



Instituto de Química

Universidade Estadual de Campinas

Laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas

**Aplicação de Técnicas Avançadas de Espectrometria
de Massas em Ciências de Alimentos e Perfumaria.**

Dissertação de Mestrado

Aluna: Lygia de Azevedo Marques

Orientador: Prof. Dr. Marcos N. Eberlin

Campinas

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

M348a Marques, Lygia de Azevedo.
Aplicação de técnicas avançadas de
espectrometria de massas em ciências de alimentos e
perfumaria / Lygia de Azevedo Marques. -- Campinas,
SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. MALDI-TOF-MS. 2. ESI-MS. 3. Micotoxinas.
4. Perfumes. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: Advanced mass spectrometry techniques applied in food analysis
and perfume characterization

Palavras-chaves em inglês: MALDI-TOF-MS, ESI-MS, Micotoxins, Perfumes

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na Área de Química Analítica

Banca examinadora: Marcos Nogueira Eberlin (orientador), Fabio César Gozzo,
Luiz Alberto Beraldo de Moraes

Data de defesa: 28/07/2006

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse caridade, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que eu tivesse o dom de profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes e não tivesse caridade, nada seria.”.

(Paulo, 13: 1, 2 e 3.)

Agradecimentos

À Deus por ter me dado saúde para realizar todos os meus objetivos.

Ao prof. Dr. Marcos Eberlin que eu conhecia como profissional e passei a admirar também como pessoa, pela orientação, confiança, amizade e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

A todos os amigos do laboratório Thomson pelo carinho e amizade e por toda a ajuda.

Aos funcionários do Instituto de Química da Unicamp, por toda a ajuda prestada no decorrer desse trabalho.

À minha querida mãe Heliara por ter me ajudado nos momentos mais difíceis e me apoiado sempre.

Ao meu pai Wagner, meu avô Benedito e a minha irmã Isadora pelo apoio e compreensão dos momentos da minha ausência em muitos finais de semana.

Aos meus avós Elvira e Mário (in memoriam) por serem maravilhosos e me apoiarem sempre.

Ao meu querido Michel pelo carinho e dedicação, por toda ajuda e paciência e por ser esta pessoa maravilhosa.

Aos meus amigos do grupo de oração da Paróquia Sagrado Coração de Jesus: por terem me dado momentos de reflexão e muita paz para continuar com meus projetos e vencer as dificuldades.

A amiga Maria Ponce pelo carinho e pela amizade.

A amiga Andréa Lucia Rezemini pela amizade, sugestões e correções.

A profissional Marta Taniwaki e suas orientadas Beatriz e Marina do ITAL pela doação de amostras de café verde e pela ótima receptividade.

Ao Guilherme do Instituto Octavio Magalhães pelo envio dos extratos de amostras de café torrado.

Ao Flávio Mello da empresa Hexis pela doação das colunas de imunoafinidade de ocratoxina.

Ao Prof. Roy Edward Bruns minha admiração e agradecimentos por toda a ajuda.

Aos amigos da Applied Biosystems Hélio Martins e Daniel Lebre por toda ajuda e sugestões.

Curriculum Vitae

Lygia de Azevedo Marques

Rua Cel Conrado Siqueira Campos 47 ap 11B
Brooklin Sao Paulo SP
CEP 04704140
(11) 50411926 (Res.) ou (11) 96576035
e-mail: lygiamarques@hotmail.com

Informações Pessoais

Estado civil: Solteira
Nacionalidade: Brasileira
Data de Nascimento: 04/12/1981
Local de nascimento: São Paulo – SP

Educação

Formação: Ensino Médio
Instituição: Colégio Bandeirantes
Cidade: São Paulo Estado: São Paulo
Concluído em dezembro de 1998.

Formação: Bacharelado em Química.
Instituição: Universidade Estadual Paulista- UNESP
Cidade: Araraquara Estado: São Paulo
Concluído em dezembro de 2003.

Experiência Profissional

Estágio no Departamento de Físico Química do Instituto de Química da UNESP como bolsista PIBIC/CnPq/Unesp, no Projeto Intitulado “Estudo e Aplicação de Técnicas Estatísticas na Análise Cromatográfica”, sob orientação do Prof. Dr Romeu Magnani, no período de 11/2001 a 07/2002.

Estágio no Departamento de Físico Química do Instituto de Química da UNESP como bolsista PIBIC/CnPq/Unesp, no Projeto Intitulado “Avaliação e Expressão da Incerteza de Medição da Massa de Material Particulado da Atmosfera da Região de Araraquara”, sob orientação do Prof. Dr Romeu Magnani, no período de 08/2002 a 11/2003.

Estágio no IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas) no período de 7 de janeiro a 3 de março de 2002, no Centro de Análises Químicas Instrumentais, Laboratório de Química Orgânica participando de projeto empregando a técnica de cromatografia a gás.

Estágio na Firmenich, no período de 03 de outubro de 2003 a 03 de fevereiro de 2004, no Laboratório de Análises Analíticas trabalhando com GC-MS.

Participações em Congressos

Participação do XIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, realizado no período de 21 a 26 de outubro de 2001, no campus universitário de Bauru, na qualidade de expositor-painel-área de exatas com o trabalho: “Estudo por Simulação da Cobertura de Intervalos de Confiança para Concentrações do Fungicida Pyrimethanil”

Apresentação no Encontro Regional de Química, realizado no Instituto de Química Unesp, Araraquara, o trabalho: “Utilização de procedimentos Estatísticos na análise de traços do pesticida Aldrin”. De 21-26 de outubro de 2001.

Participação do curso "Técnicas Cromatográficas: Fundamentos e Aplicações", promovido pela UNAERP –Universidade de Ribeirão Preto, no período de 28 a 31 de agosto de 2001, com carga horária de 28 horas; ministrado pelo prof Fernando Lanças

Participação do XIV Congresso de Iniciação Científica, realizado no período de 22 a 27 de setembro de 2002, no Campus universitário de Presidente Prudente na qualidade de aluno –autor com o trabalho: “Calibração Linear em Cromatografia Utilizando uma Planilha Eletrônica”.

Participação do XV Congresso de Iniciação Científica, realizado no período de 18 a 24 de outubro de 2003, no Campus de Marília, na qualidade de aluno autor com o trabalho: “Avaliação e Expressão da Incerteza da Massa de Material Particulado da Atmosfera da Região de Araraquara.”

Participação na organização do I Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas realizado no The Royal Palm Plaza no período de 20 a 22 de novembro de 2005.

Participação do I Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas realizado no período de 20 a 22 de novembro de 2005 com os trabalhos: “Fingerprinting de Perfumes por ESI-MS Rápida Tipificação e Identificação de Adulteração”na forma de painel e “Aflatoxin Screening by MALDI-TOF Mass Spectrometry” na forma de apresentação oral.

Artigos Publicados

Catharino, R. R., Marques L. A., Santos, L. S., Baptista, A.S., Gloria, E. M., Calori-Domingues, M. A., Facco, E. M. P., Eberlin, M.N., Anal. Chem., 2005, 77, 8155.

Marques L. A., Catharino, R. R., Bruns E.R., Eberlin, N., M., J. Flav Frag, 2006, 0,0.

RESUMO

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS AVANÇADAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS E PERFUMARIA.

Neste trabalho aplicamos técnicas avançadas de espectrometria de massas, (MALDI-TOF e ESI-MS) na análise de micotoxinas em alimentos e na tipificação e verificação de fraudes em perfumes. Aplicamos a técnica MALDI-TOF em análises de micotoxinas, e esta mostrou excelente desempenho nas análises de aflatoxinas e ocratoxina e vantagem sobre a técnica de escolha atual, o método ELISA. Esta vantagem é principalmente maior especificidade através de maior exatidão em medidas de massas e, portanto, maior confiabilidade. O Planejamento de experimento foi uma ferramenta valiosa para obtenção das melhores condições e estudo dos parâmetros de interferência. O limite de detecção encontrado para a técnica foi da ordem de 25 pg para aflatoxinas e de 1 ng para ocratoxina, com perspectiva de melhoria através de aumento da massa amostral em estudos futuros para adaptação da metodologia de extração na matriz de interesse à técnica MALDI-TOF. A técnica ESI-MS foi utilizada para a tipificação e detecção de perfumes proporcionando, através da análise de componentes principais (PCA), a diferenciação com segurança entre perfumes originais, falsos e inspirados, utilizando como indicadores componentes polares não majoritários característicos de cada categoria avaliada. Este estudo abre caminho para que esta técnica seja utilizada na avaliação de perfumes que estão sob suspeita de falsificação com auxílio de uma biblioteca de “fingerprint” de perfumes por ESI-MS. O emprego da técnica de MALDI-TOF também é uma opção vantajosa para o monitoramento da qualidade de grãos quanto a presença de toxinas indesejáveis, bem como ameaças de bioterrorismo.

ABSTRACT

ADVANCED MASS SPECTROMETRY TECHNIQUES APPLIED IN FOOD ANALYSIS AND PERFUME CHARACTERIZATION.

In this work we applied advanced mass spectrometry techniques (MALDI-TOF and ESI-MS) to micotoxin analysis in food and for the typification and detection of counterfeit perfumes. MALDI-TOF was applied to micotoxin analysis, which showed excellent performance for the analysis of aflatoxins and ochratoxin with advantage over the current technique of choice, the ELISA method. This advantage is mainly its greater specificity due the exactness of the measurements, therefore with higher reliability. The surface analysis was a valuable tool to attain the best conditions and study the interference of several parameters. The detection limit found for the technique was 25 pg for aflatoxins and 1 ng for ochratoxins, with perspective of improvement through increase of the sample mass in future studies for adaptation of the methodology of extration in the matrix of interest for the MALDI-TOF technique. The ESI-MS technique was used for typification and detection of counterfeit perfumes, providing, through principal component analysis (PCA), the characterization of original, counterfeit and inspired perfumes, using as minoritarian polar compounds as diagnostic ions of each perfume category evaluated. We envisage that the method can be used to establish a ESI-MS fingerprinting library of perfumes for comparison with those from samples under investigation, and that such a library could be updated constantly by the addition of ESI-MS of new perfumes even before they are commercially released. MALDI-TOF technique is also an advantageous option for the monitoring of crop quality relating to the presence of undesirable toxins, as well as bioterrorism threats by micotoxin poisoning.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIV
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	1
1.2. A TÉCNICA CLÁSSICA DE IONIZAÇÃO	2
1.3. ESI E MALDI: AS NOVAS TÉCNICAS DE IONIZAÇÃO	3
CAPÍTULO 1- APLICAÇÃO DA TÉCNICA MALDI-TOF NA IDENTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO.....	9
1.2 MICOTOXINAS	10
1.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA DETECÇÃO DE MICOTOXINAS	12
1.4. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DAS MICOTOXINAS ESTUDADAS	15
1.4.1. AFLATOXINA	15
1.4.2. OCRATOXINA A.....	16
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	17
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1.1. AFLATOXINA	17
2.1.2. OCRATOXINA A.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1. AFLATOXINA	19
3.1.1 OTIMIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE AFLATOXINA.....	19
3.1.2 SCREENING DE AFLATOXINAS NOS AMENDOINS	20
3.2. OCRATOXINA A.....	21
3.2.1 OTIMIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A	21

3.2.2. SCREENING DA OCRATOXINA A NAS AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO.....	24
3.2.3. APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO.....	25
3.2.4 CÁLCULO DO LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO EQUIPAMENTO UTILIZANDO CONDIÇÕES ÓTIMAS OBTIDAS PELO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO.	33
3.2.5 SCREENING DE OCRATOXINA A NAS AMOSTRAS DE CAFÉ VERDE APLICANDO AS CONDIÇÕES ÓTIMAS OBTIDA PELO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO 2⁴	37
4. CONCLUSÃO.....	44
CAPÍTULO 2-“FINGERPRINTING” DE PERFUMES POR ESI-MS: RÁPIDA TIPIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO	
46	
1. INTRODUÇÃO	47
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	49
2.1. REAGENTES E AMOSTRAS	49
2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	50
2.3. ANÁLISE DOS DADOS.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS.....	58
3.1.1 ANÁLISE DE DADOS MULTIVARIADOS.....	58
3.1.1.1 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS.....	59
3.1.1.2 ANÁLISE HIERÁRQUICA.....	59
3.2 RESULTADOS DA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS.....	60
4.CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

Lista de Abreviaturas

ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos.
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
APPI-MS	Atmospheric Pressure Photo Ionization- Mass Spectrometry
Da	Daltons
EI-MS	Electron ionization –mass spectrometry
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
ESI-MS	Electrospray ionization-mass spectrometry
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization/ World Healthy Organization
FSTA	Food Science and Technology Abstracts
GC/MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
HPLC	High performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LC-MS	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
OTA	Ocratoxina A
PCA	Principal Compound Analysis
PIB	Produto Interno Bruto
PPG	Polipropileno glycol
SPE	Solid phase extraction
TLC	Thin Layer chromatography
UV	Ultra violeta

Lista de Tabelas

Tabela 1. Matriz de Planejamento (fatorial completo 2^3) – Otimização do sinal de m/z 426	26
Tabela 2. Fatores avaliados e níveis testados.	28
Tabela 3. Matriz de experimento com valores de A, B, C e D.	28
Tabela 4: Coeficientes de contraste de um planejamento 2^4	29
Tabela 5: Efeitos	29
Tabela 6. Limite de detecção e quantificação do padrão de OTA por MALDI-TOF... com secagem da matriz em temperatura ambiente.	34
Tabela 7. Limite de detecção e quantificação do padrão de OTA por MALDI-TOF... com secagem da matriz à vácuo.	35
Tabela 8. Métodos analíticos utilizados para determinação de ocratoxina A em alimentos.	39

Lista de Figuras

Introdução Geral	1
Figura 1. Esquema de funcionamento de um espectrômetro de massas.	2
Figura 2. Ionização por eletrospray: solução contendo moléculas protonadas é nebulizada através de um capilar onde é aplicado uma alta voltagem, formando gotículas carregadas. O solvente dessas gotículas carregadas é evaporado transferindo a molécula protonada para a fase gasosa.....	4
Figura 3. Ionização por MALDI: um pulso de laser atinge o alvo contendo as espécies de interesse misturada com a matriz, que vaporiza causando a dessorção da espécie protonada	5
Figura 4. Número de citações na FSTA (Food Science and Technology Abstracts) no período de 1990 a 1999 das técnicas espectrométricas mais utilizadas em ciências de alimentos.	7
Capítulo 1	8
Figura 1. Estruturas das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	15
Figura 2. Fórmula estrutural da ocratoxina A.	16
Figura 3. Sinal do branco contendo a matriz Et ₃ N.α-CHCA.	19
Figura 4. Espectro de massas obtido no MALDI-TOF utilizando o líquido iônico Et ₃ N.α-CHCA como matriz a) Quantidade equimolar de aflatoxinas em mistura de padrões de B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ (25 pg de cada analito); b) Quantidade equimolar de aflatoxinas em mistura de padrões de B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ (25 pg de cada analito) dopadas com 1.0 μL de solução de NaCl (10 mM); c) Amostra de amendoim contaminada com fungos produtores de aflatoxinas. Espectro de massas com alta exatidão obtido no MALDI-TOF.....	21
Figura 5. Espectro de massas obtido no MALDI-TOF utilizando o líquido iônico Et ₃ N.α-CHCA como matriz. a) padrão de ocratoxina A, sem aplicação de sódio ou potássio, sinal pouco intenso em relação ao ruído. b) padrão de ocratoxina A com aplicação de sódio, sinal intenso em m/z 426 em relação ao ruído. c) padrão de ocratoxina A com aplicação de potássio, sinal intenso em m/z 442 em relação ao ruído.	23

Figura 6. Espectro de massas obtido no MALDI-TOF utilizando o líquido iônico Et3N.α-CHCA como matriz com aplicações nas seguintes ordens: a) padrão de ocratoxina A (20ng) + NaCl + matriz. b) padrão de ocratoxina A (20ng) + matriz + NaCl, c) padrão de ocratoxina A (20ng) + KCl + matriz, d) padrão de ocratoxina A (20ng) + matriz + KCl.	24
Figura 7. Espectro de massas de amostras de café obtido no MALDI-TOF utilizando o líquido iônico Et3N.α-CHCA. a) amostra de café 1 com adição de solução de sódio. b) amostra de café 1 com adição de potássio. c) amostra de café 2 com adição de solução de sódio.	25
Figura 8. Superfície de resposta mostrando a influência dos fatores: concentração de NaCl, concentração da matriz e número de espectros acumulados.	27
Figura 9. Superfície de resposta mostrando a influência dos fatores: concentração de NaCl, concentração da matriz, tipo de matriz e tipo de aplicação.	31
Figura 10. Espectro de massas por MALDI-TOF da ocratoxina A. Sinais em preto massa de 10ng, sinais em vermelho massa de 1ng e sinais em verde sinais do DHB (matriz).....	31
Figura 11. Gráfico dos efeitos.	32
Figura 12. Gráfico de concentração versus intensidade para estudo do limite de detecção e quantificação do equipamento para padrão de Ocratoxina A utilizando como matriz o DHB seco a temperatura ambiente.....	35
Figura 13. Gráfico de concentração versus intensidade para estudo do limite de detecção e quantificação do equipamento para padrão de Ocratoxina A utilizando como matriz o DHB seco a vácuo.	36
Figura 14. Espectro de massas obtido no MALDI-TOF para amostra de café verde com aplicação de 6ppb de padrão de ocratoxina A, utilizando o DHB como matriz seco à vácuo.....	38
Capítulo 2	46
Figura 1. Representação da pirâmide olfativa.	48
Figura 2. ESI(+)-MS dos perfumes originais da marca Eternity em solução metanol:água (1:1).	52

Figura 3. ESI(+)-MS dos perfumes falsificados da marca Eternity em solução metanol:água (1:1).	52
Figura 4. ESI(+)-MS dos perfumes “inspirados” da fragrância da marca Eternity em solução metanol:água (1:1).	53
Figura 5. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes originais da marca Gabriela Sabatini em solução metanol:água (1:1).	54
Figura 6. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes falsificados da marca Gabriela Sabatini em solução metanol:água (1:1).	55
Figura 7. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes “inspirados” na fragrância da marca Gabriela Sabatini em solução metanol:água (1:1).	56
Figura 8. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes originais da marca Pólo Sport em solução metanol:água (1:1).	57
Figura 9. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes falsificados da marca Pólo Sport em solução metanol:água (1:1).	57
Figura 10. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes “inspirados” na fragrância da marca Pólo Sport em solução metanol:água (1:1).	58
Figura 11. PCA dos dados de ESI(+)-MS de três marcas diferentes de perfumes originais: Eternity, Gabriela Sabatini e Pólo Sport.	60
Figura 12. PCA dos dados de ESI(+)-MS para três categorias do perfume Eternity: original (O), falsificados (F) e “inspirados” (I).	62
Figura 13. Dendograma dos dados dos perfumes da marca Eternity nas categorias: original (C ₁ -C ₄), falso (C ₅ -C ₉) e “inspirados” (C ₁₀ -C ₁₂), obtido pelo método de Ward.	62
Figura 14. PCA dos dados de ESI(+)-MS para três categorias do perfume Gabriela Sabatini: original (O), falsificados (F) e “inspirados” (I).	63
Figura 15. Dendograma dos dados dos perfumes da marca Gabriela Sabatini nas categorias: original (C ₁ -C ₆), falso (C ₇ -C ₁₁) e “inspirados” (C ₁₂ -C ₁₄), obtido pelo método de Ward.	63
Figura 16. PCA dos dados de ESI(+)-MS para três categorias do perfume Pólo Sport: original (O), falsificados (F) e “inspirados” (I).	64

Figura 17. Dendograma dos dados dos perfumes da marca Polo Sport nas categorias: original (C1-C4), falso (C7-C9) e “inspirados” (C10), obtido pelo método de Ward..... 64

1. Introdução Geral

1.1. A Espectrometria de Massas

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molar de compostos eletricamente carregados, ou íons previamente formados.¹ Estes íons são selecionados de acordo com a razão massa-carga (m/z), sendo m a massa em u (massa atômica unificada), definida como 1/12 da massa de um átomo do isótopo de ^{12}C , o qual foi designado como 12 u por convenção.²

No esquema da Figura 1 é apresentado um diagrama da funcionalidade básica de um espectrômetro de massas. De acordo com esse esquema a análise de um composto em um espectrômetro de massas segue alguns passos: Introdução da amostra, ionização das moléculas, passagem por um analisador de massas que separa os íons formados de acordo com a razão m/z , detector que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica, onde a magnitude do sinal elétrico em função da m/z é convertida por um processador de dados proporcionando um espectro de massas correspondente.

As técnicas avançadas em espectrometria de massas diferem principalmente no modo de ionização das amostras. Essa característica permitiu o uso da técnica em muitas áreas, pois a análise de proteínas, peptídeos, açúcares etc, que antes não eram possíveis de serem detectados por técnicas antigas de ionização, como EI (*electron ionization*), agora são analisados rotineiramente.

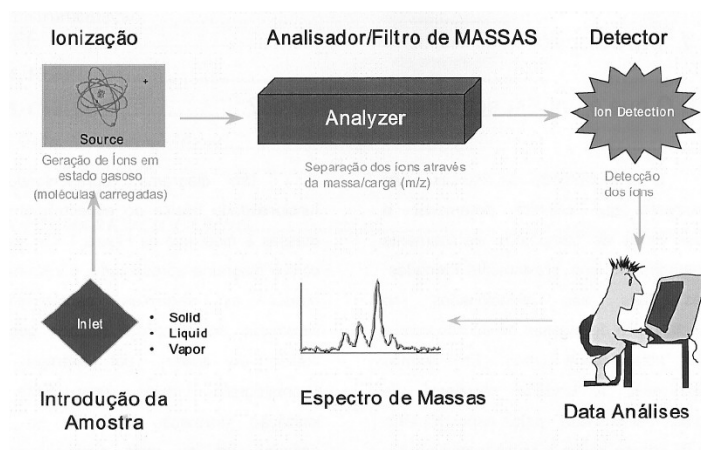


Figura 1. Esquema de funcionamento de um espectrômetro de massas. ³

1.2. A técnica Clássica de Ionização

A Ionização por Elétrons (EI), que é o método de ionização mais comum em espectrometria de massas, não só ioniza as moléculas pela retirada de um elétron, mas também transfere energia suficiente para que estas moléculas ionizadas se fragmentem. Como a massa e a intensidade relativa desses fragmentos são dependentes da estrutura da molécula, o espectro de massas torna possível a identificação de moléculas e fornece informações valiosas na elucidação estrutural de compostos desconhecidos. A grande facilidade de acoplamento de espectrômetros de massas com ionização EI com cromatógrafos gasosos torna a técnica ainda mais versátil, permitindo a análise e a quantificação de compostos em misturas relativamente complexas.

Em EI, no entanto, as substâncias precisam ser volatilizadas em alto vácuo na fonte de ionização. A maioria das moléculas orgânicas, de baixa massa (até 500 Da), possui uma pressão de vapor suficiente para serem analisadas, mas biomoléculas tais como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos não possuem estabilidade térmica suficiente para serem volatilizadas e, assim, não podem ser analisadas por EI-MS (*Electron Ionization Mass Spectrometry*). Esta

incompatibilidade limitou por muito tempo a utilização da técnica de espectrometria de massas em muitas áreas como alimentícia, farmacêutica, medicina, clínica, etc.

1.3. ESI e MALDI: As Novas Técnicas de Ionização

Com o surgimento de novas técnicas de ionização a partir da década de 80, a ionização por ESI-MS (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*)⁴ e a ionização por MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)⁵ – estendeu a espectrometria de massas à quase todos os tipos de moléculas. Tanto ESI como MALDI são técnicas brandas de ionização, o que resulta na formação de íons com baixa energia, tornando possível a ionização desde moléculas de baixa massa molecular até biomoléculas com massas de acima 1 milhão de Daltons.

Na ionização por electrospray no modo positivo, uma solução contendo a substância de interesse é acidificada, formando moléculas protonadas e os seus respectivos contra-ânions. Esta solução é então nebulizada através de um tubo capilar onde se aplica uma alta voltagem, como mostra a Figura 2.

Desse modo, os ânions presentes na solução serão neutralizados pelo capilar e as gotas formadas pela nebulização conterão excesso de cargas positivas (moléculas protonadas). O solvente presente nas gotículas é evaporado restando, assim, a molécula protonada na fase gasosa. Analogamente, pode-se utilizar uma solução básica e um potencial negativo no capilar para se produzir íons negativos. Entre as características da ionização por electrospray, pode-se citar a baixa energia dos íons formados e a possibilidade da formação de íons multicarregados (multiprotonados). A técnica de ESI foi desenvolvida por John Fenn et al ⁴ em 1984 recebendo o prêmio Nobel em Química no ano de 2002.

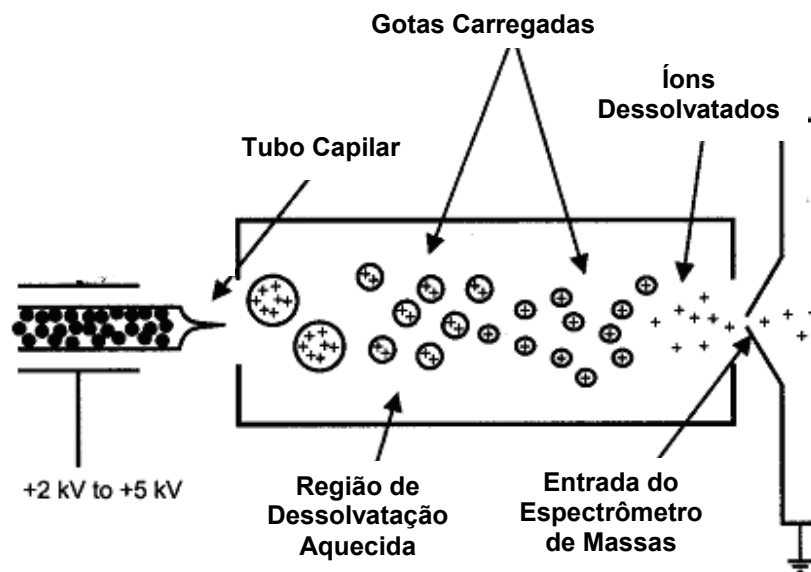


Figura 2. Ionização por eletrospray: solução contendo moléculas protonadas é nebulizada através de um capilar onde é aplicado uma alta voltagem, formando gotículas carregadas. O solvente dessas gotículas carregadas é evaporado transferindo a molécula protonada para a fase gasosa.¹

Na técnica de MALDI, introduzida por Hillenkamp et al.⁵ em 1985, a amostra contendo a espécie de interesse é misturada com uma matriz (geralmente um ácido orgânico aromático) formando uma “mistura sólida”. Um pulso de laser, com comprimento de onda próximo do UV, incide sobre essa mistura e a energia do laser é absorvida pela matriz, que tem o máximo de absorção perto do comprimento de onda do laser.

Desse modo, a matriz evapora e o analito que estava incluso na matriz, agora se encontra na fase gasosa altamente energética atribuída à excitação eletrônica da molécula da matriz ao absorver a energia do laser. A formação dos íons (ionização) ocorre através da transferência de carga (ex: transferência de prótons) das moléculas da matriz para o composto que fica na forma de MH^+ (Figura 3). Os íons formados recebem uma alta energia cinética inicial (K) que os impulsiona para o analisador de massas Time-of-flight (TOF), onde são separados de acordo com o tempo de voo, considerando a distância na qual o íon se movimenta até atingir o detector. Utilizando a equação da energia $K = mv^2/2$, onde

V é a velocidade do íon, calcula-se a massa molecular do composto. Os compostos são separados no analisador de acordo com sua razão m/z . Íons mais leves chegam mais rapidamente no detector, enquanto os íons mais pesados demoram mais tempo. No MALDI, o analisador de massas pode operar em dois modos: modo linear e modo reflectron. O modo linear é utilizado para moléculas de grande massa molecular, como as proteínas, peptídeos e polímeros e o modo reflectron utilizado para moléculas de massa de até 7000Da, como as micotoxinas. O modo reflectron possui a vantagem de apresentar uma maior resolução quando comparado ao modo linear, devido à presença de um conjunto de lentes com diferença de potencial crescente, propiciando o aumento de resolução.

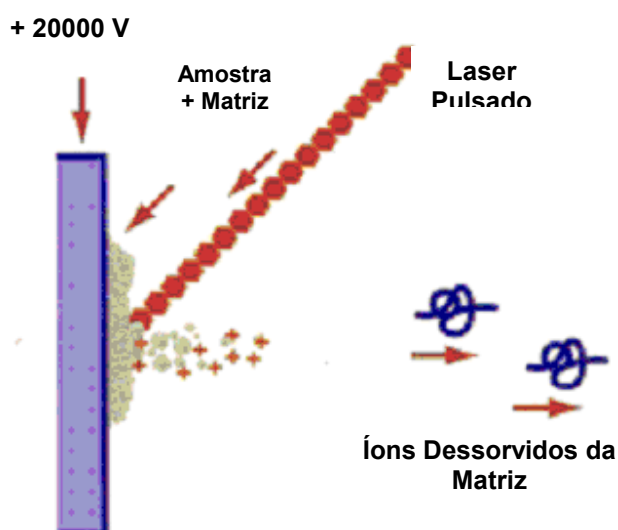


Figura 3. Ionização por MALDI: um pulso de laser atinge o alvo contendo a espécie de interesse misturada com a matriz, que vaporiza causando a desorção da espécie protonada.

Assim como em ESI, os íons gerados por MALDI têm uma energia muito baixa, mas em MALDI os íons formados possuem poucas cargas e na maioria das vezes formam-se somente espécies monocarregadas. Essa característica é interessante porque facilita a interpretação dos resultados dos espectros de massas, mesmo para compostos de alta massa molecular.

A introdução dos métodos de ionização ESI e MALDI no final da década de 80 causou uma verdadeira revolução na área da espectrometria de massas fazendo com que, hoje, ela seja empregada na análise de polímeros sintéticos, complexos organometálicos e compostos orgânicos de interesse ambiental. A maior expansão, no entanto, se deu em bioquímica, biologia molecular, petroquímica e vem crescendo na área de ciências de alimentos. Um levantamento⁶ mostra que em 2000, 65% dos espectrômetros de massas adquiridos recentemente são utilizados nas áreas de análise de fármacos e metabólitos, identificação de proteínas e análises clínicas. O gráfico da Figura 4 mostra o crescimento da técnica de espectrometria de massas na área de ciências de alimentos.⁷

O grande uso da espectrometria de massas em várias áreas científicas decorre de algumas características da técnica, tais como:

- 1) Detectabilidade – Quantidades muito pequenas de substâncias podem ser analisadas pelos métodos ESI e MALDI. Trabalhos recentes têm mostrado que a utilização de apenas 42 zeptomols (~25000 moléculas) do peptídeo P é suficiente para a sua detecção por MS.⁸
- 2) Volume de amostra – O uso de interfaces apropriadas para pequenos volumes, como as fontes de nanofluxo em ESI, permite que se use quantidade de amostras menores que 1 µL. Em MALDI, a quantidade pode ser ainda menor, e trabalhos têm relatado a utilização de apenas 50 nanolitros de amostra.⁸
- 3) Possibilidade de interfaceamento com técnicas de separação – a utilização de misturas água/solvente em ESI faz com que ela seja ideal para o acoplamento de sistemas de separação, tais como HPLC e eletroforese. A TLC (cromatografia em camada delgada), acoplada a técnica de MALDI foi testada em 2004 pelo grupo do Profº. Marcos Eberlin⁹. Nesse método aplica-se o líquido iônico (matriz) diretamente sobre a mancha que se quer analisar na placa de TLC, proporcionando uma análise rápida e com baixo ruído químico.

4) Tempo de análise – As análises por ESI e MALDI podem ser feitas em poucos segundos e essas características têm sido exploradas em projetos de larga escala, como os projetos de proteoma, onde se necessita identificar um grande número de proteínas.

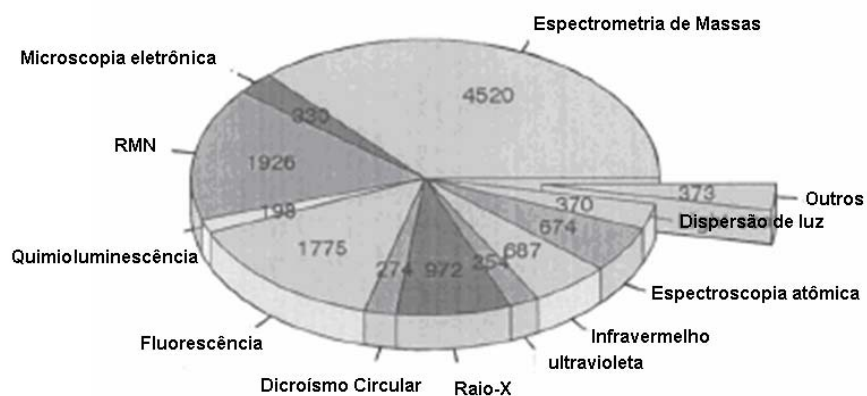


Figura 4. Número de citações na FSTA (Food Science and Technology Abstracts) no período de 1990 a 1999 das técnicas espectrométricas mais utilizadas em ciências de alimentos.⁷

Capítulo 1

Aplicação da Técnica MALDI-TOF na Identificação e Monitoramento de Micotoxinas em Alimentos

1. Introdução

1.1. Importância do Estudo

O agronegócio brasileiro movimentava 458 bilhões de reais por ano (um terço do PIB), gera 17,7 milhões de empregos (37% do total nacional), rende 30 bilhões de dólares em exportações (42% de tudo o que o Brasil vende lá fora), conforme dados apresentados em uma edição especial da revista *Veja* de abril de 2004.

A agricultura brasileira, junto com a pecuária, é uma das principais responsáveis pelo superávit da economia nacional, sendo o Brasil considerado o maior exportador de grãos do mundo. Na última safra se chegou ao recorde de 122,4 milhões de toneladas de grãos, com a soja correspondendo a 50% do peso nessa balança. Expandiram-se também as ofertas do milho e do trigo.

Objetivo do trabalho: face à importância no contexto de saúde pública e financeiro, torna-se necessário um controle da qualidade dos grãos, para identificação e monitoramento de possíveis compostos tóxicos e funcionais. Neste trabalho foi realizado o desenvolvimento de metodologia para caracterização de micotoxinas com objetivo de obtenção de método rápido e preciso para aplicação no monitoramento da qualidade de grãos.

É nesse aspecto que a técnica de espectrometria de massas atua como uma forte ferramenta na área de ciências de alimentos, por proporcionar resultados com alta precisão e confiabilidade garantindo assim uma maior vantagem competitiva dos produtos brasileiros frente ao mercado internacional, que está cada vez mais exigente em relação aos limites permitidos de toxinas em alimentos.

Foram estudadas as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e a ocratoxina A.

1.2 Micotoxinas

O termo micotoxina é originário de uma palavra grega *mykes* (fungo) e de uma palavra do latim *toxicum* (toxina). A expressão greco latina *mykes toxicum* significa toxina fúngica ou, como dizemos, micotoxina.

As micotoxinas podem ser encontradas em uma grande variedade de alimentos, por exemplo, cereais, grãos, especiarias, frutas secas, café, cerveja, vinho e, devido ao efeito acumulativo, podem ser encontrados também no leite, sangue de porco, fígado e rins e carne bovina de animais que se alimentaram com ração contaminada.¹⁰

As micotoxinas que ocorrem mais comumente são as aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), patulina, fumonisina, tricotecenos e zearaleras.¹¹ Dentre estas, as aflatoxinas são as micotoxinas mais frequentemente encontradas nos alimentos e são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Esses organismos se desenvolvem a uma temperatura ótima de 32-33°C, sendo encontrados preferencialmente em países tropicais. Não se sabe ao certo o quanto de cada aflatoxina (B1, B2, G1 e G2) é produzida pelas diferentes espécies de fungos. No trabalho de **Taniwaki et al (1993)** informa-se que embora todas as linhagens do *A. parasiticus* sejam produtoras de aflatoxinas, nem todas as linhagens do *A. flavus* são capazes de produzir. Informa-se também que a espécie *A. parasiticus* é a maior produtora de aflatoxina do que *A. flavus* e que todas as linhagens de *A. parasiticus* conhecidas são produtoras das 4 aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), enquanto que as linhagens de *A. flavus* na maioria das vezes produzem somente duas aflatoxinas B1 e B2.¹²

A ocratoxina A é produzida por dois tipos de fungos: *Aspergillus ochraceus* e o *Penicillium verrucosum*. A espécie *ochraceus* cresce em temperatura ótima de 31°C, enquanto que a espécie *verrucosum* cresce em temperatura ótima de 20°C. Dessa forma, a ocratoxina A produzida pela espécie *verrucosum* também pode ser encontrada em países temperados.¹³

A presença dessas micotoxinas em alimentos é considerada um risco a saúde pública, já que é comprovado que são carcinogênicas, teratogênicas,

nefrotóxicas e imunotóxicas. OTA está classificada como carcinogênica no grupo 2B pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*).¹⁴

Em países da Europa, níveis máximos de ocratoxina A de 5µg/kg em cereais crus, 3 µg/kg para produtos derivados de cereais para consumo direto e 1µg/kg para alimento destinado a população infantil tem sido sugerido como forma de orientação. A legislação brasileira não prevê níveis máximos dessa micotoxina, dificultando muitas vezes a entrada de produtos brasileiros, como por exemplo o café¹⁵, no mercado europeu.

As aflatoxinas são as únicas micotoxinas com níveis máximos em alimentos previstos na legislação brasileira. O Ministério da Saúde estabelece o limite de 30µg/kg para a aflatoxina B1 + aflatoxina G1 em alimentos de consumo humano. No amendoim, por exemplo, o nível máximo para aflatoxinas totais é de 20 µg/kg. Já na União Européia o limite máximo permitido nesse alimento é de 15 µg/kg.¹⁶ O Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabelece o limite de 20µg/kg de aflatoxinas totais em matérias-primas para rações. Este limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado pela FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization/ World Health Organization*).¹⁷

1.3. Técnicas Analíticas Utilizadas para Detecção de Micotoxinas

Tendo em vista a necessidade de detecção de níveis cada vez mais baixos dessas micotoxinas, várias técnicas analíticas são empregadas.

Os métodos utilizados atualmente para detecção de micotoxinas são baseados, principalmente, em técnicas como HPLC (High Performance Liquid Chromatography), TLC (thin layer chromatography) e ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay), embora GC/MS (gas chromatography mass spectrometry) também seja utilizado para análise de tricotecenos.¹¹ Dos métodos citados, apenas o ELISA é um método qualitativo, os outros são métodos quantitativos e semi-quantitativos (TLC).

Valenta (1998) utilizou a técnica de GC/MS para análise de ocratoxina A empregando derivação química, já que a OTA não é volátil. Porém, esta técnica não é realizada para análises de rotina, sendo apenas utilizada para confirmação da presença dessa micotoxina.¹⁸ GC/MS é muitas vezes realizado em conjunto com testes feitos por ELISA que podem dar resultados falsos positivos (devido a reações cruzadas) e o mais importante, resultados falso negativos, especialmente quando são analisados extratos de tecidos.

Os métodos analíticos oficiais disponíveis para a análise de micotoxinas em alimentos e derivados estão listados na AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*).¹⁹ **Gilbert et al (2002)** menciona uma lista dos métodos oficiais realizados em diversos tipos de matrizes para as aflatoxinas e também para outras micotoxinas, como a ocratoxina A.¹¹ Observa-se que a maioria dos métodos utilizados pela AOAC são realizados por HPLC com detecção por espectrofotometria na região do UV e por fluorescência.

Os limites de detecção e quantificação obtidos pela técnica de HPLC, utilizando variados métodos de extração e clean up, estão bem abaixo dos limites permitidos na legislação. Esses limites estão apresentados na tabela 8 (pág 39) em diversos tipos de matrizes. No trabalho de **Ueno et al (1997)**,²⁰ por exemplo, se alcançou um limite de detecção de 0,003 µg/kg para amostra de café, sendo que o limite máximo permitido de ocratoxina na união europeia para esse produto é de 3 µg/kg.

Trabalhos recentes utilizam técnicas avançadas de espectrometria de massas acopladas com cromatografia líquida (LC-MS). **Takino et al (2004)** compara em seu trabalho interfaces como ESI (*electrospray ionization*) e APPI (*atmospheric pressure photo-ionization*) na análise de aflatoxinas.²¹ Os trabalhos de **Krska et al (2005)** e **Monaci et al (2004)** relatam que a área promissora para a análise de multi micotoxinas será a espectrometria de massas.^{22,23}

Este trabalho é o primeiro a utilizar a técnica de ionização por MALDI no screening de amostras contaminadas por micotoxinas de baixo peso molecular.

A vantagem da utilização da técnica MALDI sobre o ESI, além do custo menor, é a possibilidade de execução de 96 análises simultâneas. A técnica porém apresenta dificuldade ao se trabalhar em baixa escala de *m/z* devido ao ruído químico muito intenso dos íons da matriz.

Para contornar esse problema procurou-se minimizar o ruído utilizando-se como matriz, um líquido iônico, que absorve energia na região do UV.^{24,25} O líquido iônico é facilmente preparado e tem muitas propriedades bem aplicáveis ao MALDI, entre as quais se incluem a habilidade de dissolver substâncias orgânicas, inorgânicas e polímeros. Possui boa estabilidade térmica e baixas pressões de vapor.

O estudo pioneiro utilizando líquidos iônicos como matriz em MALDI foi realizado por **Gross et. al. (2001)**²⁴. Um trabalho posterior realizado no laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, por **Santos et al (2004)**, utilizou os líquidos iônicos como matriz no MALDI para a seleção rápida de fármacos de baixos pesos moleculares e vem demonstrando grande eficiência.⁹ Artigos recentes na literatura, já utilizam o MALDI-TOF na análise de moléculas de baixa massa molecular com $m/z < 500\text{Da}$, na detecção de misturas de antibióticos e fármacos.^{26,27} **Lee et al (2004)** detectou moléculas de baixa massa molecular utilizando derivação de cargas com reagentes isotopicamente marcados, ou seja, adição de outra molécula que aumenta a massa molecular da molécula de baixa massa molecular aumentando, assim, sua sensibilidade.²⁷

As análises de MALDI depois de otimizadas são realizadas em menos de trinta segundos, sendo ideais para análises de confirmação de micotoxinas, dispensando o uso do GC/MS onde cada corrida dura em média vinte minutos.

À primeira vista o equipamento de MALDI -TOF é considerado com preço elevado chegando a um valor de US\$250.000,00. No entanto, a razão custo/benefício é favorável, pois podem ser realizados 96 ensaios em uma só placa de MALDI, podendo ser um procedimento automatizado com ensaios rápidos e sensíveis.

Comparando o MALDI com a técnica ELISA, por exemplo, os ensaios no MALDI saem mais barato, pois cada kit ELISA custa em média US\$379,00 e são realizados apenas 25 ensaios por kit (Romer Lab Inc).

Atualmente, o MALDI é mais utilizado em análises de biomoléculas como proteínas e peptídeos, mas recentemente a técnica vem crescendo na análise de moléculas de baixa massa molecular ou sendo empregada em análises de injeção diretas e estudos de imagem para prospecção de moléculas.^{28,29}

A tendência futura quando a técnica se tornar mais difundida em áreas como a ciências de alimentos é de que se torne cada vez mais aplicada em análises de rotina. Exemplos de sucesso feitos pelo MALDI foi o screening de vinhos na caracterização de antocianinas, apresentando ótimos resultados na comparação destas amostras.³⁰

1.4. Características Químicas das Micotoxinas Estudadas

1.4.1. Aflatoxina ³¹

Informações Gerais:

São 4 tipos de Aflatoxinas estudadas nesse trabalho. B1, B2, G1 e G2. Elas possuem essas notações porque diferem em relação à coloração quando submetidas à luz UV. As aflatoxinas B1 e B2 possuem coloração azul (blue) e as aflatoxinas G1 e G2 possuem coloração verde (green). A estrutura química do grupo das aflatoxinas é caracterizada pela ligação de dihidrofurano ou tetrahydrofurano a uma estrutura cumarínica (Figura 1).

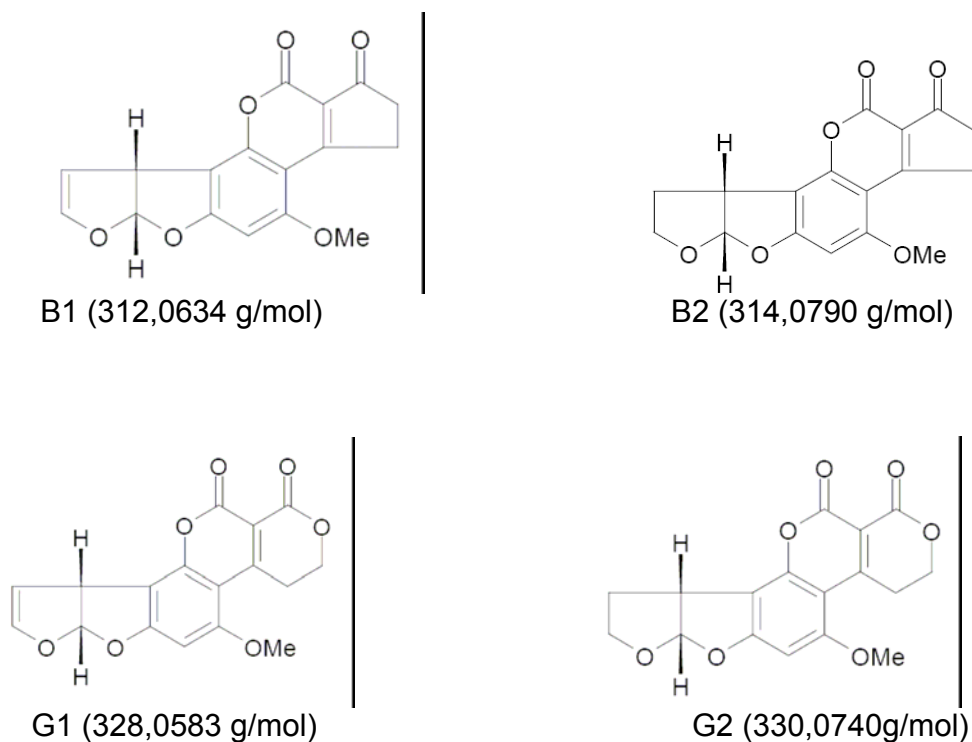


Figura 1. Estruturas das Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

1.4.2. Ocratoxina A ³¹

Informações Gerais:

A ocratoxina A ((R)-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-L-phenylalanine) é derivada de uma isocumarina ligada a L-fenilalanina, e a sua estrutura e a sua massa molecular exata está apresentada na Figura 2.

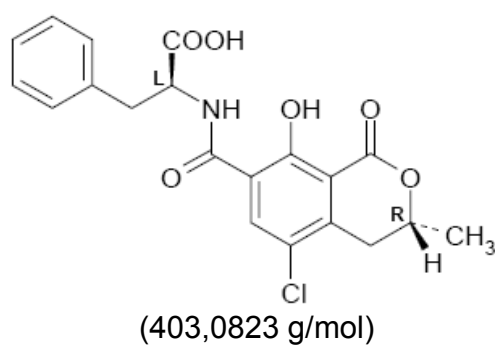


Figura 2. Fórmula estrutural da ocratoxina A.

2. Parte Experimental

2.1. Materiais e Métodos

2.1.1. Aflatoxina

A matriz de Et₃N.α-CHCA (líquido iônico) foi preparada adicionando 1 mmol do ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em 40ml de acetonitrila (previamente destilada sobre atmosfera de argônio) e nessa solução adicionar de uma só vez 1,05 mmol de trietilamina (previamente destilada em atmosfera de argônio). Deixar essa solução por 2 horas em banho de óleo mineral a uma temperatura de 90-100°C. O solvente é então removido sob baixa pressão e o produto obtido é deixado em alta vácuo por 4 horas para secagem. Do produto seco é preparada uma solução de 1% dissolvendo-o numa quantidade de acetronila apropriada. Os padrões das aflatoxinas foram adquiridos da Sigma. As amostras reais foram obtidas pela ESALQ a partir de extração de amostra de amendoins contaminados deliberadamente com o *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus parasiticus*.

A amostra de amendoim foi homogeneizada e triturada. Pesou-se 50,0 g para a extração e adicionou-se cerca de 270 mL de MeOH seguidos por 30,0 mL de KCl (solução aquosa de 4%). A mistura foi agitada por 5 minutos e depois filtrada. Uma alíquota de 150 mL do extrato total foi transferida para um bequer seguido pela adição de 150 g de óxido de magnésio, 10g de sulfato de cobre, e 150 mL de água. A mistura foi extraída com clorofórmio (2 x 10 mL), e concentrado sob vácuo com redução do volume em 10 vezes.³²

O espectrômetro de massas utilizado foi o MALDI-TOF adquirido da Micromass (Manchester, Inglaterra). Utilizou-se o modo reflectron e modo positivo de aquisição de íons. Os parâmetros para utilização do equipamento foram: tensão de pulso 2450 V e tensão do reflectron de 2 kV.

2.1.2. Ocratoxina A

Utilizou-se a mesma matriz usada nos experimentos para caracterização das aflatoxinas. O líquido iônico foi preparado a partir de uma solução de trietilamina com solução do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico com acetonitrila. O padrão de ocratoxina foi obtido da Sigma. As amostras reais de café torrado e moído foram obtidas pelo Laboratório de Micotoxinas do Instituto Octávio Magalhães em Belo Horizonte e as amostras de café verde foram obtidas pelo ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos). Para extração pesou-se 25g de amostra de café, adicionou-se 200mL de MeOH – a solução 3% de bicarbonato de sódio (1+1). Agitou-se por 30min. Filtrou-se em papel de filtro “glass microfiber filter” 100PK. Uma alíquota de 4mL foi diluída em 100mL de tampão fosfato em pH 7. Um volume de 100mL dessa solução foi passado pela coluna de imunoafinidade da marca Vican. A ocratoxina aderida na coluna é eluída com 4mL de metanol.³³

O espectrômetro de massas utilizado foi o MALDI-TOF adquirido da Micromass. Utilizou-se o modo reflectron e modo positivo de aquisição de íons. Em cada spot da placa de MALDI foi adicionado 2 μ L, correspondendo a 20ng de amostra de padrão e para as amostras reais adicionou-se 3 μ L. Os parâmetros para utilização do equipamento foram: tensão de pulso 2600 V e tensão do reflectron de 2 kV.

3. Resultados e Discussão

3.1. Aflatoxina

Para avaliar o ruído da matriz particularmente na escala de m/z em que os íons da aflatoxina devem ser detectados, foi adquirido um espectro de massas somente com a matriz Et₃N.α-CHCA (Figura 3) que denomina-se como branco. Apenas um único íon da matriz é detectado, isto é, Et₃NH⁺ de m/z 102, que claramente não interferiu na detecção das aflatoxinas.

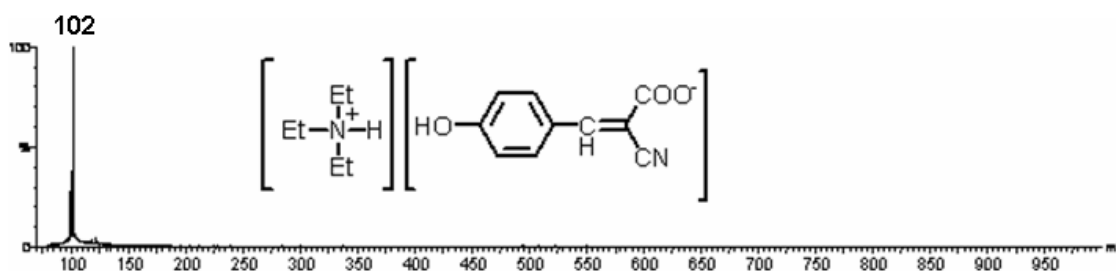


Figura 3. Sinal do branco contendo a matriz Et₃N.α-CHCA.

3.1.1 Otimização da detecção de aflatoxina

O espectro de massas de MALDI-TOF foi executado então para uma mistura equimolar de quatro aflatoxinas padrão: B1 (312 Da), B2 (314 Da), G1 (328 Da) e G2 (330 Da). Quando o espectro de massas foi adquirido sem a adição da matriz, nenhum íon do analito pode ser detectado. Quando adicionou-se a matriz juntamente com as aflatoxinas (Figura 4a), observou-se os íons principais detectados no espectro de massas correspondendo a cationização com Na⁺ e K⁺ das quatro aflatoxinas, isto é, aos íons dos adutos de m/z 335 para [B1 + Na]⁺; m/z 337 para [B2 + Na]⁺; m/z 351 para [B1 + K]⁺ e [G1 + Na]⁺, m/z 353 para [B2 + K]⁺ e [G2 + Na]⁺, m/z 367 para [G1 + K]⁺ e m/z 369 para [G2 + K]⁺. Observou-se então uma mistura de adutos de Na⁺ e de K⁺ e as interferências isobáricas para os íons das aflatoxinas de m/z 351 e 353.

Para eliminar esta interferência, foi feita uma adição de diferentes soluções de sal em cada spot da placa de MALDI que contém a mistura da aflatoxina e a matriz líquido iônico. Nessa adição esperou-se obter uma única detecção do íon para cada aflatoxina através do favorecimento da cationização, que eliminaria as interferências isobáricas.

Os cátions testados foram K^+ (solução de KCl), Ag^+ (solução de AgCl), Zn^{2+} (solução de $ZnCl_2$), e Na^+ (solução de NaCl). Os melhores resultados foram obtidos com a adição de NaCl (Figura 4b); isto é, o aduto de Na^+ foi observado para cada aflatoxina, ou seja, os íons m/z 335 para $[B1 + Na]^+$, m/z 337 para $[B2 + Na]^+$, m/z 351 para $[G1 + Na]^+$ e m/z 353 para $[G2 + Na]^+$. Neste experimento uma mistura equimolar foi utilizada, indicando escalas dinâmicas similares para a quantificação de cada uma das quatro aflatoxinas.

3.1.2 Screening de aflatoxinas nos amendoins

Depois do protocolo otimizado para a extração da aflatoxina e injeção no MALDI-TOF, amostras de amendoins contaminados com o *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus parasiticus* foram analisadas.

O analisador de massas TOF foi calibrado para que as medidas de alta exatidão m/z fossem realizadas, melhorando assim a seletividade. Com essa calibração, o espectro de alta exatidão das aflatoxinas foi obtido conforme apresentado na Figura 4c, que ilustra as quatro aflatoxinas que foram detectadas com um único aduto de Na^+ : aflatoxina B1 (m/z 335.0484, cald. m/z 335.0532), B2 (m/z 337.0618, cald. m/z 337.0688), G1 (m/z 351.0459, cald. m/z 351.0481), e G2 (m/z 353.0604, cald. m/z 353.0637).

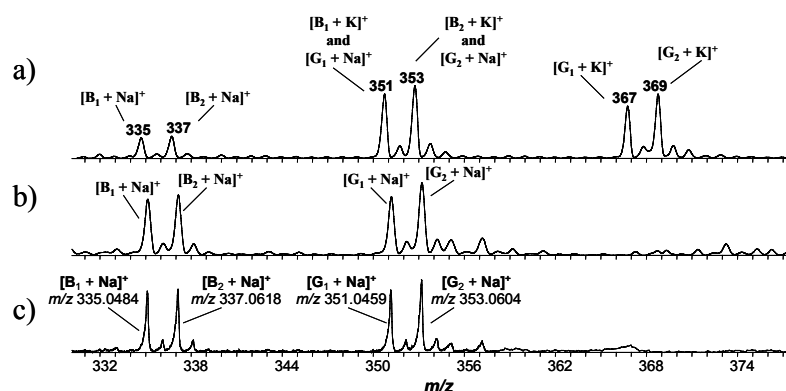


Figura 4. Espectro de massas obtido no MALDI-TOF utilizando o líquido iônico Et3N.α-CHCA como matriz a) Quantidade equimolar de aflatoxinas em mistura de padrões de B₁, B₂, G₁ e G₂ (25 pg de cada analito); b) Quantidade equimolar de aflatoxinas em mistura de padrões de B₁, B₂, G₁ e G₂ (25 pg de cada analito) dopadas com 1.0 µL de solução de NaCl (10 mM); c) Amostra de amendoim contaminada com fungos produtores de aflatoxinas. Espectro de massas com alta exatidão obtido no MALDI-TOF.

3.2. Ocratoxina A

3.2.1 Otimização da detecção de ocratoxina A

O mesmo líquido iônico, apresentado nos experimentos das aflatoxinas, foi utilizado na detecção de ocratoxina, obtendo-se um espectro limpo de único íon m/z 102, como aquele apresentado na Figura 3. Nessa faixa de massa também não ocorreu interferência com a ocratoxina A de m/z 404.

Ensaio foram realizados inicialmente com o padrão de ocratoxina A para otimizar as condições experimentais. A Figura 5a apresenta o espectro de massas do padrão de ocratoxina A e a matriz. Observa-se que o sinal da micotoxina sodiada m/z 426 ficou pouco intenso e a razão sinal/ruído ficou muito baixa, isto é, um alto ruído dificultando a detecção. Para melhorar o sinal do íon alguns sais foram adicionados. O espectro de massas da Figura 5b e Figura 5c corresponde a ocratoxina A com sódio $[M + Na]^+$ de m/z 426 e potássio $[M + K]^+$ m/z 442,

respectivamente. Um aumento da intensidade do sinal foi então observado em ambos os espectros.

As formas de aplicação desses sais também foram testadas. Aplicou-se inicialmente o padrão de ocratoxina, variando-se a ordem de aplicação da matriz (líquido iônico) e da solução do sal (KCl ou NaCl 10mM). Nas Figuras 6b e 6d são apresentados os espectros de massas do padrão de ocratoxina com aplicação da matriz antes da adição da solução dos sais (NaCl e KCl), notando-se assim que a adição dos sais após a aplicação da matriz não contribuía para melhorias da intensidade do sinal do espectro, mostrando que há interferência da ordem de adição matriz/sal.

Já nos espectros de massas apresentados nas Figuras 6a e 6c onde a aplicação dos sais foi após a aplicação do padrão, obteve-se espectros com maior razão sinal/ruído e, portanto maior intensidade do sinal do íon de m/z 426 [OTA+Na]⁺ e m/z 442 [OTA + K]⁺. A massa aplicada desse padrão nos spots da placa do MALDI está na ordem de 20ng.

A solução de sal escolhida para o método foi a solução de NaCl, porque esse cátion já provém do método de extração de ocratoxina por meio da adição de solução 3% de bicarbonato de sódio (item 2.1.2).

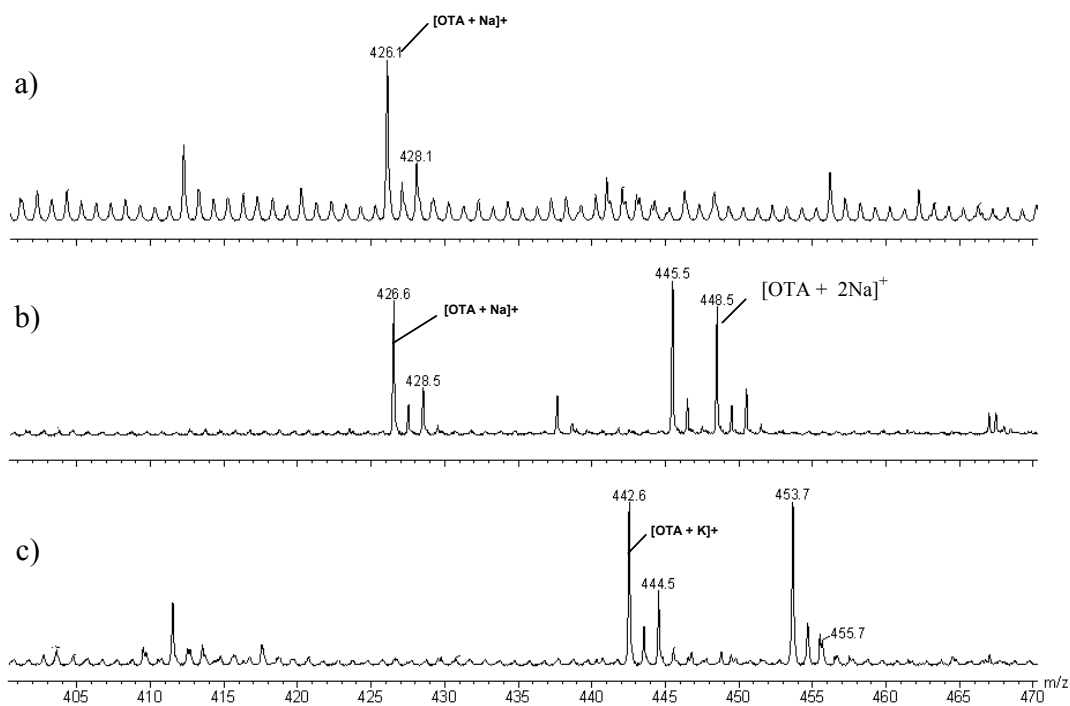


Figura 5. Espectro de massas obtido no MALDI-TOF utilizando o liquido iônico Et3N.α-CHCA como matriz. a) padrão de ocratoxina A, sem aplicação de sódio ou potássio, sinal pouco intenso em relação ao ruído. b) padrão de ocratoxina A com aplicação de sódio, sinal intenso em m/z 426 em relação ao ruído. c) padrão de ocratoxina A com aplicação de potássio, sinal intenso em m/z 442 em relação ao ruído.

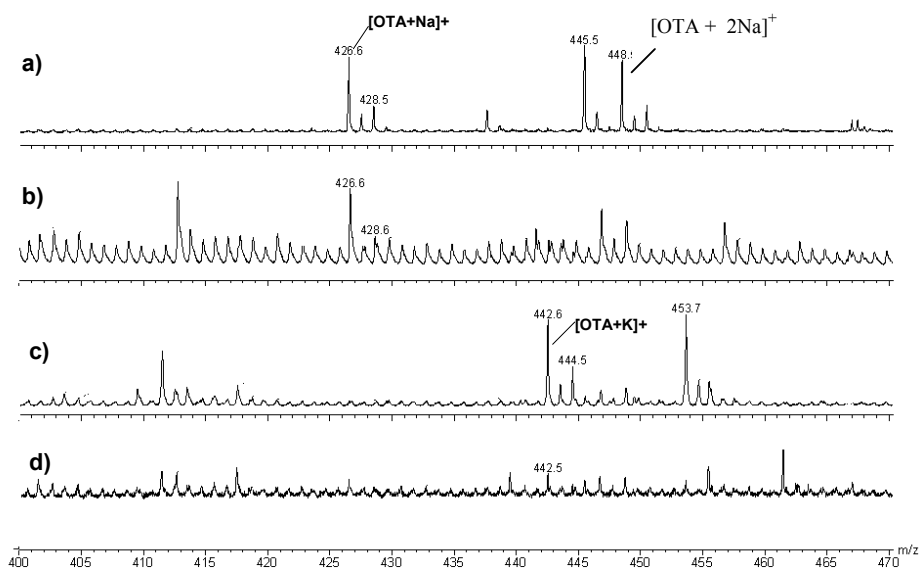


Figura 6. Espectro de massas obtido no MALDI-TOF utilizando o líquido iônico Et3N.α-CHCA como matriz com aplicações nas seguintes ordens: a) padrão de ocratoxina A (20ng) + NaCl + matriz. b) padrão de ocratoxina A (20ng) + matriz + NaCl, c) padrão de ocratoxina A (20ng) + KCl + matriz, d) padrão de ocratoxina A (20ng) + matriz + KCl.

3.2.2. Screening da Ocratoxina A nas amostras de café torrado e moído

As condições estabelecidas utilizando-se o padrão de ocratoxina foram utilizadas em amostras reais de café torrado e moído obtendo-se os resultados apresentados na Figura 7. Os sinais correspondentes aos compostos $[OTA+Na]^+$ de m/z 426 e $[OTA + K]^+$ de m/z 442 não foram observados.

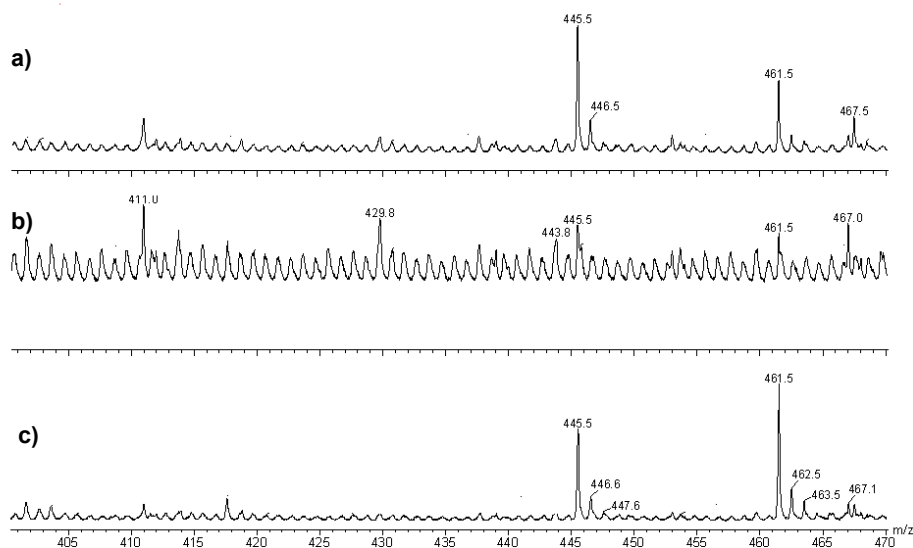


Figura 7. Espectro de massas de amostras de café obtido no MALDI-TOF utilizando o líquido iônico Et₃N.α-CHCA. a) amostra de café 1 com adição de solução de sódio. b) amostra de café 1 com adição de potássio. c) amostra de café 2 com adição de solução de sódio.

Esse efeito é provavelmente resultante da supressão iônica, ou efeito de matriz, efeito este observado principalmente quando se trabalha com matrizes complexas que apresentem algum íon que protone mais facilmente que o íon de interesse gerando, portanto, um sinal muito mais intenso.

3.2.3. Aplicação de Planejamento de Experimento

Depois de observado os espectros de massas das amostras, para os quais não se obteve nenhum sucesso, devido a não detecção do sinal da ocratoxina A, foi feito um planejamento de experimento para observar se todos os fatores aplicados, por exemplo: a concentração do sal, concentração da matriz e o número de espectros acumulados por análise poderiam ser otimizados. Para isso foi aplicado um planejamento de experimento (fatorial completo 2³) avaliando os seguintes efeitos com os respectivos níveis: concentração do NaCl (1mM a 10mM), concentração do líquido iônico (0,1% a 1%), e número de espectros acumulados (0,5min a 1,5min). Os resultados obtidos estão na Tabela 1, que

mostra a matriz de planejamento, com as respostas das intensidades do íon de m/z 426 $[\text{OTA}+\text{Na}]^+$ obtidas para cada diferente situação das combinações possíveis.

Tabela 1. Matriz de Planejamento (fatorial completo 2^3) – Otimização do sinal de m/z 426

Experimento	Conc. Sal	Conc. matriz	n° pulsos	Intensidade
1	-1	-1	-1	420
2	-1	-1	-1	345
3	1	-1	-1	374
4	1	-1	-1	435
5	-1	1	-1	501
6	-1	1	-1	508
7	1	1	-1	404
8	1	1	-1	403
9	-1	-1	1	1170
10	-1	-1	1	1060
11	1	-1	1	1230
12	1	-1	1	1170
13	-1	1	1	1428
14	-1	1	1	1350
15	1	1	1	1780
16	1	1	1	1630
17	0	0	0	904
18	0	0	0	898
19	0	0	0	858

Calcularam-se os efeitos usando o produto $X^t y$, onde X^t é a matriz transposta e y a média das replicatas.³⁴

Os resultados obtidos, podem ser melhor visualizados por intermédio do gráfico de superfície de resposta, apresentado na Figura 8. Observa-se que 4 respostas apresentaram maiores intensidades para o íon de m/z 426. Uma dessas respostas apresentou os parâmetros utilizados nos espectros de massas

anteriores: concentração do sal de 10mM, concentração da matriz de 1% e acumulo de espectros de 1,5min.

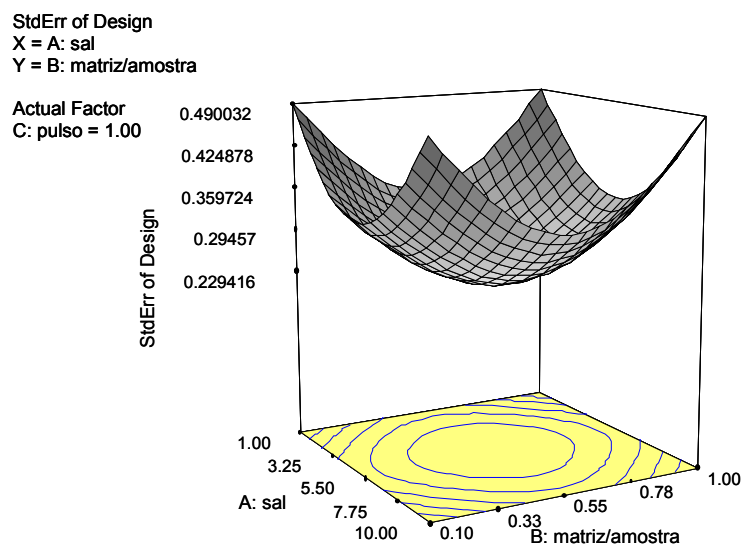


Figura 8. Superfície de resposta mostrando a influência dos fatores: concentração de NaCl, concentração da matriz e número de espectros acumulados.

Esse primeiro planejamento de experimento (fatorial 2^3) mostrou que outros fatores deveriam ser investigados, tais como novas matrizes e forma de aplicação. Dessa forma, um planejamento de experimento (fatorial completo 2^4) foi realizado. Nesse planejamento foram investigados 4 fatores como outros tipos de matrizes (alfa ciano e DHB (ácido dihidroxibenzoico)), concentração do sal, concentração da matriz e a forma de aplicação dos compostos na placa de MALDI. Foram investigadas duas formas de aplicação: sanduíche e normal. Na aplicação sanduíche aplica-se matriz, amostra, o sal e novamente a matriz, sempre esperando a secagem entre cada aplicação. No modo normal, não se aplica a matriz antes da amostra. Os níveis avaliados para os fatores estudados estão descritos na Tabela 2 e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Fatores avaliados e níveis testados.

Efeito	Nível (+)	Nível (-)
A-Conc. Sal (NaCl)(mM)	10	1
B-Conc. Matriz (%v/v)	1	0,1
C-Tipo de Matriz	Alfa ciano	DHB
D-Tipo de Aplicação	sanduíche	normal

Tabela 3. Matriz de experimento com valores de A, B, C e D.

Experimento	A: Conc. Sal (mM)	B: Conc. Matriz (mM)	C: Tipo de matriz	D: Tipo de Aplicação	Resposta: Intensidade m/z 426
1	1	0,1	DHB	normal	4620
2	10	0,1	DHB	normal	1860
3	1	1	DHB	normal	2190
4	10	1	DHB	normal	4500
5	1	0,1	Alfa ciano	normal	1120
6	10	0,1	Alfa ciano	normal	1370
7	1	1	Alfa ciano	normal	984
8	10	1	Alfa ciano	normal	2010
9	1	0,1	DHB	sanduíche	5030
10	10	0,1	DHB	sanduíche	2690
11	1	1	DHB	sanduíche	2130
12	10	1	DHB	sanduíche	4970
13	1	0,1	Alfa ciano	sanduíche	1270
14	10	0,1	Alfa ciano	sanduíche	1060
15	1	1	Alfa ciano	sanduíche	1710
16	10	1	Alfa ciano	sanduíche	3070
17	5,5	5,5	DHB	normal	1300
18	5,5	5,5	alfaciano	normal	944
19	5,5	5,5	DHB	sanduíche	1380
20	5,5	5,5	Alfa ciano	sanduíche	1230
21	5,5	5,5	DHB	normal	2340
22	5,5	5,5	Alfa ciano	normal	2060
23	5,5	5,5	DHB	sanduíche	3370
24	5,5	5,5	alfaciano	sanduíche	1430
25	5,5	5,5	DHB	normal	3370
26	5,5	5,5	alfaciano	normal	1320
27	5,5	5,5	DHB	sanduíche	4820
28	5,5	5,5	alfaciano	sanduíche	1510

O cálculo dos efeitos foi obtido multiplicando-se elemento a elemento as colunas da matriz de planejamento. Os coeficientes de contraste utilizados estão na Tabela 4 e os efeitos na Tabela 5.

Tabela 4: Coeficientes de contraste de um planejamento 2^4

M	A	B	C	D	AB	AC	AD	BC	BD	CD	ABC	ABD	ACD	BCD	ABCD
1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1
1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1
1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1
1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1
1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Onde: A: *Conc. Sal* B: *Conc. Matriz*, C: *Tipo de matriz*, D: *Tipo de aplicação*

Transformando a Tabela 4 numa matriz X de elementos +1 e -1, poderemos calcular todos os efeitos, fazendo o produto $X^t y$, onde y é a média das replicatas. O divisor para média é 16 e para os efeitos é 8. Os resultados estão na Tabela 5

Tabela 5: Efeitos

Média	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
2536,50	309,50	318,0	-1677,28	1568,50	297,0	420,20	988,0

A equação geral do modelo estatístico de um planejamento fatorial 2^4 é:

$$Y(A,B,C) = b_0 + b_a A + b_b B + b_c C + b_{ab} AB + b_{ac} AC + b_{bc} BC + b_{abc} ABC$$

ou multiplicando por $\frac{1}{2}$ já que os valores dos coeficientes do modelo são sempre a metade dos valores dos efeitos:

$$Y(A,B,C) = 2536,50 - 154,75 A + 159 B - 838,64 C + 787,25 AB + 148,50 AC + 210,25 BC - 494 ABC$$

Os resultados obtidos podem ser melhor visualizados por intermédio do gráfico de superfície de resposta, apresentado na Figura 9. Observa-se que 4 respostas proporcionaram maiores intensidades para o íon de m/z 426. A matriz que mostrou um aumento da intensidade de m/z 426 foi o ácido dihidroxibenzoico (DHB), utilizando os seguintes pares de parâmetros de concentração do sal e matriz: 10mM e 1% ou 1mM e 0,1%. Observa-se que a importância dos parâmetros não está na sua concentração e sim na razão sal/matriz de 10:1. O espectro de massas obtido para o padrão de ocratoxina A utilizando as condições ótimas obtidas pelo planejamento de experimento está apresentando na Figura 10. Observa-se que utilizando a matriz DHB favoreceu a ionização da molécula de ocratoxina protonada de m/z 404 e também da molécula com aduto de sódio de m/z 426.

O gráfico da Figura 11 mostra a interação dos efeitos observados, nota-se que o efeito que mais influencia na intensidade do íon de m/z 426 é o tipo de matriz. Essa observação já era esperada, já que a matriz é importante na ionização do analito.

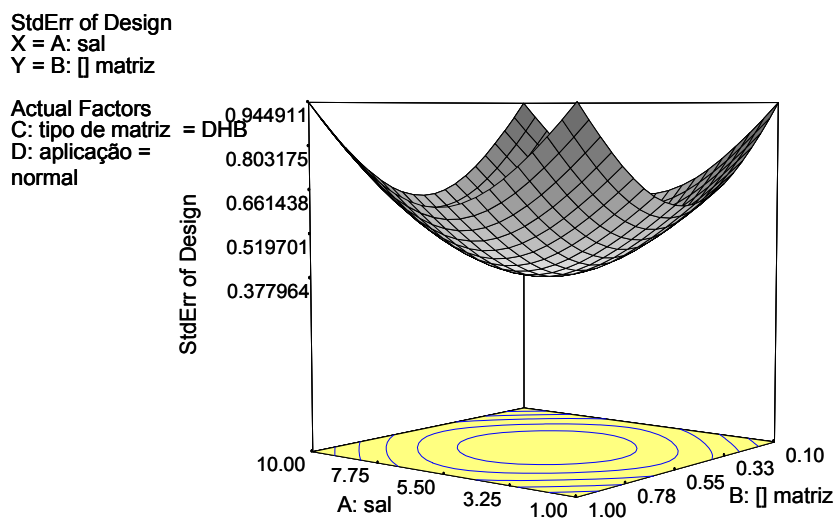


Figura 9. Superfície de resposta mostrando a influência dos fatores: concentração de NaCl, concentração da matriz, tipo de matriz e tipo de aplicação.

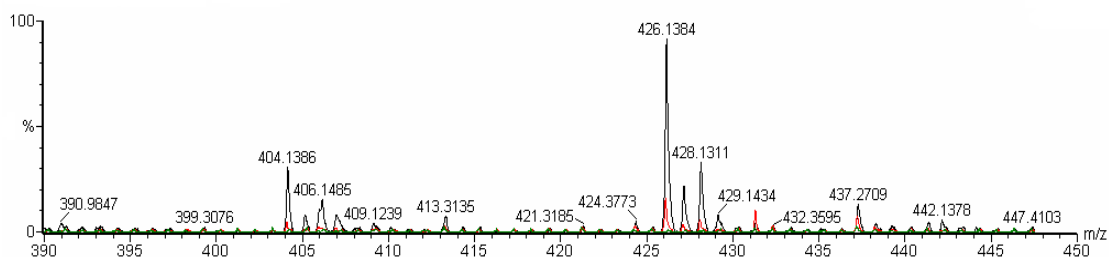


Figura 10. Espectro de massas por MALDI-TOF da ocratoxina A. Sinais em preto massa de 10ng, sinais em vermelho massa de 1ng e sinais em verde sinais do DHB (matriz).

DESIGN-EXPERT Plot
Intensidade

A: sal
B: [] matriz
C: tipo de matriz
D: aplicação

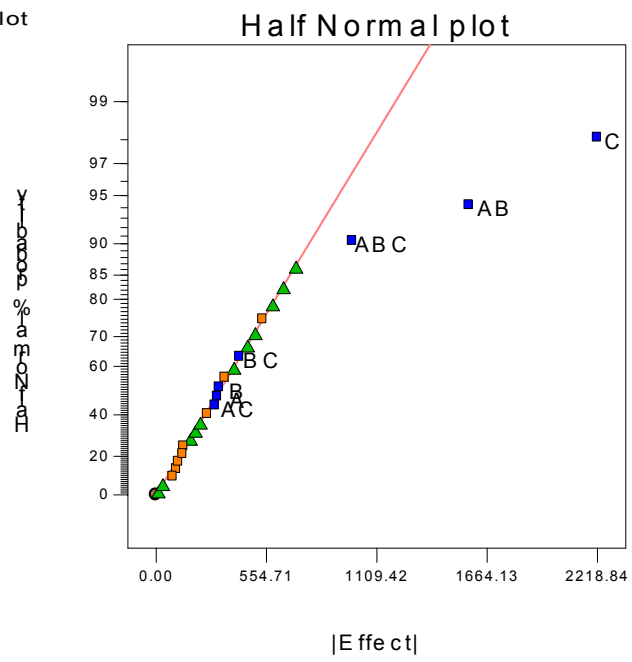


Figura 11. Gráfico dos efeitos.

3.2.4 Cálculo do Limite de Detecção e Limite de Quantificação do Equipamento Utilizando Condições Ótimas Obtidas pelo Planejamento de Experimento.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos por meio das equações:

$$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{S}$$

$$LQ = 10 \cdot \frac{s}{S}$$

Onde: s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação, e a sensibilidade (S) é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica.³⁵

Foram realizadas duas curvas de calibração, variando a secagem da matriz (DHB), em temperatura ambiente e à vácuo. Foram testados dois tipos de secagem porque o DHB quando seco em temperatura ambiente não apresenta cristalização homogênea, o que acarreta em: pouca formação de adutos, cristalização heterogênea ocorrendo variação de spot a spot. Quando o DHB é seco à vácuo a cristalização é homogênea, fácil para automação e ocorre o favorecimento dos adutos de sais.^{36,37} Na tabela 6 estão apresentados os resultados do limite de detecção e quantificação, obtido pela curva de calibração do padrão de OTA na matriz DHB seca em temperatura ambiente. Nota-se que os desvios padrões entre as triplicatas se apresentam bastante altos em comparação com a tabela 7, na qual estão apresentados os resultados do limite de detecção e quantificação, obtido pela curva de calibração do padrão de OTA na matriz DHB seca à vácuo, confirmando-se portanto a característica da cristalização homogênea quando o DHB é seco a vácuo. Os limites de detecção e quantificação obtidos a partir da curva de calibração do padrão de OTA na matriz DHB seca em temperatura ambiente foram respectivamente: 1,9ppb e 5,7ppb, os quais foram obtidos através da curva de calibração apresentada na Figura 12,

apresentando um coeficiente de correlação de 0,9857. Na tabela 7 estão apresentados os resultados dos limites de detecção e quantificação, obtido pela curva de calibração do padrão de OTA na matriz DHB seca à vácuo que foram respectivamente de 1,0 ppb e 3,0 ppb. Os limites de detecção e quantificação foram obtidos através da curva de calibração apresentada na Figura 13, apresentando um coeficiente de correlação de 0,9857.

As duas curvas de calibração apresentaram bons coeficientes de correlação, no entanto os resultados de LD e LQ obtidos pela curva de calibração do padrão de OTA na matriz DHB seca à vácuo apresentaram melhores resultados em relação ao LD e LQ na matriz seca a temperatura ambiente e apresentou também baixa variação entre as triplicatas nos diferentes níveis de concentração indicado pelo desvio padrão. Dessa forma os experimentos aplicados às amostras serão realizados com a secagem da matriz a vácuo.

Tabela 6. Limite de detecção e quantificação do padrão de OTA por MALDI-TOF com secagem da matriz em temperatura ambiente.

Ocratoxina A, Conc. em ppb	Média das intensidades de m/z 426	DP das triplicatas	DP do coeficiente linear da equação	EQUAÇÃO Y= ax + b	LD (ppb)	LQ (ppb)
0	150	27	713,3	y=1245,3x- 489,3	1,9	5,7
1	2020	1330				
2	1028	410				
6	6770	6299				
10	10333	4402				
20	25330	33068				

LD = Limite Detecção

LQ = Limite Quantificação

DP = Desvio Padrão

N = 3

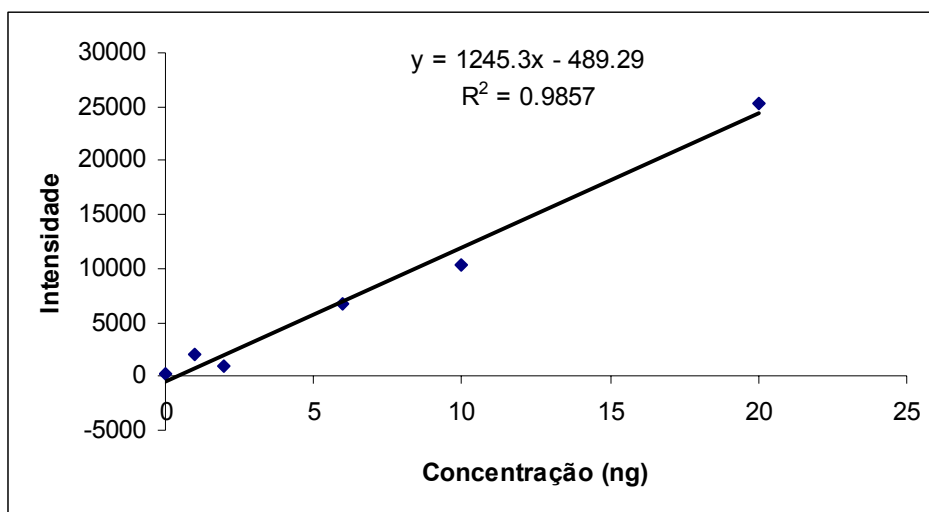


Figura 12. Gráfico de concentração versus intensidade para estudo do limite de detecção e quantificação do equipamento para padrão de Ocratoxina A utilizando como matriz o DHB seco a temperatura ambiente.

Tabela 7. Limite de detecção e quantificação do padrão de OTA por MALDI-TOF com secagem da matriz à vácuo.

Ocratoxina A, Conc. em ppb	Média das intensidades de m/z 426	DP das triplicatas	DP do coeficiente linear da equação	EQUAÇÃO Y= ax + b	LD (ppb)	LQ (ppb)
0	742	53	91,6	y=302,7x+ 804	1,0	3,0
1	1292	505				
2	1468	1091				
4	1890	358				
6	2427	286				
8	3235	1561				
10	3960	2249				

LD = Limite Detecção

LQ = Limite Quantificação

DP = Desvio Padrão

N = 3

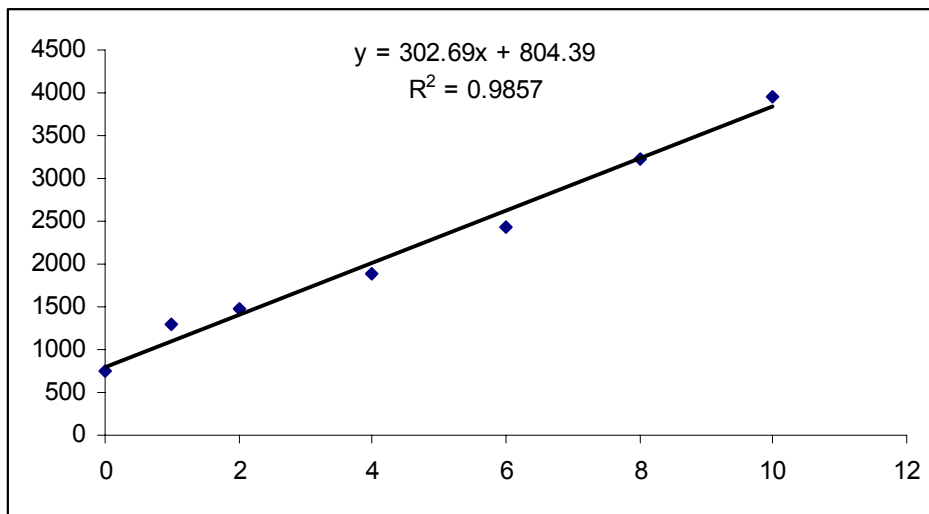


Figura 13. Gráfico de concentração versus intensidade para estudo do limite de detecção e quantificação do equipamento para padrão de Ocratoxina A utilizando como matriz o DHB seco a vácuo.

3.2.5 Screening de Ocratoxina A nas amostras de café verde aplicando as condições ótimas obtida pelo planejamento de experimento 2⁴

Como já colocado nos itens 1.2 e 1.3, a ocratoxina A possui grande diversidade de produtos alimentícios passíveis de serem contaminados, e vários métodos analíticos foram propostos, e são utilizados para sua determinação, sendo que a grande maioria tem em comum a separação por LC e fluorescência como sistema de detecção. Os métodos de extração e clean up utilizados são os mais variados possíveis conforme mostra a Tabela 8.

Como cada matriz e cada método de extração podem responder diferentemente para um mesmo método de detecção, cabe lembrar que testes para otimizar a extração e clean up da amostra devem ser realizados em complementação a este trabalho na matriz de escolha já que há a possibilidade de se trabalhar com massas maiores de amostra conforme trabalhos realizados por **Maaroufi et al.**

Sugere-se também o emprego de ferramentas estatísticas como o planejamento de experimentos para diminuir números de testes e para direcionamento e escolha das melhores condições de clean up e extração.

Neste trabalho para se avaliar a aplicabilidade da detecção por MALDI TOF, testes exploratórios foram feitos utilizando dois métodos mais usuais de clean up que são os de coluna de imunoafinidade (investigou-se duas marcas Neogen e Vican) e extração por solvente para se demonstrar a empregabilidade do método para a matriz café verde. O procedimento utilizado para a extração da ocratoxina A utilizando as colunas de imunoafinidade está apresentado no item 2.1.2. O procedimento utilizado para a extração de ocratoxina A por extração por solvente foi baseado no trabalho de Solfrizzo et al, modificado utilizando cartuchos de extração em fase sólida da marca Oásis 6cc Waters para clean up³⁸ da amostra que apresenta grupos de aminas quaternárias na superfície da fase reversa polimérica, possuindo funcionalidade de fase reversa e troca aniônica.³⁹

Utilizou-se cerca de 10g de amostra de café para o método de extração por solvente, o sinal da ocratoxina A pode ser detectado apenas quando adicionado o

padrão de ocratoxina A. Não se obteve sinal do analito mesmo adicionando padrão para as extrações realizadas por coluna de imunoafinidade. Estudos mais detalhados utilizando esta matriz e adaptando os métodos de extração a técnica MALDI-TOF, isto é procurando eliminar a interferência de sais, poderão aumentar a sensibilidade e o nível de detecção encontrados.

O resultado obtido da extração por solvente está apresentado na Figura 14 e mostra que a metodologia de extração utilizada afeta negativa ou positivamente a detecção requerendo, portanto uma complementar validação do método de extração de clean up de escolha. Sugere-se para um próximo trabalho uma comparação entre métodos de clean up.

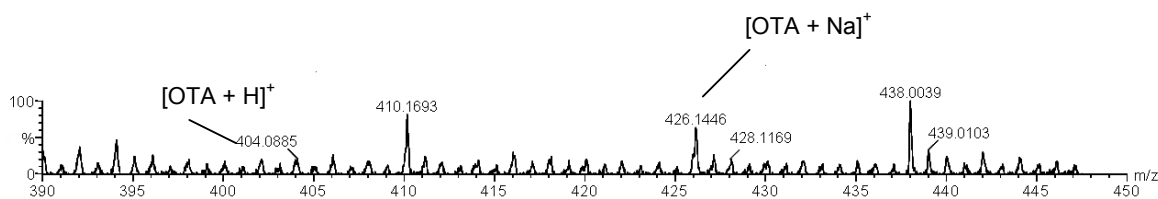


Figura 14. Espectro de massas obtido no MALDI-TOF para amostra de café verde com aplicação de 6ppb de padrão de ocratoxina A, utilizando o DHB como matriz seco à vácuo.

Tabela 8. Métodos analíticos utilizados para determinação de ocratoxina A em alimentos.

Referência	Alimento	Massa (g)	Extração	Clean-up	Quantificação	LD/LQ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Wolff et al. (2000)	Vinho, suco, óleo, vinagre	5 (ml)	Diluído com 1 ml PBS	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,01/
Wolff et al. (2000)	Carne e derivados	25	HCl-MgCl ₂ solução + CHCl ₃	Partição Líquido-líquido com NaHCO ₃ + imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência coluna	0,01/
Wolff et al. (2000)	Cereais	40	30 ml HCl-MgCl ₂ + 125 ml tolueno	SiO ₂ coluna Sep pak	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,01/
Wolff et al. (2000)	Cerveja	5 (ml)	Diluição com 1 ml PBS	Imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	
Wolff et al. (2000)	Café, chá	25	500 ml H ₂ O-NaHCO ₃	Diluição com PBS e clean-up com imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	
Wolff et al. (2000)	Laticínios, doces sementes oleaginosas	50	200 ml acetonitrila: água (6:4) 2-min agitação	Diluição com PBS e clean-up com imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	
Langseth et al. (1989); Langseth (1999)	Cereais	25	125 ml CHCl ₃ + 12.5 ml 0.1 mol/L H ₃ PO ₄ ; agitação 60 min	Cartucho de Silica Sep-pack e coluna imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,01/
Larsson & Moeller (1996)	Trigo, cevada, centeio	50	25 ml 0.1 mol/L H ₃ PO ₄ + 250 ml CHCl ₃ + 10 g terra diatomacea ;3 min agitação	Extração Líquido-líquido com 3% NaHCO ₃ + C18 (Sep-pack)	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,1/
Soares et al. (1985)	Milho, amendoim, feijão, arroz, farinha de mandioca	50	270 ml MeOH + 30 ml 4% KCl; 5 min agitação	Clarificação com (NH ₄) ₂ SO ₄ e Hyflo Super-Cel; diluição com água e extração líquido-líquido com CHCl ₃	TLC (20 x 20 cm sílica gel 60)	10/

Referência	Alimento	Massa (g)	Extração	Clean-up	Quantificação	LD/LQ(µg/Kg)
Burdaspal & Legarda (1998a)	Cerveja	5	Diluição com 1 ml 1% NaHCO ₃ 15% NaCl	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	
Trucksess et al. (1999)	Trigo, cevada, café	25	100 ml MeOH:1% NaHCO ₃ (7+3); 3-min agitação	Diluição com PBS and clean-up on Imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,03/
Solfrizzo et al. (1998)	Trigo, aveia	10	60 ml CHCl ₃ + 5 ml 0.1 mol/L H ₃ PO ₄ 30 min shaking	Extrato seco dissolvido na fase móvel HPLC e desengordurado com n hexano	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência partição líquido-líquido com hexano	/0,8
Jorgensen et al. (1996)	Trigo, centeio, cevada, aveia, farelo, carne porco e fígado	50	250 ml CH ₂ Cl ₂ :EtOH (4+1) + 25 ml 0.1 mol/L H ₃ PO ₄ 30-min agitação	Extração Líquido-líquido com 0.35 mol/L NaHCO ₃ +EtOH (5+2) e CH ₂ Cl ₂	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,05/ 0,5-4 (fígado)
Jorgensen (1998)	Cerveja	150 (ml)	Desgaseificação por 60 min	imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	
Jorgensen (1998)	Café torrado	50	200 ml 1% m/m NaHCO ₃ ; 2-min agitação	Diluição com PBS clean-up em coluna imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	
Patel et al. (1996)	Cereais, oleos, nozes, sementes,ervas, pickles, enlatados	25	125 ml CHCl ₃ + 12.5 ml 0.1 mol/L H ₃ PO ₄ 30-min agitação	Silica Sep-pack	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	
Maaroufi et al. (1995)	azeitonas, cereais e derivados	100	120 ml CHCl ₃ +HCl (100+1); agitação 24 h	TLC Preparativo	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência0	0,1/
Sharman et al. (1992)	Cereais	10	40 ml PBS:MeOH (50:50); 3-5-min agitação	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,2/

Referência	Alimento	Massa (g)	Extração	Clean-up	Quantificação	LD/LQ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Sharman et al. (1992)	Produtos de origem animal	10	100 ml CHCl_3 + 0.6 g 85% H_3PO_4 3–5-min agitação	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,2/
Rao (2000)	Alimentos	NR	Acetonitrila:água ou MeOH :água	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,2/0,5
MAFF (1999a)	Cereais	25	CHCl_3 + 0.1 mol/L H_3PO_4	Cartucho de Silica Sep-pack	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,1/0,2
Howell & Taylor (1981; modified)	Milho	25	250 ml CHCl_3 + 25 ml 0.1 mol/L H_3PO_4 30-min agitação	Cartucho de Silica Sep-pack	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,1/0,2
MAFF (1999b)	Vinho, uva, sucos	NR	NR	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,01/0,02
MAFF (1999c)	NR	NR	CHCl_3 : H_3PO_4	Extração Líquido-líquido com solução de NaHCO_3 e clean-up em coluna imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	
MAFF (1996b)	Café verde grãos	50	25 ml 0.1 mol/L H_3PO_4 + 250 ml CHCl_3 + 10 g terra diatomacea; 3-min agitação	Extração Líquido-líquido com 3% NaHCO_3 , clean up imunoafinidade e C18 (Sep-pack)	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	
Nesheim et al. (1973)	Cevada	50	25 ml 0.1 mol/L H_3PO_4 + 250 ml CHCl_3	Extração Líquido-líquido	TLC fluoridensitomet er	2/
Scott et al. (1991)	Carne, rim, figado	25	100 ml CHCl_3 + 50 ml 2 nmol/L NaCl + 50 ml 0.5 mol/L H_3PO_4 60-min agitação	Silica gel coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,5/
Patel et al. (1997)	Café solúvel e torrado	25	125 ml CHCl_3 + 12.5 ml 0.1 mol/L H_3PO_4 ; 30-min shaking	Cartucho de Silica Sep-pack + imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,1/

Referência	Alimento	Massa (g)	Extração	Clean-up	Quantificação	LD/LQ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Burdaspal & Legarda (2000)	Baby food	25	100 ml 0.5 mol/L H_3PO_4 2 mol/L NaCl + 50 ml tert-butyl methyl ether; 2-min agitação	Extração Líquido-líquido + imunoafinidade clean-up	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	/0,008
Zimmerli & Dick (1995, 1996)	Vinho, uva, suco	5 (ml)	Diluição com H_3PO_4 : 2 mol/L NaCl (33.7: 966.3), extração com 5 ml CHCl_3 1-min vortex	imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,003/0,005
Ueno (1997)	Cafê	0.5	8 ml 1% Na_2CO_3 e diluição com PBS	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,003-0,06/
Visconti et al. (1999, 2000a)	Vinho e cerveja	10 (ml) 10 ml 1%	Diluição com PEG and 5% NaHCO_3	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,01/
Ottender & Majerus (2000)	vinho	25 (ml)	Diluição com 25 ml PBS and pH 7.0–7.5	Coluna de imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,01/
Koch et al. (1996)	Cafê torrado	15	150 ml MeOH + 3% NaHCO_3 (1+1, v/v) 30-min agitação	clean-up: coluna de fenilsilano e imunoafinidade	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,1/
Majerus et al. (1994)	Trigo, cereais, frutas secas, pulses, vinho, cerveja, suco, café cru	20	30 ml HCl+ 50 ml 0.4 mol/L MgCl_2 ; extração com 100 ml tolueno agitação 60 min	Silica gel coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,1/
Leoni et al. (2000)	Cafê instantâneo e torrado	10	200 ml 1% NaHCO_3 2-min agitação	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,2/
Sizoo & van Egmond	Trigo e derivados	25	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{água}$	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,3/1
Vigilância sanitária	Trigo e derivados	20	MeOH/água ou $\text{CH}_3\text{CN}/\text{água}$	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,1/0,25

Referência	Alimento	Massa (g)	Extração	Clean-up	Quantificação	LD/LQ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Vigilância sanitaria	Vinho	5 (ml)	Diluição com água	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,05/0,1
Vigilância sanitaria	Café torrado	10	MeOH/3% NaHCO ₃	Coluna fenil silano + imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,13/0,25
Vigilância sanitaria	Paprika, pimenta ,nozes	20	MeOH/água or CH ₃ CN/água	Imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,13/0,25
Entwisle et al. (2000b)	Café torrado	15	MeOH/3% NaHCO ₃	Coluna fenil silano + imunoafinidade coluna	HPLC (RP18)/ detecção fluorescência	0,2/

HPLC, high-performance liquid chromatography; PBS, phosphate-buffered saline; PEG, polyethylene glycol; TLC, thin-layer chromatography

FONTE: Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations International Programme on Chemical Safety (IPCS)

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm> acesso em abril 2006

4. Conclusão

A técnica de MALDI-TOF-MS mostra-se promissora para execução de screening de micotoxinas em amostras de grãos (amendoim) apresentando boa detecção das principais aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Para obtenção de sensibilidade adequada das micotoxinas estudadas, alguns fatores mostraram-se importantes, tais como a utilização de líquido iônico como matriz que possibilitou a obtenção de espectros de massas livres de interferentes nas escalas de m/z mais baixas, mostrando assim a possibilidade de emprego desta técnica para os dois tipos de micotoxinas testados (aflatoxina e ocratoxina).

A utilização do NaCl para cationização com Na^+ foi outra estratégia experimental que se mostrou eficiente para obtenção dos sinais individuais bem definidos das aflatoxinas assim como para melhoria da razão sinal/ruído na análise de ocratoxina.

Quando as condições estabelecidas foram aplicadas nas amostras reais de café notou-se uma forte supressão dos íons da OTA, interferência esta que não foi notada na detecção dos 4 tipos de aflatoxinas que foram detectados com sensibilidade de 25 pg. Dessa forma recorreu-se a ferramenta estatística, planejamento de experimento, para investigar se todos os parâmetros utilizados poderiam ser otimizados. Assim, a aplicação de planejamento de experimento mostrou-se adequado no estudo de interações de fatores que afetam em uma análise no MALDI-TOF. A utilização do ácido dihidroxibenzoico (DHB) apresentou melhor desempenho, pois favoreceu a ionização da molécula de m/z 404 e a molécula de m/z 426.

No entanto, mesmo com as condições ótimas estabelecidas o método de clean up das amostras, usando coluna de imunoafinidade, provavelmente não é compatível para análise com o MALDI. Nesse caso foram feitos testes exploratórios de 3 diferentes métodos de clean up, por exemplo, variando as marcas das colunas de imunoafinidade, extração por solvente e extração em fase sólida (SPE, *solid-phase extraction*). Para minimizar a supressão iônica o procedimento de “clean up” das amostras deverá ser otimizado, para maior

compatibilidade com a técnica de MALDI, já que na literatura estão disponíveis diferentes métodos de clean up dependente de cada matriz a ser analisada.

A perspectiva futura é de que o método de screening de micotoxinas por MALDI-TOF-MS possa facilitar a análise de micotoxinas em geral, podendo ser ampliado no controle de multi-toxinas. A técnica será importante no controle de qualidade de produtos agrícolas como amendoins, milho, arroz, etc, como também poderá ser aplicada no controle de ameaças de bioterrorismo.

O trabalho com as aflatoxinas originou uma publicação no *Analytical Chemistry*²⁵ e está em andamento elaboração para entrada de solicitação de prioridade de patente.

Capítulo 2

“Fingerprinting” de Perfumes por ESI-MS: Rápida Tipificação e Identificação de Adulteração

1. Introdução

A palavra perfume vem do latim “per fumum” que significa através da fumaça, quando fragrâncias eram utilizadas na queima de incensos. O uso de fragrâncias começou com uma pequena elite (reis, faraós, imperadores e monarcas) e com significados religiosos. A partir do século vinte, com a combinação da química e da revolução industrial a revelação do perfume foi trazida para o resto da humanidade.⁴⁰

Nos dias atuais, o setor da indústria química voltado à produção para higiene pessoal, perfumaria e cosméticos obteve o melhor resultado do setor químico e petroquímico no ano de 2005 (ABIHPEC). Esse setor cresceu 40,6% em seu faturamento líquido em dólares, alcançando US\$ 5,5 bilhões.

Devido a enorme lucratividade que este setor oferece, a comercialização de produtos piratas tanto, no Brasil como em outros países vem crescendo continuamente. Ações internas vêm sendo tomadas pelo Conselho Nacional de Combate a Pirataria sobre o lançamento de linhas populares para atender os consumidores, que hoje optam por produtos piratas e também há a idéia das indústrias fazerem campanhas educativas sobre os riscos que esses produtos podem trazer aos consumidores (ABIHPEC).

Encontram-se na literatura muitos trabalhos sobre os riscos de saúde (alergias, neurotoxicidade etc) que usuários de produtos falsificados podem encontrar. Afinal, esses produtos não passam por nenhuma inspeção e muitas vezes contém substâncias alergênicas.^{41,42,43}

Os perfumes que compreendem a perfumaria fina são compostos por 78% m/m de etanol desnaturado. Etanol desnaturado é requerido pela legislação para impedir seu uso em bebidas, alimentos e produtos farmacêuticos (ANVISA) 12% m/m de fragrância, 8,5% m/m de água destilada, 0,50% de benzophenona-2 usada para prevenir a degradação da fragrância, pois essa substância absorve radiação ultravioleta e 1% m/m de PPG-20 eter metil glicose também adicionado como propriedades fixadoras da fragrância.

A criação de um perfume pode ser representada por uma pirâmide olfativa ilustrada na Figura 1. Nessa pirâmide estão representadas as notas de saída ou topo, notas de corpo e notas de fundo. Essas distribuições são representadas respectivamente pelas fragrâncias cítricas, florais e amadeiradas. As fragrâncias amadeiradas são as substâncias que possuem massa molecular mais alta e por isso correspondem aos fixadores do perfume.

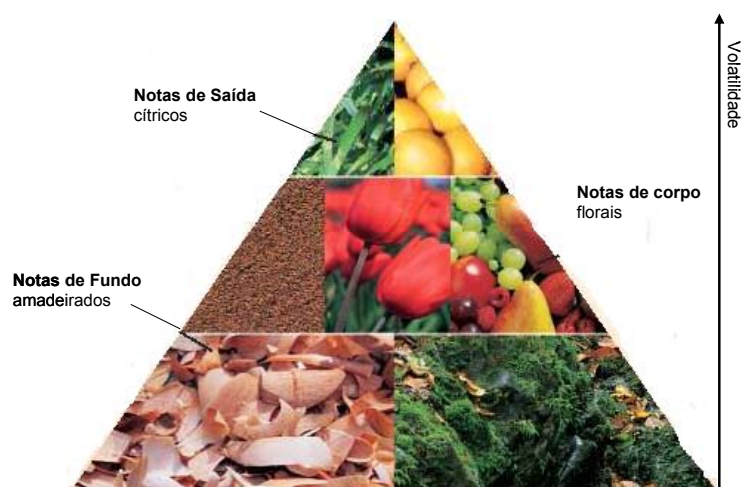


Figura 1. Representação da pirâmide olfativa.

O componente do perfume que possui o risco de falsificação é a fragrância. Em perfumes falsificados as fragrâncias utilizadas são aquelas de menor valor e que não passaram por nenhum tipo de teste de estabilidade, fotoquímico etc. Dessa forma, é necessário o emprego de técnicas analíticas viáveis e confiáveis⁴¹ para controlar práticas ilegais de falsificação de perfumes.

Em análises cujo objetivo é identificar e quantificar componentes principais em perfumes, a técnica de GC-MS (*gás chromatography-mass spectrometry*) tem sido preferencialmente utilizada.^{42,39,44,45} Outras técnicas como íon mobility spectrometry (espectrometria por mobilidade de íons) também foi usada para identificar falsificação nos perfumes. No entanto, não foi obtida diferenças entre eles, pois a detecção é feita apenas pela movimentação dos íons e não pela razão m/z dos mesmos.⁴⁶

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um novo método capaz de identificar adulteração de perfumes sem utilizar uma análise completa de compostos químicos presentes nos perfumes nem a análise de compostos voláteis (o qual é a aplicação mais comum),⁴⁷ mas uma técnica que possa realizar um screening rápido da tipificação e detecção de perfumes falsificados, utilizando componentes diagnósticos que possam distinguir amostras autênticas de amostras falsificadas.

A Ionização por Electrospray (ESI)⁴ é uma técnica branda e com uma aplicação muito ampla em análises de espectrometria de massas, melhor aplicada em moléculas polares, sem a necessidade de derivatização ou extração.

Alguns trabalhos utilizaram inserção direta de ESI-MS como método rápido na caracterização de produtos em misturas complexas como própolis⁴⁸, cerveja⁴⁹, whisky⁵⁰, vinho^{51,52}, orégano⁵³, rum e cachaça brasileira⁵⁴, gasolina^{55,56}, azeites⁵⁷ e soja⁵⁸, chamado de “fingerprinting”.

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes e Amostras

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Analisaram-se um total de 34 amostras dos perfumes Eternity da Calvin Klein, Gabriela Sabatini e Pólo Sport da Ralph Lauren, incluindo amostras originais, falsificadas e inspiradas na marcas originais.

2.2. Procedimento Experimental

As análises de ESI-MS foram realizadas em modo positivo no espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass, Manchester, UK). As condições experimentais foram: temperatura do bloco: 100°C, temperatura de dessolvatação: 100°C, voltagem do capilar: 3,0 kV e voltagem do cone 40V.

Um volume de 1,0µL das amostras de perfumes foi diluída em 1,0mL de solução MeOH:H₂O (1:1). Solução de ácido fórmico (1% v/v) foi adicionado em cada amostra para análises de ESI-(+)-MS. Essas soluções foram injetadas na interface de electrospray com uma vazão de 10µL min⁻¹ com uma bomba automática (Harvard Apparatus). Os espectros de massas foram adquiridos num intervalo de *m/z* 50-1500.

2.3. Análise dos dados

O software utilizado para tratar os dados é o Masslynx 4.0 (waters Manchester UK). Cada espectro de massas foi acumulado por 60s e gerou uma matriz final de dados de 12 amostras e 41 sinais de massas (variáveis) no intervalo de *m/z* 90-930 para as amostras do perfume Eternity, 12 amostras e 57 sinais de massas (variáveis) no intervalo de *m/z* 90-930 para o perfume Gabriela Sabatini e 10 amostras e 39 sinais de massas no intervalo de *m/z* 100-815 para o perfume Pólo Sport. Para classificar as amostras de perfume após as análises por ESI-MS, análise por componentes principais (PCA-Principal Compounds Analysis) foi realizada nos respectivos dados de ESI-MS pelo programa Statistica v. 6.0.

3. Resultados e Discussão

Figura 2 apresenta o “fingerprint” de ESI(+)-MS das amostras originais do perfume da marca Eternity. As amostras foram obtidas em lojas de procedência conhecida e contém o selo de autenticidade da importadora. Observa-se que todos os espectros de massas de ESI(+) apresentam as mesmas características para compostos polares. Nesse espectro os íons mais abundantes são aqueles de m/z 149, 181, 235 e 245. Esses íons correspondem a moléculas protonadas de compostos que não são majoritários na composição do perfume e fornecem íons diagnósticos interessantes de fingerprinting de ESI(+)-MS da marca do perfume Eternity.

Figura 3 apresenta o “fingerprint” de ESI(+)-MS das amostras falsificadas do perfume da marca Eternity. Essas amostras foram adquiridas no mercado informal por um valor muito mais baixo, e não contém o selo de autenticidade encontrado nos perfumes originais. A composição das substâncias polares encontradas nessas amostras é bem contrastante, indicando composição distinta de íons diagnósticos que são moléculas protonadas de vários componentes utilizados nestas formulações ilegais. Também é observada uma série de homólogos separados por 44Da, característicos de polietoxilados.

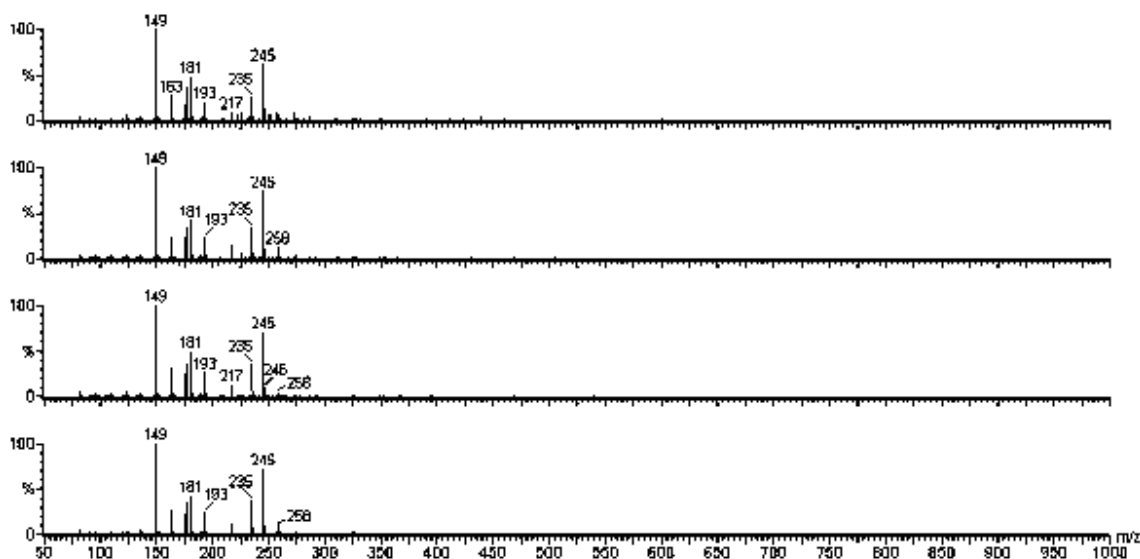


Figura 2. ESI(+)-MS dos perfumes originais da marca Eternity em solução metanol:água (1:1).

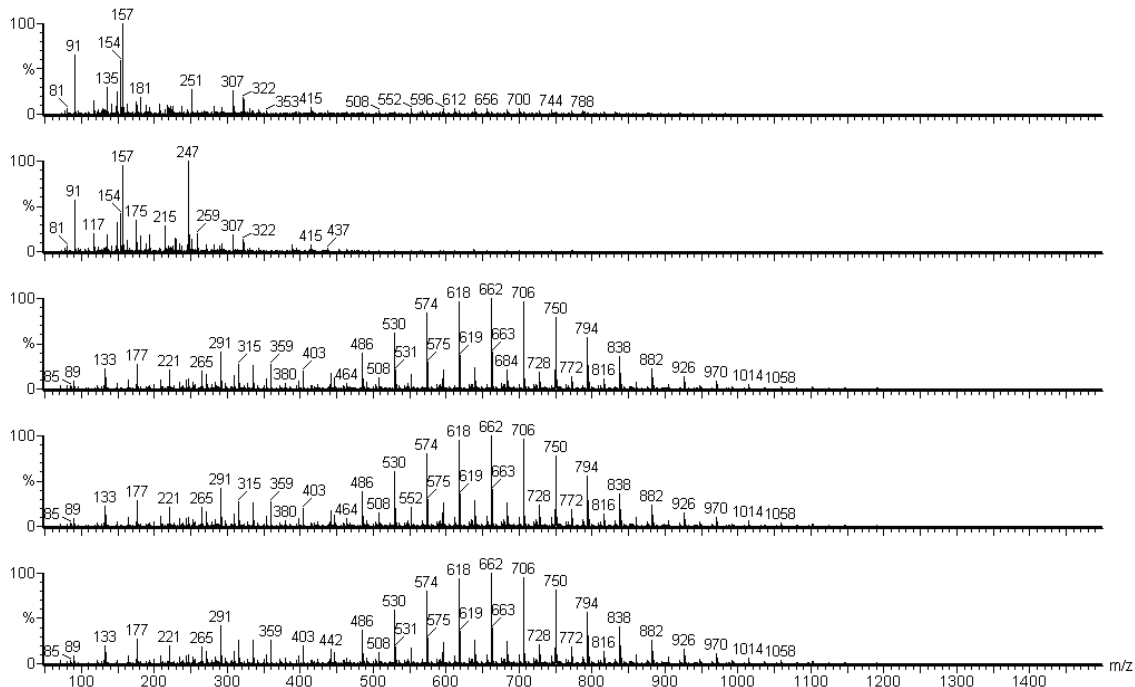


Figura 3. ESI(+)-MS dos perfumes falsificados da marca Eternity em solução metanol:água (1:1).

Figura 4 apresenta o “fingerprint” de ESI(+)-MS das amostras inspiradas na fragrância do perfume da marca Eternity. Esses perfumes não podem ser considerados como falsificados porque não são vendidos com o mesmo nome das marcas originais. Muitas vezes os perfumes “inspirados” apresentam fragrância quase que indistinguível dos perfumes originais. Os “fingerprints” destas amostras (Figura 4) são de fato muito parecidos com as amostras originais, mas pequenas diferenças podem ser notadas entre fingerprinting de ESI(+)-MS das amostras originais e inspiradas proporcionando distinção entre elas. Observa-se no primeiro espectro de massas da Figura 4 uma série de homólogos separados por 44Da (m/z 508-816) característico de um polietoxilado.

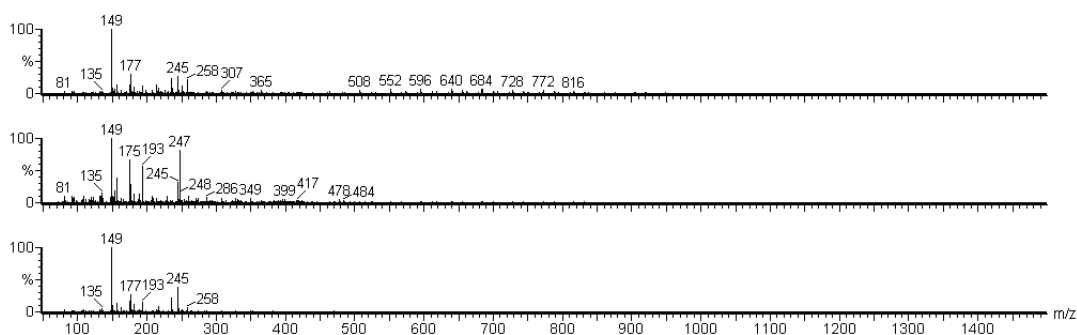


Figura 4. ESI(+)-MS dos perfumes “inspirados” da fragrância da marca Eternity em solução metanol:água (1:1).

Figura 5 apresenta o fingerprinting de ESI(+)-MS de amostras originais da marca Gabriela Sabatini. Os íons mais abundantes são aqueles de m/z 225, 229, 247 e 299. Nota-se a boa reprodutibilidade dos espectros e a presença de íons diagnósticos característicos da marca. Figura 6 apresenta o fingerprinting de ESI(+)-MS de amostras falsificadas da marca Gabriela Sabatini. Essas amostras apresentam variedade de íons diagnósticos e como encontrado nas amostras falsificadas da marca Eternity, aqui também é observada uma distribuição oligomérica de íons separados por 44Da. Figura 7 apresenta o fingerprinting de ESI(+)-MS de uma única amostra inspirada na fragrância do perfume da marca

Gabriela Sabatini. Os íons mais abundantes são aqueles de m/z 157, 247, 299 e 421. Nota-se que esta amostra possui alguns íons diagnósticos presentes nas amostras originais, mas possui outros íons diagnósticos que permitem clara distinção entre originais e inspirado.

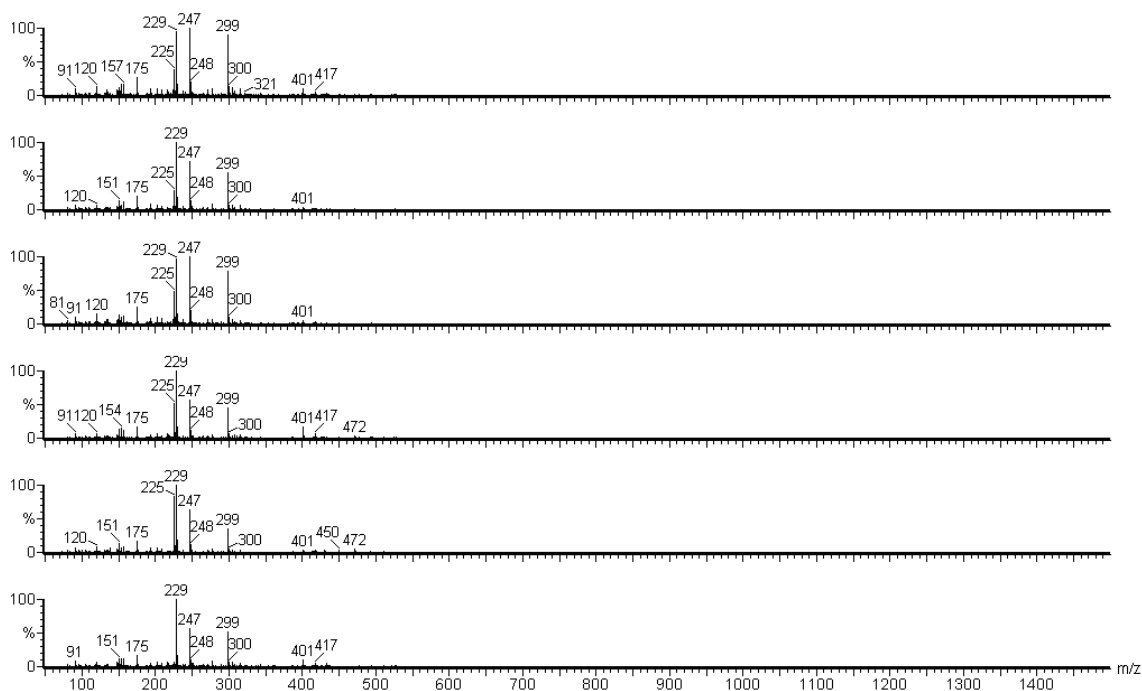


Figura 5. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes originais da marca Gabriela Sabatini em solução metanol:água (1:1).

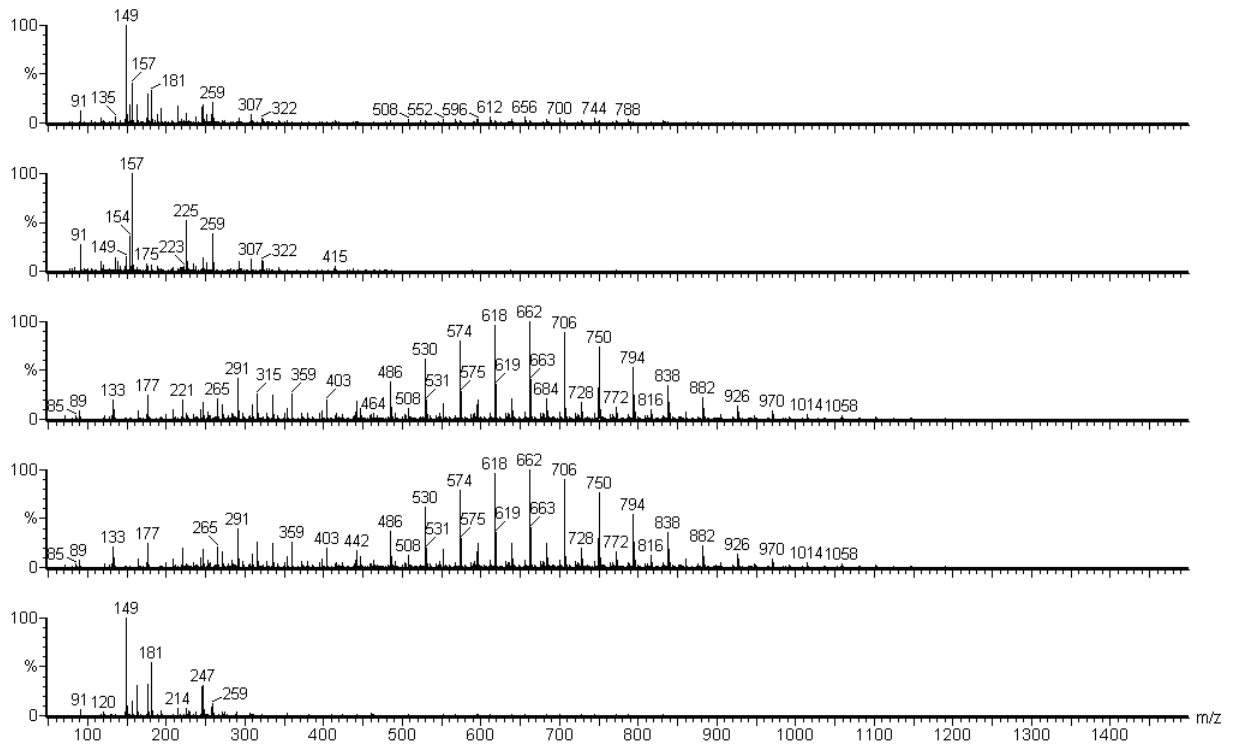


Figura 6. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes falsificados da marca Gabriela Sabatini em solução metanol:água (1:1).

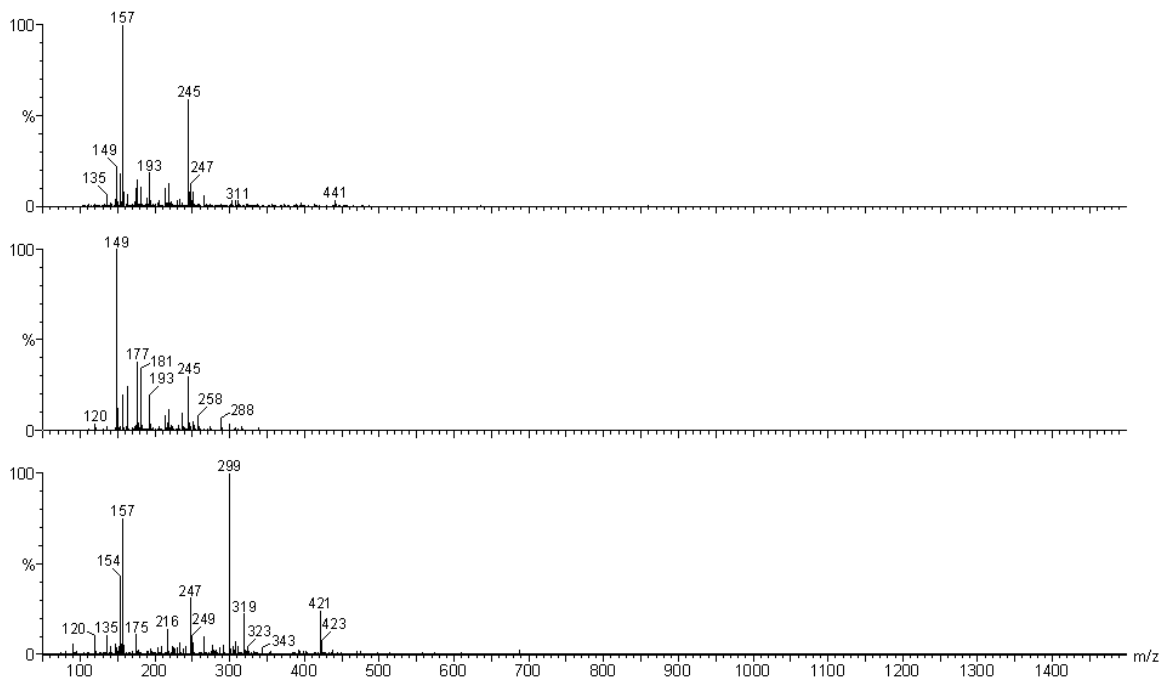


Figura 7. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes “inspirados” na fragrância da marca Gabriela Sabatini em solução metanol:água (1:1).

Figura 8 apresenta o fingerprinting de ESI(+)-MS de amostras originais da marca Polo Sport. Os íons mais abundantes são aqueles de m/z 177, 223, 245, 261 e 467. Observa-se novamente a boa reprodutibilidade entre os espectros e a presença de íons diagnósticos representativos dessa marca. Figura 9 apresenta o fingerprinting de ESI(+)-MS de amostras falsificadas da marca Polo Sport. Observa-se novamente a presença de íons diagnósticos variados e também a presença de distribuição oligomérica de íons separados por 44Da, encontrados em espectros anteriores de electrospray de perfumes falsificados (Figura 3 e Figura 6). Figura 10 apresenta o fingerprinting de ESI(+)-MS de uma única amostra inspirada na fragrância do perfume da marca Pólo Sport. Os dois íons mais abundantes são aqueles de m/z 149 and 245. Nota-se que um desses íons (m/z 245) também é encontrado nas amostras originais do Pólo Sport (Figura 8), mas o espectro do perfume inspirado continua distinguível.

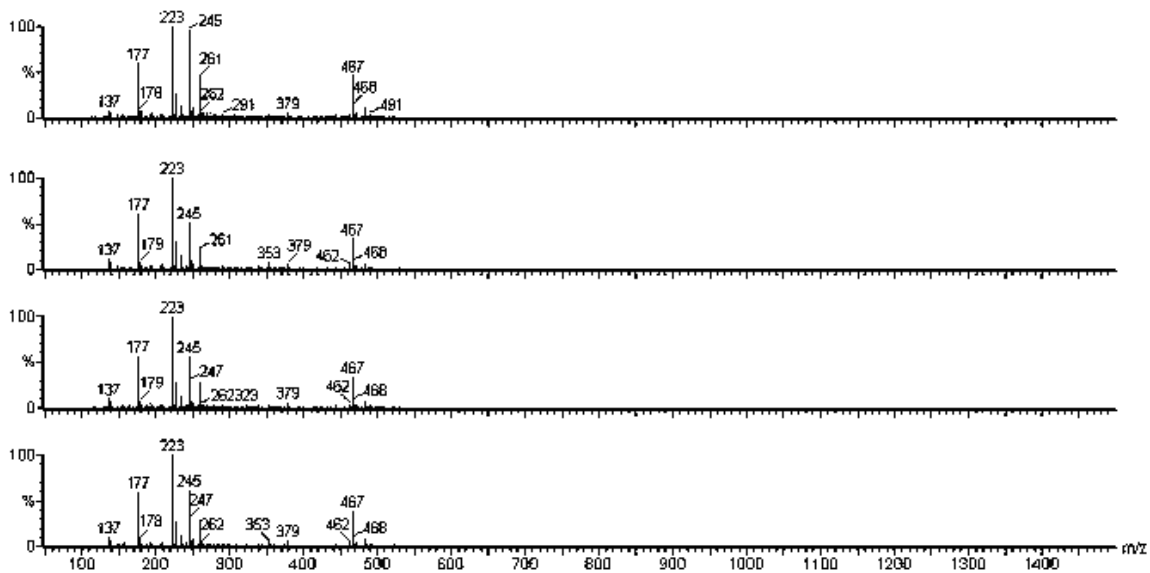


Figura 8. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes originais da marca Pólo Sport em solução metanol:água (1:1).

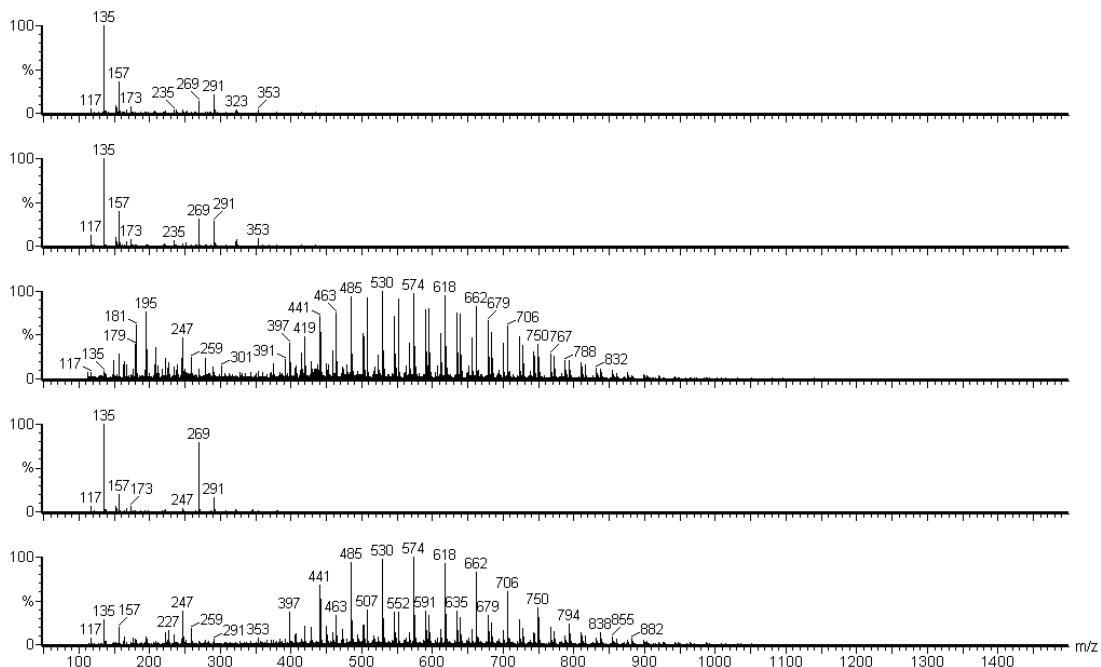


Figura 9. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes falsificados da marca Pólo Sport em solução metanol:água (1:1).

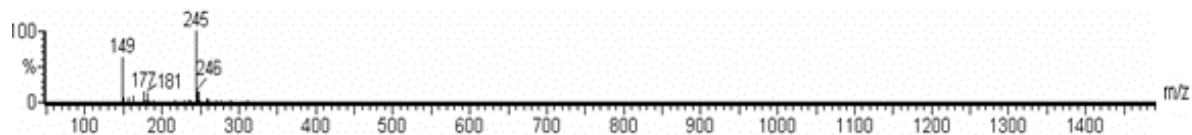


Figura 10. ESI(+)-MS fingerprinting dos perfumes “inspirados” na fragrância da marca Pólo Sport em solução metanol:água (1:1).

3.1 Análise Exploratória de Dados

3.1.1 Análise de Dados Multivariados

Dados analíticos são gerados para caracterização de amostras (perfumes, óleos, méis representativos de várias regiões etc.). Essa caracterização é relativamente simples quando se tem poucos dados analíticos para cada amostra. Espectros de massas, espectros cromatográficos etc fornecem muitos resultados por amostras, o que muitas vezes dificulta na caracterização dessas amostras.⁵⁹ A análise de dados multivariados é uma ferramenta útil na análise e classificação de grupos de amostras, possibilitando a visualização de uma matriz de dados complexa em duas ou três dimensões. Neste trabalho utilizou-se a análise Hierárquica e a Análise por Componentes Principais para classificação de perfumes.

3.1.1.1 Análise por Componentes Principais

O objetivo principal da análise de componentes principais é a obtenção de um pequeno número de combinações lineares (componentes principais) de um conjunto de variáveis, que retenham o máximo possível da informação contida nas variáveis originais. Frequentemente, um pequeno número de componentes pode ser usado, em lugar das variáveis originais, nas análises de regressões, análises de agrupamentos etc. Os Componentes são extraídos na ordem do mais explicativo para o menos explicativo. Teoricamente o número de Componentes é sempre igual ao número de variáveis. Entretanto, alguns poucos Componentes são responsáveis por grande parte da explicação total. O processamento da análise de componentes principais pode ter partida na matriz de variâncias e covariâncias ou na matriz de correlação. Optando pela matriz de correlação, é aconselhável estabelecer o limite mínimo de 1.0 unidade para a extração dos autovalores.^{59, 60}

3.1.1.2 Análise Hierárquica

Na análise hierárquica de agrupamentos são calculadas distâncias métricas entre as amostras que formam o conjunto de dados, sendo essas agrupadas de acordo com o grau de similaridade apresentado. De modo geral, menores distâncias estão associadas a um elevado grau de similaridade, enquanto que maiores distâncias indicam o comportamento oposto. Existe uma grande variedade de métodos hierárquicos disponíveis, citados a seguir: agrupamento por vizinhos mais próximos (single linkage clustering), agrupamentos por vizinhos mais distantes (Complete-linkage clustering), agrupamento por distancias médias (Average distance clustering), agrupamentos por centróides (Centroid clustering), agrupamento pelo método de Ward, agrupamento por variância mínima. Neste trabalho foi utilizado ao agrupamento pelo método de Ward. Este método é similar ao agrupamento por centróides, porém é acrescido de alguns pesos nas equações

utilizadas, descrita em termos de distâncias quadradas. O método de Ward possui uma vantagem em relação aos outros métodos por possuir uma tendência de fazer agrupamentos pequenos.⁶⁰

3.2 Resultados da Análise Exploratória dos Dados

Para testar o desempenho da técnica de ESI-MS na classificação dos perfumes, os dados foram tratados por análise de PCA (Principal Compound Analysis). Figura 11 apresenta o gráfico de Fator 1 versus Fator 2 de ESI(+)-MS das amostras originais do Eternity, Gabriela Sabatini e Pólo Sport. Todas as marcas estão claramente agrupadas e uma distante da outra.

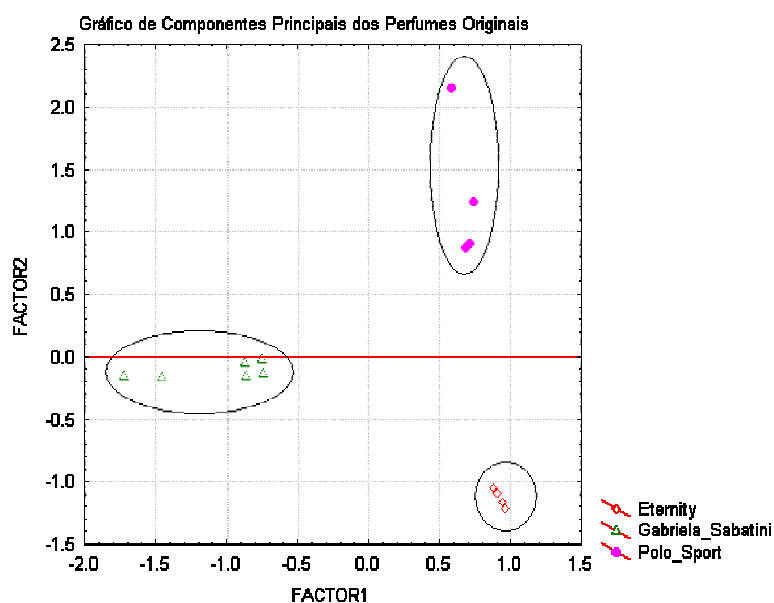


Figura 11. PCA dos dados de ESI(+)-MS de três marcas diferentes de perfumes originais: Eternity, Gabriela Sabatini e Pólo Sport.

Figura 12 apresenta o gráfico de Fator 1 versus Fator 2 de ESI(+)-MS do perfume Eternity. A porcentagem total de variância para os fatores 1 e 2 fornece 78% para interpretação dos dados, mostrando claramente que as amostras estão agrupadas nas categorias original (O), falsificada (F) e inspirada (I). Para as amostras (F) dois grupos foram formados: aqueles que contêm o cluster oligomérico de íons separados por unidade de 44 m/z (à esquerda) e o grupo que não contém tais íons (à direita). Nota-se como antes discutido que as amostras inspiradas (I) estão mais próximas das amostras originais (O), mas estão claramente separadas. Para provar essa observação foi realizado também o método por agrupamento hierárquico, o qual separa as amostras por medida de similaridade, nesse caso pela abundância da razão m/z , característica de cada grupo de perfumes. A Figura 13 apresenta o dendograma para o perfume Eternity. Observa-se que os perfumes inspirados (C_{10} e C_{12}), formam um grupo diferente dos perfumes originais provando, portanto, que não correspondem ao grupo das amostras de perfumes originais.

Observa-se também que a análise de PCA revelou a qualidade das marcas de perfumes inspirados, na Figura 12, por exemplo, duas marcas de perfumes inspirados estão mais próximas dos originais enquanto que a outra marca está próxima dos perfumes falsificados. Os gráficos de Fator 1 versus Fator 2 de ESI(+)-MS dos perfumes Gabriela Sabatini e Pólo, Figura 14 e Figura 16 respectivamente, obteve-se resultados similares daqueles obtidos pelo perfume Eternity.

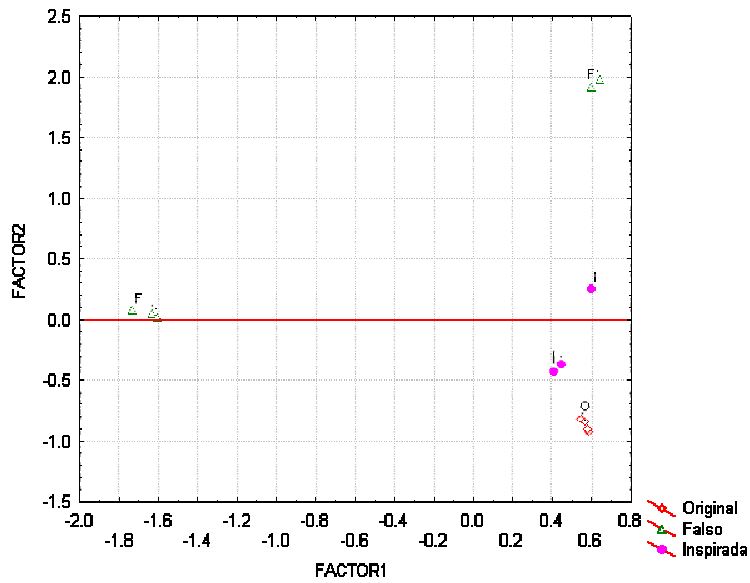


Figura 12. PCA dos dados de ESI(+)-MS para três categorias do perfume Eternity: original (O), falsificados (F) e “inspirados” (I).

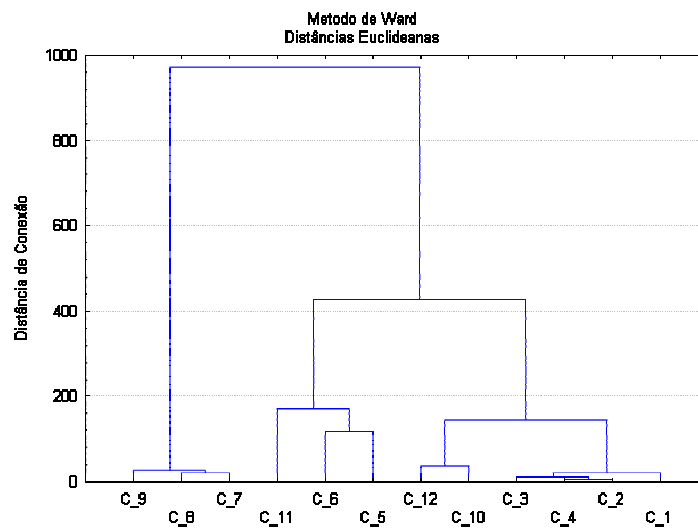


Figura 13. Dendrograma dos dados dos perfumes da marca Eternity nas categorias: original (C₁-C₄), falso (C₅-C₉) e “inspirados” (C₁₀-C₁₂), obtido pelo método de Ward.

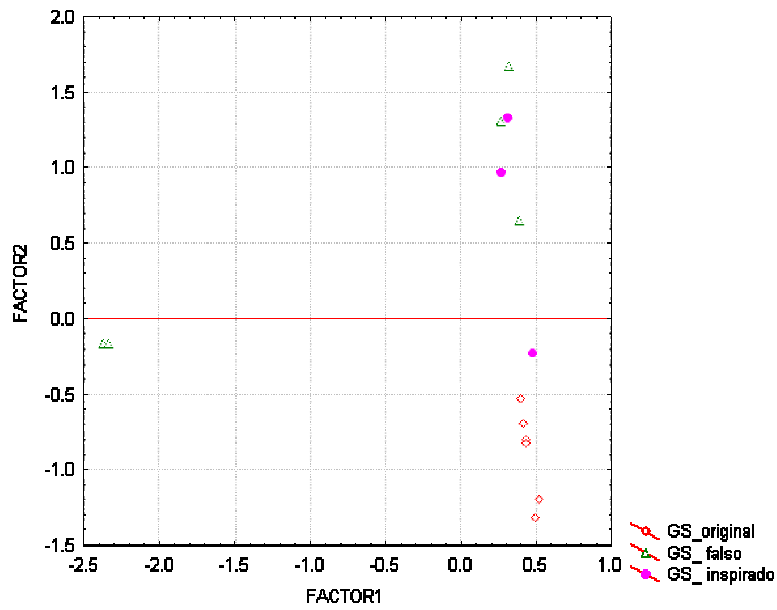


Figura 14. PCA dos dados de ESI(+)-MS para três categorias do perfume Gabriela Sabatini: original (O), falsificados (F) e “inspirados” (I).

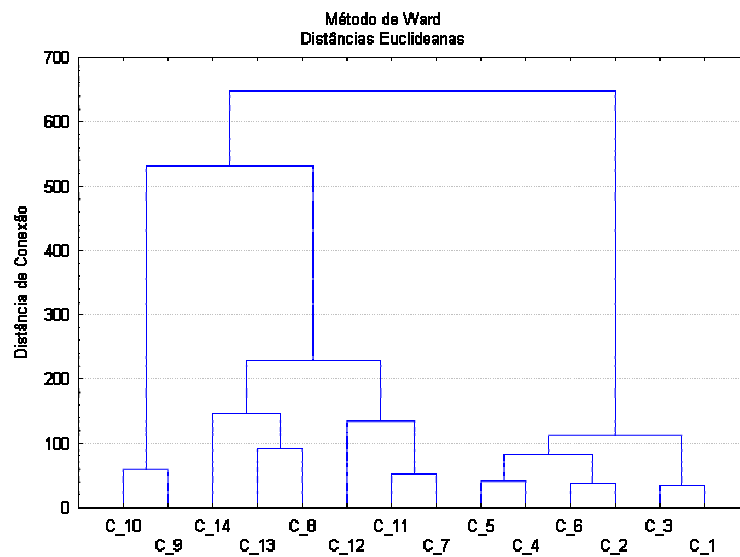


Figura 15. Dendrograma dos dados dos perfumes da marca Gabriela Sabatini nas categorias: original (C1-C6), falso (C7-C11) e “inspirados” (C12-C14), obtido pelo método de Ward.

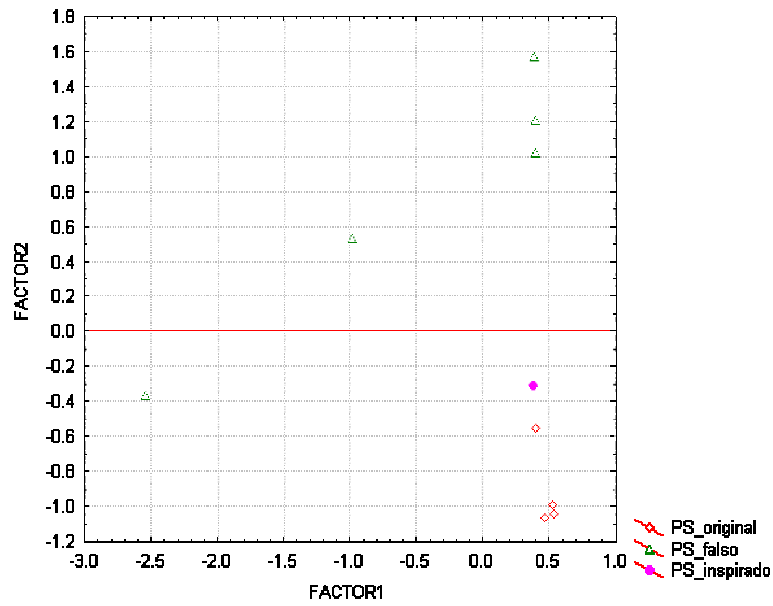


Figura 16. PCA dos dados de ESI(+)-MS para três categorias do perfume Pólo Sport: original (O), falsificados (F) e “inspirados” (I).

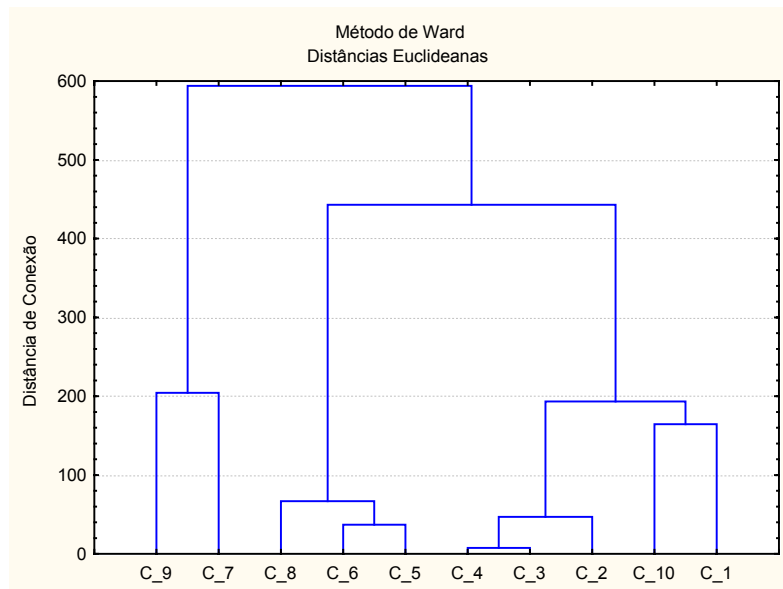


Figura 17. Dendrograma dos dados dos perfumes da marca Polo Sport nas categorias: original (C1-C4), falso (C7-C9) e “inspirados” (C10), obtido pelo método de Ward.

4. Conclusão

Uma nova técnica rápida e viável na detecção de perfumes falsificados baseada em fingerprinting de ESI-MS foi demonstrada. A preparação de amostra é mínima e a diluição com metanol/água permitiu a detecção de moléculas protonadas de compostos diagnósticos presentes nas amostras originais, falsificadas e inspiradas. A análise por componentes principais proporcionou uma melhor visualização da separação entre as diferentes categorias de perfumes e a análise hierárquica contribuiu para comprovação desses agrupamentos obtidos.

O método pode ser facilmente automatizado usando um sistema automático de injeção de amostras baseado em chips de micro-fluido de ESI que elimina a contaminação cruzada permitindo análises rápidas.⁶¹ Futuramente o método pode ser utilizado para estabelecer bibliotecas de fingerprinting de ESI-MS de perfumes para comparação com aqueles que estão sob suspeita de falsificação. Esta biblioteca poderá ser renovada constantemente pela adição de novas análises de ESI-MS de novos perfumes até mesmo àqueles que ainda não estão disponíveis no mercado.

Referências

- ¹ COLE, R. B. **Electrospray ionization Mass Spectrometry-Fundamentals, Instrumentation & Applications**. New York: John Wiley&sons, 1997.
- ² GROSS, J. H. **Mass Spectrometry- A Textbook**. Berlin: Springer, 2004.
- ³ BIOSYSTEMS., Applied (Org.). **Espectrometria de Massas e suas Aplicações**. São Paulo: Abi Expert Training Center, 2005.
- ⁴ WHITEHOUSE C. M. et al. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Analytical Chemistry**, v. 57, p.675-679, 1985.
- ⁵ KARAS, M.I; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, p.2299-2301, 1988.
- ⁶ Levantamento feito com participantes do 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topic, 11-15 Junho 2000, Long beach – CA, EUA
- ⁷ IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. New Analytical Techniques in Food Science. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 41, p.413-450, 2001.
- ⁸ KELLER, B. O.; Li, L.; Electrospray sample deposition for matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry with attomole detection limits, **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1055-1063, 2001.
- ⁹ SANTOS, L. S. et al. Fast Screening of Low Molecular Weight Compounds by Thin-Layer Chromatography and "On-Spot" MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 76, p.2144-2147, 2004.
- ¹⁰ STORZA, S.; DALL'ASTA, C.; MARCHELLI, R. RECENT ADVANCES IN MYCOTOXIN DETERMINATION IN. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p.54-76, 2006.
- ¹¹ GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends In Analytical Chemistry**, v. 21, p.468-486, 2002.
- ¹² TANIWAKI, M H; FONSECA, H; A PIZZIRANI-KLEINER, A. VARIABILIDADE DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR. **Scientia Agricola Piracicaba**, v. 50, p.140-150, 1993.
- ¹³ SWEENEY, M J; DOBSON, A D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 43, p.141-158, 1998.
- ¹⁴ OCHRATOXIN A. Disponível em: <<http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol56/13-ochra.htm>>. Acesso em: 28 dez. 2005.
- ¹⁵ GOLLUECKE, A P B; TANIWAKI, M H; TAVARES, D Q. Survey on ochratoxin A in Brazilian green coffee destined for exports. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p.641-645, 2004.
- ¹⁶ LEGISLAÇÃO sobre micotoxinas. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/legislacao.html>>. Acesso em: 30 jan. 2006.

-
- ¹⁷ JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADITIVES [JECFA, 1998, Geneva. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants – Aflatoxins**. World Health Organization, 1998.
- ¹⁸ VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal Of Chromatography A**, v. 815, p.75-92, 1998.
- ¹⁹ HORWITZ, W. (EDITOR), 2000, Gaithersburg. **The Official Methods of Analysis of AOAC International (OMA)**. Gaithersburg: AOAC International, 2000.
- ²⁰ Ueno et al, Survey of aflatoxin b1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, v. 9, p.77-83, 1997.
- ²¹ TAKINO, M et al. Atmospheric pressure photo-ionization liquid chromatography/mass spectrometric determination of aflatoxins in food. **Food Additives And Contaminants S**, v. 21, p.76-84, 2004.
- ²² KRŠKA, R et al. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. **Food Additives And Contaminants S**, v. 22, p.345-353, 2005.
- ²³ MONACI, L; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, , v. 378, p.96-103, 2004.
- ²⁴ ARMSTRONG, D W. et al. Ionic Liquids as Matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 378, p.3679-3686, 2001.
- ²⁵ CATHARINO, R R et al. Aflatoxin Screening by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 77, p.8155-8157, 2005.
- ²⁶ SLENO, L; A VOLMER, D. Some fundamental and technical aspects of the quantitative analysis of pharmaceutical drugs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 19, p.1928-1936, 2005.
- ²⁷ LEE, P J; CHEN, W; GLEBER, J C. Qualitative and quantitative analysis of small amine molecules by MALDI-TOF mass spectrometry through charge derivatization.. **Analytical Chemistry**, v. 76, p.4888-4893, 2004.
- ²⁸ HATSIS, P et al. Quantitative analysis of small pharmaceutical drugs using a high repetition rate laser matrix-assisted laser/desorption ionization source.. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 17, p.2303-2309, 2003.
- ²⁹ REYSER, M.L. et al. Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p.1081-1092, 2003.
- ³⁰ WANG, J; SPORNS, P. Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS. **Journal Of Agriculture And Food Chemistry**, v. 47, p.2009-2015, 1999.
- ³¹ OCHRATOXIN A characteristics. Disponível em: <www.biopure.at>. Acesso em: 28 dez. 2005

-
- ³² SOARES, L V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods using a multi-toxin thin-layer chromatographic method.. **Journal - Association Of Official Analytical Chemists**, v. 72, p.22-26, 1989.
- ³³ VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; Determination of Ochratoxin A in Green Coffee by Immunoaffinity Column Cleanup and Liquid Chromatography: Collaborative Study. **Food Chemical Contaminants**, v. 88, p.773-779, 2005.
- ³⁴ BRUNS, R. E.; NETO, B.; SCARMINIO, I. S. **Como Fazer Experimentos-Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campinas: Unicamp, 2001.
- ³⁵ RIBANI, M et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quimica Nova**, v. 27, p.771-780, 2004.
- ³⁶ VOYAGER BIOSPECTROMETRY WORKSTATION, Disponível em: <http://cabm-ms.cabm.rutgers.edu/Voy_guideV5.1.pdf> Acesso em: 21 mar 2006.
- ³⁷ VOYAGER, Disponível em: <http://www.labiomed.org/users/equip/MALDI-TOF/sample_prep.ppt#342,11,Slide 11> Acesso em: 17 mar 2006.
- ³⁸ SOLFRIZZO, M; AVANTAGGIATO, G; VISCONTI, A. Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals. **Journal Of Chromatography A**, v. 815, p.67-73, 1998.
- ³⁹ VENTURA, M et al. Analysis of ochratoxin in coffee by solid-phase clean up and narrow-bore liquid chromatography-fluorescence detector mass spectrometry. **Journal Of Agriculture And Food Chemistry**, v. 51, p.7564-7567, 2003.
- ⁴⁰ PYBUS, D. H.; SELL, C. S. **The Chemistry of Fragrances**. United Kingdom: The Royal Society Of Chemistry, 1999..
- ⁴¹ DEBONNEVILLE, C.; CHAINTREAU, A. Quantitation of suspected allergens in fragrances Part II. Evaluation of comprehensive gas chromatography-conventional mass spectrometry.. **Journal Of Chromatography A**, v. 1027, p.109-115, 2004.
- ⁴² LEIJS, H et al. Quantitative analysis of the 26 allergens for cosmetic labeling in fragrance raw materials and perfume oils.. **Journal Of Agriculture And Food Chemistry**, v. 53, p.5487-5491, 2005.
- ³⁹ JOHANSEN, J D. Fragrance Contact Allergy: A Clinical Review. **American Journal Of Clinical Dermatology**, v. 4, p.789-798, 2003.
- ⁴⁴ STAEB, A J. Automated storage of gas chromatography-mass spectrometry data in a relational database to facilitate compound screening and identification.. **Journal Of Chromatography A**, v. 974, p.223-230, 2002.
- ⁴⁵ CASABIANCA, H et al. Application of hyphenated techniques to the chromatographic authentication of flavors in food-products and perfumes. **Journal Of High Resolution Chromatography**, v. 18, p.279-287, 1995.
- ⁴⁶ CLARK, J M; DAUM, K; KALIVAS, J H. Demonstrated Potential of Ion Mobility Spectrometry for Detection of Adulterated Perfumes and Plant Speciation. **Analytical Letters**, v. 36, p.215-244, 2003.
- ⁴⁷ BICCI, C H; RUBIOLO, P H; CORDERO, C H. Separation science in perfume analysis. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p.53-56, 2006..

-
- ⁴⁸ SAWAYA, A C H F et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst**, v. 129, p.739-744, 2004.
- ⁴⁹ ARAUJO, A S et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. **Analyst**, v. 130, p.884-889, 2005.
- ⁵⁰ MOLLER, J K S; CATHARINO, R R; EBERLIN, M N. Electrospray ionisation mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity. **Analyst**, v. 130, p.890-897, 2005.
- ⁵¹ CATHARINO, R R et al. High-throughput analysis of wine samples during the fermentation process and identification of adulteration by electrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, 2005, submitted
- ⁵² COOPER, H J; MARSHALL, A G. Electrospray ionization fourier transform mass spectrometric analysis of wine. **Journal Of Agriculture And Food Chemistry**, v. 49, p.5510-5518, 2001.
- ⁵³ MOLLER, J K S et al. A Zinc porphyrin complex as the identical red pigment in dry-cured iberian and parma ham. **Food Chemistry**, 2006 in press.
- ⁵⁴ SOUZA, P P et al. Instant differentiation of rum and cachaça by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Journal Of Agriculture And Food Chemistry**, 2006, in press.
- ⁵⁵ QUIAN, K et al. Fundamentals and applications of electrospray ionization mass spectrometry for petroleum characterization. **Energy And Fuels**, v. 18, p.1784-1791, 2004.
- ⁵⁶ HUGHEY, Ca; RODGERS, R P; MARSHALL, A G. Resolution of 11 000 compositionally distinct components in a single electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrum of crude oil.. **Analytical Chemistry**, v. 74, p.4145-4149, 2002.
- ⁵⁷ CATHARINO, R R et al. Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: classification, quality, adulteration, and aging. **Analytical Chemistry**, v. 77, p.7429-7433, 2005.
- ⁵⁸ SANTOS, L S et al. Chemotaxonomic markers of organic, natural, and genetically modified soybeans revealed by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal Of Radioanalytical And Nuclear Chemistry**, v. 77, p.7429-7433, 2006.
- ⁵⁹ MASSART, D. L., VANDEGINSTE, B. G. M., DEMING, S. N., MICHOTTE Y. KAUFMAN, L., **Chemometrics: a Textbook**, New York, Elsevier Science Publishing Company Inc, 1988.
- ⁶⁰ BEEBE K.R., PELL R. J., SEASHOLTZ M. B., **Chemometrics A Practical Guide**, New York, John Wiley & Sons, 1998.
- ⁶¹ BINDILA, L et al. Off-line capillary electrophoresis/fully automated nanoelectrospray chip quadrupole time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry for glycoconjugate analysis. **Journal Of Mass Spectrometry**, v. 39, p.1190-1201, 2004.