

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Keila Heringer Mendonça Botelho

**Espectrometria de massas com ionização por *paper spray*  
e métodos quimiométricos aplicados à identificação  
de adulterações em açúcar e óleo de coco**

Belo Horizonte

2018

UFMG / ICEx / DQ.1276<sup>a</sup>

D. 701<sup>a</sup>

KEILA HERINGER MENDONÇA BOTELHO

**Espectrometria de massas com ionização por *paper spray*  
e métodos quimiométricos aplicados à identificação  
de adulterações em açúcar e óleo de coco**

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

BELO HORIZONTE

2018

M534e Mendonça, Keila Heringer  
2018 Espectrometria de massas com ionização por paper  
D spray e métodos quimiométricos aplicados á  
identificação de adulterações em açúcar e óleo de coco  
[manuscrito] / Keila Heringer Mendonça. 2018.  
xiii, 70 f. : il.

Orientador: Evandro Piccin .

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

1. Química Analítica -Teses 2. Alimentos-  
adulteração e inspeção - Teses 3. Espectrometria de  
massas -teses 4. Quimiometria - Teses. 5. Oleos e  
gorduras-teses 5. Coco - teses I. Piccin, Evandro  
Orientador . II. Título.

CDU 043

**"Espectrometria de Massas com Ionização por *Paper Spray* e Métodos Quimiométricos Aplicados à Identificação de Adulterações em Açúcar e Óleo de Coco"**

**Keila Heringer Mendonça**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

*Evandro Piccin*

Prof. Evandro Piccin - Orientador  
UFMG

*Rodinei Augusti*

Prof. Rodinei Augusti  
UFMG

*Marcelo Martins de Sena*

Prof. Marcelo Martins de Sena  
UFMG

Belo Horizonte, 22 de março de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por ser para mim mais do que religião. Por ser um Pai amigo e presente, que me sustenta, escuta, responde, protege e guia meus caminhos.

Agradeço aos meus pais, Eudis e Sandra, pelo amor incondicional, pelos conselhos e por terem batalhado tanto para que eu e meu irmão tivéssemos sempre as melhores condições de estudo possíveis.

Agradeço ao Bruno, meu amor e melhor amigo, por todo o cuidado e carinho. Pela imensurável ajuda nos últimos anos. Por acreditar em mim e me encorajar a seguir em frente. Agradeço por ter me dado o Dani, meu melhor presente, e junto com ele um sentido novo para a minha vida. E por fim, agradeço por você ter se tornado o pai amoroso, responsável e divertido que você é.

Agradeço ao Daniel, meu filho querido, por ter me feito experimentar um amor maior do que eu imaginava que pudesse existir. Cada pequena conquista que você alcança - dar os primeiros passinhos, dizer a primeira palavra, começar a falar e a falar muito, aprender a escrever o seu nome - traz uma alegria tão grande que supera todo o cansaço.

Agradeço a minha sogra Nelma, por cuidar do Daniel com tanto carinho para que eu pudesse recomeçar e concluir este trabalho.

Agradeço ao meu irmão Rodrigo, a minha cunhada Grazi, e as minhas queridas sobrinhas Isadora e Letícia; a minha irmã do coração Adilene; aos meus avós, Hugo e Maria; e aos meus tios, tias, primos e primas por formarem uma família unida, que cuida e se importa. É um privilégio pertencer a uma família assim.

Agradeço ao professor Evandro Piccin, pela orientação, pelo incentivo, amizade e pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar. Agradeço também pelos inúmeros ensinamentos em eletroanalítica, microfluídica e microfabricação, que não foram abordados nesse texto, e pela oportunidade de conhecer e trabalhar em um laboratório com a estrutura do LMF (Laboratório de Microfabricação) do CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais).

Agradeço ao professor Rodinei Augusti pelos ensinamentos em Espectrometria de Massas, pela disposição para esclarecer dúvidas e por disponibilizar o equipamento para a realização dos experimentos.

Agradeço aos amigos do grupo de pesquisa do professor Evandro, especialmente ao Hebert e à Victoria por me ensinarem a operar o equipamento e por toda a ajuda durante as análises; e ao Odilon, pelo apoio fundamental na reta final do trabalho.

Agradeço aos amigos do LAMS (Laboratório de Microfluídica e Separações), especialmente à Juliane, Júlia, Denise, Yessica, Luiz, Tatá, Millena, George, Karina, Glaucimar, Diego e Jaime, pela amizade e convívio agradável no laboratório.

Agradeço aos amigos Susana, Júlia, Lucas, Bernardo e Rosi, pela amizade durante esses anos.

Agradeço aos amigos do grupo de Quimiometria, especialmente ao Marcelo, Leko, Karen e Camila, pela amizade, conversas agradáveis e ajuda em quimiometria.

Agradeço ao recém-formado grupo da “Gordice e Bрита” (kkkk): Ricardo, Cyntia, Brenda, Thiago, Lili, Jarbas, Diogo, Daiane, Mari, Guilherme e Poli, pelas conversas, amizade e encontros sempre deliciosos.

Agradeço aos amigos ex-alunos do DQ, especialmente à Cristina, Júnia, Binatti, Phillippe, Luiza, Ana Flávia, Lilian e Karina, pela amizade e o carinho que não diminuíram com a distância.

Agradeço aos demais professores do departamento de química pelos ensinamentos que contribuíram em minha formação.

Agradeço aos membros do colegiado e funcionários da secretaria do programa de pós-graduação, especialmente ao professor Ângelo, Letícia, Hélio, Rose, Paulete, Alessandra e Ana Carolina pela compreensão e ajuda valiosa.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Química, especialmente ao Sr Luiz pela simpatia e presteza.

Agradeço às agências de fomento, Capes, pelo financiamento da minha bolsa de mestrado, e Fapemig, pelo auxílio financeiro no projeto.

A todos vocês os meus sinceros agradecimentos!

*“O mais importante e bonito, do mundo, é isto:  
que as pessoas não estão sempre iguais,  
ainda não foram terminadas  
mas que elas vão sempre mudando.  
Afinam ou desafinam.  
Verdade maior.  
É o que a vida me ensinou.  
Isso que me alegra...  
O correr da vida embrulha tudo,  
a vida é assim:  
esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.  
O que Deus quer é ver a gente  
aprendendo a ser capaz  
de ficar alegre a mais,  
no meio da alegria,  
e inda mais alegre  
ainda no meio da tristeza!”  
João Guimarães Rosa*

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.”  
Fernando Pessoa*

## RESUMO

O aumento no consumo seguido da supervalorização de produtos considerados funcionais faz com que eles se tornem alvo de adulterações. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e confiáveis aplicados à fiscalização e detecção dessas adulterações se faz necessário. A espectrometria de massas por *Paper Spray* (PS-MS) se destaca pela sua simplicidade, rapidez e capacidade de analisar e quantificar compostos em matrizes complexas. A Quimiometria, por sua vez, é uma ferramenta analítica poderosa que auxilia na interpretação da grande quantidade de dados gerados. Neste trabalho, um método qualitativo para detectar a adição de açúcar mascavo em amostras de açúcar de coco e um método quantitativo para determinar a adição de gordura vegetal hidrogenada em óleo de coco extra virgem foram desenvolvidos. No método qualitativo proposto, a técnica PS-MS combinada à Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), foi capaz de detectar, de maneira inequívoca, adições de açúcar mascavo entre 2 e 30% m/m em 7 marcas diferentes de açúcar de coco, o que indica uma elevada robustez do método, através de uma análise rápida e com mínimo processamento da amostra. O método quantitativo, desenvolvido com a aplicação da técnica PS-MS e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), apresentou as mesmas características de rapidez e simplicidade de análise, sendo linear na faixa de trabalho proposta. No entanto, o método não apresentou exatidão satisfatória, sendo necessário alguns ajustes para a sua validação completa. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a importância da PS-MS aliada à quimiometria como técnica analítica para detecção de fraudes e adulterações em alimentos, com potencial de serem incorporados às análises de rotina de órgãos fiscalizadores e laboratórios de controle de qualidade de alimentos.

**Palavras-chave:** Adulteração economicamente motivada, *paper spray*, quimiometria, açúcar de coco, óleo de coco extra virgem

## ABSTRACT

### **Mass spectrometry paper spray ionization and chemometric methods applied to the identification of adulterations in sugar and coconut oil**

The increase in consumption and overvaluation of functional products functional became them subject to adulterations. The development of fast and reliable analytical methods applied to detection of such adulterations is necessary. Mass spectrometry by Paper Spray Ionization (PS-MS) stands out for its simplicity, speed and ability to analyze and quantify compounds in complex matrices. Chemometrics is a powerful analytical tool that assists in the interpretation of the large amount of data generated. In this work, a qualitative method to detect the addition of brown sugar in samples of coconut sugar and a quantitative method to determine the addition of hydrogenated vegetable fat in extra virgin coconut oil were developed. In the qualitative method, the PS-MS technique combined with the Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) was able to detect, unequivocally, additions of brown sugar between 2 and 30% m / m in 7 different brands of coconut sugar, which indicates a high robustness of the method, through a quick analysis and with minimum processing of the sample. The quantitative method, developed with the application of PS-MS technique and Regression by Partial Least Squares (PLS) technique, presented the same characteristics of speed and simplicity of analysis, being linear in the proposed work range. However, the method did not present satisfactory accuracy and some adjustments were necessary for its complete validation. The results obtained in this work reinforce the importance of PS-MS combined with chemometrics as an analytical technique for the detection of food fraud and adulteration, with the potential to be incorporated into the routine analysis of inspection agencies and food quality control laboratories.

**Keywords:** Economically motivated adulteration, paper spray, chemometrics, coconut sugar, virgin coconut oi

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de câncer. ....	3
Figura 2 - Gráficos gerados pelo Google Trend para os termos “coconut oil” (2A) e “coconut sugar” (2B) entre os anos de 2004 e 2018. ....	6
Figura 3 - Frederick Accum e seu trabalho “A treatise on adulterations of food and culinary poisons”, publicado em 1820. (Adaptado de 32).....	10
Figura 4 - Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas .....	13
Figura 5 - Ilustração do processo de Ionização por Electrospray. (Adaptado de 38)....	15
Figura 6 - Analisador de Massas Ion Trap. (Adaptado de 40) .....	17
Figura 7 - Fonte de Ionização por Paper Spray. (Adaptado de 45) .....	20
Figura 8 - Etapas do processo de fabricação do açúcar de coco. (Adaptado de 60)....	26
Figura 9 - A) Espectrômetro de massas modelo LCQ FLEET (Thermo Fisher) com analisador do tipo ion trap e fonte de ionização por paper spray. B) Detalhes da fonte de ionização paper spray. ....	29
Figura 10 - Espectros de massas com ionização paper spray obtidos para o açúcar de coco AC1 nos modos positivo (A) e negativo (B).....	31
Figura 11 - Fórmula estrutural do fructooligossacarídeo Kestose. (Adaptado de 64)..	33
Figura 12 - Espectros obtidos por PS(+)-MS para as amostras de açúcar de coco não adulteradas AC2, AC3, AC4, AC5, AC6 e AC7 e para a amostra de açúcar mascavo AM. ....	36
Figura 13 - Espectros de massas PS(+)-MS de uma amostra de açúcar de coco adulterada com 1% (A) e 30% (B) de açúcar mascavo. ....	39
Figura 14 - Valores previstos pelo modelo PLS-DA. [amostras adulteradas treinamento (▼) e teste (▽) e amostras autênticas treinamento (■) e teste (□)].....	39
Figura 15 - VIP scores do modelo PLS-DA.....	40

Figura 16 - Vetor de regressão do modelo PLS-DA. ....	41
Figura 17 - Composição em ácidos graxos do óleo de coco extra virgem. ....	45
Figura 18 - Espectros PS(+)-MS obtidos para uma amostra de VCO não adulterada (A) e para uma amostra de GVH (B). ....	48
Figura 19 - Faixa ampliada do espectro PS-MS do VCO não adulterado.....	49
Figura 20 - Estrutura dos surfactantes CAPB. (Adaptado de 78).....	50
Figura 21 - Espectros PS(+)-MS obtidos para uma amostra de VCO adulterada com 14% de VGH .....	52
Figura 22 - Gráfico dos valores de referência x valores preditos em % m/m [Amostras de calibração e amostras de validação]. ....	54
Figura 23 - Erro relativo das amostras do conjunto de validação do modelo PLS. ....	55
Figura 24 - VIP scores do modelo PLS.....	55
Figura 25 - Vetor de regressão do modelo PLS.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação internacional da obesidade e riscos de doença segundo o índice de massa corporal (IMC). Fonte: Organização Mundial de Saúde. ....	2
Tabela 2 - Trabalhos desenvolvidos com PS-MS aplicada à análise de alimentos. ....	20
Tabela 3 - Adutos observados nos espectros PS-MS das amostras de açúcar de coco e mascavo, nos modos positivo e negativo. ....	37
Tabela 4 - Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA. ....	42
Tabela 5 - Otimização dos modelos PLS pela detecção de amostras anômalas .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AMS</b>	<i>Ambient Mass Spectrometry</i>
<b>AM</b>	Açúcar Mascavo
<b>CC</b>	Corrente Contínua
<b>CI</b>	Ionização Química ( <i>Chemical Ionization</i> )
<b>CON</b>	Confiabilidade
<b>APCI</b>	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
<b>APPI</b>	<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
<b>DART</b>	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
<b>DESI</b>	<i>Desorption Electrospray Ionization</i>
<b>EASI</b>	<i>Easy Ambient Sonic-Spray Ionization</i>
<b>EI</b>	Ionização por Elétrons ( <i>Electron Ionization</i> )
<b>EMA</b>	<i>Economically Motivated Adulteration</i>
<b>ESI</b>	Ionização por <i>electrospray</i> ( <i>Electrospray Ionization</i> )
<b>ESP</b>	Especificidade
<b>EXA</b>	Exatidão
<b>FN</b>	Falsos negativos
<b>FP</b>	Falsos positivos

<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa ( <i>Gas Chromatography</i> )
<b>GC-MS</b>	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ( <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i> )
<b>GVH</b>	Gordura Vegetal Hidrogenada
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>ICP</b>	Plasma Indutivamente Acoplado ( <i>Inductively Coupled Plasma</i> )
<b>m/m</b>	Razão massa/massa
<b>m/z</b>	Razão massa/carga
<b>MS</b>	Espectrometria de Massas ( <i>Mass Spectrometry</i> )
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de Massas Sequencial
<b>PCA</b>	Análise de Componentes Principais ( <i>Principal Component Analysis</i> )
<b>PLS</b>	Método de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais ( <i>Partial Least Squares</i> )
<b>PLS-DA</b>	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais ( <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> )
<b>PS</b>	Ionização por <i>Paper spray</i> ( <i>Paper spray Ionization</i> )
<b>PS(-)-MS</b>	Espectrometria de Massas com Ionização <i>Paper spray</i> no modo negativo
<b>PS(+)-MS</b>	Espectrometria de Massas com Ionização <i>Paper spray</i> no modo positivo
<b>RMSEC</b>	Raiz quadrada do erro médio de calibração ( <i>Root Mean Square Error of Calibration</i> )

<b>RMSECV</b>	Raiz quadrada do erro médio de validação cruzada ( <i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> ).
<b>RMSEP</b>	Raiz quadrada do erro médio de previsão ( <i>Root Mean Square Error of Prediction</i> )
<b>RPD</b>	Residual Prediction Deviation
<b>SEL</b>	Seletividade
<b>SEN</b>	Sensibilidade
<b>VCO</b>	<i>Virgin Coconut Oil</i>
<b>VIP</b>	Importância da Variável na Projeção ( <i>Variable Importance in Projection</i> )
<b>VL</b>	Variáveis Latentes

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 .....	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
2.1 Coco e derivados: Produtos de Interesse Comercial .....	7
2.2 Adulteração de Alimentos .....	9
2.3 Espectrometria de Massas.....	11
2.3.1 Conceitos Gerais .....	11
2.3.2 Fontes de Ionização Ambiente.....	18
2.3.3 Fonte de Ionização por Paper Spray e aplicações da PS-MS em análise de alimentos.....	19
2.4 Quimiometria.....	21
2.4.1 Mínimos Quadrados Parciais (PLS) .....	21
2.4.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) .....	24
CAPÍTULO 3 .....	25
PS-MS APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO DE AÇÚCAR DE COCO COM AÇÚCAR MASCAVO .....	25
3.1 Açúcar de Coco .....	25

3.2	Objetivos .....	27
3.3	Parte Experimental.....	27
3.3.1	Amostras e Reagentes .....	27
3.3.2	Instrumentação .....	28
3.3.3	Métodos Quimiométricos.....	29
3.4	Resultados e Discussão .....	30
3.4.1	PS-MS do Açúcar de Coco e do Açúcar Mascavo.....	30
3.4.2	Construção de um modelo qualitativo utilizando Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) .....	39
3.5	Conclusões Parciais.....	43
CAPÍTULO 4 .....		44
PS-MS APLICADA À QUANTIFICAÇÃO DA GORDURA VEGETAL HIDROGENADA ADICIONADA AO ÓLEO DE COCO EXTRA VIRGEM.....		44
4.1	Óleo de Coco Extra Virgem (VCO).....	44
4.2	Objetivos .....	45
4.3	Parte Experimental.....	46
4.4.1	PS-MS das Amostras de Óleo de Coco Extra Virgem e GVH .....	47
4.4.2	Construção de um modelo quantitativo utilizando Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) .....	52
4.5	Conclusões Parciais.....	57
CAPÍTULO 5 .....		58
CONCLUSÕES GERAIS.....		58
CAPÍTULO 6 .....		59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		59
ANEXO I.....		67
ANEXO II .....		69

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO**

A prevalência de sobrepeso e obesidade vem aumentando rapidamente no Brasil e no mundo, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma epidemia mundial e um dos maiores problemas de saúde pública na atualidade.<sup>1</sup> Um artigo publicado na revista médica *New England Journal of Medicine* estimou que 2,2 bilhões de pessoas (aproximadamente 30% da população mundial) possuem excesso de peso. A pesquisa, considerada a mais abrangente sobre o tema, foi realizada em 195 países ao longo de 35 anos e concluiu que o número de obesos mais que dobrou em 75 países entre os anos de 1980 e 2015.<sup>2</sup>

A obesidade é definida como uma doença crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal, que causa prejuízos à saúde do indivíduo.<sup>1</sup> Existem diversas maneiras de classificar e diagnosticar a obesidade. Uma das mais utilizadas baseia-se na gravidade do excesso de peso calculado pelo Índice de Massa Corporal (IMC), através da relação mostrada na equação 1:

$$\text{IMC} = \text{Peso atual (kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m}^2\text{)} \quad (1)$$

A Tabela 1 apresenta a classificação internacional dos níveis (graus) de obesidade, segundo os valores de IMC e seus respectivos riscos de doenças. Convenciona-se chamar de sobrepeso o IMC de 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup> e obesidade o IMC maior ou igual a 30 kg/m<sup>2</sup>.<sup>1</sup>

O excesso de gordura corporal é responsável por desencadear ou agravar uma série de doenças, tais como, hipertensão, diabetes tipo 2, osteoartrite, acidente vascular cerebral (AVC), disfunção erétil, síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) e alguns tipos de câncer.<sup>3,4</sup> Um estudo publicado no periódico *Journal of the American Medical Association* concluiu que mais de

160 mil "excessos" de mortes por ano, nos Estados Unidos da América, são causadas por doenças relacionadas à obesidade.<sup>5</sup>

Tabela 1 - Classificação internacional da obesidade e riscos de doença segundo o índice de massa corporal (IMC). Fonte: Organização Mundial de Saúde.

<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Classificação</b>	<b>Grau de Obesidade</b>	<b>Risco de Doença</b>
< 18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5 - 24,9	Normal	0	Normal
25,0 - 29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30,0 - 34,9	Obesidade	I	Elevado
35,0 - 39,9	Obesidade	II	Muito elevado
>40,0	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

Acompanhando a tendência mundial, a obesidade no Brasil também aumentou significativamente nos últimos dez anos, passando de 11,8%, em 2006, para 18,9%, em 2016.<sup>6</sup> A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), realizada pelo Ministério da Saúde em parceria com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), divulgou que cerca de 57% dos brasileiros maiores de 18 anos estão acima do peso, o que representa aproximadamente 82 milhões de pessoas.<sup>7</sup>

O acúmulo de gordura corporal está fortemente associado ao risco de desenvolver mais de 10 tipos de câncer, dentre eles câncer de esôfago, estômago, pâncreas, vesícula biliar, fígado, intestino (cólon e reto), rins, mama, ovário, endométrio e tireoide. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), aproximadamente 13 em cada 100 casos de câncer no Brasil são atribuídos ao sobrepeso e obesidade. Estima-se que somente por meio da alimentação saudável, prática regular de atividade física e peso corporal adequado, aproximadamente 1 em cada 3 casos de ocorrência de câncer no nosso país possa ser prevenido.<sup>8</sup> A Figura 1 apresenta uma estimativa dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de câncer.<sup>9</sup>

Segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO), o estilo de vida urbano moderno é uma das principais causas do aumento de peso populacional. A diminuição do número de refeições realizadas em casa, a necessidade de se realizar refeições em curto espaço de tempo, o aumento compensatório da alimentação em redes de *fast food*, a privação de sono, o efeito do estresse no aumento do apetite e o sedentarismo são os fatores ambientais que mais contribuem para esse quadro.<sup>10</sup>

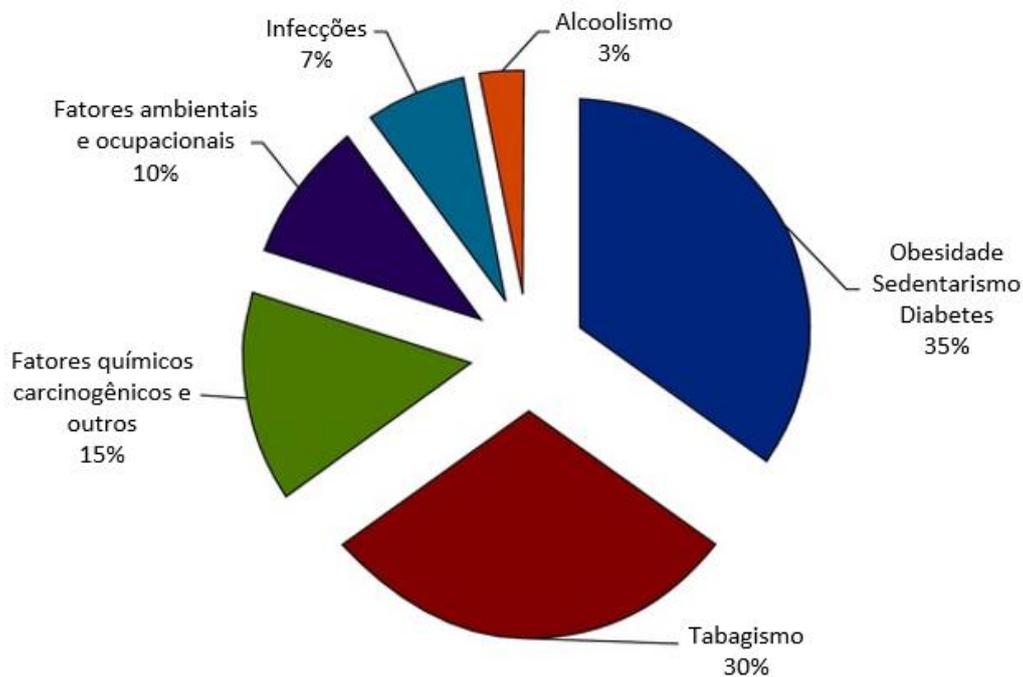


Figura 1 - Principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de câncer.  
(Adaptado de 9)

As populações com maior grau de pobreza e menor nível educacional apresentam uma maior taxa de aumento de obesidade entre os indivíduos. Esse fato é decorrente da insegurança alimentar existente nos países pobres e em desenvolvimento. A insegurança alimentar ocorre quando o acesso e a disponibilidade de alimentos são escassos, sendo um dos grandes fatores causadores, tanto da inanição, quanto da obesidade. A vulnerabilidade social impede que os indivíduos tenham o direito de escolher a qualidade da comida que chega à mesa, obrigando-os a trocarem alimentos de qualidade por alimentos baratos que são, na maioria das vezes, ricos em gordura, açúcar

refinado, sódio, contaminados com agrotóxicos e outros aditivos alimentares.<sup>11</sup> Segundo o IBGE, cerca de 52 milhões de brasileiros não têm acesso regular e permanente à alimentação, em quantidade e qualidade adequadas, ou seja, se encontram em situação de insegurança alimentar.<sup>7</sup>

Desde 1999, o Ministério da Saúde desenvolve ações com o objetivo de conscientizar a população e prevenir o sobrepeso. Uma dessas ações foi a homologação da Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN), que contém diretrizes programáticas que visam promover, proteger e apoiar práticas alimentares e estilos de vida que levem a um nível nutricional e de saúde ideal.<sup>12,13</sup>

O apelo por uma alimentação mais saudável levou os consumidores a buscarem por alimentos considerados funcionais que, além de suas funções nutricionais básicas, também produzam efeitos benéficos à saúde, reduzindo o risco de obesidade, diabetes, doenças degenerativas e câncer.

Dentre a grande variedade de produtos lançados pela indústria de alimentos funcionais e divulgados pela mídia nos últimos anos, destaca-se o óleo de coco extra virgem (VCO - *Virgin Coconut Oil*) por suas propriedades terapêuticas e pelo seu potencial efeito emagrecedor. Além do VCO, o açúcar de coco também tem chamado atenção por apresentar um baixo valor de índice glicêmico em relação ao açúcar refinado.<sup>14</sup>

A Figura 2 foi gerada utilizando o *Google Trends*, que é uma ferramenta que apresenta gráficos obtidos a partir da frequência com que um termo particular é procurado em várias regiões do mundo.<sup>15</sup> O eixo horizontal do gráfico representa o tempo e o vertical a frequência relativa com que um termo é buscado mundialmente. Um valor de 100 representa o pico de popularidade de um termo. Para a construção dos gráficos foram pesquisados os termos em inglês “*coconut oil*” (2A) e “*coconut sugar*” (2B), entre os anos de 2004 e 2018. Ambos os termos apresentaram um aumento contínuo de buscas a partir do início de 2012 e mantiveram sua popularidade, o que indica que esses alimentos continuam a despertar o interesse da população.

O grande destaque na mídia, seguido pela acentuada procura pelos produtos, refletiu no aumento da demanda de produção e conseqüentemente na elevação do preço do óleo e do açúcar de coco. Esse aumento no valor econômico tornou os produtos mais propensos a sofrerem Adulteração com Motivação Econômica (EMA - *Economically Motivated Adulteration*), que consiste na prática fraudulenta de substituir ou adicionar intencionalmente uma substância em um produto com o objetivo de aumentar o seu valor de mercado e reduzir os custos de produção.<sup>16</sup>

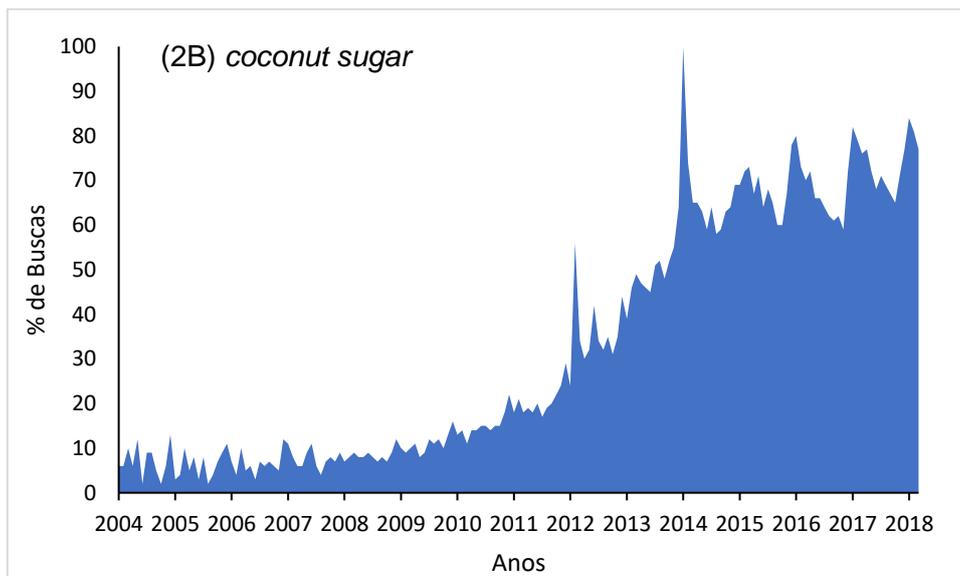
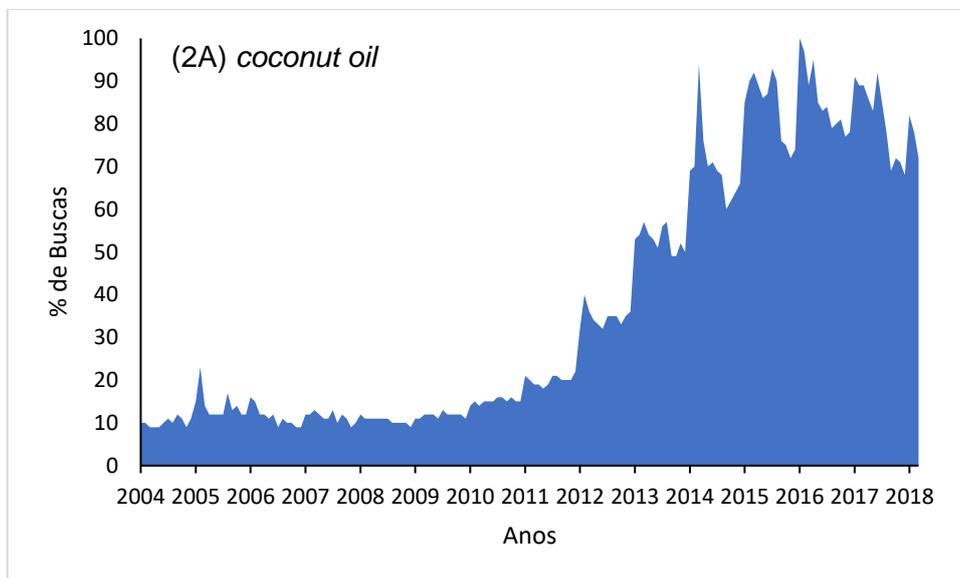


Figura 2 - Gráficos gerados pelo *Google Trend* para os termos “*coconut oil*” (2A) e “*coconut sugar*” (2B) entre os anos de 2004 e 2018.

Apesar do empenho dos órgãos fiscalizadores em coibir práticas dessa natureza, diversos casos envolvendo adulteração de alimentos são noticiados rotineiramente pela imprensa. A ineficácia ou inexistência de métodos que monitorem a qualidade dos alimentos dificulta o desenvolvimento dos processos investigativos. Atualmente, técnicas espectroscópicas, tais como análise por infravermelho (próximo e médio), UV-vis e Raman têm sido empregadas para detectar adulteração em alimentos.<sup>17,18</sup> Técnicas como a cromatografia líquida ou cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massas também têm sido bastante utilizadas.<sup>19</sup> No entanto, essas técnicas geralmente demandam muitas etapas de preparação de amostras e um longo tempo de análise. Nos últimos anos, o emprego da Espectrometria de Massas com ionização por *Paper Spray* tem se destacado por ser uma técnica altamente sensível, seletiva e pela sua capacidade de analisar compostos presentes em misturas complexas de uma forma simples e direta.

A quimiometria, por sua vez, é uma área de estudo que surgiu da necessidade de extrair o máximo de informações químicas do grande volume de dados produzidos pela instrumentação moderna. Através da aplicação de métodos matemáticos e estatísticos é possível, na maioria das vezes, minimizar a sobreposição de sinais, auxiliar na interpretação dos resultados e agilizar o processo de análise dos dados.<sup>20</sup>

Nesse contexto, na primeira parte deste trabalho foi proposto um método para identificar amostras de açúcar de coco adulteradas com açúcar mascavo utilizando a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Na segunda parte, foi proposto um método para quantificar a adição de gordura vegetal hidrogenada em óleo de coco extra virgem utilizando a PS-MS combinada à regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

# **CAPÍTULO 2**

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Coco e derivados: Produtos de Interesse Comercial**

O Coco é o fruto produzido pelo coqueiro *Cocos Nucifera* L., uma espécie pertencente à família das *Arecaceae* (palmeiras). O coqueiro é uma planta com múltiplas funcionalidades devido à vasta gama de produtos derivados do seu cultivo. Em alguns países, principalmente no sudeste asiático, o coqueiro é comumente chamado de “Árvore da Vida” em virtude dos valores nutricionais e propriedades medicinais atribuídos ao coco e aos seus subprodutos.<sup>21</sup>

O cultivo do coqueiro tem se intensificado em diversos países. Atualmente, a produção mundial de coco é de 61 milhões de toneladas por ano. A Indonésia se destaca como o maior produtor mundial produzindo cerca de 19 milhões de toneladas de coco por ano. O segundo lugar é ocupado pelas Filipinas (14 milhões t/ano), seguido da Índia (11 milhões t/ano). O Brasil ocupa o quarto lugar, produzindo aproximadamente 3 milhões de toneladas de coco por ano.<sup>22</sup>

No Brasil, o cultivo se destina principalmente à produção de coco seco “*in natura*” ou na forma de produtos industrializados (coco ralado e leite de coco). Nos últimos anos, houve um aumento significativo na produção e no consumo de água de coco impulsionado, principalmente, pela inclusão de hábitos saudáveis no comportamento da população brasileira. Esse aumento gerou uma

boa perspectiva na comercialização da água de coco tanto no mercado interno brasileiro quanto no de exportação.<sup>22</sup>

Além da água, do óleo e do açúcar, outros produtos derivados do coco têm chamado a atenção dos consumidores. Dentre eles, destacam-se o leite e a farinha de coco. O leite de coco deixou de ser usado apenas para fins culinários e passou a ser vendido como bebida pronta para consumo, disputando mercado com outros extratos vegetais como, por exemplo, os leites de soja, de amêndoas e de arroz. A farinha de coco também tem conquistado os consumidores como alternativa à farinha de trigo. Por não conter glúten, ela pode ser consumida por celíacos. Além disso, por ser fonte de fibras, o consumo da farinha de coco também é recomendado ao restante da população brasileira que, no geral, possui uma alimentação pobre em fibras, o que a predispõe ao aumento da obesidade e diabetes.<sup>22, 23</sup>

Um artigo publicado no *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* fez um levantamento de vários estudos que tinham como objetivo identificar possíveis efeitos farmacológicos e atividades biológicas em substâncias constituintes do coco. Nesses estudos, muitos extratos e frações de diversas partes da fruta foram testados e compostos com diferentes atividades foram isolados. Os efeitos farmacológicos diferem de acordo com a parte da planta, ou da fruta, utilizada. Entre as encontradas, pode-se destacar as atividades:<sup>21</sup>

- Antioxidantes: encontrada em maior quantidade na polpa (copra) e na água de coco.
- Analgésicas, anti-inflamatórias e bactericidas: extrato produzido a partir da casca (fibra) do coco.
- Antidepressivas e anticonvulsivantes: raiz do coqueiro.
- Cardio e hepatoprotetoras: água de coco.
- Antidiabéticas: polpa do coco.
- Anti-hipertensiva: extrato produzido a partir do endocarpo do coco.

Outros setores, além das indústrias farmacêutica e alimentícia, se beneficiam do cultivo do coco. A indústria de cosméticos utiliza amplamente os

derivados do coco na produção de shampoos, hidratantes, sabonetes e loções.<sup>24</sup> As fibras do coco são usadas na produção de tecidos e aproveitadas por artesãos para a fabricação de cestas e chapéus. A casca é considerada um excelente adubo natural e suas fibras servem de base para a fabricação de biomantas, que ajudam a evitar a erosão do solo e recompor a vegetação.<sup>25</sup>

As fibras naturais extraídas da casca do coco também são utilizadas na fabricação de assentos, encostos de bancos e de cabeça, que equipam os veículos *Mercedes-Benz* produzidos no Brasil.<sup>26</sup>

Indústrias de reciclagem utilizam a biomassa do coco como alternativa na geração de eletricidade. A companhia SGFE (*Sustainable Green Fuel Enterprise*) desenvolve um projeto que transforma cascas de coco em carvão vegetal ou em briquetes de material cru. Desde 2009, esses produtos têm sido usados na substituição da lenha para a queima industrial e residencial no Camboja, onde 80% das residências usam madeira ou carvão como principal fonte de combustível.<sup>27,28</sup> No Brasil, como publicado no jornal da UNICAMP, a tecnologia está em desenvolvimento e ainda não foi implantada em escala comercial.<sup>29</sup>

## **2.2 Adulteração de Alimentos**

A adulteração de alimentos é definida como sendo a diminuição da qualidade de um alimento através da substituição, intencional ou não, de parte do alimento por produtos de menor valor financeiro ou nutricional. De acordo com o Ato Federal Sobre Alimentos, Drogas e Cosméticos (FFDCA, do inglês *Federal Food, Drugs and Cosmetics Act*), a lei primária sobre segurança alimentar do FDA (*Food and Drug Administration*) dispõe que um alimento pode ser declarado adulterado se:<sup>30</sup>

- a. alguma substância danosa a saúde é adicionada;
- b. ingrediente de menor qualidade ou valor é adicionado;
- c. algum componente de alto valor é extraído do alimento;

- d. a qualidade do alimento está fora dos padrões mínimos;
- e. o produto foi adicionado de algum ingrediente visando o aumento de volume/peso;
- f. o produto for alterado de forma a parecer mais caro.

A adulteração de alimentos é um assunto debatido e estudado há mais de 200 anos. No passado, ela era restrita a alguns produtos, como pães, cervejas e vinho, pelo fato de poucos alimentos serem produzidos em escala comercial. Até antes da revolução industrial, praticamente não havia comércio de alimentos industrializados. O consumidor podia ver, tocar e analisar algumas características sensoriais (cor, cheiro, textura) dos produtos que estavam sendo consumidos. Com o aumento da comercialização em massa de alimentos industrializados, o consumidor perdeu o controle sobre a qualidade do alimento a ser consumido, ficando a mercê do controle de qualidade dos fabricantes.<sup>31</sup>

Em 1820, o químico alemão Fredrick Accum, em seu trabalho “*A treatise on adulterations of food and culinary poisons*” (Um tratado sobre adulteração de alimentos e venenos culinários), já alertava sobre a presença de alguns adulterantes em alimentos, sendo alguns deles extremamente tóxicos para os consumidores. Segundo Fredrick, era comum a adição de azul da Prússia em chás, sais de chumbo e mercúrio em queijos com casca vermelha e doces, sais de cobre para melhorar a cor de pickles, e sais de alumínio, gesso e giz para deixar a farinha mais branca.<sup>31,32</sup>



Figura 3 - Frederick Accum e seu trabalho “*A treatise on adulterations of food and culinary poisons*”, publicado em 1820. (Adaptado de 32)

Atualmente, escândalos envolvendo adulteração de alimentos são frequentemente divulgados pela imprensa. No cenário mundial, a China ocupa um lugar de destaque. Em 2007, um esquema de adulteração de leite utilizando melamina foi descoberto. Sua adição visava aumentar o teor de nitrogênio total do leite, aumentando assim a remuneração dos produtores. A melamina porém, possui forte efeito nefrotóxico, o que provocou problemas renais em mais 300.000 pessoas e resultou na morte de 6 bebês, uma vez que os leites adulterados foram utilizados na produção de formulações infantis. Em 2016, um levantamento feito por Wenjing e Jianhong identificou 1553 notícias envolvendo fraudes ou adulterações de alimentos na China.<sup>33</sup>

No Brasil, foram descobertos esquemas de adulteração de carne bovina, pescado e leite em grande escala. Esquemas similares foram reportados na Europa, envolvendo a substituição de carne bovina por carne de cavalo, e a adição de água e a utilização de aditivos proibidos em carne de frango.

O Anexo I apresenta a Lei Nº 9.677 do Código Penal, que dispõe sobre a falsificação, corrupção, adulteração ou alteração de substâncias ou produtos alimentícios, considerados crimes hediondos contra a saúde pública.

Com o aumento no número e sofisticação das adulterações, o desenvolvimento de métodos analíticos mais rápidos e eficientes torna-se necessário. Neste cenário, o emprego de técnicas envolvendo um mínimo preparo de amostras, como a espectrometria de massas com ionização por *paper spray*, combinada a métodos quimiométricos tem se destacado na análise e controle de qualidade de alimentos.

## **2.3 Espectrometria de Massas**

### **2.3.1 Conceitos Gerais**

A Espectrometria de Massas (MS - Mass Spectrometry) é uma ferramenta analítica de grande aplicabilidade, uma vez que esta técnica é capaz de fornecer informações sobre:<sup>34</sup>

- a composição elementar de amostras;

- as estruturas de moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas;
- a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas;
- a estrutura e a composição de superfícies sólidas; e
- as razões isotópicas de átomos nas amostras.

Os princípios fundamentais da espectrometria de massas datam do final dos anos 1890, quando J. J. Thomson determinou a razão massa/carga do elétron, mas sua primeira aplicação em análises de rotina ocorreu no início da década de 40, quando a técnica começou a ser adotada pela indústria petrolífera para análise quantitativa de misturas constituídas por até nove hidrocarbonetos. Antes, as análises de misturas desse tipo eram feitas por destilação fracionada seguida por medidas de refração dos componentes separados, o que consumia, em média, 200 horas de trabalho do analista. Com o uso do espectrômetro de massas, informações semelhantes passaram a ser obtidas em poucas horas ou menos.<sup>34</sup>

A partir de 1950, os espectrômetros de massas comerciais foram aperfeiçoados e adaptados para a identificação e elucidação estrutural de diversos compostos orgânicos. Essa aplicação da MS, combinada à invenção da ressonância magnética nuclear e ao desenvolvimento da espectrometria no infravermelho, revolucionou o modo como os químicos orgânicos determinavam a estrutura das moléculas, sendo de fundamental importância até os dias de hoje.<sup>35</sup>

Nas décadas de 80 e 90, as aplicações da espectrometria de massas tiveram mudanças significativas. O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica permitiu que moléculas não-voláteis, com alto peso molecular ou termicamente instáveis como, por exemplo, a maioria das moléculas presentes nos alimentos ou amostras biológicas, fossem ionizadas e analisadas por MS. Em 2002, o pesquisador americano John B. Fenn, juntamente com Koichi Tanaka e Kurt Wüthrich, foi laureado com o prêmio Nobel de Química pelo desenvolvimento de métodos suaves de ionização e dessorção em análises espectrométricas de massas de macromoléculas biológicas.<sup>35</sup>

A Figura 3 apresenta, de maneira esquemática, os componentes de um espectrômetro de massas. Em geral, a análise de um composto por MS compreende as seguintes etapas: (1) a introdução da amostra, (2) a ionização das moléculas, (3) a passagem por um analisador de massas, responsável por separar os íons formados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ), (4) em seguida os íons são contados pelo detector que transforma o sinal em corrente elétrica e, por fim, (5) o processador converte a magnitude do sinal elétrico em função da razão  $m/z$  em dados, resultando no espectro de massas correspondente.

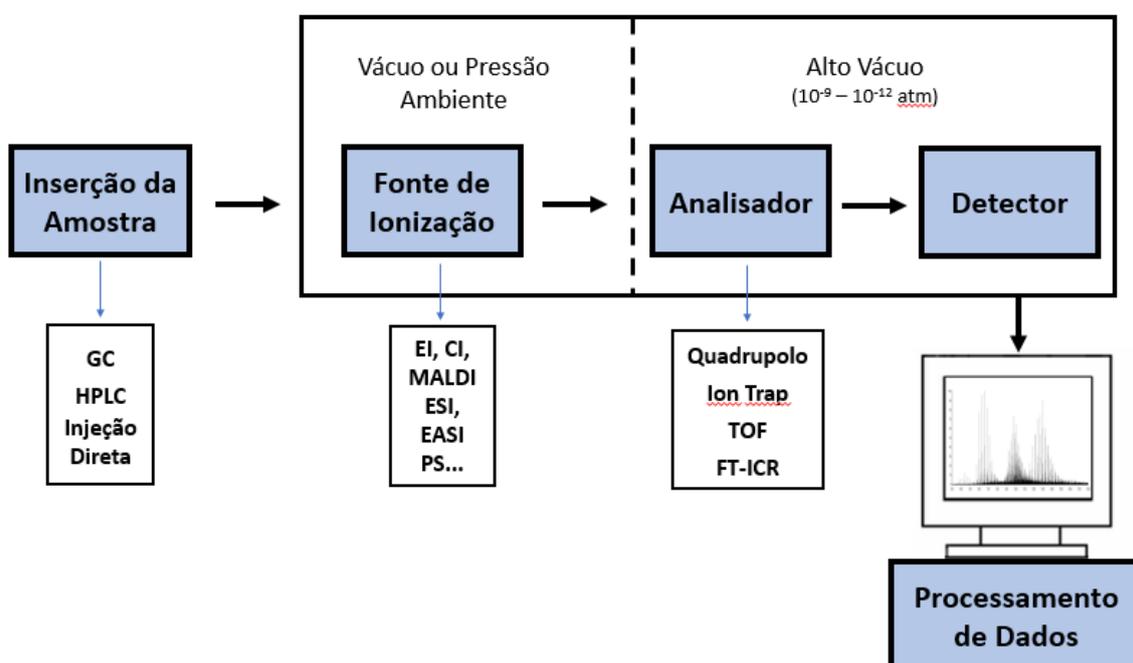


Figura 4 - Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas

O analisador de massas e o detector são sempre mantidos sob alto vácuo, enquanto a fonte, em diversas técnicas de ionização, opera à pressão atmosférica (API - *Atmospheric Pressure Ionization*).

O tipo da fonte de ionização e do analisador de massas é o que determina a aplicabilidade da MS. Inúmeros métodos de ionização, aplicáveis praticamente a todo tipo de analito, foram desenvolvidos ao longo da história da espectrometria de massas.<sup>36</sup>

O método mais simples e comum de converter a amostra em íons é a Ionização por Elétrons (EI - *Electron Ionization*). Na EI, um feixe de elétrons de alta energia é emitido a partir de um filamento aquecido e colide com as moléculas do analito. Na colisão um ou mais elétrons são retirados das moléculas e cátions são criados. A energia transmitida à amostra durante o processo é alta e pode levar a uma grande quantidade de fragmentações do íon molecular. Uma desvantagem da EI é que a amostra deve ser relativamente volátil, o que impede a análise de compostos de alto peso molecular.<sup>35</sup>

Na Ionização Química (CI - *Chemical Ionization*), as moléculas da amostra colidem com as moléculas de um de gás reagente (ex.: H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>OH) pré-ionizado. Com a colisão, algumas moléculas da amostra são ionizadas por vários mecanismos, como transferência de prótons, transferência de elétrons e formação de adutos. Assim como a EI, a Ionização Química exige que a amostra seja volátil (baixo peso molecular).<sup>35</sup>

Existem também as chamadas técnicas de dessorção (DI - *Desorption Ionization*), como a Espectrometria de Massas de Íon Secundário (SIMS - *Secondary Ion Mass Spectrometry*), o Bombardeamento de Átomos Rápidos (FAB - *Fast Atom Bombardment*) e a Ionização por Dessorção a Laser Assistido por Matriz (MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Na ionização por dessorção, a amostra a ser analisada é dissolvida ou dispersa em uma matriz. Em seguida, é emitido sobre a mistura (amostra + matriz) um feixe de íons de alta energia (SIMS), um feixe de átomos neutros (FAB) ou de fótons de alta intensidade. Na colisão com esses íons/átomos/fótons, algumas moléculas da amostra são ionizadas, expelidas da superfície e aceleradas na direção do analisador. Os métodos SIMS e FAB são capazes de analisar compostos com peso molecular de até 20.000 Da, como polipeptídios e oligonucleotídeos. Já a MALDI pode ser aplicada na análise de compostos com pesos moleculares próximos de 300.000 Da.<sup>35</sup>

Até a década de 80, as fontes de ionização operavam somente sob alto vácuo. As fontes EI e CI eram, até então, os métodos de ionização mais utilizados e os que apresentavam melhor desempenho, uma vez que a quantidade de íons e solventes que adentram o equipamento não são capazes

de comprometer o vácuo. No entanto, o emprego dessas técnicas se limitava à análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis.<sup>36</sup>

Em 1989, o trabalho publicado por John Fenn *et al.* revolucionou o campo de estudo da espectrometria de massas ao divulgar uma nova técnica de ionização, menos “agressiva” e que opera à pressão atmosférica: a Fonte de Ionização *Electrospray* (ESI - *Electrospray Ionization*).<sup>36</sup>

Na ESI, os íons são formados fora do espectrômetro de massas. A amostra é diluída em um solvente volátil, em meio ácido ou básico, e as moléculas do analito são protonadas (modo positivo) ou desprotonadas (modo negativo). Os íons também podem ser observados na forma de adutos, coordenados com cátions ou ânions. O processo de ionização por *Electrospray* (Figura 5) ocorre, basicamente em três etapas: (1) a nebulização da solução contendo a amostra em gotículas carregadas produzidas diretamente pela aplicação de voltagem no capilar (2-5 kV), (2) a liberação de íons a partir das gotículas e (3) o transporte dos íons da região de pressão atmosférica da fonte de ionização para a região de alto vácuo do analisador.<sup>37</sup>

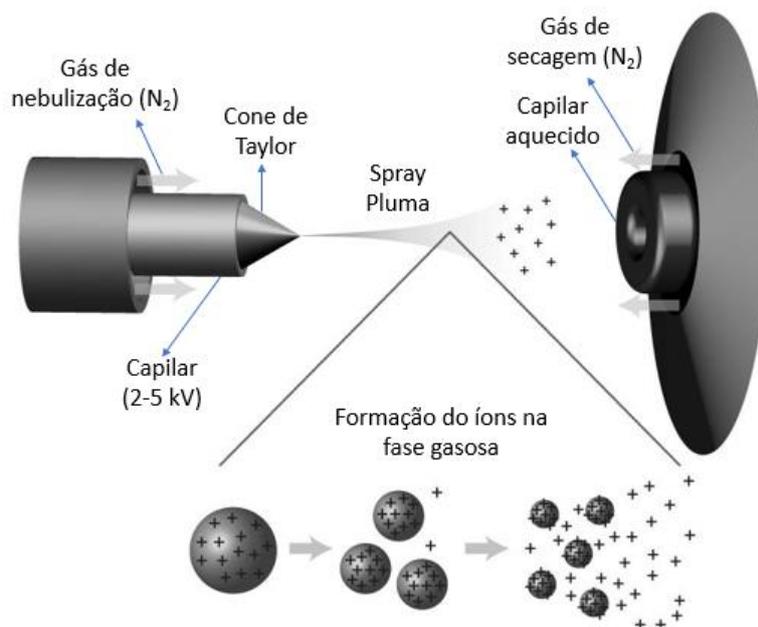


Figura 5 - Ilustração do processo de Ionização por *Electrospray*.  
(Adaptado de 38)

A transferência dos íons presentes em solução para a fase gasosa se dá do seguinte modo: o tubo capilar expulsa pequenas gotículas carregadas (spray) para dentro da câmara de ionização. As gotículas carregadas enfrentam um contrafluxo de um gás de secagem (em geral, nitrogênio) que evapora as moléculas de solvente. Assim, a densidade de carga de cada gotícula aumenta até que as forças repulsivas excedam a sua tensão superficial (limite de Rayleigh), a gotícula então se divide em tamanhos menores (explosão coulômbica). O processo se repete até que os íons da amostra, livres de solvente, se encontrem em fase gasosa.<sup>37</sup>

Com o surgimento da ESI, análises de moléculas não voláteis e de grande massa molecular, como as macromoléculas biológicas, se tornaram possíveis. Como a amostra a ser analisada deve ser introduzida em solução, é possível o acoplamento da ESI-MS com técnicas de separação, como a cromatografia líquida (LC-ESI-MS). Outra peculiaridade da Ionização por *Electrospray* está no fato de ser uma técnica de ionização branda, o que permite a análise da molécula intacta (sem ou com pouca fragmentação), mantendo inclusive as interações não covalentes.<sup>37,39</sup>

Nas análises por MS, após a ionização da amostra, os íons são acelerados, por ação de um campo elétrico, na direção do analisador de massas, onde são separados de acordo com as suas razões  $m/z$ . Os analisadores de massas se diferenciam pelo seu modo de trabalho, pela sua exatidão e pela resolução. A exatidão é medida pelo erro calculado (em ppm) do desvio da medida experimental em relação ao valor de massa teórico. A alta exatidão de massas oscila entre valores de 0,1 a 50 ppm de erro. A resolução pode ser definida como a capacidade de o analisador medir a razão  $m/z$  com a menor diferença possível da razão  $m/z$  teórica. Os analisadores de massas comerciais possuem resolução que vai de 1.000 (resolução unitária), até 100.000 (alta resolução) e de 100.000 até 1.000.000 (altíssima resolução).<sup>36</sup>

Dentre os analisadores de massas, o mais comum é o quadrupolar (Q). Esse analisador é composto por quatro barras sólidas paralelas na direção do feixe de íons. Uma voltagem de corrente contínua (CC) e uma radiofrequência (RF) são aplicadas às barras gerando um campo oscilante entre elas. A RF é

então variada para que apenas os íons de uma razão  $m/z$  específica obtenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo e atinjam o detector. Os demais íons de diferentes razões  $m/z$  passam por uma oscilação instável e colidem com uma das barras. Analisadores do tipo quadrupolo possuem baixo custo, fácil operação e manutenção. O uso de equipamentos híbridos, tais como o analisador triplo quadrupolo, permite a realização de experimentos de espectrometria de massas do modo sequencial (MS/MS). A desvantagem desses analisadores são a baixa resolução, o que torna impossível a determinação da composição elementar exata da amostra.<sup>35</sup>

Outro analisador amplamente utilizado é o analisador por “aprisionamento de íons” (IT - *Ion Trap*). O IT (Figura 6) é composto de dois eletrodos hiperbólicos terminais e um eletrodo em forma de anel. Uma corrente alternada (CA) e um potencial (RF) são aplicados entre os eletrodos terminais e o eletrodo em forma de anel. No *Ion Trap*, íons de todos os valores de razão  $m/z$  ficam “aprisionados” em uma mesma região do espaço, oscilando em trajetórias concêntricas. Em seguida, é feita uma varredura no potencial de RF e os íons, com valores de  $m/z$  crescentes, adquirem uma trajetória instável e são ejetados rumo ao detector. Um analisador do tipo IT apresenta uma maior sensibilidade em relação ao quadrupolo linear, mas tem capacidade de resolução igualmente baixa.<sup>35,40</sup>

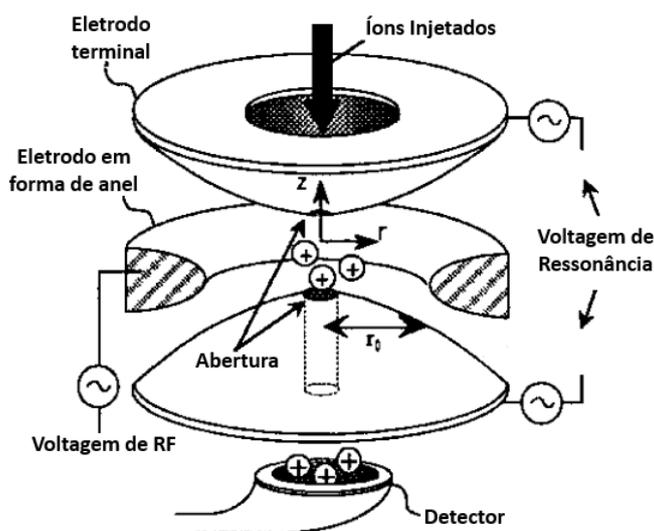


Figura 6 - Analisador de Massas Ion Trap.  
(Adaptado de 40)

O analisador de massas por tempo de voo (TOF - *time-of-flight*) possui resolução de massas na casa dos milhares e é muito utilizado no sequenciamento de peptídeos em análises de proteínas. Os analisadores FT-ICR (*Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance*) e *Orbitrap* são considerados de altíssima resolução e exatidão. O mecanismo do FT-ICR é baseado na trajetória circular de partículas carregadas sob ação de um forte campo magnético e tem sido utilizado na caracterização química do petróleo e derivados (petroleômica). O *Orbitrap* é o mais avançado analisador de massas da atualidade, podendo ser aplicado nas mais diversas áreas, desde análise de resíduos e contaminantes em águas e alimentos, controle de drogas e dopagem, toxicologia, até as modernas ciências “ômicas” (proteômica, glicômica, lipidômica, metabolômica, alimentômica, petroleômica, etc).<sup>36,40</sup>

### **2.3.2 Fontes de Ionização Ambiente**

Embora tenham simplificado, de forma significativa, as análises por Espectrometria de Massas e estendido sua aplicação a uma grande variedade de moléculas, as técnicas de ionização à pressão atmosférica, como ESI, APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) e APPI (*atmospheric pressure photon ionization*), apresentam algumas limitações. A maior delas é a aplicação exclusiva de amostras em solução, o que demanda algumas etapas de preparo como, por exemplo, extração, preparo de soluções em solventes ultrapuros, ajuste do pH da solução contendo a amostra e, em alguns casos, o uso de técnicas de separação. Tais etapas aumentam o tempo e o custo da análise.<sup>41,42</sup>

Com o intuito de solucionar esses problemas, a partir de 2004, surgiram as técnicas de ionização ambiente (AMS - *Ambient Mass Spectrometry*), que têm como principal característica a capacidade de formar íons em um ambiente externo ao espectrômetro de massas, a partir de amostras em seu estado natural, com o mínimo ou nenhum pré-tratamento. As primeiras técnicas de ionização ambiente, DART (*Direct Analysis in Real Time*) e DESI (*Desorption Electrospray Ionization*), foram desenvolvidas a partir de modificações de

técnicas de ionização à pressão atmosférica já consolidadas, como ESI e MALDI.<sup>41,42</sup>

Dentre as inúmeras vantagens da ionização ambiente, destaca-se a possibilidade realizar análises “*in loco*”, com espectrômetros de massas portáteis, sem nenhum preparo de amostras.

### **2.3.3 Fonte de Ionização por Paper Spray e aplicações da PS-MS em análise de alimentos**

Um das técnicas de ionização à pressão ambiente desenvolvidas recentemente é a Ionização por *Paper Spray*. Desenvolvida por Wang *et. al.*, essa técnica possui características similares ao ESI. Desde a sua divulgação, a PS-MS tem sido amplamente utilizada devido à sua simplicidade, eficiência e capacidade de analisar amostras complexas com um mínimo ou nenhum preparo de amostras.<sup>43</sup>

Na PS-MS, um papel cromatográfico cortado em formato triangular é usado como substrato para a amostra e posicionado em frente à entrada do capilar do espectrômetro de massas. Após a adição da amostra, aplica-se uma diferença de potencial entre o papel e a entrada do equipamento, o que promove a formação de um spray de gotículas do solvente contendo os analitos ionizados devido ao acúmulo de cargas na ponta do papel. A geração de íons na ionização por *Paper Spray* se dá pelo mesmo mecanismo do ESI. A elevada diferença de potencial faz com que as gotículas formadas tenham um excesso de cargas (positivas ou negativas), e com a evaporação do solvente o volume da gota vai se reduzindo e se dividindo devido às forças de repulsão eletrostáticas, até restarem apenas moléculas do analito isoladas e carregadas.<sup>43,44</sup>

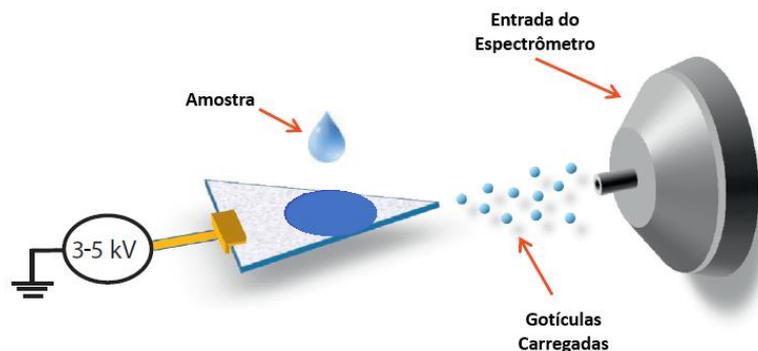


Figura 7 - Fonte de Ionização por *Paper Spray*.  
(Adaptado de 45)

Por sua capacidade de analisar compostos em baixas concentrações em matrizes complexas, a PS-MS vem sendo utilizada em diversas áreas e, dentre elas, a análise de alimentos, podendo ser aplicada na análise de uma grande variedade de alimentos, no controle de qualidade ou na detecção de fraudes e/ou adulterações.<sup>43</sup>

A Tabela 2 apresenta, de forma reduzida, alguns trabalhos desenvolvidos com PS-MS aplicada à análise de alimentos publicados nos últimos anos.

Tabela 2 - Trabalhos desenvolvidos com PS-MS aplicada à análise de alimentos.

Matriz	Objetivo	Referência
Chá	Obtenção de <i>fingerprint</i>	Deng e Yang (2013) <sup>46</sup>
Café	Diferenciação entre espécies, origem geográfica e valor comercial	Garret et al (2013) <sup>47</sup>
Bebidas não alcoólicas	Análise de 4-metilimidazol	Li et al (2013) <sup>48</sup>
Frutas e vegetais	Desenvolver um método de triagem para identificação dos pesticidas aldicarb, methomyl, methiocarb, imazali e tiabendazol	Evard et al (2015) <sup>49</sup>
Cerveja	Identificação de falsificações em cervejas	Pereira et al (2016) <sup>50</sup>
Bebidas cafeinadas	Determinação de cafeína	Taverna et al (2016) <sup>51</sup>

Bebidas cafeinadas	Determinação de cafeína	Sneha et al (2017) <sup>52</sup>
Whisky	Identificação de whisky falsificados	Teodoro et al (2017) <sup>53</sup>
Vinhos	Determinação de resveratrol	Di Donna (2017) <sup>54</sup>
Bebidas alcoolicas e não alcoolicas	Detecção e quantificação de seis corantes proibidos	Guo et al (2017) <sup>55</sup>
Peixe e água	Determinação de verde malaquita e leuco verde malaquita	Wei et al (2018) <sup>56</sup>

## 2.4 Quimiometria

A quimiometria pode ser definida como a disciplina que utiliza métodos matemáticos e estatísticos visando planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para extrair o máximo de informação química a partir de dados analíticos. As técnicas quimiométricas podem ser agrupadas em três grandes grupos: planejamento e otimização de experimentos, calibração multivariada e reconhecimentos de padrões, sendo que esta última ainda pode ser subdividida em técnicas supervisionadas e não supervisionadas.<sup>20</sup>

Nesta dissertação, foram utilizadas técnicas de calibração multivariada, através da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*), e de reconhecimento de padrões, através da aplicação da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Discriminant Analysis Partial Least Squares*).

### 2.4.1 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O método dos mínimos quadrados parciais (PLS) tem, em sua base, um conceito similar à PCA (Análise de Componentes Principais, do inglês *Principal Component Analysis*). Na PCA, ocorre uma decomposição de uma matriz  $\mathbf{X}$  em um somatório de componentes principais (PCs) ortogonais entre si. Já para a construção dos modelos PLS, é feita uma decomposição simultânea entre duas matrizes: uma matriz  $\mathbf{X}$ , de tamanho  $n \times p$ , que contém as  $p$  variáveis independentes (nessa dissertação, intensidade relativa em diferentes razões m/z) medidas para  $n$  amostras, e uma matriz  $\mathbf{Y}$ , que contém os valores de referência, que podem ser obtidos através de uma análise química realizada por outras técnicas ou serem previamente conhecidos, quando as amostras são preparadas especificamente para a construção dos modelos.<sup>57</sup>

Diferente do que ocorre na PCA, durante o processo de decomposição da matriz  $\mathbf{X}$  há uma perda da ortogonalidade entre as componentes principais (PCs), visando maximizar a variância explicada por cada uma delas simultaneamente em  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , e, devido a essa rotação, as PCs passam a ser chamadas de variáveis latentes (VLs).<sup>57</sup>

A matriz  $\mathbf{Y}$  pode ser um vetor  $n \times 1$ , quando apenas um valor de referência é utilizado no processo de decomposição matricial. Neste caso, o método quimiométrico é denominado PLS1. Quando  $\mathbf{Y}$  é uma matriz  $n \times z$  (sendo  $z > 1$ ) dois ou mais valores de referência são utilizados simultaneamente na decomposição matricial, sendo denominado então PLS2. A codificação "1" ou "2" se refere a ordem do tensor que contém os valores de referência, sendo PLS1 quando os valores de referência estão contidos em um vetor (tensor de 1ª ordem) e PLS2 quando os valores estão contidos em uma matriz (tensor de 2ª ordem).<sup>20,57</sup>

A base matemática do método PLS1 é dada pelas seguintes equações:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \quad (2)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^t + \mathbf{F} \quad (3)$$

**T** - Matriz de escores da matriz **X**

**U** - Matriz de escores da matriz **Y**

**P** - Matriz de pesos (*loadings*) de **X**

**Q** - Matriz de pesos (*loadings*) de **Y**

**E** - Resíduos de **X**

**F** - Resíduos de **Y**

O vetor de coeficientes de regressão linear **b** correlaciona **X** e **Y** de maneira linear, para *h* variáveis latentes, de acordo com o descrito pela equação 4.

$$\mathbf{u}_h = \mathbf{b}_h \mathbf{t}_h \quad (4)$$

Os valores de  $\mathbf{b}_h$  são agrupados em uma matriz diagonal **B**, que contém os coeficientes de regressão entre as matrizes **T** e **U**, e a melhor relação linear entre os escores dessas matrizes é obtida a partir das rotações das VLs de **X** e **Y** descritas anteriormente. A partir da matriz conjugada transposta **T\*** é possível a obtenção de valores de predição para novas amostras ( $\hat{Y}$ ), utilizando a equação 5.

$$\hat{Y} = \mathbf{T}^* \mathbf{B} \mathbf{Q} \quad (5)$$

Analisando as equações 4 e 5, pode-se concluir que o número de VLs selecionadas para a construção do modelo PLS é de fundamental importância para evitar o sobreajuste (escolha de um número de VLs excessivo), o que pode incluir informação não relevante no modelo, e para evitar o subajuste, quando informação relevante pode ser deixada de fora do modelo.<sup>20,57,58</sup>

Para a escolha do número adequado de VLs, um método de reamostragem chamado validação cruzada pode ser utilizado. Nesse método, o número de VLs ideal é aquele que apresentar o menor RMSECV (erro

quadrático médio de validação cruzada, do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation*). Diversos métodos para realizar a validação cruzada são descritos na literatura, sendo o *leave-one-out* o mais simples dentre eles. Nesse, uma amostra é removida do conjunto e um modelo é construído sem essa amostra. Essa amostra é então predita pelo modelo e o erro de predição é computado para modelos construídos com diferentes números de VLs. Esse processo é repetido até que todas as amostras tenham sido preditas, e então o RMSECV para cada número de VLs é estimado. Apesar de simples, o *leave-one-out* não é muito recomendado para modelo com muitas amostras ( $n > 20$ ) devido ao risco existente de sobreajuste. Partindo do mesmos princípios, outros métodos de validação cruzada são descritos na literatura, como o métodos da venezianas (*venetian blinds*, em inglês), no qual amostras são selecionadas para serem removidas do conjunto de calibração considerando um intervalo pré-determinado entre elas e o método dos blocos contínuos (*contiguous blocks*, em inglês), no qual um bloco de amostras em sequencia é retirado a cada rodada do processo de validação cruzada.<sup>20,57,58</sup>

Nesse trabalho, em todas as aplicações desenvolvidas, foi utilizado o método de validação cruzada por subconjuntos aleatórios. Nesse método, as amostras a serem removidas do conjunto são selecionadas de modo aleatório.<sup>20,57,58</sup>

#### **2.4.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)**

O PLS-DA pode ser considerado uma adaptação do método PLS para a aplicação em análises qualitativas. Os princípios matemáticos utilizados nos dois métodos são os mesmos, sendo que a diferença entre eles é a matriz **Y**. No PLS, a matriz **Y** é composta por valores numéricos que representam alguma propriedade da amostra, enquanto no PLS-DA, ela é composta por valores binários (normalmente 1 e 0), que indicam se uma amostra pertence ou não a uma classe pré-definida. Outra diferença entre o PLS e o PLS-DA é a maneira

como o número de VLs ideal é definido. Ao invés de se utilizar o RMSECV, utiliza-se o ECVC (Erro de classificação de validação cruzada). Este parâmetro é mais robusto, pois leva em consideração apenas a classe na qual uma amostra foi classificada, e não seu valor predito.<sup>20,59</sup>

Como a base matemática é comum aos dois métodos, a resposta fornecida pelo dois também é a mesma. O modelo PLS-DA também fornece como resposta valores numéricos, que na maioria das vezes não são exatamente 0 ou 1. Para a classificação das amostras preditas é então estabelecido um limite de decisão (*threshold*). Este limite pode ser definido arbitrariamente pelo analista (0,5 por exemplo) ou estimado a partir da teoria bayesiana, que leva em consideração conhecimentos *a priori* sobre o conjunto de dados para estabelecer esse limite. Amostras com valores preditos abaixo do limite deverão ser consideradas como 0 e acima do limite como 1.<sup>20,59</sup>

## **CAPÍTULO 3**

### ***PS-MS APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO DE AÇÚCAR DE COCO COM AÇÚCAR MASCAVO***

#### ***3.1 Açúcar de Coco***

O açúcar de coco é produzido a partir da seiva retirada das inflorescências do coqueiro. As inflorescências (Figura 8A) são submetidas a um processo chamado de “*tapping*”, no qual elas são unidas e amarradas, formando um feixe. Em seguida, a ponta do feixe é cortada, fazendo com que a seiva seja liberada.

(Figura 8B). A seiva é então recolhida em recipientes plásticos (Figura 8C). Cada árvore pode gerar de 1 a 3 litros de seiva por dia.<sup>60</sup>



Figura 8 - Etapas do processo de fabricação do açúcar de coco. (Adaptado de 60)

Esta seiva é rica em água (83 - 87% m/m) e, para ser transformada em açúcar, é submetida à fervura por, aproximadamente, 3 horas. Durante este processo, grande quantidade de água é removida, o que reduz seu total para menos de 5% m/m.<sup>60</sup>

O açúcar de coco é formado por mais de 90% de carboidratos, sendo os 5% restantes divididos entre proteínas, gorduras, flavonoides, polifenóis e minerais. Dentre os minerais presentes no açúcar, pode-se destacar o potássio, que possui concentrações próximas a 1000 mg/kg, correspondendo a mais de 80% do total de minerais contidos no açúcar de coco. Também estão presentes o sódio (150 mg/kg), ferro (0,5 mg/kg), zinco (0,1 mg/kg) e cálcio (3,4 mg/kg). Se comparado a outros açúcares, o açúcar de coco possui 10 vezes mais ferro e zinco que o açúcar refinado.<sup>60,61</sup>

Embora possua nutrientes benéficos à saúde, o açúcar de coco tem ganhado destaque nos últimos anos devido, principalmente, ao seu índice glicêmico (IG). O IG é uma escala de classificação de alimentos baseada no aumento da glicose sanguínea causado por um alimento quando comparado a um aumento causado por uma solução de glicose. Quanto menor o IG de um alimento, menos açúcar o mesmo libera na corrente sanguínea. Valores abaixo de 55 indicam baixo IG, entre 56 e 75, médio IG e entre 75 e 100, alto IG. O

açúcar de coco apresenta um IG igual a 35, sendo classificado como alimento com baixo índice glicêmico.<sup>61</sup>

O baixo índice glicêmico do açúcar de coco está relacionado ao teor de fibras solúveis presentes no alimento e, especialmente, à inulina (um polissacarídeo da frutose com uma unidade de glicose terminal). As fibras solúveis retardam a absorção dos carboidratos e evitam a ocorrência de picos de glicose e, conseqüentemente, picos de insulina no sangue.<sup>62</sup>

### **3.2 Objetivos**

O objetivo do trabalho apresentado neste capítulo foi desenvolver e validar um método rápido e com mínimo processamento da amostra para detectar a adulteração de açúcar de coco por açúcar mascavo utilizando espectrometria de massas com ionização por *paper spray* e análise discriminante por mínimos quadrados parciais.

### **3.3 Parte Experimental**

#### **3.3.1 Amostras e Reagentes**

Sete amostras de açúcar de coco de diferentes marcas e uma amostra de açúcar mascavo foram adquiridas em supermercados da região metropolitana de Belo Horizonte.

Diluiu-se 0,10 g de cada amostra de açúcar em 10,0 mL de água deionizada, obtida em um sistema modelo *Millipak 40 Express* (*Mili-Q*, Corporação *Millipore*, *Bedford*, MA, EUA). Um mL de cada solução preparada foi transferido para um balão de 10,0 mL, que teve seu volume completado com metanol grau HPLC (*J.T. Baker Chemicals*, *Center Valley*, *Pennsylvania*, EUA). Em seguida, foram preparadas misturas de soluções de açúcar de coco

contendo alíquotas da solução de açúcar mascavo, simulando adulterações em uma faixa de 2 a 30%, com intervalos de 2% (15 pontos). Esse procedimento foi repetido para cada uma das 7 marcas de açúcar de coco totalizando 105 amostras adulteradas.

As amostras foram aplicadas em papel cromatográfico (1 CHR *Whatman*, *GE Healthcare*, *Little Chalfont*, *Buckinghamshire*, UK), cortados na forma de triângulos isósceles de 1,0 cm de altura e 0,5 cm de base.

### 3.3.2 Instrumentação

Os espectros de massas foram adquiridos em um equipamento modelo LCQ FLEET (*Thermo Fisher Scientific*, *San Jose*, Califórnia, EUA) com analisador de massas de baixa resolução do tipo *Ion Trap*. O software utilizado foi o *Xcalibur 2.1.0* (*Thermo Fisher Scientific*, *San Jose*, Califórnia, EUA).

A fonte de ionização *paper spray* foi construída no laboratório e consiste de um conector de cobre do tipo jacaré soldado a um fio de cobre e fixado a um suporte universal contendo uma plataforma móvel (nas direções x, y e z) que permite o alinhamento do papel na entrada do espectrômetro de massas. A Figura 9 ilustra os detalhes da fonte de ionização por *paper spray*.

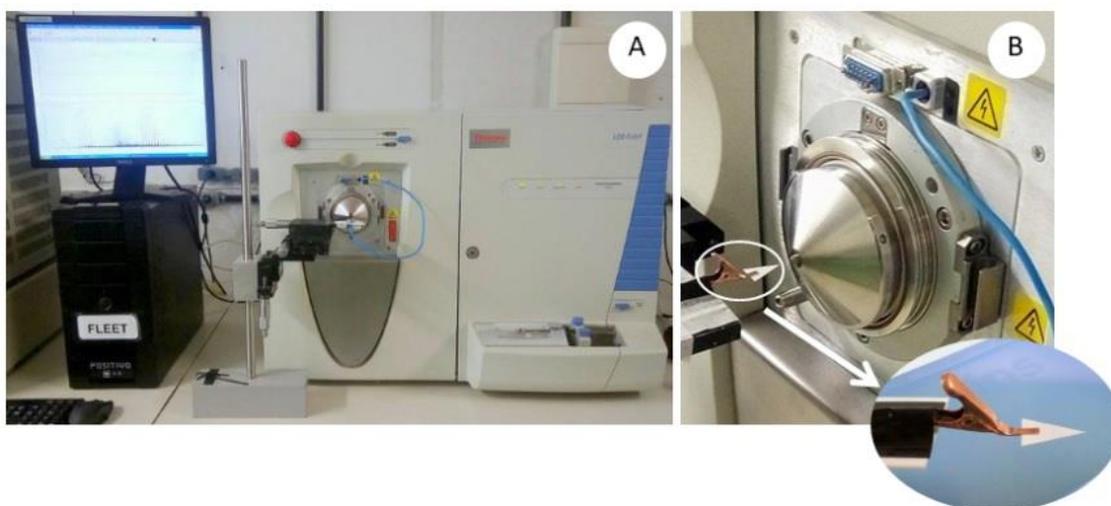


Figura 9 - A) Espectrômetro de massas modelo LCQ FLEET (Thermo Fisher) com analisador do tipo ion trap e fonte de ionização por paper spray.

B) Detalhes da fonte de ionização paper spray.

As condições experimentais para aquisição dos espectros foram definidas por meio da otimização de diversos parâmetros, tais como: dimensões do papel usado como substrato, composição do solvente, diluição da amostra, temperatura do capilar, faixa de massas ( $m/z$ ) analisada, posicionamento do papel em relação à entrada do espectrômetro, diferença de potencial aplicado e modo de aquisição dos espectros (positivo ou negativo). As condições otimizadas para a análise dos açúcares foram: potencial do *paper spray* de +5,0 kV (modo positivo) e -4,5 kV (modo negativo), potencial do capilar de 13 V, potencial das lentes de 85 V, temperatura do capilar de 275 °C, distância entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas de 0,5 cm, volume de amostra aplicado sobre o papel de 25,0  $\mu$ L e faixa de massas de 100-900  $m/z$ .

As 105 amostras de açúcar de coco adulteradas, as 21 amostras de açúcar de coco não adulteradas e 1 amostra de açúcar mascavo foram analisadas de modo aleatório e em triplicata.

### 3.3.3 Métodos Quimiométricos

A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) foi realizada utilizando o pacote estatístico PLS *ToolBox*, versão 6.3.1 (Manson, Washington, EUA), operando em ambiente *MatLab* versão 2009b (Natick, Massachusetts, EUA).

Para a construção do modelo PLS-DA, os espectros PS-MS foram arranjados em uma matriz 126 x 801, na qual as linhas representam cada amostra (105 adulteradas e 21 autênticas, totalizando 126 amostras) e as colunas representam a abundância relativa de cada razão  $m/z$  na faixa de 100 a 900. As amostras foram divididas entre conjunto de treinamento (84 amostras) e conjunto de teste (42 amostras), selecionadas de maneira igualmente espaçadas (uma a cada três amostras foi destinada ao conjunto de teste).

Para a construção do modelo, os dados foram centrados na média e a seleção do número de variáveis latentes se deu com base na avaliação do ECVC

(erro de classificação da validação cruzada), obtido por meio do método dos subconjuntos aleatórios. O desempenho do modelo gerado foi avaliado com base na sensibilidade (SEN), especificidade (ESP), confiabilidade (CONF) e *F-score*.

Para avaliação da precisão do modelo foram analisadas três amostras de concentrações de adulteração distintas em sextuplicata em três dias diferentes. O desempenho da validação foi avaliado com base na acordância (ACO) e concordância (CON).

### **3.4 Resultados e Discussão**

#### **3.4.1 PS-MS do Açúcar de Coco e do Açúcar Mascavo**

Após o ajuste das condições de ionização na fonte *paper spray*, foram obtidos os espectros PS-MS das amostras de açúcar de coco adulteradas, não adulteradas e do açúcar mascavo. A Figura 10 apresenta os espectros para uma amostra de açúcar de coco não adulterada (AC1), obtidos nos modos positivo e negativo.

Os sinais mais intensos obtidos no modo positivo (Figura 10A) indicam a formação de adutos de sódio, potássio, cálcio e magnésio de sacarose e demais oligossacarídeos presentes no açúcar de coco. O pico base,  $m/z$  365, e o íon  $m/z$  381 são descritos na literatura como sendo os adutos de sódio  $[M + Na]^+$  e de potássio  $[M + K]^+$  da sacarose (342 Da).<sup>63</sup>

Os sinais em  $m/z$  362 e  $m/z$  354 não foram descritos na literatura, mas sugerem a formação de adutos de duas moléculas de sacarose com cálcio  $[2M + Ca]^{2+}$  e magnésio  $[2M + Mg]^{2+}$ , respectivamente. Essa sugestão é fundamentada no teor desses minerais presentes no açúcar de coco.<sup>60,61</sup>

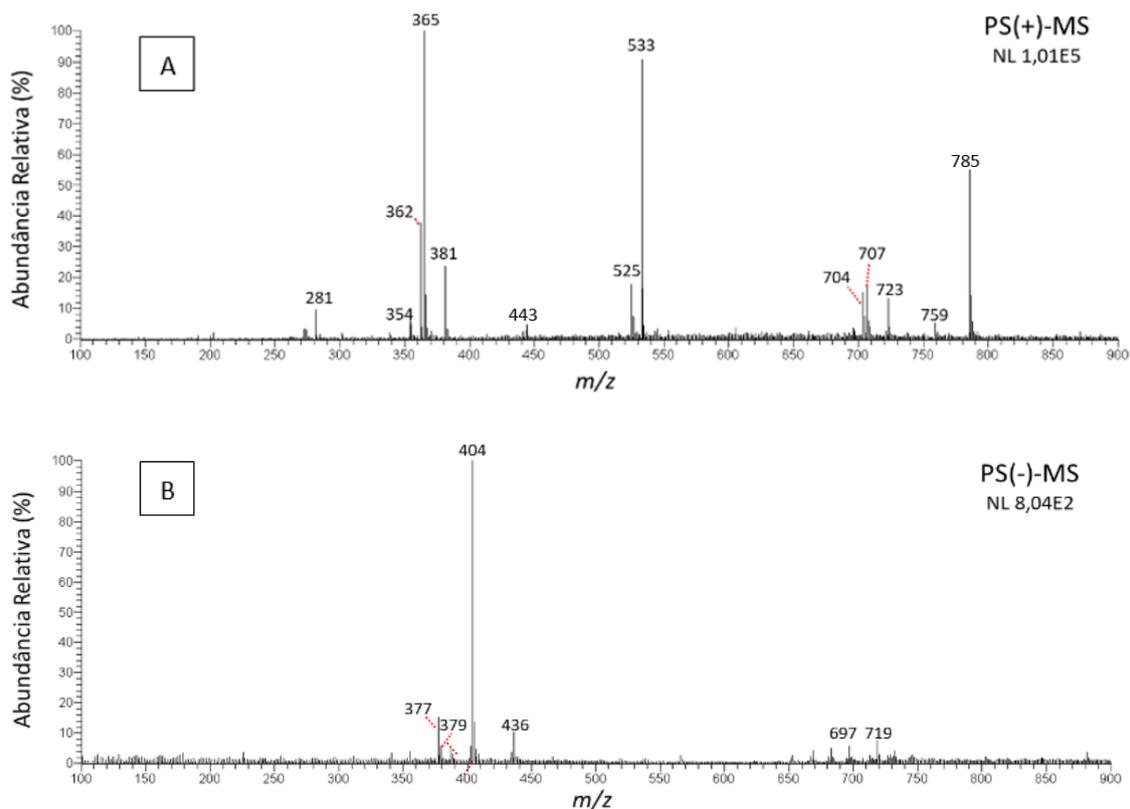


Figura 10 - Espectros de massas com ionização paper spray obtidos para o açúcar de coco AC1 nos modos positivo (A) e negativo (B).

O segundo sinal mais intenso do espectro PS(+)-MS,  $m/z$  533, sugere a formação de um aduto de cálcio com três moléculas de sacarose  $[3M + Ca]^{2+}$ . Outro sinal obtido nessa região do espectro indica a formação de um aduto de magnésio  $[3M + Mg]^{2+}$  ( $m/z$  525) também com três moléculas de sacarose.

Na faixa de  $m/z$  700-750 foram observados sinais que sugerem a formação de um aduto de cálcio  $[4M + Ca]^{2+}$  ( $m/z$  704) com quatro moléculas de sacarose, e de um aduto de sódio  $[2M + Na]^+$  ( $m/z$  707) formado com duas moléculas de sacarose.

O íon observado em  $m/z$  785 sugere a formação de um aduto de cálcio coordenado com uma molécula de um trissacarídeo (T; 504 Da) e três moléculas de sacarose (M; 342 Da), resultando no aduto  $[4M + T + Ca]^{2+}$   $\{[(3 \times 342) + 504 + 40] / 2 = 785 \text{ Da}\}$ . O trissacarídeo mencionado pertence a uma classe de polímeros da frutose chamados de frutooligossacarídeo (FOS), e a sua formação se dá pela adição de uma unidade de frutose (frutosil) à sacarose por meio de

uma ligação glicosídica, com a perda de uma molécula de água [(342 + 180) - 18 = 504 Da].

Os frutooligossacarídeos (FOS) estão presentes em uma grande variedade de plantas (mais de 30 mil), e além dos produtos derivados do coco, também podem ser encontrados em alcachofras, aspargos, beterraba, chicória, banana, alho, cebola, trigo, tomate, mel, açúcar mascavo e em tubérculos como a batata yacon. Uma das formas de produção dos FOS é a hidrólise enzimática da inulina (fibra relacionada ao baixo índice glicêmico do açúcar de coco), processo que ocorre com grande frequência na natureza.<sup>62</sup>

Devido às suas características funcionais, os frutooligossacarídeos têm impactado a indústria do açúcar, sendo também chamados de açúcares não convencionais. Esses açúcares auxiliam na manutenção da chamada “flora amigável” do trato intestinal e são conhecidos como prebióticos, uma vez que eles estabilizam e aumentam a proliferação das bactérias benéficas, como por exemplo, os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterias*, no trato gastrointestinal do hospedeiro. O consumo dos FOS, na dieta ou por meio de suplementação, intensifica a viabilidade e adesão dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal, provocando uma mudança na composição de sua microbiota e, ao mesmo tempo, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas.<sup>62</sup>

O frutooligossacarídeo presente no aduto de cálcio sugerido, referente ao sinal detectado em *m/z* 785, possui grau de polimerização 1, ou seja, uma unidade monomérica (frutosil) foi adicionada à sacarose. Esse trissacarídeo é denominado kestose (Figura 11).<sup>64</sup>

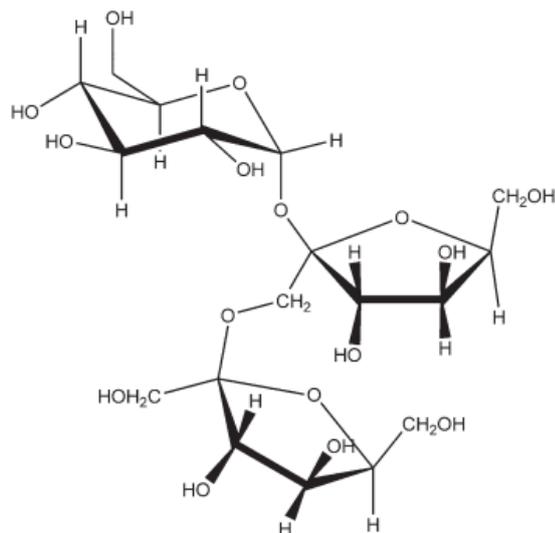


Figura 11 - Fórmula estrutural do fructooligossacarídeo Kestose.  
(Adaptado de 64)

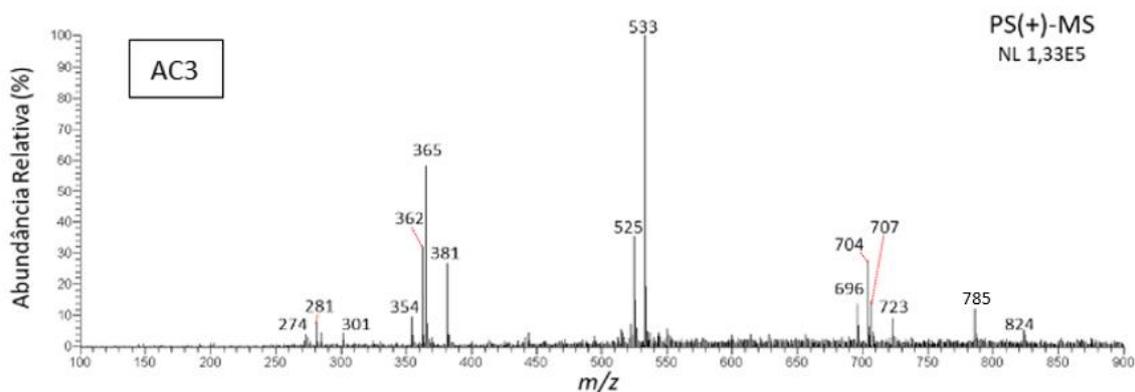
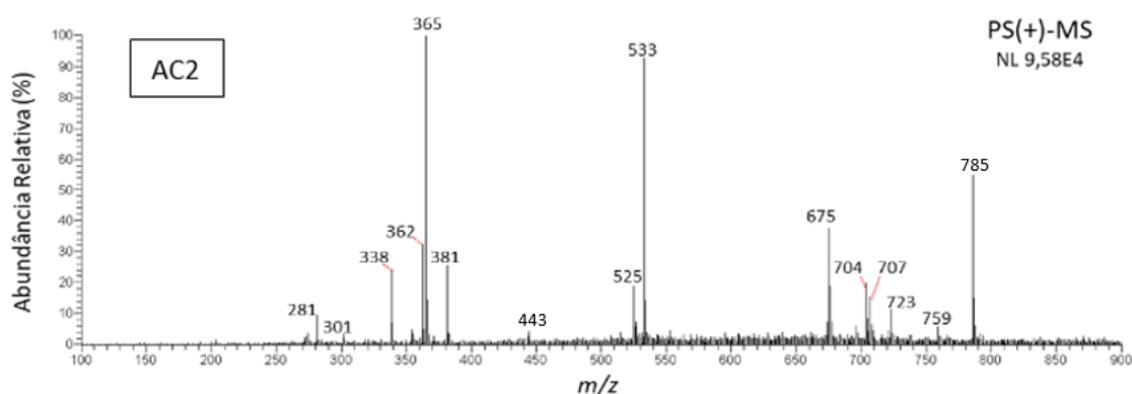
O íon de razão  $m/z$  443, assim como o de  $m/z$  785, sugere a formação de um aduto de cálcio coordenado com uma molécula do FOS kestose com, nesse caso, uma molécula de sacarose  $[M + \text{kestose} + \text{Ca}]^{2+}$   $\{(342 + 504 + 40) / 2 = 443 \text{ Da}\}$ .

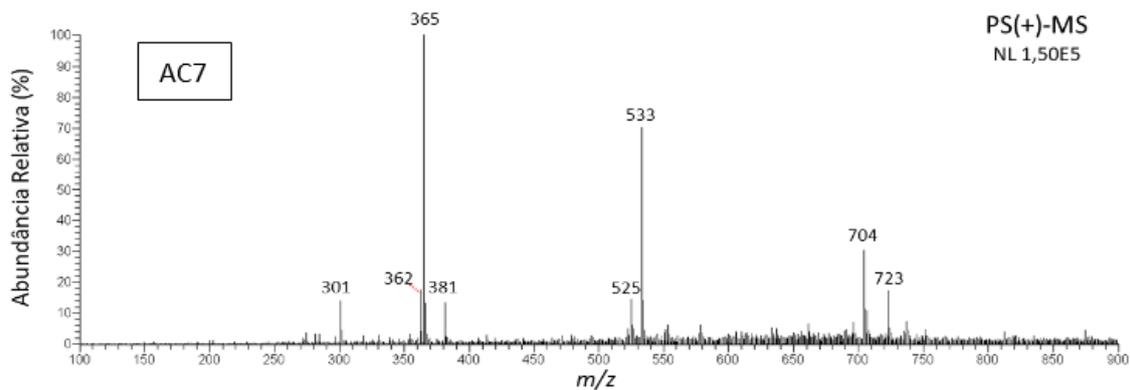
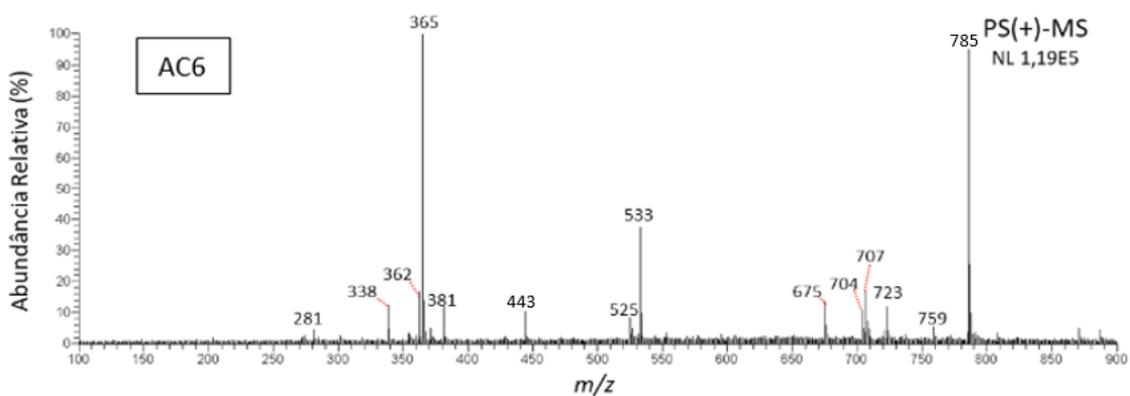
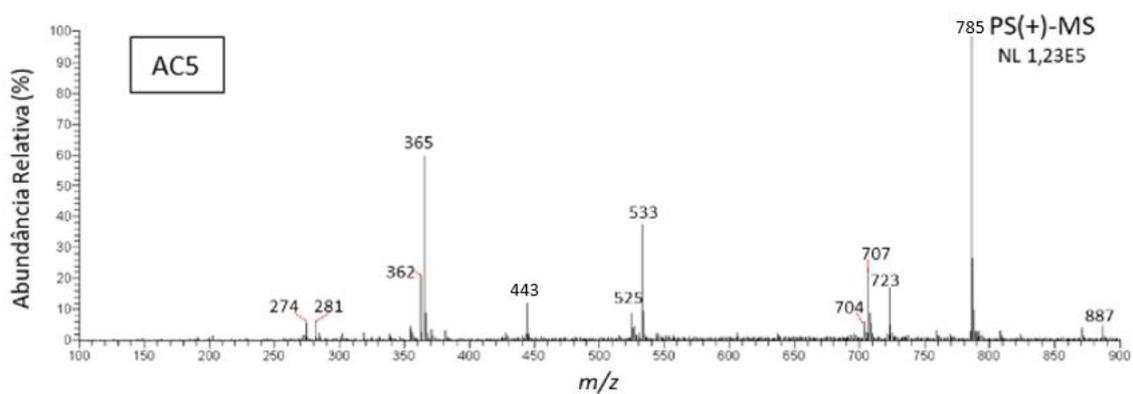
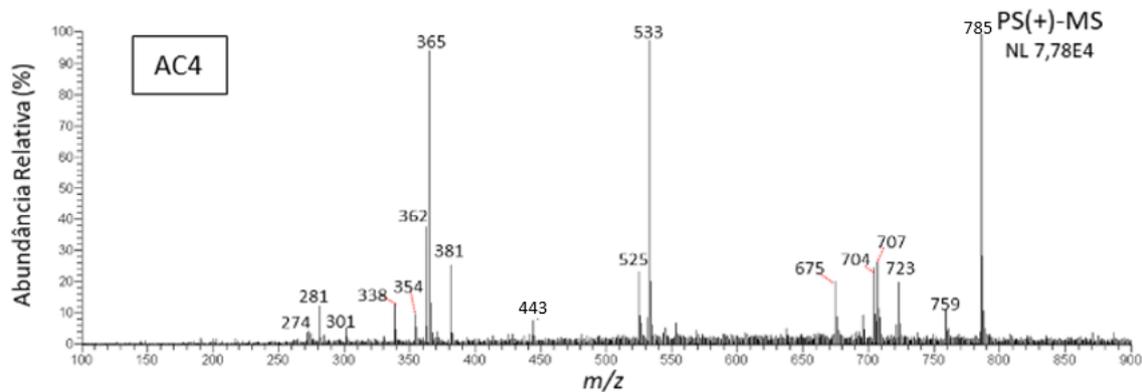
Outros sinais de menor intensidade relativa foram identificados no espectro PS(+)-MS do açúcar de coco AC1 como, por exemplo, o íon de razão  $m/z$  723, que sugere a formação de um aduto de potássio com duas moléculas de sacarose  $[2M + \text{K}]^+$ .<sup>63</sup>

No espectro PS-MS do açúcar de coco gerado em modo negativo (Figura 10B) foram observados três sinais de maior intensidade. O íon  $m/z$  377 é descrito na literatura como sendo o aduto de cloro da sacarose  $[M + \text{Cl}]^-$ .<sup>65</sup> A formação do aduto [cloro + sacarose] pode ser confirmada através da presença do íon  $m/z$  379 e da proporção 3:1 existente entre as intensidades relativas dos íons  $m/z$  377 e 379. Essa proporção é bem definida e está relacionada à abundância isotópica entre os átomos de cloro ( $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$ ) existentes na natureza. O pico base do espectro PS(-)-MS,  $m/z$  404, sugere a formação de um aduto de sacarose com o ânion nitrato  $[M + \text{NO}_3]^-$ .<sup>65</sup>

Comparando os espectros gerados nos modos positivo e negativo, foi observado que no modo positivo foram obtidos espectros mais informativos (maior quantidade de sinais), mais reproduzíveis e com maior relação sinal/ruído, estimada pelo valor de NL (*normalized intensity level*), um parâmetro instrumental que indica essa relação. Quanto maior este parâmetro, maior é a relação sinal/ruído. Os espectros no modo positivo apresentaram valores de NL aproximadamente  $10^3$  vezes maiores que os espectros do modo negativo. Além disso, os ionogramas gerados em modo positivo apresentaram maior estabilidade, com abundância relativa em torno de 80%, atribuindo maior confiabilidade aos dados gerados. Os ionogramas dos modos positivo e negativo dos espectros da Figura 10 são mostrados no Anexo II. Pelos motivos descritos, o método de identificação de açúcar de coco adulterado com açúcar mascavo foi desenvolvido apenas com os espectros gerados em modo positivo.

A Figura 12 mostra os espectros PS(+)-MS das demais marcas de açúcar de coco e do açúcar mascavo.





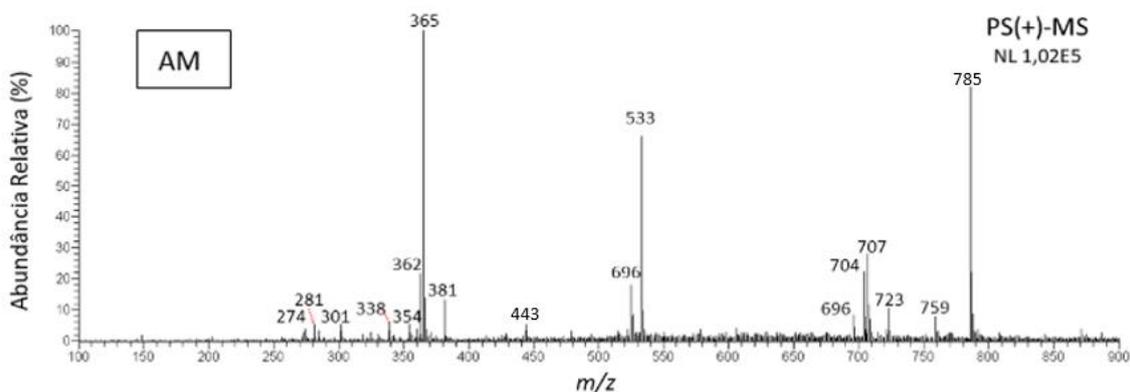


Figura 12 - Espectros obtidos por PS(+)-MS para as amostras de açúcar de coco não adulteradas AC2, AC3, AC4, AC5, AC6 e AC7 e para a amostra de açúcar mascavo AM.

Como é possível observar na Figura 12, existe uma semelhança entre os espectros PS(+)-MS dos açúcares de coco e do açúcar mascavo. Em todos os espectros foram observados sinais dos adutos de sacarose com sódio ( $m/z$  365), potássio ( $m/z$  381) e cálcio ( $m/z$  533 e 704), com algumas variações nos valores das abundâncias relativas. Já o sinal correspondente ao aduto de cálcio ( $m/z$  785) com quatro moléculas de sacarose e uma de kestose foi observado em todos os espectros, exceto no espectro da amostra de açúcar de coco AC7, e apresentou uma grande variação nos valores de abundância relativa, sendo o pico base em alguns espectros (AC4 e AC5), e no espectro da amostra AC3, um sinal com intensidade inferior à 20%.

Nos espectros PS(+)-MS de alguns açúcares, além dos íons citados, também foram observados outros sinais de menor intensidade, como o íon de razão  $m/z$  696, presente nos espectros correspondentes às amostras AC3 e AM. Esse sinal sugere a formação de um aduto de magnésio com quatro moléculas de sacarose  $[4M + Mg]^{2+}$ .

A Tabela 3, apresenta de forma resumida os principais adutos de sacarose (M), em ordem crescente de  $m/z$ , detectados nos espectros PS-MS do açúcar de coco, nos modos positivo e negativo. Alguns adutos, como os de sódio e potássio, estão descritos na literatura e os demais foram propostos com base nos valores de massa nominal das moléculas e dos íons presentes no açúcar. É importante destacar que não é possível fazer uma atribuição inequívoca dos sinais obtidos com a técnica utilizada e com um analisador de massas de baixa

resolução, uma vez que os oligossacarídeos são constituídos por monossacarídeos (hexoses ou pentoses) com a mesma massa molecular, e que a combinação entre eles pode resultar em diversos isômeros de massa. No entanto, a não-atribuição exata dos sinais detectados, não inviabiliza (e nem prejudica) a aplicação da técnica para o fim proposto.

Tabela 3 - Adutos observados nos espectros PS-MS das amostras de açúcar de coco e mascavo, nos modos positivo e negativo.

	<i>m/z</i>	Aduto
PS(+)-MS	354	$[2M + Mg]^{2+}$
	362	$[2M + Ca]^{2+}$
	365	$[M + Na]^+$
	381	$[M + K]^+$
	443	$[M + \text{kestose} + Ca]^{2+}$
	525	$[3M + Mg]^{2+}$
	533	$[3M + Ca]^{2+}$
	696	$[4M + Mg]^{2+}$
	704	$[4M + Ca]^{2+}$
	707	$[2M + Na]^+$
	723	$[2M + K]^+$
	785	$[3M + \text{kestose} + Ca]^{2+}$
PS(-)-MS	377	$[M + {}^{35}\text{Cl}]^-$
	379	$[M + {}^{37}\text{Cl}]^-$
	404	$[M + \text{NO}_3]$

Em alguns espectros foram observados os íons *m/z* 338 e 675, que também estavam presentes no branco da análise (Anexo II). O íon *m/z* 338 indica a presença de erucamida  $[M + H]^+$  e o íon *m/z* 675 corresponde ao seu dímero  $[2M + H]^+$ .<sup>66-68</sup> A erucamida é um aditivo comumente usado na indústria de polímeros e atua como agente deslizando, diminuindo o coeficiente de atrito entre duas camadas adjacentes de um material, tais como as superfícies de um filme plástico utilizado em máquinas de empacotamento automático. Além disso, a

erucamida também é usada como aditivo na fabricação de papéis, cosméticos e em indústrias têxteis. A detecção dos sinais  $m/z$  338 e 675 no branco da análise sugere que o aditivo erucamida tenha sido aplicado como revestimento do papel utilizado para a aquisição dos espectros PS-MS.

Em quase todos os espectros foi observado um sinal em  $m/z$  301 e, em alguns deles, um sinal de razão  $m/z$  279. Esses sinais correspondem, respectivamente, à molécula sodiada  $[M + Na]^+$  e protonada  $[M + H]^+$  do plastificante dibutil-ftalato (DBP), que é um contaminante frequentemente observado em análises por espectrometria de massas no modo positivo.<sup>69</sup>

A Figura 13 mostra os espectros PS(+)-MS de duas amostras de açúcar de coco adulteradas, uma com 2% e outra com 30% de açúcar mascavo. Analisando a figura, não é possível identificar visualmente, diferenças entre os espectros do açúcar de coco menos adulterado com o do açúcar mais adulterado, o que justifica a aplicação de técnicas estatísticas multivariadas para diferenciar as amostras de AC puras das amostras adulteradas com AM.

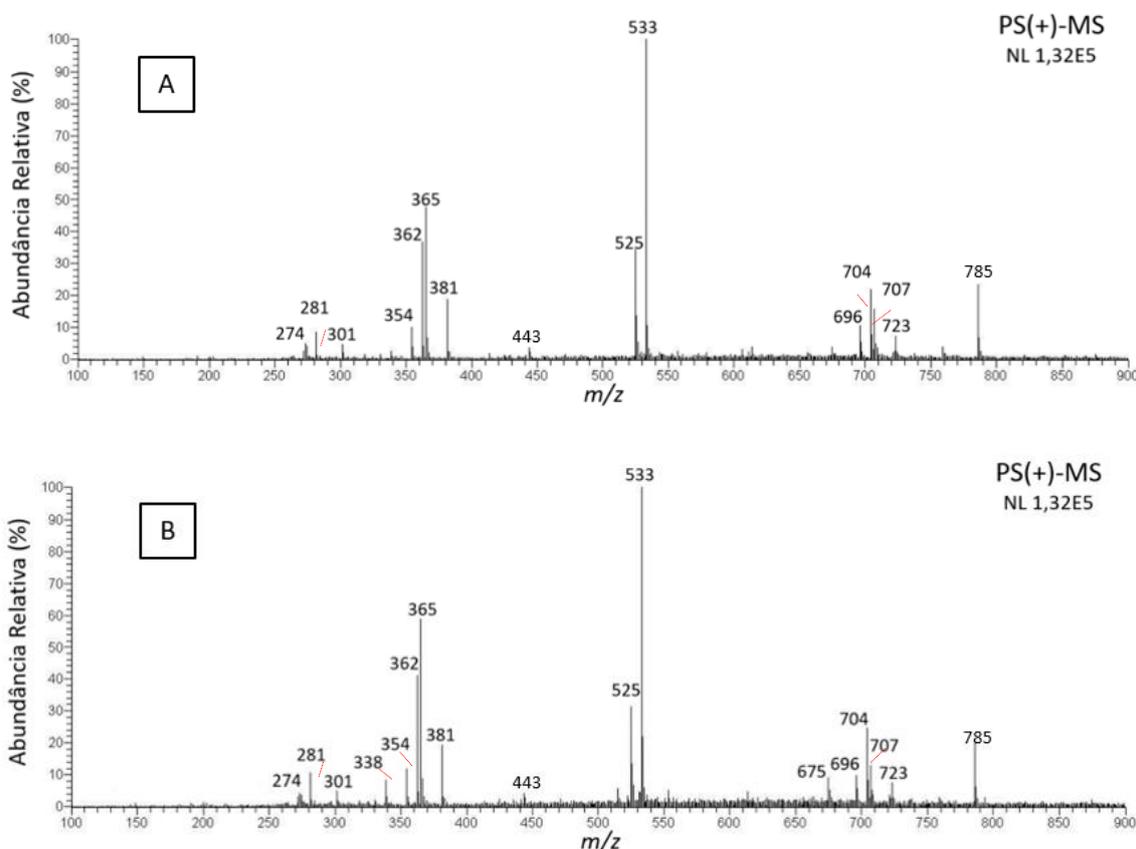


Figura 13 - Espectros de massas PS(+)-MS de uma amostra de açúcar de coco adulterada com 1% (A) e 30% (B) de açúcar mascavo.

### 3.4.2 Construção de um modelo qualitativo utilizando Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

A Figura 14 mostra os valores preditos para cada amostra no modelo PLS-DA gerado. As amostras adulteradas estão representadas por triângulos e as autênticas por quadrados, sendo que os itens cheios correspondem às amostras do conjunto de treinamento e os vazios ao conjunto de teste. Com base no ECVC, foram selecionadas 5 VLs, explicando 73,2% da variância em **X** e 71,9% da variância em **Y**. As amostras foram classificadas em adulteradas ou não adulteradas considerando o *threshold* igual a 0,535.

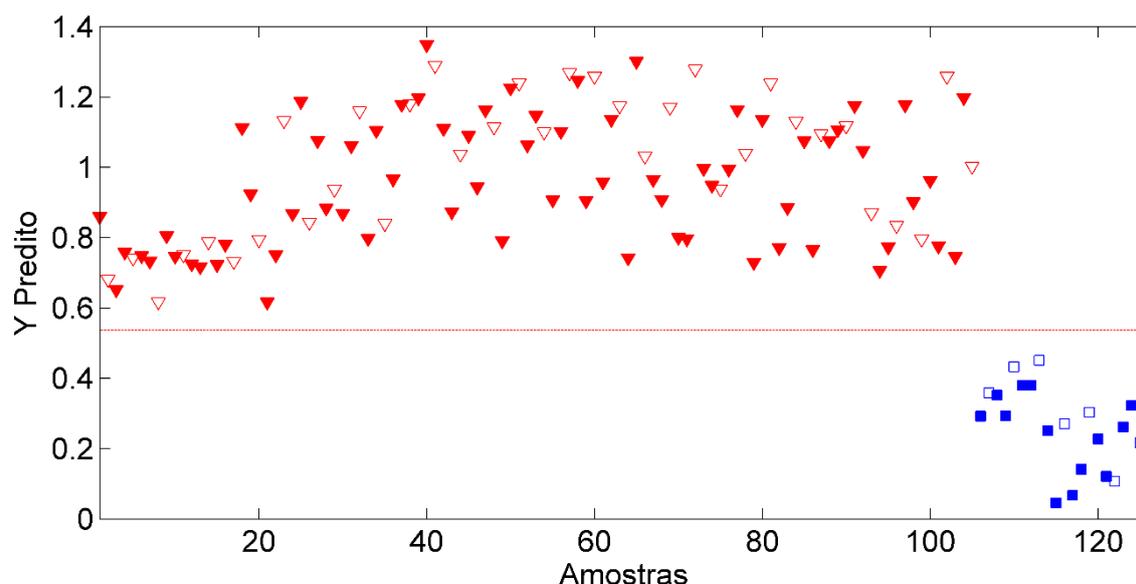


Figura 14 - Valores previstos pelo modelo PLS-DA. [amostras adulteradas treinamento (▼) e teste (▽) e amostras autênticas treinamento (■) e teste (□)]

Analisando a Figura 14, conclui-se que não houve nenhum erro de classificação para nenhuma das classes. A partir da avaliação dos *VIP scores*, (Figura 15) é possível definir quais os íons contribuíram com maior intensidade para a separação entre as amostras adulteradas e não adulteradas. Os sinais que apresentaram maiores *VIP scores* foram relativos aos íons de razão *m/z* 704

e 533, que correspondem aos adutos de cálcio com duas e três moléculas de sacarose, respectivamente, o que sugere que a diferença entre o teor de cálcio dos açúcares foi o fator que mais contribuiu para a separação. De acordo com a literatura, a concentração de cálcio no açúcar de coco é de, aproximadamente, 3,5 mg / 100 g,<sup>61</sup> enquanto no açúcar mascavo é de 83 mg / 100 g.<sup>70</sup> Esse fato indica que a adulteração do açúcar de coco, feita pelo acréscimo do açúcar mascavo, aumenta o teor de cálcio nas amostras adulteradas.

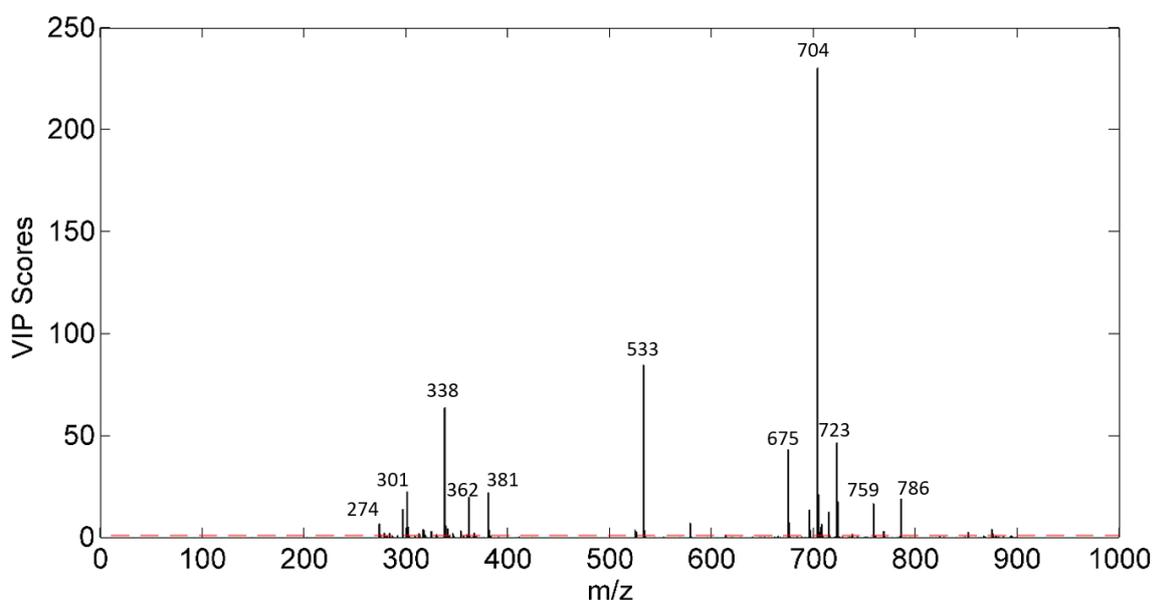


Figura 15 - VIP scores do modelo PLS-DA.

Outro íon importante na separação das classes foi o de razão  $m/z$  723, que corresponde ao aduto de potássio com duas moléculas de sacarose. De maneira semelhante ao que foi discutido para os adutos de cálcio, a diferença na concentração de potássio entre os açúcares mascavo e de coco também foi um fator importante na distinção entre amostras puras e adulteradas. Nesse caso, o açúcar de coco (1000 mg / 100 g) possui um teor de potássio muito maior do que o açúcar mascavo (133 mg / 100 g).<sup>61,70</sup> Ao observar o vetor de regressão gerado pelo modelo (Figura 16), nota-se que os valores correspondentes aos íons  $m/z$  533 e 704 são negativos, enquanto o valor correspondente ao íon  $m/z$  723 é positivo, o que reforça a ideia de que a diferença do perfil mineral das

amostras (Ca e K) foi o fator que mais contribuiu na separação entre as amostras adulteradas e autênticas.

A identificação de variações no perfil mineral de amostras através da técnica PS-MS já foi descrita na literatura. Pereira *et al* (2017) construíram um modelo capaz de diferenciar amostras de cerveja do tipo *American Standard Lager* brasileiras de acordo com a sua faixa de preço.<sup>50</sup> Segundo os autores, os fatores mais relevantes na diferenciação dessas amostras foram adutos de sódio e de potássio, o que reflete diferenças no perfil mineral dessas amostras.

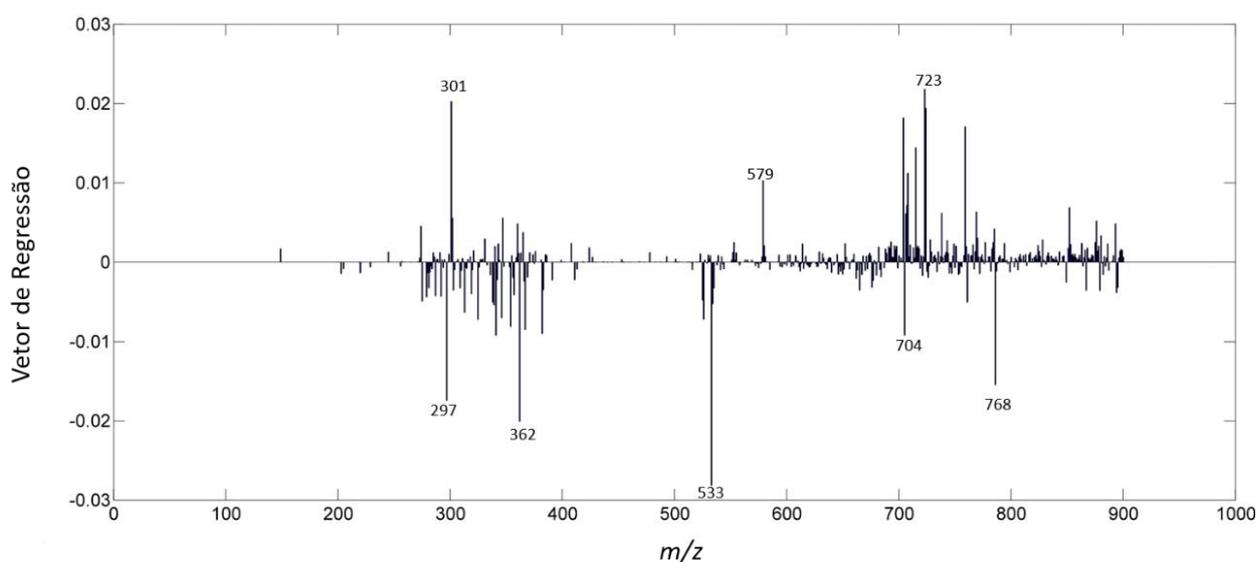


Figura 16 - Vetor de regressão do modelo PLS-DA.

As figuras de mérito que avaliam o desempenho do modelo com relação à veracidade (SEN, ESP, CONF e *F-score*) e precisão do modelo em nível de repetibilidade (ACO) e em nível de precisão intermediária (CON) estão apresentadas na Tabela 4. Como não houve nenhuma amostra classificada de forma incorreta no conjunto de treinamento e nem no conjunto teste, os parâmetros de veracidade do modelo foram todos iguais a 1. A ACO foi avaliada analisando-se 3 pontos em condições de repetibilidade (mesmo dia e mesmo analista, cada ponto em sextuplicata) e a CON foi avaliada em condições de precisão intermediária (mesmo analista, três dias diferentes, cada ponto em sextuplicata).

De acordo com a diretiva 657/2002 da União Europeia,<sup>71</sup> um método que será utilizado como triagem para a detecção de não conformidade em alimentos deve preconizar a minimização de erros falsos negativos (classificar uma amostra adulterada como não adulterada). Um resultado falso positivo é menos preocupante, pois as amostras classificadas dessa maneira devem ser confirmadas posteriormente por métodos de referência. A diretiva ainda estabelece que um método de triagem adequado deve apresentar sensibilidade acima de 0,950. Tanto para o conjunto de treinamento quanto para o teste, os valores encontrados foram de 1,000, o que habilita este modelo a ser utilizado como um método de triagem.

Tabela 4 - Figuras de mérito calculadas para o modelo PLS-DA

<b>Figura de Mérito Estimada</b>	<b>Treinamento</b>	<b>Teste</b>
SEN	1,000	1,000
ESP	1,000	1,000
CONF	1,000	1,000
F-Score	1,000	1,000
ACO <sub>m</sub>		100%
CON		96,5%

Para a avaliação da ACO, todas as amostras foram corretamente classificadas como adulteradas nos três pontos estudados, o que fornece uma acordância média (ACO<sub>m</sub>) de 100%. Já para a CON, uma das replicatas analisadas apresentou um resultado falso negativo, com isso, a CON calculada para o modelo foi de 96,5%.

### **3.5 Conclusões Parciais**

Um método inédito para a identificação de adulteração de açúcar de coco utilizando açúcar mascavo foi desenvolvido e validado. Esse método mostrou-se capaz de detectar adições de até 2% m/m do adulterante através da aplicação da espectrometria de massas com ionização por *paper spray*, com o auxílio do método de análise discriminante por mínimos quadrados parciais. O método proposto é rápido (em média um minuto para a análise em triplicata de uma amostra), não demanda pré-tratamento complexo da amostra e consome uma quantidade mínima de amostra e solvente.

O modelo foi validado através da avaliação de algumas figuras de mérito que atestam seu desempenho satisfatório, confirmando que esse método está apto a ser utilizado no controle de qualidade do açúcar de coco.

# **CAPÍTULO 4**

## **PS-MS APLICADA À QUANTIFICAÇÃO DA GORDURA VEGETAL HIDROGENADA ADICIONADA AO ÓLEO DE COCO EXTRA VIRGEM**

### **4.1 Óleo de Coco Extra Virgem (VCO)**

Nos últimos anos, o consumo mundial de óleo de coco aumentou significativamente em virtude de uma intensa divulgação feita pela mídia sobre as suas propriedades terapêuticas e, principalmente, sobre o seu potencial efeito emagrecedor. Ele é considerado, por alguns especialistas da área de saúde, o “óleo mais saudável do mundo”, e dentre os benefícios relacionados ao uso do VCO descritos na literatura, estão a aceleração do metabolismo, melhora da digestão e fortalecimento do sistema imunológico. Suas propriedades estão associadas ao seu perfil lipídico, rico em ácidos graxos de cadeia média, que favorecem um bom funcionamento do sistema cardiovascular, além de serem fonte de calorias e vitaminas lipossolúveis. Como mostrado na Figura 17, o ácido graxo majoritário na composição do óleo de coco é o ácido láurico (C12:0), que corresponde a aproximadamente 50% do total de ácidos graxos.<sup>72-74</sup>

O óleo de coco é produzido a partir da polpa de cocos frescos e maduros (até 12 meses após a polinização), através de processos mecânicos ou naturais, com ou sem a aplicação de calor. O óleo de coco não necessita de nenhum processo de refino, branqueamento, desodorização ou outro tratamento químico, podendo o mesmo ser consumido no seu estado bruto. O óleo de coco virgem é incolor, livre de sedimentos e possui um aroma natural de coco fresco.<sup>75</sup>

Esse grande destaque na mídia, seguido pela acentuada procura pelo produto, refletiu no aumento da demanda de produção e conseqüentemente na elevação do preço do óleo de coco. Atualmente, a República das Filipinas é o maior país produtor de óleo de coco do mundo, com uma produção aproximada de 1480 milhões de toneladas, o que representa mais de 40% de toda a produção mundial. Outros países asiáticos também figuram como os maiores produtores, como a Indonésia e a Índia, com 29% e 13% de toda a produção mundial. Fora da Ásia, podemos destacar o México, que responde por 4% de toda a produção mundial, e a Costa do Marfim, que responde por 0,5%.

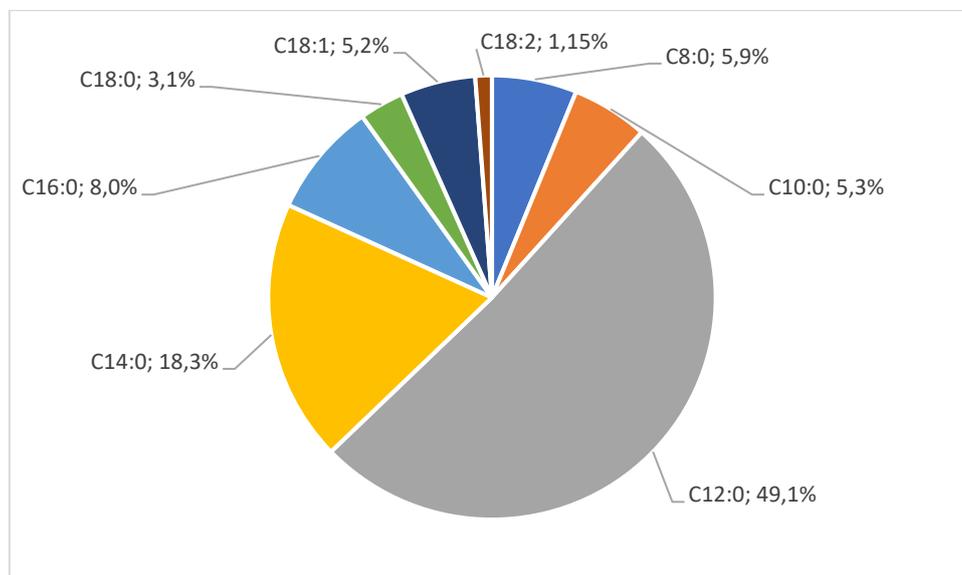


Figura 17 - Composição em ácidos graxos do óleo de coco extra virgem.

## 4.2 Objetivos

O objetivo do trabalho apresentado neste capítulo foi desenvolver e validar um método rápido e com mínimo processamento da amostra para quantificar a adição de gordura vegetal hidrogenada em óleo de coco extra virgem utilizando espectrometria de massas com ionização por *paper spray* e regressão por mínimos quadrados parciais.

### **4.3 Parte Experimental**

#### **4.3.1 Amostras e Reagentes**

As amostras de óleo de coco extra virgem e de gordura vegetal hidrogenada foram adquiridas em supermercados da região metropolitana de Belo Horizonte.

Diluiu-se 0,1 g de óleo de coco extra virgem em 10,0 mL de Hexano (*Labsynth*, SP, Brasil). Um mL da solução preparada foi transferido para um balão de 100,0 mL que teve seu volume completado com Metanol grau HPLC (*J.T. Baker Chemicals, Center Valley, Pennsylvania, EUA*). O mesmo procedimento foi usado no preparo da solução de gordura vegetal hidrogenada. Em seguida, foram preparadas soluções de óleo de coco contendo alíquotas da solução de Gordura Vegetal Hidrogenada (GVH), simulando adulterações em uma faixa de 0,3 a 21%, com intervalos de 0,3%, totalizando 70 amostras adulteradas.

As amostras foram aplicadas em papel cromatográfico 1 CHR (*Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK*), cortados na forma de triângulos isósceles de 1,0 cm de altura e 0,5 cm de base.

#### **4.3.2 Instrumentação**

Para aquisição dos espectros PS-MS do óleo de coco e da GVH foram utilizados os mesmos equipamentos e fonte de ionização *paper spray* descritos na secção 3.2.2.

As condições experimentais para a análise do óleo de coco foram otimizadas de modo semelhante ao da análise dos açúcares e os seguintes parâmetros foram estabelecidos: potencial do *paper spray* de 5,0 kV, potencial do capilar de 24V, potencial das lentes de 65V, temperatura do capilar de 275°C,

distância entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas de 0,5 cm, volume de amostra aplicado sobre o papel de 25,0 µL e faixa de massas de 300-1800 *m/z*.

As 70 amostras de óleo de coco adulteradas, 1 amostra de óleo de coco não adulterada e 1 amostra de GVH foram analisadas em sequência aleatória e em triplicata.

### **4.3.3 Métodos Quimiométricos**

Os equipamentos e *softwares* utilizados para o desenvolvimento do método descrito nesta aplicação foram os mesmos descritos na seção 3.2.3.

Para o desenvolvimento do modelo PLS as 70 amostras foram separadas entre conjunto de calibração e conjunto de validação, através da seleção de amostras igualmente espaçadas (1 a cada 3 amostras). 46 amostras foram destinadas para o conjunto de calibração e as 24 amostras restantes foram utilizadas no conjunto de validação. Antes da construção do modelo PLS, os espectros de massa foram normalizados pelo valor máximo do vetor e centralizados na média. A normalização foi utilizada para que o espectro fosse corrigido em função do pico base. O número de VLS do modelo foi definido com base na validação cruzada por subconjuntos aleatórios (6 divisões e 6 iterações).

Para se estimar o desempenho do modelo, sua linearidade foi avaliada de acordo com métodos descritos na literatura, através da avaliação da normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos da regressão, utilizando os testes de Ryan-Joiner (RJ), Brown-Forsythe (BF) e Durbin-Watson (DW), respectivamente.<sup>77</sup>

## **4.4 Resultados e Discussão**

### **4.4.1 PS-MS das Amostras de Óleo de Coco Extra Virgem e GVH**

Após o ajuste das condições de ionização da fonte *paper spray*, foram

adquiridos os espectros PS-MS para as amostras de óleo de coco puras, adulteradas e para a amostra de GVH. Por terem apresentado espectros mais reprodutíveis, a aquisição dos espectros aplicados à quantificação da GVH adicionada ao VCO foi feita no modo positivo.

A Figura 18 mostra os espectros PS(+)-MS para uma amostra de óleo de coco não adulterada (A) e uma amostra do adulterante GVH (B).

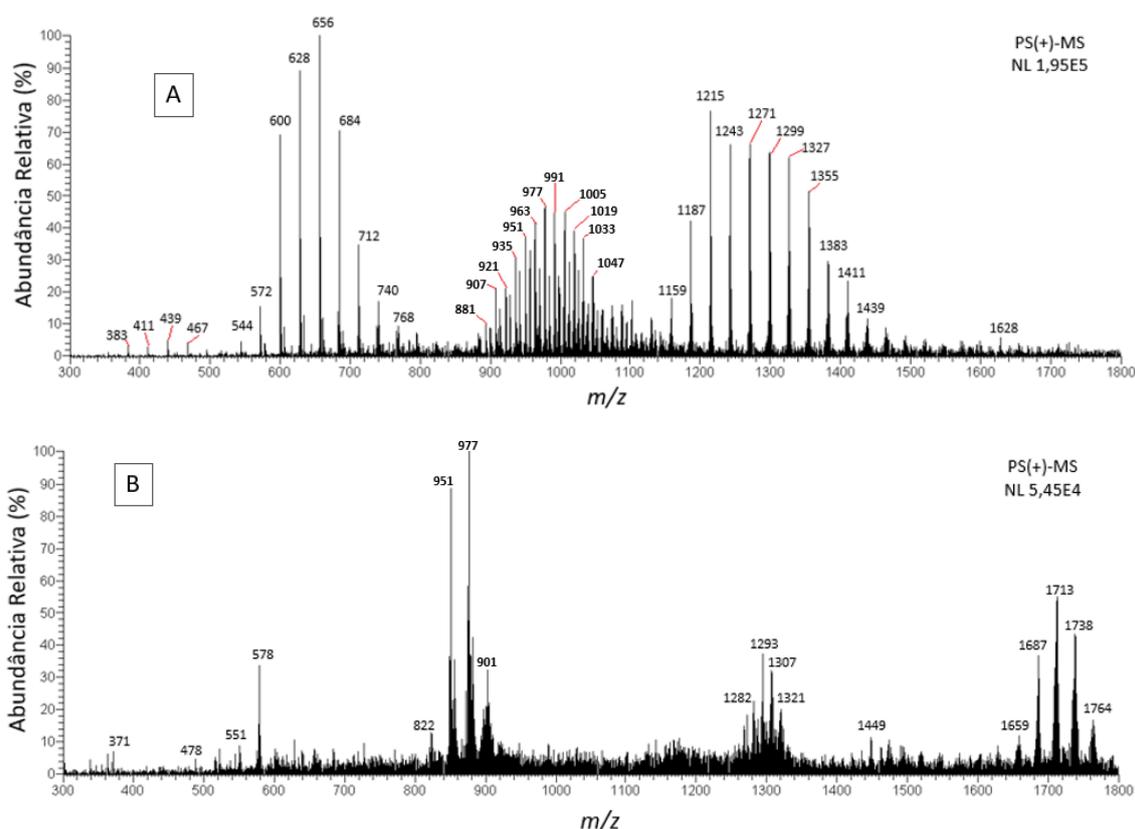


Figura 18 - Espectros PS(+)-MS obtidos para uma amostra de VCO não adulterada (A) e para uma amostra de GVH (B).

O espectro PS-MS obtido para a amostra de óleo de coco autêntica (Figura 18 A) apresentou um perfil característico de diacilgliceróis (DAGs) e triacilgliceróis (TAGs) presentes nos óleos vegetais. Os sinais de maior razão  $m/z$  detectados, observados na faixa de  $m/z$  1150 - 1450, sugerem a presença de TAGs formados por ácidos graxos saturados de cadeia média. Nessa faixa, os sinais apresentaram uma diferença de 28 Da, que corresponde a um grupo  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  pertencente à cadeia carbônica de um dos ácidos graxos ligados ao

glicerol.

O sinal de  $m/z$  1299 indica a formação de um aduto de sódio coordenado com duas moléculas de um TAG formado por ácidos graxos saturados que, somados, possuem 36 átomos de carbono (C 36:0). Como descrito na literatura, cerca de 50% do VCO é composto por ácido láurico, C12:0 (La).<sup>74</sup> Sendo assim, é provável que o sinal observado em  $m/z$  1299 seja referente ao aduto  $[2M + Na]^+$  do TAG formado por três moléculas do ácido, TAG LaLaLa. Não é possível, entretanto, afirmar que esta atribuição está correta, uma vez que os TAGs podem ser formados por diversos ácidos graxos, com inúmeras combinações entre eles, podendo gerar isômeros de mesma razão massa/carga.

Os sinais observados à esquerda e à direita do íon de razão  $m/z$  1299 apresentam uma diferença de 28 Da em relação ao sinal adjacente. Essa diferença é devida ao grupo  $CH_2-CH_2$ , pertencente à cadeia carbônica dos ácidos graxos que formam o TAG.

A Figura 19 mostra, de forma ampliada, a faixa entre  $m/z$  900 - 1100 do espectro PS-MS da amostra de óleo de coco não adulterado. Nessa faixa foram observados quatro séries de sinais, separados por 28 Da.

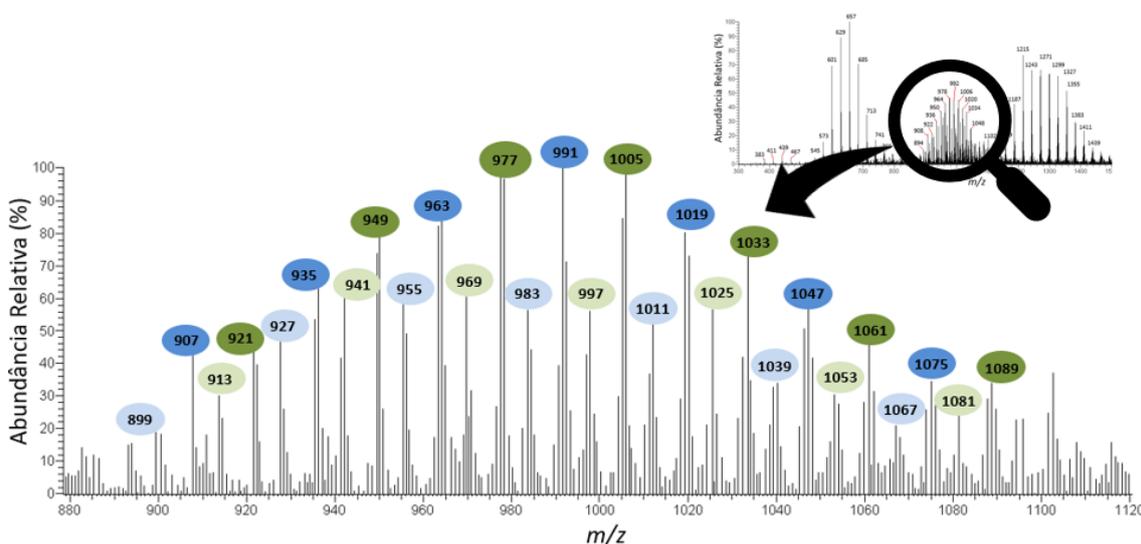


Figura 19 - Faixa ampliada do espectro PS-MS do VCO não adulterado.

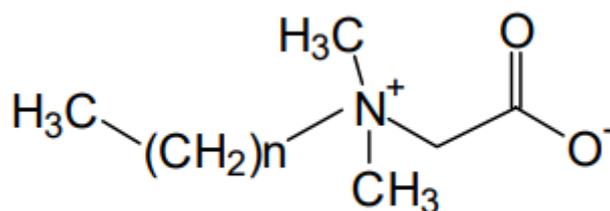
O íon de razão  $m/z$  935 sugere a formação de um aduto de sódio,  $[2M + Na]^+$ , coordenado com dois dialcíl-gliceróis C24:0, formados por duas moléculas de ácido láurico, DAG LaLa.

A região do espectro que apresentou os sinais mais intensos,  $m/z$  550 - 850, sugere a presença de compostos descritos na literatura como surfactantes à base de ácidos graxos (SDAG) do coco.<sup>24</sup> Surfactantes, ou tensoativos, são substâncias que atuam na superfície de contato entre dois líquidos imiscíveis, reduzindo (ou modificando) a tensão superficial entre eles e aumentando a estabilidade da emulsão formada.

O uso de SDAG do coco em indústrias de cosméticos e higiene pessoal tem aumentado devido ao baixo grau de irritação cutânea, oral e ocular causado por eles, em comparação aos demais surfactantes, quando adicionados à produtos como shampoos, condicionadores, sabonetes, sabões líquidos, cremes dentais, hidratantes, etc.<sup>24</sup>

A cocobetaína (Figura 20), surfactante anfótero muito utilizado pela indústria de cosméticos, é formada pela conjugação dos ácidos graxos saturados de cadeia média, contidos no óleo de coco, com uma molécula de betaína.

Em 2001, Peter Eichhorn *et. al.*, avaliam resíduos de surfactantes à base de ácidos graxos presentes no óleo de coco, em amostras de efluentes, por LC-ESI-MS, e observaram a formação de uma série de sinais (“clusters”) de adutos de CAPB do tipo  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$ , detectados no modo positivo, observados na faixa de massas entre  $m/z$  600-800.<sup>78,79</sup>



Cocobetaína; 'n' = 6, 8, 10,12, 14

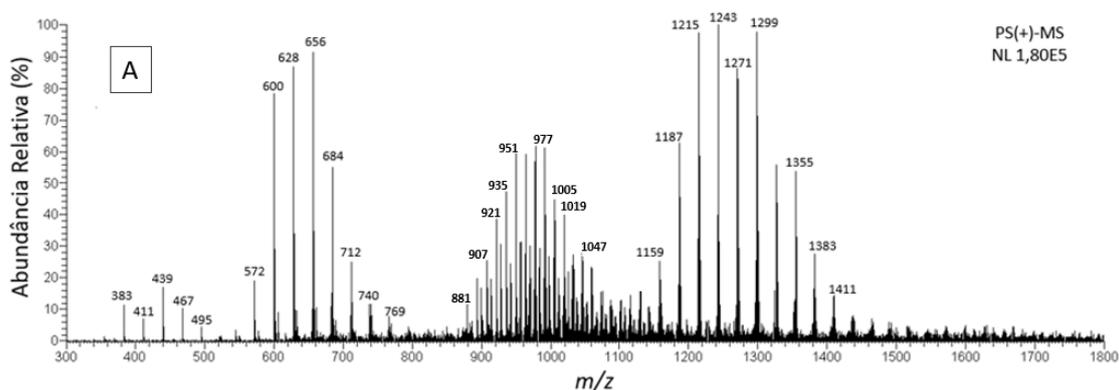
Figura 20 - Estrutura dos surfactantes cocobetaína.  
(Adaptado de 78)

O espectro PS(+)-MS obtido para a amostra de GVH (Figura 16B) apresentou sinais mais intensos na região de  $m/z$  800 - 950, que correspondem a adutos de sódio  $[M + Na]^+$  de TAGs. Sabe-se que a GVH é fabricada a partir

da hidrogenação de óleos vegetais compostos por ácidos graxos com 16 ou 18 carbonos em suas cadeias alifáticas, como os ácidos palmítico (P; C 16:0), oleico (O; C18:0), linoleico (L; C18:2) e linolênico (Ln; C18:3), que constituem mais de 80% dos óleos de soja, canola, milho e girassol. Os íons de razão  $m/z$  851, 877 e 901 são descritos na literatura como os adutos de sódio  $[M+Na]^+$  dos TAGs PPLn, PLL e LLL, respectivamente. Os sinais acima de  $m/z$  1600 Da sugerem a presença de dímeros de TGAs formados pelo aquecimento durante o processo de hidrogenação.<sup>80</sup>

Assim como nos oligossacarídeos, a determinação exata da estrutura dos lipídios derivados de ácidos graxos requer o uso de analisadores de massas de alta resolução ou análise de massas sequencial, devido à grande quantidade de isômeros de massas possíveis de serem formados na combinação entre os ácidos graxos.

A Figura 21 mostra os espectros PS(+)-MS de duas amostras de VCO adulteradas com 14% (A) e 21% (B) de GVH. O perfil dos espectros adquiridos para as amostras adulteradas é muito semelhante ao da amostra de VCO autêntica. Apesar de apresentar uma diferença perceptível nos valores da intensidade dos sinais, não é possível estabelecer uma relação linear univariada entre esses sinais e a concentração do adulterante, o que faz necessária a aplicação de métodos quimiométricos na quantificação da GVH adicionada ao óleo de coco extra virgem.



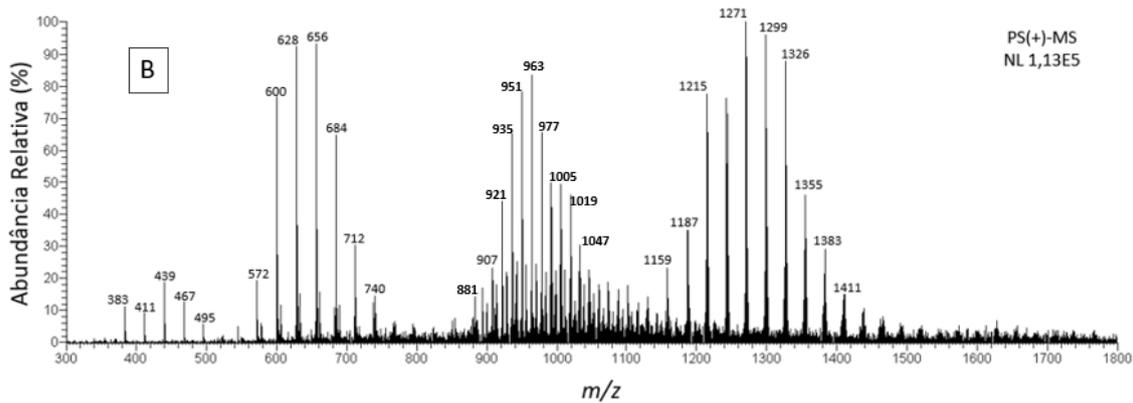


Figura 21 - Espectros PS(+)-MS obtidos para uma amostra de VCO adulterada com (A) 14% de GVH e (B) 21 de GVH

#### 4.4.2 Construção de um modelo quantitativo utilizando Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Após a construção do modelo PLS, foi possível verificar que, para as amostras com concentrações menores que 4,5% de adulteração, os erros de predição foram excessivamente elevados, com valores entre 80 e 150% de erro relativo. Por esse motivo, a faixa de estudo do modelo foi reduzida de 0,3% - 21,0% para 4,5% - 21%, totalizando 56 amostras (Tabela 5 - Modelo 1). Esse novo conjunto de amostras também foi dividido entre conjuntos de calibração e validação, sendo 37 amostras destinadas ao conjunto de calibração e 19 ao conjunto de validação. Foram utilizados os mesmos pré-processamentos e métodos de validação cruzada descritos anteriormente, e o melhor número de VLs foi definido como sendo 4. Os erros desse modelo com faixa de adulteração reduzida (entre 4,5% - 21%) foram menores que o do modelo anterior, com erros relativos máximos próximos de 30%, o que indica que o método proposto nesse trabalho não possui sensibilidade suficiente para quantificar adulterações de VCO com GVH menores que 4,5% m/m.

Como o Modelo 1 apresentou erros satisfatórios, seguiu-se com a avaliação da presença de amostras anômalas (*outliers*), utilizando o método de resíduos padronizados de *Jackknife*.<sup>77</sup> Os *outliers* foram removidos inicialmente no conjunto de calibração até um limite de 22,2% dos dados. De acordo com a

literatura, devem ser realizadas no máximo três rodadas de remoção de *outliers* para se evitar o efeito *snowballing* (remoção excessiva de amostras).<sup>81</sup>

Como indicado na Tabela 5, foi necessária apenas uma rodada de remoção de *outliers*, na qual foram removidas 8 amostras do conjunto de calibração. O modelo otimizado (Modelo 2) foi construído com 4 VLs, explicando 72,3% da variância em **X** e 98,6% da variância em **Y**. É possível verificar que houve uma redução de 41% no valor do RMSEC (1,54% para 0,90%), e de 55% no RMSEP (de 2,53% para 1,14%).

Tabela 5 - Otimização dos modelos PLS pela detecção de amostras anômalas

	MODELOS	
	1	2
Amostra de calibração	37	29
Amostras de validação	19	18
Variáveis latentes	4	4
RMSEC (%)	1,54	0,90
RMSEP (%)	2,53	1,14
RPD <sub>cal</sub>	1,5	5,5
RPD <sub>val</sub>	2,4	4,0

Uma maneira mais robusta de se comparar os modelos gerados é através dos valores de RPD, sigla do inglês *Residual Prediction Deviation*. Para um modelo ser considerado bom, ele precisa apresentar  $RPD > 2,4$  e como mostrado na Tabela 5, os valores de RPD do modelo não otimizado são baixos. No primeiro modelo o RPD<sub>cal</sub> é de 1,5, o que o classifica apenas como satisfatório. Já no segundo modelo, tanto RPD<sub>cal</sub> quanto RPD<sub>val</sub> foram superiores a 2,4, o que confirma a melhoria do modelo com a retirada dos *outliers*.<sup>77</sup>

Após a remoção dos *outliers*, o modelo otimizado foi submetido à avaliação de algumas figuras de mérito para a confirmação da sua linearidade. Os resíduos do conjunto de calibração foram avaliados com relação à sua independência, normalidade e homoscedastidade. Com base nesses testes, foi

possível verificar que os resíduos do conjunto de calibração do modelo proposto são independentes, normais e homoscedásticos a um nível de confiança de 95%, o que confirma a linearidade do modelo na faixa de estudo proposta. A Figura 22 apresenta a curva dos valores reais *versus* valores preditos obtida para o modelo PLS proposto.

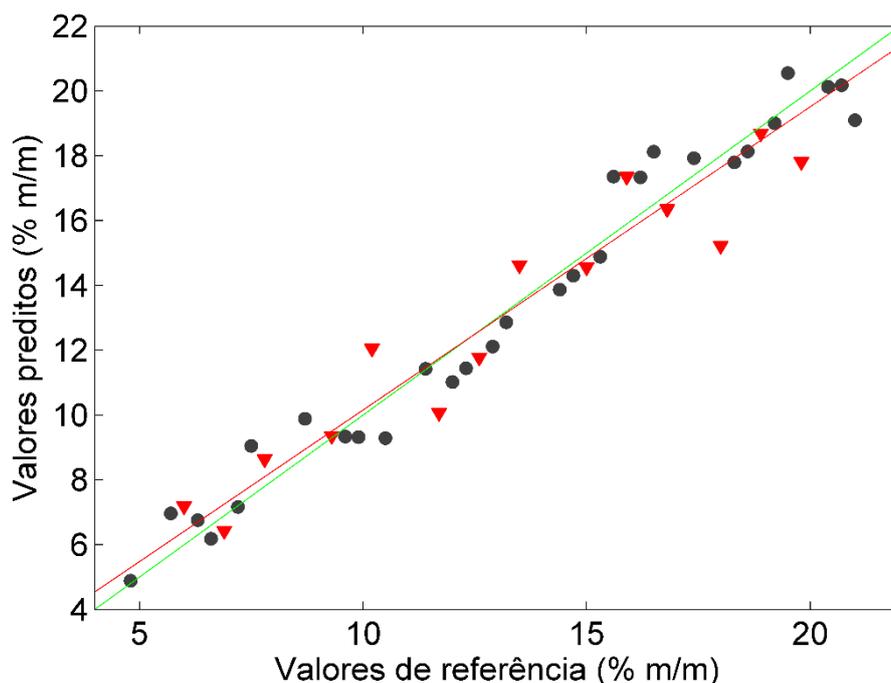


Figura 22 - Gráfico dos valores de referência x valores preditos em % m/m

[Amostras de calibração (●) e amostras de validação (▼)].

A exatidão do modelo também foi avaliada por meio do erro relativo médio da validação e do viés. A Figura 23 mostra que as amostras de validação apresentaram, na maioria das vezes, erros entre  $\pm 15\%$ . Apenas 4 amostras apresentaram erros fora desta faixa. De acordo com o guia de validação da AOAC, o erro relativo médio aceitável para análises com fração mássica de  $10^{-2}$  (analito na concentração entre 1 e 9%) é de  $\pm 3\%$  e para análises com fração mássica de  $10^{-1}$  (analito em concentrações acima de 10%) é de  $\pm 2\%$ . Para esse modelo, o erro relativo médio foi de 1,7%, sendo considerado satisfatório mesmo para os parâmetros mais rigorosos.<sup>82</sup>

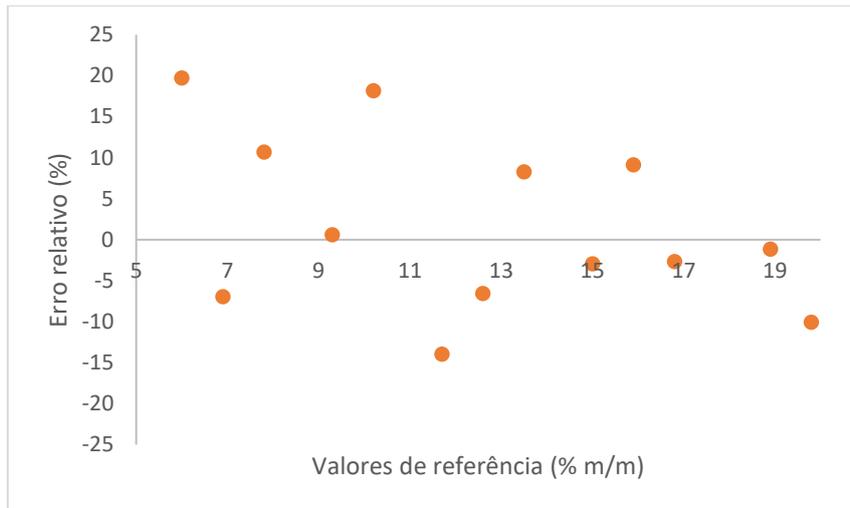


Figura 23 - Erro relativo das amostras do conjunto de validação do modelo PLS.

A partir da avaliação do viés foi possível verificar a ausência de erro sistemático do modelo. Com base nas amostras de validação foi estimado um  $t_{viés} = 0,10$ , que é menor que o valor tabelado considerando 18 graus de liberdade (número de amostras do conjunto de calibração) e  $\alpha=0,05$  ( $t_{calc} = 2,10$ ).

Analisando os *VIP Scores* do modelo otimizado (Figura 30), é possível obter informações importantes sobre as variáveis mais relevantes para a construção do modelo.

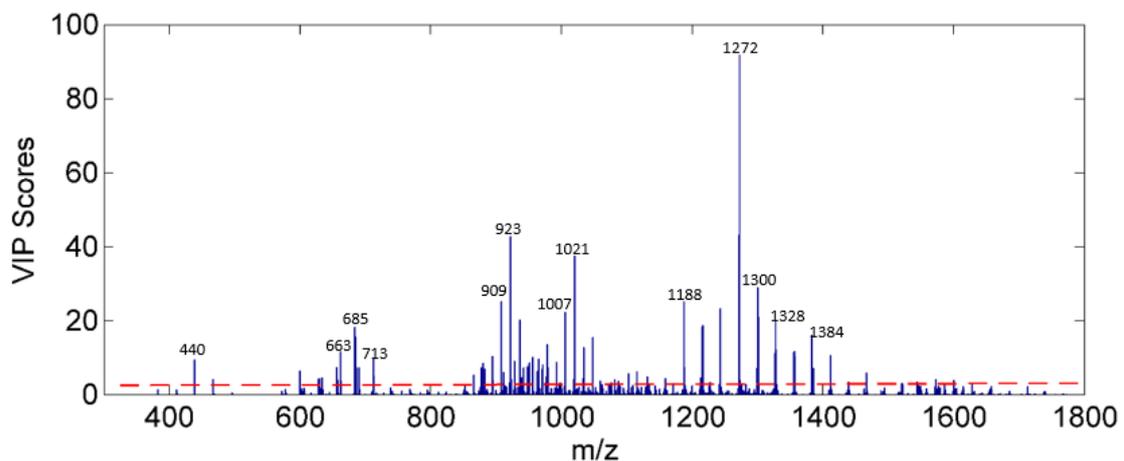


Figura 24 - VIP scores do modelo PLS.

Observando a Figura 24, verifica-se que os sinais que mais contribuíram para a construção do modelo estão divididos em três grupos:  $m/z$  600 - 750,  $m/z$  950 - 1100 e  $m/z$  1200 - 1500, sendo o sinal de razão  $m/z$  1272 o mais relevante. Esse sinal possui um valor positivo no vetor de regressão (Figura 25), o que indica que ele se relaciona com o aumento da concentração de GVH nas amostras adulteradas.

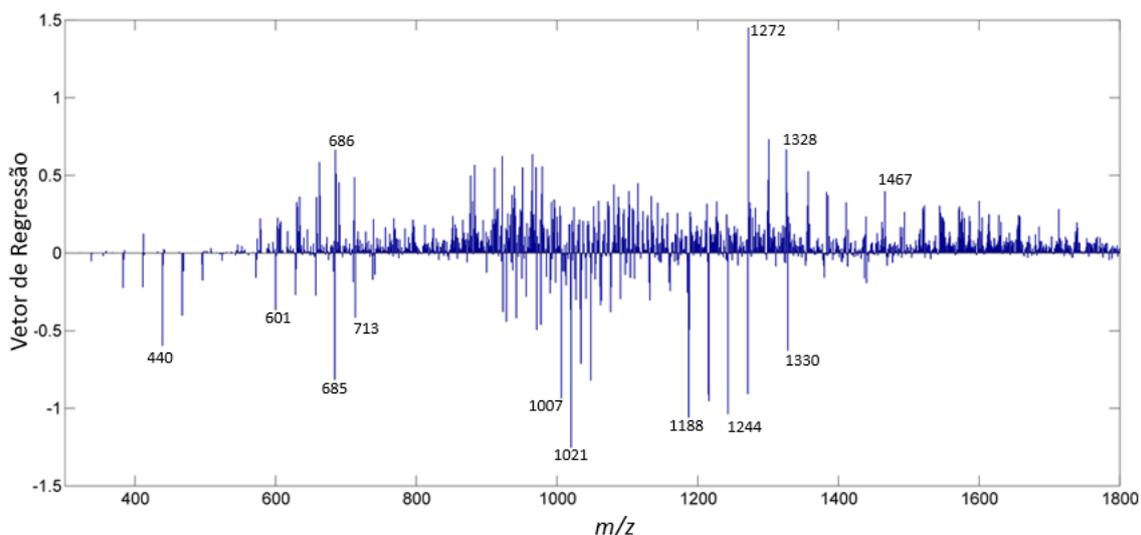


Figura 25 - Vetor de regressão do modelo PLS.

A precisão do modelo também foi avaliada em dois níveis, repetibilidade e precisão intermediária. Porém, para esses testes, o resultado obtido não foi satisfatório, sendo obtidos desvios padrões relativos da ordem de 100% ou mais. Vários parâmetros podem ter contribuído para a baixa precisão do método. Um deles é o processo de corte do papel usado como substrato, que foi feita de maneira artesanal, utilizando uma tesoura. Para se obter uma maior homogeneidade dos triângulos de papel usados na análise, os mesmos poderiam ser fabricados com o auxílio de, por exemplo, um *plotter* de recorte, facilmente encontrada em gráficas de comunicação visual. Outro fator que pode ter contribuído é o posicionamento do papel na entrada do espectrômetro de massas, uma vez que durante a análise foi observado que uma pequena mudança nessa posição provoca alterações no ionograma e no perfil do espectro gerado. Outros fatores, tais como, instabilidade da rede elétrica e variação da

temperatura da sala onde o espectrômetro de massas se encontra, também podem ter contribuído para um aumento da variabilidade no sistema resultando, conseqüentemente, na baixa precisão obtida.

#### **4.5 Conclusões Parciais**

Um método para a quantificação de gordura vegetal hidrogenada em óleo de coco extra virgem utilizando espectrometria de massas com ionização por *paper spray*, com o auxílio do método de regressão por mínimos quadrados parciais, foi desenvolvido. Esse método permite quantificar a adição do adulterante em uma faixa entre 4,5 - 21% através de uma técnica simples, rápida, que não demanda pré-tratamento complexo da amostra, além de consumir uma quantidade mínima de amostra e solvente.

Entretanto, não foi possível realizar a validação completa desse método, uma vez que o mesmo não apresentou precisão satisfatória. É provável que o simples ajuste de alguns parâmetros, tais como padronização das dimensões dos triângulos usados como substrato e posicionamento constante do papel na entrada do espectrômetro, aumentem a precisão do método.

# **CAPÍTULO 5**

## **CONCLUSÕES GERAIS**

A aplicação da espectrometria de massas com ionização por *paper spray* mostrou-se eficiente no controle de qualidade de produtos derivados do coco. A associação dessa técnica com métodos quimiométricos permitiu o desenvolvimento de um método qualitativo e um quantitativo capazes de identificar e/ou quantificar adulterantes comumente adicionados nesses produtos.

O modelo qualitativo construído a partir dos espectros obtidos por PS-MS apresentou um excelente desempenho na detecção de amostras de açúcar de coco adulteradas com açúcar mascavo, com nenhuma amostra classificada de maneira incorreta.

A técnica PS-MS também se mostrou promissora para a análise quantitativa de amostras complexas, tendo apresentado um modelo com boa linearidade para a quantificação de gordura vegetal hidrogenada em óleo de coco extra virgem, sendo necessários alguns ajustes nos parâmetros que influenciam a precisão do método.

A espectrometria de massas com ionização por *paper spray* combinada a métodos quimiométricos tem se mostrado uma ferramenta analítica poderosa na detecção de fraudes em alimentos, apresentando uma grande possibilidade de novas aplicações e chances de ser implementada em análises de controle de qualidade na indústria alimentícia, bem como na verificação de autenticidade por órgãos fiscalizadores.

# CAPÍTULO 6

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **World Health Organization:** Obesity and overweight. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Acesso em 02/2018.
2. **The Global Burden of Disease (GBD) Obesity Collaborators.** Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **New England Journal of Medicine.** 377. 13-27. 2015.
3. MELO, M. E. Doenças Desencadeadas ou Agravadas pela Obesidade. **ABESO.** Disponível em <<http://www.abeso.org.br/artigos>> Acesso em 02/2018.
4. KOPELMAN, P. Obesity as a medical problem. **Nature.** 404, 635–643. 2000.
5. YANOVSKI, S. Z.; YANOVSKI, J. A. Long-term drug treatment for obesity - A systematic and clinical review. **Journal of the American Medical Association.** 311. 74–86. 2014.
6. **Ministério da Saúde.** Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/04/obesidade-cresce-60-em-dez-anos-no-brasil>> Acesso em 02/2018.
7. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013.** Disponível em <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>> Acesso em 02/2018.
8. **Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA).** Disponível em <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_inca\\_sobrepeso\\_obesidade\\_2017.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_inca_sobrepeso_obesidade_2017.pdf)> Acesso em 02/2018.
9. OTHMAN, N. H. Honey and cancer: sustainable inverse relationship particularly for developing nations - A review. **Evidence-based complementary and alternative medicine.** 10. 2012.
10. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO).** Disponível em <<http://www.abeso.org.br/diretrizes>> Acesso em 02/2018.

11. HOFFMANN, R. Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. **Estudos Avançados** 9. 24. 159-172. 1995.
12. **Ministério da Saúde**. Disponível em < [http://dab.saude.gov.br/portaldab/diretrizes\\_pnan.php](http://dab.saude.gov.br/portaldab/diretrizes_pnan.php)> Acesso em 02/2018.
13. DIAS, P. C.; HENRIQUES, P.; ANJOS, L. A.; BURLANDY, L. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Caderno de Saúde Pública**. 33. 7. 2017.
14. TRINIDAD, P. T.; Nutrition and Health Benefits of Coconut Sap Sugar/Syrup. *Food and Nutrition Research Institute - Department of Science and Technology*. 2003. Disponível em <[http://www.coconutboard.gov.in/images/neeraTPTrinidad\\_FNRI.pdf](http://www.coconutboard.gov.in/images/neeraTPTrinidad_FNRI.pdf)> Acesso em 01/2018.
15. **Google Trends**. Disponível em <<https://trends.google.com.br/trends/>> Acesso em 02/2018.
16. EVERSTINE, K.; SPINK, J.; KENNEDY, S. Economically Motivated Adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. **Journal of food protection**. 76. 723-735. 2013.
17. NAWROCKA, A.; LAMORSKA, J. Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods. Disponível em < <https://www.intechopen.com/books/citations/advances-in-agrophysical-research/determination-of-food-quality-byusingspectroscopic-methods>> Acesso em 02/2018.
18. LI, Y. S.; CHURCH, J. S. Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials **Journal of food and drug analysis**. 22. 29-48. 2014.
19. BANSAL, S.; SINGH, A.; MANGAL, M.; MANGAL, A. K.; KUMAR, S. Food adulteration: sources, health risks, and detection methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 57. 6. 1174-1189. 2015.
20. FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Editora Unicamp. Campinas - SP. 2015.
21. LIMA, E.B.C.; SOUSA, C.N.S., MENESES, L.N.; XIMENES, N.C.; SANTOS, M.A.J.; VASCONCELOS, G.S.; LIMA, N.B.C.; PATROCINIO, M.C.A.; MACEDO, D.;

VASCONCELOS, S.M.M. Cocos nucifera (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 48. 11. 953–964. 2015.

22. **EMBRAPA**. Produção e Comercialização de Coco no Brasil Frente ao Comércio Internacional. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122994/1/Producao-e-comercializacao-Doc-184.pdf>> Acesso em 02/2018.

23. **SINDICOCO** - Sindicato Nacional dos Produtores de Coco. Disponível em <<http://www.sindcoco.com.br/informativos.php>> Acesso em 02/2018.

24. OLIVEIRA, C.H.; BINOTTI, R.S.; ASTIGARRAGA, R.E.B; GRAUDENZ, G. S.; CONDINO NETO, A. Surfactantes derivados do fruto de coco (Cocos nucifera L.) e sensibilidade cutânea. **Revista brasileira de alergologia imunopatologia**. 28. 3. 2005.

25. **EMBRAPA**. Disponível em <<https://www.embrapa.br/agroindustria-tropical/busca-de-publicacoes/-/publicacao/425175/utilizacao-da-casca-de-coco-como-substrato-agricola>> Acesso em 02/2018.

26. Associação Nacional dos Inventores. Disponível em <<http://www.invencoesbrasileiras.com.br/encosto-de-fibra-de-coco/>> Acesso em 02/2018.

27. SGFE - Sustainable Green Fuel Enterprise. Disponível em < <http://www.sgfe-cambodia.com/products>> Acesso em 02/2018.

28. FAO. Disponível em < <http://teca.fao.org/read/9024>> Acesso em 02/2018.

29. Unicamp. <<https://www.unicamp.br/unicamp/ju/noticias/2017/07/10/pesquisa-revela-potencial-energetico-da-casca-de-coco>> Acesso em 02/2018.

30. U.S. Food and Drug Administration. Disponível em <<https://www.fda.gov/Food/FoodDefense/default.htm>> Acesso em 02/2018.

31. The Royal Society of Chemistry. Disponível em < <https://eic.rsc.org/feature/the-fight-against-food-adulteration/2020253.article> > Acesso em 02/2018.

32. The public domain review. Disponível em < <https://publicdomainreview.org/collections/a-treatise-on-adulteration-of-food-and-culinary-poisons-1820/>> Acesso em 02/2018.

33. WENJING, Z.; JIANHONG, W.X. Economically motivated food fraud and adulteration in China: An analysis based on 1,553 media reports. **Food Control**. 67. 2016.

34. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. Editora LTC, 6ª Edição, São Paulo, 2005.
35. PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R.; Introdução à Espectroscopia. Cengage Learning. São Paulo. 2010.
36. HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**, 3ª Edição, England, 2007.
37. FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. **Science**. 246. 64-71. 1989.
38. Nanotechnology Solutions. Disponível em <<https://nanotechnologysolutions.wordpress.com/category/industrial-applications/>> Acesso em 02/2018.
39. PRAMANIK, B. N.; GANGULY, A. K.; GROSS, M. L. Practical spectroscopy series, volume 32, Applied Electrospray Mass Spectrometry. New York, 2002.
40. GROSS, J.H.; **Mass Spectrometry: A Textbook**. Springer-Verlag, 2004.
41. WESTON, D. J. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. **Analyst**, v. 135, p. 661-668, 2010.
42. HARRIS, G. A.; GALHENA, A. S.; FERNÁNDEZ, F. M. Ambient Sampling/Ionization Mass Spectrometry: Applications and current trends. **Analytical Methods**. 83. 4508-4538. 2011.
43. LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N. E.; LIN, J. M.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Development, characterization, and application of *paper spray* ionization. **Analytical Chemistry**. 82. 2463-2471. 2010.
44. ESPY, R. D.; MULIADI, A. R.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. *Spray* mechanism in *paper spray* ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**. 325-327. 167. 171. 2012.
45. SHI, R.Z.; EL GIERARI, M.; MANICKE, N. E.; FAIX, J. D. Rapid measurement of tacrolimus in whole blood by paper spray-tandem. *Clinica Chimica Acta*. 441. 99–104. 2015.

46. DENG, J.; YANG, Y. Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bansha herbal tea using paper spray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. 785. 82-90. 2013.
47. GARRET, R.; REZENDE, C. M.; IFA, D. R. Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis. **Analytical Methods**. 5. 5944-5948. 2013.
48. LI, A.; WEI, P.; HSU, H.; COOKS, R. G. Direct analysis of 4-methylimidazole in foods using paper spray mass spectrometry. **Analyst**. 138. 4624-4630. 2013.
49. EVARD, H.; KRUIVE, A.; LOHMUS, R.; LEITO, I. Paper spray ionization mass spectrometry - Study of a method for fast-screening analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**. 41. 221-225. 2015.
50. PEREIRA, H. V.; AMADOR, V. S.; SENA, M. M.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. **Analytica Chimica Acta**. 940. 104-112. 2016.
51. TAVERNA, D.; DI DONNA, L.; BARTELLA, L.; NAPOLI, A.; SINDONA, G.; MAZOTTI, F. Fast analysis of caffeine in beverages and drugs by paper spray tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 408. 3783-3787. 2016.
52. SNEHA, M.; DULAY, M. T.; ZARE, R. Z. Introducing mass spectrometry to first-year undergraduates Analysis of caffeine and other components in energy drinks using paper-spray mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**. 418. 156-161. 2017.
53. TEODORO, J. A. R.; PEREIRA, H. V.; SENA, M. M.; PICCIN, E.; ZACCA, J. J.; AUGUSTI, R. Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable identification of counterfeit blended Scottish whiskies. **Food Chemistry**. 237. 1058-1064. 2017.
54. DI DONNA, L.; TAVERNA, D.; INDELICATO, S.; NAPOLI, A.; SINDONA, G.; MAZOTTI, F. Rapid assay of resveratrol in red wine by paper spray tandem mass spectrometry and isotope dilution. **Food Chemistry**. 229. 354-357. 2017.
55. GUO, T.; ZHANG, Z.; YANNELL, K. E.; DONG, Y.; COOKS, G. R. Paper spray ionization mass spectrometry for rapid quantification of illegal dyes in beverages. **Analytical Methods**. 9. 6273-6279. 2017.
56. WEI, S.C.; FAN, S.; LIEN, C. W.; UNNIKRISHNAN, B.; WANG, Y. S.; CHU, H. W.; HUANG, C.C.; HUAN, P.H.; CHANG, H.T. Graphene oxide membrane as an efficient

- extraction and ionization substrate for spray-mass spectrometric analysis of malachite green and its metabolite in fish samples. **Analytica Chimica Acta**. 1003. 42-48. 2018.
57. BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry **Analyst**. 125. 2125-2154. 2000.
58. FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. 22. 724-731.1999.
59. BOTELHO, B.G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L.S; SENA, M.M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**. 181. 31-37. 2015.
60. HEBBAR, K.B.; ARIVALAGAN, M.; MANIKANTAN, M.R.; MATHEW, A.C.; THAMBAN, C.; THOMAS, G.V. Coconut inflorescence sap and its value addition as sugar – collection techniques, yield, properties and market perspective. **Current Science**. 109. 8. 2015.
61. TRINIDAD, P. T.; Nutrition and Health Benefits of Coconut Sap Sugar/Syrup. *Food and Nutrition Research Institute - Department of Science and Technology*. 2003. Disponível em <[http://www.coconutboard.gov.in/images/neeraTPTrinidad\\_FNRI.pdf](http://www.coconutboard.gov.in/images/neeraTPTrinidad_FNRI.pdf)> Acesso em 01/2018.
62. PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**. 33. 385.390. 2003.
63. SANVIDO, G. B.; GARCIA, J. S.; CORILO, Y. E.; VAZ, B. G.; ZACCA, J. J.; COSSO, R. G.; EBERLIN, M. N.; PETER, M.G. Fast screening and secure confirmation of milk powder adulteration with maltodextrin via Electrospray Ionization-Mass Spectrometry [ESI(+)-MS] and selective enzymatic hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58. 9407–9412. 2010.
64. PEJIN, B.; IODICE, C.; TOMMONARO, G.; SABOVJEVIC, M.; BIANCO, A.; TESEVIC, V.; VAJS, V.; ROSA, S.; Sugar composition of the moss *Rhodobryum ontariense* (Kindb.) **Natural Product Research**. 26. 3. 209–215. 2012.
65. SOUZA, P. P.; OLIVEIRA, L. C. A.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, D. V.; SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, R.. Brazilian cachaça: “Single shot” typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Food Chemistry**. 115. 1064–1068. 2009.

66. KELLER, B. O.; SUI, J.; YOUNG, A. B.; WHITTAL, R. M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. 627. 71–81. 2008.
67. AWASTHI, N. P.; SINGH, R. P. Microwave-assisted facile and convenient synthesis of fatty acid amide (erucamide): Chemical-catalyzed rapid method. **European Journal of Lipid Science and Technology**. 111. 202–206. 2009.
68. LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; AMIRAV, A.; FIALKOV, A. B.; ALON, T.; MARTOS, P. A.; KOK, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques. **Trends in Analytical Chemistry**. 27. 11. 2008.
69. ANDELKOVIC, T. D.; KOCIC, G. M.; ANDELKOVIC, D. H.; KOSTIC, I. S.; MILOJKOVIC, D. S. The signal response linearity in phthalates determination using ESI-MS method with the loop injection technique. **Advanced Technologies**. 4(1). 42-48. 2015.
70. National Nutrient Database for Standard Reference Release 28, May, 2016 Basic Report 19334, Sugars brown Report Date: January 24, 2018.
71. EU Publications. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Disponível em <<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en>> Acesso em 02/2018.
72. MANDAL, M.D.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Areaceae): In health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 4. 241-247. 2011.
73. MARINA, A.M.; CHE, Y.B.; AMIN, M.I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science & Technology**. 20\_ 10. 481-487.2009.
74. MARTINI, W.S.; PORTO, B.L.S.; OLIVEIRA, M.A.L.; SANT'ANA, A.C. Comparative Study of the Lipid Profiles of Oils from Kernels of Peanut, Babassu, Coconut, Castor and Grape by GC-FID and Raman Spectroscopy. **J. Braz. Chem. Soc.** 29. 2. 2018.
75. AGARWAL, R.K.; BOSCO, S.J.D.; Extraction Processes of Virgin Coconut Oil. **MOJ Food process Technol.** 4(2). 2017.
76. Index Mundi. Disponível em <<https://www.indexmundi.com/Agriculture/?commodity=coconut-oil&graph=production>> Acesso em 02/18.

77. BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. Implementação de um Método Robusto para o Controle Fiscal de Umidade em Queijo Minas Artesanal. Abordagem Metrológica Multivariada. **Química Nova**, v. 36, p. 1416-1422, 2013.
78. EICHHORN, P.; KNEPPER, T.P. Electrospray ionization mass spectrometric studies on the amphoteric surfactant cocamidopropylbetaine. **Journal of Mass Spectrometry**. 36. 677–684. 2009.
79. “Identification of Surfactants by Electrospray Liquid Chromatography-Mass Spectrometry.” Disponível em <[https://littlesandsailing.files.wordpress.com/2011/05/class\\_notes.pdf](https://littlesandsailing.files.wordpress.com/2011/05/class_notes.pdf)> Acesso em 03/18.
80. SARAIVA, S.A.; CABRAL, E.C.; EBERLIN, M.N.; CATHARINO, R.R. Amazonian Vegetable Oils and Fats: Fast Typification and Quality Control via Triacylglycerol (TAG) Profiles from Dry Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Fingerprinting. **J. Agric. Food Chem.** 57. 4030–4034. 2009.
81. VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, p. 1278-1287, 2009.
82. AOAC International. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Disponível em <[http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)> Acesso em 03/18.

## ANEXO I

### LEI Nº 9.677, DE 2 DE JULHO DE 1998.

Altera dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos crimes contra a saúde pública, e dá outras providências.

**O PRESIDENTE DA REPÚBLICA** Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Art. 1º Os dispositivos a seguir indicados do Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940 - Código Penal, passam a vigorar com a seguinte redação:

"Falsificação, corrupção, adulteração ou alteração de substância ou produtos alimentícios"

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

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

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

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

"Modalidade culposa

§ 2º Se o crime é culposos:

Pena - detenção, de 1 (um) a 2 (dois) anos, e multa."

*"Falsificação, corrupção, adulteração ou alteração de produto destinado a fins terapêuticos ou medicinais"*

"Art. 273. Falsificar, corromper, adulterar ou alterar produto destinado a fins terapêuticos ou medicinais:"

"Pena - reclusão, de 10 (dez) a 15 (quinze) anos, e multa."

"§ 1º Nas mesmas penas incorre quem importa, vende, expõe à venda, tem em depósito para vender ou, de qualquer forma, distribui ou entrega a consumo o produto falsificado, corrompido, adulterado ou alterado."

"§ 1º-A. Incluem-se entre os produtos a que se refere este artigo os medicamentos, as matérias-primas, os insumos farmacêuticos, os cosméticos, os saneantes e os de uso em diagnóstico."

"§ 1º-B. Está sujeito às penas deste artigo quem pratica as ações previstas no § 1º em relação a produtos em qualquer das seguintes condições:

I - sem registro, quando exigível, no órgão de vigilância sanitária competente;

- II - em desacordo com a fórmula constante do registro previsto no inciso anterior;
- III - sem as características de identidade e qualidade admitidas para a sua comercialização;
- IV - com redução de seu valor terapêutico ou de sua atividade;
- V - de procedência ignorada;
- VI - adquiridos de estabelecimento sem licença da autoridade sanitária competente."

"Modalidade culposa

§ 2º Se o crime é culposo:

Pena - detenção, de 1 (um) a 3 (três) anos, e multa."

"Emprego de processo proibido ou de substância não permitida

Art. 274.

Pena - reclusão, de 1 (um) a 5 (cinco) anos, e multa."(NR)

"Invólucro ou recipiente com falsa indicação

Art. 275. Inculcar, em invólucro ou recipiente de produtos alimentícios, terapêuticos ou medicinais, a existência de substância que não se encontra em seu conteúdo ou que nele existe em quantidade menor que a mencionada:"

"Pena - reclusão, de 1 (um) a 5 (cinco) anos, e multa."

"Produto ou substância nas condições dos dois artigos anteriores

Art. 276.

Pena - reclusão, de 1 (um) a 5 (cinco) anos, e multa."

*"Substância destinada à falsificação*

Art. 277. Vender, expor à venda, ter em depósito ou ceder substância destinada à falsificação de produtos alimentícios, terapêuticos ou medicinais:"

"Pena - reclusão, de 1 (um) a 5 (cinco) anos, e multa."

Art. 2º Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Brasília, 2 de julho de 1998; 177º da Independência e 110º da República.

FERNANDO HENRIQUE CARDOSO

*Renan Calheiros*

*José Sena*

Este texto não substitui o publicado no D.O.U. de 3.7.1998

## ANEXO II

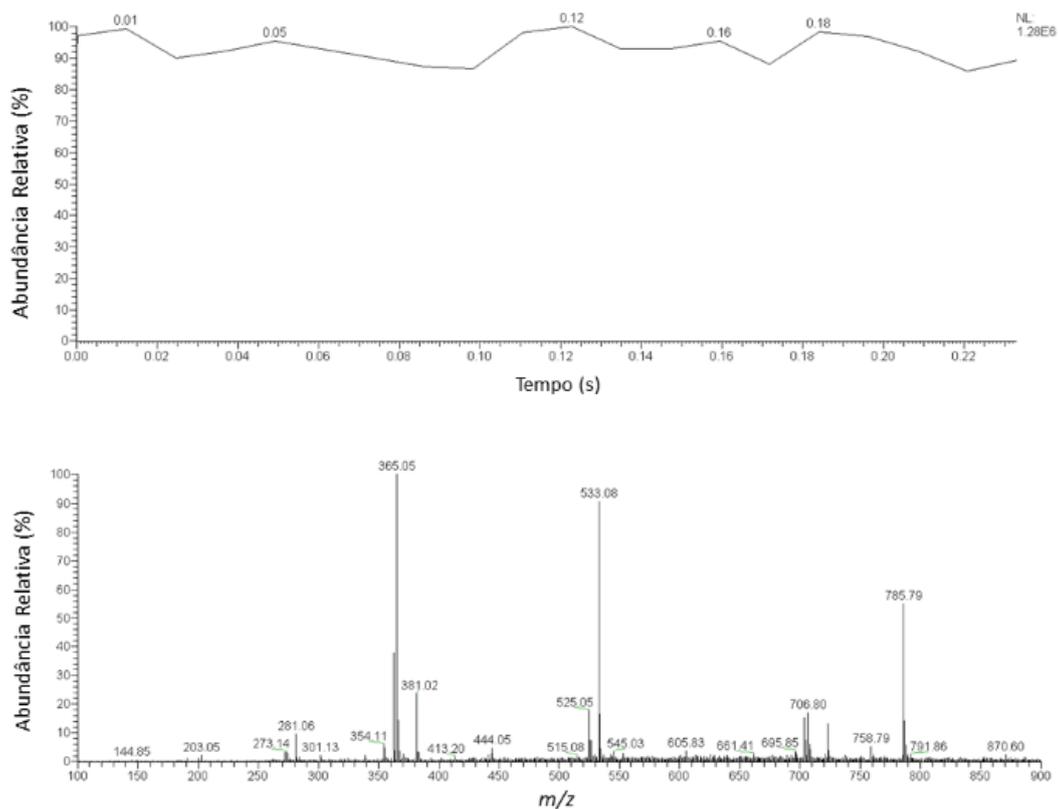
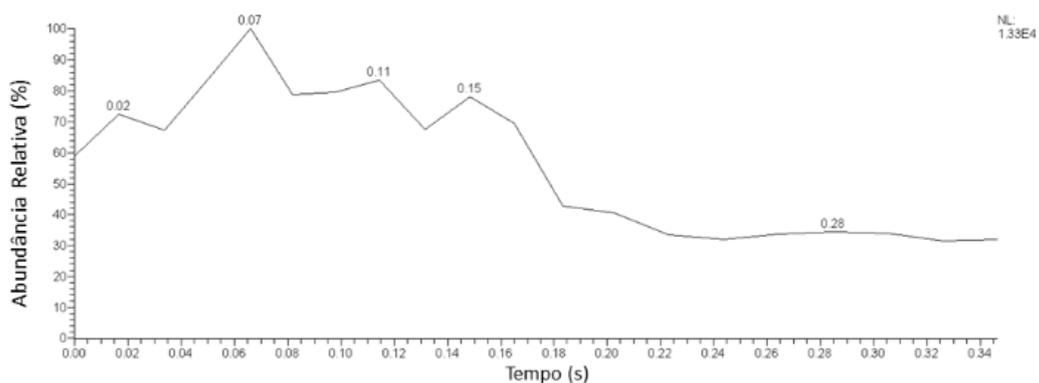


Figura A1: Ionograma e espectro PS-MS obtido para o açúcar de coco AC1 no modo positivo.



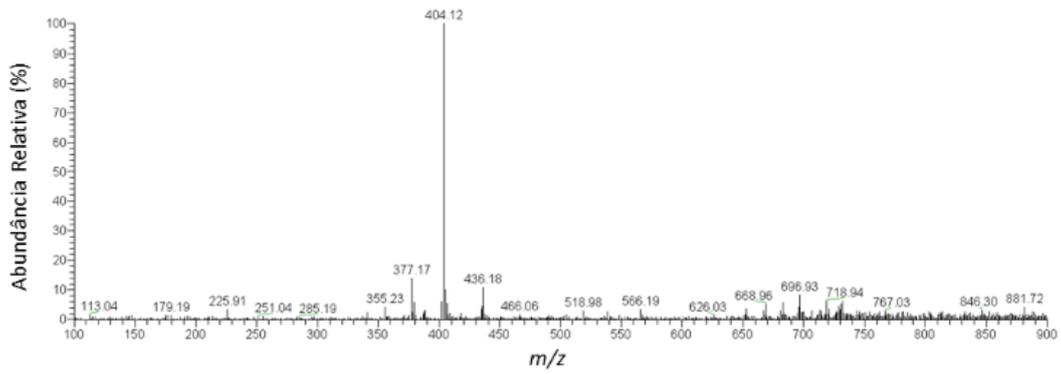


Figura AII: Ionograma e espectro PS-MS obtido para o açúcar de coco AC1 no modo negativo.

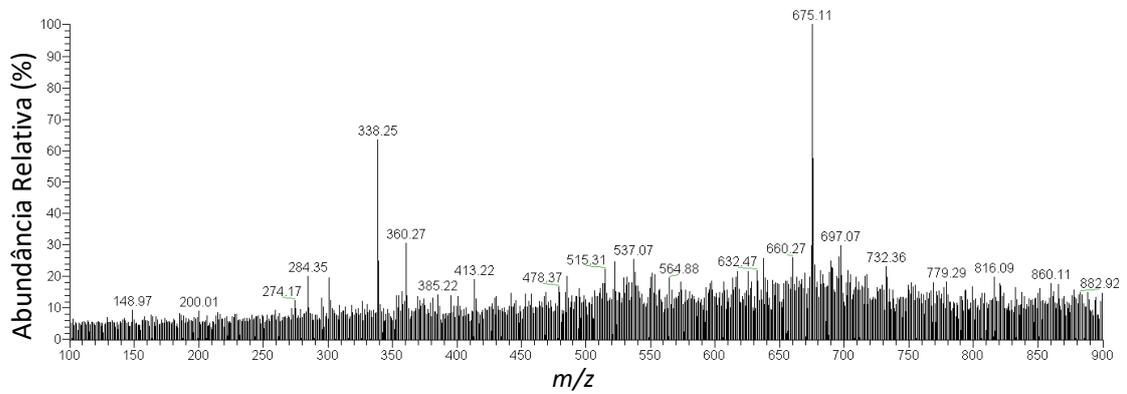


Figura AIII: PS(+)-MS da solução metanol + água (9:1) (Branco)