



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PATRICIA YUKARI SAIKI

**ANÁLISE DE MARCADORES DE SAQUÊS ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE
MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO**

***MARKERS OF SAKE WINE USING A HIGH-RESOLUTION MASS
SPECTROMETRY APPROACH***

CAMPINAS

2019

PATRICIA YUKARI SAIKI

ANÁLISE DE MARCADORES DE SAQUÊS ATRAVÉS ESPECTROMETRIA DE
MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

*MARKERS OF SAKE WINE USING A HIGH-RESOLUTION MASS
SPECTROMETRY APPROACH*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

Dissertation submitted to the State University of Campinas School of
Medical Sciences as part of the requirements for obtaining the title of
Master of Science.

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA PATRICIA YUKARI SAIKI E ORIENTADA PELO
PROF. DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Saiki, Patricia Yukari, 1993-
Sa21a Análise de marcadores de saquês através de espectrometria de massas de alta resolução / Patricia Yukari Saiki. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Rodrigo Ramos Catharino.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Saquê. 2. Marcadores biológicos. 3. Composição química. 4. Espectrometria de massa. I. Catharino, Rodrigo Ramos, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Markers of sake wine using a high-resolution mass spectrometry approach

Palavras-chave em inglês:

Rice wines

Biological markers

Chemical composition

Mass spectrometry

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Rodrigo Ramos Catharino [Orientador]

Estela de Oliveira Lima

Celia Regina Garlipp

Data de defesa: 23-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5698-8818>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8964679204462539>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

PATRICIA YUKARI SAIKI

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO

MEMBROS:

1. PROF. DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO

2. PROFA. DRA. ESTELA DE OLIVEIRA LIMA

3. PROFA. DRA. CELIA REGINA GARLIPP

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data: 23/08/2019

PÁGINA DE AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família. Meus pais, Margarida e Yasuhiro, por todo apoio e incentivo que me deram ao longo desse caminho. Vocês são minha base. Ao meu irmão Rodrigo, por ser uma ótima companhia em todas as risadas e conversas.

Ao Talles, muito obrigada por segurar minha mão durante esses anos, sendo meu amor e melhor amigo. Dividir uma casa e uma vida com você são uma das melhores escolhas que já fiz.

Aos amigos do Laboratório Innovare, em especial, a Flávia e Jeany, por me auxiliarem nos experimentos e sempre estarem dispostas a conversar, explicar e solucionar problemas e ao Mohamed por sempre esclarecer minhas dúvidas de prontidão.

E, por fim, ao prof. Rodrigo pela oportunidade de me deixar fazer parte desse laboratório e por sempre estar alegre e otimista discutindo os assuntos e resolvendo os problemas.

RESUMO

O Saquê é uma bebida alcoólica tradicional e popular no Japão, produzida a partir de arroz, água e dois microrganismos conhecidos como *Aspergillus oryzae* e *Saccharomices cerevisiae*. Existem diferentes tipos de saquês resultantes das matérias-primas utilizadas e variantes empregadas no processo de produção, parâmetros que definem as características organolépticas e a composição química do produto final. Este estudo foi realizado para melhor entender as características dessa bebida através dos marcadores encontrados em dois grupos de amostras provenientes de países distintos. Para isso, foram analisados saquês produzidos no Japão e no Brasil empregando-se a técnica de espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray (ESI-HRMS). Através da investigação metabolômica foram identificados como marcadores Japoneses: ácido satívico, rafinose, ácido pangâmico, tralkoxydim e erythrokyrin e Brasileiros: ácido 3-Carboxi-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-propanoico, ácido abscísico, pantoyllactone glucoside, propoxur e fusarina C, classificados, posteriormente, como marcadores de: arroz, cultivo, produção e qualidade. Este estudo pode ser utilizado como uma alternativa para avaliar as matérias-primas e tratamentos empregados, além dos processos de produção existentes em outros países, a fim de melhorar e complementar os já existentes no Brasil.

PALAVRAS CHAVE: Saquês; Marcadores biológicos; Composição química; Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Sake wine is a traditional and popular alcoholic beverage in Japan made with water, rice and two microorganisms known as *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. There are different types of sake as a result of raw materials and variants applied in the production process, parameters responsible for the organoleptic characteristics and the chemical composition of the final product. This study was carried out in order to better understand the characteristics present in this beverage through the markers found in two sample groups from different countries. For this purpose, sake wines produced in Japan and Brazil were analyzed using the electrospray ionization (ESI) high-resolution mass spectrometry (HRMS). Through the metabolomic investigation were identified as Japanese markers: sativic acid, raffinose, pangamic acid, tralkoxydim and erythrokyrin, and as Brazilian markers: pantoyllactone glucoside, abscisic acid, propoxur, fusarin C and 3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-1-propanoic acid. Those markers were, afterward, classified as rice, culture, production and quality markers. This approach suggests an alternative to learn and comprehend the sake wine production process and the raw materials used in other countries, and furthermore, improve and complement the existing processes in Brazil.

KEY WORDS: Rice wines; Biological markers; Chemical composition; Mass spectrometry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADI - Acceptable daily intake

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A. *oryzae* - *Aspergillus oryzae*

CE-TOF-MS - Capillary Electrophoresis time of flight mass spectrometry

ESI - Ionização por electrospray (Electrospray ionization)

GC-MS - Gas chromatography–mass spectrometry

GOM - Gohyakumangoku

HILIC-TOF-MS - Hydrophilic interaction liquid chromatography time of flight mass spectrometry

HRMS - Espectrometria de massas de alta resolução (High-resolution mass spectrometry)

KOS - Koshitanrei

K7 - Kyokay nº 7

mg/kg b.w - miligrama/kilograma peso corporal (body weight)

MS - Espectrometria de massas (Mass spectrometry)

MS/MS - Espectrometria de massas sequencial

m/z - massa/carga (mass / ion charge)

PLS-DA - Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (Partial least squares discriminant analysis)

S. *cerevisiae* - *Saccharomyces cerevisiae*

UPLC-QTOF-MS - Cromatografia líquida ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas por quadrupolo e tempo de voo (Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry)

VIP - Importância da variável na projeção (Variable Importance in Projection)

YAM - Yamadanishiki

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
Saquê.....	10
Processo de produção.....	12
Composição e características organolépticas.....	13
Comparação com outras bebidas fermentadas.....	14
Análise de bebidas alcoólicas.....	14
Espectrometria de Massas.....	15
OBJETIVOS.....	17
Objetivo geral.....	17
Objetivos específicos.....	17
RESULTADOS.....	18
Abstract.....	18
Introduction.....	19
Materials and Methods.....	22
Chemical and Reagents.....	22
Samples.....	22
Equipment.....	23
Data management.....	23
Results and Discussion.....	24
Japanese Sake wines.....	28
Rice Markers.....	28
Quality markers.....	29
Brazilian Sakes.....	30
Rice markers.....	31
Cultivation markers.....	31
Production Markers.....	32
Quality Markers.....	32
Conclusion.....	34
Author contributions.....	34
References.....	34
DISCUSSÃO GERAL.....	41
CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

INTRODUÇÃO

Saquê

O saquê é uma bebida alcoólica com uma tradição de mais de 1300 anos no Japão. Algumas evidências indicam que a tecnologia de produção da bebida foi levada por imigrantes provenientes do sul da China para a antiga corte imperial Japonesa (1). No Brasil, a bebida foi trazida com a chegada dos primeiros imigrantes japoneses em 1908 no Kasato-Maru (2).

A bebida, também conhecida como vinho de arroz, é produzida a partir da sacarificação e fermentação do arroz cozido por *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente (3).

A *S. cerevisiae* fermenta apenas açúcares simples, como a glicose. Os grãos de arroz contêm amido, dessa forma, é necessário um processo de sacarificação para conversão do amido em glicose antes do processo de fermentação. Com essa finalidade, no processo produtivo são adicionadas enzimas do *A. oryzae*, também, conhecido como *koji*. A preparação do *koji* é feita através da inoculação de seus esporos no arroz cozido a vapor, processo realizado a temperatura e umidade controlados. Essa cultura de *A. oryzae* produz, principalmente, dois tipos de enzimas: glicoamilase e alfa-amilase, sendo o balanço entre elas de fundamental importância na determinação da qualidade do saquê (1). Além de sua utilização na produção do saquê, é amplamente, empregado em produtos fermentados de origem Japonesa, como *miso*, *shoyu*, *shochu* e picles (4).

As leveduras utilizadas em processos de fermentação de etanol são geralmente representadas pelo *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, as leveduras de saquê diferem de outras leveduras fermentativas em algumas características que as tornam mais adequadas a esse processo específico de produção, como adição de um aroma agradável ao produto final e uma alta

produção de etanol à temperaturas mais baixas. Análises genéticas relacionaram características desses microrganismos ao processo de produção da bebida como, por exemplo, formação de espuma ou biossíntese de compostos (3).

O arroz é utilizado com principal matéria-prima na produção do saquê. Os grãos são polidos, lavados, deixados de molho em água e cozidos a vapor, seguido de fermentação com água, levedura e *koji* (5). O polimento dos grãos de arroz faz parte do tratamento da matéria-prima, sendo realizado com o objetivo de remover impurezas antes do processo de produção do saquê, como por exemplo, excesso de gorduras, proteínas, minerais e fitatos, que poderiam diminuir a qualidade e o sabor final da bebida. No geral, quanto maior o polimento do grão, ou seja, quanto maior a porcentagem de remoção do grão, mais sofisticada tende a ser a bebida, devido a uma maior taxa de fermentação, teor alcoólico, açúcares e compostos voláteis presentes no produto final (6). Outra etapa importante no tratamento do arroz é a absorção de água pelos grãos no processo de molho, já que essa absorção determina a digestibilidade do arroz cozido, afetando positivamente o processo de fermentação (7).

Variedades de arroz utilizadas estritamente para a produção de saquê possuem grãos maiores em relação ao tradicional arroz utilizado na alimentação oriental. Além disso, possuem uma estrutura opaca localizada no centro do grão conhecida como núcleo-branco (8,9). Os tecidos do núcleo-branco promovem a gelatinização do arroz cozido no processo de produção do saquê e induzem a invasão do *koji*, devido a isso, são importantes na produção da bebida. Diferenças nas propriedades físicas de mesmas variedades de grãos que possuem o núcleo-branco e grãos que não possuem foram reportadas, entretanto, as propriedades químicas são as mesmas (9). A busca na área de inovação de novos tipos de saquês envolve o desenvolvimento de novos tipos de arroz com características que tornem o produto final único, para isso, cultivares de arroz com baixo teor de glutelina e amilose, por exemplo, já estão sendo avaliados (5).

Processo de produção

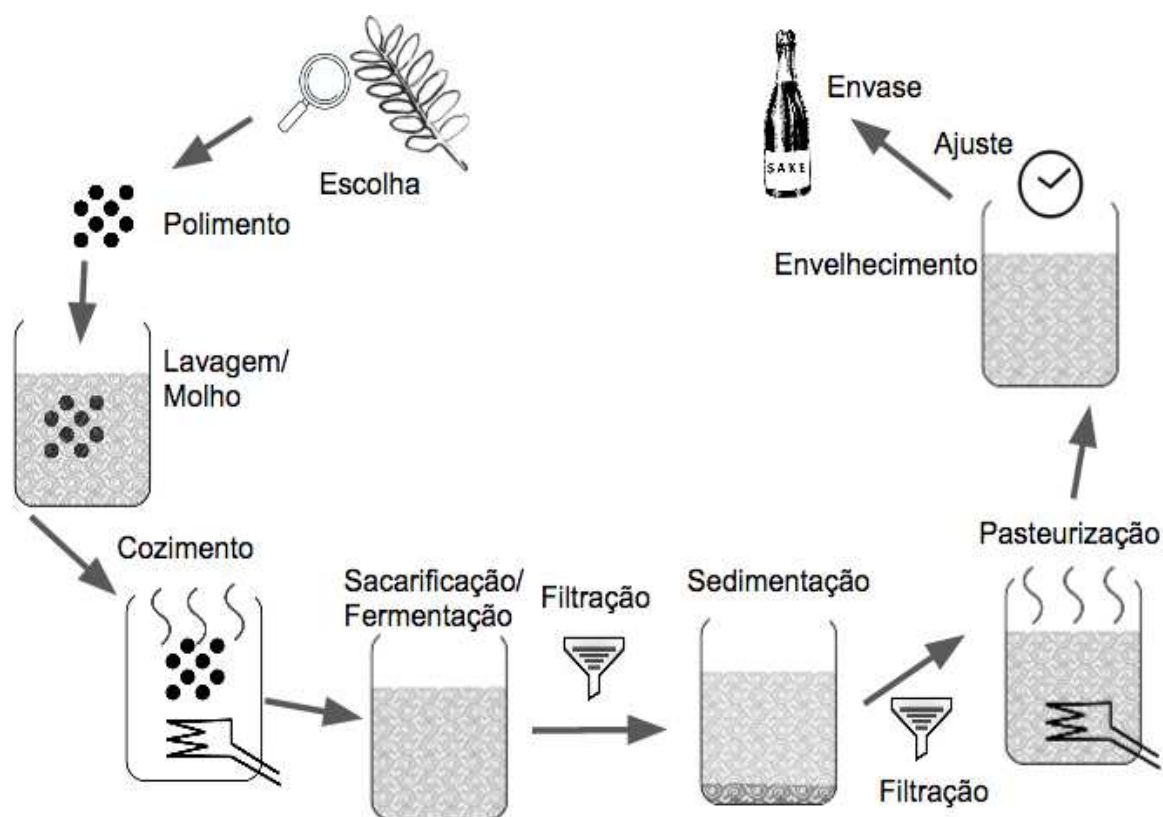


Figura 1: Processo simplificado empregado na produção do saquê.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O processo se inicia a partir da escolha dos grãos de arroz e tratamento dessa matéria-prima. Esses grãos são polidos, lavados para retirada do farelo, deixados de molho para absorção de água e cozidos à vapor (10). A partir deste arroz cozido são preparados o *koji* e o *shubo*. Uma parte desse arroz cozido é inicialmente fermentada com o fungo *A.oryzae* durante 5 a 7 dias (*koji*). Uma parte do *koji* é misturado na água, a levedura *S. cerevisiae*, ao arroz cozido e ao ácido lático de grau fermentativo ou à bacilos produtores de ácido lático, sendo essa mistura (*shubo*) incubada durante 7 dias à 4°C. A condição ácida nessa mistura é necessária para suprimir o crescimento de microrganismos que estragam a bebida. Para o processo de fermentação principal são misturados o arroz cozido, o *koji*, o

shubo e a água em 3 etapas, ao longo de 4 dias. Em média, o tempo de incubação é realizado à temperaturas entre 8° a 18°C, levando de 3 a 4 semanas para ser finalizado. Após esse período, a mistura é filtrada para retirada do arroz não dissolvido e a levedura. Segue-se um processo de sedimentação para precipitação de partículas restantes e uma nova filtração para separação dessa porção mais clara. A bebida é aquecida a 60°C para esterilização do líquido e inativação de enzimas durante o processo de pasteurização (10,11). Segue-se um processo de envelhecimento realizado, normalmente, de 6 meses a 1 ano, seguido de ajuste de teor alcoólico e envasamento (10).

Composição e características organolépticas

Na composição química do saquê já foram reportadas água, álcoois, carboidratos, proteínas, ácidos carboxílicos e minerais (12,13). As características organolépticas do saquê, provavelmente, são resultantes da concentração e combinação de compostos químicos presentes na bebida (14). Esses atributos perceptíveis incluem acidez, doçura, salinidade e amargor, além de textura e limpidez do líquido. Há evidências de que o aroma da bebida esteja relacionado à presença de álcool e compostos estéricos, e o sabor, à glicose, aminoácidos e ácidos orgânicos (15). Entretanto, apesar de existirem estudos com o objetivo de identificar compostos e relacioná-los a essas características, a correlação exata necessita de estudos complementares (14). A qualidade desejada do produto final é garantida através das características dos subprocessos integradas ao processo como um todo. Dessa forma, além de análises químicas, também podem ser empregadas análises sensoriais por operadores treinados ao longo do processo (16).

Comparação com outras bebidas fermentadas

O saquê é a bebida com maior teor alcoólico obtida através de fermentação, sem destilação (4). De uma maneira geral, para a produção de vinhos são utilizadas leveduras, principalmente as da espécie *Saccharomyces cerevisiae* para o processo de fermentação alcoólica. Neste caso, os açúcares das uvas dissolvidos no mosto (glicose e frutose) são transformados em álcool etílico e subprodutos (glicerol, acetaldeído, ácido acético, etc) (17). Para bebidas produzidas a partir de grãos, como é o caso da cerveja e do saquê, são necessárias enzimas para a transformação do amido em açúcar antes do processo de fermentação. No caso das cervejas, o malte produzido a partir da germinação controlada artificialmente da cevada (malteação) é utilizado no processo de sacarificação devido a presença de amido e enzimas na sua composição (18,19). Para o saquê, o processo de sacarificação e fermentação ocorrem simultaneamente, através da ação do *koji* e da levedura, respectivamente.

Análise de bebidas alcoólicas

Globalmente, 43% da população mundial são considerados bebedores atuais, ou seja, consumiram bebidas alcoólicas nos últimos 12 meses (20). Devido a esse número, os estudos de bebidas alcoólicas despertam interesse em muitos ramos da ciência, já que englobam desde análises antropológicas que relacionam o álcool à comportamentos sociais e culturais (21), a descobertas da composição química dos produtos. As técnicas empregadas na determinação da composição química das bebidas alcoólicas podem ser utilizadas no desenvolvimento de novas bebidas a partir de novas fontes de matérias-primas (22), relacionar as moléculas encontradas à características geográficas do local de produção (23), pode ser uma forma de melhorar o rendimento ou entender de forma mais profunda o processo

produtivo (24, 25), associar os compostos químicos a benefícios à saúde (26) ou mesmo, avaliar autenticidade ou adulteração de bebidas (27). Muitos estudos empregam técnicas analíticas cromatográficas (27, 28, 29, 30) ou as associam à espectrometria de massas (31, 32, 33).

Espectrometria de Massas

Espectrometria de massas é uma poderosa ferramenta na análise qualitativa e quantitativa de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (34). Na técnica, as moléculas de interesse são introduzidas na fonte de ionização do equipamento, onde são, primeiramente, ionizadas para aquisição de cargas positivas ou negativas. Os íons têm sua trajetória desviada de acordo com suas relações massa/carga (m/z) sendo o espectro de massas uma representação gráfica da abundância relativa dos sinais de acordo com a relação m/z dos compostos (35). Devido a alta sensibilidade, precisão de massa, facilidade na obtenção de informações estruturais dos compostos estudados, baixo limite de detecção, rapidez analítica e uma diversidade de aplicações (34,36), a espectrometria de massas tem sido aplicada com sucesso em diversas áreas como, por exemplo, na área nutricional e de alimentos (37). As mais recentes aplicações na área de problemas bioquímicos estão relacionadas a proteoma, metaboloma e metabolização de drogas. Além disso, podem ser utilizadas no controle de poluição, área forense, monitoramento de processos e muitas outras (36).

Historicamente, dificuldades na caracterização de biomoléculas através de espectrometria de massas ocorriam devido a grandes quantidades de impurezas nas amostras, baixa exatidão de massa, principalmente para compostos de maior peso molecular e processos de ionização ineficientes (34). Antes da introdução da ionização por electrospray, muitas vezes a maior limitação da técnica

era a obtenção da amostra de interesse no vácuo na forma de íons adequados para a análise de massa (37).

O desenvolvimento nas técnicas de ionização por electrospray (ESI) permitiram o aumento na complexidade de análise, como identificação de estruturas desconhecidas e aquisição de informações de amostras de interesse (34). ESI é um método no qual a solução é nebulizada para criar um fino jato de gotículas, no qual, a vaporização ocorre conforme essas gotículas atravessam a interface atmosférica, introduzindo os íons no analisador (37). A técnica é uma ferramenta poderosa na produção de íons no vácuo, provenientes de espécies de moléculas grandes e complexas em solução (38). Considerada um processo de ionização branda, pode ser aplicada à moléculas grandes e frágeis que possuem funções vitais em sistemas biológicos, já que produz moléculas ionizadas com pouca ou nenhuma fragmentação (34,38). Na área laboratorial clínica é uma ferramenta importante na análise de amostras com concentrações extremamente baixas, compostos não voláteis e biomoléculas lábeis que não são facilmente analisáveis por outras técnicas convencionais (35). Na área de alimentos, a técnica já foi empregada, por exemplo, na caracterização de processos de produção de cerveja (39), análises de extratos de produtos naturais (40), presença de taurino em energéticos (41) e controle de qualidade em azeite de oliva (42).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Encontrar e identificar marcadores de saquês Japoneses e Brasileiros utilizando a técnica de espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray.

Objetivos específicos

Relacionar os compostos encontrados com as matérias-primas utilizadas e o processos de produção empregados.

Comparar os marcadores encontrados entre os grupos analisados.

Verificar a presença de contaminantes e associá-los às etapas do processo de produção.

RESULTADOS

MARKERS OF SAKE WINE USING A HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY APPROACH

*Patricia Yukari Saiki, Karina Akemy Ikejiri, Tatiane Melina Guerreiro, Flávia Luísa Dias Audibert, Jeany Delafiori, Rodrigo Ramos Catharino**

Abstract

Sake wine is a traditional and popular alcoholic beverage in Japan made with water, rice and two microorganisms known as *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. This study was carried out in order to better understand the characteristics present in this beverage through the comparison between groups from different countries (five samples produced in Japan, and five samples produced in Brazil). The analysis was performed using the electrospray ionization (ESI) high-resolution mass spectrometry (HRMS), followed by a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), markers relevance by VIP score, metabolites mass-based search via repository of information and fragmentation of the target molecules by MS / MS to confirm the results. It was possible to notice differences between the groups and pointed out markers coherent with the sake wine production process, such as sativic acid, raffinose, pangamic acid, abscisic acid, pantoyllactone glucoside and 3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-1-propanoic acid. Besides that, it was possible to identify some quality markers such as erythroskyrin, tralkoxydim, propoxur and fusarium C. This approach suggests an alternative to learn and comprehend the sake wine production process and the raw materials used in other countries, and furthermore, improve and complement the existing processes in Brazil.

Key-words: Sake wines; Biological markers; Chemical Composition; Mass spectrometry.

Introduction

Sake wine is an alcoholic beverage primarily produced from rice and water. The microorganisms responsible for the starch conversion into ethanol are known as *Aspergillus oryzae* (koji mold) and *Saccharomyces cerevisiae* (sake yeast), through a simultaneous and controlled process known as saccharification and simultaneous fermentation [1].

The production process involves the starch hydrolysis into glucose by the koji mold enzymes, and the glucose conversion into ethanol by the sake yeast action [2]. Approximately 300 compounds have already been identified in sake, and its composition depends on the combination between the parameters and the raw materials used in the production process, which include, for example, the rice species and type of grain polishing, water quality, koji mold, yeast strains and fermentation parameters [3,4]. In general, sakes are composed of alcohols, carbohydrates, amino acids, esters, carboxylic acids and inorganic compounds, in which, amino acids and high alcohol concentration are the major contributors in the beverage taste development [3, 5]. Roughly, the steps in the sake production process are: rice selection, polishing, washing, maceration and grains vaporization, followed by fermentation, mixture filtration, sedimentation, filtration, pasteurisation (or non-pasteurization), aging, adjustment and packaging [6].

Different approaches have been developed to evaluate the parameters diversity involved in the quality and in the final sensory and metabolic sake characteristics. Rice is the main material used in this beverage production. In general, two rice types (*Oryza sativa* L.), sake rice and cooking rice, have been used in this process [7]. The cooking rice consumed in Japan, when compared to sake rice, has a smaller size and a lower lipid concentration, but a higher protein concentration, conditions that are not favorable to sake flavor [2].

Within the sake rice group there are many varieties, for example, Gohyakumangoku (GOM), Yamadanishiki (YAM), and the genetic crossing between GOM and YAM known as Koshitanrei (KOS), which differ from each other in grains polishing properties, components, and metabolites present in the final product with its uses [7]. The grains polishing is part of the raw material treatment, where its main purpose is to remove unnecessary substances to the process such as proteins, lipids and minerals. Generally, a beverage produced from a more polished grain tends to be more refined. A polished rice of 70 and 75% is used for a non-premium sake, which means that 30% of the grain was polished and 70% of grain was used to produce the beverage [8]. Koji mold is prepared by inoculating its spores into an amount of steamed rice in a temperature, humidity controlled environment [6]. This *Aspergillus oryzae* culture has a high proteolytic and saccharification activity. Moreover, it is also used in the miso, or soy sauce production [9]. From the *Saccharomyces cerevisiae* species, sake yeast has characteristics such as high ethanol production, growth and fermentation at temperatures higher than 15° C, which justify its choice in the sake production process [10]. In the past, there was a wide variety of products, due to the different sake yeasts used without preculture, since they were produced individually and naturally in the fermentation environment. Over the years, in Japan, the majority of the production has been made using a typical sake yeast strain known as *S. cerevisiae* Kyokai no. 7 (K7) which have ensured an improvement in the sake quality, however, it reduced the taste varieties. Currently, most producers keep utilizing the K7 group in a purified pre-culture, however, there are still some producers who perform the process in the same manner as in the past [11]. The pre-culture is prepared in a small scale mixture (shubo or moto) with koji mold, water, sake yeast, lactic acid and steamed rice. Lactic acid suppresses the growth of microorganisms that are harmful to the product development, and can be obtained by adding lactic acid to the moto (sokujo-moto) or by including lactic acid bacteria in the mixture (yamahai-moto) [12].

Sake is a millennial and traditional drink in Japan, consumed in both low and high temperatures. The major sake producers in the eastern country (around

20) produce approximately, an average of 50% of the total country production, however, it is estimated that there are 2000 sake producers in Japan, excluding Okinawa prefecture [3]. The existing and commercialized sake types in Japan differ among themselves due to the raw materials used and the production process employed. They are: Ginjo, Daiginjo, Junmai, Junmai ginjo, Junmai daiginjo, Honjozo, Futsu-shu, Nigorizake, Sparkling, Taruzake, Genshu, Kosu, Nama-chozo-shu, and Namazake [6]. Considerable interest in the study of this type of alcoholic beverage is due to the growing interest in Brazil. In 2017, it was estimated that there were 1.5 million Japanese citizens in the country [13], associated with 9th position in the world rice production ranking [14].

The Decree N° 6.871, from June 4, 2009, which regulates the law 8.918, from July, 14, 1994 provides the standardization, registration, inspection and production of alcoholic beverages in Brazil. Specifically for sake wine commercialized in Brazilian national territory, the regulation predict an alcoholic content of 14 to 26% by volume at 20 °C, as basic ingredients, the rice must saccharified by the fungus *Aspergillus oryzae* and, optionally, potable ethyl alcohol of agricultural origin, water, natural flavors and sugar. The main classification among Brazilian types is due to the sucrose concentration per liter. They are: dry (less than thirty sucrose grams per liter) and liqueur (more than thirty sucrose grams per liter) [15].

Metabolic studies are widely performed in Japan to identify and characterize possible markers related to production and storage processes and correlate them to the organoleptic final product characteristics, using techniques such as CE-TOF MS, GC/MS, HILIC- TOF-MS, UPLC-QTOF-MS [7]. However, no comparative study between sakes produced internationally and nationally in Brazil using MS has been performed so far.

The metabolomics consist of identifying and quantifying a vast number of components with particular physicochemical properties and different classes such as amino acids, lipids, nucleotides, etc. [16]. The use of high technology as mass spectrometry (MS) as well as its ionization techniques is employed in the identification of these substances. The electrospray ionization technique (ESI) has

contributed in the last years to the growth in the direct application of MS in different matrices in identification and comparison studies, due to the increased sensitivity of the equipment and the simplicity in the preparation of the samples [17,18].

The aim of this study was to find, identify and understand the non-target metabolic profile (absence of target metabolite) of sakes produced in Japan and Brazil using electrospray ionization (ESI) high-resolution mass spectrometry (HRMS).

Materials and Methods

Chemical and Reagents

Formic acid and methanol solutions were purchased from J.T. Baker (Xalostoc, Mexico) and used with no further purification. Deionized water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, USA).

Samples

The sake samples were divided in two groups: Japanese and Brazilian samples. The Brazilian group were purchased from commercial establishments in São Paulo and Campinas, Brazil. The Japanese samples were commercially obtained from different establishments in Japan. The entire information about the samples are described in Table 1 and 2.

Table 1: Japanese samples

<i>Identification Code</i>	<i>Location of Production</i>
SV	Yamanashi, Japão
A5	Yamanashi, Japão
8	Kyoto, Japão
9	Akita, Japão
10	Hokkaido, Japão

Table 2: Brazilian samples

<i>Identification Code</i>	<i>Location of Production</i>
AS	São Paulo, Brasil
C	São Paulo, Brasil
AD	São Paulo, Brasil
AK	São Paulo, Brasil
SPAK	São Paulo, Brasil

Samples were prepared by placing 10 μL of sake wine sample in a 1,5 mL Eppendorf tube with 990 μL of methanol:water (1:1). Subsequently, 2 μL of formic acid was added to the tube solution test.

Equipment

High-resolution mass spectra were obtained using an LTQ-XL Orbitrap Discovery instrument (Thermo Scientific, California, USA). The injection pump uses a continuous flow of 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and a 500- μL Hamilton Gastight glass syringe (Hamilton, Nevada, USA). The acquisition time was 30s in a scan range from 100 to 1000 m/z for positive mode. Experiments were carried out in five replicates.

Data management

Fingerprints obtained were processed using MetaboAnalyst 4.0 and tables of m/z values as functions of intensities were extracted from the bulk spectra. In order to identify differences between the two groups, score plots were obtained after PLS-DA of normalized data. Through the VIP score analysis was possible to verify the relevance of each marker. To identify the molecules a fragmentation by MS/MS was made for each possible marker associated with a research in metabolomic database Metlin. It was considered a 4 decimal places for mass accuracy and a mass error less than 2 ppm.

Results and Discussion

MS fingerprints are represented by figure 1 and 2. From the PLS-DA analysis presented in figure 3 it was possible to verify the statistical differences between the groups. The results found after components identification were presented in tables 3 and 4. The MS/MS fragments are presented in tables 5 and 6.

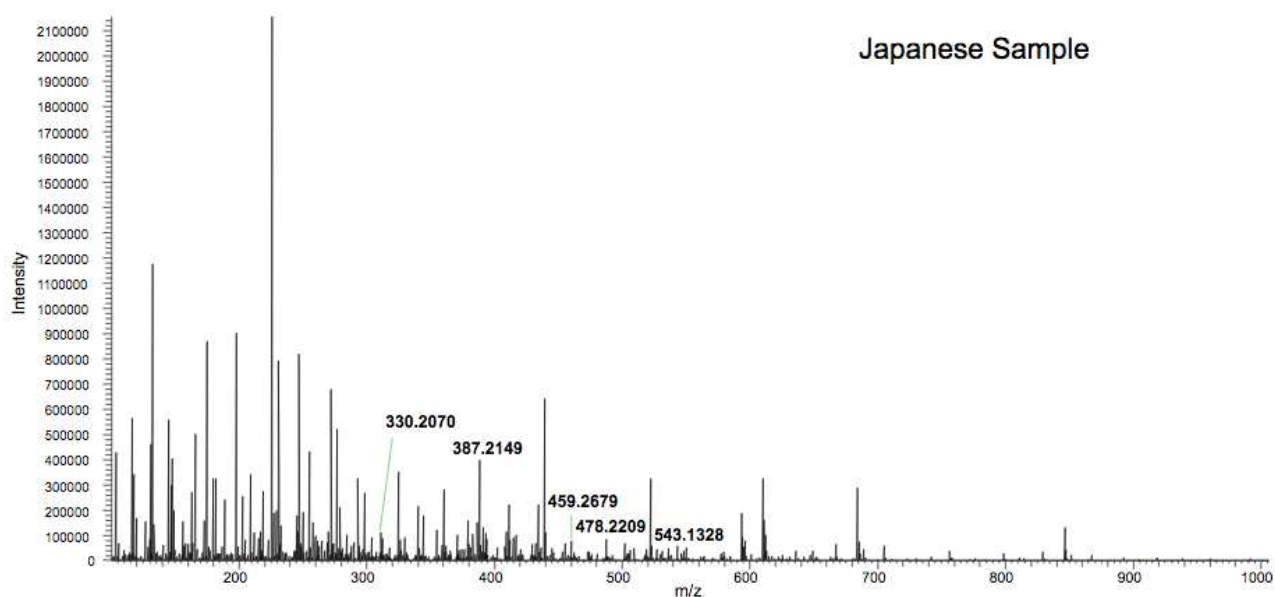


Figure 1: Representative fingerprinting of the Japanese group. The ion indications correspond to the identified markers shown in table 3.

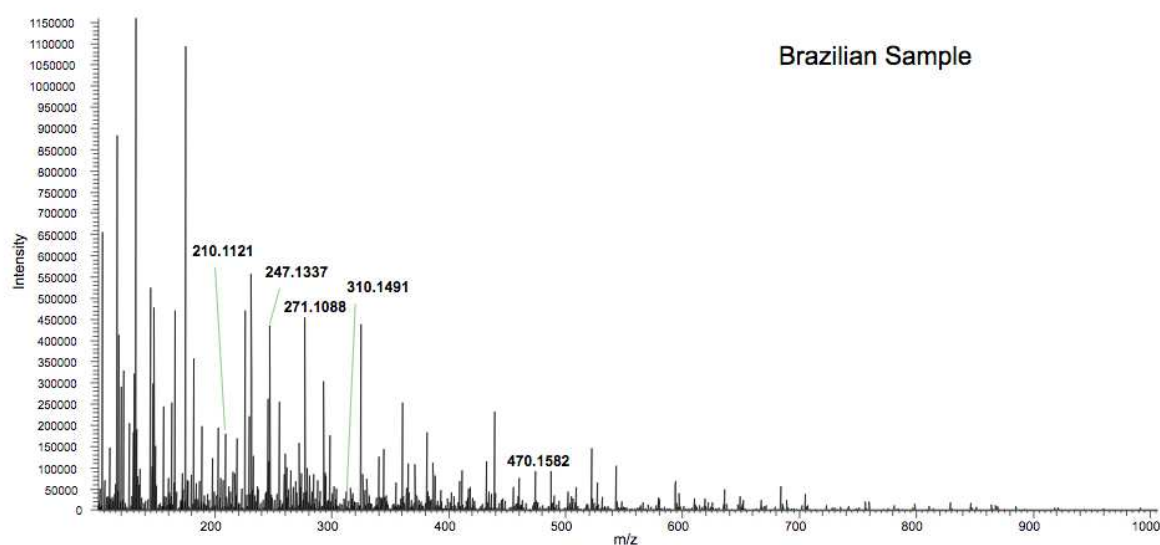


Figure 2: Representative fingerprinting of the Brazilian group. The ion indications correspond to the identified markers shown in table 4.

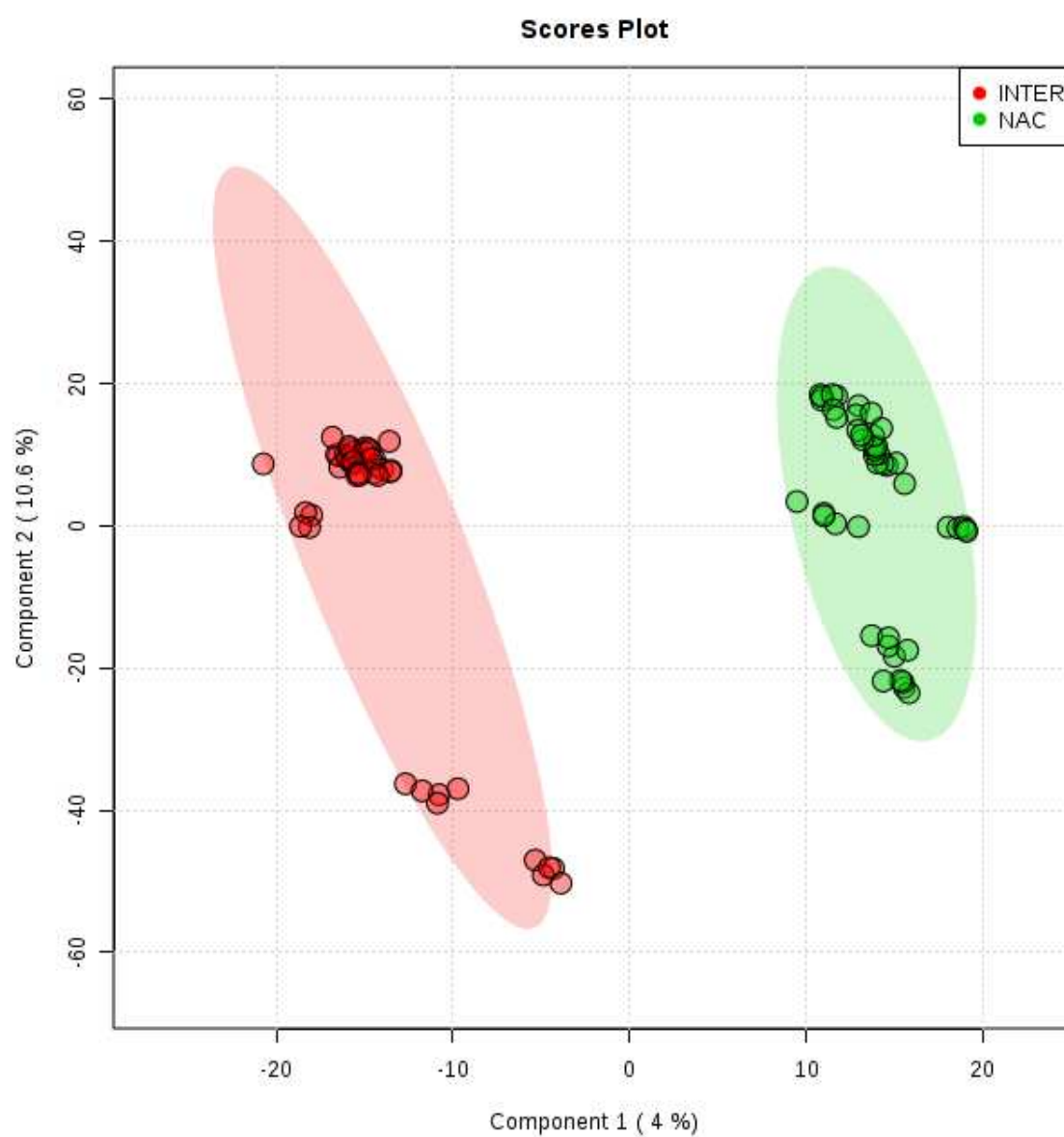


Figure 3: Score plot derived from PLS-DA illustrates the statistical evidence of metabolomics differences between Japanese and Brazilian groups. The red spots correspond to Japanese group and the green ones, to the Brazilian group.

Table 3: Japanese markers found after PLS-DA and VIP score analysis

Experimental Mass (m/z)	Theoretical Mass (m/z)	Ion	δ (PPM)	Compound	Compound Description
387.2149	387.2143	[M+K] ⁺	-1.55	Sativic acid	Product from the oxidation of linoleic acid [21]
543.1328	543.1322	[M+K] ⁺	-1.10	Raffinose	Free sugar found in developing rice grains [23]
330.2070	330.2064	[M+H] ⁺	-1.82	Tralkoxydim	Herbicide for weed control at rice [28]
459.2679	459.2677	[M+Na] ⁺	-0.44	Pangamic acid	Compound isolated from rice bran [25], also known as B15 or vitamin B15 [26]
478.2209	478.2200	[M+Na] ⁺	-1.88	Erythrosyrim	Mycotoxin produced by <i>Penicillium islandicum</i> [35]

Table 4: Brazilian markers found after PLS-DA and VIP score analysis

Experimental Mass (m/z)	Theoretical Mass (m/z)	Ion	δ (PPM)	Compound	Compound Description
470.1582	470.1576	[M+K] ⁺	-1.28	Fusarin C	Mutagenic mycotoxin produced by some <i>Fusarium</i> species [56]
310.1491	310.1496	[M+NH ₄] ⁺	1.61	Pantoyllactone glucoside	Compound present in rice seedlings that grow aerobically in the dark [48]
210.1121	210.1125	[M+H] ⁺	1.90	Propoxur	Insecticide [53]
247.1337	247.1334	[M+H-H ₂ O] ⁺	-1.21	Absciscic Acid	Stress hormone [41]
271.1088	271.1083	[M+H-H ₂ O] ⁺	-1.84	3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-1-propanoic acid	Compound produced by species of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [50]

Table 5 MS/MS fragments from Japanese markers

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)
Sativic acid	[M+K] ⁺ 387	175, 370, 352, 274
Raffinose	[M+K] ⁺ 543	525, 331, 335, 381
Tralkoxydim	[M+H] ⁺ 330	197, 169, 199
Pangamic acid	[M+Na] ⁺ 459	441, 442, 312, 261
Erythroskyrin	[M+Na] ⁺ 478	460, 461, 381, 394

Table 6: MS/MS fragments from Brazilian Markers

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)
Fusarin C	[M+K] ⁺ 470	452, 308, 424, 453
Pantoyllactone glucoside	[M+NH ₄] ⁺ 310	292, 293, 276, 219
Propoxur	[M+H] ⁺ 210	192, 191, 135, 181
Abscisic Acid	[M+H-H ₂ O] ⁺ 247	147, 229, 85, 230
3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-1-propanoic acid	[M+H-H ₂ O] ⁺ 271	224, 253, 242, 210

Japanese Sake wines

The Japanese group presented 5 markers: sativic acid, raffinose, pangamic acid, tralkoxydim and erythroskyrin, which were split into: raw material, and quality markers.

Rice Markers

The fatty acids are lipidic components which perform an important role in the structure of cell membranes and also, in several metabolic processes in different living beings [19]. Fatty acids have already been found in the composition of rice, and from that, 75% are from unsaturated type. Within this group, oleic and linoleic acids are highly predominant. The **sativic acid**, also known as 9,10,12,13-Tetrahydroxyoctadecanoic acid [20], is a product from the oxidation of linoleic acid [21] and, due to its presence in the rice composition, it can be considered a potential biomarker of rice consume and its derivatives products [22]. Other chemical compounds that can be observed in the rice composition are free sugars. Studies indicate that in developing rice grains, a high concentration of free sugars is found, such as **raffinose**, sucrose, melibiose, glucose and fructose, although the raffinose and fructose concentration are greater in rice bran [23]. The presence of these oligosaccharides in the developing grains indicates the possibility

that they are involved in hemicellulose synthesis in bran and ground rice [24]. The presence of rice bran markers may be indicative that the sakes analyzed were produced with less polished rice grains, considered as non-premium beverage types. **Pangamic acid**, also isolated from rice bran, is a compound [25], also known as B15 or vitamin B15. It is commercially sold usually in a blend form with other compounds, but is not widely recognized as a vitamin, since there is not much evidence that it is essential to the human diet and it is not yet known whether the deficiency in the consumption of pangamic acid is associated with any disease [26]. However, there are already associations of effects related to the lactic acid decrease during exercise and reduction of fatigue [25]. The compound was isolated in its crystalline form in 1951 from the rice bran and apricot seeds [27].

Quality markers

The evaluation of contaminants presence is important to determine the quality of analyzed products. **Tralkoxydim** is one of the compounds which was found and identified as a marker of Japanese sake group. This compound is utilized as herbicide for weed control at rice, wheat, barley, rye, maize and other cereals crops cultures [28]. It belongs to cyclohexanedione group, which acts on acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase), an important enzyme in biosynthesis and production of fatty acids in plants. Tralkoxydim is capable to inhibit ACCase, even in nanomolar concentrations of this enzyme, hence, it is efficient against undesired weed growth [29]. The effectiveness of herbicides depends on the application method, frequency, humidity and soil type, in addition to other environmental conditions [30]. Specifically, the cyclohexanediones group is affected by the presence of salts in the water, use of adjuvant compounds, pH, ultraviolet light and antagonistic herbicides [31], hence, it is important to consider parameters that may influence their action during utilization. Tralkoxydim belongs to toxicity category III and it is classified as a "likely to be a human carcinogen" [32]. The herbicide persistence in the soil and water after use is not considered long [33]. In 2011 the Japanese government announced a schedule for review of agricultural chemicals, and the Tralkoxydin is

one of the compounds present in the list [34]. The maximum residue level allowed for rice cultivars in the Asian country is 0.02 ppm [28], but in the present study a quantification of this compound was not performed. Another molecule evaluated as a quality marker was **Erythroskyrin**. The compound is a mycotoxin produced by *Penicillium islandicum* [35]. This fungi is widely distributed and causes the decomposition of rice, wheat, corn, and other food [36]. It produces a large amount of secondary metabolites, where at least 27 being considered as toxic [37]. Between 2003 and 2004, 1% of harvested rice in Japan showed contamination by *Penicillium*, while that rate in stored rice was higher than 13% [36]. The "Yellow rice syndrome" was related to toxic disturbances associated with consumption of rice contaminated with *Penicillium* species. Other toxins found in yellowed rice include luteoskyrin, cyclochlorotine, and islanditoxin, with each compound being quite toxic [38]. In 1950 an experiment revealed that some mycotoxins produced by *Penicillium Islandicum*, such as flavoskyrin, islandicin and erythroskyrin induced liver tumors in rats and mice [39], however their significance in human and animal health remain unclear [38]. Although cases of human poisoning have not been associated with yellowed rice, recommendations have already been made to the Japanese Government regarding the control and inspection of imported rice, as well as safety measures for the handling of domestic rice during post-harvest and long term storage [40]. A method for the analysis of Luteoskyrin, one of the compounds produced by *Penicillium Islandicum*, was able to detect and quantify mycotoxin in Chinese sakes [36]. The mycotoxin found in the present study was not quantified.

Brazilian Sakes

The Brazilian sake group presented 5 markers: abscisic acid, pantoyllactone glucoside, 3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-1-propanoic acid, propoxur e fusarin C, which were divided into: rice, cultivation, production and quality markers.

Rice markers

The abscisic acid, as known as ABA, was found as a rice marker on Brazilian group. This compound is a stress hormone which belongs to the sesquiterpenes group [41], being the main hormone in the control of the plants' survival capacity in adverse and changing environments [42], and its signalling pathway is considered a very old adaptation to the terrestrial environment [43]. ABA was initially identified in the 1960s as a growth inhibitor in cotton fruits and leaves of sycamore. Over the years, studies have already demonstrated their role as regulator of many aspects of plant growth and development, including embryo maturation, seed dormancy, germination, cell division and stretching, floral induction and responses to environmental stresses such as drought, salinity, cold, pathogen attack and UV radiation [41,44,45]. Studies report that ABA concentrations increased drastically in plants under stress conditions due to drought, in the case of wheat and avocado this increase was 40 times in relation to non-stressed plants. Another study related the increase of the concentration of ABA and its analogues in the presence of herbicides, and the results indicated that the protection of the plant against these chemical compounds can be induced by the ABA and its analogues, similar to situations of environmental stress [46].

Cultivation markers

In Brazil, two types of ecosystems are predominant in rice cultivation: the wetland and the upland. In the wetland system, flood irrigation is predominant, in which 75% of the country's national rice production is carried out in this way since it is not as dependent on climatic conditions as the other form of cultivation. This system is characterized by the creation of an anaerobic condition that promotes a series of changes in the plant development and nutrient absorption. On the other hand, the upland ecosystem is characterized by the aerobic developmental condition of the root of the plant, as it is used for most other cereals [47]. The compound found,

known as **pantoyllactone glucoside** (PLG), is present in rice seedlings that grow aerobically in the dark, accumulating, along with sugars and amino acids, in developing coleoptiles. This compound is primarily regulated by the O₂ level but has its concentration reduced in the presence of CO₂ and ethylene, which are abundant in submerged rice crops. The PLG begins to disappear as seed grows, around 5 days after sowing, being transformed into pantoyllactone primeveroside (PLP) by the action of light. No accumulation of PLG and PLP was detected in seedlings germinated and grown either aerobically in the dark or under hypoxic conditions [48]. Its function is still not very clear, but there are indications that it is related to the biosynthesis of pantothenic acid and Coenzyme A, in general, to the growth of rice seeds [49].

Production Markers

The **3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido [3,4-b] indole-1-propanoic acid** belongs to the class of organic compounds known as harmala alkaloids and is also known as 1-(2-carboxyethyl)-1,2,3,4-tetrahydro-b-carboline-3-carboxylic acid. This compound is produced by species of *Saccharomyces cerevisiae* [50] and can be found in soy and worcester sauces, yeast extract and wine [51, 52]. 3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido [3,4-b] indole-1-propanoic acid can be considered a marker of fermentative processes carried out by yeasts of the *Saccharomyces cerevisiae* type.

Quality Markers

Propoxur, also known as PHC, is a chemical compound belonging to the phenyl methylcarbamate group, being used as an insecticide. According to ANVISA the acceptable daily intake (ADI) is 0.02 mg/kg b.w, being the compound belonging to the category II (highly toxic products) in the toxicological classification of compounds [53], however, studies in mice did not present carcinogenic or

teratogenic effects to its exposure. In the human body, the carbamates, in general, are not retained, thus, do not present cumulative effects. The insecticide is used in food storage areas, domestic houses, domestic animals and culture of fruits, vegetables, ornamental plants, grapes, rice, corn, alfalfa, soybeans, cotton, sugar cane and cocoa [54]. In 2018, Propoxur was one of the insecticides that had the import tax withdrawn by the Brazilian government [55]. Another compound classified as contaminant was **Fusarin C**, a mutagenic mycotoxin produced by some *Fusarium* species [56]. In tropical countries, as in the case of Brazil, it is associated with *F. verticillioides* or *F. proliferatum* that attack cultivars of rice, corn and some fruits [57]. A study analyzed 350 seeds of 10 rice cultivars in Rio Grande do Sul and the percentage of *Fusarium* species found was 1.8% [58]. Mycotoxins cause large economic impacts on Brazilian agriculture, since the infection of grains and sub-products during storage and harvesting makes these foods unfeasible for consumption. It is estimated that during the production, transport or storage stage 25% of the world's food is affected by fungal growth. In the human body, mycotoxins produced by *Fusarium* species can lead to symptoms such as diarrhea, loss of air, starvation, loss of muscle tone, anorexia, encephalopathy and hepatic necrosis, which may potentialize some diseases [59]. The presence of abscisic acid can be directly related to the identification of Propoxur and Fusarin C, since the hormone is responsible for protecting the plant in stress situations.

According to table 7 it is possible to make a direct comparison between the markers found in the analyzed groups.

Table 7: Comparative of markers between the groups

Markers	Japanese	Brazilian
Rice	Sativic acid	
	Raffinose	Absciscic Acid
	Pangamic acid	
Production		3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-1-propanoic acid
Cultivation		Pantoyllactone glucoside
Quality	Erythroskyrin	Fusarin C
	Tralkoxydim	Propoxur

Conclusion

The ESI-HRMS demonstrated to be a simple and rapid approach to analyze complex mixtures, such as sake. The technique is convenient due to fast injection and small sample size requirement. When associated with PLS-DA and VIP score, the results are capable to demonstrate the differences between the groups from the same beverage type. MS shows evidence that the sake production process is similar in Brazil, however other elements have influence in the final product, such as, environment, supplies, raw materials and climate. This can also be a mode to evaluate the quality and contaminants presence, such as pesticides and mycotoxins. This approach suggests an alternative to learn and comprehend the sake production process and the raw materials used in other countries, and furthermore, improve and complement the existing processes.

Author contributions

PS, KI and TG performed the experiments. PS, FA and JD performed data analysis. PS wrote the manuscript. RC idealized all experiments and managed the research group.

References

1. Kotaka A, Bando H, Kaya M, Murai MK, Kuroda K, Sahara H, et al. Direct ethanol production from barley β -glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae* β -glucosidase and endoglucanase. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*. 2008;105(6):622-7.
2. Anzawa Y, Nabekura Y, Satoh K, Satoh Y, Ohno S, Watanabe T, et al. Polishing Properties of Sake Rice Koshitanrei for High-Quality Sake Brewing. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*. 2013;77(10):2160-5.

3. Yoshizawa K. Sake: Production and flavor. *Food Reviews International*. 1999;15(1):83-107.
4. Yazawa H, Tokuoka M, Kozato H, Mori Y, Umeo M, Toyoura R, et al. Investigation of relationship between sake-making parameters and sake metabolites using a newly developed sake metabolome analysis method. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019;1723(18):30251-2.
5. Furukawa SI, Isogai A, Kusaka K, Fujii T, Wakai Y. Identification of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one as the characteristic aroma of sake made from low-glutelin rice. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*. 2017;123(2):209-15.
6. Japan Sake and Shochu Makers Association and National Research Institute of Brewing. *A Comprehensive Guide to Japanese Sake*. Tokyo: Japan Sake and Shochu Makers Association and National Research Institute of Brewing; 2011.
7. Ichikawa E, Hirata S, Hata Y, Yazawa H, Tamura H, Kaneoke M, et al. Analysis of metabolites in Japanese alcoholic beverage sake made from the sake rice Koshitanrei. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*. 2019;1-13.
8. Makoto K. SAKE Alcoholic Beverage Production in Japanese Food Industry. In: Muzzalupo I, editor. *Food Industry*. 2013.
9. LIU, Keshun. Food Use of Whole Soybeans. *Soybeans*. 2008;441-81.
10. AKAO, Takeshi. Progress in the genomics and genome-wide study of sake yeast. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*. 2019;5:1-10.
11. Takao Y, Takahashi T, Yamada T, Goshima T, Isogai A, Sueno K, et al. Characteristic features of the unique house sake yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Km67 used for industrial sake brewing. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*. 2018;126(5):617-23.
12. Terasaki M, Miyagawa S, Yamada M, Nishida H. Detection of Bacterial DNA During the Process of Sake Production Using Sokujo-Moto. *Current Microbiology*. 2018;75(7):874-9.
13. Oliveira N. O Japão dentro do Brasil [internet]. Brasília: Ministério do Turismo; [updated 2017 Jun 16; cited 2019 Jun 12]. Available from: <http://www.turismo.gov.br/últimas-notícias/7896-o-japão-dentro-do-brasil.html>.

14. Silva OF. ÁRVORE DO CONHECIMENTO Arroz: Estatísticas de produção [internet]. Brasília: Agência Embrapa de Informação Tecnológica (Ageitec); [updated 2017 Jun 06; cited 2019 Jun 12]. Available from: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fe7457q102wx5eo07qw4xezy8czjj.html>.
15. BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei Nº 8.918, de 4 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União - Seção 1 - 5/6/2009, Página 20.
16. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 2006;26(1):51-78.
17. Vivian AF, Aoyagui CT, Noin DO, Catharino RR. Mass spectrometry for the characterization of brewing process. *Food Research International*. 2016;89(1):281-8.
18. Riccio MF, Saraiva SA, Marques LA, Alberici R, Haddad R, Moller JC, et al. Easy mass spectrometry for metabolomics and quality control of vegetable and animal fats. *European Journal Of Lipid Science And Technology*. 2010;112(4):434-8.
19. Martin CA, Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, Souza NE, et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*. 2006;19(6):761-70.
20. Kimm R, Noguchi T. On the Chemical Constituents of Rice-embryo. *Bulletin Of The Agricultural Chemical Society Of Japan*. 1933;9(7-9):94-105.
21. Fryer PJ, Weston FE. *Technical Handobook of oils, fats and waxes*. Vol 1. Cambridge: Cambridge at the university press; 1918.
22. Showing Compound Sativic acid (FDB006421) [internet]. Canada: FoodDB; [cited 2019 Jun 12]. Available from: <http://foodb.ca/compounds/FDB006421>.
23. PASCUAL, Cynthia G.; SINGH, Rangil; JULIANO, Bienvenido O. Free sugars of rice grain. *Carbohydrate Research*. 1978;62(2):381-5.
24. SINGH R, JULIANO BO. Free Sugars in Relation to Starch Accumulation in Developing Rice Grain. *Plant Physiology*. 1977;59(3):417-21.

25. Gray ME, Titlow LW. B15: Myth or Miracle? The Physician and Sportsmedicine. 1982;10(1):107–12.
26. Showing metabocard for Pangamic acid (HMDB0029949) [internet]. Canada: FooDB; [cited 2019 Jun 12]. Available from: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0029949>.
27. French WN, Levi L. Pangamic Acid (Vitamin B₁₅, Pangametin, Sopangamine) Its Composition and Determination in Pharmaceutical Dosage Forms. Canadian Medical Association Journal. 1966;94(22):1185–7.
28. Table of MRLs for Agricultural Chemicals - Agricultural Chemical : TRALKOXYDIM [internet]. Japan: THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. [cited 2019 Jun 12]. Available from: http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=43700.
29. Srivastava A, Gupta KC, Singh G. Dissipation of tralkoxydim herbicide from wheat crop and soil under sub-tropical conditions. Pesticide Science. 1995;43(1),53–5.
30. Balyan RS, Malik RK, Panwar RS. Effects of rates, times and methods of application of tralkoxydim on wild oat (*Avena ludoviciana*) in wheat. Tropical Pest Management. 1992;38(4):411–5.
31. Villiers BL, Kuds P, Smit JJ, Mathiassen SK. Tralkoxydim: adjuvant, MCPA and other effects. Weed Research. 2001;41(6):547–56.
32. United States Environmental Protection Agency (EPA). Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7501C) [internet]. Pesticide Fact Sheet: Tralkoxydim. 1998 Dec 4. Available from: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-121000_04-Dec-98.pdf.
33. Srivastana A, Grupta KC. Dissipation of Tralkoxydim in Water-Soil System. Journal of Pesticide Science. 1994;19(3):145–9.
34. Japan Announces JFY 2011 Review Schedule for Agricultural Chemicals [internet]. Japan: USDA FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE (United States) . [updated 2011 May 19; cited 2019 Jun 12]. Available from:

[http://www.usdajapan.org/en/reports/Japan%20announces%20JFY2011%20Review%20Schedule%20for%20Agricultural%20Chemicals%20\(2\).pdf](http://www.usdajapan.org/en/reports/Japan%20announces%20JFY2011%20Review%20Schedule%20for%20Agricultural%20Chemicals%20(2).pdf).

35. Showing metabocard for Erythroskyrin (HMDB0030464) [internet]. Canada: FooDB; [cited 2019 Jun 12]. Available from: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0030464>.

36. Peng Q, Tian R, Li B, Hu J, Meng Y, Wang J. Determination of Luteoskyrin in Rice Wine by High-Performance Liquid Chromatography–Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Letters*. 2014;48(1):9–15.

37. Kozakiewicz Z. Occurrence and Significance of Storage Fungi and Associated Mycotoxins in Rice and Cereal Grains. Highley E, Johnson GI. Mycotoxin Contamination in Grains. Papers presented at the 17th ASEAN Technical Seminar on Grain Postharvest Technology; Lumut 1995 Jul 25-27 .Lumut: ACIAR; 1996.18-26.

38. Pitt JI. Penicillium Toxins. Champ BR, Highley E, Hocking AD, Pitt JI. Proceedings of an international conference held at Bangkok; 1991 Apr 23-26; Bangkok. Thailand. ACIAR; 1991. 99-103.

39. Tsunoda H. Micro-organisms which deteriorate stored cereals and grains. "In": Herzberg M: Proceedings of the First US - Japan Conference on Toxic Micro-organisms; 1968 Oct 7-10; Hawaii, US. Washington: UJNR and US department of interior; 1970.

40. Udagawa S, Tatsuno T. Safety of rice grains and mycotoxins - a historical review of yellow rice mycotoxicoses. *Yakushigaku Zasshi*. 2004;39(2):321-42. Japanese.

41. Srivastava LM. Absciscic Acid. *Plant Growth and Development*. 2002;217-32.

42. Chen CW, Yang YW, Lur HS, Tsai YG, Chang MC. A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development. *Plant Cell Physiology*. 2006;47(1).

43. American Society of Plant Biologists. Absciscic acid. *The plant cell*. 2012;22(12):tpc.110.tt1210.

44. Xu J, Audenaert K, Hofte M, Vleeschauwer D. Absciscic Acid Promotes Susceptibility to the Rice Leaf Blight Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* by

- Suppressing Salicylic Acid-Mediated Defenses. PLoS ONE. 2013; 8(7): e67413. Corrected and republished from: PLoS ONE. 8(7): 10.1371/annotation.
45. Finkelstein R. Absciscic Acid Synthesis and Response. The Arabidopsis Book. 2013; 2013(12):e0166.
 46. Devine MD, Harren JC, Abrams SR, Gusta LV. Effect of drought stress, absciscic acid, and absciscic acid analogues on the efficacy of diclofop-methyl and tralkoxydim. Journal of Plant Growth Regulation. 1995;14(2):77–84.
 47. Santos AB. ÁRVORE DO CONHECIMENTO Arroz: Sistema de cultivo [internet]. Brasília: Agência Embrapa de Informação Tecnológica (Ageitec); [cited 2019 Jun 12]. Available from: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000g1wcnzza02wx5ok0ha2lipwbeel46.html>.
 48. Menegus F, Lilliu I, Scaglioni L. A unique pantoyllactone glycoside system is activated in rice seedlings developing aerobically in the dark. Physiologia Plantarum. 2002;116(3):299-307.
 49. Scaglioni L, Selva A, Cattaruzza L, Menegus F. Pantoyllactone Primeveroside Structure and its Distribution with Pantoyllactone Glucoside in Rice Seedling Organs. Natural Product Letters. 2000;14(3)159–66.
 50. 3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-1-propanoic acid (YMDB01492) [internet]. Canada: YMDB; [cited 2019 Jun 12]. Available from: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB01492>.
 51. Showing metabocard for 3-Carboxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-1-propanoic acid (HMDB0034881) [internet]. Canada: HMDB; [cited 2019 Jun 12]. Available from: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0034881>.
 52. Yannai S. Dictionary of Food Compounds with CD-ROM. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2012.
 53. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Índice monografico P19: Propoxur. [cited 2019 Jun 12]. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/p19.pdf/98a847cd-0eee-483d-b7ea-2dfbd382365f>.

54. Kussumi TA. Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* e sua certificação [dissertação]. São Paulo: Instituto de pesquisas energéticas e nucleares - Autarquia associada à Universidade de São Paulo; 2007.
55. Gecex aprova retirada do imposto de importação de inseticida usado no plantio de soja e milho [internet]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; [updated 2018 Sep 26; cited 2019 Jun 12]. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/gecex-aprova-retirada-do-imposto-de-importacao-de-inseticida-usado-no-plantio-de-soja-e-milho>.
56. Mirocha CJ, Abbas HK, Kommedahl T, Jarvis BB. Mycotoxin Production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* Isolated from *Baccharis spp.* from Brazil. *Applied And Environmental Microbiology*. 1989;55(1):254-5.
57. Batt CA, Tortorello ML. *Encyclopedia of food microbiology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2014.
58. Franco DF, Ribeiro AS, Alcêu S, Nunes CD, Ferreira E. Fungos associados a sementes de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*. 2001;7(3):235-6.
59. Gonçalves B, Santana L, Pelegrini P. Micotoxinas: uma revisão sobre as principais doenças desencadeadas no organismo humano e animal. *Revista da Saúde da Fiaciplac*. 2017;4(1):1-12.
60. Macías F, Chinchilla N, Valera RM, Molinillo JMG. Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. *Steroids*. 2006;71(7):603-8.

DISCUSSÃO GERAL

Através dos *fingerprintings* obtidos a partir dos grupos analisados foi possível verificar que existem compostos comuns entre os saquês japoneses e brasileiros, entretanto, o perfil geral dos espectros é diferente, revelando características específicas à cada grupo. Após a avaliação do PLS-DA foi possível confirmar a separação e diferenciação entre os grupos japoneses e brasileiros, ainda que dentro dos próprios grupos houvesse uma diferenciação, evidenciando uma necessidade de considerar todas as etapas e processos envolvidos na produção da bebida como relevantes aos compostos encontrados nos produtos finais. Subsequente a análise de VIP score definiu-se a relevância de cada marcador, sendo possível identificá-los e relacioná-los a cada etapa do processo de produção.

Os processos de produção dos saquês japoneses são mais conhecidos e divulgados em estudos científicos, justamente pela importância e tradição da bebida no país, entretanto, no caso dos saquês brasileiros, quase nenhuma informação a respeito do tratamento de matéria-prima e processo produtivo empregado é divulgada. Os marcadores encontrados forneceram evidências de como essa produção é realizada no Brasil.

A identificação de marcadores de arroz nos dois grupos foi importante, já que o grão é a principal matéria-prima utilizada na produção do sake, sendo dessa forma, uma evidência de que o arroz foi utilizado no processo. A diferença entre os tipos utilizados, o modo de cultivo, tratamento e preparo dos grãos pode ser a razão pela qual diferentes marcadores de arroz terem sido encontrados nos grupos comparados. No grupo Brasileiro, ainda foram definidos marcadores relacionados ao modo de cultivo do arroz, em um sistema de produção aeróbico, também conhecido como terras altas e marcadores de processo de produção fermentativo empregado no preparo da bebida. Os pesticidas, assim como os outros compostos

encontrados, não foram quantificados, mas é importante avaliar a presença desses compostos, já que apesar de processos de fermentação e, possível, pasteurização ainda foram encontrados nos produtos finais.

CONCLUSÃO

O trabalho alcançou seu objetivo, pois a técnica empregada foi capaz de encontrar e identificar compostos presentes nas amostras analisadas, de uma maneira rápida e simples. Ainda foi possível entender melhor o processo de produção da bebida através de associações dos marcadores encontrados com as etapas de produção já conhecidas em literatura.

A análise foi uma maneira de evidenciar que muitos fatores acabam influenciando na composição química do produto final, desde o manuseio da matéria-prima à processos empregados na fabricação do produto. Além disso, pode ser uma abordagem para controle de qualidade da bebida, já que foram encontrados contaminantes nos produtos.

O estudo abre uma janela para mais estudos de melhoramento de produto e processo de bebidas alcoólicas como os saquês.

REFERÊNCIAS

1. Kitagaki H, Kitamoto K. Breeding Research on Sake Yeasts in Japan: History, Recent Technological Advances, and Future Perspectives. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2013;4(1):215–35.
2. Motoyama S. Kasato-Maru. *Estud. av.* [internet]. 2011; [cited 2019-06-18] 25(72): [323-326]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142011000200025&lng=en&nrm=iso.
3. Katou T, Kitagaki H, Akao T, Shimoi H. Brewing characteristics of haploid strains isolated from sake yeast Kyokai No. 7. *Yeast*. 2008;25(11):799-807.
4. Murooka Y, Yamshita M. Traditional healthful fermented products of Japan. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2008;35(8):791–8.
5. Furukawa S, Tanaka K, Masumura T, Ogihara Y, Kiyokawa Y, Wakai Y. Influence of Rice Proteins on Eating Quality of Cooked Rice and on Aroma and Flavor of Sake. *Cereal Chemistry Journal*. 2006;83(4):439–46.
6. Arachchige LNK, Illeperuma CK, Wewegama LB, MHW Gunawardhane. Quality of Rice Wine as Affected by Rice Polishing Ratio. *Tropical Agricultural Research* [internet]. 2006; [acessado em 15 Jun 2019]: [em torno de 10 p.]. Disponível em: https://www.pgia.ac.lk/files/Annual_congress/journal/v18/11.pdf.
7. Mizuma T, Kiyokawa Y, Wakai Y. Water absorption characteristics and structural properties of rice for sake brewing. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008;106(3):258–62.
8. Yoshida S, Ikegami M, Kuze J, Sawada K, Hashimoto Z, Ishii T, et al. QTL Analysis for Plant and Grain Characters of Sake-brewing Rice Using a Doubled Haploid Population. *Breeding Science*. 2002;52(4):309–17.
9. Tamaki M, Kurita S, Toyomaru M, Itani T, Tsuchiya T, Aramaki I, et al. Difference in the Physical Properties of White Core and Non-White-Core Kernels of the Rice Varieties for Sake Brewing is Unrelated to Starch Properties. *Plant Production Science*. 2006;9(1):78–82.

10. Japan Sake and Shochu Makers Association and National Research Institute of Brewing. A Comprehensive Guide to Japanese Sake. Tokyo : Japan Sake and Shochu Makers Association and National Research Institute of Brewing; 2011
11. Uno T, Itoh A, Miyamoto T, Kubo M, Kanamaru K, Yamagata H, et al. Ferulic Acid Production in the Brewing of Rice Wine (Sake). *Journal of the Institute of Brewing*. 2009;115(2): 116–21.
12. Yoshizawa K. Sake: Production and flavor. *Food Reviews International*. 1999;15(1):83–107.
13. Departamento de informática em saúde. Relatório básico: Bebida alcoólica, arroz (saque) [internet]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo; [atualizado em 3 Out 2016; acessado em 13 Jun 2019]. Disponível em: <https://tabnut.dis.epm.br/alimento/43479/bebida-alcoolica-arroz-saque>.
14. Takahashi K, Kabashima F, Tsuchiya F. Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry reveals the correlation between chemical compounds in Japanese sake and its organoleptic properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016;121(3):274–80.
15. Sugimoto M, Koseki T, Hirayama A, Abe S, Sano T, Tomita M, et al. Correlation between Sensory Evaluation Scores of Japanese Sake and Metabolome Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(1):374–83.
16. Oishi K, Tominaga M, Kawato A, Abe Y, Imayasu S, Nanba A. Application of fuzzy control theory to the sake brewing process. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1991;72(2):115–21.
17. Guerra CC, Mandelli F, Tonietto J, Zanús MC, Camargo UA. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos [internet]. Bento Gonçalves: Embrapa uva e vinho; 2005.
18. Rosa NA, Afonso JC. A química da cerveja. *Química nova na escola*. 2015;37(2):98-105.
19. Rebello FFP. Produção de cerveja. *Revista agrogeoambiental*. 2009; 1(3): 145-55.

20. CISA - Centro de informação sobre saúde e álcool. Relatório global sobre álcool e saúde - 2018 [internet]. São Paulo: CISA; [atualizado em 21 Set 2018 2018; acessado em 13 Jun 2019]. Disponível em: <http://www.cisa.org.br/artigo/10049/relatorio-global-sobre-alcool-saude-2018.php>.
21. Heath DB, Waddell JO, Everett MW. Cross-cultural approaches to the study of alcohol: an interdisciplinary perspective. Paris: Mouton Publishers; 1976.
22. Nobuyuki MR, Souza AJ. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. *Acta Amazonica*. 2003;33(3):489-98.
23. Bogusz Junior B, Ketzer DCM, Gubert R, Andrades L, Gobo AB. Composição química da cachaça produzida na região Nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2006;26(4):793-8.
24. Andrade JS, Pantoja L, Maeda RN. Melhoria do rendimento e do processo de obtenção da bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). *Food Science and Technology*. 2003; 23 Suppl 0:34-8.
25. Miranda MB, Martins NGS, Belluco AES, Horii J, Alcarde AR. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008;28(1):84-9.
26. Moraes V, Locatelli C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. *Evidência*. 2010;10 (1-2):57-68.
27. Nagato LAF, Duran MC, Caruso MSF, Barsotti RCF, Badolato ESG. Monitoramento da autenticidade de amostra de bebidas alcoólicas enviadas ao instituto Adolfo Lutz em São Paulo. *Ciência e tecnologia de alimentos*. 2001;21(1):39-42.
28. Nascimento RF, Cerroni JL, Cardoso DR, Lima NBS, Franco DW. Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. *Food Science and Technology*. 1998;18(3):350-6.
29. Plutowska B, Wardencki W. Application of gas chromatography–olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. *Food Chemistry*. 2008;107(1):449-63.

30. Dragone G, Mussatto SI, Oliveira JM, Teixeira JA. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*. 2009;112(4):929-35.
31. Campo E, Cacho J, Ferreira V. Solid phase extraction, multidimensional gas chromatography mass spectrometry determination of four novel aroma powerful ethyl esters: Assessment of their occurrence and importance in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*. 2007;1140(1-2):180-8.
32. Conacher HB, Page BD, Lau BP, Lawrence JF, Bailey R, Calway P, et al. Capillary column gas chromatographic determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*. 1987;70(4):749-51.
33. Bolaños PP, González RR, Frenich AG, Vidal LM. Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008;1208(1-2):16-24.
34. Vandell VE, Limbach P. Overview of Biochemical Applications of Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 2017;514–516.
35. CS Ho, CWK Lam, MHM Chan, RCK Cheung, LK Law, LCW Lit, et al. *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*. Clinical Biochemistry. 2003;24.
36. Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3th ed. Brussels: Wiley; 2007.
37. Cooks RG, Ouyang Z, Takats Z, Wiseman J. Ambient Mass Spectrometry. *Science*. 2006;311(5767):1566-70.
38. Fenn J, Mann M, Meng C, Wong S, Whitehouse C. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64–71.
39. Vivian AF, Aoyagui CT, Noin DO, Catharino RR. Mass spectrometry for the characterization of brewing process. *Food Research International*. 2016;89(1):281-8.

40. Cabral EC. Utilização da técnica de *fingerprinting* por espectrometria de massas para análise de extratos de produtos naturais [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química; 2010.
41. Catharino RR, Haddad RG, Helena T, Eberlin MN, Santos LS. Fast Analysis of Taurine in Energetic Drinks by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011;22(4):801-6.
42. Alves JO. Controle de qualidade de azeite de oliva extra virgem e misturas diesel/biodiesel utilizando espectrometria de massas e validação multivariada [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas; 2014.