resultando em bebidas com alta qualidade, durabilidade e uniformidade entre lotes.<sup>11</sup>

Durante a fermentação, as leveduras convertem os açúcares de baixo peso molecular em álcool e CO<sub>2</sub>, além de produzir metabólitos que podem conferir sabores desejáveis e indesejáveis à cerveja. Por isso, após o período no fermentador, a cerveja passa por uma etapa de maturação durante alguns dias, na qual as leveduras metabolizarão esses compostos para a adequação da cerveja aos padrões sensoriais desejados. Nessa etapa, também se realiza a adição de aditivos cervejeiros (Quadro 1).<sup>11</sup>

Após a maturação, a cerveja é então clarificada utilizando algum material poroso (comumente terra diatomácea) como filtro. O gás carbônico produzido durante a fermentação pode ser recuperado e posteriormente utilizado para carbonatar a cerveja durante o seu transporte para os tanques pressurizados de envase.<sup>11</sup>

No processo de envase a cerveja é transferida para o recipiente requerido para sua comercialização. No Brasil, a cerveja é comumente comercializada nas formas de latas, garrafas descartáveis, barriletes e garrafas retornáveis.<sup>11</sup> As garrafas retornáveis (600 mL) são a forma de comercialização mais utilizada pela indústria nacional. Em 2015, elas foram responsáveis pelo envasamento de 48,7% da produção nacional, seguidas de 47,4% em latas e 3,9% em outras embalagens.<sup>16</sup>

Por fim, a cerveja passa pelo processo de pasteurização para garantir que o conteúdo do recipiente se mantenha livre de durante o período em que é transportada e armazenada para os pontos de venda.<sup>11</sup>

Na indústria cervejeira, o uso de aditivos tem a função de adequar as propriedades químicas e físicas da bebida. Tais substâncias também auxiliam na conservação do produto e na melhora de sua qualidade. O Quadro 1 apresenta as substâncias permitidas pela Resolução RDC 65 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA), de 29 de novembro de 2011, que dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para fabricação de cervejas.

Quadro 1 – Aditivos cervejeiros permitidos pela RDC 65 para a produção de cervejas.

Função	INS	Aditivo	Limite máximo (g/100 g ou g/100 mL)
Acidulante	270	Ácido láctico (L-, D- e DL-)	Quantum satis
	296	Ácido málico (D-, L-)	Quantum satis
	330	Ácido cítrico	Quantum satis
	338	Ácido fosfórico, ácido orto-fosfórico	0,044
Antiespumante	900 a	Dimetilsilicone, dimetilpolixisano, polidimetilpolixasano	0,001
Antioxidantes	220	Dióxido de enxofre, anidrido sulfuroso	0,005
	221	Sulfito de sódio	
	223	Bissulfito de sódio, sulfito ácido sódico	
	224	Metabissulfito de potássio	
	225	Sulfito de potássio	
	227	Bissulfito de cálcio, sulfito ácido de cálcio	
	228	Bissulfito de potássio	0,03
	300	Ácido ascórbico (L-)	
	301	Ascorbato de sódio	
	302	Ascorbato de cálcio	
	303	Ascorbato de potássio	
	315	Ácido eritóbico, ácido isoascórbico	
	316	Eritorbato de sódio, isoascorbato de sódio	
539	Tiosulfato de sódio	0,005	
Aromatizantes	Aromatizantes naturais (somente óleo essencial, essência natural ou destilado natural de sua origem)		Quantum satis
Corantes	101i	Riboflavina	0,01
	120	Carmim, cochonila, ácido carmínico, sais de Na, K, NH <sub>4</sub> e Ca	0,01

Fonte: ANVISA <sup>17</sup>

Além desses aditivos, a legislação brasileira também autoriza a utilização de coadjuvantes cervejeiros por meio do Decreto RDC 64, que dispõe sobre a aprovação de uso de coadjuvantes para fabricação de cervejas.<sup>18</sup> As substâncias listadas nessa resolução auxiliam no processo de produção da bebida, mas são eliminadas ou deixam poucos



resíduos no produto final. As principais substâncias utilizadas são: agentes clarificantes e de filtração, agentes de controle de microrganismos, catalisadores, detergentes, fermentos biológicos, gases propelentes para embalagens, nutrientes para leveduras e resinas de trocas iônicas. A lista completa dessas substâncias é apresentada no Anexo B.

A quantidade e a natureza dos insumos cervejeiros, assim como o controle das variáveis do processamento, possibilitam a obtenção de cervejas com características sensoriais diversas. No Brasil, o estilo mais consumido é o *Standard American Lager*, que se caracteriza por possuir uma cor clara, baixo corpo e frescor, devido à sua alta carbonatação, baixo amargor e presença aromas neutros. Essas cervejas também se caracterizam pela alta carga de adjuntos cervejeiros utilizados em sua fabricação.<sup>19</sup>

### **2.1.2 Mercado mundial e brasileiro de cervejas**

A produção mundial de cerveja movimentou em torno de 196 bilhões de litros em 2014.<sup>20</sup> Segundo estatísticas do mesmo ano, o mercado mundial era dominado por 4 grandes multinacionais (AB inBEV, SABMiller, Heineken e Carlsberg), que juntas respondiam por 47% do mercado mundial.<sup>20</sup> Estima-se que até o ano de 2020, o mercado mundial de cervejas girará em torno de US\$ 690 bilhões em vendas.<sup>21</sup>

No Brasil, em 2014, o mercado de cervejas respondeu por cerca de 6,6% do mercado mundial dessa bebida e, atualmente, esse é um setor que possui grande impacto na economia nacional, com a geração de muitos empregos e grande arrecadação de impostos.<sup>22</sup> Em 2014, estima-se que esse setor foi responsável por 1,6% do produto interno bruto brasileiro e pela arrecadação de R\$ 21 bilhões de reais em impostos.<sup>23</sup>

O impacto e a influência dessa bebida no hábito de consumo dos brasileiros são enormes, visto que grande maioria dos lares do país e 1,2 milhões de pontos de vendas são atendidos por esse setor industrial.<sup>23</sup> Conseqüentemente, a elevada demanda de produção dessa bebida colocou o país como o 3º maior produtor mundial de cerveja, com volume estimado de 14,1 bilhões de litros em 2014, atrás apenas da China (44,93 bilhões de litros/ano) e Estados Unidos (22,55 bilhões de litros/ano).<sup>22</sup>

Apesar do Brasil se destacar como um grande produtor mundial de cerveja, o país ainda possui baixas taxas de consumo *per capita* quando comparado a outros países. Em 2014, O Brasil apareceu apenas como o 27º colocado no *ranking* mundial de consumo *per capita* de cerveja, com um volume aproximado de 66,9 litros per capita/ano. Comparando esse valor aos volumes consumidos nos países líderes desse *ranking*, tais

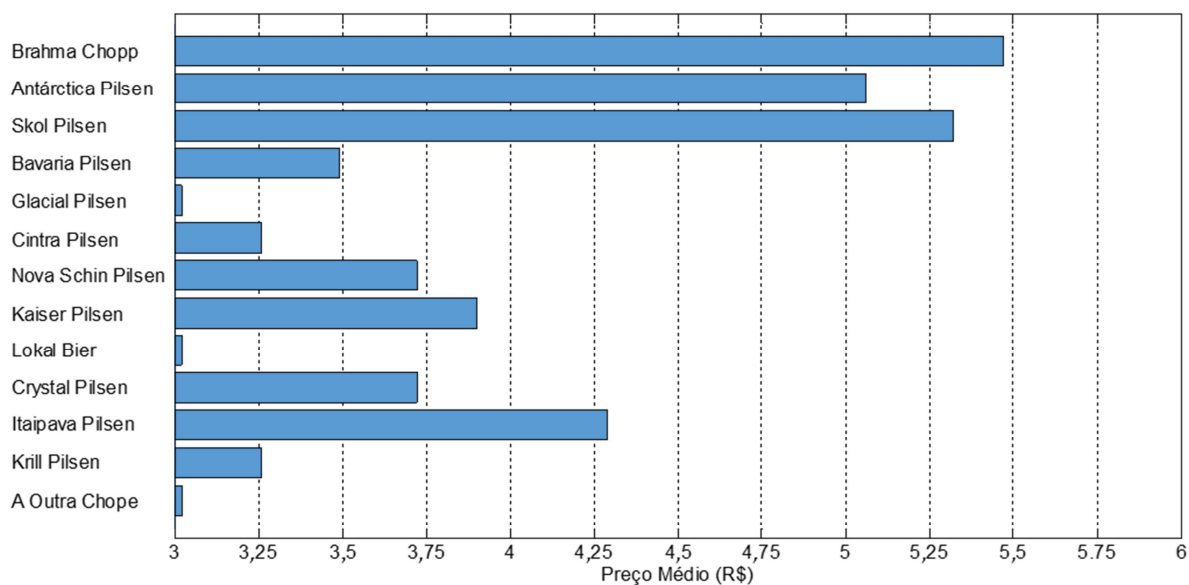
como a República Checa (147,1 litros per capita/ ano), a Namíbia (108,9 litros per capita/ ano) e a Áustria (105,9 Litros per capita/ ano), conclui-se que o Brasil ainda possui um grande potencial para desenvolvimento de sua capacidade de produção e consumo.<sup>22</sup>

O mercado cervejeiro no Brasil é controlado por quatro empresas (Ambev, Brasil Kirin, Grupo Petrópolis e Cervejaria Heineken) que dominam aproximadamente 96% da produção nacional. Juntas essas empresas possuem um total de 50 fabricas distribuídas em todo território nacional e são responsáveis pela geração de cerca de 2,2 milhões de empregos, quando considerada toda a cadeia produtiva da cerveja.<sup>23</sup>

A Ambev respondeu sozinha por 67,5% do volume total de cerveja produzido em 2015 no Brasil.<sup>24</sup> O domínio do mercado por essa empresa começou nos anos 2000, após sua criação após a fusão das cervejarias Brahma e Antarctica, que dominavam grandes mercados regionais.<sup>11</sup> Posteriormente, a empresa adquiriu empresas internacionais, como a belga Interbrew (2004), a americana Anheuser-Busch (2008) e a anglo-sul africana SABMiller (2015), se tornando assim a maior cervejaria do mundo (AB inBEV).<sup>11,25</sup>

Devido à grande tradição herdada das empresas adquiridas e aos grandes investimentos na produção, *marketing* e logística, as três marcas produzidas pela Ambev se tornaram líderes de venda no mercado brasileiro. Atualmente, essas marcas - Brahma, Antarctica e Skol - estão entre as 10 marcas mais valiosas do Brasil (juntas totalizando R\$ 27,719 bilhões em 2015).<sup>26</sup> Esse cenário, aliado a aspectos referentes à tributação, faz com que os rótulos dessa empresa possuam maior valor de comercialização em relação às demais concorrentes nacionais.

Para exemplificar os impactos desses fatores para a formação do preço dessas cervejas no Brasil, abaixo é apresentada a Figura 5, que compara os preços médios de diversas marcas de cerveja em Minas Gerais. Esses valores são divulgados pela Secretária de Fazenda do estado de Minas Gerais para fim do cálculo de arrecadação do ICMS. Como observado, as marcas Antarctica, Skol e Brahma possuem maior valor comercial quando comparadas a cervejas de outros fabricantes, o que serve como principal incentivo para que ocorra grande número de casos de falsificações dessas cervejas.



Fonte: Secretária de Estado de Fazenda de Minas Gerais.<sup>27</sup>

Figura 5 – Preço médio ponderado calculado de garrafas de cervejas retornáveis (600 mL) no estado de Minas Gerais.

### 2.1.3 Métodos para autenticação de cervejas

A classificação e diferenciação de cervejas já foram estudadas através do emprego de diversas técnicas analíticas, tais como: termogravimetria,<sup>28</sup> espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta-visível,<sup>28-31</sup> espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES),<sup>32-34</sup> espectroscopia de fluorescência molecular,<sup>30,35</sup> espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS),<sup>32,36</sup> espectroscopia de absorção atômica,<sup>31</sup> ressonância magnética nuclear,<sup>37-41</sup> sensores colorimétricos,<sup>42</sup> análises sensoriais,<sup>43,44</sup> cromatografia gasosa,<sup>29,45-48</sup> sensores potenciométricos,<sup>49-52</sup> cromatografia líquida,<sup>53,54</sup> espectrometria de massas de razões isotópicas,<sup>33</sup> espectroscopia no infravermelho médio e próximo,<sup>28,29,40,55-59</sup> e a espectrometria de massas de forma autônoma ou hifenizada a outros instrumentos.<sup>29,36,45-48,54,60-63.</sup> A seguir, são apresentados discutidos detalhes desses métodos desenvolvidos.

ALCAZAR *et al.* aplicaram a espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) para quantificação de 11 metais em 32 amostras de cervejas pertencentes a 3 tipos diferentes (*Lager*, *Ale* e sem álcool). Os resultados apontaram que as amostras foram satisfatoriamente discriminadas (92% de predições

corretas) pelo emprego de métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões supervisionados. As espécies mais relevantes para a diferenciação desses estilos de cerveja foram os metais manganês (Mn), fósforo (P), magnésio (Mg) e potássio (K).<sup>34</sup>

DUARTE *et al.* empregaram <sup>1</sup>H RMN e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para diferenciação de 50 marcas de cervejas de três diferentes tipos (*Lager*, *Ale* e sem álcool). Segundo os resultados obtidos, a discriminação desses estilos de cerveja pode ser feita a partir da análise de regiões específicas dos espectros de cada cerveja, nas quais se observam sinais referentes a compostos aromáticos e também a açúcares.<sup>40</sup>

ZHANG *et al.* analisaram 18 marcas de cervejas pertencentes a 9 estilos cervejeiros distintos, empregando arranjos de sensores colorimétricos. Esses dispositivos empregavam uma combinação de diferentes corantes que reagem seletivamente com componentes presentes nas cervejas e adquiriram padrões de cores distintos para uma das bebidas analisadas. As imagens desses sensores após a aplicação das amostras foram posteriormente analisadas por métodos não supervisionados de identificação de padrões. Os resultados apontaram que esse método é capaz de diferenciar estilos distintos de cervejas com erros menores que 3%.<sup>42</sup>

SILVA *et al.* empregaram GC-MS combinada com microextração em fase sólida para a determinação do perfil de compostos voláteis de 20 marcas de cervejas *Lagers* brasileiras. Nos perfis obtidos foram identificados compostos como alcoóis, ésteres, cetonas, aldeídos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, entre outras classes. A comparação desses perfis foi realizada através de mapas Kohonen, um tipo de rede neural artificial. A análise resultou no agrupamento das cervejas estudadas em cinco classes distintas, de acordo com as semelhanças entre a composição dos componentes voláteis detectados. É importante ressaltar que em algum desses agrupamentos, marcas de cervejas fabricadas por diferentes empresas foram agrupadas em um mesmo conjunto.<sup>47</sup>

CAJKA *et al.* empregaram a espectrometria de massas de alta resolução com ionização por análise direta em tempo real (DART, do inglês *direct analysis in real time*) e ferramentas quimiométricas para diferenciação entre cervejas trapistas e outras que pertencem ao mesmo estilo, mas que não possuem o selo de autenticação da ordem trapista. A análise foi capaz de identificar derivados de carboidratos e aminoácidos (modo positivo) e ácidos orgânicos (modo negativo) de modo rápido, confiável e com baixo custo. A partir do uso dos *fingerprints* obtidos, os modelos quimiométricos construídos para discriminação das amostras apresentaram classificações corretas maiores que 95%.<sup>60</sup>

CARTER *et al.* determinaram a composição isotópica ( $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificaram diversos íons inorgânicos presentes em amostras de cervejas de diferentes países, com a finalidade de classificá-las segundo as suas origens e estilos (*Ale*, *Stout*, *Lager* e trigo). Os autores apontaram grandes correlações entre a concentração de isótopos  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  com a origem dessas cervejas. Isso foi associado às mudanças provocadas na composição da água utilizada para a fabricação dessas cervejas devido à diferença nos volumes de precipitações pluviais de cada região estudada. Além de obterem a classificação das amostras segundo a origem, os autores também apontaram que a composição dos íons e de isótopos de  $\delta^{13}\text{C}$  é capaz de discriminar as cervejas segundo suas origens e estilos, devido aos diferentes insumos e adjuntos cervejeiros adicionados na produção de cada uma.<sup>33</sup>

Observa-se na literatura que a discriminação química de cervejas é de natureza multivariada, pois o emprego de ferramentas quimiométricas para o tratamento dos dados obtidos é observado na quase totalidade dos trabalhos. Entre as análises quimiométricas mais utilizadas, destacam-se: análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de agrupamentos (HCA), análise discriminante linear (LDA), modelagem independente e flexível por analogia de classe (SIMCA), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e redes neurais artificiais.

Recentemente, a fusão de dados também foi utilizada para discriminação de cervejas de estilos ou origens diferentes com sucesso. Nessa abordagem, as informações provenientes de diferentes técnicas analíticas podem ser reunidas e analisadas simultaneamente por métodos quimiométricos. O modo pelo qual esses dados serão analisados com a aplicação da fusão de dados dependerá do nível de processamento prévio requerido pelos dados, que pode ser baixo, médio ou alto.<sup>64</sup>

A fusão de dados de nível baixo requer o mínimo processamento das matrizes que contêm os resultados de cada técnica de forma isolada. Os dados são apenas pré-processados e, posteriormente, concatenados para uma nova matriz que será analisada pelo método quimiométrico apropriado. No nível intermediário, antes da construção da matriz de fusão de dados, as informações relevantes de cada conjunto são previamente extraídas e então concatenadas. Isso pode ser realizado, por exemplo, fundindo-se os escores de modelos PCA, PLS ou PLS-DA previamente construídos. A fusão de dados de alto nível requer a construção de modelos quimiométricos (tais como PLS ou PLS-DA) para cada conjunto de dados de modo isolado. As previsões de cada um desses modelos são então utilizadas para a construção da matriz de fusão de dados, que será submetida a uma

nova análise quimiométrica para previsão/classificação.<sup>64</sup> O nível alto de fusão de dados frequentemente produz piores resultados que os outros dois níveis.<sup>65</sup>

VERA *et al.* discriminaram cervejas do mesmo estilo fabricadas em 4 fábricas diferentes de uma mesma empresa utilizando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, espectroscopia no infravermelho médio e espectroscopia UV-VIS; A abordagem da fusão de dados em níveis baixo e médio foi utilizada junto à LDA (análise discriminante linear). O emprego da fusão de dados apresentou resultados mais satisfatórios em relação aos modelos construídos com cada técnica de forma isolada.<sup>29</sup>

GUTIERREZ *et al.* empregaram um arranjo de 15 sensores potenciométricos e 6 voltamétricos para diferenciação de cervejas de 3 estilos diferentes por meio da fusão de dados de nível baixo e de métodos quimiométricos (PCA e LDA). Os autores alcançaram eficiências de 96% na classificação das amostras segundo seus estilos utilizando o método de análise linear discriminante (LDA) após uma seleção dos sensores que apresentaram as melhores respostas para classificação.<sup>52</sup>

BIANCOLILLO *et al.* utilizaram a fusão de dados nos níveis baixo e médio combinada a métodos quimiométricos (PLS-DA e SIMCA) para diferenciação de uma cerveja especial, do tipo *American Pale Ale*, produzida por uma determinada empresa italiana, de outras cervejas do tipo *Ale* produzidas pela mesma empresa e por empresas concorrentes. As técnicas utilizadas nesse estudo foram análise termogravimétrica, espectroscopias no infravermelho próximo e médio, e espectroscopia na região do ultravioleta e visível. Os autores alcançaram 100% de classificações corretas empregando o método PLS-DA com fusão de dados de nível médio.<sup>28</sup>

TAN *et al.* analisaram 27 marcas de cervejas chinesas do tipo *American Lagers* fabricadas por 11 empresas diferentes empregando a espectroscopia de fluorescência e espectroscopia no ultravioleta/visível. Os resultados dessas técnicas foram analisados por PCA e LDA com a abordagem usando fusão de dados nos níveis baixo e médio. Os autores alcançaram 86,7% de classificações corretas das cervejas de acordo com os fabricantes usando a fusão de dados de nível médio.<sup>30</sup>

Embora com um número considerável de trabalhos presentes na literatura, a abordagem da fusão de dados apresenta desvantagens devido à necessidade de se empregar um número maior de etapas para o preparo de amostras (uma vez que cada técnica pode requerer um preparo diferente), disponibilidade e capacitação de analistas para operar dois ou mais instrumentos e tratamento de dados.

De uma forma geral, observa-se que a maioria dos métodos propostos até o momento está voltada para a classificação e diferenciação de cervejas de estilos diferentes. Menor atenção tem sido dada aos estudos envolvendo a diferenciação de cervejas de um mesmo estilo, o que representa um desafio maior do ponto de vista analítico, devido à maior similaridade entre suas composições químicas.

## 2.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas se destaca pela sua grande capacidade de executar análises qualitativas e quantitativas com alta seletividade e baixos limites de detecção. Essa técnica possibilita a elucidação de estruturas químicas através da (1) aplicação da espectrometria de massas sequencial, que possibilita obter padrões de fragmentação característicos para cada composto, (2) realização de análises em alta resolução, que aponta a massa de um determinado composto com alto grau de exatidão, ou aplicação de ambas as abordagens. Essa técnica também é muito versátil, pois frequentemente é empregada em associação com métodos de separação (cromatografia gasosa, cromatografia líquida e eletroforese capilar) ou utilizada de forma autônoma por meio de métodos diretos de injeção de amostras.<sup>66</sup>

A técnica se fundamenta na ionização dos analitos, seguida pela separação dos mesmos de acordo com suas razões  $m/z$  e, por fim, a detecção e processamento dos sinais por um sistema apropriado. Os componentes básicos de um espectrômetro de massas são ilustrados na Figura 6.

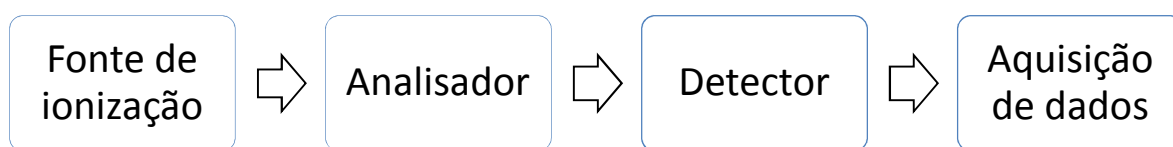


Figura 6 – Diagrama simplificado de um Espectrômetro de massas.

A fonte de ionização é responsável por conferir carga aos analitos. Os cátions e ânions dos compostos a serem analisados podem ser formados a partir de fragmentação com a aplicação de uma alta energia (Ex: ionização por impacto de elétrons) ou através de reações ácido-base, que permitem a formação de espécies protonadas/desprotonadas. A

formação de adutos com cátions/ânions inorgânicos também é bastante utilizada. A escolha do método de ionização adequado está sujeita às características dos analitos e da matriz das amostras.<sup>66</sup>

Após a ionização, os íons são acelerados e focalizados por campos elétricos e magnéticos aplicados por lentes eletrostáticas. Posteriormente, esses íons adentram na câmara de alto vácuo, onde estão localizados o analisador de massas e o detector.<sup>66</sup>

Os analisadores de massas são responsáveis pela discriminação dos íons com diferentes razões  $m/z$  e/ou pelas fragmentações dos analitos de interesse. Diversas configurações e modos de operação desses dispositivos estão disponíveis no mercado e aspectos como a sensibilidade, resolução (capacidade de discriminar íons com valores de razões  $m/z$  próximos) e a capacidade de realizar fragmentações devem ser avaliadas para a escolha do equipamento.<sup>66</sup>

Um tipo de analisador amplamente utilizado é o *Ion Trap* tridimensional. Esses analisadores têm a capacidade de “aprisionar” os íons provenientes da fonte de ionização através da combinação de campos eletromagnéticos e ondas de rádio frequência. O conjunto de íons que adentram a esses dispositivos adquirirão movimentos de precessão que, posteriormente, serão sucessivamente cessados para que ocorra a sua detecção de acordo com as razões  $m/z$ . Esses analisadores também permitem fragmentar os íons aprisionados com o auxílio de gases inertes a baixas pressões. Uma das vantagens desse detector é a sua alta sensibilidade, devido à capacidade de pré-concentrar os íons de interesse antes desses serem enviados ao detector. Entretanto, esses detectores apresentam baixas resoluções.<sup>66</sup>

Após a discriminação dos íons e/ou eventuais fragmentações realizadas pelo analisador, esses são enviados ao detector que será responsável por gerar as repostas instrumentais pela conversão da corrente iônica em sinais elétricos. Esses sinais posteriormente são processados por um sistema de aquisição de dados para gerar o espectro de massas.<sup>66</sup>

### **2.2.1 Fontes de ionização ambiente**

Até a década de 1980, a espectrometria de massas esteve restrita à análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis por meio de fontes de “impacto eletrônico” (EI) e ionização química (CI). Esses equipamentos requerem que seus componentes internos estejam em alto vácuo para que o processo de discriminação e detecção dos íons ocorra



adequadamente. As fontes EI e CI, até então, eram os métodos de ionização mais utilizados e os que apresentavam melhores desempenhos, pois a quantidade de íons e de solventes (gases) que adentram ao equipamento não é capaz de comprometer o vácuo interno. Entretanto, essas fontes requerem o emprego de altas energias de ionização e altas temperaturas, o que inviabilizava a análise por espectrometria de massas de uma diversidade de analitos (tais como biomoléculas de massa molecular elevada).<sup>66</sup>

Essa limitação, que até então impedia o emprego da espectrometria de massas principalmente para análises de compostos de grande massa molecular e/ou termolábeis, levou a uma infinidade de propostas de novos métodos de ionização muitas vezes ineficientes. Entretanto, foi o trabalho publicado por John Fenn *et al.* em 1989 que causou uma grande revolução nesse campo de estudo ao propor a fonte de ionização *electrospray* (ESI).<sup>67</sup> Devido a esse trabalho, John Fenn foi laureado com o prêmio Nobel, juntamente com Koichi Tanaka e Kurt Wuthrich, devido às suas contribuições para o desenvolvimento de métodos de identificação e análise estrutural de macromoléculas biológicas.

O mecanismo de ionização por *electrospray* se baseia na ionização dos analitos por meio do deslocamento de equilíbrios químicos, de modo a favorecer a formação de espécies iônicas já presentes em solução. Essa técnica é classificada como um método de ionização à pressão atmosférica, pois não requer a aplicação de vácuo.<sup>68</sup>

A análise se inicia com o bombeamento da solução contendo a amostra para um capilar que sofre a ação de potencial elétrico aplicado em relação à entrada do espectrômetro de massas. Com a aplicação do potencial, ocorre um grande acúmulo de cargas elétricas na extremidade do capilar, fazendo com que a solução contendo os analitos sofra um processo hidrodinâmico que favorece a formação de um fino *spray* de gotículas carregadas. Esse processo de formação do *spray* é facilitado pela aplicação de fluxos auxiliares de gases inertes.<sup>68</sup>

Na medida em que as gotículas adentram ao equipamento, o solvente é evaporado, provocando a diminuição de seus diâmetros. Isso provoca o aumento da densidade de íons e espécies químicas na gota até que, em um determinado momento, as forças de coesão das moléculas são superadas pelas forças coulombianas de repulsão entre as cargas. Nesse momento, ocorre a expulsão dos analitos ionizados das gotas devido à formação de espécies carregadas, por meio de mecanismos ácido-base.<sup>68</sup>

As técnicas a pressão atmosférica como um todo ainda apresentam algumas limitações no que se refere à realização de análises rápidas e de baixo custo de compostos presentes em matrizes complexas (ex: alimentos). Isso porque são requeridas várias etapas

de pré-tratamento de amostras e insumos (gases e solventes). Em decorrência disso, a partir da década de 2000 surgiu a demanda pelo desenvolvimento de novos métodos de ionização, o que resultou no surgimento das fontes de ionização ambiente.<sup>69</sup> Segundo HARRIS *et al.*, os métodos de ionização ambiente podem ser categorizados pelos seguintes critérios:

- I. A fonte não deve impor barreiras físicas que impossibilitem a análise de amostras em formatos não convencionais (ex: tecidos biológicos).
- II. A amostra deve ser minimamente tratada antes das análises (eliminação de etapas de extrações, concentrações, separações ou diluições).
- III. A fonte deve ser facilmente acoplável a qualquer espectrômetro de massas, sem prejuízo à sua integridade e desempenho.
- IV. A ionização dos analitos deve ser branda e alcançada a partir da aplicação de valores de energia baixos.

As primeiras técnicas de ionização ambiente (DART e DESI) surgiram como modificações de técnicas já consolidadas de ionização à pressão atmosférica, tais como a ionização por eletrospray (ESI) e dessorção de matriz assistida por laser (MALDI). Desde então, diversos métodos têm sido propostos e aplicados para execução de análises diretas de tecidos, fluídos biológicos, amostras de origem ambiental, forenses, aquisição de imagens químicas, análise de derivados de petróleo, produtos farmacêuticos e alimentos.<sup>69</sup>

Uma das grandes vantagens desses métodos é a possibilidade de empregá-los para análises químicas *in loco* a partir do acoplamento dessas fontes a espectrômetros de massas portáteis.<sup>69</sup>

### **2.2.2 Fonte de Ionização por *paper spray***

Entre os métodos de ionização ambiente, a fonte de ionização *paper spray* (PS-MS) é uma das que têm recebido maior atenção nos últimos anos. A primeira descrição dessa técnica foi feita por WANG *et al.*, em 2010, e desde então ela vem sendo amplamente empregada devido à sua grande simplicidade, eficiência e baixo custo em análises qualitativas e quantitativas. Assim como as demais técnicas de ionização ambiente, o seu maior atrativo é a capacidade de executar análises de compostos presentes em matrizes complexas com o mínimo preparo de amostras.<sup>70</sup>

A ionização por PS-MS (Figura 7) consiste na aplicação de uma pequena quantidade de amostra (1-5  $\mu\text{L}$ ) sobre um substrato poroso triangular (geralmente papel cromatográfico), que é mantido à frente da entrada do espectrômetro de massas. Em seguida, um pequeno volume (10-50  $\mu\text{L}$ ) de solvente apropriado (ex: metanol) é adicionado sobre o papel e uma diferença de potencial é aplicada entre o papel e a entrada do equipamento. Esse potencial aplicado promoverá a formação de um fino *spray* de gotículas do solvente contendo os analitos ionizados devido ao grande acúmulo de cargas elétricas na ponta do papel. Por fim, à medida que o solvente evapora, a repulsão elétrica entre as cargas presentes nessas gotículas causa a liberação dos íons dessolvatados, que serão analisados pelo espectrômetro de massas.<sup>70</sup>

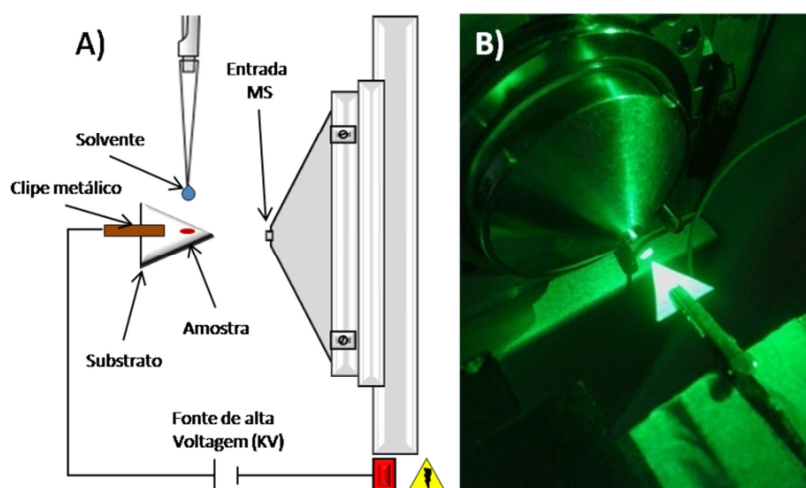


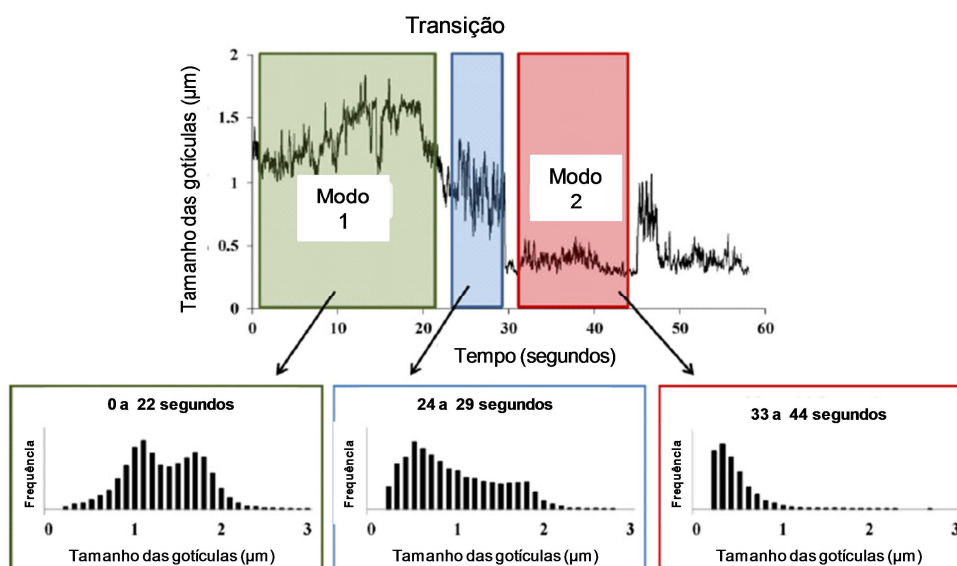
Figura 7 – Fonte de ionização *paper spray*: (A) Desenho esquemático do aparato utilizado e (B) Visualização da formação do *spray* no substrato com auxílio de um *laser*.

O mecanismo da ionização por *paper spray* já foi abordado na literatura por alguns autores que apontaram as variáveis mais críticas para o desenvolvimento de uma metodologia PS-MS robusta e confiável.

LIU *et al.* avaliaram o efeito da concentração da amostra, do volume de solvente, do tipo de substrato e da aplicação de um recobrimento de Politetrafluoretileno (PTFE) sobre o papel para prolongação do tempo de formação do *spray*. Foi observado um aumento de duração do *spray* ao se variar os parâmetros estudados, entretanto, a aplicação do recobrimento polimérico sobre o papel foi o efeito mais significativo dentre os fatores estudados. Também foram testados vários tipos de substratos, mostrando que o papel

cromatográfico apresentou melhor desempenho, em termos de razão sinal/ruído e também devido à menor presença de íons residuais nesse tipo de papel. Por fim, o nível do sinal obtido para a análise de cocaína em função do posicionamento do papel foi avaliado, obtendo-se altas intensidades em distâncias de até 0,6 cm da entrada do espectrômetro.<sup>71</sup>

ESPY *et al.* também realizaram estudos acerca do mecanismo do *paper spray* e observaram a formação de múltiplos *sprays* na ponta do papel (cones de Taylor). Esses são responsáveis pela grande capacidade de ionização dos analitos da fonte *paper spray*. Os autores observaram que parâmetros tais como a magnitude do potencial aplicado, o tipo de solvente e a distância do papel até a entrada do espectrômetro têm impacto direto na eficiência de ionização. Além disso, a disposição das microfibras também influencia no processo de ionização devido aos efeitos causados sobre o tamanho e a velocidade das gotículas do *spray*. Os autores identificaram dois modos distintos de formação do *spray* (Figura 8).<sup>72</sup>



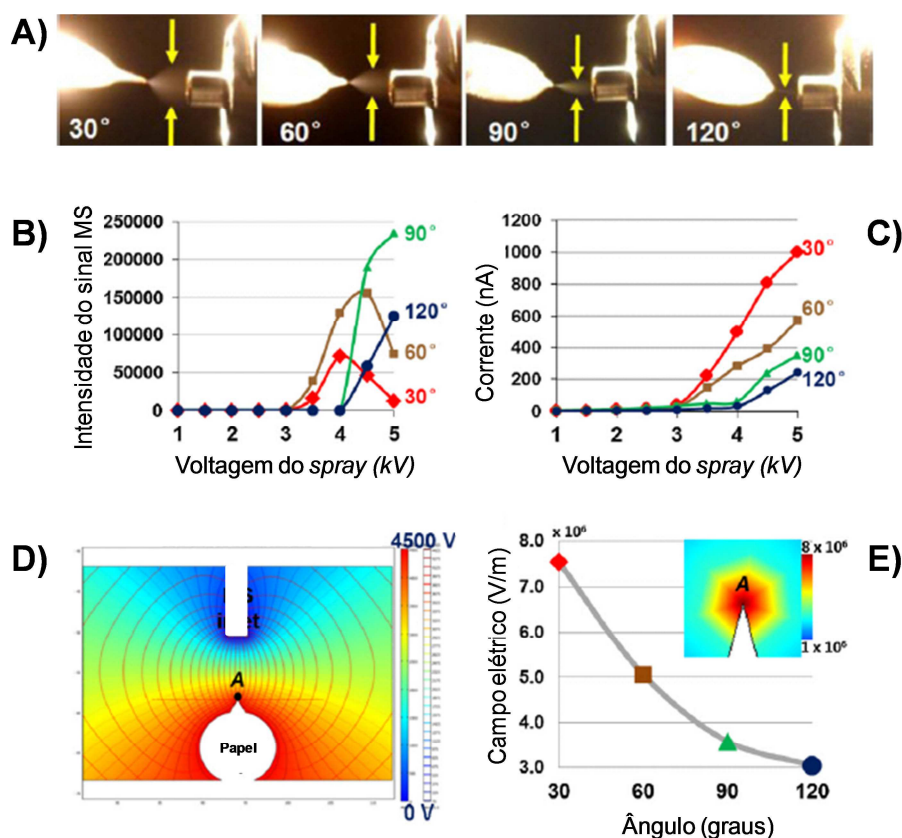
Fonte: Adaptado de ESPY *et al.*<sup>72</sup>

Figura 8 - Distribuição do tamanho das gotículas em no spray por PS-MS.

No Modo 1 de ionização os autores apontaram que o papel ainda possuía grande quantidade de solvente, o que favorece a formação dos múltiplos *sprays* contendo gotículas de diâmetros grandes (1 a 2 µm). Nesse modo, foram registradas baixas correntes de íons e o predomínio de analitos ionizados através de processos de transferência de prótons.<sup>72</sup>

O Modo 2 se inicia na medida em que o fluxo de solvente na ponta do papel diminui. Isso faz com que as gotículas sejam formadas por um único *spray* e possuam menor diâmetro ( $<0,5 \mu\text{m}$ ). Nesse modo observou-se a estabilização dos sinais do equipamento e um aumento considerável da corrente de íons, ambos causados pelo favorecimento da ionização dos analitos por múltiplos processos, tais como: transferência de prótons por mecanismos ácido-base, formação de cátions e ânions radicais e formação de adutos com espécies inorgânicas.<sup>72</sup>

YANG *et al.*, por outro lado, avaliaram o efeito da geometria do papel, do potencial aplicado e da corrente gerada sobre o formato do *spray* formado na ponta do substrato PS-MS e as respostas de intensidade de sinal (Figura 9).<sup>73</sup>



FONTE: Adaptado de YANG *et al.*<sup>73</sup>

Figura 9 – Efeitos da geometria do papel e do potencial aplicado em análises PS-MS: A) Variação dos diâmetros do cone de Taylor, B) Variação da intensidade dos sinais com o potencial aplicado, C) Variação da corrente com o potencial aplicado, D) Campo elétrico calculado para o papel com ângulo de 60° e E) Variação do campo elétrico.

Os autores observaram que o aumento dos ângulos dos vértices dos substratos triangulares provoca uma redução do diâmetro do *spray* (Fig. 9A) formado e requer o aumento do potencial aplicado para a formação do *spray* (Fig. 9B). Nesse trabalho também foi constatado que o aumento no potencial provoca a intensificação da corrente do *spray* devido ao maior acúmulo de cargas na ponta do substrato e à redução do diâmetro das gotículas (Fig. 9C). Os campos elétricos formados pelas cargas acumuladas foram determinados (Fig. 9D e 9E) pelos quais se constatou que o ângulo de 30° no vértice do papel provoca a maior densidade de cargas no vértice do papel responsável pela formação do *spray* e, conseqüente, ionização da amostra (Fig. 9E).<sup>73</sup>

Com relação às aplicações, o uso da ionização por *paper spray* têm possibilitado análises qualitativas e quantitativas de analitos presentes em matrizes complexas. Vários trabalhos na literatura abordam o emprego dessa técnica para análise de drogas em fluidos biológicos,<sup>70,71</sup> metabólitos em tecidos animais e vegetais,<sup>74,75</sup> discriminação de microrganismos,<sup>76</sup> falsificação de documentos,<sup>77</sup> inibidores de corrosão em estruturas metálicas,<sup>78</sup> monitoramento de reações químicas<sup>79</sup> e de corantes em cosméticos.<sup>80</sup> Essa técnica também tem recebido atenção para análise de contaminantes em alimentos, bem como na discriminação de alimentos e bebidas em função de suas diferentes origens e/ou qualidades.<sup>81-87</sup>

SOPARAWALLA *et al.* aplicaram a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* em conjunto com um espectrômetro de massas portátil para detecção de resíduos do agrotóxico tiobendazol em cascas de laranjas. As análises foram realizadas *in loco*, ou seja, no próprio ponto de venda. A detecção dos analitos a partir das cascas de laranjas foi alcançada utilizando um pedaço de papel de filtro umidificado com metanol, que posteriormente foi cortado na forma apropriada para a PS-MS. Não foi avaliada a possibilidade de análises quantitativas dos agrotóxicos.<sup>81</sup>

TAVERNA *et al.* analisaram diversos azo-corantes (vermelho Sudão I, II, III e IV e paranitranilina) em amostras de pimentas Chilli. Para isso, as amostras foram fortificadas com diferentes concentrações desses corantes e seus extratos foram obtidos com o uso de uma solução de acetonitrila/clorofórmio. Posteriormente, os extratos foram aplicados no papel cromatográfico para análise por PS-MS. A quantificação de todos os compostos foi realizada pelo uso de padrões internos deuterados. Foi possível detectar concentrações de até 1 ppm na matriz analisada.<sup>82</sup>

ZHANG *et al.* determinaram diversos contaminantes em alimentos, tais como beta-agonistas em carnes bovinas e suínas, melanina em leite, corantes em misturas de

pimentas, e ftalatos em bebidas esportivas. Curvas semi-quantitativas obtidas para esses contaminantes/adulterantes apresentaram ótimos ajustes e baixos limites de detecção. Os autores destacaram a importância de estudar a composição dos solventes empregados em PS-MS, visto que a solubilidade dos analitos presentes em cada matriz é fortemente influenciada pela escolha do solvente adequado.<sup>83</sup>

DENG e YANG foram os primeiros autores a aplicar a fonte *paper spray* para obtenção de *fingerprints* e tratá-los por métodos quimiométricos, buscando a diferenciação de amostras chás (ban-chá). Foram obtidos perfis no modo negativo contendo sinais referentes a ácidos orgânicos e saponinas triterpenóides. No modo positivo, os sinais majoritários corresponderam a aminoácidos e carboidratos. A partir dos perfis obtidos no modo negativo e usando análise de componentes principais (PCA), foi possível discriminar amostras de acordo com as datas de validade e provenientes de fabricantes diferentes.<sup>84</sup>

MAZZOTI *et al.* avaliaram a atividade anti-inflamatória de azeites de oliva usando a PS-MS. As amostras foram aplicadas na forma bruta sobre papel cromatográfico e seus analitos foram ionizados através de derivatizações de grupos aldeídos com metoxamina (presente no solvente utilizado para formar o *spray*). Curvas analíticas semi-quantitativas foram construídas com sinais referentes a fragmentações MS/MS dos analitos e usando adição de padrão interno. Os autores mostraram a viabilidade do método para a análise de azeites.<sup>85</sup>

GARRET *et al.* aplicaram a PS-MS combinada a ferramentas quimiométricas não supervisionadas (PCA e HCA) na classificação de cafés brasileiros. Os espectros de massas obtidos (modo positivo) apresentaram adutos de açúcares e aminoácidos protonados. Os autores obtiveram os espectros a partir dos extratos dessas amostras e também por meio da análise direta de grãos de café cortados na forma de lâminas triangulares (*coffee spray*). As amostras estudadas foram discriminadas de acordo com seus estados de origem (Bahia, Paraná e Rio de Janeiro).<sup>86</sup>

KIM e CHA propuseram uma técnica derivada da PS-MS, chamada *paper cone spray*, para a análise de alimentos (carnes, chás e fórmulas infantis) e medicamentos (formulações farmacêuticas) diretamente na forma sólida. Os autores apresentaram os perfis MS obtidos e identificaram os componentes característicos de cada amostra. Eles também apresentaram perspectivas para análises quantitativas utilizando essa técnica.<sup>87</sup>

Os métodos que utilizam análises de *fingerprints* por PS-MS são muito vantajosos devido à simplicidade e rapidez na aquisição dos espectros. A interpretação dos resultados, por outro lado, é mais laboriosa devido à grande quantidade de dados presentes

nos espectros obtidos. Portanto, a análise desses resultados requer o uso de métodos estatísticos multivariados, capazes de extrair maior quantidade de informações, além de facilitar a interpretação dos dados.

## **2.3 Quimiometria**

A quimiometria é uma disciplina que se desenvolveu em sintonia com o rápido avanço tecnológico de equipamentos analíticos e microcomputadores, ocorrido a partir da década de 1970. Esses aparelhos possibilitavam a rápida obtenção de respostas multivariadas a partir de uma simples medida e a grande quantidade de sinais gerados muitas vezes tornava inviável a interpretação convencional dos dados, que era feita até então utilizando modelos univariados.<sup>88</sup> Desde o seu surgimento, essa disciplina vem se desenvolvendo e seu uso tem se disseminado a muitas outras áreas do conhecimento, tais como a engenharia, biologia, física, ciências “ômicas” dentre outras.

A quimiometria se propõe a resolver problemas relacionados ao planejamento de experimentos, à otimização de condições de processos e também à extração e interpretação de informações químicas relevantes a partir de um conjunto de dados, por meio de métodos matemáticos e estatísticos.<sup>88</sup>

Os métodos mais utilizados para esse propósito podem ser classificados, de acordo com os objetivos da análise, em métodos de classificação não supervisionada, classificação supervisionada, calibração multivariada e resolução de curvas. Os métodos mais utilizados são a análise de componentes principais (PCA), em classificação não supervisionada, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e o SIMCA, em classificação supervisionada, o PLS, em calibração multivariada e o MCR e o PARAFAC, em resolução de curvas.<sup>88</sup> Essa dissertação, que tem como objetivo desenvolver modelos de classificação, utilizará os métodos PCA e PLS-DA.

### **2.3.1 Análise de componentes principais (PCA)**

A análise de componentes principais foi inicialmente proposta em 1901 por Karl Pearson, mas seu uso só obteve destaque a partir da década de 1930, após a publicação do trabalho de Hotteling que formalizou o método e o aplicou para análises multivariadas na área de psicologia. A PCA é um método não supervisionado de classificação, ou seja, apenas a natureza dos dados instrumentais será utilizada para se obter informações sobre o



seu comportamento. Por esse motivo, ela também pode ser categorizada como uma análise exploratória dos dados. A aplicação desse método permite descobrir e interpretar mais facilmente os padrões existentes nos dados, além de possibilitar a detecção de amostras com comportamento atípico.<sup>88</sup>

Esse método procura extrair as informações latentes contidas nos dados através de operações de autovalores e autovetores, responsáveis pela combinação das variáveis originais altamente correlacionadas para formação de novos fatores (ou componentes principais). Desse modo, é possível reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados sem que as relações existentes entre as amostras sejam afetadas.<sup>88</sup> Isso pode ser demonstrado observando-se a Figura 10, que esquematiza a interpretação geométrica de um modelo PCA hipotético.

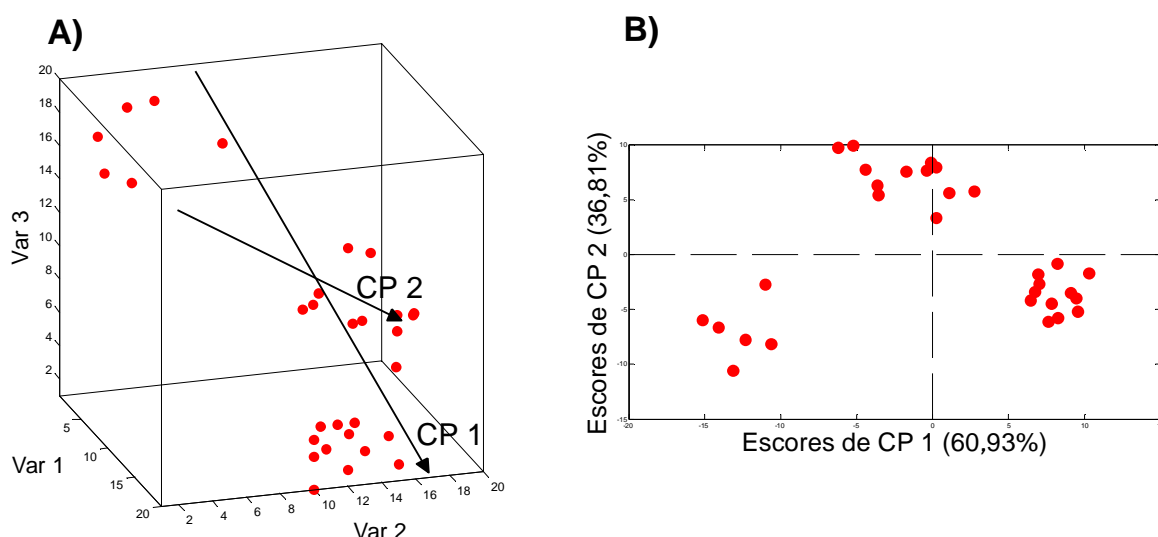


Figura 10 – Interpretação geométrica da PCA: A) representação das amostras simuladas em função de suas variáveis Var 1, Var 2 e Var 3 e B) representação dos escores das componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2), obtidas a partir da combinação linear das variáveis originais na análise PCA.

Um espaço hiperamostral formado por 3 variáveis (var 1, var 2 e var 3) contém as informações dessas amostras (pontos). Através de uma operação de mudança de bases nesse sistema de coordenadas, é possível projetar os dados das amostras em um plano formado pelas componentes principais CP1 e CP2. As coordenadas desses pontos nesses

eixos - denominadas escores - permitem visualizar a relação entre as amostras sem a perda de informações do sistema de coordenadas original, se essas componentes explicarem a maior parte da variância total.<sup>88</sup>

A interpretação de como as variáveis originais influenciam na discriminação dos escores, ou seja, das amostras originais, ocorrerá pela análise da influência dos pesos (*loadings*) de cada uma delas no novo sistema das componentes principais. Os pesos são determinados pelo cosseno dos ângulos formados entre os eixos de Var 1, Var 2 e Var 3, e os eixos das componentes principais (CP1 e CP2).<sup>88</sup>

Matematicamente, a PCA pode ser explicada de acordo com a Equação 1 a seguir. A matriz  $\mathbf{X}$  é decomposta em produtos de vetores escores ( $\mathbf{t}$ ) e pesos ( $\mathbf{l}$ ), cada produto correspondendo a uma componente principal selecionada. A seleção do número apropriado de componentes principais se dá a partir da determinação do pseudoposto do conjunto de dados. Além disso, obtêm-se uma matriz de resíduos  $\mathbf{E}$ , que representa as componentes principais que não foram selecionadas e que irão descrever informações aleatórias (ruídos instrumentais) ou irrelevantes, mas que apresentam importância prática para a detecção de amostras anômalas.<sup>88</sup>

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X} \end{bmatrix} = [\hat{\mathbf{X}}] + \mathbf{E} = \begin{bmatrix} \mathbf{l}_1^T \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{t}_1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{l}_2^T \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{t}_2 \end{bmatrix} + \dots + \mathbf{E} \quad \text{Equação 1}$$

Por definição, as componentes principais são traçadas nas direções de maior variabilidade dos dados. Desse modo, descreve-se a maior quantidade da informação original utilizando-se poucas componentes principais. Essa variância explicada é expressa a partir dos valores do quadrado dos autovalores calculados para cada CP. A análise da variância explicada por cada CP também é útil para ajudar a definir o número ideal de CP ou o pseudoposto da matriz.<sup>88</sup>

Outra propriedade importante das componentes principais é que elas são ortogonais entre si, ou seja, independentes. Desse modo, a interpretação dos resultados é facilitada, porque a análise dos *loadings* permitirá extrair maiores informações referente à identificação de fenômenos ou características independentes, que são responsáveis pelo agrupamento das amostras.<sup>88</sup>

### 2.3.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*PLS-DA*) é um método supervisionado de classificação, ou seja, as informações referentes à atribuição das amostras para as classes pré-determinadas também são consideradas durante a análise dos dados analíticos instrumentais. Ela foi uma adaptação baseada no método de calibração multivariada dos mínimos quadrados parciais (PLS), o qual foi inicialmente proposto por Herman Wold, na década de 1960, para aplicações em econometria. Posteriormente, o PLS foi aplicado na análise de dados de origem química por seu filho Svante Wold, na década de 1970.<sup>88</sup> Entretanto, a ideia da aplicação do método PLS para análises discriminantes, embora já tivesse sido mencionada por outros trabalhos nos anos anteriores, só foi formalizada a partir da publicação do artigo de BARKER e RAYENS, em 2003.<sup>89</sup>

No método PLS-DA (Fig. 11), uma matriz  $X$ , que contém as variáveis independentes, ou seja, os dados espectrais, e um vetor  $y$  (ou matriz  $Y$ ), que contém as variáveis categóricas, ou seja, os valores codificados que indicam as classes das amostras são decompostos simultaneamente em variáveis latentes. Essas variáveis latentes são responsáveis por determinar um novo hiperespaço, o qual contém as informações das amostras originais, e permite traçar uma delimitação capaz de discriminar as amostras.<sup>90</sup>

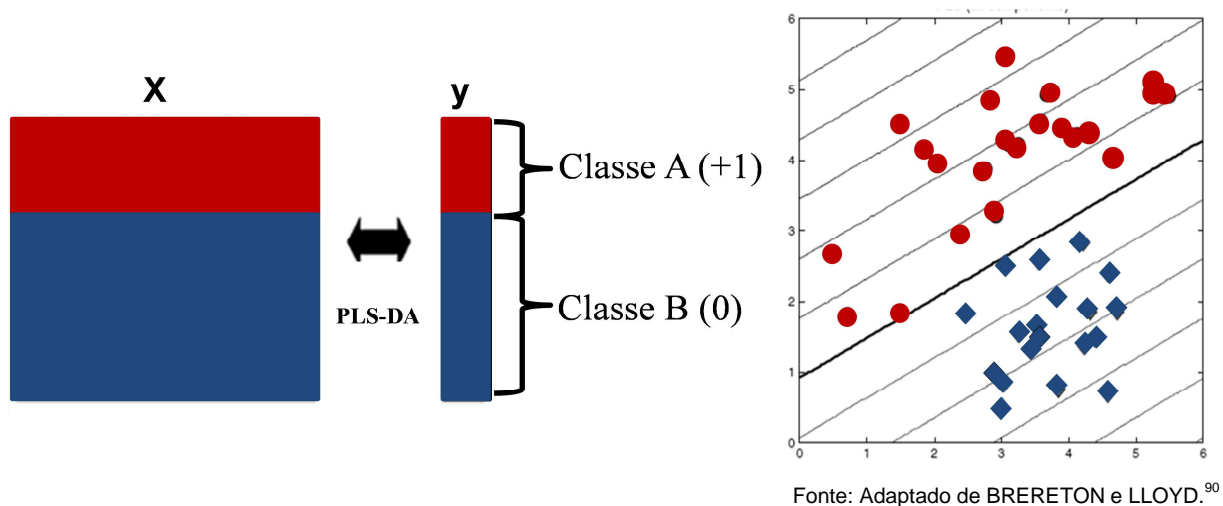


Figura 11 – Princípio da análise PLS-DA: A) representação dos conjuntos de variáveis espectrais ( $X$ ) e categóricas ( $y$ ) e B) discriminação das amostras de acordo com as classes pré-definidas pela função discriminante determinada pelo método PLS-DA.

Existem duas variantes do método PLS-DA, assim como no método PLS. No método PLS1-DA, existe apenas uma possibilidade de atribuição de classe, pertence ou não pertence, e as informações estão codificadas em valores binários (1 ou 0) contidos no vetor  $\mathbf{y}$ . Já o método PLS2-DA permite a discriminação de várias classes simultaneamente, sendo que cada coluna de uma matriz  $\mathbf{Y}$  conterà a codificação binária para a atribuição da respectiva classe de interesse.<sup>88</sup>

Para a construção de modelos supervisionados são utilizados dois conjuntos de amostras distintos. O conjunto de treinamento contém os dados das amostras que serão utilizadas para a construção do modelo. Já o conjunto teste contém amostras que não foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros do modelo e serão utilizadas para verificar o seu desempenho de maneira independente.<sup>88</sup>

A base matemática do método PLS1-DA pode ser resumida nas Equações 2 e 3 a seguir, nas quais  $\mathbf{X}$  é matriz que contém os dados instrumentais,  $\mathbf{y}$  é o vetor contendo as atribuições das amostras codificadas,  $\mathbf{T}$  é a matriz de escores,  $\mathbf{L}$  e  $\mathbf{q}$  contêm os pesos, e  $\mathbf{E}$  e  $\mathbf{f}$  são as matrizes dos resíduos, relativas a  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$ , respectivamente.<sup>88</sup>

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{L} + \mathbf{E} \quad \text{Equação 2}$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{T}\mathbf{q} + \mathbf{f} \quad \text{Equação 3}$$

Além do fato de utilizar o vetor  $\mathbf{y}$  contendo as informações codificadas das amostras (característica de um método supervisionado), outro aspecto que diferencia a análise de fatores realizada pela PLS-DA daquela realizada pela PCA é que os pesos da matriz  $\mathbf{X}$  não são ortogonais, o que possibilita a obtenção da máxima variância entre os escores de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$ . Consequentemente, as variáveis latentes do modelo não estarão necessariamente modeladas nas direções de máxima variabilidade da matriz  $\mathbf{X}$ . Isso faz com que a variância explicada pelas sucessivas variáveis latentes não seja necessariamente decrescente. Entretanto, isso também faz com que a eficácia para realização de análises discriminantes seja maior.<sup>90</sup>

Na decomposição de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$ , visando-se obter a máxima variância entre esses conjuntos, introduz-se nos cálculos uma matriz denominada matriz fator-peso (*weights*),  $\mathbf{W}$ . Cada linha dessa matriz é composta pelos coeficientes de regressão dos vetores-colunas da matriz  $\mathbf{X}$  em relação ao vetor  $\mathbf{y}$ , determinadas durante o cálculo de cada variável latente. Além de ser empregada durante o cálculo dos escores e pesos das matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$ , a matriz

**W** também é utilizada para o cálculo do vetor de regressão **b** (Equação 4) do modelo PLS-DA, junto com a matriz de pesos **L** de **X** e o vetor de pesos **q**, de **y**.<sup>88</sup>

$$\mathbf{b} = \mathbf{W}(\mathbf{L}^T\mathbf{W})^{-1}\mathbf{q} \quad \text{Equação 4}$$

O vetor de regressão **b** determinará a equação do plano contido no hiperespaço formado pelas variáveis latentes do modelo, sendo utilizado para a previsão dos valores categóricos das amostras utilizadas na sua construção e também das novas amostras desconhecidas a serem previstas/atribuídas. Os valores previstos, contidos em **c** (Equação 5), estarão próximos ao intervalo determinado pelos códigos binários indicados no vetor **y**. O vetor **f** contém os erros entre os valores de referência e previstos, e também pode ser utilizado para a detecção de amostras anômalas.<sup>90</sup>

$$\mathbf{c} = \mathbf{bX} + \mathbf{f} \quad \text{Equação 5}$$

Após a previsão dos valores em **c**, os valores previstos para as amostras devem ser classificados utilizando-se um valor limite que seja capaz de delimitar as classes corretamente (*threshold*). Na maioria das aplicações de PLS-DA, esse limite de decisão entre as classes é determinado por meio da estatística Bayesiana e da teoria de probabilidade.<sup>88</sup>

O teorema de Bayes relaciona a probabilidade condicional de que eventos dependentes ocorram, ou seja, é possível determinar a probabilidade de um evento A ocorrer após um evento B, desde que sejam conhecidas as probabilidades *a priori* de ocorrência dos eventos isoladamente e uma regra capaz de estimar a probabilidade de que um dos eventos ocorra em decorrência do anterior.<sup>91</sup>

Dadas as classe A e B, e os valores de previstos para ambas pelo método PLS-DA, a probabilidade  $P(A|z)$  de uma amostra pertencer à classe A é igual ao produto da probabilidade *a priori* de uma amostra pertencer à classe A -  $P(A)$  – e da probabilidade *a posteriori* da classe A conter uma amostra  $y$  prevista -  $P(z|A)$  - (Equação 6). O denominador da equação abaixo é igual a um e representa a probabilidade  $P(z)$  de uma amostra pertencer à classe A ou classe B. O mesmo tratamento descrito acima é dado para a classe complementar B.<sup>88</sup>

$$P(A | \hat{z}_1) = \frac{P(\hat{z}_1 | A) \times P(A)}{P(\hat{z}_1 | A) \times P(A) + P(\hat{z}_1 | B) \times P(B)} \quad \text{Equação 6}$$

A probabilidade *a priori*  $P(A)$  de uma amostra pertencer a uma classe A será dada pela razão entre o número de amostras pertencerem a essa classe ( $I_A$ ) dividido pelo número total de amostras do conjunto de calibração/treinamento,  $I_A + I_B$  (Equação 7). Já a probabilidade *a posteriori*  $P(z|A)$  da classe A conter um valor  $z$  previsto pode ser estimada a partir da definição de uma função densidade de probabilidade calculada a partir do conjunto de valores  $z$  previstos (Equação 8). Para esse cálculo, também são estimados o desvio padrão ( $S_A$ ) e a média aritmética ( $\bar{z}$ ) desse conjunto. Esse mesmo tratamento também é realizado para a classe B.<sup>88</sup>

$$P(A) = \frac{I_A}{I_A + I_B} \quad \text{Equação 7}$$

$$P(\hat{z}_1 | A) = \frac{1}{S_A \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{\hat{z}_1 - \bar{z}}{S_A} \right)^2} \quad \text{Equação 8}$$

O limite de decisão será dado quando as probabilidades das classes A e B conterem o valor  $z$  forem iguais. O valor ideal para delimitar as classes A e B é definido quando  $P(A|z)$  e  $P(B|z)$  são iguais. Considerando esse fato e substituindo-se as Equações 7 e 8 no teorema de Bayes (Equação 9), é possível determinar o valor do limite de decisão isolando-se o termo  $\hat{z}_i$ .<sup>88,92</sup>

$$P(\hat{z}_1 | A) \times P(A) = P(\hat{z}_1 | B) \times P(B) \quad \text{Equação 9}$$

Por fim, o número ideal de variáveis latentes do modelo deve ser determinado a partir da validação cruzada. A ideia dessa abordagem é retirar uma amostra, ou um grupo de amostras, do conjunto de treinamento durante a construção do modelo e prevê-las como se fossem amostras desconhecidas, utilizando-se diferentes números de variáveis latentes. Após a retirada de todas as amostras, os erros de classificação de validação cruzada (CVCE, *cross validation classification error*) obtidos para as variáveis latentes estudadas são comparados e o menor valor é escolhido como número ideal. Desse modo, maximiza-se a quantidade de informação sistemática dos dados e minimiza-se a quantidade de informação

espúria e ruídos no modelo. O método ideal para validação cruzada dependerá do tamanho do conjunto de dados e de sua organização.<sup>88</sup>

### 2.3.2.1 Algoritmo Kennard-Stone

A construção de um modelo de regressão confiável, representativo e robusto requer a seleção adequada das amostras de calibração/treinamento, que representem toda a variabilidade do conjunto de dados. Portanto, o critério utilizado para a definição dessas amostras é um fator chave para a análise. O algoritmo Kennard-Stone foi apresentado em 1969 e vem sendo utilizado nos últimos anos como a principal abordagem para a escolha das amostras que são utilizadas na construção de modelos de regressão multivariados.<sup>93</sup>

Esse algoritmo utiliza um critério sistemático baseado no cálculo das distâncias Euclidianas entre as amostras, considerando o hiperespaço definido pelas variáveis originais do conjunto de dados. As duas primeiras amostras selecionadas para o conjunto de treinamento/calibração serão aquelas que apresentam a maior e a menor distância em relação à origem multivariada dos dados (o ponto médio central). Em seguida, a terceira amostra selecionada será aquela que apresentar a maior distância em relação às amostras já selecionadas. Esse processo se repete até que o número de amostras pré-definido pelo analista (convencionalmente, 2/3 do total de amostras) seja alcançado.<sup>93</sup>

### 2.3.2.2 VIP escores

A importância da variável na projeção (*Variable importance on projection* - VIP scores) é um vetor informativo calculado para estimar a relevância de cada variável na construção do modelo.<sup>94</sup> O valor do VIP escore de uma variável J ( $VIP_j$ ) é dado pela Equação 10.

$$VIP_j = \sqrt{d \frac{\sum_{k=1}^h v_k (w_{jk})^2}{\sum_{k=1}^h v_k}} \quad \text{Equação 10}$$

Onde  $d$  é o número de variáveis do conjunto  $X$ ,  $h$  é o número de variáveis latentes do modelo,  $w$  é o vetor fator-peso (*weight*) entre o vetor-coluna de  $X_j$  e o vetor  $y$ , e  $v_k$  representa a variância de  $X$ , calculada a partir dos escores e dos resultados das previsões  $y$ .<sup>94</sup>

Esse vetor é de grande relevância para a interpretação dos modelos e pode ser usado na seleção de variáveis, pois a média dos quadrados dos valores de VIP scores de todas as variáveis do modelo é igual a um. Por isso, esse valor é utilizado como critério para a “regra do maior que 1”, que aponta as variáveis mais relevantes para a construção do modelo.<sup>94</sup>

### 2.3.3 Seleção dos preditores ordenados (OPS)

O uso da seleção de variáveis tem como objetivo a melhora do ajuste dos dados, a redução dos erros de previsão ou classificação e o aumento na interpretabilidade dos modelos gerados. Grande parte dos métodos existentes, tais como iPLS (PLS em intervalos), siPLS (PLS em intervalos sinérgicos), dentre outros, foram desenvolvidos para a análise de espectros contínuos, sendo pouco indicados para a análise de dados discretos, tais como os provenientes de espectros de massas.<sup>95</sup>

O método de seleção de preditores ordenados (OPS) é capaz de analisar dados de diversas naturezas e foi desenvolvido por TEÓFILO *et al.*, em 2009. Ele é tido como promissor para a análise de variáveis discretas, pois não se limita apenas à análise direta de vetores informativos, prática que é a mais utilizada para a seleção de variáveis em análises quimiométricas.<sup>95</sup> O método OPS também utiliza um algoritmo de buscas que procura, por meio de sucessivas análises de subconjuntos formados pelas variáveis diferenciadas pelos vetores informativos, construir os modelos que apresentem os menores erros de previsão.<sup>96</sup>

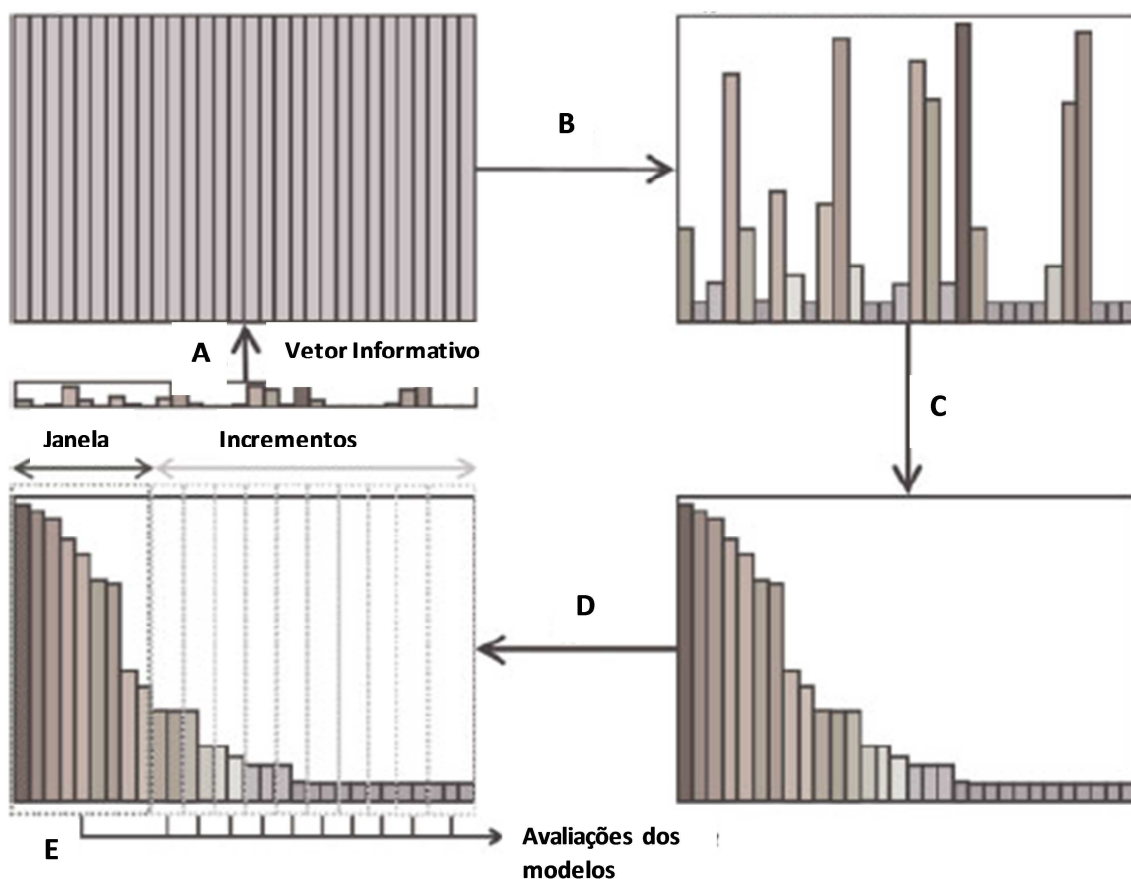
Os vetores informativos são estimados a partir de parâmetros do modelo e podem ser usados tanto para sua interpretação (espectral) quanto para seleção de variáveis. Os vetores de regressão e VIP scores (VIP), mencionados anteriormente, são exemplos desses vetores.<sup>95</sup>

Outro exemplo é o vetor do sinal analítico líquido (NAS, *net analyte signal*), cujo conceito foi introduzido por Morgan na década de 1970.<sup>88,97</sup> Esse vetor expressa a real variabilidade capturada pelo modelo proveniente exclusivamente dos componentes das amostras e exclui toda a informação referente a ruídos e interferentes. No método OPS, esses dois e mais outros cinco vetores informativos, ou combinações deles, são usados na inicialização. São eles os vetores pesos/*loadings* (LOA), produto da covariância (CovProc), resíduos (SqREs), razão sinal-ruído (Stn) e correlação **X-y** (Corr **X-y**).<sup>95</sup>

A Figura 12 ilustra o princípio do OPS. No primeiro passo (A), um modelo supervisionado é gerado para a construção dos vetores informativos a serem avaliados. Em



seguida (B), as variáveis originais são sistematicamente diferenciadas de acordo com os valores fornecidos pelo vetor informativo. Na terceira etapa (C), as variáveis originais são ordenadas em ordem decrescente. Por fim (D), um conjunto inicial pré-estabelecido das variáveis (janela) e novos conjuntos formados a partir do acréscimo sucessivo das variáveis restantes são utilizados para gerar novos modelos PLS-DA.<sup>95</sup>



Fonte: Adaptado de TEÓFILO, R. F. *et al.*<sup>95</sup>

Figura 12 – Ilustração do método OPS: A) construção do vetor informativo, B) diferenciação das variáveis segundo a atribuição dada pelo vetor informativo selecionado, C) ordenamento das variáveis diferenciadas, D) definição dos subconjuntos formados pela janela de variáveis e seus incrementos e E) definição do subconjunto de variáveis ideal segundo critérios do método OPS ( $R_{CV}$ , RMSECV e número de variáveis selecionadas).

Os resultados dos modelos gerados para cada conjunto são registrados para a posterior seleção do conjunto responsável por gerar o modelo com menores valores de erro da validação cruzada (RMSECV) e maior correlação entre os valores de  $y$  de referência *versus* previstos ( $R_{CV}$ ). Esses parâmetros medem a qualidade do ajuste do modelo e são usados como critérios de otimização.<sup>95</sup>

### 2.3.4 Validação de métodos qualitativos

A validação de métodos analíticos é importante por garantir que os resultados obtidos por uma determinada metodologia são confiáveis para os fins aos quais se destinam. No caso de análises qualitativas, a validação se baseia no cálculo de figuras de mérito específicas (diferentes das quantitativas), baseadas nos resultados das classificações das amostras (corretas e incorretas).

#### 2.3.4.1 Figuras de mérito calculadas a partir da Tabela de contingência

A veracidade de métodos de classificação pode ser atestada partir dos cálculos das Figuras de mérito baseadas nos valores dispostos nas Tabelas de contingência resultantes (Tabela 4). Nessas Tabelas, os resultados das classificações das amostras são apresentados da seguinte forma: número de amostras classificadas corretamente como verdadeiras (VP), número de amostras classificadas corretamente como falsas (VN), número de amostras classificadas erroneamente como verdadeiras (FP) e número de amostras classificadas erroneamente como falsas (FN).<sup>98</sup>

Tabela 4 – Configuração típica da tabela de contingência.

		<b>Resultado <i>real</i></b>	
		<i>Verdadeiro</i>	<i>Falso</i>
<b>Resultado previsto</b>	<i>Verdadeiro</i>	VP	FP
	<i>Falso</i>	FN	VN

A sensibilidade – Sen (Equação 11) - e a especificidade – Esp (Equação 12) - representam as taxas de classificações corretas, VP e VN, e idealmente, ambos os seus valores devem ser tão altos quanto possíveis (máximo de 100%). Já as taxas de falso

negativos – TFN (Equação 13) - e de falso positivos – TFP (Equação 14) - representam a razão de amostras classificadas erroneamente e devem ser minimizados (preferencialmente igual a 0%).<sup>98</sup>

$$Sen = \frac{VP}{VP + FN} \quad \text{Equação 11} \qquad Esp = \frac{VN}{VN + FP} \quad \text{Equação 12}$$

$$TFN = \frac{FN}{VP + FN} \quad \text{Equação 13} \qquad TFP = \frac{FP}{VN + FP} \quad \text{Equação 14}$$

Um modo mais abrangente de avaliação dos resultados pode ser expresso através dos cálculos da exatidão - Exa (Equação 15) - e confiabilidade - Con (Equação 16). A exatidão representa a taxa de classificações corretas considerando-se o número total de amostras e a confiabilidade indica o desempenho do método para a classificação das amostras, considerando as previsões corretas de cada classe independentemente. Ambos os parâmetros devem ter o maior valor possível (100%).<sup>98</sup>

$$Exa = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \quad \text{Equação 15}$$

$$Con = Sen + Esp - 1 \quad \text{Equação 16}$$

#### 2.3.4.2 Área sobre a curva de receptores característicos operacionais (AUROC)

O desempenho de modelos de classificação também pode ser avaliado através dos valores das áreas sobre a curva dos receptores operacionais característicos (*Area Under Receiver Operating Characteristcs* - AUROC).<sup>99</sup>

As curvas ROC começaram a ser utilizadas a partir da Segunda Guerra Mundial para avaliar qualitativamente o desempenho dos operadores de radares (chamados receptores operacionais) na diferenciação entre os sinais eletrônicos e os ruídos detectados. Nas décadas seguintes, o uso dessas curvas foi difundido na análise de outros métodos de classificação empregados em outras áreas do conhecimento.<sup>99</sup>

Essas curvas são construídas graficando-se os valores das sensibilidades e das taxas de falsos positivos (1 – Especificidade), obtidos por diferentes valores de limites de

decisão do método qualitativo. A Figura 13 ilustra um exemplo de uma curva AUROC para um modelo de classificação.<sup>99</sup>

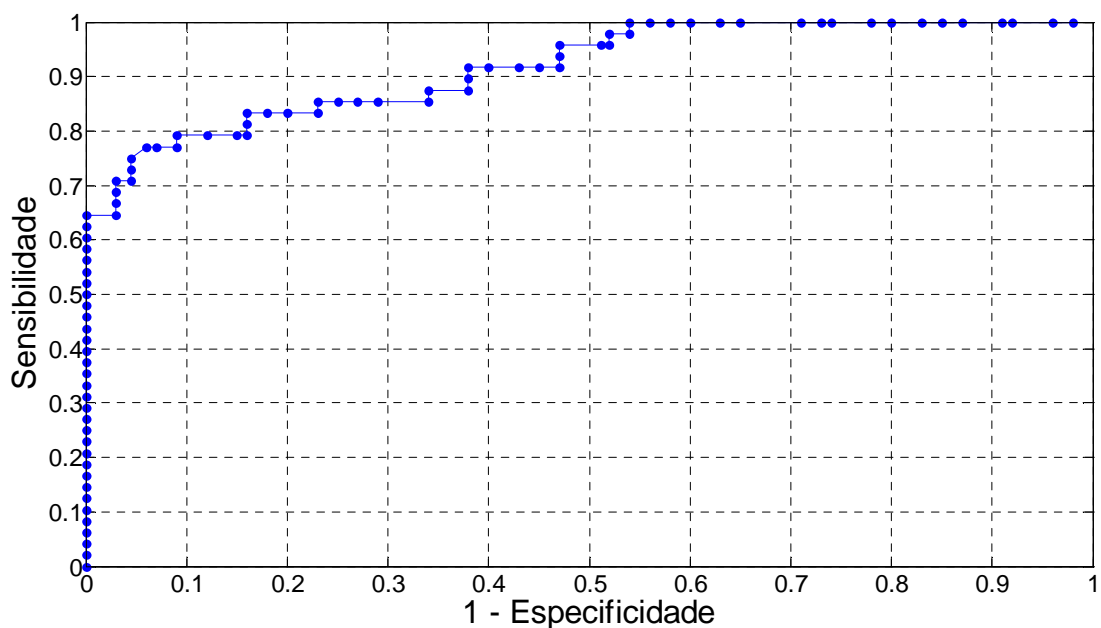


Figura 13 – Exemplo de curva ROC.

A determinação do valor da área sob essa curva é um método simples e rápido, que indica o desempenho de análise qualitativa de classificação em discriminar as classes estudadas. Em uma metodologia que avalia se uma determinada amostra pertencente à classe A (verdadeira) ou à classe B (falso), o valor da AUROC pode ser interpretado como a probabilidade de uma amostra verdadeira ser classificada como pertencente à classe A, em comparação a uma amostra falsa (pertencente à B) ser prevista como pertencente à classe A.<sup>99</sup>

Os valores de AUROC próximos a 1 indicarão a existência de limites de decisão entre as classes capazes de discriminá-las com o máximo de desempenho, ou seja, resultarão em valores de sensibilidade próximos a 100% e da taxa de falsos positivos próximos a 0%. Já os valores de AUROC iguais ou menores a 0,5 indicam a inviabilidade do método, pois nesse caso, a probabilidade de se obter verdadeiros positivos é igual ou menor a probabilidade de se obter falsos positivos para uma determinada classe.<sup>99</sup>

### 2.3.4.3 Medidas de Precisão - Acordância e concordância

A avaliação da precisão de métodos analíticos comumente é realizada através de cálculos de FOM que se baseiam nos valores previstos para replicatas de uma determinada amostra ou padrão, em condições específicas de análise. Por exemplo, a repetibilidade é calculada a partir de amostras analisadas nas mesmas condições, mesmo equipamento e pelo mesmo analista. Já a reprodutibilidade é determinada a partir dos resultados obtidos nas mesmas condições, mas em equipamentos, analistas ou períodos diferentes. Entretanto, no caso de métodos de classificação, essas FOM não se aplicam, visto os resultados obtidos expressam apenas a informação qualitativa que indica se a amostra pertence ou não a uma determinada classe.<sup>100</sup>

Para contornar essa limitação, LANGTON *et al.* formularam FOM capazes de estimar a precisão de métodos qualitativos, baseadas em cálculos probabilísticos e análise combinatória dos resultados de classificações de replicatas de amostras obtidas em condições semelhantes. Essas FOM são a acordância (ACO) e a concordância (CONC).<sup>100</sup>

A ACO é uma FOM análoga à repetibilidade e expressa a probabilidade de se obter duas classificações idênticas para replicatas de uma determinada amostra. O seu cálculo é feito a partir da Equação 17, na qual um número  $r$  de replicatas da amostra e do número  $n$  de classificações corretas a partir do método analítico.<sup>100</sup>

$$ACO = \frac{[r(r-1) + (n-r)(n-r-1)]}{n(n-1)} \quad \text{Equação 17}$$

Já a CONC (Equação 18) é análoga à reprodutibilidade (ou precisão intermediária, caso as variáveis do estudo não sejam compatíveis) e expressa a probabilidade de se obter dois resultados idênticos para replicatas de uma determinada amostra. Nesse caso, um número  $r$  de replicatas de uma determinada amostra é realizado em  $b$  dias ou laboratórios diferentes e o número  $n$  de classificações corretas são determinados. Outro parâmetro utilizado para o cálculo é a média dos valores de acordância calculadas a partir dos resultados dos  $b$  dias ou laboratórios ( $ACO_m$ ).<sup>100</sup>

$$CONC = \frac{[2r(r-nb) + nb(nb-1) - ACO_m nb(n-1)]}{n^2 b(b-1)} \quad \text{Equação 18}$$

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Amostras

Um total de 141 cervejas comercializadas em garrafas retornáveis de 600 mL foi adquirido em bares e distribuidoras de bebidas da região metropolitana de Belo Horizonte, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 – Fabricantes, marcas e número de amostras das cervejas adquiridas.

<b>Cervejaria</b>	<b>Marca</b>	<b>Lotes</b>	<b>Número de garrafas</b>
Ambev	Antarctica *	10	24
Ambev	Brahma *	10	24
Ambev	Skol *	10	24
Brasil Kirin	Cintra	5	14
Brasil Kirin	Glacial	5	14
Grupo Petrópolis	Lokal	5	14
Grupo Petrópolis	Crystal	5	13
Cervejaria Krill	A Outra	5	14

\* Cervejas que apresentam maior valor comercial.

Para cada marca de cerveja analisada nesse estudo, foram obtidas amostras fabricadas em lotes distintos. Essa proposta tem como finalidade incluir possíveis variações na composição química dessas bebidas devido a diferentes condições de fabricação e estocagem às quais cada lote esteve submetido até o momento do estudo. A inclusão dessas variações nos modelos quimiométricos teve como propósito torná-los mais robustos.

As amostras estudadas pertencem a oito marcas, bastante populares, que frequentemente são citadas em casos de apreensões de cervejas falsificadas. Essas cervejas são fabricadas por quatro grandes cervejarias nacionais, sendo aquelas fabricadas pela Ambev (Antarctica, Brahma e Skol) o grande alvo dessa prática devido aos seus maiores valores comerciais em relação às demais marcas. A Figura 14 mostra os rótulos das marcas de cervejas incluídas nesse estudo e destaca a semelhança entre os vasilhames de 600 mL, um dos aspectos que encorajam a prática de falsificação por não oferecer evidências para diferenciação.



Figura 14 – Marcas das cervejas estudadas.

### 3.2 Materiais e reagentes

Metanol grau HPLC, adquirido da J.T. Baker Chemicals (Center Valley, Pensilvânia, EUA), foi utilizado como solvente para execução das análises por PS-MS. Como substrato para aplicação das amostras na fonte de ionização *paper spray* foi utilizado papel cromatográfico 1 CHR, adquirido de Whatman (Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Esse papel foi cortado na forma de triângulos equiláteros com dimensões de 1,5 centímetros, com auxílio de uma tesoura.

### 3.3 Instrumentação

Para desgaseificação das amostras foi utilizado um banho ultrassônico modelo Unique Ultra Cleaner 1400 A (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). Os espectros de massas foram adquiridos em um espectrômetro Thermo Fisher LCQ FLEET com analisador de massas de baixa resolução do tipo *ion trap* (San Jose, Califórnia, EUA). A fonte de ionização *paper spray* foi construída no laboratório e consiste em um clipe metálico do tipo jacaré, ligado a um fio de cobre conectado à fonte de potencial do espectrômetro de massas. Esse aparato foi mantido por um suporte universal contendo uma plataforma móvel, que permite o ajuste fino do posicionamento do papel (nas direções x, y e z) em relação à entrada do equipamento. A Figura 15 mostra o aparato utilizado para a análise PS-MS de cervejas brasileiras.

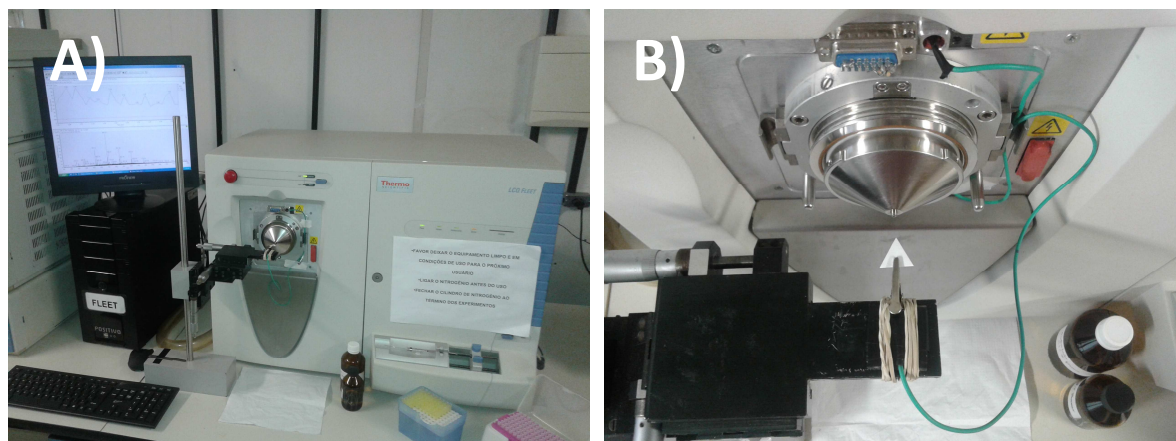


Figura 15 - Aparato instrumental utilizado para obtenção dos espectros PS-MS: A) modelo LCQ FLEET da Thermo Fisher com analisador do tipo *ion trap* e B) Detalhes da fonte de ionização *paper spray*.

As condições experimentais do espectrômetro de massas com a fonte *paper spray* foram definidas através da otimização de diversos parâmetros, tais como: dimensões e tipo de papel utilizado como substrato, composição e volume do solvente, posicionamento do papel em relação à entrada do espectrômetro, magnitude da diferença de potencial aplicado, volume de amostra, temperatura do capilar e modo de aquisição dos espectros (positivo ou negativo). As condições otimizadas utilizadas para a análise de cervejas foram: potencial do *paper spray* de +6,0 kV (modo positivo) e -4,0 kV (modo negativo); potencial do capilar de 40 V; potencial das lentes de 120 V; temperatura do capilar de 350°C; distância entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas de 1,0 cm e faixa de massas de 100-1800  $m/z$ .

As análises foram executadas em sequência aleatória em relação às classes das amostras, e em triplicata. Cerca de 50 mL de amostra foram transferidas para frascos âmbar e desgaseificadas utilizando o banho ultrassônico por 15 minutos. Em seguida, alíquotas de 2,0  $\mu\text{L}$  foram transferidas para os triângulos de papel mantidos na frente da entrada do MS pelo conector de cobre ligado à fonte de alta tensão. Por fim, um volume de 40,0  $\mu\text{L}$  de metanol foi aplicado sobre o papel e a fonte de potencial foi ligada para aquisição dos espectros pelo software Thermo Fisher Scientific Xcalibur 2.2 SP1 (San Jose, Califórnia, EUA).



### 3.4 Métodos Quimiométricos

A análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram executadas no *software* MATLAB, versão 7.9.0.529 (Mathworks, Natick, Massachusetts, EUA), com o auxílio do pacote (*toolbox*) PLS Toolbox, versão 5.2.2 (Eigenvectors Research, Manson, Washington, EUA).

Ainda no ambiente computacional MATLAB, foram utilizadas as seguintes rotinas: (A) Kennard-Stone disponibilizado pelo Dr. Michal Daszykowski (Universidade de Silesia, Cracóvia, Polônia) e (B) Seleção de Variáveis por preditores ordenados – OPS, disponibilizado pelos Profs. Reinaldo F. Teófilo (UFV) e Márcia M. C. Ferreira (UNICAMP).

#### 3.4.1 Modelo PCA

Os espectros de massas das cervejas foram dispostos em uma matriz **X** (141 x 1701), na qual as amostras estão nas linhas e a intensidade relativa de cada razão *m/z* foi arranjada nas colunas. Essa matriz foi analisada pelo método PCA, sendo os dados centrados na média como forma de pré-processamento.

#### 3.4.2 Modelos PLS-DA

Para construção do modelo PLS-DA, além da matriz **X**, também foi utilizado um vetor **y** (141x1), contendo as informações codificadas de atribuição de classe. As amostras das marcas de cervejas mais caras e que são alvo das falsificações (Antarctica, Brahma e Skol) foram modeladas conjuntamente e receberam atribuições iguais a 1. As amostras de marcas com menores valores comerciais (Cintra, Crystal, Glacial, Lokal e A outra), utilizadas nesse tipo de fraude, receberam atribuição igual a 0.

Ainda na construção do modelo PLS-DA utilizou-se o algoritmo Kennard-Stone (para o conjunto de espectros de cada marca de cerveja isoladamente) para selecionar de maneira sistemática cerca de 2/3 das amostras para o conjunto de treinamento e 1/3 para o conjunto teste. A matriz **X** e o vetor **y** foram centrados na média. A validação cruzada foi realizada pelo método de subconjuntos aleatorizados, utilizando 10 divisões e 10 iterações.

### 3.4.3 OPS

Os valores de tamanhos de janela e de incrementos de variáveis, ambos utilizados para iniciação do método OPS, foram respectivamente definidos como 10 e 5. Todos os vetores informativos gerados pelo OPS (Regressão, Correlação **X-y**, Resíduos, VIP scores, CovProc, sinal analítico líquido, pesos e Sinal-ruído) e suas combinações binárias foram testados, de modo a buscar um modelo otimizado com baixo valor na soma quadrática dos erros da validação cruzada (RMSECV), alto coeficiente de correlação ( $R_{CV}$ ) e um menor número de variáveis selecionadas.

### 3.4.4 Figuras de mérito para validação dos modelos PLS-DA

A partir da Tabela de contingência gerada pelo modelo PLS-DA, calculou-se as figuras de mérito taxa de falso negativos (TFN), taxa de falso positivos (TFP), taxa de verdadeiro positivos ou sensibilidade (SEN), taxa de verdadeiro negativos ou especificidade (ESP), exatidão (EXA) e confiabilidade (CON). As medidas de áreas sob as curvas ROC foram realizadas usando o PLS Toolbox, após a construção dos modelos.

Por fim, calcularam-se a acordância (ACO) e a concordância (CONC), a partir do resultado das triplicatas de amostras pertencentes a um dos lotes adquiridos para cada marca que continham seis replicatas. Isso foi feito para evitar alteração das amostras devido às suas perecibilidades. Selecionaram-se amostras de 6 marcas (Brahma, Skol, Cintra, Crystal, Glacial e Lokal) analisadas em três dias diferentes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PS-MS de cervejas brasileiras

Após o ajuste das condições de ionização na fonte *paper spray*, foram obtidos os espectros PS-MS das cervejas no modo positivo e negativo. A Figura 16 apresenta espectros representativos para ambos os modos de aquisição.

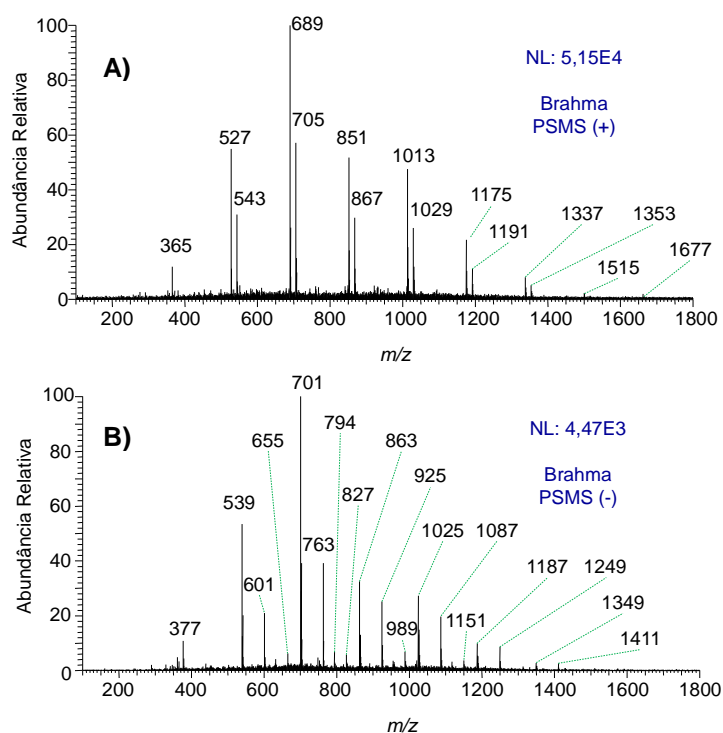


Figura 16 – Espectros representativos obtidos por PS-MS no estudo de cervejas brasileiras: (A) modo positivo e (B) modo negativo.

No modo positivo (Figura 16A), os perfis obtidos apresentaram pares de sinais intensos (separados por 16 u) e distanciados entre si por 162 u. Esses sinais evidenciam a formação de adutos de sódio e potássio de malto-oligossacarídeos provenientes da hidrólise de moléculas de amido e do metabolismo das leveduras. Os primeiros sinais dessa série de malto-oligossacarídeos correspondem a adutos de sódio e potássio da maltose ( $m/z= 365$  e  $m/z= 381$ ), razão pela qual se observa a diferença de 16 u entre os sinais pareados. Os malto-oligossacarídeos seguintes a essa série se diferenciam pelo número de unidades de glicose contidas na cadeia carbônica desses açúcares, ligadas por meio de ligações

glicosídicas. Isso justifica a diferença de 162 u entre os pares de sinais observados. A glicose possui massa igual a 180 u, entretanto, na formação da ligação glicosídica ocorre a perda de uma molécula de água (18 u) devido à adição ao carbono anomérico.

Os sinais de maior  $m/z$  detectados nessa série foram identificados como adutos de sódio e potássio da maltononose ( $m/z= 1449$  e  $m/z= 1515$ ). Além desses malto-oligossacarídeos, também foram detectados sinais de baixa intensidade com razões massa-carga iguais a  $m/z$  582, 616, 759, 782 e 921, para os quais não foi possível fazer atribuições com base na literatura.

Nos espectros obtidos das amostras no modo negativo (Figura 16B) foram observados padrões semelhantes aos obtidos no modo positivo, com a presença de pares de sinais intensos separados por 62 u e que se distanciam entre si por 162 u. Esses sinais se referem à adutos dos mesmos malto-oligossacarídeos com íons cloreto ( $\text{Cl}^- = 35$  u) e dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^- = 97$  u). Alguns dos sinais de menores intensidades correspondem a esses açúcares nas suas formas desprotonadas.

A formação de adutos  $[\text{M}+\text{H}_2\text{PO}_4]^-$  de malto-oligossacarídeos foi proposta com base em estudos de artigos que abordam a quantificação de ânions em cervejas. A diferença de massas de 97 u também poderia sugerir a formação de adutos com íons hidrogenosulfato ( $\text{HSO}_4^- = 97$  u). Entretanto, íons fosfato estão presentes em maior concentração em cervejas de variados estilos, quando comparados a íons sulfato.<sup>101,102</sup>

Cabe ressaltar que os sinais obtidos por PS-MS das cervejas estudadas já foram previamente relatados na literatura em trabalhos que utilizaram a espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI-MS). No trabalho de MAURI *et al.*, por exemplo, esses malto-oligossacarídeos também foram detectados e quantificados por ESI-MS na forma de adutos de sódio e potássio em cervejas italianas do tipo *Lager*.<sup>103</sup> DUARTE *et al.*, por outro lado, identificaram esses malto-oligossacarídeos utilizando LC-NMR/MS, visando um método para controle de qualidade. Eles observaram apenas a formação de adutos de sódio, uma vez que uma solução de acetato de sódio foi adicionada às amostras antes da análise por MS.<sup>104</sup>

ARAÚJO *et al.* diferenciaram cervejas brasileiras de 3 estilos diferentes utilizando ESI-MS (modo positivo e negativo) e obtiveram *fingerprints* muito semelhantes aos obtidos por PS-MS. Nos espectros obtidos no modo negativo, os autores relataram a formação de adutos de cloretos desses açúcares e observaram a presença dos sinais referentes aos adutos de dihidrogenofosfato. Entretanto, para esses últimos não foram feitas as atribuições.<sup>63</sup>

Outra técnica de ionização para análises MS à pressão atmosférica que foi eficiente na identificação desses malto-oligossacarídeos em cervejas foi a MALDI. SEDO *et al.* e PARK *et al.* detectaram adutos desses açúcares no modo positivo utilizando MALDI-TOF-MS para classificação de cervejas de origens e estilos diferentes.<sup>61,62</sup>

Apesar de ser possível obter *fingerprints* de cervejas utilizando a PS-MS no modo negativo, observaram-se experimentalmente problemas relacionados à reprodutibilidade nesse modo de detecção. Durante os experimentos no modo negativo, observou-se uma grande variação na corrente resultante do potencial aplicado na base do papel da PS-MS. Mesmo com o ajuste das condições experimentais, esse problema não foi superado. O aumento da voltagem e diminuição da distância entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas provoca a formação de descargas elétricas coronas. Portanto, a metodologia PS-MS no modo negativo não foi utilizada nos estudos posteriores. A Figura 17 ilustra exemplos de replicatas dos espectros PSMS no modo positivo de cervejas.

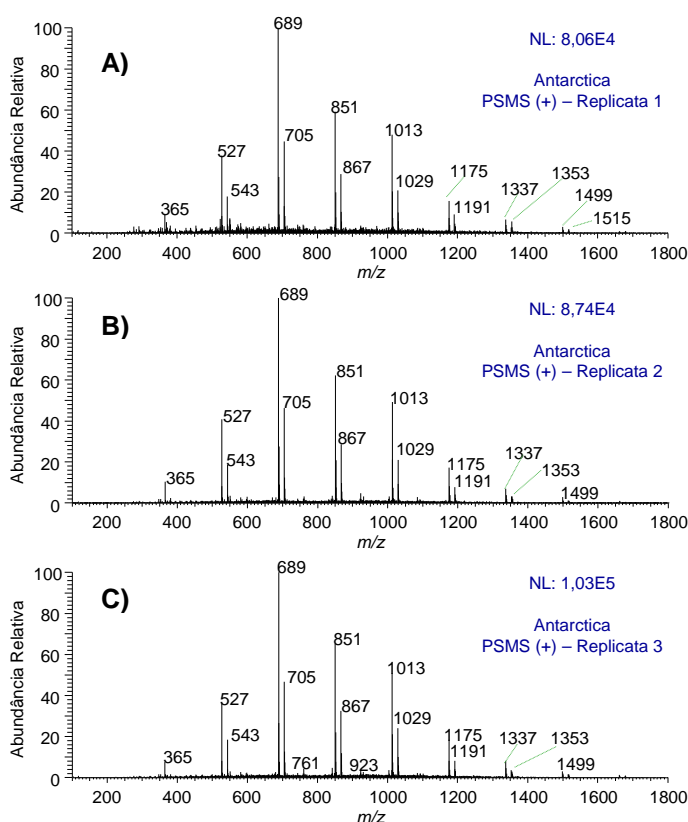


Figura 17 – Replicatas de espectros PSMS no modo positivo de cervejas (marca Antarctica): A) primeira replicata, B) segunda replicata e C) terceira replicata.

A Tabela 6 apresenta um sumário das atribuições dos sinais dos adutos dos malto-oligossacarídeos detectados nos espectros PS-MS, nos modos positivo e negativo, das cervejas brasileiras estudadas (mostrados na Figura 16).

Tabela 6 – Sinais Referentes aos malto-oligossacarídeos detectados nos espectros PS-MS, nos modos positivo e negativo.

Composto	MM (g.mol <sup>-1</sup> )	[M+Na] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	[M+K] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	[M+Cl] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	[M+H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )
Maltose	342	365	381	341	377	439
Maltotriose	504	527	543	503	539	601
Maltotetraose	666	689	705	665	701	763
Maltopentaose	828	851	867	827	863	925
Maltohexaose	990	1013	1029	989	1025	1087
Maltoheptaose	1152	1175	1191	1151	1187	1249
Maltooctaose	1314	1337	1353	1313	1349	1411
Maltononaose	1476	1499	1515	1475	1511	1573

Como mostra a Figura 18, uma análise visual comparativa entre os espectros obtidos no modo positivo não permite a diferenciação inequívoca entre as diferentes marcas de cervejas estudadas. Analisando os espectros das marcas com maior valor comercial (Antarctica, Brahma e Skol), por exemplo, observam-se grandes similaridades, nas intensidades dos sinais referentes aos adutos de sódio (*m/z* 527, *m/z* 689, *m/z* 851, *m/z* 1013, *m/z* 1075, *m/z* 1337 e *m/z* 1499), que possuem intensidades bem maiores quando comparados aos picos de adutos de potássio dos mesmos açúcares. O mesmo comportamento é observado para as marcas Crystal e Lokal, fabricadas pela cervejaria Petrópolis.

Nos espectros das marcas Cintra e Glacial (Cervejaria Brasil Kirin), por outro lado, a relação entre os sinais referentes aos adutos de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> é inversa, o que possibilita a diferenciação dessas duas marcas. Nos espectros da cerveja A Outra, observa-se que ambos os adutos de maltotriose apresentam intensidades relativas mais elevadas que as observadas nos espectros das demais cervejas. No entanto, trata-se de uma diferença bastante sutil para uma diferenciação inequívoca.

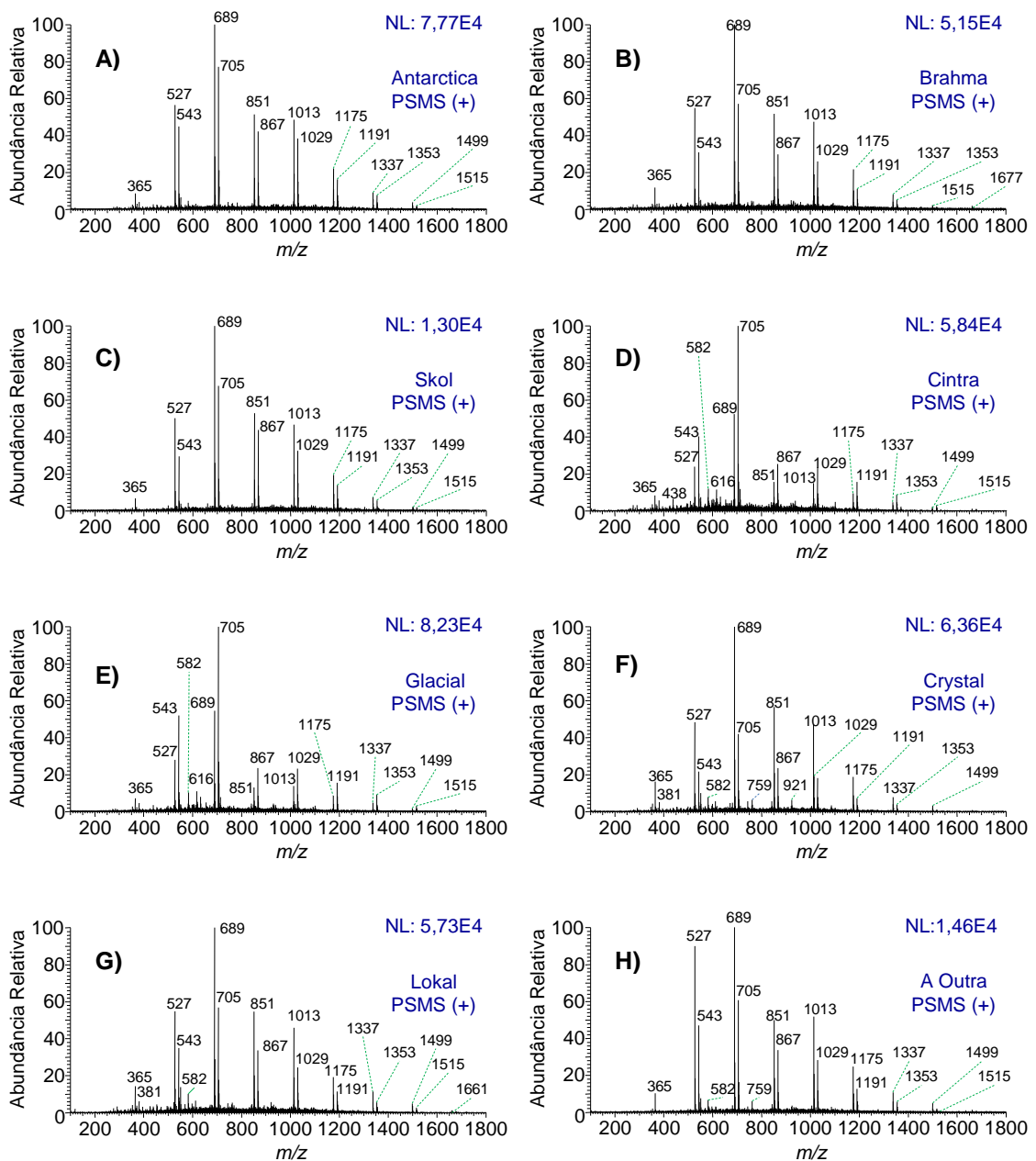


Figura 18- Espectros PS(+)-MS das cervejas estudadas nesse trabalho e que têm sido envolvidas em casos de falsificação: A) Antarctica, B) Brahma, C) Skol, D) Cintra, E) Glacial, F) Crystal, G) Lokal e H) A Outra.

Essas pequenas diferenças podem ser explicadas pela utilização de insumos e condições de fabricação distintas para cada marca, as quais incluem a qualidade da água, as configurações de equipamentos e os parâmetros utilizados para cada etapa de produção (gradientes de temperaturas, pH, tempos de residência), a qualidade e proporção dos

cereais e adjuntos cervejeiros, a proporção de conservantes e estabilizantes, e o metabolismo das cepas de leveduras empregadas na fermentação. O Quadro 2 apresenta informações retiradas dos rótulos das cervejas estudadas, que indicam a composição de aditivos e adjuntos utilizados na produção dessas bebidas. Esses componentes, sobretudo os conservantes, evidenciam os resultados obtidos por PS-MS, no que diz respeito às relações entre os sinais referentes aos adutos de sódio e potássio desses malto-oligossacarídeos.

Quadro 2 – Composição informada no rótulo das cervejas analisadas por PS-MS.

Informações dos rótulos	Antarctica	Brahma	Skol	Cintra	Glacial	Lokal	Crystal	A outra
Água	P	P	P	P	P	P	P	P
Malte (Min. 55 % do extrato original)	P	P	P	P	P	P	P	P
Cereais não maltados (Máx. 45 % do extrato original)	P	P	P	P	P	P	P	A
Lúpulo	P	P	P	P	P	P	P	P
Carboidratos (Max. 15 % extrato original)	P	P	P	A	A	P	P	P
INS221 (Máx. 0,005 g.L <sup>-1</sup> )	P	P	P	A	A	A	A	A
INS223 (Máx. 0,005 g.L <sup>-1</sup> )	A	A	A	A	A	P	P	A
INS316 (Máx. 0,01 g.L <sup>-1</sup> )	P	P	P	P	P	P	P	P
INS405 (Máx. 0,007 g.L <sup>-1</sup> )	P	P	P	P	P	P	P	P
Álcool (%)	4,9	4,8	4,7	4,7	4,4	4,7	4,5	4,5

O símbolo (P) indica a presença do componente e (A) indica a ausência.

Como pode ser observado no Quadro 2, todas as cervejas estudadas utilizam as matérias primas básicas para produção de cerveja: água, malte e lúpulo. Além desses itens, essas cervejas também utilizam os insumos INS 316 (isoascorbato de sódio) e INS 405 (alginato de propileno glicol).<sup>105</sup> A primeira dessas substâncias atua como antioxidante para prolongar a validade dessas bebidas. O alginato de propileno glicol é um polissacarídeo utilizado como estabilizante da espuma,<sup>17</sup> o que evita o contato direto da cerveja com o oxigênio atmosférico e contribui para a melhora da qualidade sensorial do produto.

Entretanto, a análise dos outros insumos apresentados no Quadro 2 pode explicar parte das informações obtidas nos espectros PS(+)-MS, devido à diferença de composição dessas cervejas. A primeira observação é em relação às fontes de carboidratos.<sup>15</sup>



A utilização de carboidratos (adjuntos cervejeiros açucarados – Tabela 3) apresenta influência direta na composição dos malto-oligossacarídeos dessas cervejas, pois esses insumos são previamente processados e possuem alta concentração de açúcares com baixa massa molecular, tais como a glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose. Em contraste, a utilização de adjuntos amiláceos (Tabela 2) resultará em distribuições de malto-oligossacarídeos distintas, pois a fonte de açúcares desses insumos – amido – sofre hidrólise enzimática simultaneamente ao amido proveniente do malte de cevada. A composição de malto-oligossacarídeos com a utilização de cereais não-maltados resultará na formação de açúcares com massas molares diversas.<sup>15</sup>

A cerveja A Outra é a única das bebidas estudadas que não utiliza fontes de açúcares provenientes de cereais não maltados (tais como cevada, milho arroz e trigo). Ainda, segundo as informações contidas em seu rótulo, essa cerveja recebe a adição de carboidratos processados (tais como açúcares e xaropes).<sup>15</sup> Portanto, o uso desse tipo de aditivo maior intensidade dos sinais de adutos de sódio ( $m/z = 527$ ) e potássio ( $m/z = 543$ ) de maltotriose nos espectros PS(+)-MS pode ser atribuída à maior concentração de açúcares com cadeias glicosídicas menores desses adjuntos.

Algumas das cervejas estudadas utilizam outros aditivos que atuam como antioxidantes para conservação dessas bebidas. As marcas Brahma, Antarctica e Skol recebem a adição de INS 223 (metabissulfito de sódio). As marcas produzidas pelo Grupo Petrópolis – cervejas Lokal e Crystal - recebem o aditivo INS 221 (sulfito de sódio).<sup>105</sup>

As cervejas das marcas Glacial e Cintra, cujos espectros apresentaram sinais dos adutos de potássio mais intensos que os de sódio, não recebem os aditivos INS 221 e INS 223, o que pode ser um indício de que essas cervejas possuam menores concentrações de íons sódio em relação às bebidas dos demais fabricantes. Isso explicaria o motivo pelo qual os sinais dos adutos de potássio dos malto-oligossacarídeos identificados se mostraram mais intensos do que os sinais dessas mesmas moléculas na forma de adutos de sódio.

Além da adição dos insumos utilizados na fabricação dessas cervejas, apresentados no Quadro 1 e Quadro B1, outros fatores como a origem das matérias primas e os modos de processamento também contribuem para diferenciação de algumas dessas marcas pelos espectros PS(+)-MS obtidos. A marca de cerveja A Outra, por exemplo, também não recebe cargas dos conservantes INS 221 e INS 223, assim como as cervejas fabricadas pela Brasil Kirin. Porém, a relação entre os sinais dos adutos dos oligo-maltossacarídeos nos espectros PS-MS é similar àquelas observadas para as marcas produzidas pela Ambev e Grupo Petrópolis.

## 4.2 Modelos quimiométricos

### 4.2.1 Análise de componentes principais (PCA)

O modelo PCA foi gerado a partir do arranjo dos dados espectrais  $X$  (141 x 1701). A PCA explicou 57,55% da variância total dos dados após a seleção de 2 componentes principais. As demais CP não dispunham de informações relevantes para a discriminação das amostras de cervejas abordadas nesse estudo e, portanto, foram desprezadas.

A presença de amostras anômalas foi verificada através da análise dos valores de  $T^2$  de Hotelling e dos resíduos  $Q$  das amostras. A Figura 19 ilustra os resultados dos cálculos desses parâmetros para todas as amostras, os quais confirmam o ajuste do modelo pelo fato de que nenhuma amostra apresentou simultaneamente altos resíduos e alta influência (quadrante superior direito). As linhas tracejadas indicam os limites de confiança a 95% de confiabilidade desses parâmetros.

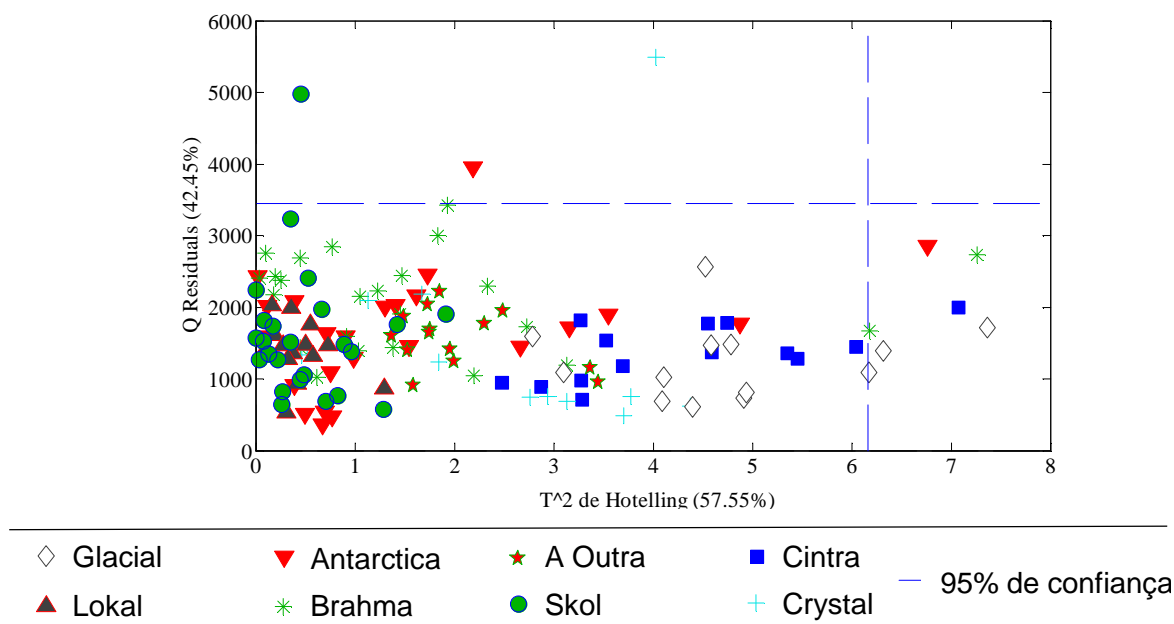


Figura 19 – Detecção de *outliers*: valores de  $T^2$  de Hotelling *versus* resíduos  $Q$ .

Os valores dos escores para CP 1 (41,46% da variância explicada) e CP 2 (16,09%) podem ser visualizados na Figura 20, na qual se observa a formação de dois agrupamentos facilmente distinguíveis. O menor conjunto é formado pelas bebidas

fabricadas pela cervejaria Brasil Kirin (Glacial/Cintra) e o maior agrupamento formado pelas demais marcas. A análise isolada dos escores e dos pesos de cada uma das componentes principais possibilita elucidar as razões responsáveis pela formação desses agrupamentos.

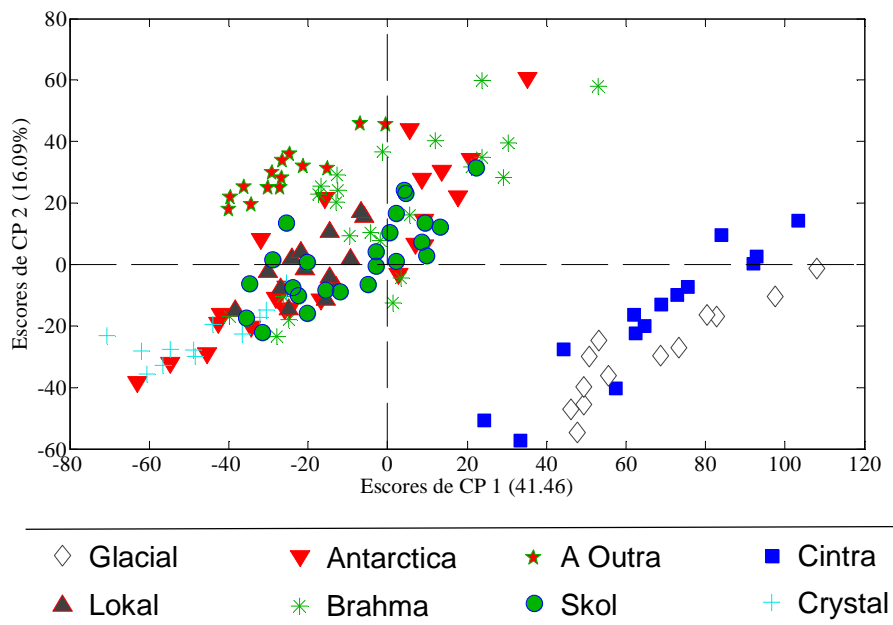


Figura 20 - Escores de CP1 e CP2.

A componente principal 1 explicou 41,46% da variância total dos dados e foi responsável para discriminação de grande parte das cervejas Glacial (GL) e Cintra (CA). Além disso, observa-se que no maior agrupamento as amostras da cerveja Crystal (CL) ligeiramente se destacam das demais por possuírem escores mais negativos.

Os pesos das variáveis em CP1 estão ilustrados na Figura 21 (A). A discriminação das cervejas produzidas pela cervejaria Brasil Kirin ocorreu devido à contribuição positiva dos sinais de adutos de potássio de alguns oligossacarídeos ( $m/z$  381,  $m/z$  543,  $m/z$  705,  $m/z$  1191 e  $m/z$  1353) e de outros sinais de menor intensidade nos espectros PS-MS ( $m/z$  582,  $m/z$  616 e  $m/z$  759) para a formação dessa componente principal.

Os sinais dos adutos de sódio dos oligossacarídeos detectados contribuíram de forma negativa para a formação de CP1. Esse comportamento dos pesos para essa componente principal reforça a ideia de que as cervejas Cintra e Glacial podem ser diferenciadas pela razão de íons sódio/potássio na composição química das bebidas desse

fabricante, devido à utilização de insumos distintos para sua produção (água, conservantes, coadjuvantes e adjuntos).

A componente principal 2, ilustrada na Figura 20, explicou 16,09% da variância e foi responsável pela ligeira discriminação das marcas Glacial (GL), Cintra (CA) e Crystal (CL) das amostras de cervejas da marca A Outra (AO).

A análise dos pesos de CP 2 (Figura 21 B) indica que os sinais referentes aos adutos de sódio dos malto-oligossacarídeos detectados, principalmente a maltotriose ( $m/z$  527), contribuem positivamente para a formação dessa componente principal. Isso confirma a discussão prévia realizada para os espectros PS-MS.

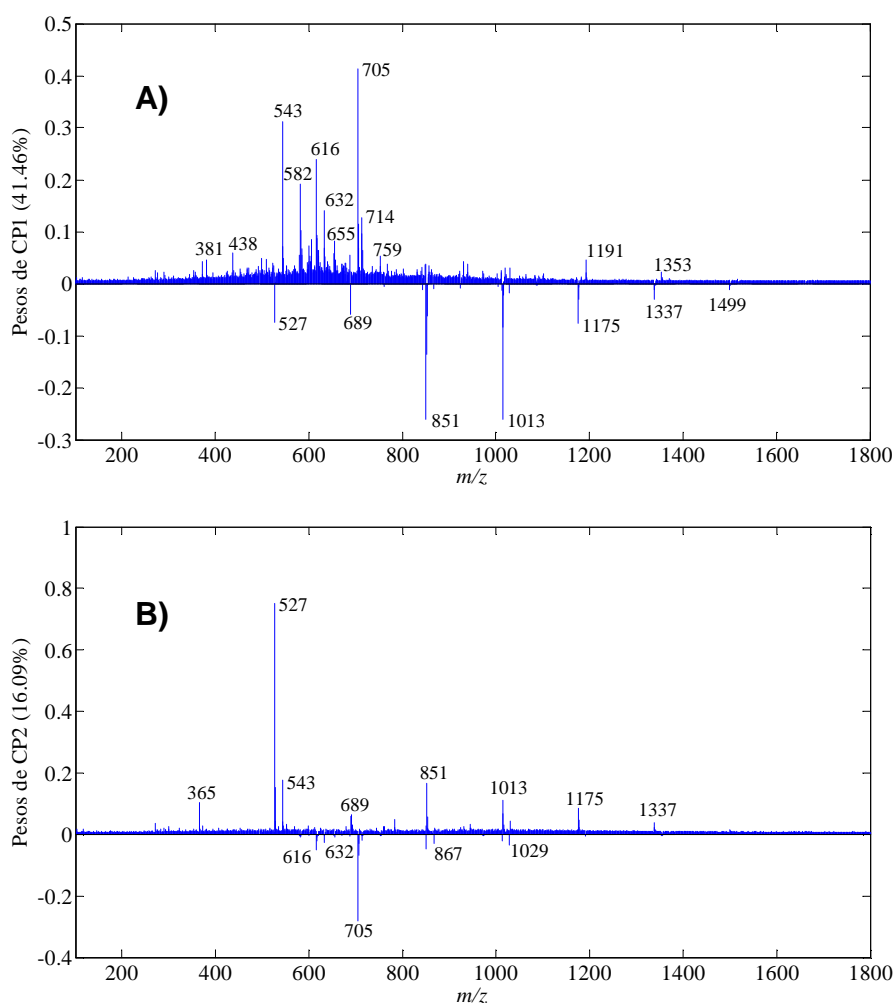


Figura 21 - Pesos da CP1 (A) e CP2 (B).

Apesar de ser possível diferenciar uma fração das amostras utilizando-se o método não supervisionado PCA, a dispersão e a grande sobreposição entre os escores de

algumas marcas de cervejas desencoraja o emprego dessa abordagem para análises de identificação de cervejas falsificadas. Entretanto, esses resultados reforçam as interpretações feitas a partir dos espectros PS-MS e dão indícios que a aplicação de métodos supervisionados, como PLS-DA, serão bem sucedidos.

#### 4.2.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

Os conjuntos de treinamento e teste foram definidos utilizando-se o algoritmo Kennard-Stone para as amostras de cada marca de cerveja isoladamente. Essa etapa selecionou os espectros médios de 93 amostras para o conjunto de treinamento e de 48 para o conjunto de teste. O modelo PLS-DA gerado descreveu 71,38% da variância da matriz  $\mathbf{X}$  e 82,10% da variância do vetor  $\mathbf{y}$ , utilizando 5 variáveis latentes (VL). O erro de classificação da validação cruzada (CVCE) foi igual a 1,22%.

A Figura 22 ilustra as previsões das amostras de cerveja estudadas pelo modelo PLS-DA<sub>completo</sub> (1701 variáveis). O limite de decisão (*threshold*) determinado pelos calculados baseados na estatística Bayesiana foi igual a 0,4906. Observou-se nessa figura que o conjunto de treinamento apresentou dois erros de classificação de amostras da marca Skol (SL), as quais foram previstas como cervejas de baixo valor comercial. No conjunto teste, uma amostra da marca Lokal (LL) foi erroneamente classificada como sendo da classe de cervejas fabricadas pela Ambev (maior valor comercial).

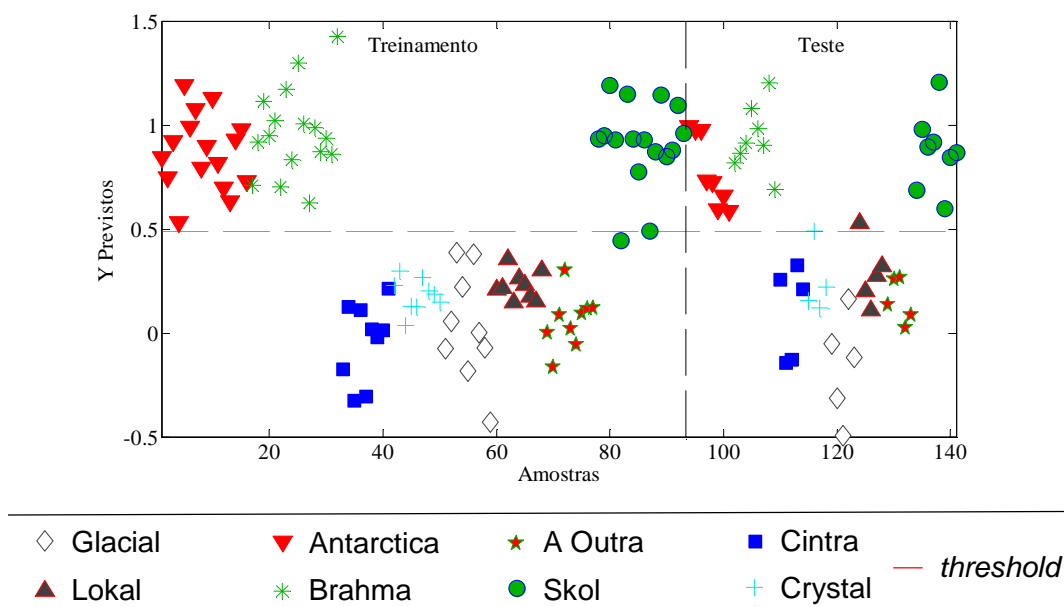


Figura 22 – Valores previstos pelo modelo PLS-DA<sub>completo</sub>.

O vetor VIP escores do modelo PLS-DA<sub>completo</sub> está ilustrado na Figura 23. No gráfico abaixo, observa-se que os sinais dos adutos de sódio e potássio de todos os malto-oligossacarídeos detectados por PS(+)-MS (Tabela 6) contribuem para essa discriminação das classes de cervejas estudadas. Além desses íons, outros sinais também foram importantes para a previsão das amostras, tais como os sinais  $m/z$  276,  $m/z$  582,  $m/z$  616,  $m/z$  759,  $m/z$  782 e  $m/z$  921 (não identificados).

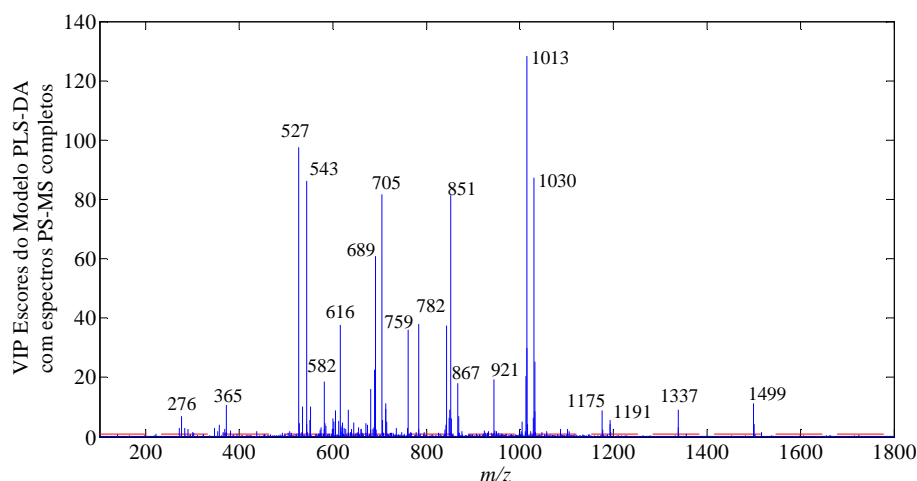


Figura 23 – VIP escores do modelo PLS-DA<sub>completo</sub>.

Os resultados das figuras de mérito do modelo PLS-DA<sub>completo</sub> estão expostos na Tabela 7. Pela análise desses resultados, verifica-se a alta veracidade das previsões desse modelo. A sensibilidade (Sen) e especificidade (Esp) mostraram valores superiores a 95%, exatidões (Exa) acima de 97% e confiabilidades iguais a 95,8% para os conjuntos de treinamento e teste.

A precisão do método também apresentou valores satisfatórios. A acordância (ACO) e a concordância (CONC) mostraram que a probabilidade de se obter os mesmos resultados para uma determinada amostra em condições análogas à repetibilidade e à precisão intermediária foram maiores que 96%.

Tabela 7 – Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA<sub>completo</sub>.

Conjunto	SEN (%)	TFN (%)	ESP (%)	TFP (%)	Exa (%)	Con (%)	ACO (%)	CONC (%)	AUROC
Treinamento	95,8	4,2	100,0	0,0	97,8	95,8			
Teste	100,0	0,0	95,8	4,2	97,9	95,8	96,30	96,30	1,00

**SEN** –Sensibilidade; **TFN** – Taxa de Falsos Negativos; **ESP** – Especificidade; **TFP** – Taxa de Falsos Positivos; **EXA** – Exatidão; **Con** – Confiabilidade; **ACO** – Acordância; **CONC**- Concordância e **AUROC** – Área sobre a curva de receptores característicos operacionais.

A área sobre a curva do receptor característico operacional (AUROC) foi definida a partir da curva ROC ilustrada na Figura 24. O valor de AUROC igual a 1,00 indica que esse modelo é perfeitamente capaz de discriminar as classes de cervejas no conjunto de teste sem erros.

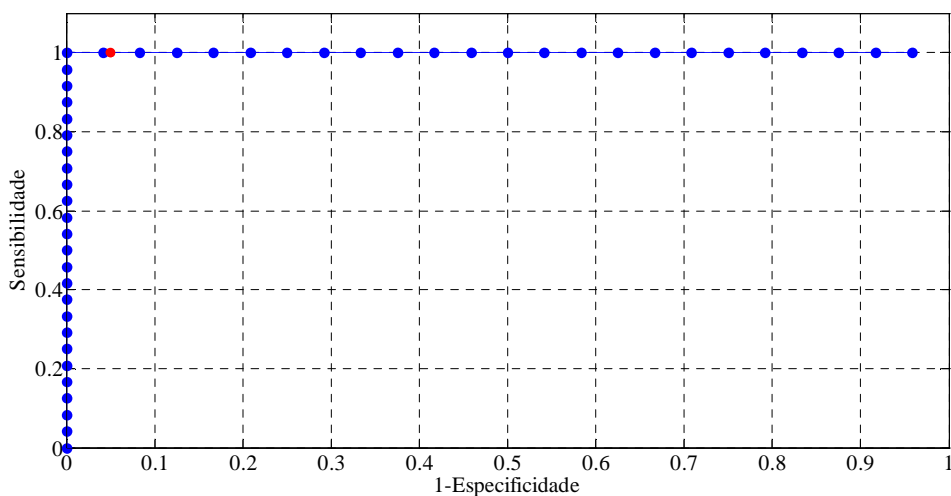


Figura 24 – Curva ROC do modelo PLS-DA<sub>completo</sub>.

O círculo vermelho na Figura 24 indica a sensibilidade e 1-especificidade para as amostras do conjunto teste de acordo com o *threshold* definido (0,4906). Apesar do valor de AUROC indicar que é possível classificar todas as amostras corretamente no conjunto teste, o modelo avaliado não selecionou nenhum desses *thresholds* previstos para delimitação das

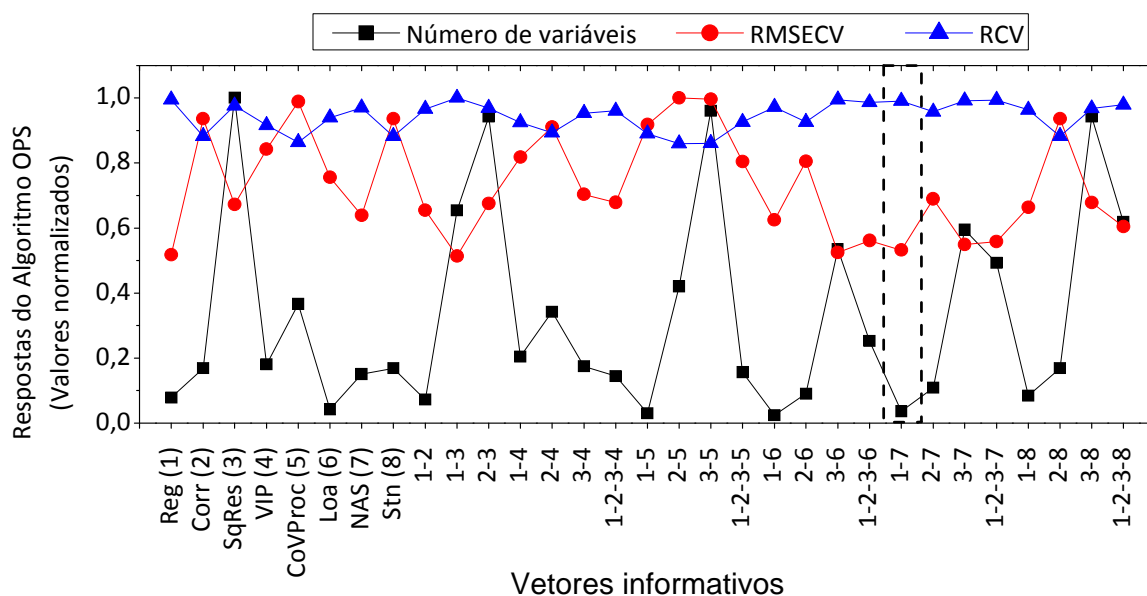
classes. Isso ocorre porque o limite de discriminação é determinado pela estatística Bayesiana em conjunto com dos dados do conjunto de treinamento.

Apesar dos resultados apontarem alguns erros de classificação, o modelo PLS- $DA_{\text{completo}}$  se mostrou eficaz e preciso para classificação de cervejas suspeitas de falsificação.

### 4.2.3 Método de seleção de variáveis dos preditores ordenados (OPS)

Os parâmetros utilizados para a seleção de variáveis pelo método OPS foram número de variáveis latentes do modelo original ( $h_{\text{modelo}}$ ) igual a 5 e número de variáveis latentes do modelo teste OPS ( $h_{\text{ops}}$ ) igual a 16. Um total de 31 vetores informativos foi avaliado pelo método OPS para gerar diversos conjuntos de variáveis selecionadas, a partir do ordenamento das variáveis originais segundo critérios impostos por esses vetores.

A escolha do conjunto ótimo de variáveis foi realizada pela comparação dos valores de somas do erro quadrático da validação cruzada (RMSECV), coeficientes de correlação da validação cruzada ( $R_{CV}$ ) e dos números de variáveis selecionadas. As respostas normalizadas geradas pelo método OPS para todos os modelos testados estão ilustradas na Figura 25.



**Reg** –Regressão; **Corr** –Correlação entre **X** e **y**; **SqRes** –Resíduos Quadráticos; **VIP** –Importância da Variável na Projeção; **CovProc** – Procedimentos de Covariância; **Loa** – Pesos; **NAS** – Sinal Analítico Líquido; **Stn**- Razão Sinal-Ruído.

Figura 25 – Respostas do método OPS: RMSECV,  $R_{CV}$  e  $N^{\circ}$  de variáveis.



A partir da análise das respostas acima, identificou-se que o conjunto de variáveis gerado pelo vetor REG-NAS (combinação binária Regressão/Sinal Analítico Líquido) apresentaram o menor valor de RMSECV (0,1496), baixo número de variáveis selecionadas (60 variáveis) e alto valor de  $R_{CV}$  (0,954). Esse conjunto de variáveis foi então aplicado para otimização do modelo PLS DA<sub>completo</sub>.

#### 4.2.4 Modelo PLS-DA após a seleção de variáveis pelo método OPS

O modelo PLS-DA reconstruído após a seleção de variáveis pelo OPS descreveu 75,80% da variância da matriz  $X$  e 85,52% da variância do vetor  $y$ , usando 4 variáveis latentes (CVCE igual a 0,73%). A Figura 26 ilustra os valores previstos pelo modelo PLS DA após a seleção das variáveis. Nela, pode-se observar que todas as amostras foram classificadas corretamente nos conjuntos de treinamento e teste.

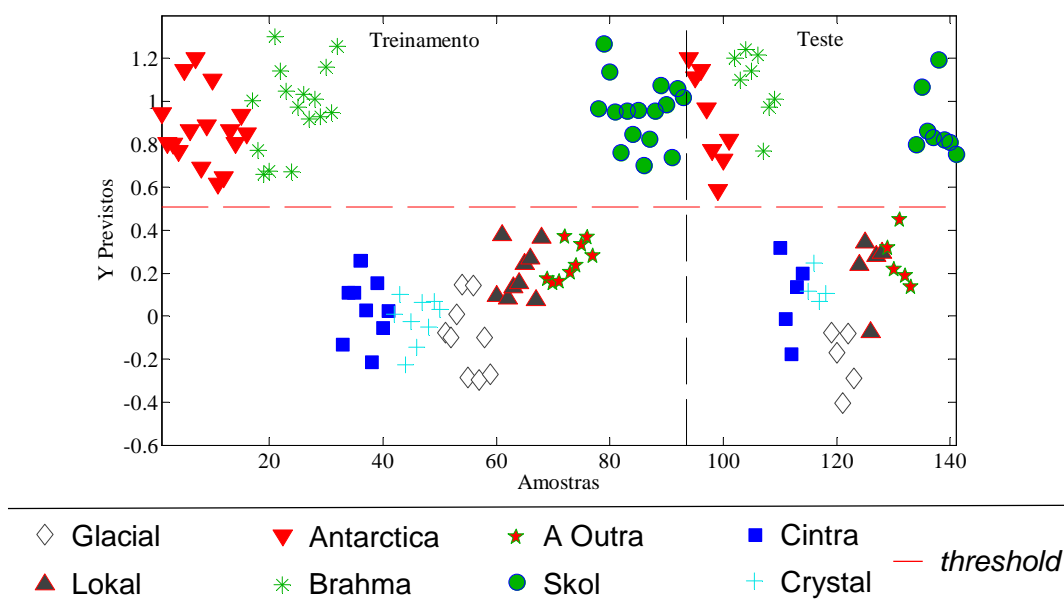


Figura 26 – Valores previstos pelo modelo PLS-DA após aplicação do OPS.

Já a Figura 27 ilustra o vetor de VIP escores do modelo PLS-DA OPS, na qual pode ser visualizado que os adutos de maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltohexaose – atribuídos na Tabela 6 - e outros sinais não identificados ( $m/z$  759,  $m/z$  782 e  $m/z$  921) foram relevantes para discriminação das classes de cervejas. A partir desses resultados, é possível atribuir esses sinais como marcadores químicos que podem ser utilizados para identificar amostras suspeitas de falsificação.

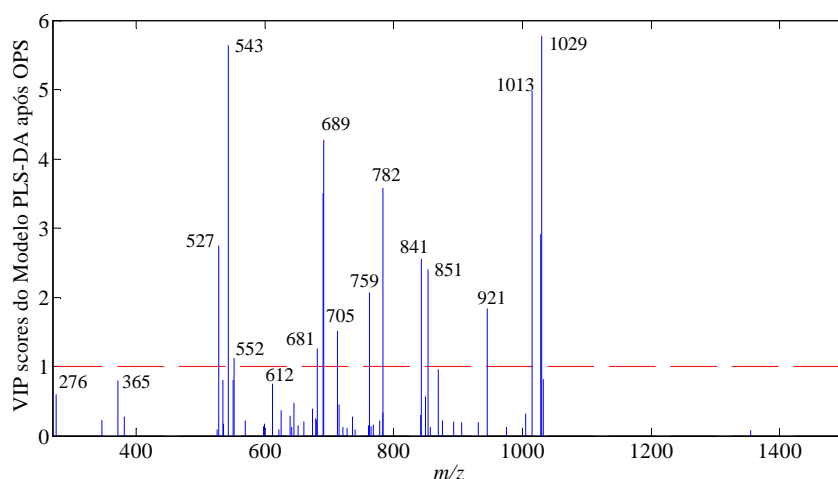


Figura 27 – VIP scores do modelo PLS-DA.

O efeito da seleção de variáveis pelo método OPS apresentou reflexos positivos nos valores das figuras de mérito do modelo PLS-DA. A partir da análise da Tabela 8, observa-se que ambas figuras de mérito de veracidade e precisão apresentaram incrementos e resultaram no bom desempenho do modelo.

Tabela 8 – Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA OPS.

Conjunto	SEN (%)	TFN (%)	ESP (%)	TFP (%)	Exa (%)	Con (%)	ACO (%)	CONC (%)	AUROC
Treinamento	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	100,0			
Teste	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	1,00

**SEN** –Sensibilidade; **TFN** – Taxa de Falsos Negativos; **ESP** – Especificidade; **TFP** – Taxa de Falsos Positivos; **EXA** – Exatidão; **Con** – Confiabilidade; **ACO** – Acordância; **CONC**- Concordância e **AUROC** – Área sobre a curva de receptores característicos operacionais.

A análise do valor de AUROC indica que o método OPS não afetou a capacidade de discriminação das classes em relação ao modelo anterior, porque o valor foi mantido constante. A Figura 28 apresenta a curva ROC do modelo PLS-DA após a seleção de variáveis pelo OPS. Ela mostra que o limite entre as classes determinado a partir das previsões do conjunto de treinamento (ponto vermelho) coincidiu com um dos valores de

*threshold* previstos pela AUROC para a discriminação correta de todas as amostras no conjunto teste (especificidade e sensibilidade iguais a 1).

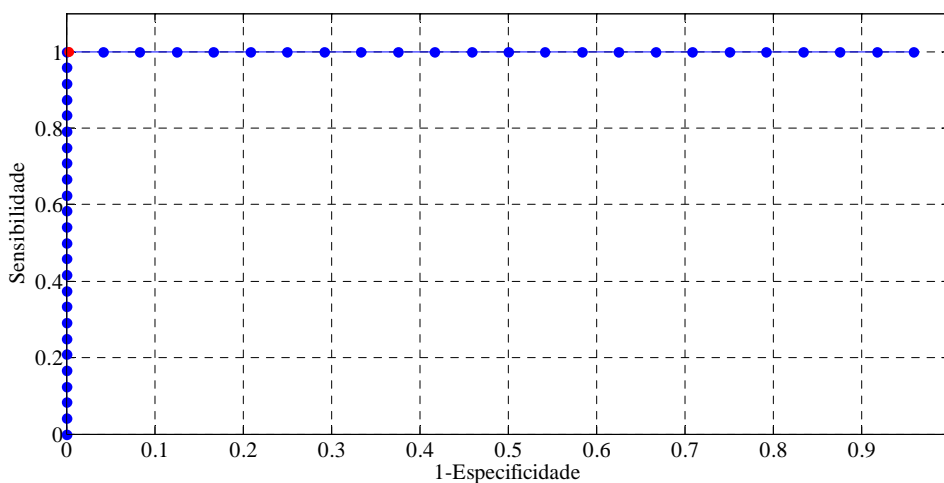


Figura 28 – Curva ROC do modelo PLS-DA OPS.

O método OPS foi responsável por eliminar informações espectrais aleatórias e/ou redundantes presentes nas matrizes de dados através da seleção de variáveis. Como resultado dessa ação, aumentou-se o desempenho da classificação do modelo PLS-DA.

Pela observação das figuras de mérito de precisão desse modelo, constata-se que a seleção das variáveis também teve impactos positivos nos valores de acordância e concordância. As flutuações instrumentais observadas na execução de replicatas de cada amostra foram minimizadas devido à extração das informações com maior contribuição para a previsão correta das cervejas de cada classe.

O OPS também indicou que é possível restringir a faixa de massas dessa análise para a região de 300 a 1100  $m/z$ . Esse fato implica no aumento da sensibilidade da análise PS-MS em conjunto com o método PLS-DA, uma vez que a seleção da faixa de massas permitirá a seleção dos sinais relevantes para discriminação com maiores razões sinal-ruído.

## 5 CONCLUSÕES

Uma nova abordagem baseada na PS-MS combinada com PLS-DA foi desenvolvida para uma nova aplicação forense: Uma diferenciação efetiva e direta de cervejas do estilo *Standard American Lager*. Cervejas desse estilo possuem uma grande homogeneidade em suas propriedades, o que torna difícil sua diferenciação por métodos analíticos convencionais.

No contexto desse trabalho, três marcas de cervejas (Skol, Brahma, Antarctica), líderes de mercado no Brasil, foram discriminadas de outras cinco marcas com menor valor comercial que comumente são utilizadas para falsificações de cervejas através da violação de suas embalagens.

O procedimento analítico completo é muito rápido, requer uma preparação de amostra mínima e demanda um consumo de solvente insignificante. Foram desenvolvidos modelos quimiométricos a partir dos resultados de amostras dessas cervejas provenientes de diferentes lotes, de modo a obter um método representativo e robusto.

O modelo PCA foi capaz de agrupar algumas amostras de cerveja que possuíam diferentes perfis de carboidratos, os quais foram ionizados através da aplicação do PS-MS na forma de adutos de sódio e potássio. Já o modelo PLS-DA foi construído e otimizado pelo uso do método de seleção de variáveis OPS, de modo a aumentar a veracidade e a precisão das classificações, resultando em uma taxa de confiabilidade do método igual a 100%.

A diferenciação e classificação de alimentos e bebidas são de grande importância tanto para os fabricantes quanto para os consumidores, pois garante confiança nas informações contidas no rótulo e na autenticidade do produto consumido.

Portanto, a combinação do PS-MS e PLS-DA se mostrou uma poderosa ferramenta analítica para se alcançar tais garantias, a qual está sendo estudada para aplicações em outras matrizes alimentícias no nosso grupo de pesquisa na UFMG.

## 6 REFERÊNCIAS

1. REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G.. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Trends in Food & Technology**. 17. 344-353. 2006.
2. G1. Notícia: Polícia fecha duas fábricas de cerveja falsificada em Vicente Pires, no DF, 2016. Disponível em: < <http://g1.globo.com/distrito-federal/noticia/2016/06/policia-fecha-duas-fabricas-de-cerveja-falsificada-em-vice-pires-no-df.html> >. Acesso em 10/06/2016.
3. ALAGOAS 24 HORAS. Notícia: Polícia Civil, PRF e Gecoc descobrem esquema de adulteração de bebidas, 2008. Disponível em: < <http://www.alagoas24horas.com.br/768323/policia-civil-prf-e-gecoc-descobrem-esquema-de-adulteracao-de-bebidas/> >. Acesso em: 10/06/2016.
4. SETELAGOAS.COM.BR. Notícia: Quadrilha presa na Várzea por esquema de adulteração de cerveja era chefiada por dentista, 2014. Disponível em: <<http://setelagoas.com.br/noticias/policia/23725-quadrilha-presa-na-varzea-por-esquema-de-adulteracao-de-cerveja-era-chefiada-por-dentista>>. Acesso em: 10/06/2016.
5. BAND. Notícia: Homem é preso por falsificar cervejas em SP, 2014. Disponível em:< <http://noticias.band.uol.com.br/cidades/noticia/100000703997/homem-e-preso-por-falsificar-cervejas-em-sp.html> >. Acesso em: 10/06/2016.
6. POLÍCIA CIVIL DE MINAS GERAIS. Notícia: Polícia civil deflagra operação gelada e apreende cervejas adulteradas, 2014. Disponível em: <<https://www.policiacivil.mg.gov.br/noticia/exibir?id=175033> >. Acesso em: 10/06/2016.
7. BRASIL, **Lei Nº 9.677 de 2 de Julho de 1998**. Altera dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos crimes contra a saúde pública, e dá outras providências.
8. BRASIL, **Lei Nº 8.078 de 11 de Setembro de 1990**. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências.
9. BRASIL, **Lei Nº 8.137 de 27 de Dezembro de 1990**. Define crimes contra a ordem tributária, econômica e contra as relações de consumo, e dá outras providências.

10. MEUSSDOERFFER, F. G.. **A Comprehensive History of Beer Brewing**. EßLINGER, H. M.. Handbook of Brewing – Process, Technology, Markets. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
11. FILHO, W. G.; CEREDA, M. P.. **Cerveja**. AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.. Biotecnologia Industrial – Volume 4. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.
12. EXAME.COM. Notícia: O que fazer com as cervejas “artesanais”, Lemman?, 2016. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/rede-de-blogs/branding-consumo-negocios/2016/05/18/o-que-fazer-com-as-cervejas-artesanais-lemman/>>. Acessado em 29/07/2016.
13. Brasil. **Decreto Nº 6.871, de 4 de Junho de 2009**. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.
14. KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. Berlin: VLB, 2004.
15. HOUGH, J. S.. **The biotechnology of malting and brewing**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985.
16. RECEITA FEDERAL DO BRASIL. **Sistema de Controle de Produção de Bebidas – SICUBE**, 2015. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/PessoaJuridica/Bebidas/SistContrProdSicobe.htm>>. Acesso em: 12/06/2016.
17. ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº 65, de 29 de Novembro 2011**. Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para fabricação de cervejas.
18. ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº 64, de 29 de Novembro 2011**. Dispõe sobre a aprovação de uso de coadjuvantes de tecnologia para fabricação de cervejas.
19. BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM. **2015 Style Guidelines**. 2015. Disponível em: <[http://www.bjcp.org/docs/2015\\_Guidelines\\_Beer.pdf](http://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf)>. Acesso em: 29/07/2016.
20. BARTH-HAAS GROUP – **The Barth Report Hops 2014/2015**. Nuremberg: Joh. Barth & Sohn GmbH & Co KG, Julho, 2015. Disponível em: <[http://barley-malt.ru/wp-content/uploads/2015/08/barthreport\\_2014-2015\\_en.pdf](http://barley-malt.ru/wp-content/uploads/2015/08/barthreport_2014-2015_en.pdf)>. Acesso em: 14/06/2016.

21. THE STATISTICS PORTAL. Beer production worldwide from 1998 to 2014 (in billion hectoliters). Disponível em: <<http://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>>. Acesso em 14/06/2016.
22. KIRIN HOLDINGS UNIVERSITY. Global Beer Consumption by country in 2014. 2015. Disponível em: <[http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/1224\\_01.html](http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/1224_01.html)>. Acesso em: 14/06/2016.
23. CERVBASIL. **Anuário 2015**. 2015. Disponível em: <[http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO\\_CB\\_2015\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf)>. Acesso em: 14/06/2016.
24. ANHEUSER-BUSCH INBEV - AB InBev 2015 Annual Report.2015. Disponível em: <<http://annualreport.ab-inbev.com/>>. Acessado em: 14/06/2016.
25. G1. Notícia: SABMiller aceita oferta de compra da AB InBev por US\$ 109 bilhões, 2015. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/negocios/noticia/2015/10/sabmiller-aceita-oferta-de-compra-da-ab-inbev-por-us-109-bilhoes.html>>. Acesso em: 07/07/2016.
26. INTERBRAND. Marcas brasileiras mais valiosas. Disponível em: <<http://www.rankingmarcas.com.br/2015/>>. Acessado em: 14/06/2016.
27. Secretaria de Estado de Fazenda de Minas Gerais. **Portaria SUTRI nº 538 de 30 de março de 2016, de 30 de Março de 2016**. Divulga os preços médios ponderados a consumidor final (PMPF) para cálculo do ICMS devido por substituição tributária nas operações com cerveja e chope.
28. BIANCOLILLO, A.; BUCCI, R.; MAGRI, A. L.; MAGRI, A. D.; MARINI, F.. Data-Fusion for multiplatform characterization of an italian craft beer aimed as its authentication. **Analytica Chimica Acta**. 820. 23-31. 2014.
29. VERA, L.; ACEÑA, L.; GUASCH, J.; BOQUÉ, R.; MESTRES, M.; BUSTO, O.. Discrimination and sensory descriptions of beers through data fusion. **Talanta**. 87. 136-142. 2011.
30. TAN, J.; LI, R.; JIANG, Z.. Chemometric classification of Chinese Lager beers according to manufacturer based on data fusion of fluorescence, UV and visible spectroscopies. **Food Chemistry**. 184. 30-36. 2015.
31. BELLIDO-MILLA, D.; MORENO-PEREZ, J. M.; HERNÁNDEZ-ARTIGA, M. P.. Differentiation and classification of beers with flame atomic spectrometry and

- molecular absorptions spectrometry and sample preparation assisted by microwaves. **Spectrochimica Acta Part B**. 55. 855-864.2000.
32. BONG, Y.; RYU, J.; CHOI, S.; LA, M.; LEE, K.. Investigation of the geographical provenance of the beer available in South Korea using multielements and isotopes. **Food Control**. 60. 378-381. 2016.
  33. CARTER, J. F.; YATES, H.S.A.; TINGGI, U.. A global survey of the stable isotope and chemical compositions of bottled and canned beers as a guide to authenticity. **Science and Justice**. 55. 18-26. 2015.
  34. ALCÁZAR, A.; PABLOS, F.; MARTIN, M. J.; GONZÁLEZ, A. G.. Multivariate characterization of beers according to their mineral content. **Talanta**. 57. 45-52. 2002.
  35. SIKORSKA, E.; GÓRECKI, T.; KHMELINSKII, I.; SIKORSKI, M.; KEUKELEIRE, D.. Fluorescence Spectroscopy for characterization and differentiation of beers. **Journal of Institute of Brewing**. 110. 267-275. 2004.
  36. MAHMOOD, N.; PETRACO, N.; HE, Y.. Elemental fingerprint profile of beer samples constructed using 14 elements determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): multivariation analysis and potential application to forensic sample comparison. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 402. 861-869. 2012.
  37. ALMEIDA, C.; DUARTE, I. F.; BARROS, A.; RODRIGUES, J.; SPRAUL, M.; GIL, A. M.. Composition of beer by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy: Effects of Brewing site and Date of Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54. 700-706. 2006.
  38. PETERSEN, B. O.; NILSSON, M.; BOJSTRUP, M. HINDSGAUL, O.; MEIER, S.. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy for profiling complex carbohydrate mixtures in non-fractionated beer. **Food Chemistry**. 150. 65-72.150. 2014.
  39. DUARTE, I.F.; BARROS, A.; BELTON, P. S.; RIGHELATO, R.; SPRAUL, M.; HUMPPER, E.; GIL, A. M.. High-resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50. 2475-2481. 2002.
  40. DUARTE, I. F.; BARROS, A.; ALMEIDA, C.; SPRAUL, M.; GIL, A. M.. Multivariate analysis of NMR and FTIR data as a potential tool for the quality of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52. 1013-1038. 2004.
  41. LACHENMEIER, D. W.; FRANK, W.; HUMPFER, E.; SCHAFER, H.; KELLER, S.; MORTTER, M.; SPRAUL, M.. Quality control of beer using high-resolution nuclear



- magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. **European Food Research and Technology**. 220. 215-221. 2005.
42. ZHANG, C.; BAILEY, D. P.; SUSLICK, K. S.. Colorimetric sensor arrays for the analysis of beers: A feasibility study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54. 4925-4931. 2006.
  43. GHASEMI-VARNAMKHAJASTI, M.; MOHTASEBI, S. S.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M. L.. Classification of non-alcoholic beer based on aftertaste sensory evaluation by chemometric tools. **Expert Systems with Applications**. 39. 4315-4327. 2012.
  44. DAEMS, V.; DELVAUX, F.. Multivariate analysis of descriptive sensory data on 40 commercial beers. **Food Quality and Preference**. 8. 373-380.1997.
  45. VERA, L.; ACEÑA, L.; GUASCH, J.; BOQUÉ, R.; MESTRES, M.; BUSTO, O.. Characterization and classification of the aroma of beer samples by means of an MS e-nose and chemometric tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 399. 2073-2081. 2011.
  46. ROSSI, S.; SILEONI, V.; PERRETTI, G.; MARCONI, O.. Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 94. 919-928. 2014.
  47. SILVA, G. A.; AUGUSTO, F.; POPPI, R. J.. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. **Food Chemistry**. 111. 1057-1063. 2008.
  48. CAJKA, T.; RIDDELLOVA, K.; TOMANIOVA, M.; HAJŠLOVA, J.. Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile *fingerprints*. **Journal of Chromatography A**. 1217. 4195-4203. 2010.
  49. STOIKOVA, E. E.; DOLGOVA, N. N.; SAVEL'EV, A. A.; GALUKHIN, A. V.; STOIKOV, I.I.; ANTIPIN, I. S.; EVTUGIN, G. A.. Beer classification based on the array of solid-contact potentiometric sensors with thialcalixarene receptors. **Russian Chemical Bulletin, International Edition**. 64. 223-231.2014
  50. CETÓ, X.; GUTIÉRREZ-CAPITÁN, M.; CALVO, D.; VALLE, M.. Beer classification by means of a potentiometric electronic tongue. **Food Chemistry**. 141. 2533-2540. 2013.
  51. BLANCO, C. A.; FUENTE, R.; CABALLERO, I.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L.. Beer discrimination using a portable electronic tongue based on screen-printed electrodes. **Journal of Food Engineering**. 157. 57-62. 2015.

52. GUTIÉRREZ, J. M.; HADDI, Z.; AMARI, A.; BOUCHIKNI, B.; MIMENDIA, A.; CETÓ, X.; VALLE, M.. Hybrid electronic tongue based on multisensory data fusion for discrimination of beers. **Sensors and Actuators B: Chemical**. 177. 989-996. 2013.
53. PÉREZ-RÀFOLS, C.; SAURINA, J.. Liquid chromatographic fingerprints and profiles of polyphenolic compounds applied to the chemometric characterization and classification of beers. **Analytical Methods**. 7. 8733-8739. 2015.
54. MATTARUCCHI, E.; STOCCHERO, M.; MORENO-ROJAS, J. M.; GIORDANO, G.; RENIERO, F.; GUILLOU, C.. Authentication of trappist beers by LC-MS *fingerprints* and multivariate data analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58. 12089-12095. 2010.
55. EGIDIO, V.; OLIVERI, P.; WOODCOCK, T.; DOWNEY, G.. Confirmation of brand identity in foods by near infrared transreflectance spectroscopy using classification and class-modelling chemometrics techniques – The example of a Belgian beer. **Food Research International**. 44. 544-549. 2011.
56. ENGEL, J.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L. M. C.; DOWNEY, G.. Confirmation of brand indent of a trappist beer by mid-infrared spectroscopy coupled with multivariate data analysis. **Talanta**. 99. 426-432. 2012.
57. LACHENMEIER, D.W.. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. **Food Chemistry**. 101. 825-832. 2007.
58. LI, H.; TAKAHASHI, Y.; KUMAGAI, M.; FUJIWARA, K.; KIKUCHI, R.; YOUSHIKURA, N.; AMANO, T.; LIN, J.; OGAWA, N.. A chemometrics approach for distinguishing between beers using near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**. 17. 69-76. 2009.
59. PIERNA, J. A. F.; DUPONCHEL, L.; RUCKEBUSCH, C.; BERTRAND, D.; BAETEN, V.; DARDENNE, P.. Trappist beer identification by vibrational spectroscopy: A chemometric challenge posed at the 'Chimométrie 2010' congress. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 113. 2-9. 2012.
60. CAJKA, T.; RIDDELLOVA, K.; TOMANIOVA, M.; HAJŠLOVA, J.. Ambiente mass spectrometry employing a DART ion source for a metabolic fingerprinting/ profiling: a powerful tool for beer origin recognition. **Metabolomics**. 7. 500-508. 2011.
61. PARK, E.; YANG, H.; KIM, Y.; KIM, J.. Analysis of oligosaccharides in beer using MALDI-TOF-MS. **Food Chemistry**. 134. 1658-1664. 2012.

62. SEDO, O.; MÁROVÁ, I.; ZDRÁHAL, Z.. Beer fingerprinted by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Food Chemistry**. 135. 473-478. 2012.
63. ARAÚJO, A. S.; ROCHA, L. L.; TOMAZELA, D. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; ALMEIDA, R. R.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. **Analyst**. 130. 884-889. 2005.
64. NUNES, K. M.; ANDRADE, M.V.O.; FILHO, A. M. P. S.; LASMAR, M. C.; SENA, M. M.. Detection and characterisation of frauds in bovine meat in natura by non-meat ingredient additions using data fusion of chemical parameters and ATR-FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**. 205. 14-22. 2016.
65. BORRÁS, E.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; MESTRES, M.; ACEÑA, L.; BUSTO, O.. Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment - A review. **Analytica Chimica Acta**. 891. 1-14. 2015.
66. HOFFMAN, E.; STROOBANT, V.. **Mass Spectrometry – Principles and applications**, 3<sup>rd</sup> Edition. Chichester: John Wiley & Sons Inc, 2007.
67. FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M.. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**. 246. 64-71. 1989.
68. CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N. P.. Electrospray ionization mass spectrometry: Chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds. **Quimica Nova**, 29. 287-292. 2006.
69. HARRIS, G. A.; GALHENA, A. S.; FERNÁNDEZ, F. M.. Ambient Sampling/Ionization Mass Spectrometry: Applications and current trends. **Analytical Methods**. 83. 4508-4538. 2011.
70. WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z.. *Paper spray* for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. **Angewandte Chemie International Edition**. 49. 877-880. 2010.
71. LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N. E.; LIN, J. M.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z.. Development, characterization, and application of *paper spray* ionization. **Analytical Chemistry**. 82. 2463-2471. 2010.
72. ESPY, R. D.; MULIADI, A. R.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G.. *Spray* mechanism in *paper spray* ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**. 325-327. 167-171. 2012.

73. YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J. D.; CHAPPEL, W. J.; MANICKE, N. E.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z.. Paper spray ionization devices for direct biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**. 312 (2012) 201-207. 2012.
74. WANG, H.; MANICKE, N. E.; YANG, Q.; ZHENG, L.; SHI, R.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z.. Direct analysis of biological tissue by paper spray mass spectrometry. **Analytical Methods**. 83. 1197-1201. 2011.
75. LIU, J.; WANG, H.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z.. Leaf spray: Direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**. 83. 7608-7613. 2011.
76. HAMID, A. M.; JARMUSCH, A. K.; PIRRO, V.; PINCUS, D. H.; CLAY, B. G.; GERVASI, G.; COOKS, R. G.. Rapid discrimination of bacterias by paper spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**. 86. 7500-7507. 2014.
77. FERREIRA, P. S.; SILVA, D. F. A.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E.. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. **Analyst**. 140. 811-819. 2015.
78. JJUNJU, F. P. M.; LI, A.; BADU-TAWIAH, A.; WEI, P.; LI, L.; OUYANG, Z.; ROGAN, I. S.; COOKS, R. G.. In situ analysis of corrosion inhibitors using a portable mass spectrometer with paper spray ionization. **Analyst**. 138. 3740-3748. 2013.
79. YAN, X.; AUGUSTI, R.; LI, X.; COOKS, R. G.. Chemical Reactivity assessment using reactive paper spray ionization mass spectrometry: The Katritzky Reaction. **ChemPlusChem**. 78. 1142-1148. 2013.
80. MA, Q.; BAI, H.; LI, W.; WANG, C.; LI, X.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z.. Direct identification of prohibited substances in cosmetics and foodstuffs using ambient ionizations on a miniature mass spectrometry system. **Analytica Chimica Acta**. 912. 65-73. 2016.
81. SOPARAWALLA, S. S.; TADJIMUKHAMEDOV, F. K.; WILEY, J. S.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G.. In situ analysis of agrochemical residues on fruit using ambient ionization on a handheld mass spectrometer. **Analyst**. 136. 4392-4396. 2011.
82. TAVERNA, D.; DONNA, L.; MAZZOTTI, F.; POLICICCHO, B.; SINDONA, G.. High-throughput determination of Sudan Azo-dyes within powdered chili pepper by paper spray mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**. 48. 544-547. 2013.

83. ZHANG, Z.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z.. *Paper spray*: a simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs. **Analyst**. 137. 2556-2558. 2012.
84. DENG, J.; YANG, Y.. Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bansha herbal tea using *paper spray* mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. 785. 82-90. 2013.
85. MAZZOTI, F.; DONNA, L.; TAVERNA, D.; NARDI, M.; AIELLO, D.; NAPOLLI, A.; SINDONA, G.. Evaluation of dialdehydic anti-inflammatory active principles in extra-virgin olive oil by reactive paper spray mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**. 352. 87-91. 2013.
86. GARRET, R.; REZENDE, C. M.; IFA, D. R.. Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis. **Analytical Methods**. 5. 5944-5948. 2013.
87. KIM, P.; CHA, S.. Paper cone spray ionization mass spectrometry (PCSI MS) for simple and rapid analysis of raw solid samples. **Analyst**. 140. 5868-5872. 2015.
88. FERREIRA, M. M. C.. **Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas:Editora UNICAMP. 2015.
89. BARKER, M.; RAYENS, W.. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**. 17. 166-173. 2003.
90. BRERETON, R. G.; LLOYD, G. R.. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. **Journal of Chemometrics**. 28. 213-225. 2014.
91. HOEL, G. P.; PORT, S. C.; STONE, C. J.. **Introdução à teoria da probabilidade**. Rio de Janeiro: Interciência, 1978.
92. BOTELHO, B. G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L. S.; SENA, M. M.. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**. 181. 31-37. 2015.
93. KENNARD, R. W.; STONE, L. A.. Computer aided design of experiments. **Technometrics**. 11. 137-148. 1969.
94. TRAN, T. N.; AFANADOR, N. L.; BUYDENS, L. M.C.; BLANCHET, L.. Interpretation of variable importance in Partial Least Squares with Significance Multivariate

- Correlation (sMC). **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 138. 153-160. 2014.
95. TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C.. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. **Journal of Chemometrics**. 23. 32-48. 2009.
96. SOROL, N.; ARANCIBIA, E.; BORTOLATO, S. A.; OLIVIERI, A. C.. Visible/near infrared-partial least-squares analysis of Brix in sugar cane juice: A test field for variable selection methods. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 102, 100–109. 2010.
97. MORGAN, D. R.. Spectral absorption pattern detection and estimation. I. Analytical Techniques. **Applied Spectroscopy**. 51. 404-415. 1977.
98. TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I., RIUS, F. X.. Validation of qualitative analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**. 23. 137-145. 2004.
99. MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B.. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletivas**. 11. 7-31.2003.
100. LANGTON, S. D.; CHEVENNEMENT, R.; NAGELKERKE, N.; LOMBARD, B.. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. **International Journal of Food Microbiology**. 79. 175-181. 2002.
101. KLAMPF, C. W.. Analysis of Organic Acids and Inorganic Anions in Different Types of Beer Using Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47. 987-990. 1999.
102. JIANG, Y.; COLE, R. B.. Oligosaccharide Analysis Using Anion Attachment in Negative Mode Electrospray Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. 16. 60-70. 2005.
103. MAURI, P.; MINOGGIO, M.; SIMONETTI, P.; GARDANA, C.; PIETTA, P.. Analysis of saccharides in beer samples by flow injection with electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. 16. 743-748. 2002.
104. DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; SPRAUL, M.; GIL, A. M.. Application of NMR spectroscopy and LC-NMR/MS to the identification of carbohydrates in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51. 4847-4852. 2003.

**105.** MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - Tabela de codificação pelo INS para aditivos. Disponível em: <  
[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/vegetal/RegistroAutorizacoes/Relacao\\_de\\_Codigos\\_INS\\_Aditivos.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/RegistroAutorizacoes/Relacao_de_Codigos_INS_Aditivos.pdf)>. Acesso em: 03/07/2016.

## ANEXO A

A Lei Nº 9.677, de 2 de Julho de 1998 que alterou dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal dispõe em seus artigos 272 e 277 punições passíveis de serem aplicadas a indivíduos que atuem na produção e comercialização de alimentos falsificados, sendo que destaca-se a aplicabilidade dessa norma aos casos envolvendo bebidas alcoólicas.<sup>7</sup>

Art. 272 - Corromper, adulterar, falsificar ou alterar substância ou produto alimentício destinado a consumo, tornando-o nociva à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo:

Pena - reclusão, de 4 (quatro) a 8 (oito) anos, e multa.

§ 1º-A - Incorre nas penas deste artigo quem fabrica, vende, expõe à venda, importa, tem em depósito para vender ou, de qualquer forma, distribui ou entrega a consumo a substância alimentícia ou o produto falsificado, corrompido ou adulterado.

§ 1º - Está sujeito às mesmas penas quem pratica as ações previstas neste artigo em relação a bebidas, com ou sem teor alcoólico.

A Lei Nº 8.078, de 11 de Setembro de 1990 dispõe de artifícios aplicáveis para julgar e punir indivíduos que comercializam produtos falsificados, assim como cervejas e outras bebidas, devido a dano causado a violação do código de defesa do consumidor em seu artigo 66.<sup>8</sup>

Art. 66. Fazer afirmação falsa ou enganosa, ou omitir informação relevante sobre a natureza, característica, qualidade, quantidade, segurança, desempenho, durabilidade, preço ou garantia de produtos ou serviços:

Pena - Detenção de três meses a um ano e multa.

§ 1º Incorrerá nas mesmas penas quem patrocinar a oferta.

§ 2º Se o crime é culposos;

Pena Detenção de um a seis meses ou multa.

A Lei Nº 8.137, de 27 de Dezembro de 1990 em seu artigo 7 em seus incisos II, III, IV, VII IX multas ou condenações àqueles que vendem ou expõe à venda mercadorias



cujas embalagens, tipos, especificações, pesos ou composição estejam em desacordo com as prescrições.<sup>9</sup>

Art. 7º Constitui crime contra as relações de consumo:

I - favorecer ou preferir, sem justa causa, comprador ou freguês, ressalvados os sistemas de entrega ao consumo por intermédio de distribuidores ou revendedores;

II - vender ou expor à venda mercadoria cuja embalagem, tipo, especificação, peso ou composição esteja em desacordo com as prescrições legais, ou que não corresponda à respectiva classificação oficial;

III - misturar gêneros e mercadorias de espécies diferentes, para vendê-los ou expô-los à venda como puros; misturar gêneros e mercadorias de qualidades desiguais para vendê-los ou expô-los à venda por preço estabelecido para os demais mais alto custo;

IV - fraudar preços por meio de:

a) alteração, sem modificação essencial ou de qualidade, de elementos tais como denominação, sinal externo, marca, embalagem, especificação técnica, descrição, volume, peso, pintura ou acabamento de bem ou serviço;

b) divisão em partes de bem ou serviço, habitualmente oferecido à venda em conjunto;

c) junção de bens ou serviços, comumente oferecidos à venda em separado;

d) aviso de inclusão de insumo não empregado na produção do bem ou na prestação dos serviços;

V - elevar o valor cobrado nas vendas a prazo de bens ou serviços, mediante a exigência de comissão ou de taxa de juros ilegais;

VI - sonegar insumos ou bens, recusando-se a vendê-los a quem pretenda comprá-los nas condições publicamente ofertadas, ou retê-los para o fim de especulação;

VII - induzir o consumidor ou usuário a erro, por via de indicação ou afirmação falsa ou enganosa sobre a natureza, qualidade do bem ou serviço, utilizando-se de qualquer meio, inclusive a veiculação ou divulgação publicitária;

VIII - destruir, inutilizar ou danificar matéria-prima ou mercadoria, com o fim de provocar alta de preço, em proveito próprio ou de terceiros;

IX - vender, ter em depósito para vender ou expor à venda ou, de qualquer forma, entregar matéria-prima ou mercadoria, em condições impróprias ao consumo;

Pena - detenção, de 2 (dois) a 5 (cinco) anos, ou multa.

Parágrafo único. Nas hipóteses dos incisos II, III e IX pune-se a modalidade culposa, reduzindo-se a pena e a detenção de 1/3 (um terço) ou a de multa à quinta parte.

## ANEXO B

Quadro B1 – Coadjuvantes permitidos pela RDC 64 para produção de cervejas.

Função	Coadjuvante
AGENTE DE CLARIFICAÇÃO/ FILTRAÇÃO	Albumina
	Algas marinhas <i>Euchema</i> processadas
	Bentonita
	Carragena (inclui a furcellarana e seus sais de sódio e potássio), musgo irlandês.
	Carvão ativo
	Caseína
	Celulose
	Dióxido de silício, sílica.
	Gelatina
	Ictiocola (cola de peixe)
	Perlita
	Poliamida
	Poliestireno
	Polivinilpirrolidona insolúvel
	Tanino (ácido tânico)
Terra diatomácea	
AGENTE DE CONTROLE DE MICRORGANISMOS (somente para tratamento de leveduras)	Ácido fosfórico
CATALISADOR	Ácido sulfúrico
	Ácido fosfórico
	Ácido giberélico
	Ácido láctico
	Ácido sulfúrico
	Carbonato de cálcio
	Cloreto de cálcio
	Hidróxido de cálcio
	Óxido de magnésio
	Sulfato de cálcio
DETERGENTE	Dimetilsilicone, Dimetilpolisiloxano, Polidimetilsiloxano (0,001g/100g ou 100mL)
FERMENTO BIOLÓGICO	Bactérias lácticas <i>Oenococcus oeni</i>
	Leveduras <i>Saccharomyces</i>
	Leveduras <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
GÁS PROPELENTE, GÁS PARA EMBALAGENS	Gás carbônico
	Nitrogênio
NUTRIENTE PARA LEVEDURAS	Autolisado de leveduras
	Cloreto de amônia
	Cloreto de zinco
	Dihidrogeno fosfato de amônio, fosfato de amônio dibásico
	Extrato de levedura
	Hidrolisado protéico de levedura
	Hidrogeno fosfato de amônio
	Lactato de cálcio
	Lactato de magnésio
	Lactato Gluconato de Cálcio (Lacto-gluconato de cálcio)
	Sulfato de amônia
	Sulfato de magnésio
	Sulfato de manganês
	Sulfato de zinco
Tiamina (vitamina B1)	
RESINA DE TROCA IÔNICA/ MEMBRANA/ PENEIRA MOLECULAR	Resinas trocadoras de íons e produtos para sua regeneração

Fonte: Anvisa.<sup>18</sup>