

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

JANAÍNA APARECIDA REIS TEODORO

IMPRESSÃO DIGITAL E IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES
EM AMOSTRAS DE INTERESSE FORENSE APLICANDO *PAPER*
***SPRAY MASS SPECTROMETRY*: PERFUME E UÍSQUE**

Belo Horizonte
2017

UFMG/ICEx/DQ.1.206^a
D.665^a

JANAÍNA APARECIDA REIS TEODORO

**IMPRESSÃO DIGITAL E IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES
EM AMOSTRAS DE INTERESSE FORENSE APLICANDO *PAPER
SPRAY MASS SPECTROMETRY*: PERFUME E UÍSQE**

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

Belo Horizonte
2017

T314i Teodoro, Janaína Aparecida Reis
2017 Impressão digital e identificação de adulterações
D em amostras de interesse forense aplicando paper spray
mass spectrometry [manuscrito] : perfume e uísque /
Janaína Aparecida Reis Teodoro. 2017.
[iv], 91 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.

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

1. Química analítica - Teses 2. Perfumes -
Adulteração e inspeção - Teses 3. Uísque - Adulteração
e inspeção - Teses 4. Espectrometria de massa - Teses
5. Química legal - Teses 6. Quimiometria - Teses I.
Augusti, Rodinei, Orientador II. Título.

CDU 043

UFMG

Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEs



"Impressão Digital e Identificação de Adulterações em Amostras de Interesse Forense Aplicando *Paper Spray Mass Spectrometry*: Perfume e Uísque"

Janaína Aparecida Reis Teodoro

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG

Prof. Ildelfonso Binatti
CEFET-MG

Profa. Clésia Cristina Nascentes
UFMG

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

A gratidão nos aproxima de Deus. Por isso reconheço que sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho seja trocando ideias, me dando sugestões ou simplesmente pela amizade. Minha gratidão, especialmente, àqueles que desempenharam um papel importantíssimo nessa caminhada:

Ao meu Orientador, Professor Dr. Rodinei Augusti, agradeço pela oportunidade e confiança na realização deste trabalho e por tantas vezes ser um exemplo de pessoa e profissional, nos ensinando através de sua postura, como ser alguém melhor.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para que eu pudesse investir nos meus sonhos. Em especial a minha mãe pelo carinho, presença, apoio e presteza em me ajudar a todo momento. Sem dúvida você é minha fortaleza, minha guia e minha maior encorajadora.

Aos meus familiares, irmão (Vini), tios, primos, avó (Binica) que sempre apostaram, incentivaram e confiaram em mim desde pequena.

Ao Doug pela boa vontade em me ajudar em todas as situações, por sua compreensão, paciência e mais do que isso, por seu carinho incondicional.

Agradeço aos colegas de laboratório: Bruna, Júlia, Susana, Lucas, Hebert, Victória, Camila e Marina, a colaboração de todos vocês foi muito importante. Em especial ao Hebert pela disponibilidade e prontidão em ajudar no trabalho e pela paciência em me ensinar a quimiometria.

Aos melhores amigos de uma vida: Dilian, Dimitry, Flávia, Leopoldo, Marina e Sara que mesmo não estando realmente ligados ao trabalho, estiveram por perto dando apoio e ouvindo meus problemas. Sendo pacientes com as minhas faltas, mas sempre disponíveis para os tão necessários encontros de amigos.

Ao Fernando, Sthéfany e Matheus pela amizade e cumplicidade durante a escrita.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas sugestões que certamente enriquecerão este trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

À UFMG, ICEX, Departamento de Química e Secretária de Pós-Graduação em Química por permitirem o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA por me ajudarem a vencer mais esta etapa!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

A autenticidade de alimentos, cosméticos e outras matrizes, tem sido uma preocupação constante em todo mundo devido aos prejuízos econômicos e potenciais riscos à saúde de indivíduos que consomem estes produtos fabricados em condições e com insumos impróprios. No Brasil, esta situação é observada em casos de falsificação de bebidas, perfumes e outras amostras de interesse forense que ocorrem frequentemente e a partir diversos modos. Estas fraudes dificilmente são percebidas pelos consumidores devido à sua similaridade com os originais. Métodos para detecção destas fraudes não estão prontamente disponíveis para os órgãos fiscalizadores sendo que a análise química é uma alternativa que garante uma prova inequívoca da autenticidade ou não de determinado produto. Neste trabalho, a espectrometria de massas com a ionização *paper spray* (PS-MS) é sugerida como uma opção viável para obtenção de perfis químicos (*fingerprints*) objetivando a detecção rápida, simples e com baixo custo para investigar falsificações em perfumes e uísques. As amostras falsificadas utilizadas foram reais e obtidas de órgãos policiais por meio de apreensão. Os *fingerprints* obtidos apresentaram perfis distintos para as duas classes de amostras (originais e falsificados) sendo possível a determinação visual da autenticidade, porém para uma visão mais clara e assertiva de todos os resultados simultaneamente, os dados espectrométricos foram submetidos a ferramentas quimiométricas para a diferenciação das suas classes utilizando a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Figuras de mérito (FOM) para avaliar o desempenho desta metodologia foram calculadas. Os modelos otimizados resultaram na classificação correta de todas as amostras e valores perfeitos das FOM para os perfumes e de valores muito próximos do ideal para os uísques, tendo apenas uma amostra classificada erroneamente. O método apresentou potencial para ser aplicado em rotinas de laboratórios de fiscalização e perícia para detecção de falsificações em perfumes e uísque podendo ser expandido para aplicação em outros tipos de fraudes.

Palavras-chave: identificação de falsificações; *fingerprints*; autenticidade de perfume e uísque; espectrometria de massas com ionização por *paper spray*; PLS-DA.

ABSTRACT

The authenticity of food, cosmetics and other matrices has been a worldwide concern because of the economic losses and potential health risks of individuals who consume these products manufactured under bad conditions and with improper inputs. In Brazil, this situation is observed in cases of drinks, perfumes and other samples of forensic interest forgeries that occur frequently and in different ways. These frauds are hardly perceived by consumers because of the similarity and quality of counterfeits. Methods for detecting such frauds are not readily available to regulatory organs and chemical analysis is an alternative that guarantees unambiguous proof of the authenticity of a particular product. In this work, mass spectrometry with *paper spray ionization* (PS-MS) is suggested as a viable option for obtaining chemical profiles (*fingerprints*) for fast, simple and low-cost for counterfeit detection in perfumes and whiskeys. The counterfeited samples used were real and obtained from police agencies through seizure. The obtained fingerprints presented different profiles for the two classes of samples (original and counterfeited), being possible the visual determination of authenticity, but for a clear and assertive view of all the results simultaneously, the spectrometric data were submitted to chemometric tools for the differentiation of their classes using partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Merit figures (FOM) to evaluate the performance of this methodology were calculated. The optimized models have resulted in the correct classification of all samples and perfect FOM values for perfumes and values very close to the ideal for whiskeys, having only one sample misclassified. The method presents potential to be applied in routines of inspection laboratories and criminal investigations to detect falsifications in perfumes and whiskey and could be expanded for application in other types of fraud.

Keywords: counterfeit detection; fingerprints; perfume and whisky authenticity; paper spray mass spectrometry, PLS-DA.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Problematização do tema	2
1.3 Justificativa	5
1.4 Objetivos.....	6
1.4.1 Objetivo Geral.....	6
1.4.2 Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO 2	7
2.1 Revisão Bibliográfica.....	7
2.1.1 Espectrometria de massas	7
2.1.1.1 Introdução da amostra	8
2.1.1.2 Fonte de ionização	8
2.1.1.2.1 Ionização por Electrospray	9
2.1.1.2.2 Ionização por Paper Spray	11
2.1.1.3 Analisadores de massas.....	16
2.1.1.4 Detectores	16
2.1.1.5 Tratamento de dados.....	17
2.1.1.6 Espectrometria de massas em química forense	17
2.1.2 Quimiometria	18
2.1.2.1 Análise de Componentes Principais (PCA).....	19
2.1.2.2 Análise Discriminatória por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	20
2.1.2.2.1 Variáveis latentes	22
2.1.2.2.2 Validação de modelos qualitativos	23
CAPÍTULO 3	26
3.1 Perfumes.....	26
3.2 Produção de perfumes	31
3.2.1 Expressão à frio.....	31
3.2.2 Destilação por arraste a vapor	31
3.2.3 Extração por solventes voláteis	32

3.2.4	Dióxido de carbono ou CO ₂ supercrítico	32
3.2.5	Enfloração	32
3.3	Parte experimental	33
3.3.1	Materiais e reagentes	34
3.3.2	Instrumentação.....	35
3.3.3	Métodos quimiométricos	36
3.3.3.1	Figuras de mérito para a validação dos modelos PLS-DA	37
3.4	Resultados e discussão.....	37
3.4.1	Modelo PCA	46
3.4.2	Modelo PLS-DA.....	47
3.5	Conclusões parciais	54
CAPÍTULO 4		55
4.1	Uísque	55
4.2	Produção do uísque.....	57
4.2.1	Maltagem.....	58
4.2.2	Maceração.....	59
4.2.3	Fermentação	59
4.2.4	Destilação.....	59
4.2.5	Maturação	59
4.3	A química do uísque	62
4.4	Parte experimental	66
4.4.1	Instrumentação.....	68
4.4.2	Modelos quimiométricos	69
4.4.2.1	Figuras de mérito para a validação dos modelos PLS-DA	69
4.5	Resultados e Discussão	69
4.5.1	Modelo PCA	73
4.5.2	Modelo PLS-DA.....	77
4.6	Conclusões parciais	81
CAPÍTULO 5		82
5.1	Conclusões gerais	82
CAPÍTULO 6		83
6.1	Referências bibliográficas.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Trabalhos que reportam a utilização da espectrometria de massas em química forense.....	18
Tabela 2: Configuração típica de uma tabela de contingência.	23
Tabela 3: Quantidade e nome das amostras de perfumes originais e falsificados.	34
Tabela 4: Atribuições sugeridas para os íons encontrados experimentalmente nas análises PS(+) - MS.....	50
Tabela 5: Fórmulas estruturais para os compostos relatados na literatura.....	51
Tabela 6: Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA a partir dos dados de PS (+) – MS das amostras de perfume.	53
Tabela 7: Constituintes que compõem o padrão de identidade dos uísques.....	65
Tabela 8: Nome e número das amostras de uísque analisadas.....	67
Tabela 9: Estrutura dos compostos propostos.	76
Tabela 10: Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA construído calculados a partir dos dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Notícia sobre apreensão de perfumes falsificados e seus riscos à saúde ⁵	3
Figura 2: Apreensão de perfumes e canetas no DF ⁷	4
Figura 3: Notícia sobre a operação Chicago de apreensão de bebidas falsificadas ⁸	4
Figura 4: Diagrama simplificado de um espectrômetro de massas ¹⁰	7
Figura 5: Esquema simplificado de uma fonte de ionização por <i>Electrospray</i> ¹³	10
Figura 6: Esquema simplificado de uma fonte de ionização por <i>Paper Spray</i> ¹⁶	11
Figura 7: Modos de formação de spray e distribuição do tamanho das gotículas em PS-MS ¹⁷	13
Figura 8: Efeitos da geometria do papel e da voltagem em análises PS-MS: a) Variação dos diâmetros do cone de Taylor, b) Variação da intensidade dos sinais, c) Variação da corrente dos sinais com a voltagem aplicada, d) Campo elétrico calculado para o papel com ângulo de 60° e e) Variação do campo elétrico ¹⁸	15
Figura 9: Princípio básico da análise PCA com dados oriundos de espectros de massas ⁴² . 20	
Figura 10: Princípio básico de uma análise PLS-DA ⁴⁴	21
Figura 11: Equações para o cálculo das figuras de mérito de modelos qualitativos ⁴⁶	24
Figura 12: Exemplo de curva AUROC ⁴⁷	25
Figura 13: Pirâmide olfativa dos perfumes ⁵³	28
Figura 14: Escala de notas de um perfume e a participação de diferentes fragrâncias nessas notas ⁴⁸	29
Figura 15: Aparato instrumental utilizado para obtenção dos espectros PS-MS: A) modelo LCQ FLEET da Thermo Scientific com analisador do tipo <i>ion trap</i> e B) Detalhes da fonte de ionização <i>paper spray</i>	35
Figura 16: PS (+) – MS obtidos representativos do perfume Arbo original (a) e falsificado (b).	38
Figura 17: Sobreposição dos PS (+) – MS obtidos para o perfume Arbo de três lotes diferentes.	39
Figura 18: PS (+) – MS obtidos representativos do perfume Egeo Dolce original (a) e falsificado (b).	39
Figura 19: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Egeo Feminino original (a) e falsificado (b).	40
Figura 20: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Egeo Masculino original (a) e falsificado (b).	41
Figura 21: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Floratta in Blue original (a) e falsificado (b).	41
Figura 22: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Floratta in Rose original (a) e falsificado (b).	42
Figura 23: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Malbec original (a) e falsificado (b).	42
Figura 24: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Portinari original (a) e falsificado (b).	43
Figura 25: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Quasar Azul original (a) e falsificado (b).	43

Figura 26: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Quasar Vermelho original (a) e falsificado (b).	44
Figura 27: Espectros do perfume Malbec Original (a) e três amostras falsificadas da mesma marca (b) (c) e (d).	45
Figura 28: Escores de PC1 e PC2 obtidos com os dados de PS (+) - MS das amostras de perfume.	46
Figura 29: <i>Loadings</i> de PC2 calculados a partir dos dados PS (+) - MS das amostras de perfume.	47
Figura 30: Valores previstos pelo modelo PLS-DA, para as amostras de perfume. Os códigos entre asteriscos correspondem a amostras de perfume falsificadas.	48
Figura 31: Coeficientes de regressão do modelo PLS-DA obtidos a partir dos dados PS (+) – MS das amostras de perfume.	49
Figura 32: Diagrama simplificado das etapas de produção de uísque ⁷⁵	58
Figura 33: Diagrama simplificado das categorias de <i>Scotch</i> Uísque ⁷⁶	61
Figura 34: A química do uísque ⁷⁸	63
Figura 35: PS (-) – MS representativos das amostras de uísque por PS-MS. Os pares RL original (a) e falsificado (b), BL original (c) e falsificado (d) e WH original (e) e falsificado (f).	70
Figura 36: PS (-) – MS de amostras de uísque BL Original (a) e três amostras falsificadas da mesma marca (b), (c) e (d).	72
Figura 37: Escores de PC1 e PC2 obtidos com os dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.	73
Figura 38: Escores de PC1 e PC2 obtidos com os dados de PS (-) – MS das amostras de uísque com separação entre as marcas.	74
Figura 39: <i>Loadings</i> de PC2, calculados a partir dos dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.	75
Figura 40: Valores previstos no modelo PLS-DA calculados a partir dos dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.	78
Figura 41: Coeficientes de regressão do modelo PLS-DA calculados a partir dos dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.	79
Figura 42: VIP escores do modelo PLS-DA calculados a partir dos dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

EASI – *Easy Ambient Sonic-spray Ionization*

EI – Ionização por elétrons

ESI – Ionização por *electrospray*

ESP – Especificidade ou taxa de verdadeiros negativos

EXA – Exatidão

DESI - *Desorption Electrospray Ionization*

FN – Falsos negativos

FOM – Figuras de méritos

FP – Falsos positivos

MALDI - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

m/z – Razão massa/carga

MS – Espectrometria de massas

MS/MS – Espectrometria de massas sequencial

PC – Componentes principais

PCA – Análise de componentes principais

PLS-DA – Análise discriminante por mínimos quadrados parciais

PS-MS – Espectrometria de massas com ionização por *paper spray*

PS (+) - MS – Espectro de massas obtido por ionização *paper spray* no modo positivo

PS (-) - MS – Espectro de massas obtido por ionização *paper spray* no modo negativo

AUROC – Área sob a Curva dos Receptores Operacionais Característicos.

SEN – Sensibilidade ou taxa de verdadeiros positivos

TFN - Taxa de falsos negativos

TFP – Taxa de falsos positivos

VIP – Vetor importância da variável na projeção

VN – Verdadeiros negativos

VP – Verdadeiros positivos

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A expansão da pirataria em diversos tipos de produtos tem se tornado motivo de preocupação mundial devido aos prejuízos que frequentemente caminham juntamente com essa prática¹.

A falsificação de um produto ocorre quando é feita uma cópia não autorizada deste com a intenção de se comercializar como legítimo. Além disso, os produtos falsificados gerados se assemelham às características principais do produto copiado, porém, geralmente, a falta de controle de produção e/ou a substituição dos componentes por outros de menor custo podem acarretar diversos problemas^{1; 2}.

Dessa maneira, a autenticidade e integridade de produtos, sejam alimentícios, cosméticos, de vestuário, eletrônicos, etc., é uma constante e crescente preocupação de órgãos competentes devido aos potenciais riscos associados a essa atividade¹.

No Brasil, a repressão a pirataria é uma atividade política pública. Pois, dentre os danos sofridos por tal prática, podem ser citados os riscos à saúde do consumidor, os impactos econômicos ocasionados pela perda da arrecadação de impostos, prejuízo da livre concorrência e da imagem de marcas que porventura tenham seus produtos associados à falsificação, além de normalmente estar relacionada a outros crimes, como roubo, receptação, contrabando, homicídios, tráfico de drogas, dentre outros¹.

Para a correta tipificação do crime de adulteração ou falsificação de determinado produto é necessária a realização de análises que comprovem o fato. Porém, a ineficácia ou até mesmo inexistência de métodos apropriados para monitoramento da qualidade de determinados produtos pelos órgãos de fiscalização, dificulta os processos investigativos e acaba por incentivar a prática desses crimes que usualmente terminam de maneira impune¹.

Portanto, tendo em vista a relevância do tema, o desenvolvimento de métodos que sejam capazes de identificar falsificações de maneira rápida, simples e precisa é

de grande utilidade para atividades de fiscalização que abordem a autenticidade de produtos comercializados no país³.

Neste trabalho foi proposta uma alternativa analítica compatível com a necessidade de análises de amostras de interesse forense. A técnica de ionização *paper spray* combinada à espectrometria de massas foi utilizada como ferramenta para a investigação e discriminação de amostras de uísque e perfumes quanto a sua originalidade frente a exemplares falsificados.

Os dados analíticos gerados foram submetidos a tratamentos quimiométricos para uma visualização mais ampla e clara dos resultados. Para tanto, aplicou-se a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com a construção de modelos que compreenderam amostras reais fruto de apreensões em operações policiais.

1.2 PROBLEMATIZAÇÃO DO TEMA

Perfumes nacionais e importados são recorrentemente alvo de falsificação assim como bebidas como o uísque. Ambos os produtos têm um alto valor agregado e ampla relevância no mercado. Devido a isso, são artigos que quando falsificados e comercializados geram enormes lucros para os criminosos, trazendo assim incentivo para esta prática^{2; 4}.

Os métodos utilizados para falsificação costumam ser bem simples e de baixo custo. No caso dos perfumes é comum o uso de fragrâncias mais baratas que as originais e o uso de outros componentes não inspecionados. Já o uísque pode ser diluído com outro álcool e adicionado corante caramelo para disfarçar a cor, ou a simples troca de rótulos de produtos mais caros por outros mais baratos ou a fabricação de uma bebida com diversos componentes não inspecionados e corantes^{2; 4}.

Essas práticas não necessitam de uso de equipamentos elaborados e a fabricação não passa por nenhum tipo de controle de qualidade ou sanitária. Além de utilizar insumos de baixo custo e não inspecionados. O manejo inadequado dos materiais expõe os mesmos ao risco de contaminação por microrganismos ou até da adição de compostos que possam ser prejudiciais à saúde do consumidor. Muitas vezes, na intenção de reduzir a percepção de que o produto seja falsificado, os

produtores reutilizam garrafas, frascos, rótulos e tampas que podem, inclusive, ser retirados do lixo e possivelmente acabam por não receber nenhum tipo de assepsia.

Apreensões de uísque e perfume falsificados são recorrentes na mídia e ocorrem em diversos estados do país. Abaixo são apresentados casos de fraudes desse tipo que tiveram repercussão midiática.



Figura 1: Notícia sobre apreensão de perfumes falsificados e seus riscos à saúde⁵.

Na notícia acima de 2016 (Figura 1), veiculada na *webpage* do Jornal Nacional da Rede Globo, estima-se a partir de dados da polícia federal que, em 2015, foram apreendidos R\$ 28 milhões em produtos de higiene e beleza nas ruas do país, dentre os quais estão os perfumes. Sendo que, na semana da notícia, haviam sido destruídos 7,5 toneladas de maquiagens e perfumes suspeitos de falsificação⁵.

De acordo com o balanço aduaneiro de 2014, a Polícia Federal apreendeu nas fronteiras mais de R\$12 bilhões de perfumes suspeitos que iriam adentrar o país⁶.

A notícia a seguir é de 2016 e foi veiculada na *webpage* G1 – Globo e apresenta um caso de apreensão de produtos falsificados no Distrito Federal (Figura 2).⁷



Europeus são presos por vender no DF canetas e perfumes falsificados

Eles usavam carros de luxo e roupas de marca nas abordagens. Grupo dizia que pretendia deixar o país e fazer comércio a preço de custo.



Figura 2: Apreensão de perfumes e canetas no DF⁷.

Fraudes em alimentos e bebidas como o uísque também são frequentes. Recentemente, houve uma grande operação policial chamada “Operação Chicago” (Figura 3) que desarmou o maior esquema de falsificação de bebidas do país. A notícia foi exibida no programa televisivo “Fantástico” da Rede Globo, em 2016. A quadrilha era especializada na fabricação e comercialização de uísque e outras bebidas falsificadas em bares, restaurantes e casas noturnas⁸.



Figura 3: Notícia sobre a operação Chicago de apreensão de bebidas falsificadas⁸.

O que chama a atenção são as péssimas condições sanitárias onde ocorre a produção das bebidas falsificadas. Além da falta de higiene, um perito entrevistado na reportagem mencionou que o maquinário utilizado é comum no envase de produtos de limpeza como cloro, detergentes e outros. Fatores como esse, além da

possibilidade do emprego de insumos perigosos como o metanol que foi mencionado na reportagem, trazem riscos em potencial à saúde dos consumidores⁸.

De acordo com a reportagem, as falsificações eram muito sofisticadas o que as deixava imperceptíveis através de inspeção visual. Muitas vezes a verificação de características físicas dos produtos ou a análise documental (rótulos, lacres, notas fiscais) são o suficiente para detectar e coibir falsificações. Porém em alguns casos é indispensável a análise química para oferecer uma prova inequívoca da constatação da falsificação de determinado produto. Com a evolução das técnicas de falsificação, que utilizam-se muitas vezes de componentes físicos originais (garrafas, selos, rótulos) fica mais difícil a comprovação de uma falsificação tornando assim a análise química uma poderosa ferramenta para evidenciar e provar de forma contundente o fato⁸.

1.3 JUSTIFICATIVA

A espectrometria de massas associada à ionização por *paper spray* é uma alternativa altamente viável para análises forenses objetivando a identificação de falsificações em diferentes tipos de amostras. Esta técnica alia a simplicidade, baixo custo e rapidez na execução de análises que visem estimar a composição química de matrizes complexas sem necessitar de tratamento da amostra. A obtenção de impressões digitais químicas (*fingerprints*) é de grande utilidade na interpretação qualitativa e comparativa do comportamento de determinada amostra em detrimento de outra.

Para tanto, a grande quantidade de dados gerados pela espectrometria de massas necessita de ferramentas que possibilitem uma ampla visualização dos dados para uma interpretação melhor e mais clara dos resultados. Isso pode ser obtido através da utilização da quimiometria como suporte no reconhecimento de padrões entre as amostras.

O desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de detectar falsificações de modo eficaz, simples e rápido pode ser de grande valia para a fácil implantação em análises de rotina em situações de investigação de casos suspeitos. É alta a demanda de técnicas analíticas com esses atributos uma vez que, a quantidade e a qualidade das fraudes vêm crescendo continuamente e a necessidade de coibir crimes desse tipo é enorme devido aos prejuízos associados a eles.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho é aplicar a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* na obtenção de *fingerprints* para detectar e discriminar falsificações de perfume e uísque de modo simples, rápido e de baixo custo.

1.4.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar o desempenho da espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) para obtenção de *fingerprints* de amostras de interesse forense (perfume e uísque) na detecção de falsificações.
- II. Otimizar as condições instrumentais para o uso do espectrômetro de massas com a fonte de ionização por *paper spray* para obter *fingerprints* representativos de perfume e uísque.
- III. Sugerir possíveis atribuições para alguns íons encontrados nos *fingerprints* das amostras de perfume e uísque.
- IV. Discriminar as amostras reais (perfumes e uísques) de acordo com sua classificação (original ou falsificado) submetendo os espectros obtidos por PS-MS a estudos por métodos quimiométricos.
- V. Validar os modelos PLS-DA construídos através do cálculo de figuras de mérito para métodos qualitativos de classificação para verificar o desempenho do método.

CAPÍTULO 2

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Espectrometria de massas

A espectrometria de Massas (EM) é uma técnica analítica empregada na identificação e quantificação de substâncias orgânicas ou inorgânicas presentes em sólidos, líquidos ou gases, e na elucidação de suas propriedades químicas e estruturais. Nesta técnica, as moléculas do composto de interesse devem ser ionizadas e seus íons, já em fase gasosa, serão separados eletromagneticamente de acordo com suas razões massa/carga (m/z)⁹.

Algumas características dessa técnica fizeram com que ela tenha se tornado uma ferramenta importante em análises forenses como sua especificidade, elevada sensibilidade e limites de detecção cada vez mais baixos⁹.

Na Figura 4 é apresentado um diagrama esquemático que representa simplificada um espectrômetro de massas. Cada etapa de uma análise por espectrometria de massas será brevemente apresentada.

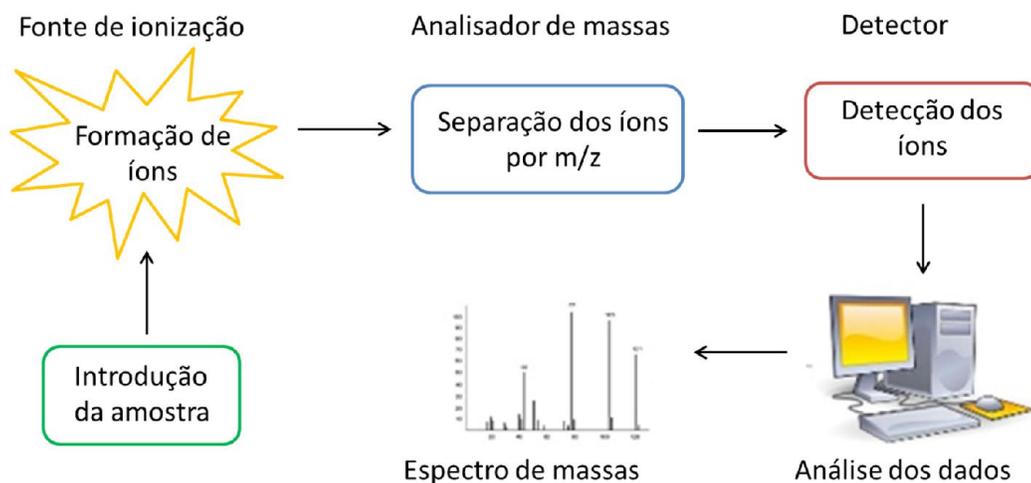


Figura 4: Diagrama simplificado de um espectrômetro de massas¹⁰.

A análise de um composto basicamente envolve cinco etapas: introdução da amostra, ionização das moléculas, separação dos íons (razão massa/carga), detecção dos íons, conversão do sinal elétrico em um espectro de intensidade por m/z (razão massa/carga)⁹.

2.1.1.1 Introdução da amostra

A espectrometria de massas permite a introdução da amostra diretamente na entrada do espectrômetro ou podem ser utilizadas técnicas de separação de maneira acoplada. As técnicas cromatográficas, gasosa e líquida, e a eletroforese capilar têm sido empregadas com sucesso em diversos trabalhos, inclusive na área forense⁹.

O grande diferencial, o que trouxe um notável avanço à espectrometria de massas, foram os métodos de ionização de amostra. Atualmente as inovações em espectrometria de massas têm permitido que a introdução da amostra e a ionização ocorram de maneira quase simultânea. Dessa forma, houve a ampliação do número e do tipo de compostos compatíveis com a espectrometria de massas⁹.

2.1.1.2 Fonte de ionização

A passagem da amostra pela fonte de ionização é a etapa que garante a ionização dos analitos da amostra antes de sua entrada no analisador de massas. Os maiores avanços da espectrometria de massas são devidos às inovações dessas técnicas de ionização que devem levar em conta as propriedades físico-químicas do analito e a energia transferida durante o processo de ionização. Algumas técnicas de ionização, por transferirem muita energia para a amostra, acabam por fragmentar parcialmente ou totalmente os analitos, dificultando a detecção de um íon característico de maneira intacta⁹.

Dentre as diversas técnicas de ionização existentes na EM a pioneira no processo foi a ionização por elétrons (EI -*Electron Ionization*). Sua união com a EM trouxe diversos benefícios, pois possibilitou a quantificação e identificação de compostos em misturas complexas, além da elucidação de compostos orgânicos. Nesse método as moléculas são ionizadas através da retirada de um elétron e, devido à grande quantidade de energia fornecida, ocorre também a fragmentação da molécula. Em relação às propriedades físico-químicas dos analitos compatíveis,

esse tipo de ionização está diretamente relacionada com a cromatografia gasosa devido a necessidade de trabalhar em alta temperatura e em alto vácuo⁹.

Como mencionado anteriormente, além de provocar a fragmentação das moléculas de interesse, o que nem sempre pode ser vantajoso, a EI está restrita a substâncias voláteis e termicamente estáveis. Dessa maneira, um pequeno número de analitos é compatível com essa técnica. Compostos com massas altas ou biomoléculas não podem ser analisadas por essa técnica. Devido a essa limitação, o estudo de outros métodos de ionização ganhou força até que em 1980, John Fenn, vencedor do prêmio Nobel de química de 2002, propôs o *Electrospray* (ESI) como uma alternativa nos processos de ionização em espectrometria de massas, trazendo, então, grande revolução nessa área¹¹.

2.1.1.2.1 Ionização por *Electrospray*

O *electrospray* se tornou a técnica de ionização mais importante na espectrometria de massas, pois permitiu a formação de moléculas carregadas (íons) em pressão atmosférica a partir de compostos polares e pouco voláteis em fase líquida. É uma técnica de ionização branda, provocando pouca (ou nenhuma) fragmentação dos analitos estudados⁹.

Na técnica ESI, a ionização do analito pode ocorrer por remoção de elétrons, captura de elétrons, protonação, desprotonação, formação de adutos ou transferência de espécies carregadas da fase condensada para a fase gasosa (*spray*)¹².

O processo de ionização por *electrospray* se dá pela passagem de um líquido através de um capilar de metal extremamente fino, onde é empregada uma alta tensão com formação de microgotas altamente carregadas. A nebulização ou secagem da solução é facilitada pela ajuda de um gás nebulizador, normalmente o nitrogênio. Na medida em que o solvente se evapora, a densidade de carga da superfície da molécula aumenta até que as forças repulsivas de Coulomb entre as cargas superficiais exceda as tensões superficiais, levando assim a divisões consecutivas da microgota inicial (Figura 5)^{9; 12}.

No decorrer do processo, finalmente, a gota conterá apenas moléculas que reterão parte da carga inicial, ou seja, irão formar íons protonados $(M + H)^+$ ou íons desprotonados $(M - H)^-$ ⁹.

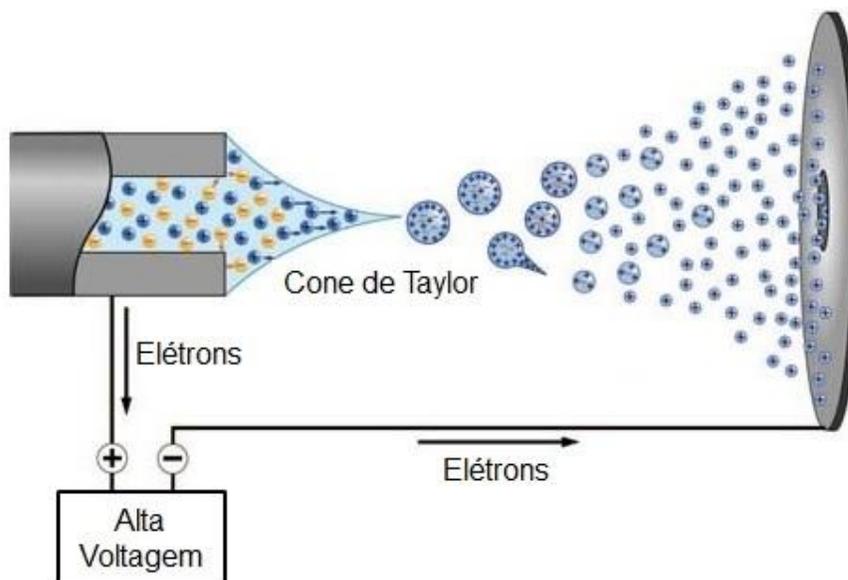


Figura 5: Esquema simplificado de uma fonte de ionização por *Electrospray*¹³.

Entretanto, ainda que a técnica ESI permita análises à temperatura e pressão ambientes, ainda há limitações quanto ao grande preparo de amostras aplicado. Esta técnica trabalha com amostras no estado líquido, sendo que para amostras sólidas e até para amostras líquidas complexas, há a necessidade de etapas de pré-tratamento que muitas vezes envolve alto gasto de insumos e tempo. Dessa maneira, outras técnicas de ionização ambiente (*DESI- Desorption Electrospray Ionization*, *MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, *EASI - Easy Ambient Sonic-spray Ionization*, *Paper Spray*, dentre outras), algumas com princípios parecidos com o ESI, foram surgindo e abrindo cada vez mais o leque de aplicações da espectrometria de massas⁹.

As técnicas de ionização ambiente são brandas e ocorrem à pressão atmosférica, além de permitirem a introdução direta da amostra, dispensando o uso de técnicas de separação prévias. Essas técnicas se caracterizam pela rápida e eficiente análise de amostras complexas com a possibilidade de aplicação em

amostras em diferentes estados físicos (ex.: sangue, tecidos, drogas) com mínima necessidade de tratamento⁹.

Dentre essas técnicas, especial atenção será dada ao *Paper Spray Ionization Mass Spectrometry* (PS-MS), que foi a técnica em destaque neste trabalho.

2.1.1.2.2 Ionização por Paper Spray

A técnica de ionização por *paper spray* surgiu em 2010 e foi proposta por Wang e colaboradores (2010) e desde então foi aplicada em diversos tipos de amostras¹⁴.

As características desta técnica que a tornaram atrativa em diferentes áreas foram a possibilidade de aplicação em matrizes complexas com, rapidez, simplicidade, baixo custo e eficiência¹⁵.

O esquema da Figura 6 demonstra de maneira simplificada a disposição e funcionamento de uma fonte *paper spray*.

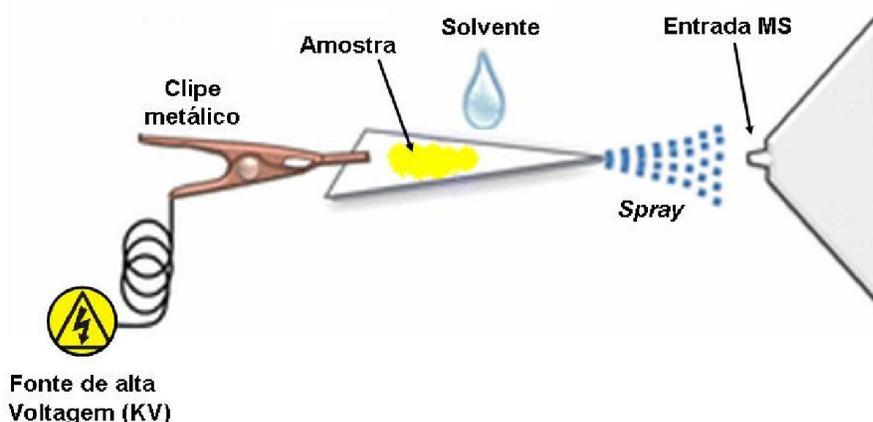


Figura 6: Esquema simplificado de uma fonte de ionização por *Paper Spray*¹⁶.

Construída de maneira simples, a fonte PS consiste na impregnação da amostra, seja líquida ou sólida, em um substrato poroso, normalmente papel cromatográfico, em formato triangular. Este triângulo, que será convencionalmente chamado de papel, é posicionado na frente da entrada do espectrômetro de massas com a distância ajustada de acordo com a necessidade, auxiliado por um clipe

metálico preso à base do papel triangular. Este clipe metálico está posicionado à uma base móvel ajustável nos eixos X, Y, Z para facilitar a adequação das distâncias e posicionamento do papel. Ao clipe metálico é acoplada uma fonte de alta voltagem, que pode ser até mesmo fornecida pelo próprio espectrômetro de massas.

Para o funcionamento da fonte e a obtenção de espectros, deve-se umedecer o papel com a adição de um solvente para promover a dessolvatação dos íons de maneira similar ao ESI e aplica-se a diferença de potencial a fim de promover a formação de gotículas carregadas. As gotículas de solvente contendo os analitos são então acumuladas na ponta do papel e, ao serem “expulsas”, um fino spray é formado. A PS, diferentemente do ESI, não necessita do auxílio de gases inertes para o processo de secagem do solvente. Ocorre com a evaporação natural do solvente e a repulsão elétrica das cargas presentes nessas gotículas aumenta ao ponto que os íons dessolvatados adentram ao espectrômetro de massas¹⁴.

O mecanismo *paper spray* já foi relatado na literatura por alguns autores que estudaram a robustez e confiabilidade do método avaliando a interferência de determinados fatores nas análises.

A formação do spray durante o processo PS-MS foi abordado por Espy *et al.*(2012) (Figura 7) que identificaram dois modos distintos de formação do spray. No Modo 1, o papel possui grande quantidade de solvente, favorecendo a formação de múltiplos cones de Taylor e gotículas de diâmetros maiores (1 a 2 μm). No modo 2, o sistema já se encontra pobre em solvente e devido a isso as gotículas formadas mantiveram-se em um único cone de Taylor e apresentaram diâmetros menores (<0,5 μm). Outra observação importante foi que no modo 1 foram registradas baixas correntes de íons, predominando então a ionização dos analitos por processos de transferência de prótons. Já no modo 2 notou-se uma alta corrente (~1A), favorecida pela ionização dos analitos por múltiplos processos, tais como: transferência de prótons por mecanismos ácido-base de Bronsted, formação de cátions e ânions radicais e também pela formação de adutos com espécies inorgânicas¹⁷.

A formação de múltiplos cones de Taylor na ponta do papel é responsável pela grande capacidade de transferência de cargas e ionização do *paper spray*. Os autores observaram ainda que parâmetros tais como a voltagem, o tipo de solvente,

a distância do papel até a entrada do espectrômetro, a disposição das microfibras e corte do papel influenciam no tamanho e velocidade das gotículas do *spray* e que estes têm impacto direto na eficiência de ionização dos analitos¹⁷.

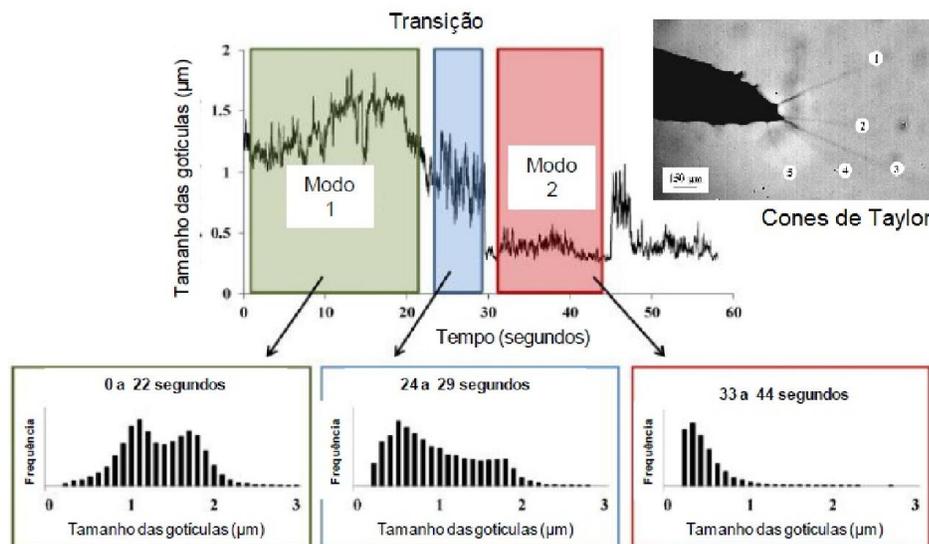


Figura 7: Modos de formação de spray e distribuição do tamanho das gotículas em PS-MS¹⁷.

O tipo de substrato foi analisado por Liu *et al.* (2010) que investigaram quatro tipos de papéis de filtro com tamanhos de poro diferentes, papel de fibra de vidro e papel cromatográfico. Utilizaram uma solução modelo de cocaína em metanol/água para avaliar os fatores. Concluiu-se que o melhor substrato foi o papel cromatográfico devido a menor presença de íons provenientes do papel e a obtenção de espectros com maior razão sinal/ruído, uma vez que este tipo de papel possui fibras orientadas e ordenadas que favorecem a percolação do solvente pelo papel e o direcionamento do *spray* para a entrada do espectrômetro de massas. Também foi avaliado a influência do posicionamento do papel em relação ao espectrômetro de massas. Os resultados foram avaliados quanto a intensidade do sinal analítico da cocaína para diversas posições do papel, concluindo-se que o posicionamento do papel não é um fator determinante na qualidade das análises¹⁴.

O formato e angulação do papel foram estudados por Yang *et al.* (2012) (Figura 8) que avaliaram a interferência desses fatores sobre a resposta de intensidade do sinal e voltagem no espectrômetro de massas. Observou-se que o

aumento do ângulo do papel triangular tornou necessário o aumento da voltagem aplicada para a formação do *spray*. Esse aumento também diminuiu o diâmetro do *spray*, diminuindo a quantidade de gotículas que adentraram o espectrômetro de massas e, conseqüentemente, reduzindo a intensidade do sinal analítico. O aumento do ângulo promoveu o aumento da quantidade de gotículas que adentraram o espectrômetro de massas, porém demonstrou que pequenos desvios na posição do papel frente à entrada do equipamento eram menos toleradas. Dessa forma, concluiu-se que a voltagem do *spray* aumentou à medida que o ângulo foi aumentado. Já o campo elétrico aumentou à medida que o ângulo diminuiu. Além disso, menores ângulos geram *sprays* mais estáveis e maior intensidade do sinal analítico. Este efeito foi mais pronunciado no papel com ângulo de 30°, pois o aumento da voltagem teve maior efeito sob a densidade de cargas na ponta do papel e para a formação de gotículas com menor diâmetro¹⁸.

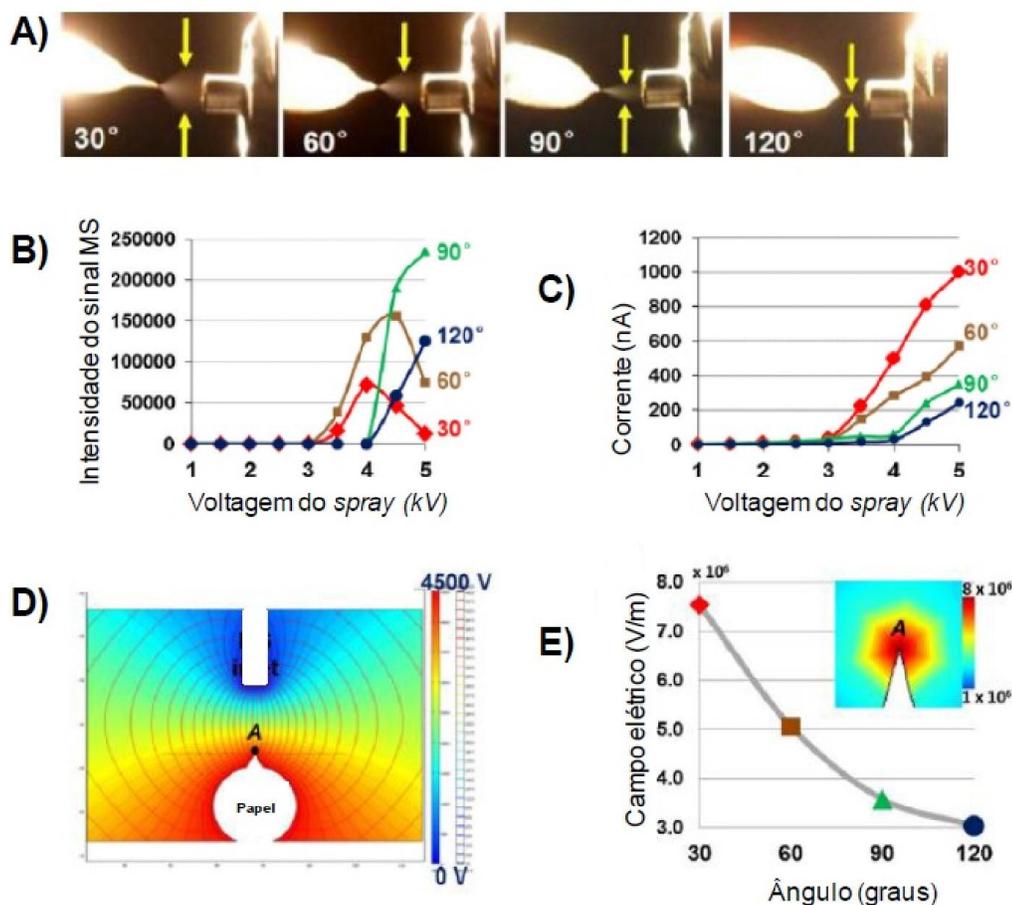


Figura 8: Efeitos da geometria do papel e da voltagem em análises PS-MS: a) Variação dos diâmetros do cone de Taylor, b) Variação da intensidade dos sinais, c) Variação da corrente dos sinais com a voltagem aplicada, d) Campo elétrico calculado para o papel com ângulo de 60° e e) Variação do campo elétrico¹⁸.

Vários trabalhos na literatura abordam diversos tipos de aplicação da técnica *paper spray*, seja em análises qualitativas, seja em análises quantitativas de amostras complexas. Dentre esses trabalhos destacam-se o PS-MS aplicado na determinação de fármacos em sangue e urina^{19; 20}, discriminação da origem de café²¹, análise direta de drogas de abuso em sangue e urina²², monitoramento de reações^{23; 24}, determinação de contaminantes em alimentos^{25; 26}, detecção de falsificações em cervejas²⁷, falsificação de documentos^{28; 29}.

Alguns artigos propuseram a obtenção de *fingerprints* de diferentes amostras por PS-MS^{21; 30; 31} sendo que esse tipo de análise apresenta vantagens como a simplicidade e rapidez de aquisição de espectros de massas. A comparação dos

perfis químicos pode ser feita visualmente, porém a grande quantidade de dados presentes nos espectros requer o auxílio de ferramentas capazes de extrair informações e facilitar a interpretação dos dados.

2.1.1.3 Analisadores de massas

A adição de carga permite que a espécie seja afetada por campos elétricos. Dessa maneira, após serem gerados na fonte de ionização, os íons adentram o equipamento e são encaminhados para uma região conhecida como analisador de massas, onde as razões m/z são separadas⁹.

Os tipos de analisadores mais utilizados são: quadrupolos (Q), armadilha de íons (IT- *Íon Trap*), tempo de voo (TOF – *Time of Flight*), setor elétrico (E) e setor magnético (B), ressonância ciclotrônica de íons com Transformada de Fourier (FT-ICR – *Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance*) e configurações híbridas (p. ex.: IT-TOF). Na Espectrometria de Massas Seqüencial (MS/MS) vários analisadores podem ser combinados em série [p. ex.: triploquadrupolo (QqQ)]. Estes arranjos permitem obter um espectro dos fragmentos de um íon selecionado no primeiro analisador⁹.

Neste trabalho foi utilizado o analisador do tipo *íon trap*. Neste analisador os íons são aprisionados dentro dele e são submetidos a um campo elétrico no seu interior. Este campo é capaz de manter os íons em uma órbita estável. Um potencial de rádio frequência (RF) é aplicado e os íons são então desestabilizados e expelidos para fora do analisador, de acordo com seus valores de m/z ⁹.

2.1.1.4 Detectores

Os íons, após a passagem pelo analisador de massas, alcançam o detector. O detector tem a função de detectar e amplificar o sinal da corrente de íons que vem do analisador e transferir o sinal correspondente para o sistema de processamento de dados. Entre os diferentes tipos de detectores encontram-se as placas fotográficas e os cilindros Faraday, que permitem a medida direta dos íons que chegam ao detector, as fotomultiplicadoras, multiplicadoras de elétrons e com arranjo em canais, que aumentam a intensidade do sinal, e ainda os detectores de carga, que reconhecem cargas em movimento⁹.

2.1.1.5 Tratamento de dados

Por fim, um computador dedicado ao espectrômetro de massas registra os dados de saída, convertendo-os em valores de m/z e intensidades, além de controlar também toda a instrumentação pela introdução de valores e variação de diversos parâmetros através de *softwares* específicos para tal⁹.

2.1.1.6 Espectrometria de massas em química forense

A espectrometria de massas tem aplicações em várias áreas da química, física, biologia, dentre outras áreas, e tem sido empregada com sucesso nas ciências forenses. A versatilidade da técnica que apresenta várias fontes de ionização que se adequam a diferentes tipos de amostras e estados físicos é uma excelente alternativa em análises forenses. Devido a isso, na literatura encontram-se trabalhos que aplicam a espectrometria de massas em diversas situações forenses conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Trabalhos que reportam a utilização da espectrometria de massas em química forense.

Aplicação forense	Análise	Matriz	Técnica
Documentoscopia	Autenticidade de documentos	Caneta esferográfica	DESI ³²
Documentoscopia	Envelhecimento de tintas de caneta	Caneta esferográfica	EASI ³³
Crimes sexuais	Identificação de impressões digitais	Lubrificante de preservativos	DESI ³⁴
Explosivos	Caracterização de explosivos	ANFO (Nitrato de amônio/óleo combustível)	ESI/EASI ³⁵
Autenticidade de alimentos	Adulteração de azeite	Azeite de oliva	ESI ³⁶
Toxicologia	Quantificação de drogas em cérebro	Cérebro humano	LC-MS ³⁷
Toxicologia	Determinação de cocaína em casos de overdose	Fígado humano	CG-MS ³⁸

2.1.2 Quimiometria

A quimiometria é uma disciplina que alia métodos matemáticos e estatísticos para extrair informações relevantes de dados obtidos quimicamente. A proposta é conseguir entender padrões e interpretar com mais clareza grandes conjuntos de dados obtidos em análises químicas³⁹.

Dentre as abordagens mais recorrentes da quimiometria estão os planejamentos de experimentos, modelos de classificação, calibração multivariada,

dentre outros, se tornando uma valiosa ferramenta para o tratamento de dados em combinação com os métodos clássicos de análises⁴⁰.

O avanço tecnológico e a evolução de computadores e métodos instrumentais contribuíram significativamente para a disseminação e desenvolvimento da quimiometria em diversas áreas do conhecimento tais como engenharia, física, biologia e outras⁴⁰.

A química analítica foi uma das áreas efetivamente beneficiadas com o crescimento dos métodos quimiométricos, pois, com a rápida obtenção de dados analíticos, e em grande quantidade, foi necessário o uso de ferramentas que possibilitassem a interpretação e uma visualização ampla e mais clara dos resultados em conjunto⁴¹.

A quimiometria pode ser subdividida em diferentes subáreas de acordo com o modo de extração e interpretação das informações químicas. No presente trabalho foram empregadas classificação supervisionada usando PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais) para a discriminação das classes das amostras de uísque e perfumes (originais e falsificados) e o PCA (Análise de Componentes Principais) para fazer uma prévia classificação das amostras de uísque.

2.1.2.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais é um dos métodos mais utilizados na quimiometria e pode ser considerada a base para a construção dos demais métodos quimiométricos, pois dá uma tendência inicial do comportamento do conjunto de dados por ser uma análise exploratória. Isso quer dizer que este método utiliza apenas a natureza dos dados instrumentais para classificá-los, sendo, também por esse motivo, categorizado como um método não supervisionado de classificação⁴¹.

A PCA é normalmente utilizada com o objetivo de possibilitar a visualização integral do conjunto de dados dando uma primeira ideia da similaridade ou diferença entre as amostras, além de permitir a detecção de *outliers* (amostras com comportamento atípico)⁴¹.

O princípio da PCA consiste em reduzir o número de variáveis das matrizes de dados, sem alterar as relações existentes entre as amostras, através da

construção de um novo sistema de eixos denominado componentes principais. Dessa maneira, é possível visualizar a natureza multivariada dos dados em poucas dimensões e, conseqüentemente, facilitando a interpretação dos resultados que serão apresentados de maneira agregada⁴¹.

A construção do modelo inicia-se pelo cálculo das componentes principais que dependem da organização dos dados em matrizes, de forma que nas linhas estejam dispostas as amostras e nas colunas estejam dispostas as variáveis, conforme esquematizado na Figura 9⁴¹.

Por definição, as componentes principais são traçadas nas direções de maior variabilidade dos dados e, teoricamente, o número de componentes é sempre igual ao número de variáveis. Entretanto, poucas componentes são responsáveis por grande parte da explicação do modelo⁴¹.

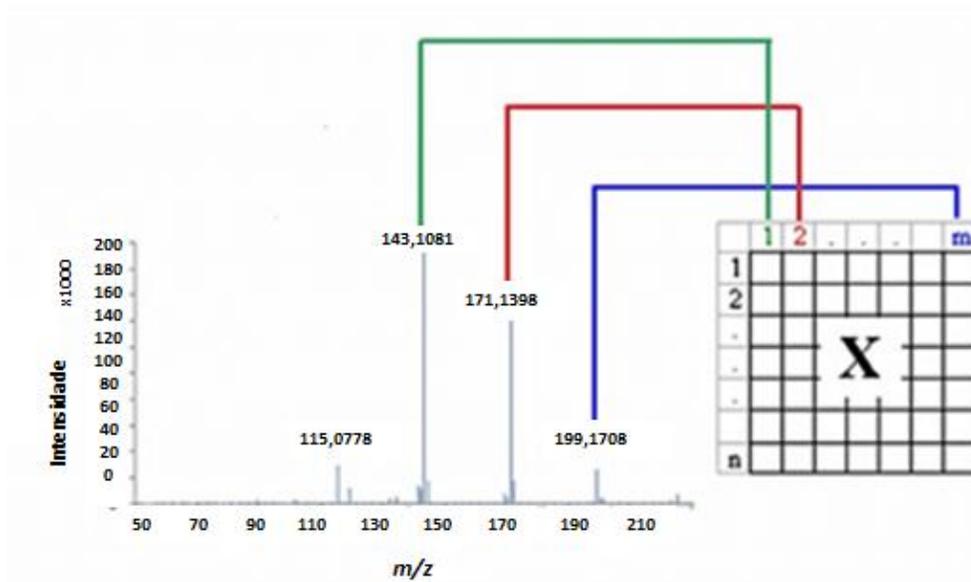


Figura 9: Princípio básico da análise PCA com dados oriundos de espectros de massas⁴².

2.1.2.2 Análise Discriminatória por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

A análise discriminatória por mínimos quadrados parciais é uma ferramenta de classificação supervisionada capaz de reconhecer diferenças entre grupos

conhecidos. As informações referentes às amostras são pré-determinadas em classes que são utilizadas juntamente com os dados analíticos gerados⁴³.

Nesse modelo, uma matriz X contém os dados analíticos e uma matriz y contém os valores codificados que representam as classes de interesse. Neste caso, se atribui o valor 1 para as amostras pertencentes à classe das amostras originais e 0 para as amostras falsificadas⁴⁴.

Essas matrizes são pré-processadas e decompostas para o cálculo de fatores (variáveis latentes) que estejam apontadas para a direção que seja a mais favorável para a discriminação das classes propostas. Na Figura 10 é apresentado um esquema representativo da construção de um modelo PLS-DA⁴⁴.

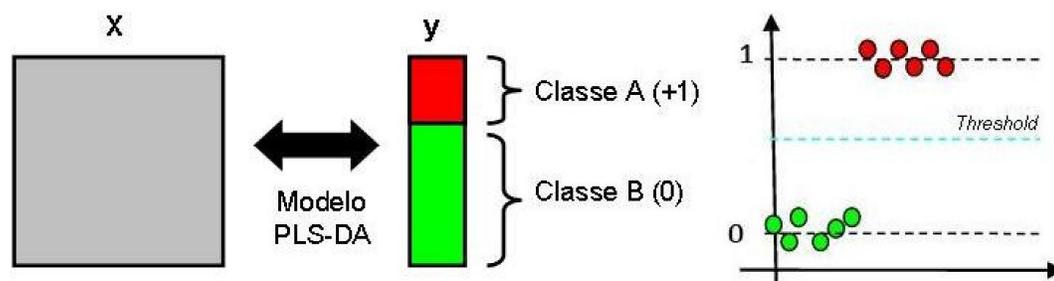


Figura 10: Princípio básico de uma análise PLS-DA⁴⁴.

Desta forma, no modelo PLS-DA as amostras que pertencerem à classe A ficarão preferencialmente dispersas em torno de 1 no gráfico de estimativa do valor de classe. Já as amostras que pertencerem à classe B ficarão preferencialmente dispersas em torno de 0, assim como pode-se observar na Figura 10. Os valores previstos pelo modelo PLS-DA não são exatamente 0 ou 1, mas sim uma aproximação desses valores. Assim, um limite (*threshold*) é estabelecido de tal maneira que as amostras que ficarem acima desse limite são classificadas como pertencentes à classe A e as que ficarem abaixo pertencentes à classe B⁴⁴.

Para a construção de modelos supervisionados como o PLS-DA, as amostras são separadas em dois conjuntos diferentes: o conjunto de treinamento conterá os dados das amostras que serão utilizadas para o cálculo do coeficiente de regressão do modelo e o conjunto de teste conterá amostras conhecidas que não foram empregadas para o cálculo dos parâmetros do modelo e serão utilizadas para

avaliar o seu desempenho, ou seja, se o modelo é adequado para discriminar os parâmetros desejados⁴⁴.

A seleção desses conjuntos de amostras deve ser feita de forma que haja a maior representatividade possível da variabilidade dos dados e de forma que as amostras de teste sejam bem representadas pelas amostras de treinamento. A construção de um modelo de regressão confiável e robusto depende desse parâmetro, portanto a escolha do critério de seleção é de grande importância para o sucesso do modelo. Neste trabalho, utilizou-se tanto a seleção manual das amostras, respeitando alguns pontos que serão explicitados mais a frente, quanto o algoritmo Kennard-Stone⁴⁴.

O algoritmo Kennard-Stone foi apresentado em 1961 e tem sido muito utilizado desde então devido a sua simplicidade de aplicação e adequação para a construção de modelos de regressão multivariados. Esse algoritmo baseia-se na seleção das amostras com base nas suas distâncias no espaço X definido pelas variáveis do conjunto de dados iniciando pela seleção das duas amostras com maior distância entre si. Para cada uma das amostras restantes, calcula-se a distância mínima em relação às amostras já selecionadas. Posteriormente, a amostra com a maior distância mínima é retida, e o procedimento é repetido até que um determinado número de amostras seja selecionado (convencionalmente 2/3 do total).⁴⁵

2.1.2.2.1 *Variáveis latentes*

A determinação do número de variáveis latentes é um fator relevante para a qualidade do modelo elaborado e, o número ideal dessas variáveis deve ser indicado através da validação cruzada. Este método é fundamentado na habilidade de previsão de um modelo construído por parte de um conjunto de dados, seguido pela previsão do restante do conjunto de dados, a qual é realizada pelo modelo construído. Por fim, os erros de classificação obtidos para as variáveis latentes estudadas são comparados e o menor valor, ou seja, aquele que produziu o menor erro de previsão sem perda significativa da variância dos dados, é escolhido como número ideal. Com isso, espera-se que o modelo contenha informações importantes do conjunto de dados e apresente boa habilidade de previsão sem incluir informações irrelevantes como ruídos e interferências⁴⁴.

2.1.2.2.2 Validação de modelos qualitativos

Para garantir a confiabilidade, precisão e eficácia de uma determinada metodologia é importante o emprego de testes e cálculos de validação. No caso de análises qualitativas, utiliza-se frequentemente a aplicação de figuras de mérito baseadas nos resultados das classificações das amostras (corretas e incorretas)⁴⁶.

Para avaliar a veracidade de métodos de classificação constrói-se uma tabela de contingência que apresentará os resultados das classificações das amostras conforme a Tabela 1. Sendo que o número de amostras classificadas corretamente como verdadeiras será chamado de verdadeiro positivo (VP), o número de amostras classificadas corretamente como falsas de verdadeiro negativo (VN), o número de amostras classificadas incorretamente como verdadeiras de falso positivo (FP) e o número de amostras classificadas incorretamente como falsas de falso negativo (FN)⁴⁶.

Tabela 2: Configuração típica de uma tabela de contingência.

		Status da Amostra (Predição)	
		Verdadeiro	Falso
Resultado Previsto	Verdadeiro	VP	FP
	Falso	VN	FN

A partir dos resultados apresentados pela tabela de contingência, calculam-se diversos outros parâmetros de mérito.

A sensibilidade (SEN) e a especificidade (ESP) representam a taxa de classificações corretas para cada classe e, quanto mais próximas de 100%, mais próximo do ideal estará o modelo. A taxa de falsos negativos (TFN) e taxa de falsos positivos (TFP) representam a razão de amostras classificadas incorretamente em relação às amostras de cada classe e quanto mais próximas de 0% mais próximo do ideal estará o modelo. A exatidão (EXA) representa a taxa de classificações corretas levando-se em consideração o número total de amostras. A confiabilidade (CON) indica o desempenho do método para a classificação das amostras considerando as

previsões corretas de cada classe independentemente. Ambos os parâmetros, quanto mais próximos de 100% estiverem, mais próximo do ideal estará o modelo⁴⁶.

A figura 11 apresenta as equações utilizadas nos cálculos das figuras de mérito descritas acima.

$$\begin{aligned} SEN &= \frac{VP}{VP + FN} & TFP &= \frac{FP}{VN + FP} \\ ESP &= \frac{VN}{VN + FP} & EXA &= \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \\ TFN &= \frac{FN}{VP + FN} & CON &= SEN + ESP - 1 \end{aligned}$$

Figura 11: Equações para o cálculo das figuras de mérito de modelos qualitativos⁴⁶.

O desempenho de modelos de classificação também pode ser avaliado através dos valores das áreas sob a curva dos receptores operacionais característicos (*Area Under Receiver Operating Characteristcs* - AUROC). Essas curvas conciliam a relação entre a sensibilidade e a especificidade do modelo⁴⁷.

Para tanto, a construção da curva AUROC é feita traçando-se um diagrama que represente a sensibilidade em função da taxa de falsos positivos (1-Especificidade) obtidos através de diversos valores de limites de decisão do método. A Figura 12 mostra um exemplo de uma curva AUROC⁴⁷.

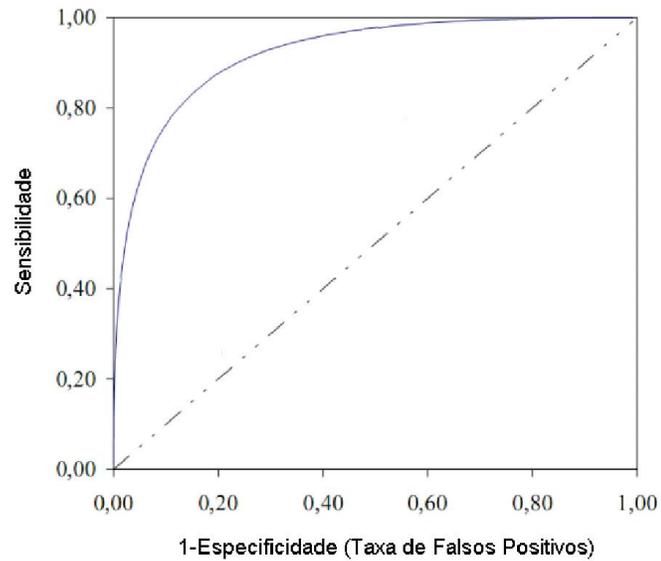


Figura 12: Exemplo de curva AUROC⁴⁷.

A análise gráfica de uma curva AUROC deve ser feita quanto à proximidade de seus valores a 1. Isso quer dizer que, quanto mais próximo de 1 estiver o AUROC, maior será a capacidade de discriminação entres as classes do modelo construído. Ou seja, valores próximos a 1 indicam que a sensibilidade está próxima de 100% e a taxa de falsos positivos próxima de 0%. Já quando o valor de AUROC estiver próximo de 0,5 o modelo fica inviabilizado, pois a probabilidade de se obter verdadeiros positivos será igual ou menor que a probabilidade de se obter falsos positivos para uma determinada classe⁴⁷.

CAPÍTULO 3

3.1 PERFUMES

Os aromas têm sido utilizados desde primórdios pela humanidade. Os perfumes surgiram a aproximadamente 800 mil anos atrás associados a rituais religiosos. Inicialmente, os aromas eram difundidos através da queima de incensos e, devido a essa utilização, o termo perfume surgiu a partir da junção das palavras latinas per (que significa origem de) e fumare (fumaça)⁴⁸.

O uso de fragrâncias pelos indivíduos iniciou-se posteriormente com a elite egípcia e, após a revolução industrial, os avanços na química permitiram que os perfumes atingissem o restante da humanidade⁴⁸.

O avanço das técnicas de extração permitiu que mais fontes odoríferas fossem exploradas e, conseqüentemente, houve o aumento dos tipos de perfume. Os óleos essenciais podem ser obtidos de folhas, flores, raízes, animais, cascas de árvores, frutas, especiarias, dentre outros⁴⁸.

A vasta possibilidade de exploração de fontes naturais permite uma diversificada e complexa composição dos perfumes atualmente. Porém, o baixo rendimento de extração de produtos como o jasmim (um quilograma de óleo essencial de jasmim requer cerca de oito milhões de flores) incentivou a procura e desenvolvimento de compostos sintéticos para compor as fragrâncias⁴⁸.

Os perfumes produzidos atualmente são, em sua maioria, compostos por produtos sintéticos. Alguns perfumes mais caros ainda têm óleos essenciais em sua composição, porém utilizam também compostos sintéticos para realçar algum aroma natural. A química na perfumaria trouxe grandes benefícios como o barateamento dos perfumes e, conseqüentemente, permitiram seu uso por um número maior de pessoas. Além disso, as fragrâncias sintéticas contribuíram para a preservação de plantas e animais que eram explorados por seus óleos essenciais⁴⁹.

Devido a sua grande utilização, os perfumes se tornaram um produto importante nas economias de diversos países. No Brasil, o setor da indústria química voltada para a produção de produtos de higiene pessoal, cosméticos e

perfumaria teve, em 2015, um faturamento líquido de impostos sobre vendas de 42,6 bilhões de reais⁵⁰.

A delicada produção e o custo das matérias primas garantiram aos perfumes um alto valor agregado. A comercialização desses produtos gera uma enorme lucratividade e, devido a isso, no Brasil e em outros países vem crescendo continuamente a falsificação de perfumes. Essa prática, além de trazer prejuízos, ainda pode causar danos à saúde do consumidor, uma vez que a produção não passa por nenhum rigor, podendo conter substâncias perigosas⁵¹.

Na literatura existem muitos trabalhos que abordam o risco de algumas substâncias alergênicas que podem estar presentes em perfumes falsificados, já que sua produção muitas vezes não passa por nenhuma inspeção de qualidade. Casos de neurotoxicidade, dermatites e alergias já foram relatados e o potencial risco à saúde dos usuários de perfumes falsificados é recorrentemente abordado^{51; 52}.

A elaboração de um perfume compreende basicamente os seguintes componentes: etanol desnaturado, essência, fixador, propileno glicol e água destilada. Sendo que a essência pode ser totalmente sintética, mistura de sintética e natural e totalmente natural e é a principal responsável pelo custo de um perfume⁴⁸. Podem ser adicionados também compostos como a benzofenona-2 para prevenir a degradação da fragrância, já que essa substância absorve radiação ultravioleta. O propileno glicol é adicionado para aumentar a solubilidade da essência no solvente e o fixador tem a função de retardar a evaporação da essência⁴⁸.

Usualmente, um perfume é constituído por uma combinação de fragrâncias as quais são distribuídas de acordo com uma pirâmide olfativa (Figura 13). As chamadas “notas” de um perfume variam de acordo com a volatilidade dos compostos⁴⁸.

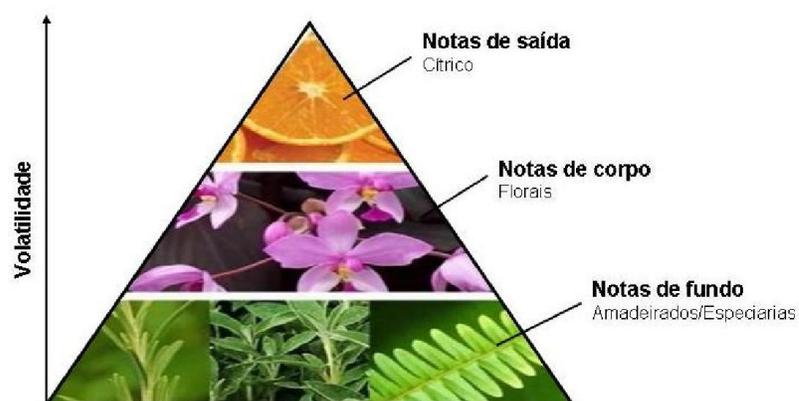


Figura 13: Pirâmide olfativa dos perfumes⁵³.

As notas de saída são as que se destacam primeiro, nos primeiros 15 minutos da evaporação e, geralmente são leves, frescas e com odor cítrico. As notas de corpo são como a “personalidade” do perfume. Correspondem à parte intermediária do perfume e levam um tempo maior para evaporar, de 3 a 4 horas. O odor é geralmente floral. As notas de fundo são as essências com maior poder de fixação e são percebidas depois de 4 a 5 horas de uso. O odor é geralmente amadeirado e denso⁴⁸.

Quanto às fragrâncias, o sistema moderno de classificação as organiza em 14 grupos conforme a volatilidade de seus compostos.



Figura 14: Escala de notas de um perfume e a participação de diferentes fragrâncias nessas notas⁴⁸.

A fragrância é o componente mais susceptível à falsificação devido a seu alto valor. Muitas vezes as falsificações ocorrem com a substituição da fragrância original por alguma de custo inferior e que não tem sua qualidade testada. É importante que uma fragrância receba testes de estabilidade, fotoquímico, alergênicos, etc., antes de ir para o mercado⁵¹.

Órgãos de inspeção são cada vez mais carentes de técnicas de análise compatíveis com essa finalidade, pois a alta demanda e a crescente qualidade das falsificações dificultam as análises de rotina e impulsionam os estudos voltados para a obtenção de métodos analíticos simples, rápidos, eficientes e confiáveis.

Dessa maneira, na literatura há diversos trabalhos focados em atestar a autenticidade de perfumes, seja quanto sua composição, seja a partir da comparação do perfil químico com exemplares originais.

R. Haddad *et al.* (2008), utilizaram a técnica *Easy Ambient Sonic-spray Ionization Mass Spectrometry* (EASI-MS) para a rápida detecção de falsificações em perfumes. Foram analisados perfumes originais e falsificados e foi obtido um método capaz de adquirir *fingerprints* de perfumes de maneira rápida, simples e reproduzível. Para a discriminação entre os exemplares originais e falsificados foram utilizadas ferramentas quimiométricas. A desvantagem desta técnica é a necessidade do uso

de um gás inerte para auxiliar na secagem do solvente, além de necessitar de um suporte de vidro para as análises, o que pode ser um limitador para o número de amostras⁵¹.

A espectrometria de massas já foi utilizada com outras fontes de ionização na obtenção de *fingerprints* em análises discriminatórias de perfumes. L. de Azevedo Marques *et al.* (2006) utilizaram o *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (ESI-MS) para tal finalidade e K. Chingin *et al.* (2008) aplicaram a técnica *Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (EESI-MS) na classificação e identificação de amostras de perfume falsificados^{54; 55}.

M. Cano *et al.* (2011) construíram um sensor chamado de “*electronic olfactory system* (EOS)” que utiliza uma câmara com seis tipos de sensores baseados em diferentes óxidos metálicos semicondutores para a rápida detecção e discriminação de falsificações em perfumes. Esse método é realizado com a obtenção de *fingerprints* dos perfumes originais, falsificados e inspirados (perfumes com formulação e embalagens diferentes das originais, porém com fragrâncias semelhantes a do perfume original). e avaliou dois métodos de preparo de amostra. Ao fim do estudo conclui-se que o sistema EOS obteve bons resultados na discriminação dos três tipos de perfume. Porém, a necessidade do preparo de amostra, mesmo que simples, pode ser um fator limitante devido ao elevado número de amostras. Além disso, a construção de um sistema sensorial pode ser laboriosa e cara⁵⁶.

Assim como M.Cano *et al.*, J. Gebicki *et al.* (2015) utilizaram um sensor chamado de “*Electronic nose*” para análises de autenticidade de perfumes. Gomes *et al.* (2016) classificaram perfumes como originais ou falsificados através da análise do etanol presente na composição dos dois tipos de produto bem como a análise dos íons sódio, potássio e cloreto por cromatografia gasosa e de troca iônica, respectivamente. Conclui-se que as amostras de perfume falsificadas apresentam teores de etanol menores que as originais e teores de cloreto maiores que as originais. Os dados foram tratados com ferramentas quimiométricas e obteve-se um método eficiente para a diferenciação de amostras originais e falsificadas. Esse método, apesar de apresentar bons resultados, necessita de duas técnicas cromatográficas diferentes que, além de terem custo elevado, tem um tempo de análise longo^{57; 58}.

A composição e detecção de compostos alergênicos em perfumes também é um tema bastante abordado na literatura. Sendo que a principal técnica aplicada para análises desse tipo é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas ^{52; 59; 60; 61; 62}.

3.2 PRODUÇÃO DE PERFUMES

Como mencionado anteriormente, a composição básica de um perfume compreende o solvente, majoritariamente etanol, fragrâncias, propileno glicol, fixadores, que podem ser adicionados ou até mesmo naturalmente presentes nas fragrâncias, água, produtos para proteção a raios UV e outros.

Dentre esses componentes, as fragrâncias são a de maior importância, pois são a “personalidade” e a característica principal de um perfume. Além disso, a obtenção das fragrâncias no processo de produção de um perfume é a etapa que requer maior trabalho e atenção⁴⁹.

Em meio aos diversos tipos de fragrâncias podemos destacar os óleos essenciais, substâncias naturais, voláteis e aromáticas desempenham inúmeras funções dependendo da sua localização na planta. Estes óleos podem ser obtidos a partir de métodos de extração, sendo que alguns dos métodos mais utilizados serão descritos brevemente⁶³.

3.2.1 Expressão à frio

Este método é geralmente utilizado para a extração de óleos essenciais cítricos, presentes principalmente nas cascas de frutas cítricas. Nesse método, as cascas são submetidas a prensagem a frio e o líquido gerado é coletado. A vantagem da expressão à frio é que os óleos essenciais não são submetidos a altas temperaturas o que, devido a sua delicadeza, pode degradar alguns componentes⁶³.

3.2.2 Destilação por arraste a vapor

Esse tipo de destilação é utilizado para isolar os compostos voláteis da planta separando-os das partes insolúveis da planta em água. Devido ao aquecimento e pressão nem todos os tipos de plantas podem ser submetidas a esse método de extração. Neste processo, o vapor de água circula através da planta forçando a

liberação de seus óleos essenciais pela quebra das bolsas intercelulares onde ficam armazenados. O óleo fica misturado à água que são juntamente condensados. Depois, óleo é separado por decantação e coletado⁶³.

3.2.3 Extração por solventes voláteis

Um solvente seletivo, que seja capaz de dissolver rapidamente e completamente os compostos odoríferos da planta, atóxico e com baixo ponto de ebulição é escolhido. A planta é colocada em um extrator e passa por uma seqüência de lavagens com solventes. A mistura de extrato e solvente é, então, concentrada e parcialmente destilada originando um produto que é misturado ao álcool. Após a evaporação do álcool obtém-se o óleo essencial puro. Esse método é geralmente empregado em plantas delicadas como flores, pois apresenta um rendimento maior que os outros métodos⁶³.

3.2.4 Dióxido de carbono ou CO₂ supercrítico

Neste processo o dióxido de carbono é utilizado sob pressão e em baixa temperatura deixando-o em um estado supercrítico. As plantas são misturadas ao CO₂ supercrítico que, ao retornar ao seu estado gasoso, deixa o óleo essencial puro e sem resíduos de solvente. Este método mantém a integridade dos compostos ativos da planta, sendo de grande utilidade para plantas delicadas e sensíveis⁶³.

3.2.5 Enfloração

É um processo feito artesanalmente e em pequenas quantidades, é difícil, demorado e muito caro, pois consiste na aplicação de pétalas de flores sobre gordura animal para que esta absorva os óleos essenciais. Em seqüência, a gordura é tratada com álcool que, devido a sua maior afinidade com os perfumes, os extrai deixando um extrato puro do óleo essencial desejado. Este método é geralmente aplicado em flores que tenham baixa concentração de óleo essencial e que sejam sensíveis a temperaturas elevadas⁶³.

Depois da extração do óleo essencial, ou da síntese de uma fragrância em laboratório, a elaboração do perfume para uso pessoal consiste na adição dos outros componentes já listados anteriormente em quantidades pré-determinadas,

sendo que a fragrância geralmente é uma mistura de várias matérias primas diferentes escolhidas para criar um aroma único e harmonioso. O produto é então envasado geralmente em frascos de vidro, e comercializado⁶³.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

Um total de 60 amostras de perfume foram analisadas, sendo que este total compreende amostras originais e falsificadas.

Os perfumes analisados neste trabalho são da marca Boticário, uma marca bastante popular no Brasil. Além da sua popularidade, a empresa Boticário destaca-se por ser a maior rede de franquias do mundo, produzindo cosméticos com elevado padrão de qualidade⁶⁴.

As amostras originais foram coletadas em três lojas físicas da cidade de Belo Horizonte e as amostras falsificadas foram objetos de apreensão pela Polícia Civil de São Paulo. A Tabela 3 apresenta a distribuição das amostras.

Tabela 3: Quantidade e nome das amostras de perfumes originais e falsificados.

Marca	Código de identificação	Amostras originais (Lotes diferentes)	Amostras falsificadas
Arbo	AB	3	2
Egeo Dolce	ED	3	4
Egeo Feminino	EW	3	1
Egeo Masculino	EM	3	3
Floratta in Blue	FB	2	3
Floratta in Rose	FR	3	2
Malbec	MB	3	8
Portinari	PT	3	3
Quasar Azul	QA	3	4
Quasar Vermelho	QV	3	1
	TOTAL	29	31

Para cada perfume original abordado neste estudo foram obtidas amostras de três lotes diferentes para incluir possíveis pequenas variações na elaboração dos produtos ou na armazenagem dos mesmos. Além de poder englobar as variações das amostras, a inclusão de lotes diferentes tem por objetivo aumentar a robustez do modelo quimiométrico.

3.3.1 Materiais e reagentes

O solvente utilizado para as análises no PS-MS foi metanol de grau HPLC, da marca J.T. Baker *Chemicals* (Center Valley, Pennsylvania, EUA). Como suporte para as amostras nas análises PS-MS, foi utilizado papel cromatográfico grau 1 da marca Whatman *International Ltd* (Maidstone, England) cortado com uma tesoura em

formato triangular (10 mm de altura e 5 mm de base) e posicionado à aproximadamente 1 cm da entrada do espectrômetro de massas.

3.3.2 Instrumentação

As amostras foram coletadas em tubos plásticos de fundo cônico do tipo “Eppendorf” que ficaram fechados até o momento das análises.

Para a aquisição dos espectros de massas, foi utilizado um equipamento LCQ FLEET da Thermo Scientific (San Jose, Califórnia, EUA) com analisador de massas de baixa resolução do tipo *ion trap*. A fonte de ionização *paper spray* utilizada foi construída no laboratório (Figura 15).

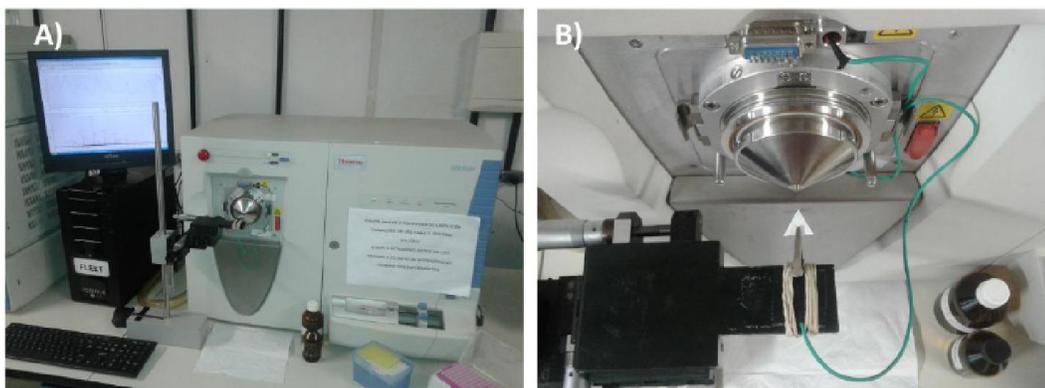


Figura 15: Aparato instrumental utilizado para obtenção dos espectros PS-MS: A) modelo LCQ FLEET da Thermo Scientific com analisador do tipo *ion trap* e B) Detalhes da fonte de ionização *paper spray*.

A fonte consiste em uma plataforma (X, Y e Z) ajustável para melhor posicionamento do papel na entrada do espectrômetro de massas. O papel é preso a um clipe metálico ligado a fonte de alta tensão do espectrômetro de massas por um fio de cobre.

Foi escolhido um perfume como modelo para avaliar variáveis como: distância do papel à fonte, tamanho do triângulo, volume do solvente, diferença de potencial aplicada, volume de amostra e modo de aquisição dos espectros (positivo ou negativo).

As condições instrumentais do espectrômetro de massas com a fonte *paper spray* foram selecionadas depois de vários testes de otimização visando a obtenção de espectros de massas mais limpos e reprodutíveis.

Dessa maneira, as melhores condições para a análise dos perfumes foram: potencial do PS-MS de + 4,5 kV, temperatura do capilar 275 °C, voltagem do capilar 35 V, voltagem das lentes 65 V, distância do papel à entrada do espectrômetro de 1,0 cm e faixa de massas de 150 – 1000 *m/z*.

As análises foram executadas de modo aleatório. Não houve nenhum tipo de pré-tratamento das amostras, sendo que as mesmas foram transferidas do tubo “Eppendorf”, onde estavam armazenadas, diretamente para o papel no momento da análise.

Foram utilizadas alíquotas de 10 µL de cada perfume, e transferidas para o papel que estava previamente preso ao clipe metálico ligado à fonte de alta tensão e corretamente posicionado na frente do espectrômetro de massas. Em seguida, 30 µL de metanol foi adicionado ao papel e acionada a fonte de potencial para a aquisição dos espectros de massas após o processamento de 30 microscans.

O software utilizado foi o Xcalibur 2.1.0 - Thermo Fisher Scientific (San Jose, Califórnia, EUA).

3.3.3 Métodos quimiométricos

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi executada no software MATLAB 7.9.0.529 (Natick, Massachusetts, EUA) com adição de um pacote de métodos quimiométricos pela instalação do PLS Toolbox 5.2.2 (Manson, Washington, Estados Unidos da América).

Para a construção do modelo PLS-DA, além da matriz X também foi utilizado um vetor y (60x1) contendo as informações qualitativas codificadas referentes aos perfumes originais e falsificadas. Sendo que as amostras originais receberam atribuições iguais a 1 e as amostras falsificadas rotuladas como 0.

As amostras para o conjunto de treinamento e teste foram selecionadas manualmente, sendo que cerca de 2/3 das amostras foram para o conjunto de treinamento e 1/3 para o conjunto teste. Os dados foram centrados na média e o

melhor modelo foi construído com duas variáveis latentes, escolhidas por meio da validação cruzada no modo subconjuntos aleatórios com 10 *splits* e 20 interações.

3.3.3.1 Figuras de mérito para a validação dos modelos PLS-DA

A partir da tabela de contingência gerada pelo modelo PLS-DA calculou-se as figuras de mérito para avaliação de seu desempenho, tais como: taxa de falsos negativos (TFN), taxa de falsos positivos (TFP), taxa de verdadeiros positivos ou sensibilidade (SEN), taxa de verdadeiros negativos ou especificidade (ESP), exatidão (EXA) e confiabilidade (CON). As medidas de áreas sob as curvas AUROC foram realizadas pelo PLS Toolbox 5.2.2 após a construção dos modelos.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de massas dos *fingerprints* dos perfumes foram obtidos após a otimização dos parâmetros do equipamento. As análises foram realizadas no modo positivo de ionização, pois neste modo os espectros de massas foram obtidos com maior qualidade (maior relação sinal/ruído) do que no modo negativo de ionização. A Figura 16 apresenta espectros de massas (PS (+) – MS) representativos dos pares de amostras (original e falsificado) dos perfumes abordados neste trabalho. Algumas marcas de perfume tinham mais de um exemplar falsificado, porém será apresentado apenas um espectro de massas de um desses exemplares para fins de comparação.

Embora haja íons coincidentes em perfumes de marcas diferentes, é possível notar a grande variabilidade e complexidade da composição dos perfumes originais.

Em todos os pares é notável a diferença entre os PS (+) – MS dos perfumes originais e falsificados. Novamente uma simples comparação visual é parâmetro suficiente para classificar um perfume como original ou falsificado.

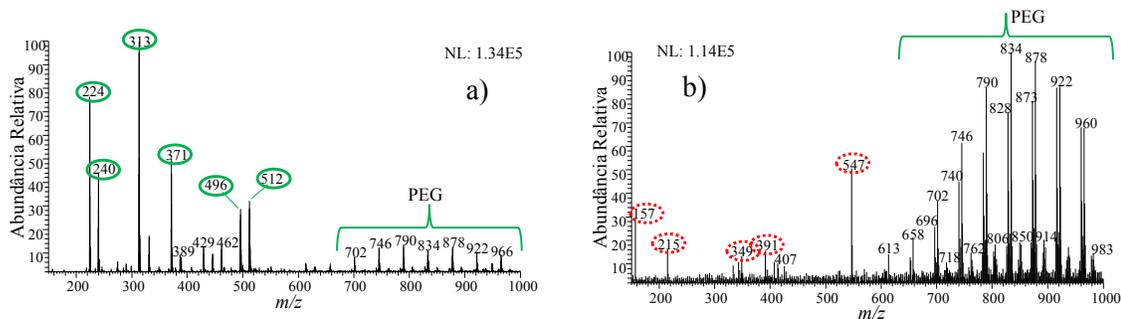


Figura 16: PS (+) – MS obtidos representativos do perfume Arbo original (a) e falsificado (b).

A análise visual dos PS (+) – MS permite a percepção clara das diferenças encontradas nos espectros de massas e nos leva a inferir as prováveis formulações utilizadas na fabricação dos perfumes.

Os íons mais abundantes na Figura 16 de m/z 224, 240, 313, 371, 496, 512 e o conjunto de íons entre m/z 614-966, separados por 44 unidades de massa, os quais sugerem a presença de um polímero polietoxilado com aduto de amônio, constituem a assinatura química do perfume Arbo Original (Figura 16a). Esses íons correspondem, provavelmente, a moléculas protonadas de compostos predominantes da composição do perfume. Em contrapartida, esses mesmos íons característicos da autenticidade já não estão presentes no PS (+) – MS do perfume falsificado. A mudança do perfil característico é um diagnóstico inequívoco da inidoneidade do perfume, uma vez que os íons mais abundantes nesse caso são os de m/z 157, 215, 349, 391, 547 e o grupo de íons separados por 44 unidades de massa. O polímero continua presente PS (+) – MS do perfume Arbo falsificado (Figura 16b), porém com intensidade maior do que no PS (+) – MS do perfume original (Figura 16a). A presença de polímeros polietoxilados já foi relatada na literatura⁵¹ e sugere o emprego do composto polietileno glicol (PEG), que é frequentemente encontrado na formulação de perfumes de baixa qualidade como um emulsificante. A alta intensidade desses íons no espectro de massas (Figura 16a e 16b) é um possível indício da utilização desse insumo em maior quantidade na fabricação do perfume falsificado.

O mesmo perfil foi observado para as outras amostras desse mesmo perfume original de frascos diferentes, evidenciando a reprodutibilidade da técnica. Na Figura

17 os espectros obtidos das amostras de três lotes diferentes foram sobrepostos para facilitar a visualização. É possível notar que apesar de algumas diferenças nos PS (+) – MS, a técnica se apresentou reprodutível, mesmo entre amostras de lotes distintos.

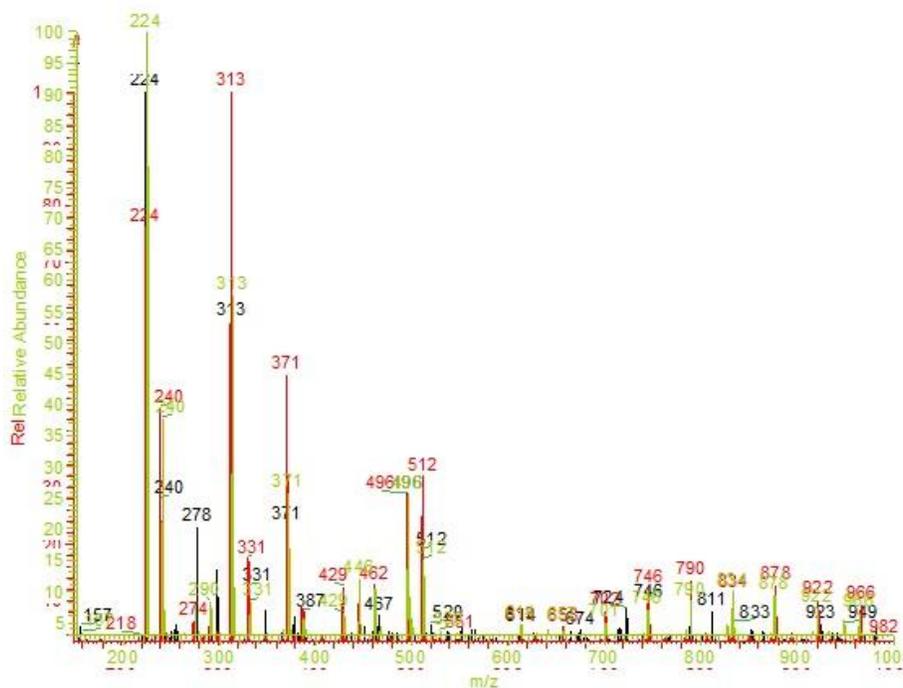


Figura 17: Sobreposição dos PS (+) – MS obtidos para o perfume Arbo de três lotes diferentes.

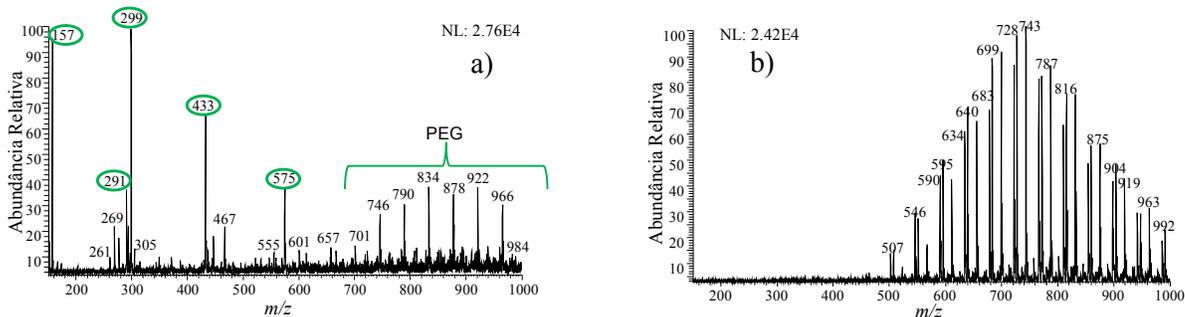


Figura 18: PS (+) – MS obtidos representativos do perfume Egeo Dolce original (a) e falsificado (b).

Os íons de maior intensidade de m/z 157, 291, 299, 433, 575 e o conjunto de íons de massa m/z 701-966, separados por 44 unidades, constituem a assinatura química do perfume Egeo Dolce original. O mesmo perfil foi observado para as outras amostras desse mesmo perfume de lotes diferentes, evidenciando a reprodutibilidade da técnica. A Figura 18 mostra o espectro de massas que representa o *fingerprint* de uma amostra falsificada e comercializada como o perfume Egeo Dolce. É notável, a partir da inspeção visual dos espectros de massas, a diferença nos perfis dos dois perfumes. Os íons característicos de maior intensidade presentes no PS (+) – MS do perfume original (Figura 18a) já não aparecem no perfume falsificado (Figura 18b). Sendo que os íons de maior intensidade nesse caso são característicos cadeias poliméricas protonadas distintamente com adutos de sódio ou amônio.

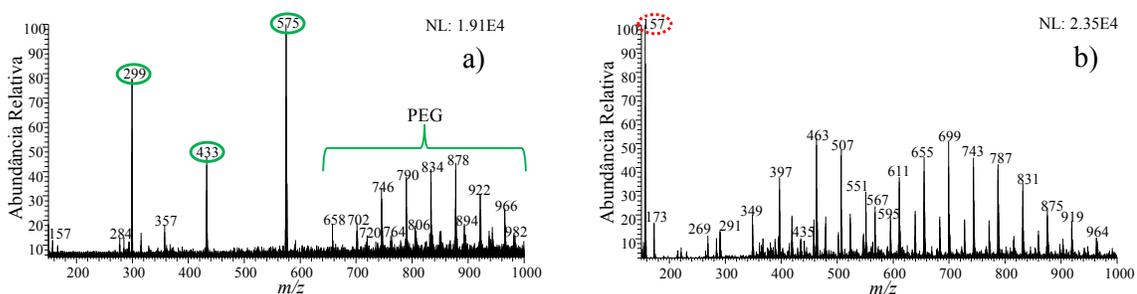


Figura 19: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Egeo Feminino original (a) e falsificado (b).

A Figura 19 apresenta os PS (+) – MS do perfume Egeo feminino, original (Figura 19a) e falsificado (Figura 19b), sendo que o mesmo comportamento foi observado. Os espectros de massas foram muito diferentes para os dois tipos de amostras. Para o exemplar original, os íons característicos foram 299, 433, 575 e o grupo de íons de massa m/z 658-966, separados por 44 unidades. Já o PS (+) – MS da amostra falsificada apresentou o íon de m/z 157 com grande intensidade e grupos de íons referentes a duas cadeias poliméricas distintas.

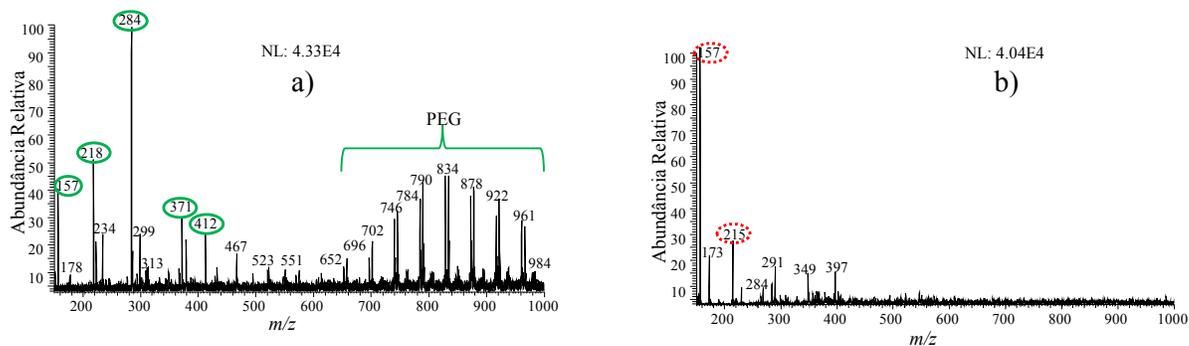


Figura 20: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Egeo Masculino original (a) e falsificado (b).

No PS (+) – MS do perfume Egeo Masculino, os íons mais intensos foram os de m/z 157, 218, 284, 371, 412 e um grupo de íons com m/z entre 652-984 referentes a duas cadeias poliméricas distintas. O PS (+) – MS do perfume falsificado não apresentou os polímeros observados na amostra original e os íons mais intensos foram os de m/z 157 e 215. O íon de m/z 157 é coincidente nos dois espectros de massas (Figuras 20a e 20b), porém no perfume falsificado sua intensidade é maior.

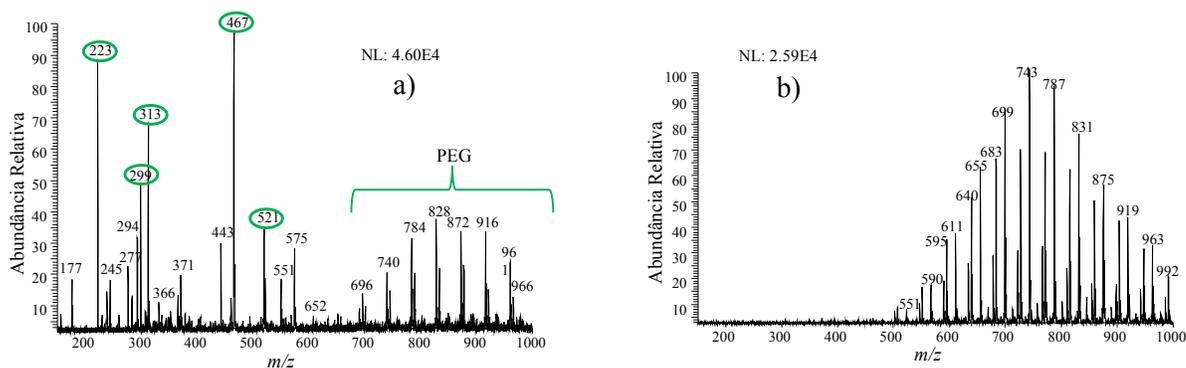


Figura 21: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Floratta in Blue original (a) e falsificado (b).

No PS (+) – MS do perfume Floratta in Blue pode-se observar os íons com intensidades elevadas (m/z 223, 299, 313, 467, 521) e o mesmo polímero presente nos outros perfumes originais. O PEG está aparentemente presente na composição de todos os perfumes originais empregados neste trabalho, porém sua intensidade é variável entre eles. O perfume falsificado não apresenta nenhum dos íons

característicos do perfume original com exceção do polímero PEG que está agregado a uma segunda cadeia polimérica.

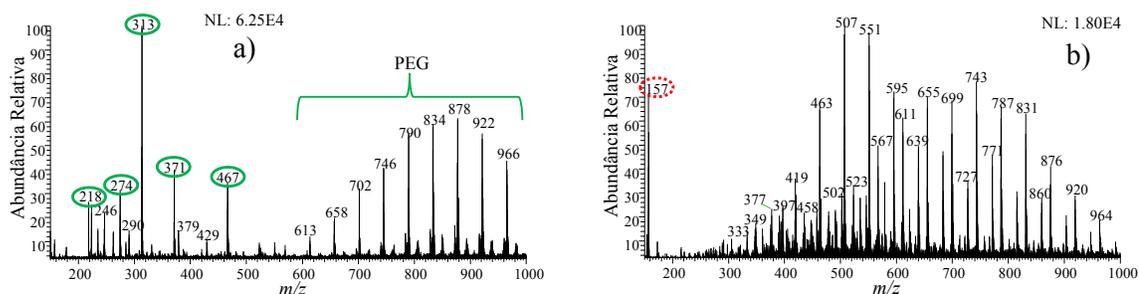


Figura 22: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Floratta in Rose original (a) e falsificado (b).

O PS (+) – MS do perfume Floratta in Rose apresentou os íons de m/z 218, 274, 313, 371, 467 com maior intensidade, além do PEG. O perfume falsificado não apresentou nenhum dos íons característicos do perfume original, tendo os íons de m/z 157, 507 e 551 mais intensos. Além disso, a distribuição dos íons indica a possível presença de dois polímeros diferentes do encontrado nos outros perfumes.

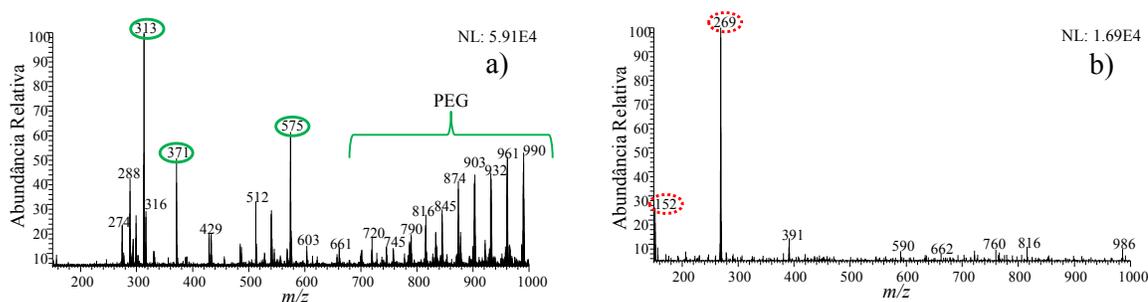


Figura 23: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Malbec original (a) e falsificado (b).

O PS (+) – MS do perfume Malbec, além do PEG, que é comum a todos, tem os íons de m/z 313, 371, 575 com maior intensidade. A amostra falsificada não apresenta nenhum dos íons característicos do perfume original e tem apenas dois íons com intensidade considerável: m/z 152 e 269.

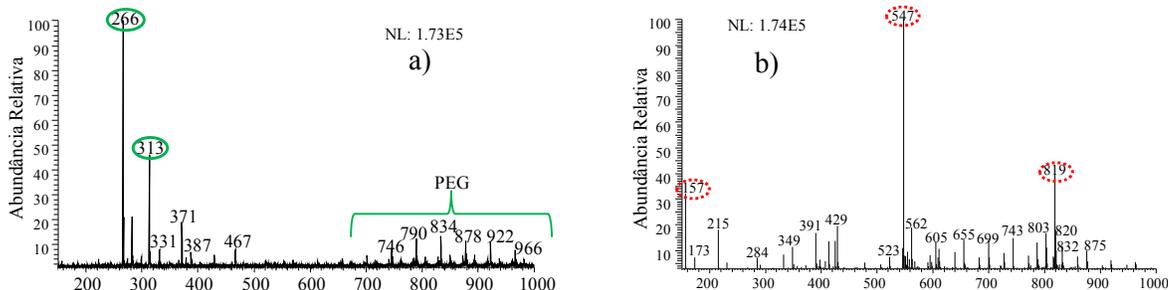


Figura 24: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Portinari original (a) e falsificado (b).

O PS (+) – MS do perfume Portinari original apresenta os íons do polímero PEG com baixa intensidade e os íons de m/z 266 e 313 como principais (Figura 24a). Já o PS (+) – MS do perfume falsificado (Figura 24b) mostrou os íons de m/z 157, 547 e 819 presentes em maior abundância.

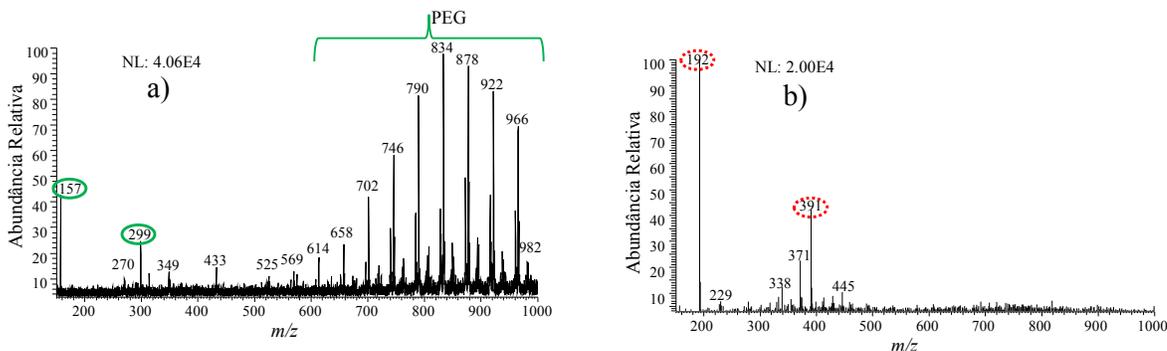


Figura 25: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Quasar Azul original (a) e falsificado (b).

O PS (+) – MS do perfume Quasar Azul apresentou os íons característicos do PEG e os íons de m/z 157 e 299 como os mais intensos (Figura 25a). Já o PS (+) – MS do perfume falsificado tem os íons de m/z 192 e 391 presentes em maior abundância (Figura 25b).

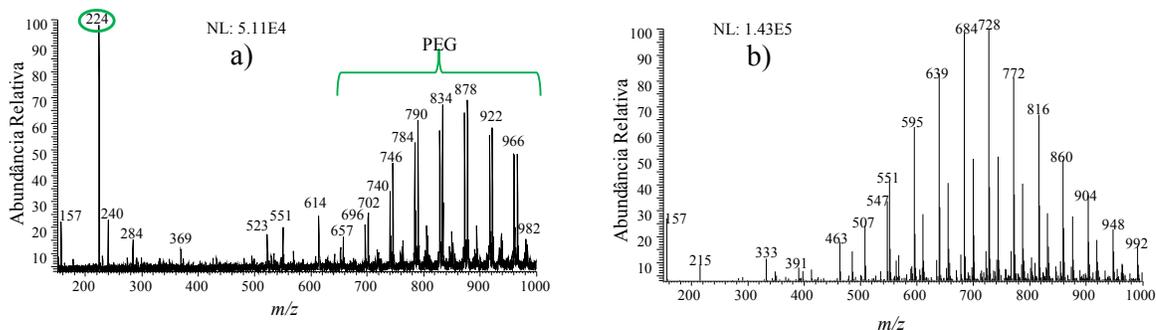


Figura 26: PS (+) – MS representativos obtidos do perfume Quasar Vermelho original (a) e falsificado (b).

O PS (+) – MS do perfume Quasar Vermelho apresentou os íons típicos do PEG e o íon de m/z 224 como o mais intenso. Já PS (+) – MS do perfume falsificado mostrou apenas os íons referentes a uma cadeia polimérica, em destaque no espectro (Figura 26b).

Esses íons destacados podem ser considerados os marcadores químicos dos perfumes originais pois, considerando as variações instrumentais, são os mesmos para os perfumes de lotes diferentes. Isso é possível devido ao controle de qualidade aplicado na produção desses cosméticos. No caso dos falsificados, a diversidade de produtores e a falta de rigor na fabricação não permite a atribuição de íons marcadores para eles. Dessa forma, utiliza-se o perfil dos originais como um padrão e, em caso de amostras suspeitas, compara-se o espectro de massas obtido atentando-se para as variações nesses marcadores.

Outros parâmetros, perceptíveis ao consumidor, menos específicos podem também ser indicativos da falsificação do perfume como odor, fixação, aparência do líquido ou do frasco, selos, caixa, etc. Porém, com o avanço das técnicas e da habilidade dos adulteradores, fica cada vez mais difícil perceber uma falsificação apenas com esses dados. Dessa maneira, a análise química e comparativa dos espectros de massas característicos dos perfumes oferece uma prova irrefutável de autenticidade e garantia do produto.

A análise por espectrometria de massas, além de poder ser utilizada para garantir a autenticidade do produto, ainda pode ser ferramenta importante no diagnóstico da presença de compostos potencialmente danosos à saúde que podem ser utilizados na fabricação de perfumes falsificados. A produção desses perfumes

não passa por nenhum tipo de controle de qualidade, sanitária ou de higiene, podendo conter compostos perigosos. A obtenção de *fingerprints* por *paper spray* pode ser aliada à espectrometria de massas sequencial promovendo a fragmentação dos compostos e sua provável identificação. Neste trabalho, será apresentada, posteriormente, uma tabela com algumas possíveis atribuições a alguns íons mais frequentemente encontrados nos espectros dos perfumes feitas com base na literatura.

A Figura 27 mostra três amostras falsificadas comercializadas como o perfume Malbec. É possível notar a grande diversidade dos perfis para cada amostra, evidenciando novamente a falta de rigor no preparo desses perfumes. Além disso, existem várias fontes de falsificações, sendo que cada produtor utiliza insumos e modos de preparo diferentes. Isso corrobora mais ainda a afirmação de que as amostras falsificadas têm muitas distinções nos seus perfis químicos.

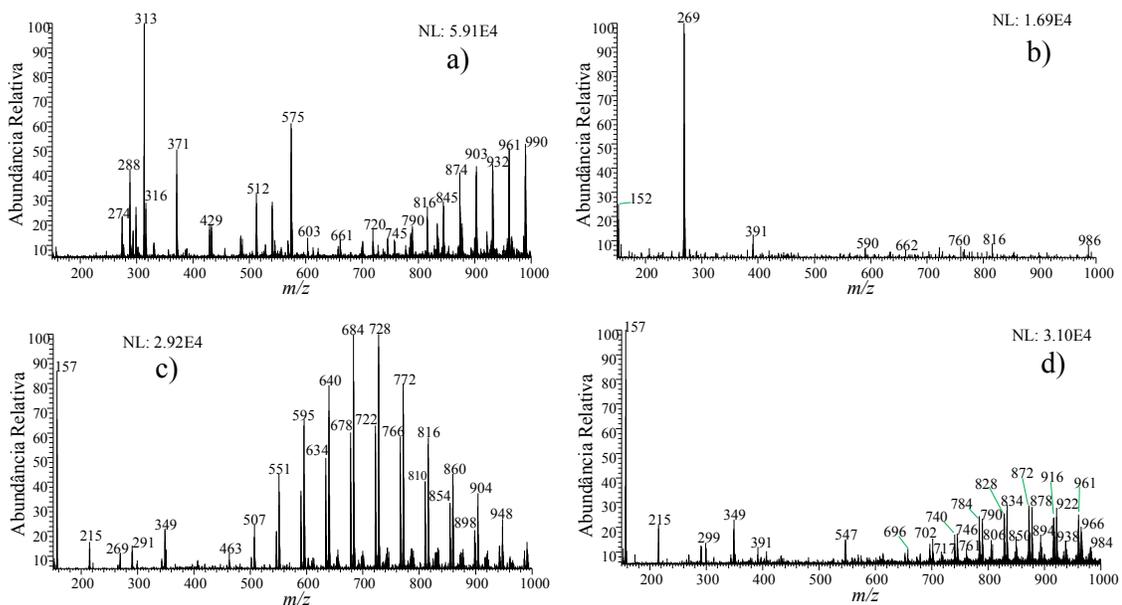


Figura 27: Espectros do perfume Malbec Original (a) e três amostras falsificadas da mesma marca (b) (c) e (d).

A variabilidade das amostras falsificadas requer um método analítico capaz de lidar com essa variedade de fatores envolvidos e, mesmo assim, oferecer resultados confiáveis quanto à autenticidade ou não do produto investigado. Assim, apesar de a comparação visual ser suficiente para a diferenciação de amostras de

perfumes, em muitos casos essa caracterização não é tão simples. Espectros de massas fornecem um grande número de dados analíticos que dificultam a visualização de características de um grande grupo de amostras. Dessa maneira, a análise de dados de maneira multivariada é uma ferramenta importante e de grande utilidade para a classificação de grupos de amostras. Para uma visualização mais uniforme e agrupada de todo o conjunto de dados, foram construídos dois modelos quimiométricos (PCA e PLS-DA).

3.4.1 Modelo PCA

Para perceber diferenças e padrões naturais entre amostras foi elaborado um modelo PCA. Os dados foram centrados na média e selecionou-se as duas componentes principais que representaram 64,09% da variância total. Não foi observado tendência significativa nos PC's restantes, portanto, nenhuma outra componente foi incluída na discussão.

A Figura 28 ilustra o gráfico de escores (PC1 versus PC2) ao tratar os dados obtidos por PS (+) – MS. É possível notar que PC1 não foi capaz de discriminar entre amostras autênticas e falsificadas. No entanto, em PC2 houve uma discriminação razoável uma vez que os perfumes autênticos apresentaram uma tendência de valores mais negativos na PC2, em oposição a amostras falsas. Observou-se também que as amostras falsificadas estão mais dispersas neste gráfico do que as amostras autênticas o que evidencia a grande distinção e variabilidade na fabricação dos perfumes falsificados.

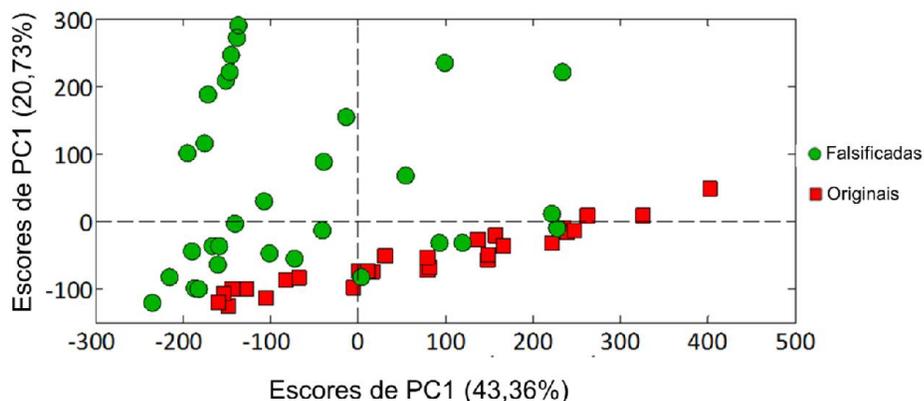


Figura 28: Escores de PC1 e PC2 obtidos com os dados de PS (+) - MS das as amostras de perfume.

A avaliação do gráfico de *loadings* de PC2 (Figura 29) aponta as variáveis que estão mais relacionadas com cada grupo de amostras. Sendo que o grupo de íons com faixa de m/z 600-1000 apresentam valores positivos na PC2 e estão associados às amostras falsificadas. Por outro lado, os íons de m/z 224, 239, 273, 299, 313, 371, 467 e 575 apresentam valores negativos e estão associados com as amostras autênticas. Os *loadings* de PC1 não contribuíram para a discriminação das amostras autênticas das falsificadas.

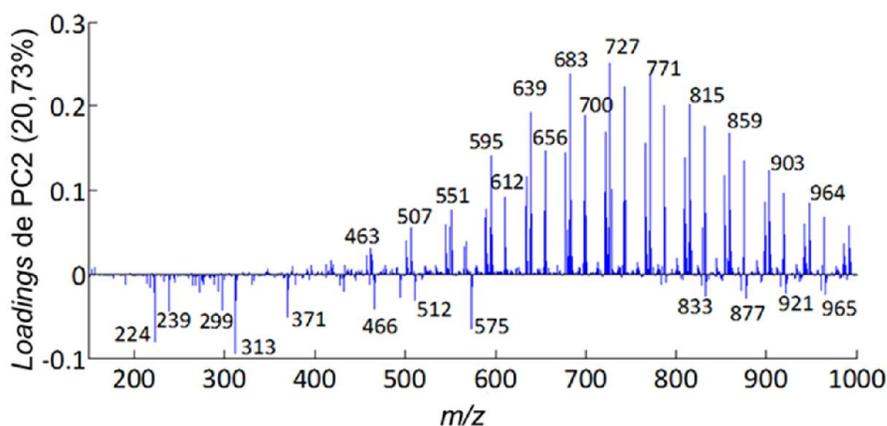


Figura 29: *Loadings* de PC2 calculados a partir dos dados PS (+) - MS das amostras de perfume.

O modelo PCA, por sua característica exploratória dos dados, nos oferece uma tendência inicial do comportamento do conjunto de dados, porém, apesar de através da PCA ser possível obter uma razoável classificação das amostras, o modelo PLS-DA é mais indicado para discriminar as amostras de perfumes originais e falsificados, uma vez que as informações das classes a que cada uma pertence é incorporada ao modelo.

3.4.2 Modelo PLS-DA

Com o intuito de obter mais informações e ter uma perspectiva mais direta e abrangente de todo o conjunto de perfumes analisados, construiu-se um modelo PLS-DA. Para tanto, os conjuntos de treinamento e teste foram definidos manualmente, respeitando-se a aleatoriedade e as proporções de amostras para cada conjunto. Dessa forma, esse procedimento acarretou na seleção dos resultados de 19 amostras originais e 17 amostras falsificadas para o conjunto de treinamento e de 10 amostras originais e 14 amostras falsificadas para o conjunto de

teste. O modelo PLS-DA construído descreveu 58,52% da variância da matriz **X** e 75,86% da variância do vetor **y** utilizando 2 variáveis latentes.

A Figura 30 ilustra os valores previstos pelo modelo PLS-DA para as amostras de perfume e o *threshold* utilizado para discriminação das classes. Não houve erros de classificação do modelo.

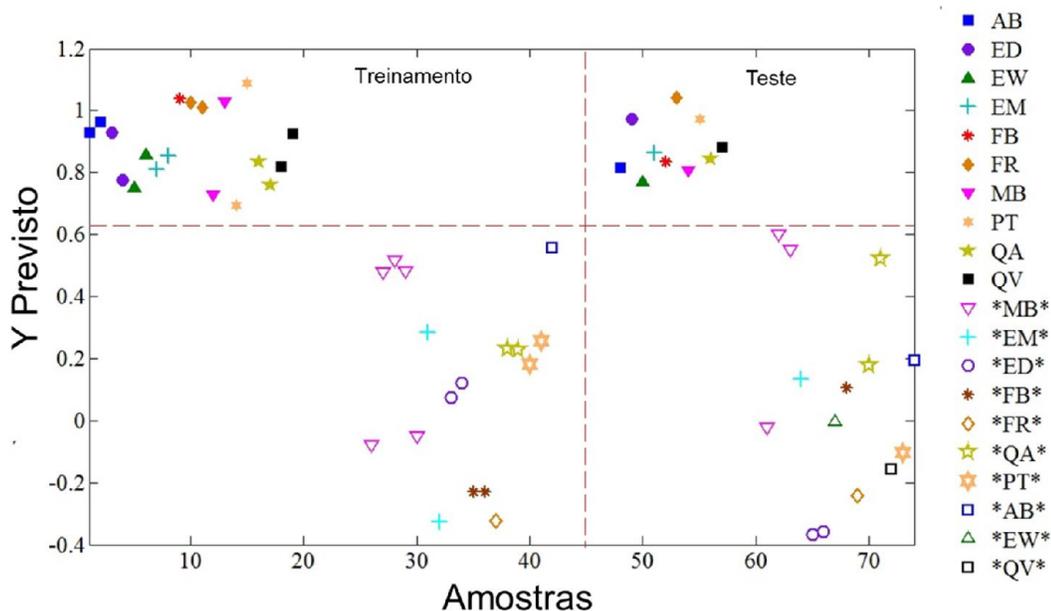


Figura 30: Valores previstos pelo modelo PLS-DA, para as amostras de perfume. Os códigos entre asteriscos correspondem a amostras de perfume falsificadas.

A análise PLS-DA permitiu a discriminação correta de todas as amostras de perfume. Isto se deve à característica do modelo supervisionado PLS-DA que é construído visando a obtenção do máximo de correlação entre os conjuntos de dados de modo a maximizar a discriminação das classes através da decomposição simultânea das matrizes dos conjuntos **X** e **y**.

O vetor de regressão do modelo está apresentado na Figura 31. Nesta figura, observa-se que os íons (razões *m/z*) que mais contribuem para a diferenciação das classes. Sendo que os valores positivos contribuem mais para classificar uma amostra como original e os valores negativos contribuem para classificar uma amostra como falsificada. Estes dados confirmam as análises qualitativas dos

espectros PS (+) – MS. Os íons mais importantes para a discriminação de um perfume como original ou falsificado, encontrados no gráfico de coeficientes de regressão no modelo PLS-DA são compatíveis com os íons obtidos no gráfico de *loadings* de PC2 (Figura 29).

A avaliação do vetor VIP Scores (Importância da Variável na Projeção) permitiu confirmar que estes foram os íons que mais contribuíram para a discriminação das classes no modelo, sendo que todos eles tiveram resultado acima de 1.

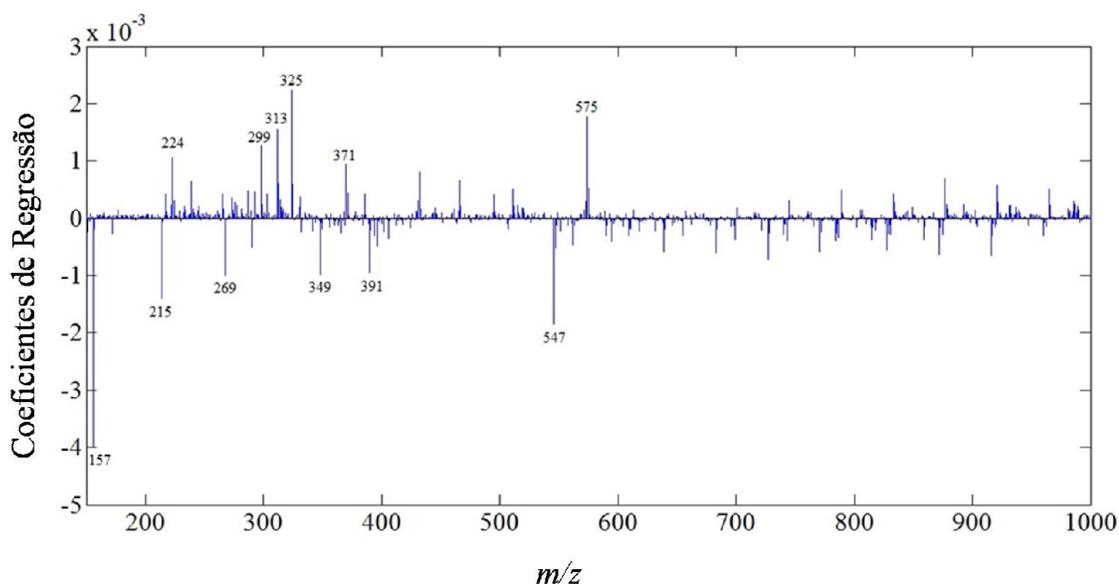


Figura 31: Coeficientes de regressão do modelo PLS-DA obtidos a partir dos dados PS (+) – MS das amostras de perfume.

Para a construção dos modelos quimiométricos e para análises comparativas de *fingerprints* não é necessário conhecer as substâncias relacionadas aos íons encontrados. Porém, algumas sugestões, baseadas na literatura, podem ser feitas objetivando entender a contribuição de tais compostos na discriminação dos perfumes. Dessa maneira, de posse das razões *m/z* mais importantes para a classificação dos perfumes, foram feitas sugestões de possíveis atribuições dos íons a compostos comumente encontrados nesse tipo de matriz.

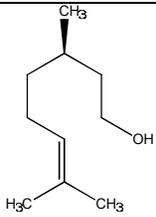
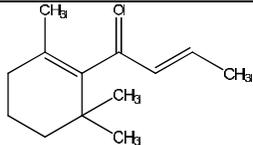
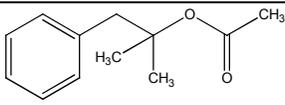
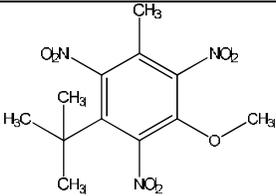
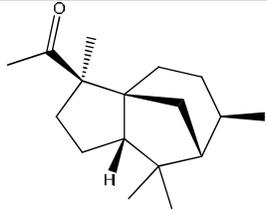
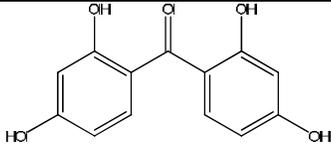
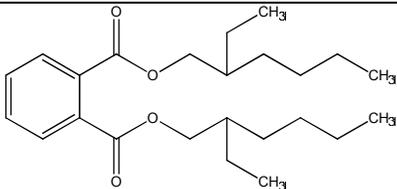
A Tabela 4 apresenta as atribuições realizadas bem como sua função na composição de um perfume.

Tabela 4: Atribuições sugeridas para os íons encontrados experimentalmente nas análises PS(+) - MS.

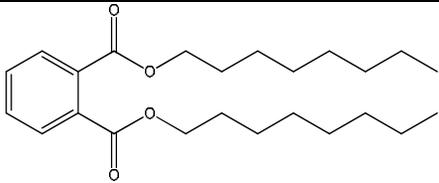
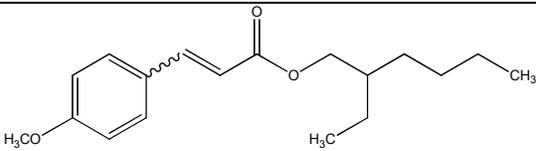
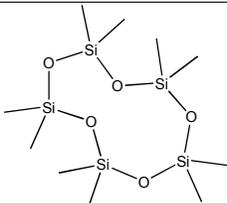
m/z	Espécie do íon	Atribuição sugerida	Aplicação em perfumaria
157	[M+H] ⁺	Citronelol ^{52; 62}	Fragrância
215	[M+Na] ⁺	Damascone ⁶²	Fragrância
	[M+Na] ⁺	Dimetil benzil carbonil acetato (DMBCA) ⁶²	Fragrância
269	[M+Na] ⁺	Benzofenona-2 ^{65; 66}	Filtro de radiação UV
	[M+H] ⁺	Musk ambrette (2-tert-butil-4,6-dinitro-5 metilanisole) ⁶⁷ (Almíscar)	Fragrância
	[M+Na] ⁺	Metil cedril cetona (<i>Acetylcedrene</i>) ⁶²	Precursor de fragrância
391	[M+H] ⁺	Bis (2-etil hexil) ftalato (DEHP) ^{61; 67}	Solvente/Fixador
	[M+H] ⁺	Di-n-octil- ftalato (DNOP) ⁶⁷	Solvente/Fixador
313	[M+Na] ⁺	Etilhexil metoxicinamato ⁶⁸	Filtro de radiação UV
371	[M+H] ⁺	Decametilciclopentasiloxano ⁶⁹	Solvente

A Tabela 4 apresenta alguns dos íons mais importantes destacados na Figura 31 dos coeficientes de regressão e os possíveis compostos a eles atribuídos através de busca bibliográfica. A Tabela 5 apresenta a fórmula estrutural de cada composto sugerido na Tabela 4.

Tabela 5: Fórmulas estruturais para os compostos relatados na literatura.

Composto	Fórmula estrutural
<p>Citronelol</p> <p><i>m/z</i> 157</p>	
<p>Damascone</p> <p><i>m/z</i> 215</p>	
<p>DMBCA</p> <p><i>m/z</i> 215</p>	
<p>Almíscar</p> <p><i>m/z</i> 269</p>	
<p>Metil cedril cetona</p> <p><i>m/z</i> 269</p>	
<p>Benzofenona-2</p> <p><i>m/z</i> 269</p>	
<p>DEHP</p> <p><i>m/z</i> 391</p>	

Continua

Composto	Fórmula estrutural
<p>DNOP</p> <p><i>m/z</i> 391</p>	
<p>Etilhexil metoxicinamato</p> <p><i>m/z</i> 313</p>	
<p>Decametilciclopentasiloxano</p> <p><i>m/z</i> 371</p>	

O citronelol, predominantemente encontrado na composição dos perfumes falsificados, está na lista regulatória da União Europeia como composto de uso restrito. Já o Musk ambrette e o DEHP estão na mesma lista como compostos de uso proibido na fabricação de cosméticos. Benzofenona-2 é um filtro de radiação UV muito comum na formulação de cosméticos. A ANVISA autoriza o uso desse produto na concentração máxima de 10%^{52; 61; 62; 65; 66; 67; 70}.

O Damascone, metil cedril cetona e decametilciclopentasiloxane são compostos que recentemente entraram na lista de atenção do *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS)^{62; 69}.

O DNOP não é de uso proibido, porém está na lista de produtos controlados pela *Environmental Protection Agency* EUA (EPA). O DMBCA e o Etilhexil metoxicinamato não estão relacionados em listas de controle, porém, cinamatos em geral já estiveram relacionados a casos de alergia. Em geral, os compostos descritos na Tabela 3, proibidos ou não, já foram relacionados à possibilidade de alergia ou toxicidade por órgãos de controle^{62; 67; 68}.

A baixa quantidade de atribuição aos íons encontrados experimentalmente nos perfumes originais é compatível com a grande diversidade e complexidade na composição dos mesmos. Além disso, os rótulos dos perfumes não descrevem com detalhes suas composições.

Não é possível afirmar com certeza se os compostos sugeridos são realmente coincidentes com os íons encontrados, uma vez que as análises foram realizadas em um espectrômetro de massas de baixa resolução e não foi feita fragmentação dos íons para confirmação. Porém, a possibilidade da presença de compostos perigosos chama a atenção para o potencial risco à saúde dos consumidores de perfumes falsificados.

Os resultados dos cálculos das figuras de mérito dos modelos PLS-DA estão expostos na Tabela 6. Pela análise das figuras de mérito verifica-se que o modelo obteve um ótimo desempenho na discriminação de perfumes, obtendo valores de sensibilidade, especificidade, exatidão e confiabilidade de 100%. As taxas de falsos negativos e de falsos positivos foram nulas.

A área sobre a curva do receptor característico operacional (AUROC) foi determinada a partir da verificação da área sobre a curva AUROC calculada com os parâmetros do modelo. O valor igual a 1 indica que este modelo é perfeitamente capaz de discriminar os perfumes como originais ou falsificados e indica que existem valores de *threshold* capazes de classificar todas as amostras do conjunto teste corretamente.

Tabela 6: Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA a partir dos dados de PS (+) – MS de perfume.

Figuras de mérito	Conjunto de Treinamento (%)	Conjunto de Teste (%)
Taxa de falsos negativos (TFN)	0	0
Taxa de falsos positivos (TFP)	0	0
Sensibilidade (SEN)	100	100
Especificidade (ESP)	100	100
Exatidão (EXA)	100	100
Confiabilidade (CON)	100	100
AUROC		1

O modelo quimiométrico construído mostrou-se eficaz e preciso para a discriminação dos perfumes originais e falsificados. A construção do modelo com amostras reais demonstra sua aplicabilidade em análises de rotina de órgãos fiscalizadores com a possível criação de um banco de dados de amostras originais e comprova a robustez do modelo PLS-DA obtido.

3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

A técnica PS-MS foi um método eficaz, eficiente, reproduzível, simples e rápido para obter impressões digitais de perfumes.

O método proposto com a construção de um modelo PLS-DA permitiu a discriminação de perfumes originais e falsificados, o que caracterizou esta proposta como uma boa alternativa à análise de perfumes para fins de monitoramento e inspeção ou para controle de qualidade para a indústria. Apesar da heterogeneidade das amostras, foi gerado um modelo PLS-DA robusto, confiável e exato. Além disso, a discriminação obtida pelo modelo permite a construção de bancos de dados para facilitar as análises.

A possível presença de compostos potencialmente perigosos na composição dos perfumes falsificados enfatiza a importância da realização de análises químicas desses produtos. A técnica é capaz de identificar a presença destes compostos e, se necessário, confirmar suas estruturas via espectrometria de massas sequencial e/ou de alta resolução.

CAPÍTULO 4

4.1 UÍSQUE

O nome uísque surgiu da expressão *uisge beatha*, equivalente gaélico do latim *aquae vitae* – “água da vida”. A origem dessa bebida é incerta uma vez que não há registros que realmente confirmem onde se originou sua produção⁷¹.

No livro “Um brinde à vida: a história das bebidas de Marco de La Roche”, o uísque começou a ser produzido devido à crise da filoxera que devastou os vinhedos e, conseqüentemente, as bebidas produzidas a partir deles. Dessa maneira, em 1494 houve a primeira menção ao uísque em um documento tributário escocês que fala da venda de barris de malte a um frei, o que criou uma ligação da bebida ao monges e mosteiros. Com isso, houve a suposição de que o uísque tenha sido produzido primeiramente na Irlanda antes mesmo que na Escócia, uma vez que a primeira era o centro religioso e, na idade média, os monges eram os principais responsáveis pela produção da bebida para fins medicinais⁷¹.

Inicialmente, o uísque era produzido a partir da maltagem dos grãos de cevada em alambiques com uso de turfa como combustível e para conferir aromas defumados à bebida. Posteriormente, devido à grande demanda, a bebida passou a ser produzida também a partir de outros cereais, como trigo, centeio e milho. Com as variações de produção do uísque, o mesmo passou a obter diferentes classificações e definições⁷².

O uísque é uma bebida destilada de sabor marcante e de alto teor alcoólico feita a partir de cereais, levedura e água, e maturada em barris de madeira por determinado tempo. Sua definição não é bem determinada, pois varia de acordo com as regulamentações legais de cada país⁷².

De acordo com a legislação brasileira, a definição de uísque, uísque ou *whiskey*, é a seguinte:

“Bebida com graduação alcoólica de trinta e oito a cinquenta e quatro por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida do destilado alcoólico simples de cereais envelhecido, parcial ou totalmente maltados, podendo ser adicionado de

álcool etílico potável de origem agrícola, ou de destilado alcoólico simples de cereais, bem como de água para redução da graduação alcoólica e caramelo para correção da cor e deve ser envelhecido em barril de madeira por no mínimo 2 anos”⁷³.

Apesar de o uísque estar normalmente associado a consumidores exigentes e sofisticados, essa bebida atraiu diversos apreciadores ao longo do tempo e, devido a isso vem movimentando um enorme mercado mundial de produção. Só no Brasil, foram vendidos cerca de 38,4 milhões de litros de uísque em 2015⁷⁴.

Embora todos os uísques tenham características organolépticas semelhantes, há diferentes tipos da bebida de acordo com o tipo ou tipos de cereais utilizados como matéria-prima na sua produção e o tempo de envelhecimento. Dessa maneira, de acordo com a formulação utilizada na fabricação, o uísque recebe diferentes nomes. O Decreto nº 6871 de 04 de junho de 2009 do MAPA classifica o uísque como:

I - Uísque malte puro ou uísque puro malte, quando a bebida for elaborada exclusivamente com destilado alcoólico simples de malte envelhecido ou malte uísque, com o coeficiente de congêneres (voláteis não-álcool) não inferior a trezentos e cinquenta miligramas por cem mililitros em álcool anidro;

II - Uísque cortado ou *blended* uísque, quando a bebida for obtida pela mistura de, no mínimo, trinta por cento de destilado alcoólico simples de malte envelhecido ou malte uísque, com destilados alcoólicos simples de cereais, álcool etílico potável de origem agrícola ou ambos, envelhecidos ou não, com o coeficiente de congêneres não inferior a cem miligramas por cem mililitros, em álcool anidro;

III - Uísque de cereais ou *grain* uísque, quando a bebida for obtida a partir de cereais reconhecidos internacionalmente na produção de uísque, sacarificados, total ou parcialmente, por diástases (enzimas que atuam sobre o amido) da cevada maltada, adicionada ou não de outras enzimas naturais e destilada em alambique ou coluna, envelhecido por período mínimo de dois anos, com o coeficiente de congêneres não inferior a cem miligramas por cem mililitros, em álcool anidro;

IV - *bourbon* uísque, *bourbon whiskey*, *tennessee* uísque ou *tennessee whiskey*, quando o uísque for produzido nos Estados Unidos da América de acordo com a sua legislação.

O uísque engarrafado no território nacional somente poderá fazer uso das denominações de origem, ou seja, *scotch* uísque, *canadian* uísque, *irish* uísque, *bourbon* uísque, *tennessee* uísque e outras reconhecidas internacionalmente, quando elaborado, exclusivamente, com matérias-primas importadas a granel, cujos destilados sejam produzidos e envelhecidos em seus respectivos países de origem e que mantenham as características determinadas por suas legislações, podendo apenas ser adicionado de água para redução da graduação alcoólica e de caramelo para a correção da cor.

A porcentagem do destilado alcoólico simples de malte envelhecido, de milho ou de outros cereais empregados na elaboração do uísque será calculada em função do teor alcoólico expresso em volume, em álcool anidro”⁷³.

4.2 PRODUÇÃO DO UÍSQUE

A produção do uísque conta com três ingredientes básicos: grão (cereais), água e fermento e, por último, o envelhecimento em barris de carvalho, principais responsáveis pelo aromas e sabores da bebida. As variações desses ingredientes conferem a peculiaridade de cada uísque, como por exemplo o tipo de cereal utilizado, a levedura empregada na fermentação, o tempo de envelhecimento e o tipo de barril utilizado⁷².

O processo de produção do uísque é bastante complexo e envolve várias etapas que serão brevemente apresentadas. A Figura 32 representa um esquema resumido das etapas de produção de um uísque⁷².

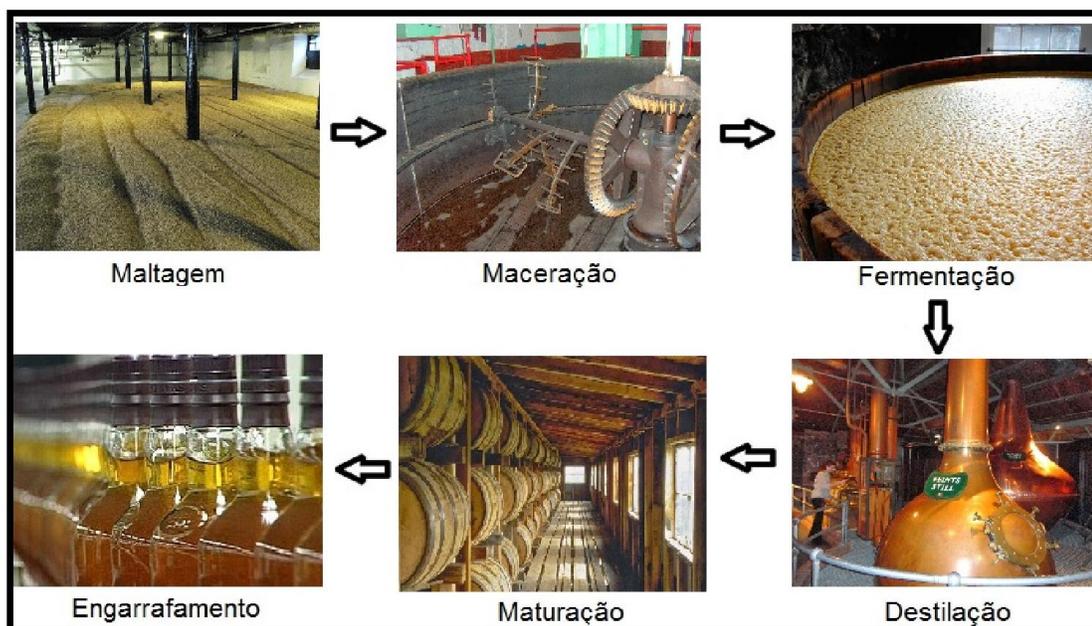


Figura 32: Diagrama simplificado das etapas de produção de uísque⁷⁵.

4.2.1 Maltagem

A etapa de maltagem é importante para elevar o teor enzimático dos grãos de cereais que serão utilizados na produção. Nesta etapa a cevada é germinada artificialmente e ocorre a liberação de enzimas que facilitarão a transformação dos amidos da cevada em açúcares fermentáveis que serão posteriormente convertidos em álcool.

A maltagem é iniciada com a adição de água em tanques apropriados para favorecer a germinação da cevada. Depois que o grão chega ao grau de germinação desejado, o mesmo é secado em estufa ou fornos que podem ter propriedades defumadoras que são responsáveis por transferir fenóis à cevada, conferindo-lhe sabor e aroma peculiares. Depois da secagem, a cevada já pode ser chamada de malte e contém um teor de água reduzido para aproximadamente 4%. Essa etapa é importante para a armazenagem e para impedir o desenvolvimento de atividade biológica⁷².

4.2.2 Maceração

O malte seco é moído para formar uma espécie de farinha chamada de “*grist*”. Essa farinha é misturada à água quente em tonéis de cobre, aço inoxidável ou madeira para a ativação das enzimas que transformarão o amido em açúcares solúveis. O líquido resultante desta etapa é chamado de mosto⁷².

4.2.3 Fermentação

O mosto é encaminhado para o resfriamento e acrescido de fermentos (leveduras). Nesta etapa o açúcar é metabolizado e convertido em etanol, CO₂ e outros produtos. O líquido produzido tem o aspecto semelhante ao da cerveja e é chamado de “*wash*” (mosto fermentado) com graduação alcoólica de 5 a 8%⁷².

4.2.4 Destilação

Após a fermentação, o “*wash*” é encaminhado para a destilação na qual basicamente ocorre a separação entre a água e o álcool pelas diferentes temperaturas de ebulição (100 °C e 78 °C, respectivamente).

Geralmente são utilizadas duas etapas de destilação sendo que alguns produtores de uísque utilizam até três etapas. Nos destiladores, o líquido é submetido a aquecimento. Quando atinge aproximadamente 80 °C, os vapores de álcool começam a atingir o condensador. O líquido gerado é chamado de “*low wine*” e tem teor alcoólico de aproximadamente 20%.

Esse líquido é encaminhado para a segunda destilação e, no final desta etapa, a bebida gerada apresenta teor alcoólico de aproximadamente 70%⁷².

4.2.5 Maturação

A etapa de maturação consiste no armazenamento do uísque em barris de madeira, geralmente carvalho, que será responsável por conferir características sensoriais à bebida. O tempo de envelhecimento varia de acordo com especificações do tipo de uísque. Essa informação deve estar presente na garrafa e geralmente o tempo de envelhecimento está intimamente ligado ao custo da bebida.

Muitos fatores podem influenciar as características e qualidade do produto final. O tipo de madeira utilizada na maturação é um fator importante no sabor e aroma da bebida. Fatores como cor, pH, ácidos, ésteres e açúcares presentes no uísque também são influenciados pelo tipo do barril. O carvalho americano (*Quercus alba*) por exemplo, confere sabores e aromas de avelã, baunilha, canela, caramelo, castanhas, gengibre e mel. Já o carvalho europeu (*Quercus robur*) confere sabores e aromas de figo, frutas cristalizadas, frutas secas, laranja, noz-moscada e passas⁷².

4.2.6 Homogeneização, filtragem e engarrafamento

Depois do tempo de maturação, bebidas envelhecidas em barris diferentes são misturadas para homogeneizar as características do produto final uma vez que, mesmo que os barris sejam idênticos, poderá haver pequenas diferenças no uísque.

Nesta etapa também ocorre a diluição da bebida pela adição de água desmineralizada, gerando um produto com teor alcoólico de aproximadamente 40%.

O uísque pode ainda ser filtrado, normalmente à frio, para a retirada de partículas em suspensão. Finalizada essas etapas, o uísque está pronto para ser engarrafado e comercializado.

No processo descrito acima foi mencionado apenas o malte como matéria-prima na produção do uísque. Porém sua fabricação pode utilizar outros cereais como insumos. O *Scotch* uísque, que foi a bebida estudada nesse trabalho, pode ser classificado de acordo com o tipo de matéria prima empregada na sua elaboração. A Figura 33 mostra as categorias de Scotch uísque existentes⁷².

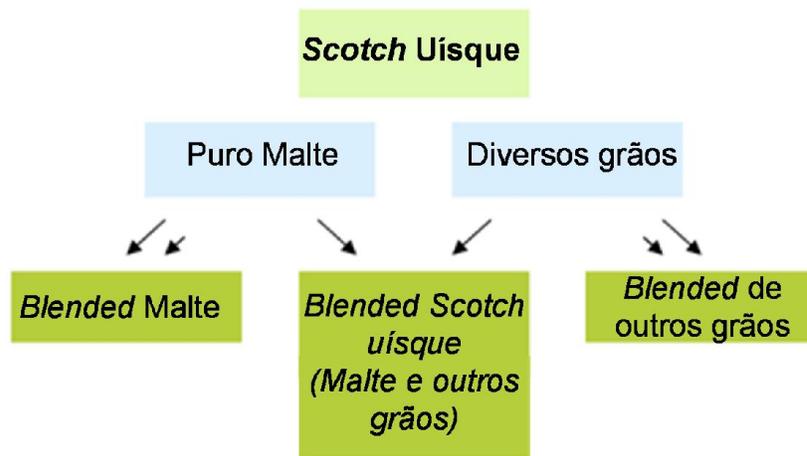


Figura 33: Diagrama simplificado das categorias de Scotch Uísque⁷⁶.

- Puro Malte: produzido com 100% de cevada maltada em uma única destilaria.
- Diversos grãos: produzido com diferentes tipos de grãos, podendo conter ou não malte, em uma única destilaria.
- *Blended* Malte: produzido através da mistura de dois ou mais uísques do tipo puro malte de destilarias diferentes.
- *Blended Scotch* uísque: produzido a partir da mistura de pelo menos um uísque puro malte e um uísque de diversos grãos, sendo que normalmente são feitos com mais de 40 tipos de uísque diferentes. É o tipo mais comercializado no Brasil.
- *Blended* de outros grãos: produzido através da mistura de dois ou mais uísques de diversos grãos de destilarias diferentes.

O *Blending* é um procedimento importante para garantir um equilíbrio e harmonia dos sabores e características do uísque. Quando é feito com uísques do mesmo tipo, serve para homogeneizar os sabores e aromas. Já quando mistura tipos diferentes (*Blended Scotch* uísque) é importante pois o uísque puro malte é geralmente muito encorpado, diferente do uísque puro de outros grãos. Dessa forma, a mistura dos dois tipos balanceia os aromas e sabores, trazendo maior popularidade à bebida pois agrada a mais tipos de paladares⁷².

4.3 A QUÍMICA DO UÍSQUE

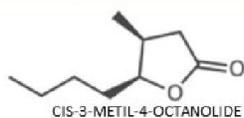
A Figura 34 apresenta um esquema simplificado da produção do uísque e dos compostos responsáveis por importantes características sensoriais da bebida⁷⁷.

A Química do Uísque

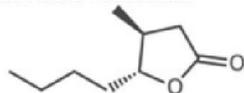


O Uísque contém centenas de diferentes substâncias em sua composição. Esta pode ser influenciada pelo tipo de malte e grãos utilizados, pelo processo de destilação e pela madeira utilizada nos barris de maturação. É impossível listar todos os compostos presentes na composição da bebida, mas apresentamos uma descrição de algumas moléculas que tem influência sobre os sabores do uísque.

Lactonas



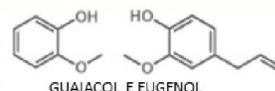
TRANS-3-METIL-4-OCTANOLIDE



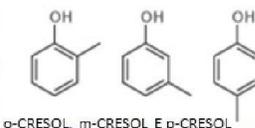
Lactonas de uísque são encontradas nos barris de carvalho da maturação, e absorvidos pela bebida durante o processo. O isômero trans é responsável pelo sabor amadeirado e de coco enquanto o isômero cis tem um forte sabor picante.



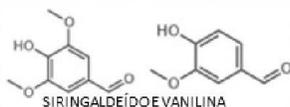
Compostos Fenólicos



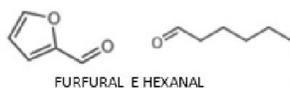
Geralmente, os compostos fenólicos contribuem para o sabor defumado e amendoado. No caso de Scotch uísques, o uso da turfa nos fornos de secagem de cevada maltada resultam na presença de compostos fenólicos incluindo os Cresóis que têm cheiro medicinal.



Aldeídos



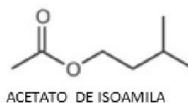
Muitos aldeídos diferentes podem ser extraídos de barris de carvalho e incorporar ao uísque. O Siringaldeído confere um aroma picante e amadeirado, enquanto a Vanilina dá tons de baunilha. O Furfural adiciona um sabor amendoado, enquanto o Hexanal oferece notas de ervas.



Ésteres

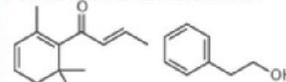


Ésteres em uísque podem adicionar sabores frutados, como o Hexanoato de etila, que dá um sabor doce de maçã. O Acetato de isoamila, por outro lado, dá aromas de banana e pera. Alguns uísques são filtrados a frio para remover a maioria dos ésteres pois eles podem causar a turvação da bebida.



Outros Compostos

B-DAMASCENONA E ÁLCOOL FENÉTILICO



A β-damascenona, e o Álcool fenético adicionam notas florais ao uísque. O Diacetil, composto que confere um sabor desagradável comum na cerveja, contribui para um sabor amantelado no uísque. Outros sabores desagradáveis de queimado ou de borracha podem ser produzidos por compostos de enxofre, embora eles também possam adicionar tons de carne à bebida.

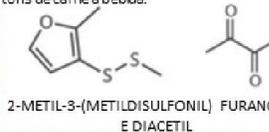


Figura 34: A química do uísque⁷⁸.

O uísque é uma bebida de composição química complexa cuja produção requer condições controladas para obtenção de um produto de qualidade. Sendo assim, a presença de certos compostos químicos é de extrema importância para seu sabor e aroma⁷⁹.

Apesar de vários trabalhos terem se ocupado em verificar e conhecer a composição química do uísque, ainda há muito a ser explorado. A maior parte dos componentes presentes na bebida são provenientes dos barris de madeira utilizados na etapa de maturação⁷⁹.

O carvalho consiste de aproximadamente 10% (m/m) de óleos voláteis, ácidos voláteis e não voláteis, açúcares, taninos, pigmentos e compostos inorgânicos. Porém os compostos que serão absorvidos pelo uísque dependem de vários fatores como o tempo de maturação, as variações de temperatura e o pré-tratamento recebido pela madeira⁷⁹.

Os compostos majoritariamente encontrados na composição do uísque são os álcoois como etanol, isobutanol, n-propanol e 2,3-metilbutanol, além de outros compostos como acetato de etila e acetaldeído. Além desses, compostos com menores concentrações também podem estar presentes e, geralmente, são os principais responsáveis pelas características sensoriais da bebida. Compostos como álcoois, ácidos graxos, aldeídos, ésteres, fenóis e compostos contendo nitrogênio e enxofre são chamados de compostos minoritários e são importantes marcadores em análises de autenticidade de uísques, pois são muito característicos de cada processo de produção⁷⁹.

Os fenóis contribuem com aromas e sabores defumados e amargos. Os aldeídos e algumas lactonas transferem sabores amadeirados, de coco e apimentados. Além disso, algumas lactonas contribuem com características de cereais, vegetais e baunilha. Os ésteres trazem sabores e aromas frutados de pera, maçã, e banana⁷⁹.

Devido a presença de diversos componentes, a legislação brasileira preconiza valores padrões exigidos para a identidade do uísque. A Tabela 7 apresenta os valores legislados segundo o MAPA⁸⁰.

Tabela 7: Constituintes que compõem o padrão de identidade dos uísques.

Item	Limite Mínimo	Limite Máximo	Classificação	
1	Acidez volátil, em ácido acético, em mg/100mL de álcool anidro	---	150	---
2	Álcool superior (somatório do álcool n-propílico, álcool isobutílico e álcoois isso-amílicos) em mg/100mL de álcool anidro.	---	300	---
3	Aldeídos, em aldeído acético, mg/100mL de álcool anidro	---	20	---
4	Coeficiente de congêneres, em mg/100 mL de álcool	>350	---	Uísque malte puro
		>100	---	Uísque cortado ou uísque de cereais.
		>150	---	Bourbon uísque
5	Ésteres, em acetato de etila, em mg/100mL de álcool anidro	---	150	---
6	Graduação alcoólica, em %v/v a 20°C	38	54	---
7	Somatório de furfural e hidroximetilfurfural, em mg/100mL de álcool anidro	---	5	---

Na literatura encontram-se muitos trabalhos voltados para a verificação da autenticidade de uísques a partir de diferentes técnicas analíticas.

Møller et al. (2005) utilizaram a técnica ESI-MS para obter *fingerprints* de uísque com o objetivo de provar sua autenticidade. Amostras originais e falsificadas foram submetidas a análises por ESI-MS sem passar por tratamentos complexos como extração, derivatização ou diluição. No caso das análises em modo positivo, foi adicionado ácido fórmico para favorecer a protonação das espécies. Uma simples inspeção visual dos espectros de massas permitiu a diferenciação dos dois tipos de amostras (original e falsificada) e o método proposto mostrou ser rápido, simples e facilmente aplicável a análises de rotina e controle de qualidade da bebida. A técnica ESI-MS tem diversas vantagens, porém, o possível efeito de memória que pode

ocorrer entre uma análise e outra traz problemas em numerosas amostras, além da necessidade de um gás nebulizador⁸¹.

Heller *et. al* (2011) utilizaram a eletroforese capilar com detector ultravioleta na determinação de compostos como marcadores químicos para identificar falsificações em uísque. O método se mostrou aplicável para esta finalidade e se concentrou em comparar a presença e concentração de aldeídos fenólicos nas amostras originais e falsificadas. Os resultados foram confirmados com análises de LC-MS/MS⁸².

J.S. Garcia et al. (2013) aplicaram a técnica *Eletrospray Ionization- Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry* (ESI-FT-ICR MS) na obtenção de *fingerprints* de uísques originais e falsificados. Os perfis químicos específicos para cada tipo de amostra foram obtidos e comparados para discriminá-los. Além disso, a alta resolução do equipamento utilizado permitiu a atribuição de íons encontrados experimentalmente a substâncias importantes na composição da bebida. A técnica se mostrou aplicável a propósitos como a garantia da autenticidade de uísques, bem como no controle de qualidade desta e de outras bebidas⁸³.

Outros trabalhos utilizaram diferentes técnicas para estudar a composição do uísque como separações cromatográficas^{84; 85}; espectroscopia UV-VIS^{86 87}, espectroscopia de infravermelho⁸⁸, sensores potenciométricos⁸⁹ e espectrometria de massas^{81; 83; 90}. Porém, muitos destes métodos têm as desvantagens de serem lentos, laboriosos e destrutivos, consumindo reagentes ou solventes e gerando resíduos químicos.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

Neste trabalho foram utilizadas amostras (autênticas e falsificadas) de três diferentes marcas cedidas pela Polícia Federal. O conjunto de exemplares autênticos totalizou 44 amostras das marcas: *White Horse* (WH), *Johnnie Walker - Red Label* (RL) e *Johnnie Walker - Black Label* (BL). No mercado total de uísques, a marca líder é *Johnnie Walker* (da Diageo), seguida por *Teacher's* (*Pernod Ricard*), *Old Eight* (*Campari*), *Natu Nobilis* (*Pernod Ricard*) e *White Horse* (Diageo)⁹¹. O conjunto de exemplares falsificados também totalizou 44 amostras das mesmas marcas tais amostras foram apreendidas pela Polícia Federal e cedidas para a

realização das análises. A Tabela 8 apresenta a distribuição das amostras de uísque utilizadas neste trabalho.

Tabela 8: Nome e número das amostras de uísque analisadas.

Marca	Código de identificação	Amostras originais (Lotes diferentes)	Amostras falsificadas
<i>White Horse</i>	WH	16	16
<i>Johnnie Walker – Red Label</i>	RL	14	14
<i>Johnnie Walker – Black Label</i>	BL	14	14
	TOTAL	44	44

O uísque *Red Label* da Marca *Johnnie Walker* e o uísque *White Horse* são uísques classificados como “*standard*”, ou seja, uísques que receberam um período de maturação de no mínimo três anos, e o uísque *Black Label - Johnnie Walker* foi maturado por oito anos.

As amostras utilizadas no trabalho foram recebidas em vials e ficaram lacradas até o momento das análises e não foram submetidas a nenhum tipo de pré-tratamento. As análises de PS-MS foram realizadas em duplicata.

O solvente utilizado para as análises PS-MS foi metanol de grau HPLC, da marca J.T. *Baker Chemicals (Center Valley, Pennsylvania, EUA)*. Como suporte para as amostras nas análises PS-MS, foi utilizado papel cromatográfico grau 1 da marca *Whatman International Ltd (Maidstone, England)* cortado com uma tesoura em formato triangular (10 mm de altura e 5 mm de base) e posicionado à aproximadamente 1 cm da entrada do espectrômetro de massas.

4.4.1 Instrumentação

As amostras foram transferidas para tubos plásticos de fundo cônico do tipo *Eppendorf* que ficaram fechados até o momento das análises. Para a aquisição dos espectros de massas, foi utilizado um equipamento LCQ FLEET da Thermo *Scientific* (San Jose, Califórnia, EUA) com analisador de massas de baixa resolução do tipo *ion trap*.

As condições instrumentais do espectrômetro de massas com a fonte *paper spray* foram escolhidas depois de vários testes de otimização visando a obtenção de espectros de massas mais limpos e reprodutíveis.

Foi escolhido um uísque como modelo para avaliar variáveis como: distância do papel à entrada do espectrômetro de massas, tamanho do triângulo, volume do solvente, diferença de potencial aplicada, volume de amostra e modo de aquisição (positivo ou negativo).

Dessa maneira, as melhores condições para a análise de uísque foram: potencial do PS-MS - 4,0 kV, temperatura do capilar 215 °C, voltagem do capilar -12 V, voltagem das lentes -85 V, distância do papel à entrada do espectrômetro de massas 1,0 cm e faixa de massas de 100 – 600 *m/z*.

As análises foram executadas de modo aleatório e não houve nenhum tipo de pré-tratamento das amostras, sendo que as mesmas foram transferidas do *Eppendorf*, onde estavam armazenadas, diretamente para o papel no momento da análise.

Alíquotas de 2 µL de cada amostra de uísque, foram transferidas, com o auxílio de uma micropipeta para o centro do triângulo de papel. Este estava preso ao clipe metálico, posicionado na frente do espectrômetro de massas e conectado à fonte de alta tensão. Em seguida 30 µL de metanol foi adicionado ao papel e a fonte de potencial ligada. Os espectros de massas foram adquiridos continuamente (30 *scans*).

O software utilizado foi o Xcalibur 2.1.0 da Thermo *Scientific* (San Jose, Califórnia, EUA).

4.4.2 Modelos quimiométricos

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi executada no software MATLAB 7.9.0.529 (*Natick, Massachusetts*, EUA) com adição de um pacote de métodos quimiométricos pela instalação do PLS Toolbox 5.2.2 (*Manson, Washington*, EUA).

Para construção do modelo PLS-DA, além da matriz X também foi utilizado um vetor y (88x1) contendo as informações qualitativas codificadas referentes aos uísques originais e falsificados. Sendo que as amostras originais receberam atribuições iguais a 1 e as amostras falsificadas rotuladas como 0.

As amostras para o conjunto de treinamento e teste foram selecionadas com o auxílio do algoritmo Kennard-Stone, sendo que aproximadamente 2/3 das amostras, foram para o conjunto de treinamento e 1/3 para o conjunto teste (57 amostras e 31 amostras respectivamente). Os dados foram centrados na média e o melhor modelo foi construído com três variáveis latentes, escolhidas por meio da validação cruzada no modo subconjuntos aleatórios com 10 *splits* e 20 interações.

4.4.2.1 Figuras de mérito para a validação dos modelos PLS-DA

A partir da tabela de contingência gerada pelo modelo PLS-DA, calculou-se as seguintes figuras de mérito para avaliação de seu desempenho: taxa de falsos negativos (TFN), taxa de falsos positivos (TFP), taxa de verdadeiros positivos ou sensibilidade (SEN), taxa de verdadeiros negativos ou especificidade (ESP), exatidão (EXA) e a confiabilidade (CON). As medidas de áreas sob as curvas AUROC foram feitas pelo *software* PLS Toolbox 5.2.2 após a construção dos modelos.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de massas (*fingerprints*) das amostras de uísque foram obtidos depois da otimização dos parâmetros do equipamento. O modo negativo de ionização foi escolhido, pois gerou espectros de massas com maior qualidade (maior relação sinal/ruído e maior quantidade de informações relevantes). A Figura 35 apresenta espectros de massas (PS (-) – MS) representativos dos pares de amostras (original e falsificado) das marcas de uísque abordadas neste trabalho.

Apesar de o conjunto de amostras conter várias amostras falsificadas, será apresentado o PS (-) – MS de apenas um desses exemplares para fins de comparação.

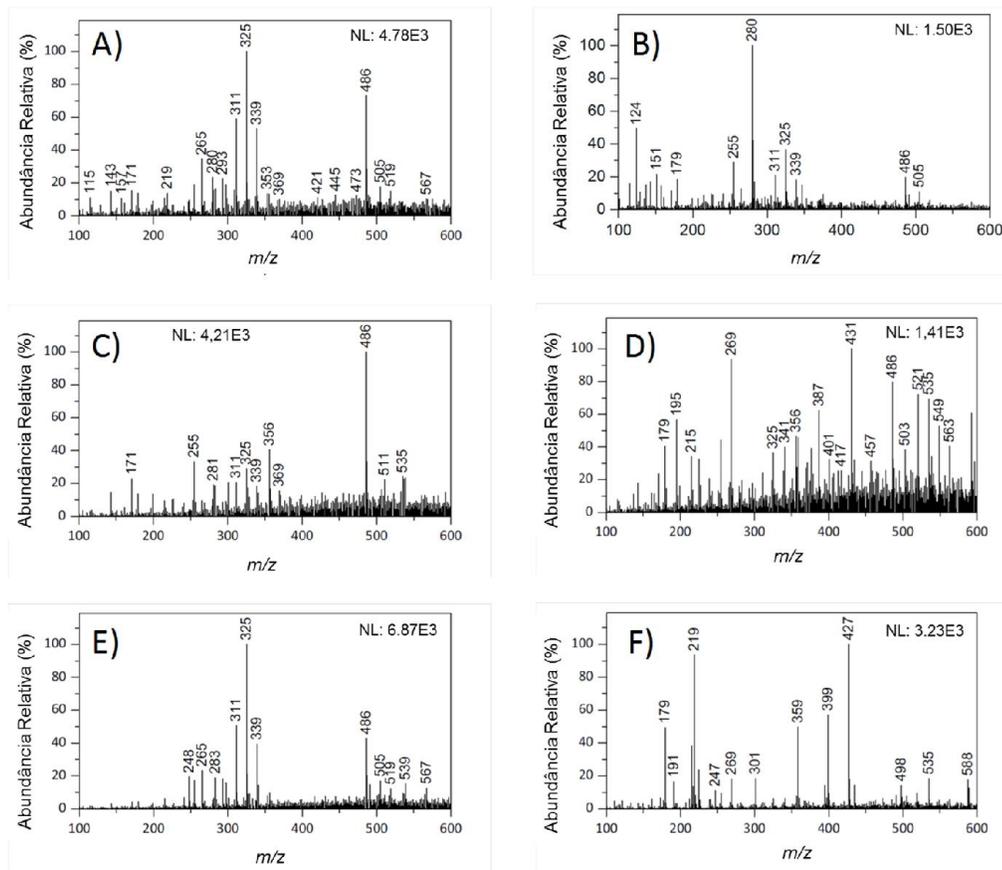


Figura 35: PS (-) – MS representativos das amostras de uísque por PS-MS. Os pares RL original (a) e falsificado (b), BL original (c) e falsificado (d) e WH original (e) e falsificado (f).

A visualização dos PS (-) – MS dos uísques originais permite perceber algumas semelhanças entre as diferentes marcas como a presença dos íons de m/z 311, 325, 339, 486 com intensidades variadas (Figuras 35a, 35c e 35e). Mesmo tendo íons coincidentes, os perfis químicos das amostras originais são distintos, permitindo a discriminação visual dos mesmos. Nesse caso, porém, a distinção por inspeção visual, não é tão simples quanto no caso dos perfumes, no qual a distinção é mais evidente.

Em todos os pares é perceptível a diferença entre os espectros de massas dos uísques originais e falsificados. Novamente a simples comparação visual é

parâmetro suficiente para classificar um uísque como original ou falsificado. Apesar de haver íons coincidentes entre os dois tipos de amostras, os íons marcadores dos uísques originais permitem classificar corretamente uma amostra qualquer. Além disso, nas amostras falsificadas é comum a presença de outros íons que não aparecem nas amostras originais. Esses íons podem estar relacionados à compostos adicionados para adulterar ou forjar a fabricação de um uísque autêntico.

Excluindo-se as variações instrumentais, o mesmo perfil foi observado para as outras amostras da mesma marca de uísque original de lotes diferentes, evidenciando a reprodutibilidade da técnica.

No caso dos falsificados, a diversidade de produtores e a variabilidade de insumos utilizados fabricação não permite a atribuição de íons marcadores. Porém, alguns íons identificados neste trabalho já foram apresentados na literatura como comuns em uísques falsificados. Dessa forma, utiliza-se o perfil dos originais como um padrão e, em caso de amostras suspeitas, compara-se o PS (-) – MS obtido atentando-se para as variações nesses marcadores.

Outros parâmetros menos específicos podem também ser indicativos da falsificação de bebidas como sabor, cor, garrafa, teor alcoólico, rótulos, selos de autenticidade, dentre outros. Porém, com o avanço das técnicas e da habilidade dos adulteradores, fica cada vez mais difícil perceber uma falsificação apenas com os parâmetros organolépticos ou aspectos visuais do produto. Assim como nas amostras de perfume, a análise química e comparativa dos espectros de massas característicos dos uísques pode se tornar uma alternativa capaz de dirimir dúvidas quanto à autenticidade da bebida.

A espectrometria de massas é apropriada para a obtenção de *fingerprints* que permitem uma verificação rápida da idoneidade da amostra por comparação com um exemplar autêntico, bem como para a obtenção de informações importantes da sua composição química. Dessa forma, caso haja compostos potencialmente danosos à saúde, empregados na fabricação de bebidas falsificadas, estes podem ser detectados e confirmados com o PS conjugado à espectrometria de massas sequencial ou de alta resolução. Neste trabalho, será apresentada, posteriormente, uma tabela com algumas possíveis atribuições a alguns dos íons mais

frequentemente encontrados nos espectros de massas dos uísques feitas com base na literatura.

A Figura 36 mostra o PS (-) – MS de três amostras falsificadas comercializadas com a marca *Black Label*. É possível notar a grande diversidade dos perfis para cada amostra falsificada. Além disso, existem várias fontes de falsificação sendo que cada falsário utiliza insumos e modos de preparo diferentes, o que corrobora a afirmação de que as amostras falsificadas possuem perfis químicos distintos. Por exemplo, os procedimentos seguintes são normalmente utilizados pelos falsificadores: (a) mudança de etiquetas em garrafas de uísque mais baratos; (B) diluições com álcool e adição de caramelo para correção de cor; (C) substituição e/ou adição de bebidas alcoólicas alternativas (cachaça, vodca e outras).

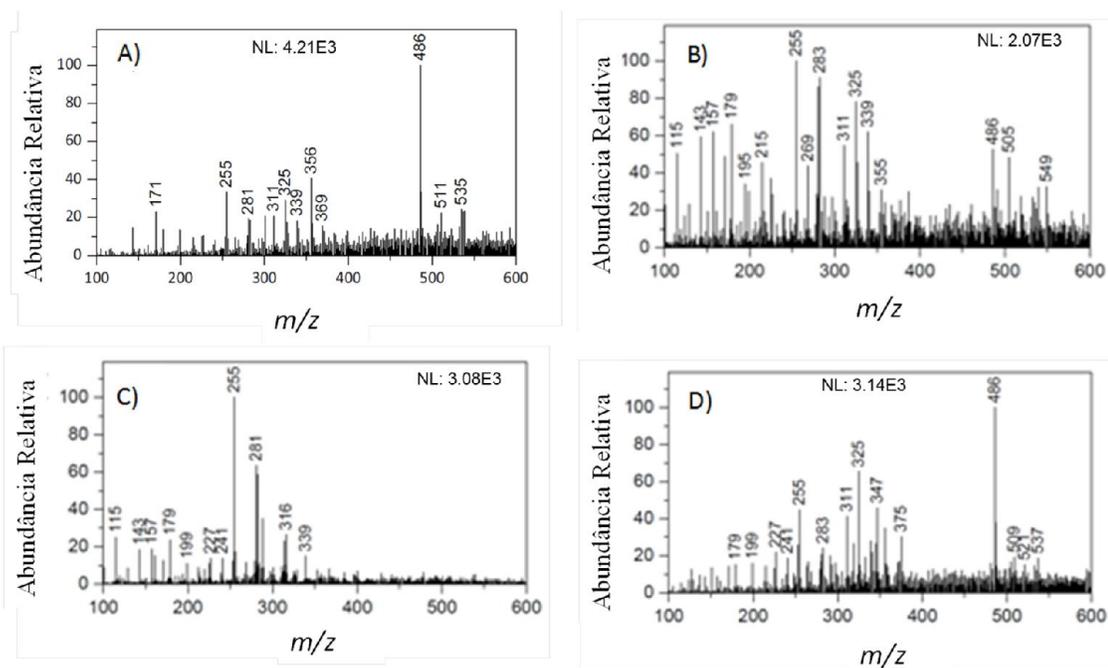


Figura 36: PS (-) – MS de amostras de uísque BL Original (a) e três amostras falsificadas da mesma marca (b), (c) e (d).

Conforme mencionado anteriormente, uma diferenciação visual dos espectros de massas é possível, sendo, porém, dificultada pela grande quantidade de dados gerados e pela similaridade dos espectros de massas de uísques de marcas diferentes. Diferentemente dos perfumes, mesmo entre marcas distintas, a

fabricação e os insumos utilizados na produção de uísques segue um protocolo devido às semelhantes características sensoriais dos produtos, além do controle de qualidade pelo qual eles passam.

Dessa maneira, é indicado o emprego de ferramentas que possibilitem uma visão agrupada de todo o conjunto de dados e que deem uma noção melhor da distribuição dessas amostras em classes. Para tanto, construiu-se dois modelos quimiométricos (PCA e PLS-DA) para que as tendências de comportamento das amostras de uísque sejam visualizadas e para facilitar a implantação das análises em rotinas de laboratórios forenses.

4.5.1 Modelo PCA

Construiu-se o modelo PCA com os dados centrados na media e duas componentes principais resultando em 46,82% da variância total. As componentes restantes foram verificadas e não foram observados padrões evidentes dos escores. Por este motivo, nenhum PC extra foi incluído na discussão.

Assim, a Figura 37 ilustra o gráfico de escores (PC1 versus PC2) ao tratar os dados obtidos por PS (-) – MS.

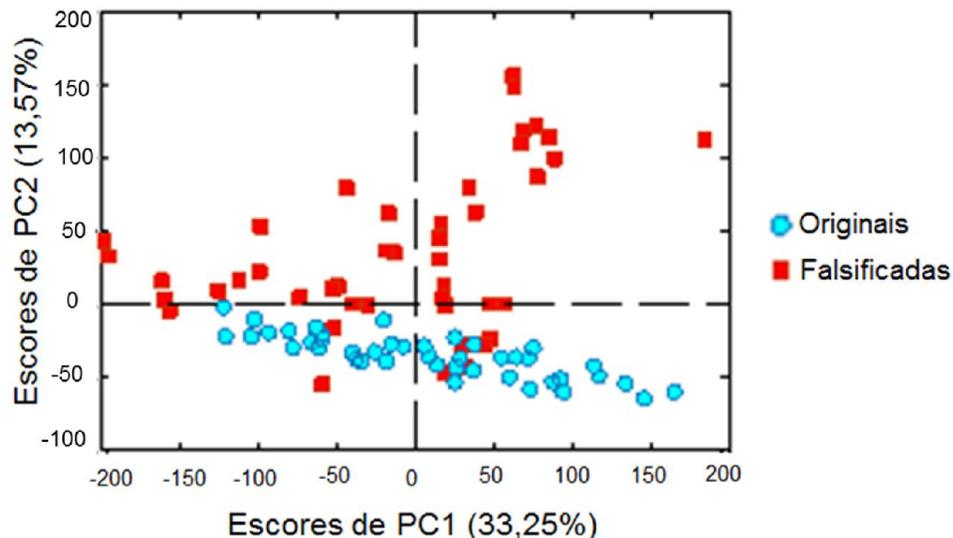


Figura 37: Escores de PC1 e PC2 obtidos com os dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.

Enquanto os escores de PC1 (33,3%) não foram capazes de discriminar entre as amostras autênticas e falsificadas, os escores de PC2 (13,6%) proporcionaram uma discriminação razoável.

Como pode ser observado na Figura 37, todas as amostras autênticas apresentaram escores negativos em PC2 (círculos), enquanto 77% (34 de 44) das amostras falsificadas apresentaram valores positivos (quadrados). Assim, o PC2 pode ser definido como um componente que caracteriza os uísques autênticos em seus valores de escores negativos. Por outro lado, PC1 pode ser definido como um componente relacionado com o envelhecimento dos uísques autênticos. Com efeito, este componente proporcionou uma discriminação moderada entre as amostras autênticas em função do seu envelhecimento, sendo que a maioria das amostras de BL com mais tempo de envelhecimento (8 anos) apresentou valores positivos em PC1 em contraste com a maioria das amostras de RL (3 anos) que apresentaram escores negativos. Este comportamento pode ser observado pela análise do gráfico de PC1 *versus* PC2, em que os escores de cada marca são indicados por símbolos diferentes, conforme ilustrado na Figura 38.

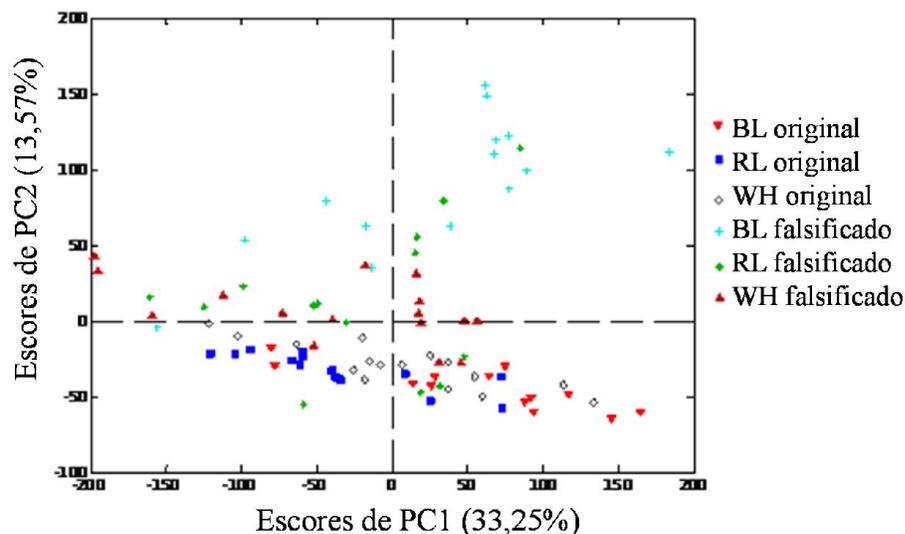


Figura 38: Escores de PC1 e PC2 obtidos com os dados de PS (-) – MS das amostras de uísque com separação entre as marcas.

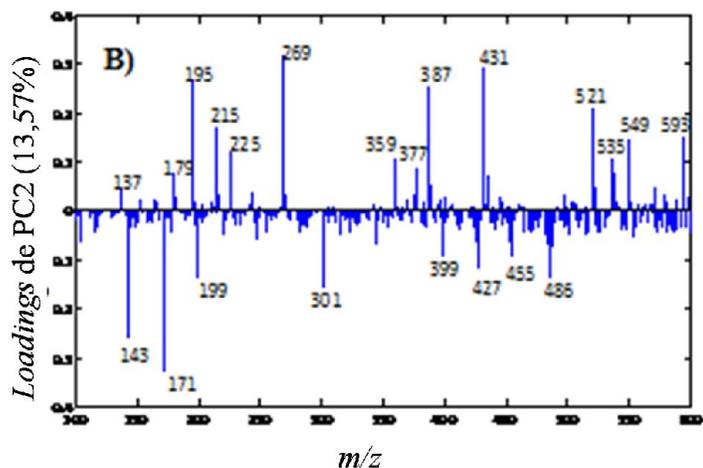


Figura 39: Loadings de PC2, calculados a partir dos dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.

O exame dos *loadings* de PC2 (Figura 39) revela que apenas alguns ânions/variáveis que apresentam os valores mais negativos foram responsáveis pela discriminação dos uísques autênticos. As amostras autênticas (escores negativos) receberam maior contribuição dos íons de m/z 143, 171, 199, 301, 427 e 486. Por outro lado, as amostras falsificadas, apesar de sua origem e métodos de produção diferentes, foram principalmente diagnosticadas pelos íons de m/z 179, 195, 215, 225, 269, 359, 377, 387, 431.

Estes resultados são consistentes com trabalho anterior de Møller e colaboradores que diferenciaram uísques escoceses autênticos e falsificado por inserção direta por ESI(-)-MS. Estes autores observaram que os uísques escoceses autênticos são caracterizados pelos ânions de m/z 143, 171 e 199, enquanto que os ânions de m/z 179, 377 e 387 foram considerados marcadores diagnósticos para as amostras falsificadas⁸¹.

Alguns desses ânions também foram relatados por Garcia e colaboradores, que analisaram amostras de uísque usando a inserção direta com ionização por *electrospray* com espectrometria de massas com transformada de Fourier (ESI-FT-MS). O uso de espectrometria de massas de alta resolução permitiu a proposição de possíveis estruturas para esses compostos. A Tabela 9 ilustra as estruturas propostas para alguns dos analitos diagnósticos detectados neste trabalho⁸³.

Tabela 9: Estrutura dos compostos propostos.

Composto	Estrutura proposta
[M-H] ⁻	
Ácido Caprílico	
<i>m/z</i> 143	
Ácido cáprico	
<i>m/z</i> 171	
<i>m/z</i> 199	
<i>m/z</i> 269	
Ácido elágico	
<i>m/z</i> 301	
<i>m/z</i> 399	

Os ânions de *m/z* 143 e 171 correspondem às formas desprotonadas dos ácidos caprílico e cáprico, respectivamente, que já tiveram suas presenças relatadas em amostras de cachaça e são comumente encontrados em outros tipos de

alimentos. O ânion de m/z 301 é atribuído ao ácido elágico desprotonado, que já foi identificado em outras bebidas destiladas e tem propriedades antioxidantes. O ânion de m/z 399 foi mencionado como resultante de reações redox dos tambores de madeira durante o processo de maturação do uísque. Garcia e colaboradores também detectaram um ânion de m/z 269, que é um importante marcador de uísques falsificados e propuseram duas possíveis estruturas (Tabela 9) para este composto. No entanto, estes autores também detectaram outros ânions como os de m/z 179, 431 e 521 exclusivamente em amostras falsificadas. Estes resultados estão em concordância com os sinais mais intensos observados nos *loadings* de PC2 (Figura 39). O ânion de m/z 179 já foi relatado como a forma desprotonada de um monossacárido (por exemplo, glucose). A predominância destes íons nas amostras falsificadas pode revelar a adição de caramelo para ajuste de e sabor^{81; 83}.

4.5.2 Modelo PLS-DA

Nos métodos quimiométricos não supervisionados, como PCA, as informações de classes não são incorporadas ao modelo. Assim, amostras desconhecidas são atribuídas visualmente a um grupo específico, sem um critério para definir os limites de classe. Em contraste, os métodos supervisionados permitem a classificação de forma automatizada e mais sistemática. Assim, um método quimiométrico supervisionado (PLS-DA) foi aplicado aos dados PS (-) - MS. Deve-se ressaltar a importância de analisar amostras em uma ordem aleatória, visando evitar a influência de efeitos sistemáticos nos resultados. O melhor modelo PLS-DA foi construído com três variáveis latentes, representando 53,18% e 83,31% da variância total de X e y, respectivamente. A figura 40 ilustra os valores preditos resultantes da aplicação do modelo PLS-DA para o conjunto de treinamento e para o conjunto de teste.

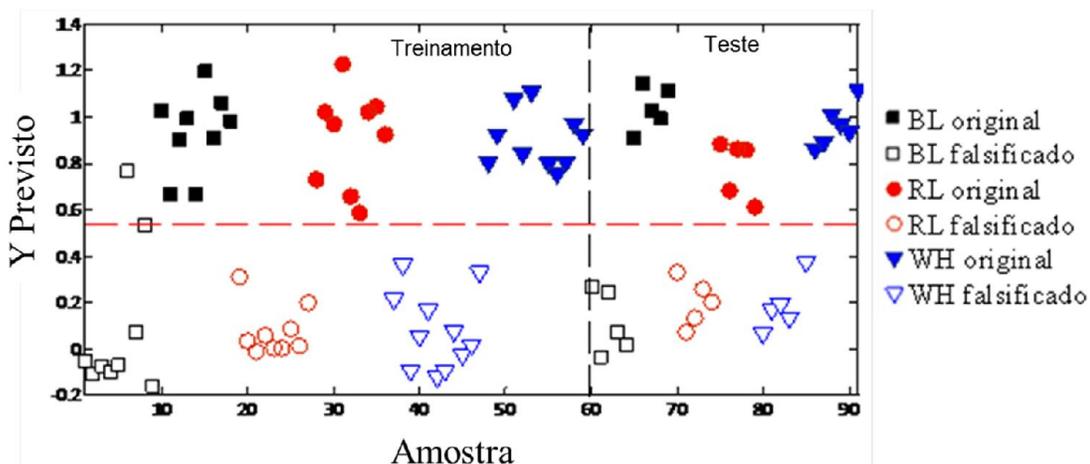


Figura 40: Valores previstos no modelo PLS-DA calculados a partir dos dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.

Pode-se observar que apenas uma amostra foi classificada erroneamente por esse modelo PLS-DA, um excelente resultado considerando a variabilidade natural inerente ao processo de *blending* que engloba misturas de diferentes maltes e/ou uísques de grãos. A amostra mal classificada refere-se a um uísque BL falsificado (falso positivo) no conjunto de treinamento. Apesar das notáveis disparidades entre as amostras falsificadas, apreendidas em diversas operações da Polícia Federal Brasileira em diferentes locais e datas, não foram observados erros no conjunto de validação. Este resultado, portanto, mostra a alta capacidade do modelo para realizar a discriminação entre os uísques falsificados e autênticos.

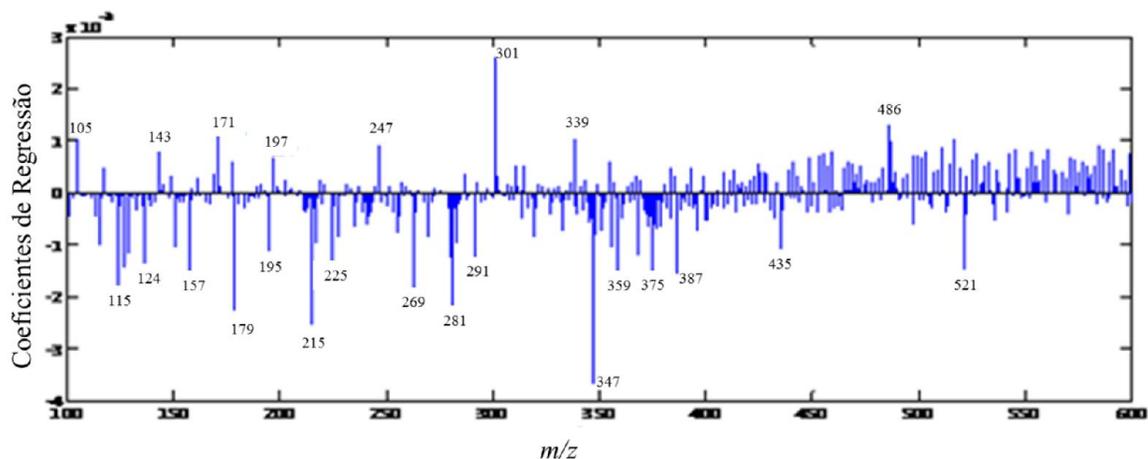


Figura 41: Coeficientes de regressão do modelo PLS-DA calculados a partir dos dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.

A Figura 41 mostra o gráfico dos coeficientes de regressão do modelo PLS-DA. Este gráfico permite a interpretação do modelo e a detecção das variáveis mais importantes para a discriminação das classes de uísque pré-definidas. Este gráfico mostra que os ânions de m/z 105, 143, 171, 301 e 486 têm os coeficientes positivos e estão relacionados aos uísques autênticos ($y = 1$). Em outras palavras, estas variáveis indicam ânions diagnóstico para as amostras autênticas. Por outro lado, os ânions de m/z 124, 179, 195, 215, 347, 387 e 521, que apresentaram coeficientes de regressão negativos, desempenham um papel importante para prever valores de y próximos de zero, isto é, amostras falsificadas.

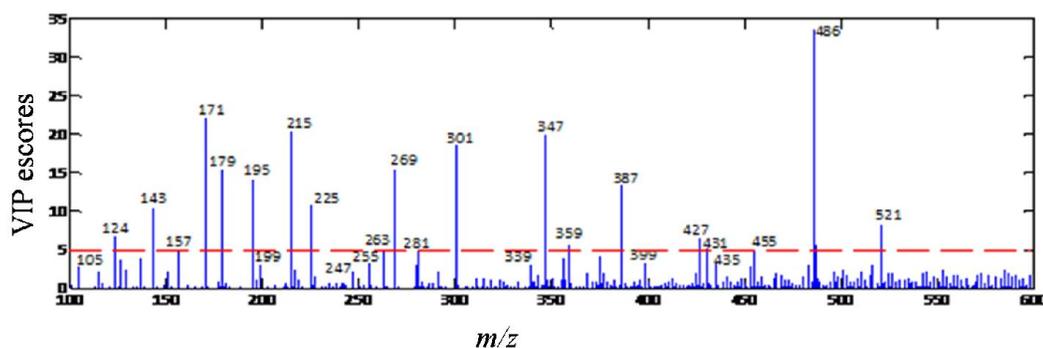


Figura 42: VIP escores do modelo PLS-DA calculados a partir dos dados de PS (-) – MS das amostras de uísque.

A Figura 42 exibe o vetor de VIP escores do modelo PLS-DA. A linha vermelha tracejada representa o limiar que indica a variável mais relevante para diferenciar as classes 1 e 0. Normalmente, esse limiar é definido como 1,0, mas nós arbitrariamente definimos esses valores como 5,0, a fim de selecionar um conjunto menor de quinze ânions como diagnóstico para uísques autênticos (m/z 124, 143, 171, 179, 195, 215, 225, 269, 301, 347, 359, 387, 427, 486 e 521). Observe a excelente correspondência entre as variáveis selecionadas por esses vetores informativos (Figuras 41 e 42) com os *loadings* de PC2 no modelo PCA (Figura 39). Ambos os modelos confirmam a notável capacidade do PS-MS na identificação de amostras de uísque falsificadas.

A Tabela 10 mostra a exatidão excepcional do modelo PLS-DA como verificado pelo cálculo das figuras de mérito. Uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 96,6% revelam que apenas uma amostra foi classificada erroneamente no conjunto de treinamento, ao passo que não foram observadas classificações erradas no conjunto de teste. Estes resultados demonstram que, apesar da heterogeneidade das amostras (como explicado anteriormente) e a ausência de procedimentos de pré-tratamento da amostra, o modelo atingiu taxas de confiabilidade muito altas, de 96,6% e 100% para os conjuntos de treinamento e teste, respectivamente.

Tabela 10: Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA construído calculados a partir dos dados de PS

(-) – MS das amostras de uísque.

Figuras de mérito	Conjunto de Treinamento	Conjunto de Teste (%)
	(%)	
Taxa de falsos negativos (TFN)	0	0
Taxa de falsos positivos (TFP)	3,4	0
Sensibilidade (SEN)	100	100
Especificidade (ESP)	96,6	100
Exatidão (EXA)	100	100
Confiabilidade (CON)	96,6	100
AUROC		1

Outra figura de mérito que indica o alto desempenho da metodologia atual é AUROC, que atingiu o valor máximo de 1,0. Esse resultado reflete a capacidade do modelo de discriminar entre as amostras e, portanto, indica que este modelo pode ser aplicado com sucesso para detectar amostras falsificadas e discriminá-las de das autênticas. Este modelo pode ser tornado mais robusto e expandido pela adição de outras marcas de uísque.

4.6 CONCLUSÕES PARCIAIS

Foi descrito um método baseado na aplicação direta da espectrometria de massas com ionização por *paper spray* combinado a modelos de classificação quimiométrica (PCA e principalmente PLS-DA) para distinguir entre amostras autênticas e falsificadas de uísque. A metodologia desenvolvida inclui uísques autênticos de diversas marcas e lotes e um número de amostras falsificadas produzidas pela adoção de vários procedimentos. Apesar da heterogeneidade das amostras, foi gerado um modelo PLS-DA robusto, confiável e exato. Este modelo foi capaz de classificar as amostras em autêntico e falsificado com quase 100% de taxa de sucesso. A utilização de PS-MS também permitiu identificar os principais analitos de diagnóstico que são compostos marcadores para cada classe de amostras.

CAPÍTULO 5

5.1 CONCLUSÕES GERAIS

Uma nova abordagem baseada na aplicação da técnica PS-MS combinada com PLS-DA foi desenvolvida para uma aplicação forense: a diferenciação efetiva e direta de uísques e perfumes originais e falsificados.

O procedimento analítico completo é muito rápido e mínimo preparo de amostra e demanda um consumo de solvente insignificante. Foram desenvolvidos modelos quimiométricos a partir dos resultados de amostras dessas matrizes provenientes de diferentes lotes e de amostras falsificadas reais que foram provenientes de apreensão em operações policiais, de modo a obter um método representativo e robusto.

A diferenciação e classificação de bebidas, cosméticos e outros produtos são de grande importância tanto para os fabricantes quanto para os consumidores, pois os garante confiança nas informações contidas no rótulo e autenticidade do produto consumido. Portanto, a combinação do PS-MS e PLS-DA se mostrou uma poderosa ferramenta analítica para se alcançar esse objetivo. Considerando ainda que esta é uma metodologia pouco explorada e com grande capacidade de novas aplicações este trabalho traz boas inovações no campo da química forense com chances de implementação em análises de órgãos fiscalizadores.

CAPÍTULO 6

6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 MEDEIROS, L. A. de **A CPI da pirataria: os segredos do contrabando e da falsificação no Brasil**. 1ª edição. 2005.
- 2 MARTINS, A. R. **Desenvolvimento de método para discriminação entre marcas de uísque e identificação de adulteração por espectroscopia UV-Vis e PLS-DA**. 2015. (Dissertação de mestrado). Instituto de química, Universidade de Brasília, Brasília.
- 3 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 p. 2006.
- 4 MARQUES, L. D. A. **Aplicação de Técnicas Avançadas de Espectrometria de Massas em Ciências de Alimentos e Perfumaria**. . 2006. (Dissertação de mestrado). Instituto de química, UNICAMP, Campinas.
- 5 G1, J. N.-. **Cosméticos piratas podem fazer mal à saúde, alertam especialistas**. 2016. Acesso em: 16/05/2016.
- 6 FEDERAL, R. **Balanco aduaneiro**. <http://idg.receita.fazenda.gov.br/dados/resultados/aduana/arquivos-e-imagens/balanco-aduaneiro-2014.pdf>, 2014. Acesso em: 19 de junho de 2015.
- 7 G1. **Europeus são presos por vender no DF canetas e perfumes falsificados**. 2016. Acesso em: 16/05/2016.
- 8 G1, F.-. **Operação desarma o maior esquema de falsificação de bebidas do Brasil**. 2016. Acesso em: 30/12/2016.
- 9 HOFFMANN, E. D.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: Principles and applications**. Third Edition. 2007.
- 10 LEAL, L.; VIEIRA, M. **Espectrometria de massas - Princípios e Aplicações (Adaptado)**. 2014.
- 11 FENN, J. B. et al. **ELECTROSPRAY IONIZATION FOR MASS-SPECTROMETRY OF LARGE BIOMOLECULES**. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, Oct 1989. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989AT60700031 >.

- 12 LANÇAS, F. M. **A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis?"**. 2009. 35-61
- 13 WATERS. Common Ionization - How Do We Make Ions? (Adaptado). Disponível em: < http://www.waters.com/waters/pt_BR/Common-Ionization/nav.htm?cid=10073251&locale=pt_BR. >.
- 14 LIU, J. J. et al. Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2463-2471, Mar 2010. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275379300042 >.
- 15 WANG, H. et al. Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 49, n. 5, p. 877-880, 2010 2010. ISSN 1433-7851. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274612500006 >.
- 16 ESPY, R. D. et al. Rapid analysis of whole blood by paper spray mass spectrometry for point-of-care therapeutic drug monitoring. **Analyst**, v. 137, n. 10, p. 2344-2349, 2012 2012. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303126000012 >.
- 17 _____. Spray mechanism in paper spray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325, p. 167-171, Jul 2012. ISSN 1387-3806. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309018400022 >.
- 18 YANG, Q. et al. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 312, p. 201-207, Feb 15 2012. ISSN 1387-3806. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301692200025 >.
- 19 SHI, R.-Z. et al. Rapid measurement of tacrolimus in whole blood by paper spray-tandem mass spectrometry (PS-MS/MS). **Clinica Chimica Acta**, v. 441, p. 99-104, Feb 20 2015. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000350085300018 >.
- 20 REN, Y. et al. Paper-capillary spray for direct mass spectrometry analysis of biofluid samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 5, p. 1385-1390, Feb 2016. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000368815200010 >.
- 21 GARRETT, R.; REZENDE, C. M.; IFA, D. R. Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 5944-5948, 2013 2013. ISSN 1759-9660. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000325722600013 >.

- 22 SU, Y. et al. Quantitative paper spray mass spectrometry analysis of drugs of abuse. **Analyst**, v. 138, n. 16, p. 4443-4447, 2013. ISSN 0003-2654. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000321787600003 >.
- 23 DE PAULA, C. C. A., VALADARES, A., JURISCH, M., PICCIN, E., AND AUGUSTI, R. Paper spray mass spectrometry applied in the monitoring of a chemical system in dynamic chemical equilibrium: the redox process of methylene blue. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 9, p. 1176-1180, 2016.
- 24 RESENDE, S. F. et al. On-surface photocatalytic degradation of methylene blue: In situ monitoring by paper spray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, 2016.
- 25 ZHANG, Z. P.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray: a simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs. **Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2556-2558, 2012. ISSN 0003-2654. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000303768100006 >.
- 26 WANG, Q. et al. A silica coated paper substrate: development and its application in paper spray mass spectrometry for rapid analysis of pesticides in milk. **Analyst**, v. 140, n. 23, p. 8048-8056, 2015. ISSN 0003-2654. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365189900026 >.
- 27 PEREIRA, H. V. et al. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. **Analytica Chimica Acta**, v. 940, p. 104-112, Oct 2016. ISSN 0003-2670. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000384015800011 >.
- 28 FERREIRA, P. D. S. et al. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. **Analyst**, v. 140, n. 3, p. 811-819, 2015 2015. ISSN 0003-2654.
- 29 JURISCH, M.; AUGUSTI, R. Detection of signature forgery with erasable pens using paper spray mass spectrometry (PS-MS). **Analytical Methods**, v. 8, n. 23, p. 4543-4546, 2016. ISSN 1759-9660. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000378235200001 >.
- 30 HAMID, A. M. et al. Rapid Discrimination of Bacteria by Paper Spray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 15, p. 7500-7507, Aug 5 2014. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000340081100051 >.
- 31 DENG, J.; YANG, Y. Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bانشا herbal tea using paper spray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 785, p. 82-90, Jun 27 2013. ISSN 0003-2670. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000320851400011 >.

- 32 IFA, D. R. et al. Forensic analysis of inks by imaging desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. **Analyst**, v. 132, n. 5, p. 461-467, 2007. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246070800014 >.
- 33 LALLI, P. M. et al. Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 135, n. 4, p. 745-750, 2010. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275865100014 >.
- 34 MIRABELLI, M. F. et al. Analysis of sexual assault evidence by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 7, p. 774-778, Jul 2013. ISSN 1076-5174. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000321336000004 >.
- 35 HERNANDES, V. V. et al. Characterization of ANFO explosive by high accuracy ESI(+/-)-FTMS with forensic identification on real samples by EASI(-)-MS. **Forensic Science International**, v. 249, p. 156-164, Apr 2015. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000351947300028 >.
- 36 ALVES, J. O.; SENA, M. M.; AUGUSTI, R. Multivariate calibration applied to ESI mass spectrometry data: a tool to quantify adulteration in extra virgin olive oil with inexpensive edible oils. **Analytical Methods**, v. 6, n. 18, p. 7502-7509, 2014. ISSN 1759-9660. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000341080900053 >.
- 37 SAMPEDRO, M. C. et al. Screening and quantification of antipsychotic drugs in human brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to postmortem diagnostics of forensic interest. **Forensic Science International**, v. 219, n. 1-3, Jun 2012. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000304626800031 >.
- 38 MAGALHAES, E. J. et al. Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose. Application of an innovative and efficient extraction/clean up procedure and gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1309, p. 15-21, Sep 2013. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000324353600002 >.
- 39 FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Editora UNICAMP., 2015. 496 p.
- 40 BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, v. 8, p. 84-99, 1985.
- 41 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Estadística y Quimiometria Para Química Analítica**. 4ª Edición. 2002. 296
- 42 ALVES, J. D. O. **Controle de qualidade de azeite de oliva extra virgem e misturas diesel/biodiesel utilizando espectrometria de massas e validação multivariada. (Adaptado)**. 2014. Departamento de química - Instituto de ciências exatas, UFMG, Belo Horizonte.

- 43 BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 3, p. 166-173, Mar 2003. ISSN 0886-9383. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182005800002 >.
- 44 BRERETON, R. G.; LLOYD, G. R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. **Journal of Chemometrics**, v. 28, n. 4, p. 213-225, Apr 2014. ISSN 0886-9383. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000333753400001 >.
- 45 KENNARD, R. W.; STONE, L. A. COMPUTER AIDED DESIGN OF EXPERIMENTS. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-&, 1969. ISSN 0040-1706. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1969C675800010 >.
- 46 TRULLOLS, E.; RUISANCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137-145, Feb 2004. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000189165900015 >.
- 47 MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletivas**, v. 11, p. 7-31, 2003.
- 48 DIAS, S. M.; SILVA, R. R. **Perfumes: uma química inesquecível**: Química nova na escola
1996.
- 49 BARROS, A. L. N. **Análise de perfumes**. 2007. Centro Universitário das,
- 50 Anuário ABIHPEC 2015. 2016. Disponível em: < <http://abihpec.org.br/anuario-2015/> >. Acesso em: 06/04/2016.
- 51 HADDAD, R. et al. Perfume fingerprinting by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: nearly instantaneous typification and counterfeit detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 22, p. 3662-3666, Nov 2008. ISSN 0951-4198. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261197600025 >.
- 52 DESMEDT, B. et al. HS-GC-MS method for the analysis of fragrance allergens in complex cosmetic matrices. **Talanta**, v. 131, p. 444-451, Jan 2015. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000343691000061 >.
- 53 BELCORP. Rally de Fragrâncias: conheça nossas famílias olfativas (Adaptado). 2016-02-17 2016. Disponível em: < <http://somosbelcorp.com.br/blog/?p=11657> >.
- 54 MARQUES, L. D. A. et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of perfumes: rapid classification and counterfeit detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 24, p. 3654-3658, 2006 2006. ISSN 0951-4198. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242936400006 >.

- 55 CHINGIN, K. et al. Rapid classification of perfumes by extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 13, p. 2009-2014, Jul 2008. ISSN 0951-4198. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257243800001 >.
- 56 CANO, M. et al. Rapid discrimination and counterfeit detection of perfumes by an electronic olfactory system. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 156, n. 1, p. 319-324, Aug 10 2011. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292058200046 >.
- 57 GEBICKI, J.; SZULCZYNSKI, B.; KAMINSKI, M. Determination of authenticity of brand perfume using electronic nose prototypes. **Measurement Science and Technology**, v. 26, n. 12, Dec 2015. ISSN 0957-0233. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000366448200018 >.
- 58 GOMES, C. L. et al. Multivariate Classification of Original and Fake Perfumes by Ion Analysis and Ethanol Content. **Journal of Forensic Sciences**, v. 61, n. 4, p. 1074-1079, Jul 2016. ISSN 0022-1198. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000379425800028 >.
- 59 VAN ASTEN, A. The importance of GC and GC-MS in perfume analysis. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9-10, p. 698-708, Sep-Oct 2002. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178773700029 >.
- 60 DEBONNEVILLE, C.; CHAINTREAU, A. Quantitation of suspected allergens in fragrances Part II. Evaluation of comprehensive gas chromatography-conventional mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1-2, p. 109-115, Feb 20 2004. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188498900015 >.
- 61 LOPEZ-NOGUEROLES, M. et al. A rapid and sensitive gas chromatography-mass spectrometry method for the quality control of perfumes: simultaneous determination of phthalates. **Analytical Methods**, v. 5, n. 2, p. 409-415, 2013 2013. ISSN 1759-9660. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312658600012 >.
- 62 REY, A. et al. Determination of suspected fragrance allergens extended list by two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry in ready-to-inject samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1404, p. 95-103, Jul 24 2015. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000357242900012 >.
- 63 OSMOZ. Técnicas de produção de perfumes - OSMOZ. 2012. Disponível em: < <http://www.osmoz.com.br/estatico/tecnicas-de-fabricacion> >. Acesso em: 16/05/2016.
- 64 Grupo Boticário. 2016. Disponível em: < <http://www.grupoboticario.com.br/pt/grupo-boticoario/Paginas/Inicial.aspx> >.

- 65 ANVISA. **Resolução RDC nº 79** 28 de agosto de 2000
- 66 GIMENEZ-ARNAU, A. et al. Principles and methodology for identification of fragrance allergens in consumer products. **Contact Dermatitis**, v. 47, n. 6, p. 345-352, Dec 2002. ISSN 0105-1873. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180967700006 > .
- 67 SANCHEZ-PRADO, L. et al. Multicomponent analytical methodology to control phthalates, synthetic musks, fragrance allergens and preservatives in perfumes. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 370-379, Jul 15 2011. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292848900050 > .
- 68 UTER, W. et al. Coupled exposure to ingredients of cosmetic products: III. Ultraviolet filters. **Contact Dermatitis**, v. 71, n. 3, p. 162-169, Sep 2014. ISSN 0105-1873. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000341137500005 > .
- 69 HORII, Y.; KANNAN, K. Survey of organosilicone compounds, including cyclic and linear siloxanes, in personal-care and household products. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, n. 4, p. 701-710, Nov 2008. ISSN 0090-4341. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259678900017 > .
- 70 UNION., T. E. P. A. T. C. O. T. E. **REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30 November 2009 on cosmetic products.** 2009.
- 71 ROCHE, M. Um brinde à vida: a história das bebidas. Acesso em: 10/2016.
- 72 BUENO, D. J. E. R. Single Malt Brasil. 2017. Disponível em: < <http://www.singlemaltbrasil.com.br/whisky> > . Acesso em: 02/01/2017.
- 73 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A.-B. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009.**: Diário Oficial da União. Seção I: p. 20 p. 2009.
- 74 BRAZIL, D.-M. I. Vendas de uísque bourbon crescem no Brasil. 2016. Disponível em: < <http://www.datamark.com.br/noticias/2016/9/vendas-de-uisque-bourbon-crescem-no-brasil-216846/> > . Acesso em: 10/2016.
- 75 HANSEN, M. Desvendando Whisky: Como o Whisky é produzido (Adaptado). 2014. Disponível em: < <http://desvendandowhisky.blogspot.com/2014/05/como-o-whisky-e-produzido.html> > .
- 76 BRASIL, S. M. Scotch Whisky (Adaptado). Disponível em: < http://www.singlemaltbrasil.com.br/whisky/scotch_whisky/ > .

- 77 COMPOUNDCHEM. Compound Interest - The Chemistry of Whisky. 2017. Disponível em: < <http://www.compoundchem.com/> >. Acesso em: 02/01/2017.
- 78 @COMPOUNDCHEM. The Chemistry of Whisky (Adaptado). 2015-03-31 2015. Disponível em: < <http://www.compoundchem.com/2015/03/31/whisky/> >.
- 79 PIGGOTT, J. R.; CONNER, J. M. **Fermented Beverage Production**. 2^a. 2003.
- 80 MAPA. BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E.; ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa número 15 de 31 de março de 2011**.: Diário Oficial da União 2011.
- 81 MOLLER, J. K. S.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity. **Analyst**, v. 130, n. 6, p. 890-897, 2005. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229305200016 >.
- 82 HELLER, M. et al. A Rapid Sample Screening Method for Authenticity Control of Whiskey Using Capillary Electrophoresis with Online Preconcentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6882-6888, Jul 2011. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292417700009 >.
- 83 GARCIA, J. S. et al. Whisky analysis by electrospray ionization-Fourier transform mass spectrometry. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 98-106, Apr 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316843100013 >.
- 84 PARKER, I. G. et al. Investigation into the use of carbon isotope ratios (C-13/C-12) of Scotch whisky congeners to establish brand authenticity using gas chromatography combustion-isotope ratio mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 423-428, Nov 1998. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000076093700019 >.
- 85 FITZGERALD, G. et al. Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 896, n. 1-2, p. 351-359, Oct 2000. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000090029400037 >.
- 86 MACKENZIE, W. M.; AYLOTT, R. I. Analytical strategies to confirm Scotch whisky authenticity. Part II: Mobile brand authentication. **Analyst**, v. 129, n. 7, p. 607-612, 2004. ISSN 0003-2654. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222202300010 >.
- 87 CANTARELLI, M. A. et al. Authentication and Discrimination of Whiskies of High Commercial Value by Pattern Recognition. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 3, p. 790-798, Mar 2015. ISSN 1936-9751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000349553900028 >.

- 88 MCINTYRE, A. C. et al. Detection of counterfeit Scotch whisky samples using mid-infrared spectrometry with an attenuated total reflectance probe incorporating polycrystalline silver halide fibres. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, n. 2, p. 228-233, Apr 2011. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289453600012 > .
- 89 NOVAKOWSKI, W.; BERTOTTI, M.; PAIXAO, T. Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: Discrimination of wines and whiskies. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 1, p. 145-151, Sep 2011. ISSN 0026-265X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292431300023 > .
- 90 MEIER-AUGENSTEIN, W.; KEMP, H. F.; HARDIE, S. M. L. Detection of counterfeit scotch whisky by H-2 and O-18 stable isotope analysis. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 1070-1074, Aug 2012. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302986400063 > .
- 91 BEBIDAS, A.-A. B. D. <http://www.abrabe.org.br>. . 2017.