

**MARIA FRANCESCA RICCIO**

**USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COMO FERRAMENTA  
METABOLÔMICA E CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEOS  
VEGETAIS E GORDURAS ANIMAIS**

**Campinas**

**2011**

**i**





**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA**

**Maria Francesca Riccio**

---

**USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COMO FERRAMENTA  
METABOLÔMICA E CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEOS  
VEGETAIS E GORDURAS ANIMAIS**

---

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do título de Mestre em  
Ciência Médicas, área de Ciências Biomédicas.

**CAMPINAS – SP**

**2011**

iii

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

R419u Riccio, Maria Francesca  
    Uso da espectrometria de massas como ferramenta metabolômica e controle de qualidade de óleos vegetais e gorduras animais. / Maria Francesca Riccio. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

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

1. Metabolômica. 2. Espectrometria de massa. 3. Controle de qualidade. 4. Óleos vegetais. I. Catharino, Rodrigo Ramos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Use of mass spectrometry as a metabolomic tool and quality control of vegetable oils and animal fats**

**Keywords:**

- **Metabolomic**
- **Mass spectrometry**
- **Quality of control**
- **Vegetable oils**

**Titulação: Mestrado em Ciências Médicas**  
**Área de Concentração: Ciências Biomédicas**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino**  
**Prof. Dr. Regina Sparrapan**  
**Prof. Dr. Deborah Helena Markowicz Bastos**

**Data da defesa: 11-03-2011**

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
**Maria Francesca Riccio**

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

**Membros:**

1. Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino -



2. Profa. Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos -



3. Profa. Dra. Regina Sparrapan -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 11/03/2011**

**Aos meus pais, Angelo e Atenas e a minha filha Laura Muriel,  
com amor e gratidão,**

## **Agradecimentos**

À Banca Examinadora pela leitura e pela valiosa correção desta tese, o meu “muito obrigada”;

Ao meu orientador, Professor e acima de tudo, amigo Rodrigo, pelo incentivo, força e apoio efetivo de sempre, um orientador da ciência e da vida;

Aos meus pais, Angelo (de onde ele estiver) e Atenas, por todo o esforço na minha educação e no apoio na carreira em que escolhi seguir;

À minha filha Laura Muriel, minha maior companheira em todos os momentos;

A toda equipe e Família do Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, em especial ao Prof Dr Marcos Nogueira Eberlin, por permitir tanto aprendizado, com tecnologia de última geração, base do que sou hoje;

A Profa Dra Regina e a Dra Patrícia, pelo imenso auxílio na escrita, na correção e pela amizade eterna;

Aos amigos Renato Haddad, Sérgio, Lygia, Alexandra, Rosana pela efetiva participação neste trabalho;

A minha família, em especial, ao meu irmão Farid, à minha cunhada e irmã Lúcia e aos meus amados sobrinhos Luciana, Marcello, Fernanda, Luiz Carlos, Jrene, Aloma, Maurício e João;

À Família CAEP, em especial ao Dr Pedro Serafim, ao Dr Ulisses e a minha grande amiga Ana Cláudia (minha Ne), pelo incentivo à pesquisa e à ciência;

Aos meus grandes professores que foram os meus guias para alcançar este título;

À Deus, por ter me criado e estar ao meu lado, sempre me protegendo e guiando;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

***“No meio de toda dificuldade encontra-se a oportunidade”***

*Albert Einstein*

## RESUMO

Este trabalho direcionou-se ao controle de qualidade de óleos vegetais e gorduras animais pelo emprego de análise de baixa massa molecular pela técnica *EASI-MS* utilizando a ferramenta metabolômica. As matérias-primas graxas (óleos e gorduras vegetais e animais) e os produtos sintetizados a partir destes insumos são misturas complexas, com aplicações e valores agregados variados como por exemplo para a nutrição humana, aplicações industriais na produção de lubrificantes, biodiesel, plasticidas, surfactantes, entre outros. As técnicas disponíveis como Cromatografia gasosa (GC) com detector de ionização de chama (FID) ou acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS) tem sido as técnicas mais utilizadas para caracterizar óleos e gorduras, através da determinação da composição de ácidos graxos. Como a caracterização da composição graxa destas matrizes são muitas vezes restritas, exigindo a necessidade de procedimentos laboriosos como extrações, purificações que requerem muito tempo utilizamos neste trabalho uma recente técnica de ionização ambiente de espectrometria de massas: *EASI-MS* (*easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*) na caracterização de óleos vegetais e gorduras animais que dispensa o emprego de processos de derivatização química e a separação cromatográfica. Neste trabalho aplicamos a metabolômica para elucidação de um conjugado de marcadores taxonômicos de óleos nunca observados ou analisados em conjunto antes, principalmente ácidos graxos e bifenóis os quais podem ser extraídos de maneira simples e eficaz. Para a caracterização dos componentes existentes no metaboloma de óleos de origem vegetal e animal e para a caracterização de azeites de oliva de diferentes procedências, uma simples extração com uma solução hidroalcoólica foi utilizada. O extrato foi adicionados à uma superfície de vidro para dessa forma, serem injetados para dentro do equipamento de massas e então analisados. O equipamento utilizado foi um Q-Trap<sup>TM</sup> utilizando uma fonte de *EASI* construída por pesquisadores do Laboratório ThoMSon de espectrometria de massas (IQ/UNICAMP). Os espectros de massas obtidos demonstraram a presença de ácidos graxos livres além de bifenóis característicos de cada tipo de óleo ou gordura analisado. A presença na mesma análise (espectro) demonstrou que mesmo para amostras complexas, a técnica se mostra aplicável para a identificação, caracterização e controle de qualidade de maneira inequívoca para óleos e gorduras.

## ABSTRACT

This work is directed to quality control of vegetable oils and animal fats by the use of low molecular analysis of the EASI-MS technique using the metabolomics tool. Raw materials greases (oils and vegetable and animal fats) and the products synthesized from these inputs are complex mixtures, with varying applications and value added such as for human nutrition, industrial applications in the lubricants production, biodiesel, plasticity, surfactants, among others. The available techniques such as chromatography (GC) with flame ionization detector (FID) and coupled to a mass spectrometer (GC-MS) has been the most widely used techniques to characterize oils and fats by determining the fatty acid composition. To characterize the grease composition of these matrices are often restricted, requiring the need of laborious procedures such as extractions, purifications that require much time, in this work we used a recent technique ambient ionization mass spectrometry: EASI-MS (Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry) in the characterization of vegetable oils and animal fats does not require the use of chemical derivatization procedures and chromatographic separation. In this work we have applied metabolomics to elucidate a combination of taxonomic markers oils never observed or analyzed together before, mainly fatty acids and biphenols which can be extracted in a simple and effective process. To characterize the metabolome of existing components in vegetable oils and animal and for the characterization of olive oils from different sources, a simple extraction with a water-methanol solution was used. The extract was added to a glass surface to thereby be injected into the spectrometer and then analyzed. The equipment used was a Q-Trap<sup>TM</sup> using a source of EASI built by researchers at the Thomson Laboratory of mass spectrometry (Institute of Chemistry / UNICAMP). The mass spectra obtained showed the presence of free fatty acids besides biphenols characteristic of each type of oil or fat analyzed. The presence in the same analysis (spectrum) showed that even for complex samples, the technique proves to be applicable to the identification, characterization and quality control unequivocally for oils and fats.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. Introdução Geral.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Espectrometria de Massas e a Metabolômica em Alimentos.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Técnicas de Ionização aplicadas a Alimentos.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Aplicações da ionização por EASI (EASI-MS).....</b>	<b>23</b>
<b>1.4 Análise de Óleos pelo emprego de EASI-MS como Ferramenta Metabolômica.....</b>	<b>24</b>
<b>1.5 Características gerais de óleos e gorduras.....</b>	<b>26</b>
<b>2. Objetivo Geral.....</b>	<b>28</b>
<b>3, Objetivos Específicos.....</b>	<b>28</b>
<b>4. Materiais e Métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Reagentes e Amostras.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Procedimento Experimental.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.1. Preparo das amostras.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.2. Condições instrumentais.....</b>	<b>30</b>
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1. Aspectos Gerais.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2. Caracterização dos Óleos e Gorduras.....</b>	<b>36</b>
<b>5.3. Caracterização dos Azeites de Diferentes Origens.....</b>	<b>38</b>
<b>5.4. Análise Exploratória dos Dados.....</b>	<b>40</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>41</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AG</b>	Ácidos graxos
<b>EASI – MS</b>	<i>Easy Ambient SonicSpray Ionization – Mass Spectrometry</i> - Espectrometria de massas com ionização por <i>Easy ambient sonic spray</i> .
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i> – ionização por electrospray
<b>L</b>	<i>linoleic</i> – linoléico
<b>Ln</b>	<i>linolenic</i> - linolênico
<b>M</b>	<i>myristic</i> – mirístico
<b>MALDI</b>	<i>Matrix Assisted Laser Dessorption Ionization</i> – Ionização e Dessorção a Laser assistida por matriz
<b>MH<sup>+</sup> / MH<sup>-</sup></b>	Molécula ionizada (protonada / desprotonada)
<b>Mo</b>	<i>myristoleic</i> – miristoléico
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> - Espectrometria de Massas
<b>m/z</b>	razão massa carga
<b>O</b>	<i>oleic</i> – oléico
<b>P</b>	<i>palmitic</i> - palmítico
<b>PC</b>	<i>Principal component</i> – Componente principal
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i> – Análise por componente principal
<b>Po</b>	<i>palmitoleic</i> – palmitoléico
<b>PT</b>	<i>pentadecilic</i> – pentadecílico
<b>Q ou q</b>	Quadrupolo
<b>S</b>	<i>stearic</i> – esteárico
<b>SSI</b>	<i>Sonic Spray Ionization</i> – ionização por <i>spray</i> super sônico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ferramentas omicas na nutrição e saúde. Genômica, proteômica e metabolômica integradas na Ciência da Nutrição e na promoção de saúde. Figura modificada de Fialho E.....	14
<b>Figura 2:</b> Ionização por MALDI.....	20
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de Ionização por ESI.....	21
<b>Figura 4:</b> Espectro da proteína A de peso molecular 45.000 Da.....	22
<b>Figura 5:</b> Equipamento de ESI-MS/MS.....	23
<b>Figura 6:</b> Exemplo de uma molécula de triacilglicerídeo (TAG), derivado da reação do glicerol com três moléculas de ácido dodecanóico.....	26
<b>Figura 7:</b> Uma foto ilustrativa do equipamento Q-TRAP (acima) e um esquema da configuração interna do equipamento (abaixo).....	30
<b>Figura 8:</b> Uma foto da fonte EASI utilizada nas análises: A) posições de ajustes (XYZ), B) tubulação do gás de nebulização (N <sub>2</sub> ), C) câmera, D) dispositivo de <i>Sonic Spray</i> , E) Luz, F) orifício do cone, G) capilar de <i>Sonic Spray</i> em aço inox, H) anteparo de vidro onde a amostra é disposta, I) Capilar de sílica e J) Conector para acoplamento da seringa.....	31
<b>Figura 9:</b> Esquema da análise em fonte EASI.....	31
<b>Figura 10:</b> Espectros obtidos de extratos secos por EASI(-)-MS de (A) óleo de oliva, (B) óleo de amêndoa, (C) óleo de soja, (D) óleo de semente de uva, (E) óleo de canola, (F) manteiga e (G) banha de porco.....	34
<b>Figura 11:</b> Espectros obtidos de extratos secos de óleos de oliva de diferentes procedências por EASI(-)-MS de (A) Portugal, (B) Itália, (C) Espanha (D) Líbano e (E) Grécia.....	35
<b>Figura 12:</b> PCA para confirmar o que observou na inspeção visual com intervalo de confiança de 100% do EASI (-)-MS de dados dos cinco diferentes tipos de azeites analisados a partir de: PT: Portugal, O: Itália, Es: Espanha, Lib: Líbano e Gre: Grécia.....	41

## 1. Introdução Geral

No século passado, os alimentos eram tidos apenas como fontes de substâncias essenciais para preencher os requisitos nutricionais básicos do organismo humano ou animal. Hoje, sabe-se que os alimentos oferecem muito mais, são fontes de substâncias bioativas que proporcionam benefícios adicionais à saúde. As investigações nesse sentido foram estimuladas principalmente, pelos avanços científicos que proporcionaram evidências convincentes ligando dieta e saúde a uma nova e importante área chamada de metabolômica.

O surgimento da nutrigenômica foi favorecido pelo impressionante desenvolvimento das ferramentas omicas ocorrido na última década, muito em parte devido ao Projeto Genoma Humano.<sup>1,2</sup> Alguns autores definem, inclusive, nutrigenômica como a aplicação de ferramentas de genômica funcional na área de nutrição<sup>3,4</sup>. Dentre essas, destacam-se as que possibilitam a análise do transcritoma (transcritômica), proteoma (proteômica) e metaboloma (metabolômica) (Figura 1).

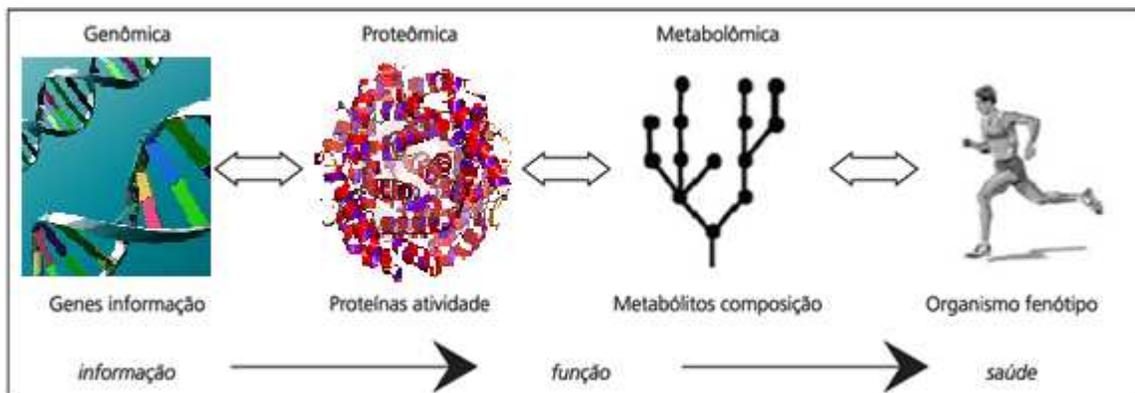


Figura 1: Ferramentas omicas na nutrição e saúde. Genômica, proteômica e metabolômica integradas na Ciência da Nutrição e na promoção de saúde. Figura modificada de Fialho E.<sup>8</sup>

Diferentemente do genoma (conjunto do material genético), que se modifica lentamente, ao longo de gerações, o transcrito, o proteoma e o metaboloma (conjunto em um dado momento de transcritos, proteínas e metabólitos, respectivamente) sofrem alterações constantes, em resposta a diferentes fatores ambientais, incluindo a alimentação<sup>1</sup>.

Metabolômica representa a análise quali e quantitativa do conjunto total de metabólitos de baixo peso molecular (<1500Da) em um dado sistema biológico e determinado momento<sup>5,6</sup>. As moléculas incluem peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis, alcalóides, minerais, bem como qualquer outra substância química ingerida ou sintetizada por uma célula ou organismo<sup>7</sup>.

A análise metabolômica é bastante complexa visto que o metaboloma varia de acordo com o tempo e localização biológica. Nesse sentido, órgãos, células em um órgão e compartimentos intracelulares apresentam metabolomas distintos, que podem ser influenciados por fatores como gênero, genótipo, estado hormonal, exercício físico, estresse e alimentação<sup>1,8</sup>.

### **1.1 Espectrometria de Massas e a Metabolômica em Alimentos**

Avanços recentes em instrumentação<sup>9, 10</sup> e o desenvolvimento de novas e revolucionárias técnicas revitalizaram acentuadamente a Espectrometria de Massas (MS), que se constitui hoje em uma das mais abrangentes técnicas instrumentais em ciência, com amplas aplicações em diversas plataformas “ômicas” como genômica, transcriptômica, proteômica e outras. Com seus novos horizontes e amplas perspectivas de desenvolvimento, a MS vem se consolidando como uma ferramenta

extremamente versátil e essencial em ciência. Desde pesquisas aplicadas até as mais fundamentais, a MS tem exercido papel de grande destaque, com crescente atuação na área da mais nova “ômica”, a metabolômica<sup>11</sup>.

A metabolômica corresponde à análise das moléculas do metaboloma. O metaboloma é o conjunto dos produtos finais resultante da diversidade das atividades enzimáticas integrando as respostas aos estímulos exteriores (mecânicos ou químicos) num tecido ou conjunto de células específicas<sup>12</sup>, ou seja, o conjunto das moléculas de baixo peso molecular geradas pelo metabolismo primário e intermediário dos seres vivos.

Uma vez conhecida a composição dos metabólitos através de diferentes técnicas, poderemos prever, por exemplo, a ativação de determinados genes (nos casos de regulação conhecida), avaliar o risco imediato para determinadas substâncias tóxicas em alimentos, ou identificar novos biomarcadores que serão utilizados na rastreabilidade da origem e no conhecimento de novos constituintes nutricionais.<sup>12, 13</sup>

A Metabolômica em alimentos ocupa um lugar de destaque na era moderna.<sup>14</sup> A preocupação em relação aos alimentos deixou de ser apenas a prevenção de sua deterioração e extensão de sua vida de prateleira, mas se concentra hoje nos macro nutrientes e micronutrientes que os compõem (água, carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais). As evidências crescentes que demonstram uma estreita relação entre a dieta e as doenças humanas têm levado a grandes investimentos em países desenvolvidos e intensas atividades de pesquisas em metabolômica, tanto governamentais como particulares.<sup>14, 15</sup> As propriedades médico-preventivas, além do valor nutricional dos constituintes naturais dos alimentos, de um lado, e os efeitos tóxicos de constituintes e contaminantes do outro, tornaram prioritário o conhecimento da total composição química dos alimentos através do emprego das mais diferentes técnicas instrumentais utilizando a ferramenta ômica.<sup>15</sup> Nos países cujo o coeficiente

de desenvolvimento é maior, hoje não é mais permitida a comercialização de alimentos sem que a sua composição seja do conhecimento do consumidor. Os benefícios decorrentes da diminuição do sofrimento humano e dos gastos com medicamentos e atendimento hospitalar, aliados à maior produtividade que resulta em uma população mais sadia, retribuem os investimentos nas pesquisas visando proporcionar uma dieta adequada e saudável para a população, esforços que requerem aplicação constante da ferramenta metabolômica em alimentos<sup>14</sup>.

Um país que deseja entrar na modernidade e garantir seu lugar em um mercado internacional cada vez mais competitivo deve ter grupos de pesquisa e desenvolvimento capazes de realizar análises essenciais para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, avaliar e desenvolver métodos analíticos adequados para as necessidades do país e a natureza dos seus produtos e de gerar um banco de dados sobre os diversos metabólitos existentes nos alimentos comercializados ou potencialmente comercializáveis. Esta infra-estrutura garante à população alimentos nutritivos, seguros e de alta qualidade, além de evitar a rejeição dos produtos exportados. A análise metabolômica é também o primeiro passo para utilização eficiente das riquezas naturais.<sup>14</sup>

Dados sobre os diversos metabólitos existentes nos alimentos tem como usuários indústrias, institutos governamentais, instituição de ensino e pesquisa, hospitais, serviços de informação à comunidade, sendo necessários as atividades profissionais de milhares de pessoas envolvendo cientistas, engenheiros, tecnólogos, nutricionistas, médicos, farmacêuticos, economistas, professores e profissionais de marketing.<sup>14, 15</sup>

No Brasil existe escassez de dados em pesquisa de metabolômica como ferramenta para o controle e a rastreabilidade de alimentos.<sup>16</sup> A população está, portanto, exposta ao consumo de alguns alimentos de qualidade não controlada,

inclusive quanto ao valor nutricional e presença de contaminantes tóxicos. Portanto, o uso da análise metabolômica suportada por técnicas instrumentais rápidas com alta precisão, exatidão e versatilidade tornam-se indispensáveis na área de alimentos. As técnicas de MS ocuparam um papel de destaque na última década, por exatamente preencherem tais requisitos.<sup>16</sup> Assim aliar a metabolômica à técnica de MS torna-se uma tarefa de suma importância tecnológica e econômica para o Brasil.

## 1.2 Técnicas de Ionização aplicadas a Alimentos

Embora a espectrometria de massas esteja consolidada há vários anos pelo desenvolvimento de técnicas de ionização por elétrons e ionização química, elas eram limitadas quanto a aplicação em biomoléculas em alimentos.

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica utilizada para a medida da massa molecular de substâncias químicas (que devem estar eletricamente carregadas). Permite também identificar, quantificar e elucidar as propriedades estruturais de moléculas e atualmente é uma técnica indispensável em diferentes áreas, como química, biologia, ciências médicas, tecnológicas e inúmeras outras.

O princípio básico da espectrometria de massas consiste em gerar íons a partir de compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado, separá-los através de sua relação massa-carga ( $m/z$ ) em um analisador de massas, e detectar quali e/ou quantitativamente os compostos a partir da relação massa-carga dos íons ( $m/z$ ) e suas respectivas abundâncias por meio de um detector, que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica. A magnitude do sinal elétrico em função da relação  $m/z$  é convertida por um processador de dados, que gera o espectro de massas correspondente.<sup>17</sup>

No início dos anos 90, duas técnicas de ionização foram desenvolvidas, o que

ampliou muito a gama de aplicações de MS. Estas duas técnicas foram chamadas Ionização e Dessorção a Laser assistida por matriz(MALDI) e electrospray (ESI)<sup>9,10,18, 19</sup> Através de conceitos simples, mas revolucionários, moléculas termolábeis, íons em solução, complexos organometálicos, polímeros e moléculas de elevadas massas moleculares (até 1 MDa ou mais), enfim espécies antes não adequadas às técnicas clássicas de ionização em MS, podem hoje ser analisadas com facilidade por MALDI-MS e/ou por ESI-MS.<sup>18</sup>

Massas moleculares de proteínas e outras macromoléculas tem sido determinadas com alta precisão, além de inúmeras novas aplicações para moléculas menores de diversas classes. Estas novas técnicas de ionização tem assim projetado a MS também na área de alimentos de forma nunca antes possível.<sup>18</sup>

MALDI-MS: Para análise de substâncias em alimentos, como exemplo de aflatoxinas, ou de qualquer outro analito, prepara-se uma solução da amostra e matriz (pequenas moléculas orgânicas). O solvente é então evaporado resultando em uma solução sólido-sólido que é depositada sobre uma superfície chamada de anteparo de amostra. Esta solução é então irradiada com laser (Figura 2), ocorrendo aquecimento localizado e seletivo. A matriz por sua vez absorve fortemente a radiação do laser e por consequência ocorre a evaporação rápida da matriz e da molécula ionizada (ex: MH<sup>+</sup>), que é então liberada para a fase gasosa, e acelerada pelo potencial aplicado à sonda em direção ao analisador de massas.<sup>20</sup>

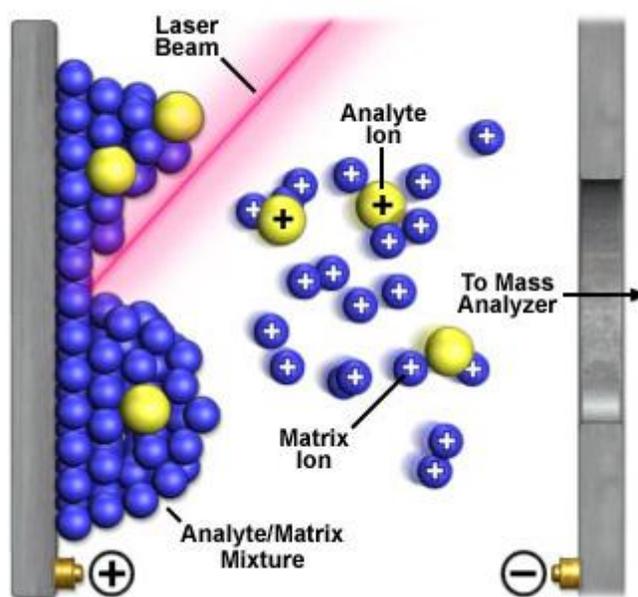


Figura 2: Ionização por MALDI <sup>21</sup>

ESI-MS: A Figura 3 descreve o mecanismo de ionização com a transferência dos íons positivos das gotas do spray para a fase gasosa. O processo de ionização ESI é inovador, pois íons são formados em solução e não mais na fase gasosa, eliminando-se então os problemas de volatilização de substâncias termolábeis e macromoléculas. A solução pode conter íons resultantes da dissolução de sais ou íons formados por protonação ou desprotonação (ou complexação com cátions) de substâncias ácidas ou básicas com ampla faixa de pesos moleculares como proteínas. Em electrospray no modo positivo, a solução é então submetida a um spray eletrolítico que oxida os íons negativos, deixando as gotas produzidas no spray com excesso de íons positivos, ou alternativamente através da redução dos íons positivos, com excesso de íons negativos (ESI negativo). Através de contra-corrente de nitrogênio aquecido, evapora-se o solvente e reduz-se o volume das gotas. Ocorre então repulsão crescente entre íons de mesma carga, com possível subdivisão das gotas, e estes íons são eventualmente transferidos para a fase gasosa em um processo brando e eficaz. A

partir desta etapa, operam os processos normais de análise, seleção e detecção de íons na fase gasosa por MS.<sup>20</sup>

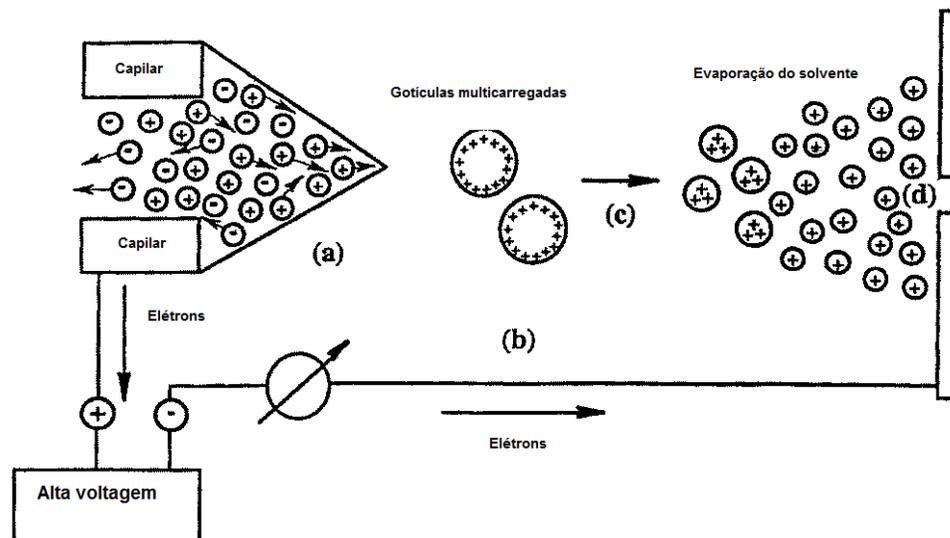


Figura 3: Mecanismo de Ionização por ESI

A Figura 4 mostra espectros de ESI de uma macromolécula (proteína A de peso molecular 45.000 Da). Em solução ácida ocorre a multiprotonação da macromolécula, com formação de íons multicarregados  $MH^{n+}$  com diferentes quantidades de cargas positivas. Obtém-se então o espectro na forma de envelope de íons centrado em torno de  $m/z$  1000. Outra grande vantagem da técnica ESI é que podem ser utilizados analisadores convencionais de  $m/z$  para determinações de altas massas. Portanto, os íons deste envelope são todos formados por moléculas da mesma proteína, mas com cargas variadas. Medindo-se o espaçamento entre os picos do envelope formado de diferentes razões massa-carga ( $m/z$ ), calcula-se então a massa da proteína. Alternativamente, pode-se obter o espectro de ESI-MS de íons negativos através de desprotonação em meio básico.<sup>20</sup>

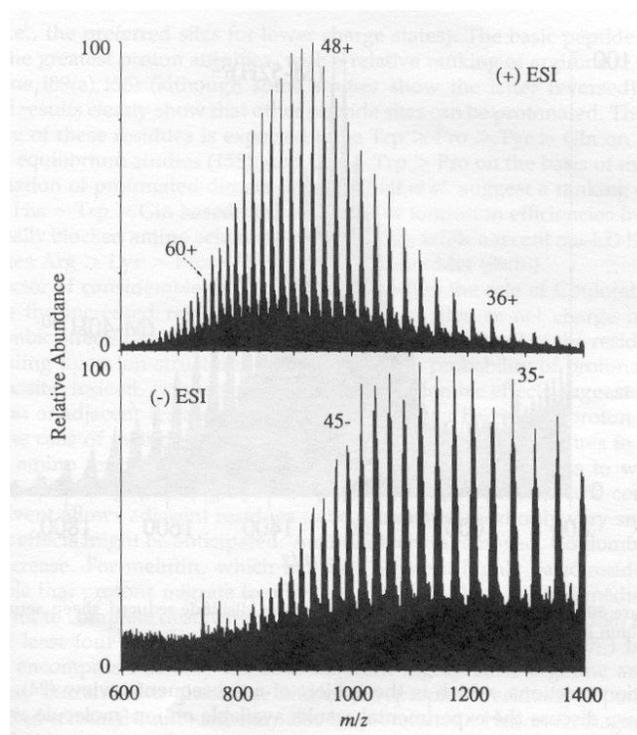


Figura 4: Espectro da proteína A de peso molecular 45.000 Da<sup>20</sup>

A ESI é também revolucionária por permitir à MS o acesso e o estudo da química e estrutura de uma ampla variedade de íons antes inacessíveis por MS clássica com ionização EI/CI.<sup>19</sup> Como exemplos podemos citar aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos e compostos bioativos em geral e diversas substâncias termolábeis, ionizadas em solução nas suas formas protonada, desprotonada ou complexada com cátions metálicos. A ausência de dissociação devido a formação de íons "frios" em solução é vantajosa para a análise de massas moleculares, mas dificulta a análise estrutural detalhada. A combinação de ESI com técnicas de MS/MS (Figura 5) se mostra então ideal e completa, pois, por exemplo, moléculas mono- ou multi-

protonadas como é o caso das proteínas e peptídeos, podendo ser selecionadas pelo primeiro analisador de massas Q1 de um equipamento triploquadrupolar, dissociadas por CID em Q2, e os fragmentos analisados então por Q3, possibilitando o sequenciamento de peptídeos através da espectrometria de massas<sup>20, 22</sup>

Porém pode ocorrer supressão iônica em ESI para análise de misturas, sendo muitas vezes necessário aliar a técnica de cromatografia líquida para eliminar tal efeito. Utilizando normalmente gradientes diferentes de solventes como acetronitrila / água em conjunto com colunas C<sub>18</sub>, entre outras, diminui-se o efeito de supressão iônica, pelo alto poder de separação que a técnica fornece<sup>22</sup>.

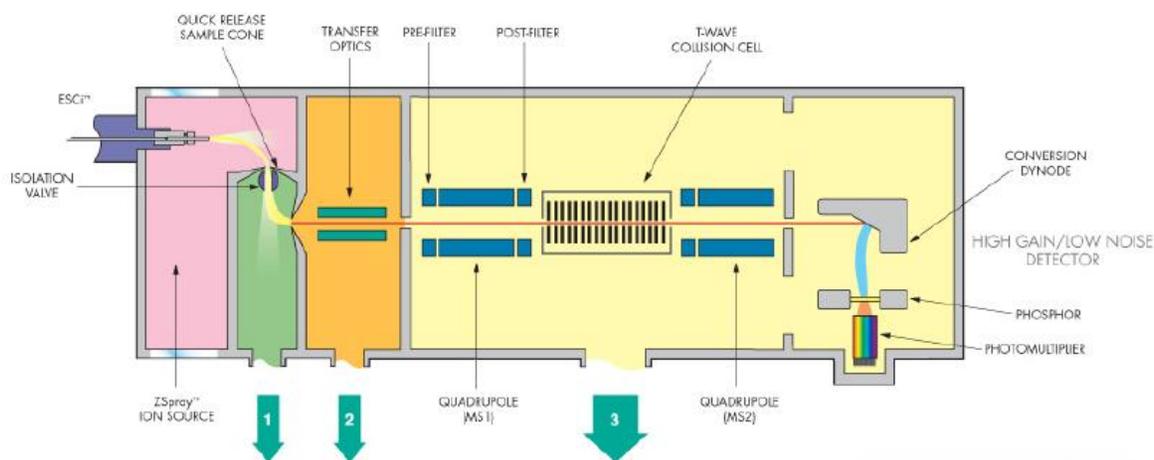


Figura 5: Equipamento de ESI-MS/MS<sup>23</sup>

### 1.3 Aplicações da ionização por EASI (EASI-MS)

Recentemente, o laboratório ThoMSon de Espectrometria de massas publicou uma nova técnica de dessorção/ionização para análise ambiente em espectrometria de massas: *easy ambient sonicspray ionization* (EASI).<sup>24</sup> Esta técnica requer pouco ou nenhum preparo de amostra e pode ser realizado diretamente em vários tipos de amostra. EASI usa o spray super sônico para criar microgotas de solvente carregadas devido à distribuição estatística não-balanceada de cátions e ânions.<sup>24, 25</sup> Essas

gotículas carregadas bombardeiam a superfície causando o fenômeno de desorção e a ionização do analito. A vantagem do EASI é que não requer preparo de amostra complexo (apenas uma simples preparação) e a ionização é branda de forma levando à formação de espécies moleculares intactas o que facilitam uma análise de misturas com menos ruído.<sup>25</sup>

EASI-MS tem sido aplicado com sucesso na análise de uma variedade de analitos e matrizes, tais como, comprimidos,<sup>24</sup> perfumes<sup>26</sup> e surfactantes<sup>27</sup>. Recentemente, EASI tem sido acoplado à espectrometria de massas por inserção via membrana (EASI-MIMS, do inglês *membrane introduction mass spectrometry*)<sup>25</sup> e cromatografia em camada fina (EASI-TLC-MS)<sup>28</sup>. Como EASI-MS é baseado em *SSI*, é a técnica mais suave de ionização em espectrometria de massas ambiente, gerando íons do analito intactos, sem ou com muito pouca dissociação. Esta característica do EASI é útil na análise de moléculas frágeis e misturas complexas, pois para cada molécula é formado apenas um íon no espectro.<sup>28</sup> Uma vez que não se aplica alta voltagem nem aquecimento no capilar do *spray*, transformações térmicas ou eletroquímicas que ocorrem em outras técnicas são minimizadas ou eliminadas. EASI por ser fácil de usar e implementar, parece ser ideal para análises em campo.<sup>28</sup>

#### **1.4 Análise de Óleos pelo emprego de EASI-MS como Ferramenta**

##### **Metabolômica**

Adulteração de óleos vegetais de alto preço com óleos de baixo preço para aumentar a lucratividade é uma prática comum, largamente empregada e ilegal. Essa prática é especialmente adotada para os óleos de oliva, que são adulterados geralmente com óleo de amêndoas (devido a sua composição similar) ou óleo de soja (devido ao baixo custo e à alta disponibilidade).<sup>29, 30</sup>

Por ser a autenticidade do óleo importante por questões de saúde e por questões comerciais, é constante a busca por métodos simples, rápidos e eficientes para tipificar e controlar adulterações ou falsificações.<sup>29</sup>

Óleos vegetais apresentam triglicérides característicos na sua composição, perfil de ácidos graxos livres e outros constituintes naturais como bifenóis. Esses constituintes naturais são marcadores quimiotaxonômicos para o metaboloma de óleos vegetais, para a classificação e controle de pureza.<sup>31</sup> Estes perfis são comumente obtidos por métodos cromatográficos como cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia à gás (CG), precedidos por vezes por métodos de hidrólise e derivatização.<sup>32-34</sup> Infusão direta por electrospray por espectrometria de massas (ESI-MS) e Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) foram utilizados para a análise de *fingerprint* metabólico, tipificação e controle de qualidade com excelentes resultados para óleos.<sup>35, 36</sup>

Foi demonstrado recentemente, por diferentes tipos de óleos vegetais, que uma infusão direta [ESI(-)-MS] de um extrato de óleo extraído através de uma mistura de uma solução contendo água:metanol com 0,1% de hidróxido de amônio foi efetivo para caracterizar o perfil químico de ácidos graxos livres e bifenóis. Esta mesma técnica demonstrou ser capaz de verificar a adulteração de óleo de oliva por óleo de soja.<sup>35</sup>

As adulterações são amplamente empregadas para aumentar a lucratividade, porém as mesmas são consideradas um risco à saúde pública. Os métodos existentes até o momento são seletivos, porém, extremamente trabalhosos, envolvendo gastos de reagentes e muito tempo de análise. O desenvolvimento e a implementação de métodos simples, seletivos e eficazes são necessários para auxiliar no controle de qualidade de produtos.

## 1.5 Características gerais de óleos e gorduras

Óleos e gorduras são constituídos principalmente por uma mistura complexa de triacilglicerídeos (aproximadamente 95-98%), que atuam como fonte de reserva energética para animais e plantas. Os óleos também atuam como solvente para os demais componentes minoritários como esteróis, vitaminas lipossolúveis (principalmente tocoferóis/tocotrienóis), pigmentos incluindo clorofila e carotenóides, compostos fenólicos, fosfolípidios, ácidos graxos livres, mono e diglicerídios.<sup>37</sup>

Os triacilglicerídeos são ésteres formados a partir da reação do glicerol com três unidades de ácidos graxos, como mostra o exemplo na Figura 6.

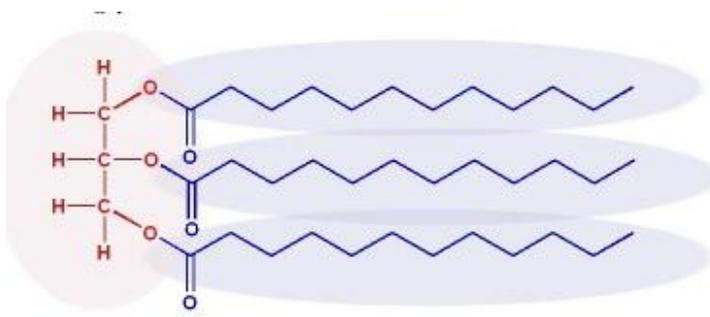


Figura 6: Exemplo de uma molécula de triacilglicerídeo (TAG), derivado da reação do glicerol com três moléculas de ácido dodecanóico.

As gorduras animais e os óleos vegetais são misturas de triglicerídeos, que diferem na sua composição em ácidos graxos e, conseqüentemente, no seu ponto de fusão. Os TAGs das gorduras animais são ricos em ácidos graxos saturados, o que atribui a esse lipídeo uma consistência sólida à temperatura ambiente; os de origem vegetal, ricos em ácidos graxos insaturados, são líquidos. Os TAGs podem ser hidrolisados, liberando ácidos graxos e glicerol.<sup>38</sup>

Dentre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva é um dos mais importantes e antigos do mundo, sendo largamente usado nos países que margeiam o Mediterrâneo. É raro existir, dentre os óleos vegetais não refinados, um "*flavour*" mais apreciado do que o do azeite de oliva virgem<sup>39</sup>.

O azeite de oliva é um tipo de óleo produzido única e exclusivamente a partir de azeitonas, fruto de uma árvore chamada oliveira. O nome "azeite de oliva" não pode ser utilizado nas misturas de azeite com outros óleos (esses são chamados de óleos compostos) e o azeite é o óleo de oliva obtido através de métodos físicos. Portanto nem todo óleo de oliva pode ser considerado azeite.<sup>40</sup>

Existem cerca de 270 tipos de azeitonas e somente 24 são regularmente utilizadas na produção de azeites. Cada país tem seu tipo característico, a exemplo, na Espanha existem os tipos Alberquina, Picual e Empeltre enquanto em Portugal encontra-se o tipo Galega<sup>41</sup>.

O Azeite de Oliva é classificado com base nas suas características organolépticas (sabor e aroma), analíticas (acidez e outros dados químicos) e pelo processo extrativo e pode ser dividido, basicamente, em 3 tipos:

**AZEITE EXTRA VIRGEM:** Obtido através da extração por processo de prensagem mecânica das azeitonas, com aroma e sabor impecável, apresenta menos de 1% de acidez.

**AZEITE VIRGEM:** Obtido através da extração por processo de prensagem mecânica das azeitonas, com acidez abaixo de 2%.

AZEITE PURO: Composto por azeite refinado e azeite virgem, apresentando menos de 1,5% de acidez.

## **2. Objetivo Geral**

Analisar substâncias de baixa massa molecular provenientes do metabolismo vegetal ou animal para estudo utilizando a técnica EASI – MS (*easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*) para identificação de marcadores taxonômicos contidos nos diferentes tipos de óleo de origem vegetal e animal e verificar a possível adulteração de óleos de oliva de diferentes procedências (países de diferentes origens).

## **3. Objetivos Específicos**

- 1) Caracterização de componentes existentes no metaboloma (ou seus derivados) em óleos de soja, oliva, amêndoa, semente de uva, canola, manteiga e banha de porco.
- 2) Caracterização de componentes de azeite de diferentes países produtores.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Reagentes e Amostras**

Hidróxido de amônio e metanol grau HPLC foram adquiridos da Merck SA (Rio de Janeiro, Brasil). Água ultrapura foi obtida do sistema de purificação MilliQ (Millipore).

Para a primeira parte do trabalho, ou seja, para a caracterização de componentes existentes no metaboloma, um total de 15 (quinze) amostras de óleos de origens vegetal e animal foram obtidos de fornecedores confiáveis e a autenticidade foi evidenciada por EASI(+)-MS através do perfil de triacilglicerídeos (TAGs) (perfil não mostrado neste trabalho). Os óleos analisados foram óleo de oliva (A), óleo de amêndoas (B), óleo de soja não refinado (C), óleo de semente de uva (D), óleo de canola (E), manteiga (F) e banha de porco (G).

Para a caracterização dos componentes nos diferentes azeites, 30 (trinta) amostras de azeite extra-virgem com acidez inferior a 0,5% de países diferentes (dos países Portugal, Espanha, Grécia, Itália e Líbano) foram adquiridos. Para cada procedência foram adquiridos 6 azeites.

As amostras estavam dentro do prazo de validade e apresentavam identificação no rótulo, sem sinais de adulteração ou falsificação.

## **4.2. Procedimento Experimental**

### **4.2.1. Preparo das amostras**

A uma alíquota de 100  $\mu$ L de amostra de óleo/gordura foram adicionados 200  $\mu$ L de uma solução de metanol:água (1:1) contendo 0,1% de hidróxido de amônio. 40 $\mu$ L da fração hidro-alcoólica foi disposta sobre um anteparo de vidro, aguardando-se a completa secagem em temperatura ambiente deste material sobre o anteparo. Posteriormente, a amostra seca foi colocada na parte frontal da fonte EASI, para que fosse analisada por EASI(-)-MS.

#### 4.2.2. Condições instrumentais

Os experimentos foram feitos em um espectrômetro hifenado do tipo triplo quadrupolo e *ion trap*, sendo o último quadrupolo (Q3) um *ion trap* linear (Figura 7). O equipamento utilizado foi Q-Trap™ (Applied Biosystems) utilizando uma fonte de EASI (Figura 8) construída pelo laboratório ThoMSON de espectrometria de massas, por meio do uso de uma fonte comercial de nano-ESI como plataforma básica. Um esquema geral do processo de exposição do anteparo na fonte EASI está ilustrada na Figura 9.



Figura 7: Uma foto ilustrativa do equipamento Q-TRAP (acima) e um esquema da configuração interna do equipamento (abaixo)<sup>42</sup>

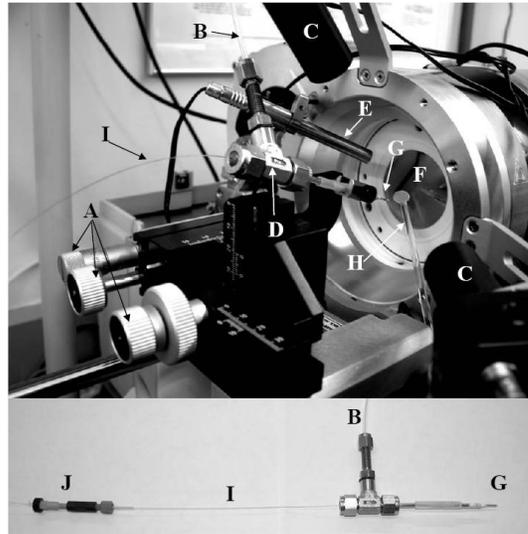


Figura 8: Uma foto da fonte EASI utilizada nas análises: A) posições de ajustes (XYZ), B) tubulação do gás de nebulização ( $N_2$ ), C) câmera, D) dispositivo de *Sonic Spray*, E) Luz, F) orifício do cone, G) capilar de *Sonic Spray* em aço inox, H) anteparo de vidro onde a amostra é disposta, I) Capilar de sílica e J) Conector para acoplamento da seringa.

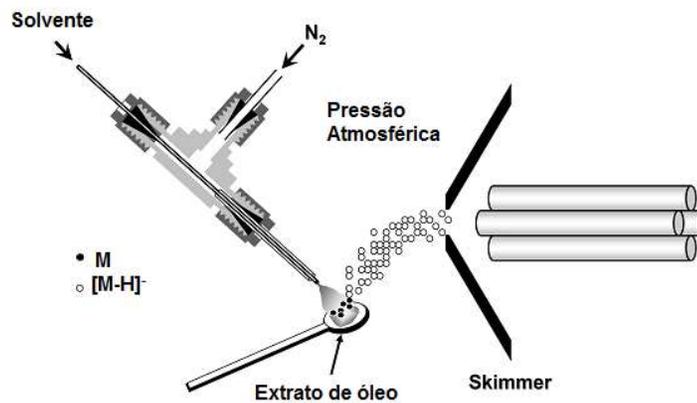


Figura 9: Esquema da análise em fonte EASI

O espectrômetro de massas operou no modo negativo. As condições EASI(-)-MS foram as seguintes: Na bomba de seringa, utilizou-se um fluxo de 20µL/min de metanol:água (1:1) contendo hidróxido de amônio, pressão do gás de nebulização (N<sub>2</sub>) foi de cerca de 30bar, Pressão do gás de cortina (*curtain gas*) de 5 bar, potencial do *declustering* de 100V, distância do anteparo de vidro foi de aproximadamente 2mm do *skimmer* e o ângulo do capilar foi de 30graus. O experimento de fragmentação (MS/MS) foi realizado através da seleção de um ion precursor no Q1, que foi dissociado no q2 através de colisão induzida com auxílio de nitrogênio e a análise do íon produto foi realizada no Q3. A energia de colisão variou entre 10 e 40 eV, dependendo do perfil de dissociação do íon precursor.

## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1. Aspectos Gerais**

As análises foram conduzidas sem o uso de preparação complexa das amostras. O método de EASI-MS vem sendo aplicado para a análise de fármacos e cosméticos e foi desenvolvida inicialmente para a caracterização de compostos com estrutura simples<sup>24, 26-27</sup> Contudo, quando se aplicou para óleos e gorduras neste projeto, além da vantagem de evitar elaboradas preparações de amostras, outro fator a se destacar é que este tipo de ionização tem um caráter mais brando quando comparado com ESI, possibilitando análises de moléculas instáveis.

Quando as amostras são preparadas por meio de solubilização e transferência de uma alíquota de ambas as soluções para o anteparo inerte, forma-se uma camada de amostra que tende a se cristalizar no centro do anteparo, quando seca à temperatura e

pressão ambiente, o que acarreta na formação de um filme homogêneo promovendo a obtenção de espectros de massas reprodutíveis.

Os espectros de massas de óleos e gorduras obtidos por EASI-MS mostram perfis típicos de ácidos graxos e bifenóis, e apresentam sinais de 100 a 600  $m/z$  conforme ilustrado pelo espectro de massas dos óleos analisados neste trabalho e mostrados nas figuras 10 e 11 a seguir.

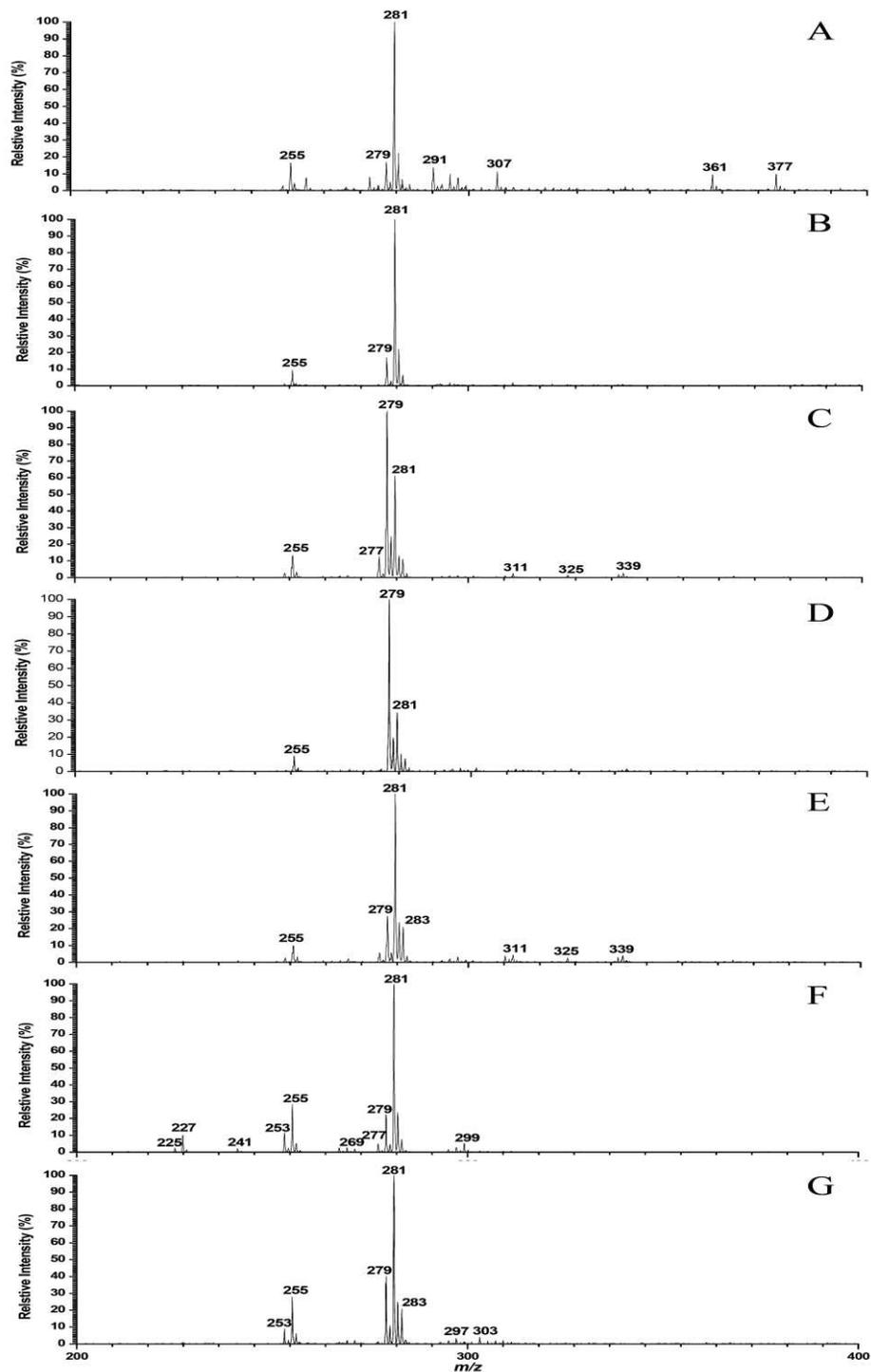


Figura 10: Espectros obtidos de extratos secos por EASI(-)-MS de (A) óleo de oliva, (B) óleo de amêndoa, (C) óleo de soja, (D) óleo de semente de uva, (E) óleo de canola, (F) manteiga e (G) banha de porco.

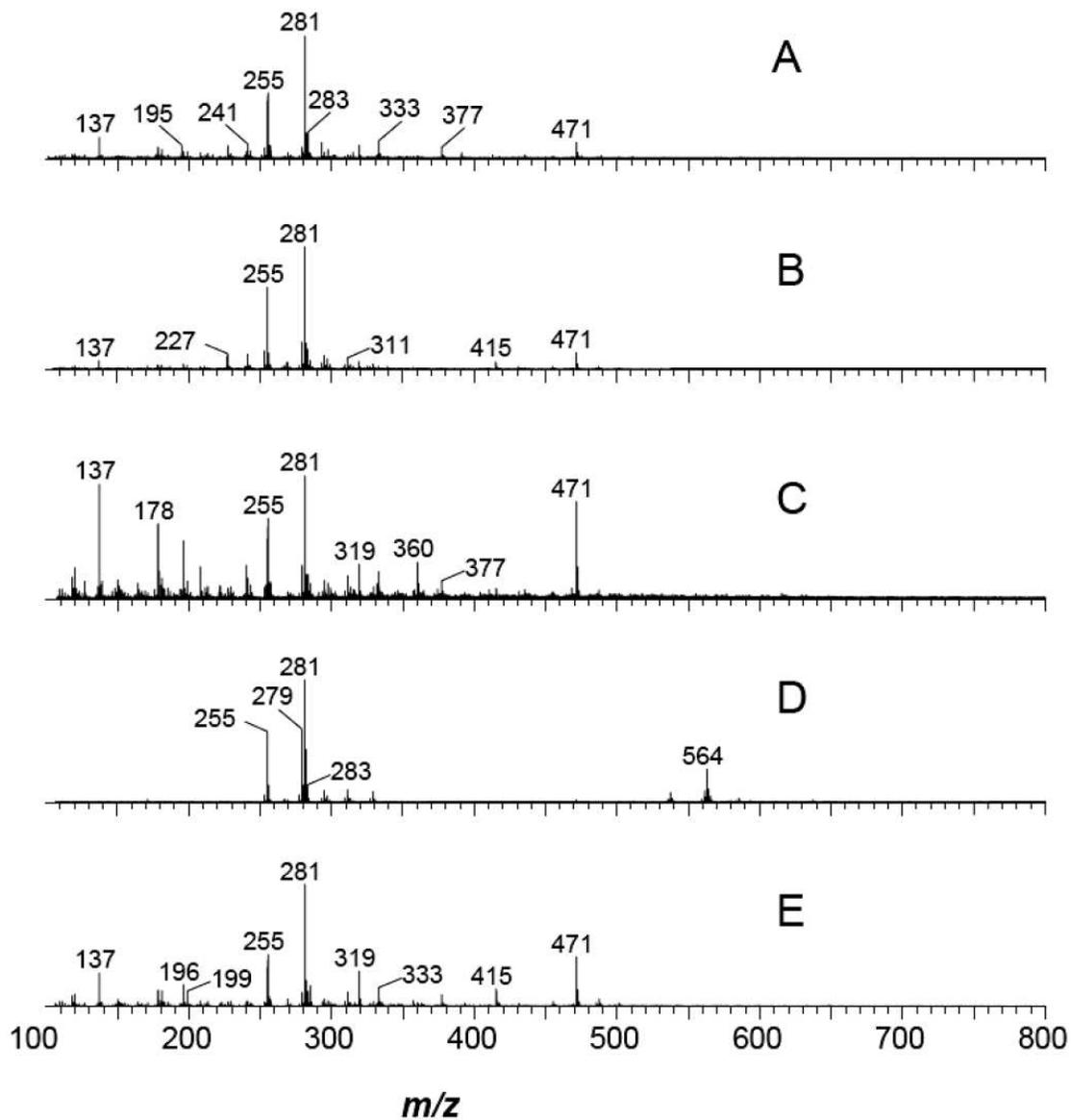


Figura 11: Espectros obtidos de extratos secos de azeites de diferentes procedências (6 amostras de cada procedência) por EASI(-)-MS de (A) Portugal, (B) Itália, (C) Espanha (D) Líbano e (E) Grécia.

Os íons no intervalo de  $m/z$  250-300 correspondem a maioria dos ácidos graxos (AG) livres encontrados neste trabalho detectados principalmente como

íons desprotonados [AG-H].<sup>36</sup>

Os íons na faixa de  $m/z$  100-250, bem como 300-650 correspondem em sua maioria aos bifenóis.<sup>36, 55</sup>

Vários trabalhos existentes na literatura analisam os ácidos graxos e bifenóis separadamente, contudo neste trabalho observamos os mesmos de maneira simultânea.<sup>49-51, 53-55</sup>

No mecanismo de fragmentação, é interessante ressaltar que os ácidos graxos em experimentos de MS/MS, mesmo utilizando-se uma energia muito alta de colisão, não fragmentam, sendo necessária a alta resolução para identificar cada íon. Já os bifenóis perdem predominantemente água e CO<sub>2</sub>, facilitando a identificação por MS/MS em complementação com a utilização de alta resolução.

## 5.2. Caracterização dos Óleos e Gorduras

A Figura 10 compara os espectros de massas por EASI-MS dos óleos de oliva, amêndoa, soja, semente de uva, canola, manteiga e banha de porco.

É interessante notar que cada óleo apresenta um espectro de massas com um perfil típico de ácidos graxos que permite sua caracterização rápida e fácil, conforme descrito a seguir.

O *fingerprint* do óleo de oliva (Figura 10A) destaca principalmente os ácidos graxos palmítico (P), linoléico (L) e oléico (O) caracterizado através dos íons de  $m/z$  255 (P), 279 (L) e 281 (O). Este resultado está de acordo com a típica composição do óleo de oliva que contem entre 15-30% de ácido palmítico, 20-46% de ácido linoléico e 80-100% de ácido oléico.<sup>43-44</sup>

O óleo de amêndoa não muito comum no Brasil, mas extensamente

utilizado na Comunidade Européia (Figura 10B) tem entre 75-100% de ácido oléico<sup>43, 45</sup> e é muito semelhante quimicamente com o óleo de oliva sendo utilizado como solvente adulterante do mesmo, contudo neste trabalho verificamos que este óleo é caracterizado principalmente pela inexistência dos íons correspondentes aos bifenóis, exatamente por passar pelo processo de refino e estes dados são observados no espectro de massas e servem para rápida diferenciação dos mesmos na técnica aqui proposta<sup>45</sup>

O óleo de soja é um dos insumos mais produzidos no Brasil (Figura 10C), por sua vez, é constituído principalmente por ácidos linoléico (80-100%) e oléico (30-60%),<sup>43,46</sup> e exibe os íons  $m/z$  255 (P),  $m/z$  277 linolênico (Ln),  $m/z$  279 (L) e  $m/z$  281 (O) como os mais abundantes. Observa-se que óleo de soja também é utilizado para adulteração do óleo de oliva e apresentam os mesmos ácidos graxos diagnósticos do óleo de oliva, e desta maneira, a diferenciação entre eles se promove através da análise das abundâncias relativas entre os íons e da presença de bifenóis. À medida que o óleo de oliva é mais rico em ácido oléico do que o óleo de soja, o íon de  $m/z$  281 (O) é mais intenso no oliva. O mesmo ocorre em relação ao ácido linoléico que é mais abundante no óleo de soja, de modo que o espectro de massas mostra os íons  $m/z$  279 (L) mais abundante no óleo de soja e a ausência de bifenóis.

O óleo de semente de uva (Figura 10D) é caracterizado por dois ácidos graxos insaturados (linoléico e oléico) e um saturado (palmítico), uma vez que o ácido linoléico é o principal componente do óleo de semente de uva com (aproximadamente 80%).<sup>43,47</sup>

Já o óleo de canola é um óleo bem semelhante quimicamente com os óleos de oliva e avelã,<sup>48</sup> principalmente pela predominância do ácido oléico

observado também em nosso estudo (Figura 10E).

Nas gorduras analisadas neste trabalho representadas pelas figuras 10F e 10G oriundas de manteiga e banha de porco apresentam o ácido oléico como ácido graxo predominante e ácidos graxos de cadeia curta, registrados em trabalhos anteriores por cromatografia gasosa.<sup>49,50</sup>

A técnica parece ser muito interessante para análise rápida de óleos e gorduras mostrando resultados muito semelhantes aos obtidos por cromatografia gasosa.

### 5.3. Caracterização dos Azeites de Diferentes Origens

Após a realização do trabalho com os óleos e gorduras verificamos experimentalmente que os óleos de oliva apresentavam diferenças entre si segundo a região de origem que era facilmente caracterizada pelos íons correspondentes aos bifenóis, permitindo assim uma tipificação rápida e simples (Figura 11).

O espectros de massas dos óleos de oliva extra virgens apresentam íons  $[M-H]^+$  na faixa de  $m/z$  100-600, sendo que os óleos são oriundos de Itália, Portugal e Grécia possuem um espectro com maior similaridade entre si.

Os óleos originários de Portugal (Figuras 11A) são constituídos, principalmente, por AGs e bifenóis. Os íons de  $m/z$  281 (O) e  $m/z$  255 (P) são mais abundantes sendo que, a relação entre os íons mais abundantes é de aproximadamente 2:1. O espectro de massas do óleo português exibe também íons que foram identificados como bifenóis e vitaminas com  $m/z$  137 (tirosol),  $m/z$  195 (*2-(4-hydroxyphenyl) ethyl acetate*),  $m/z$  319 (*decarboxylated-oleuropein*

*aglycon*),  $m/z$  377 (*oleuropein aglycon*) e  $m/z$  471 ( $\alpha$ -*tocopheryl acetate*), mostrando ser um óleo rico em constituintes funcionais.

O *fingerprint* do óleo de oliva Italiano (Figura 11B) é característico, pois os bifenóis são escassos, não tanto quanto o óleo Libanês, mas bem próximo. Nota-se que os poucos bifenóis identificados são o tirosol ( $m/z$  137), e *1-acetoxypinoresinol* ( $m/z$  415) este último por sua vez somente encontrado neste óleo italiano e no grego, podendo ser sugerido como um típico biomarcador para estes óleos.

Destaca-se no azeite espanhol a presença de quase todos os constituintes identificados neste trabalho que auxiliam na tipificação e determinação de origem do mesmo. Embora este azeite espanhol e os óleos estudados exibam íons na mesma faixa de  $m/z$ , verifica-se que o azeite espanhol possui um perfil diferente que é caracterizado principalmente por bifenóis.

O azeite grego (Figuras 11E), muito famoso até pelas suas propriedades terapêuticas, é bem semelhante ao português, contudo apresenta menos constituinte que o azeite espanhol (Figuras 11C).

Outro ponto a ser abordado, refere-se ao azeite Libanês que apresenta quase que exclusivamente apenas ácidos graxos livres comuns a todo e qualquer óleo de oliva seja ele refinado ou extra virgem (Figuras 11D).

Consequentemente sugerimos a partir dos dados obtidos de que no azeite espanhol possa haver maior atividade funcional, contudo para confirmar esta hipótese seriam necessários estudos *in vitro* e *in vivo* mais aprofundados.

#### 5.4. Análise Exploratória dos Dados.

Para confirmar e ilustrar o desempenho da técnica EASI-MS na classificação dos azeites de oliva de diferentes origens, os dados foram tratados por meio da análise de componentes principais (PCA).

A análise de PCA é uma metodologia empregada na caracterização de amostras, onde é necessário extrair informação de um grande número de variáveis. Trata-se de uma ferramenta útil na análise e classificação de um grupo de amostras, pois permite visualizar os dados obtidos a partir das amostras em um gráfico bi ou tridimensional.<sup>51</sup>

Os componentes principais (PC) são obtidos em ordem decrescente de variância, onde o componente principal (PC1) detém mais informação estatística que o PC2, e assim por diante. Portanto a janela PC1 x PC2 é a mais importante estatisticamente (*scores*). PCA também pode ser usada para ver quais variáveis (*loadings*) têm maior importância no agrupamento das amostras. Quando há um número grande de variáveis, o uso do PCA tridimensional, onde visualizamos a janela PC1 x PC2 x PC3, pode ser mais adequado<sup>52</sup>

A Figura 12 mostra o gráfico de PC1 (Fator 1) versus PC2 (Fator 2) para os espectros EASI-MS das amostras de azeite de diferentes regiões (cujos íons estão na mesma região de *m/z* observada). Os *fingerprints* foram expressos como as intensidades dos principais íons [AG-H]<sup>+</sup> de cada amostra.

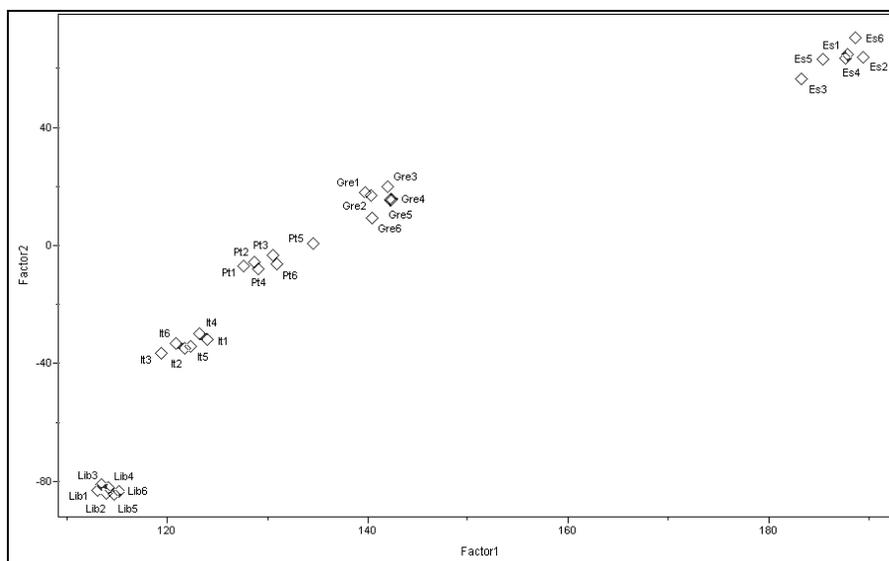


Figura 12: PCA para confirmar o que observou na inspeção visual com intervalo de confiança de 100% do EASI (-)-MS de dados dos cinco diferentes tipos de azeites analisados a partir de: PT: Portugal, O: Itália, Es: Espanha, Lib: Líbano e Gre: Grécia

O gráfico bidimensional PC1 versus PC2 foi capaz de cobrir 95% da variância dos dados, de maneira que cada um dos quatro tipos de azeites foi claramente agrupado e separado. O azeite proveniente do Líbano está mais isolado na parte inferior do PCA por não possuir praticamente bifenóis, já o azeite oriundo da Espanha apresenta maior número de compostos bifenóis o que faz com que ele também se diferencie facilmente na parte superior do PCA.

## 6. Conclusão

A técnica EASI-MS permite a análise direta de ácidos graxos e bifenóis nos óleos e gorduras vegetais e animais estudados.

Os espectros de massas por EASI-MS mostram que cada óleo e gordura possuem um padrão característico (*fingerprint*), de maneira que foi possível elaborar um banco de dados das amostras avaliadas, de acordo com os íons diagnósticos e suas abundâncias relativas, bem como de possibilitar o rastreamento de origem.

É necessário destacar também as vantagens da espectrometria de massas EASI-MS aplicada neste trabalho, na caracterização de óleos e gorduras, pois, além de ser uma técnica pioneira, complementa as informações obtidas pelas técnicas cromatográficas, a partir de um procedimento direto, rápido e simples.

Enfim, o procedimento desenvolvido dispensa o emprego de complexidade na preparação de amostra e permite a obtenção de resultados mais reprodutíveis. A técnica se mostra aplicável para a identificação, caracterização e controle de qualidade e rastreabilidade de óleos e gorduras.

Existe a perspectiva futura de estender a técnica para caracterização de outros óleos e gorduras, bem como empregá-la nos estudos de produtos de oxidação de óleos e gorduras de diferentes espécies e origens.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Rist MJ, Wenzel U, Daniel H. Nutrition and food science go genomic. **Trends Biotechnol.** 2006; 24(4):172-8.
2. Ghosh D, Skinner MA, Laing WA. Pharmacogenomics and nutrigenomics: synergies and differences. **Eur J Clin Nutr.** 2007; 61(5):567-74.
3. Kaput J, Rodriguez RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. **Physiol Genomics.** 2004;16(2):166-77.
4. DeBusk RM, Fogarty CP, Ordovas JM, Kornman KS. Nutritional genomics in practice: where do we begin? **JADA.** 2005;105(4):589-98.
5. Astle J, Ferguson JT, German JB, Harrigan GG, Kelleher NL, Kodadek T, et al. Characterization of proteomic and metabolomic responses to dietary factors and supplements. **J Nutr.** 2007; 137(12): 2787-93.
6. Trujillo E, Davis C, Milner J. Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. **JADA.** 2006; 106(3):403-13.
7. Wishart DS. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Sci Technol.** 2008
8. Fialho E, Moreno FS, ONG, TP. Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. **Rev. Nutr.** 2008, vol.21, n.6, pp. 757-766.
9. Fenn JB, Mann M., Meng, CK., Wong, SF., Whitehouse, CM. **Science**, 1989, vol. 246, p.64-71.
10. Karas MI., Hillenkamp F. **Analytical Chemistry**, 1988, vol. 60, p. 2299-2301.
11. Lv, Y. H.; Liu, X. R.; Yan, S. K.; Liang, X.; Yang, Y.; Dai, W. X.; Zhang, W. D. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 52, 129-135.
12. Kaddurah-Daouk, R.; Kristal, B. S.; Weinshilboum, R. M. **Annual Review of**

- Pharmacology and Toxicology** 2008, 48, 653-683.
13. Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, Heller E, McCarroll R, Wiegand R, Berriz GF, Roth FP, Gerszten RE. **Circulation** 2005, 112, 3868-3875.
  14. Scalbert A, Brennan L, Fiehn O, Hankemeier T, Kristal BS, van Ommen B, Pujos-Guillot E, Verheij E, Wishart D, Wopereis S. **Metabolomics**, 2009, 5, 435-458.
  15. Dragsted LO. **Meat Science**, 84, 301-307
  16. Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE. **Trends in Food Science & Technology**, 2009, 20, 557-566.
  17. GROSS JH. **Mass Spectrometry – A Textbook**. Berlin: Springer, 2004.
  18. Stewart II. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, 1999, 54, 1649-1695.
  19. Loo J A. **Mass Spectrometry Reviews**, 1997, 16, 1-23.
  20. Kussmann M, Nordhoff E, RahbekNielsen H, Haebel S, RossellLarsen M, Jakobsen L, Gobom J, Mirgorodskaya E, KrollKristensen A, Palm L, Roepstorff P. **Journal of Mass Spectrometry**, 1997, 32, 593-601.
  21. Disponível em < [http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization\\_maldi.html](http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html) > . Acesso em: 23/11/2010.
  22. Roesler R, Catharino RR, Malta LG, Eberlin MN, Pastore G. **Food Chemistry**, 2007, 104, 1048-1054.
  23. Waters – Disponível em <www.waters.com>. Acesso em: 24/11/2010
  24. Haddad R, Sparrapan R, Eberlin, M. N. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2006, 20, 2901-2905.
  25. Haddad R, Sparrapan R, Kotiaho T, Eberlin MN. **Analytical Chemistry**, 2008, 80, 898-903.

26. Haddad R, Catharino RR, Marques LA, Eberlin MN. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2008, 22, 3662-3666.
27. Saraiva SA, Abdelnur PV, Catharino RR, Nunes G, Eberlin MN. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2009, 23, 357-362
28. Haddad R, Milagre HMS, Catharino RR, Eberlin MN. **Analytical Chemistry**, 2008, 80, 2744-2750.
29. Rohman A, Man YBC. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 2009, 86, 1149-1153.
30. Azadmard-Damirchi S. **Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, 27, 1-10.
31. Kamal-Eldin A. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2006, 108, 1051-1061.
32. Bereau D, Benjelloun-Mlayah B, Banoub J, Bravo R. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 2003, 80, 49-53.
33. Moh MH, Tang TS, Tan GH. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 2002, 79, 1039-1043.
34. Palmer AJ, Palmer FJ. **Journal of Chromatography**, 1989, 465, 369-377.
35. Catharino RR, Haddad R, Cabrini LG, Cunha IBS, Sawaya A, Eberlin MN. **Analytical Chemistry**, 2005, 77, 7429-7433.
36. Saraiva SA, Cabral EC, Eberlin MN, Catharino RR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, 57, 4030-4034.
37. Eldin AK. **Eur. J. Lipid Science Technol.**, 2006, 58, p. 1051-1081.
38. Morrison, R.; Boyd, R. **Química Orgânica**. 12<sup>a</sup> Ed., Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1995.

39. Goodacre R, Kell DB, Bianchi G. **Journal of Science of Food Agricultural.**, 1993, 63, p.297-307.
40. Associação Brasileira de Produtores, Importadores e Comerciantes de Azeite de Oliveira – OLIVA. Disponível em <<http://www.oliva.org.br>>. Acesso em 23/11/2010
41. Luján RJ, Capote FP, de Castro MDL. **Phytochem. Anal.**, 2009; 20: 221–230.
42. **Laboratório ThomSon de Espectrometria de massas** – UNICAMP. Disponível em <[http://thomson.igm.unicamp.br/Q\\_Trapp.htm](http://thomson.igm.unicamp.br/Q_Trapp.htm)>. Acesso em: 23/11/2010
43. Catharino RR, Haddad R, Cabrini LG, Cunha IBS, Sawaya A, Eberlin MN. **Anal. Chem.**, 2005, 77, 7429-7433.
44. Muguerza E, Ansorena D, Bloukas JG, Astiasaran I. **J. Food Sci.**, 2003, 68, 1531-1536.
45. Oliveira I, Sousa A, Morais JS, Ferreira I, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. **Food Chem. Toxicol.**, 2008, 46, 1801-1807.
46. Nishiyama-Naruke A, Souza JA, Canelos M, Curi R. **Anal. Lett.**, 1998, 31, 2565-2576.
47. Perez-Serradilla JA, Priego-Capote F, de Castro MDL. **Anal. Chem.**, 2007, 79, 6767-6774.
48. Cruz-Hernandez C, Deng ZY, Zhou JQ, Hill AR, Yurawecz MP, Delmonte P, Mossoba MM, Dugan MER, Kramer JKG. **J. AOAC Int.**, 2004, 87, 545-562.
49. Indrasti D, Man YBC, Mustafa S, Hashim DM. **Food Chem.**, 122, 1273-1277.
50. Chin ST, Man YBC, Tan CP, and Hashim DM. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 2009, 86, 949-958.
51. Lopez-Lopez A, Rodriguez-Gomez F, Cortes-Delgado A, Montano A, Garrido-Fernandez A. **J. Agric. Food Chem.**, 2009, 57, 8973-8981.
52. Kadegowda AKG, Piperova LS, Erdman RA. **J. Dairy Sci.**, 2008, 91, 749-759.

53. Parcerisa J, Codony R, Boatella J, Rafecas M. **J. Agric. Food Chem.**, 1999, 47, 1410-1415.
54. Christopoulou E, Lazaraki M, Komaitis M, Kaselimis K. **Food Chem.** 2004, 84, 463-474.
55. Lerma-Garcia MJ, Lantano C, Chiavaro E, Cerretani L, Herrero-Martinez JM, Simo-Alfonso EF. **Food Research International**, 2009, 42(10), 1446-1452.