

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LETÍCIA MONTEIRO SIMEÃO

**DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA EM PRODUTOS CÁRNEOS
E EMBUTIDOS POR CLAE-EM/EM**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato

Orientadora

Porto Alegre, 4 de dezembro de 2020.

Agradecimentos

Encerra-se uma jornada intensa. De muita preocupação, problemas, stress, ansiedade e momentos de lazer e convivência com pessoas queridas perdidos. Mas também foi um ciclo de muito, mas muito aprendizado. E, por essa razão, sinto que o dever foi cumprido e que cada obstáculo valeu a pena.

Gostaria de agradecer, primeiramente, ao MAPA e ao LFDA-RS, que me proporcionaram a estrutura e as condições para realizar esse projeto. Espero profundamente que o que foi desenvolvido aqui (e as melhorias que virão posteriormente) fique de legado e possa ser útil ao trabalho que desempenhamos diariamente no laboratório, à serviço da sociedade.

Agradeço sinceramente aos colegas do RCA, que sempre foram extremamente prestativos e atenciosos. Em especial à Louise Jank, que esteve disponível mesmo nos dias e horários mais aleatórios para sanar minhas dúvidas, com toda a paciência do mundo, e ao Fabiano Barreto, que mesmo tendo inúmeras outras coisas muito importantes para dar conta, esteve presente e foi uma peça-chave para o desenvolvimento deste projeto. Um agradecimento especial também à Companhia Minuano de Alimentos e à Djenifer, que muito atenciosa e gentilmente forneceram algumas das amostras utilizadas neste trabalho.

Agradeço aos meus colegas do IQA, pelo apoio e compreensão nos momentos em que não estive tão presente ou disponível, por estar envolvida com o projeto. Em especial ao Tiago Cunha, que me ajudou com cálculos, dúvidas e dilemas.

Agradeço à UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade, e à minha orientadora, professora Tânia Pizzolato, por ter me guiado e aceitado embarcar comigo nessa empreitada no mundo da proteômica, cheio de contratemplos e descobertas, que nos tirou da zona de conforto.

Agradeço também ao Israel, meu amor, amigo e companheiro, que sempre me incentivou da maneira que pôde, segurou minha barra incontáveis vezes quando a ansiedade falava mais alto e compreendeu todo o tempo que tive que dedicar à construção deste trabalho (que não foi pouco!). Obrigada amor.

Agradeço à minha mãe, por todo o amor e apoio que tive ao longo da vida para priorizar os estudos. Se hoje estou onde estou, certamente é porque tem muito mérito dela por trás de tudo, porque ela nunca mede esforços para me ajudar no que é possível. Obrigada mãe.

Agradeço imensamente aos meus amigos. Aos que me ajudaram diretamente, com alguma ideia ou solução de problema, mas também aos que só estiveram ali presentes fazendo meus dias mais agradáveis, aos que ouviram lamúrias e desabafos, que me ajudaram com palavras de incentivo ou que compartilham das dificuldades do meio acadêmico. Tenho muita sorte por ter tantas pessoas especiais na minha convivência, tantas que não cabe nomear todas aqui. Mas elas sabem quem são. Muito obrigada!

Por último, mesmo que possa soar um pouco pedante, agradeço à minha perseverança. Por ter superado barreiras ao entrar em uma esfera de conhecimento totalmente nova pra mim, de proteômica e espectrometria de massa. Por ter tido disciplina e dedicação para passar às vezes 10, 12 horas no laboratório fazendo experimentos e mal parando para comer; por ter perdido incontáveis noites ou finais de semana inteiros na frente do computador; por ter desanimado e depois encontrado força pra continuar; por ter pensado em desistir, mas persistido. Sinto a tranquilidade de quem sabe que deu o seu melhor e me orgulho de ter conseguido chegar até aqui e de poder dizer que essas 142 páginas são fruto do meu empenho.

Encerra-se uma jornada intensa. De muita preocupação, problemas, stress, ansiedade e momentos de lazer e convivência com pessoas queridas perdidos. Mas também foi um ciclo de muito, mas muito aprendizado. E, por essa razão, sinto que o dever foi cumprido e que cada obstáculo valeu a pena.

Frodo: “Queria (...) que nada disso tivesse acontecido.”

Gandalf: “Assim como todos que testemunham tempos sombrios como este. Mas não cabe a eles decidir, o que nos cabe é decidir o que fazer com o tempo que nos é dado”.

J. R. R. Tolkien

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	xiv
Símbolos e abreviaturas	xvi
Resumo.....	xix
Abstract.....	xxi
1. Introdução	23
2. Revisão bibliográfica	26
2.1. Proteína de soja.....	26
2.1.1. Características físico-químicas da soja e seus derivados.....	31
2.1.2. A proteína de soja como alérgeno	35
2.1.3. Uso industrial da proteína de soja em produtos cárneos e as ferramentas analíticas atuais	36
2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à Espectrometria de massa em modo tandem (CLAE-EM/EM)	41
2.2.1. Aplicação em proteômica.....	42
2.2.2. Aplicação em análise de produtos cárneos.....	45
2.2.3. Desafios na quantificação de proteínas em alimentos processados.....	46

3. Materiais e Métodos.....	51
3.1. Materiais	51
3.1.1. Solventes, reagentes e padrões	51
3.1.2. Preparo das soluções e fase móvel	51
3.1.3. Preparo das amostras.....	52
3.2. Métodos.....	56
3.2.1. Parâmetros do Espectrômetro de Massa.....	56
3.2.2. Parâmetros da análise por cromatografia a líquido.....	58
3.2.3. Validação das metodologias analíticas	58
3.2.4. Limite de detecção (LD)	60
3.2.5. Especificidade / Seletividade	60
3.2.6. Linearidade	60
3.2.7. Curva de calibração, sensibilidade e faixa de trabalho	61
3.2.8. Limite de quantificação (LQ)	61
3.2.9. Precisão	62
3.2.10. Precisão intermediária	62
3.2.11. Recuperação.....	62
3.2.12. Validação da metodologia qualitativa.....	63
3.2.13. Métodos de quantificação	65

3.2.14. Validação de metodologia quantitativa por padronização externa.....	67
4. Resultados e discussão	69
4.1. Testes de otimização do preparo de amostra.....	69
4.1.1. Otimização da extração da gordura	69
4.1.2. Otimização do tampão de extração das proteínas de interesse	70
4.1.3. Otimização do processo de extração das proteínas de interesse	71
4.1.4. Otimização do volume de extrato e tempo de digestão	78
4.1.5. Otimização do volume de solução de tripsina	81
4.2. Metodologia qualitativa	82
4.3. Metodologia quantitativa	87
4.3.1. Ajustes no preparo de amostra	87
4.3.2. Testes com diluição do extrato	89
4.3.3. Testes com redução do volume de extrato digerido	92
4.3.4. Quantificação por adição de padrão	99
4.3.5. Quantificação por calibração externa.....	102
5. Conclusão	109
6. Referências	111
Anexo I – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade	126

Anexo II – Dados da validação de metodologia qualitativa	132
Anexo III – Dados da quantificação por adição de padrão em salsichas e mortadelas	133
Anexo IV - Dados da validação de metodologia quantitativa por calibração externa	137

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura geral dos aminoácidos e da prolina, exceção à regra.	26
Figura 2. Estruturas conformacionais das proteínas e siglas que representam cada aminoácido.	27
Figura 3. a) Estrutura de trímero da β -conglucina. (Fonte: adaptado de Maruyama <i>et al.</i> , 2004) ⁽²³⁾ . b) Vista superior e c) vista lateral da estrutura hexamérica da glicina, formada pela união de dois trímeros. (Fonte: adaptado de Adachi <i>et al.</i> , 2003) ⁽²⁴⁾	29
Figura 4. Frações da proteína de soja e seus respectivos constituintes.	29
Figura 5. Estrutura química das formas agliconas das isoflavonas presentes na soja.....	33
Figura 6. Esquema geral de cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado à espectrômetro de massa em modo tandem.	42
Figura 7. Etapas dos processos <i>Bottom-up</i> e <i>Top-down</i> de análises de proteína por espectrometria de massa.	44
Figura 8. Exemplo de quebra da estrutura da proteína glicina (11S) da soja, após digestão com a enzima tripsina, formando os fragmentos peptídicos que podem ser detectados por espectrometria de massa.....	44
Figura 9. Esquema das etapas principais de métodos <i>shotgun</i> para análise de proteínas.	52
Figura 10. Fluxograma dos testes de otimização realizados em cada etapa do preparo de amostra.	53
Figura 11. Esquema do protocolo de preparo de amostra otimizado.	55

Figura 12. Esquema do procedimento utilizado na validação do método qualitativo para detecção de proteína de soja em produtos cárneos.	64
Figura 13. Gráfico ilustrativo do método de quantificação por adição de padrão.	66
Figura 14. Planejamento experimental de validação quantitativa, avaliando a repetibilidade, precisão intermediária e recuperação.	68
Figura 15. Cromatogramas relativos às transições monitoradas nos três peptídeos para as amostras de mortadela, extraíndo as proteínas com tampão ureia-tris-HCl em pH 8,2 e tampão SDS-2-ME em pH 8,0.	71
Figura 16. Protocolo de preparo dos testes de extração das proteínas de soja em mortadela, linguiça e salsicha, comparando os métodos de ultrassom e banho-maria.	73
Figura 17. Cromatogramas dos peptídeos EAF ($m/z = 632,3/760,4$) e FYL ($m/z = 793,9/283,1$) para amostras de mortadela tratadas com ultrassom por 2 horas e aquecimento em banho-maria a 90° C por 2 horas.	74
Figura 18. Áreas obtidas comparando ultrassom e aquecimento como método de extração, em diferentes tempos, para amostras de linguiça, mortadela e salsicha.	75
Figura 19. Protocolo de preparo dos testes de extração das proteínas de soja em mortadela, mortadela fortificada e PIS, comparando os métodos de ultrassom e agitação em dispersador.	76
Figura 20. Áreas médias e desvios obtidos para os peptídeos EAF ($m/z = 632,3/760,4$) e FYL ($m/z = 793,9/283,1$) comparando os métodos de extração com ultrassom e dispersador, para amostras de mortadela, mortadela fortificada e PIS, analisadas em triplicata.	77

Figura 21. Resultados de uma curva de calibração de linguiça com PIS para o peptídeo FYL ($m/z = 793,9/283,1$) comparando os preparos de amostra somente com ultrassom e combinando dispersador (ultra-turrax T18) e ultrassom.....	78
Figura 22. Resultados das áreas médias normalizadas obtidas comparando os volumes 100 e 200 μL de extrato de amostra e 3 e 17 horas de digestão trípica, para o peptídeo FYL ($m/z = 793,9/283,1$) nas amostras de proteína isolada de soja e proteína desengordurada de soja.	80
Figura 23. Comparação das áreas obtidas após 1 e 3 horas de digestão trípica, para o peptídeo FYL ($m/z = 793,9/283,1$), nas amostras de proteína isolada e proteína concentrada de soja.	81
Figura 24. Médias das áreas das duplicatas obtidas utilizando 40, 50 e 100 μL de volume de solução de tripsina $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, na etapa de digestão trípica em amostras de mortadela, salsicha e linguiça, para os peptídeos EAF ($m/z = 632,3/760,4$) e FYL ($m/z = 793,9/283,1$)	82
Figura 25. Cromatograma obtido para a proteína isolada de soja ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$).	83
Figura 26. Cromatograma obtido para a amostra “14” de salame fortificada com 0,50 % (m/m) de proteína isolada de soja.	84
Figura 27. Cromatogramas das transições $m/z = 632,3/760,4$ e $m/z = 632,3/916,5$ correspondentes ao peptídeo EAF, obtidos para a) solução de proteína isolada de soja $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$; b) Amostra fortificada “14”, que apresentou pico com relação sinal-ruído de 17,7.....	85
Figura 28. Cromatogramas das agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína para a amostra branca "F".....	87
Figura 29. Curva de calibração em linguiça branca com adição de proteína isolada de soja, com 200 μL de extrato.....	88

Figura 30. Representação esquemática da etapa de diluição prévia à digestão, realizada em curvas de linguiça e salame com adição de PIS.....	89
Figura 31. Curvas de calibração preparadas em linguiça branca e proteína isolada de soja, com diluição dos extratos pré-digestão, em 5 e 10 vezes.	90
Figura 32. Cromatogramas obtidos para o peptídeo EAF ($m/z = 632,3/760,4$) no ponto de concentração 2,0 %, na curva em linguiça com diluição de 5x e na curva em salame com diluição de 10x.	90
Figura 33. Cromatogramas do peptídeo FYL ($m/z = 793,9/424,2$) antes e após centrifugação nas amostras da curva em salame com 10x de diluição que apresentaram precipitação.	91
Figura 34. Curva de calibração de proteína isolada de soja em linguiça, utilizando 100 μ L de extrato na digestão com tripsina, para o peptídeo FYL (transição $m/z = 793,9/283,1$).	93
Figura 35. Curvas analíticas para a adição de padrão, peptídeo FYL transição $m/z = 793,9/283,1$. a) Em amostra de mortadela sem toucinho, com 50 μ L de extrato digerido. b) Em amostra de salsicha <i>hot dog</i> , com 50 μ L de extrato digerido.	95
Figura 36. Curvas de calibração de linguiça branca com adição de PIS, utilizando 12, 20 e 50 μ L de solução de tripsina, para os peptídeos: a) EAF na transição $m/z = 632,3/760,4$ e b) FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$	97
Figura 37. Curvas de calibração obtidas por adição de padrão para as amostras mortadela sem toucinho, mortadela Bologna, salsicha <i>Hot dog</i> e salsicha <i>Golden</i> , para o peptídeo FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$, utilizado como quantificador.	101
Figura 38. Cromatograma das transições mais intensas do peptídeo FYL em amostra de mortadela sem toucinho.	101

Figura 39. Cromatograma da linguiça toscana branca utilizada na validação, sem picos no tempo de retenção característico do peptídeo FYL (4,98 minutos).

..... 102

Figura 40. Curvas em matriz branca fortificada e tampão ureia-tris-HCl, para verificação do efeito de matriz..... 103

Figura 41. Cromatograma do peptídeo FYL nas transições $m/z = 793,9/283,1$ (quantificador) e $m/z = 793,9/424,2$ (qualificador), para o primeiro ponto da curva analítica (0,63 %) que também representa o LQ do método..... 105

Lista de Tabelas

Tabela 1. Teores de proteína mínimos exigidos para os derivados comerciais de soja.....	32
Tabela 2. Aplicações industriais dos derivados Farinha desengordurada de soja (FDS), Proteína concentrada de soja (PCS) e Proteína isolada de soja (PIS) em produtos cárneos.....	37
Tabela 3. Teores máximos de adição de proteína de soja em produtos cárneos segundo legislação do MAPA.....	38
Tabela 4. Parâmetros do espectrômetro de massa para análise dos peptídeos e agliconas da soja.....	57
Tabela 5. Parâmetros da fonte de ionização por <i>electrospray</i> do espectrômetro de massa.....	58
Tabela 6. Parâmetros do método de cromatografia a líquido para a separação dos peptídeos marcadores.....	58
Tabela 7. Critérios de avaliação para métodos qualitativos e quantitativos, segundo o INMETRO.....	59
Tabela 8. Dados das áreas para a curva de calibração de proteína isolada de soja em linguiça, peptídeo FYL (transição $m/z = 793,9/283,1$), utilizando 100 e 200 μL de extrato na digestão com tripsina.....	92
Tabela 9. Concentração calculada de proteína de soja nas amostras de mortadela e salsicha, considerando os teores de proteína em base seca das matérias-primas utilizadas.....	94
Tabela 10. Dados de área obtidos para as amostras de mortadela e salsicha com adição de padrão, volumes 50, 100 e 200 μL de extrato digerido, peptídeo FYL (transição $m/z = 793,9/283,1$).....	94

Tabela 11. Áreas obtidas para os peptídeos EAF na transição $m/z = 632,3/760,4$ e FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$ em curva de linguiça branca com PIS digerida com 12, 20 e 50 μL de solução de tripsina.	97
Tabela 12. Resultados calculados para amostras de mortadela sem toucinho, mortadela Bologna, salsicha <i>hot dog</i> e salsicha <i>Golden</i>	100
Tabela 13. Resultados de Repetibilidade, Reprodutibilidade intralaboratorial e Recuperação (%) obtidas nos 3 dias de validação.....	106
Tabela 14. Resultados das 20 amostras fortificadas e 20 amostras brancas da validação do método qualitativo.	132
Tabela 15. Dados da adição de padrão na amostra de mortadela sem toucinho.	133
Tabela 16. Dados da adição de padrão na amostra de mortadela Bologna. .	134
Tabela 17. Dados da adição de padrão na amostra de salsicha <i>Hot Dog</i>	135
Tabela 18. Dados da adição de padrão na amostra de salsicha <i>Golden</i>	136

Símbolos e abreviaturas

2-ME: 2-mercaptoetanol

AF: Ácido fórmico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: do inglês *Association of Official Agricultural Chemists*

CLAE-EM/EM: Cromatografia líquida de alta-eficiência acoplada à espectrometria de massa

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DOQ-CGCRE: Documento Orientativo de Qualidade da Coordenação Geral de Acreditação

DTT: Ditioneitol

EAF: polipeptídeo EAFGVNMQIVR, oriundo da quebra da proteína de soja com tripsina

ELISA: do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESI: do inglês *Electrospray ionization*

FAO: do inglês *Food and Agriculture Organization*

FDA: do inglês *Food and Drug Administration*

FDS: Farinha desengordurada de soja

FYL: polipeptídeo FYLAGNQQEFLK, oriundo da quebra da proteína de soja com tripsina

HFL: polipeptídeo HFLAQSFNTNEDIAEK, oriundo da quebra da proteína de soja com tripsina

IAA: Iodoacetamida

IN: Instrução Normativa

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

K: aminoácido Lisina

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de Quantificação

LFDA: Laboratório Nacional de Defesa Agropecuária

m/z: razão massa/carga

MALDI: do inglês *Matrix-assisted laser desorption ionization*

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRC: Material de Referência Certificado

MRM: do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

OMS: Organização Mundial da Saúde

P: aminoácido Prolina

P.A.: Para análise

PCS: Proteína concentrada de soja

PDA: do inglês *Photodiode Array Detector*

PIS: Proteína isolada de soja

PLE: *Pressurized Liquid Extraction*

PCR: do inglês *Polymerase Chain Reaction*

ppb: parte por bilhão

ppm: parte por milhão

PTS: Proteína texturizada de soja

QqQ: Triplo quadrupolo

Q-TOF: do inglês *Quadrupole-time of flight*

R: aminoácido Arginina

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RTIQ: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SMPR: *Standard Method Performance Requirements*

SPE: do inglês *Solid phase extraction*

Resumo

A proteína de soja é industrialmente utilizada em diversos tipos de produtos cárneos e embutidos, por conferir características físico-químicas interessantes aos alimentos processados. A grande disponibilidade dos derivados de soja e seu baixo valor agregado tornam-se atrativos para a atuação de fraudadores. Além do prejuízo na qualidade do produto final, a adulteração com proteína de soja pode causar problemas de saúde pública, visto que a soja está dentre os 8 tipos de alimento que mais causam reações alérgicas no mundo. Portanto, é de grande importância manter a fiscalização a fim de evitar fraudes. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica capaz de determinar proteína de soja em produtos cárneos e embutidos, visando sua implementação na rotina de Fiscalização Federal de Produtos de Origem Animal do MAPA. Além disso, foi avaliada uma possível correlação entre o teor de proteínas e de isoflavonas. O método desenvolvido focou em atender à demanda da Fiscalização Federal com protocolos adequados à rotina laboratorial nos quesitos de custo e tempo de análise. A técnica analítica utilizada foi cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em modo tandem (CLAE-EM/EM) com ionização por *electrospray*. Foi utilizado um protocolo de análise do tipo “*shotgun*”, que consistiu em extrair as proteínas de interesse da matriz, digerí-las com enzima tripsina e analisar os peptídeos HFLAQSFNTNEDIAEK, EAFGVNMQIVR e FYLAGNQQEFLK, marcadores da soja. O método desenvolvido foi capaz de detectar com segurança a presença dos analitos em concentrações a partir de 0,50 % (m/m) em diversas matrizes cárneas, atendendo ao objetivo de confirmar a presença de proteína de soja em produtos cárneos e embutidos. O peptídeo EAFGVNMQIVR na transição $m/z = 632,3/760,4$ foi utilizado como pico qualificador. Para fins quantitativos, o método desenvolvido foi validado para a matriz linguiça, utilizando padronização externa com amostras fortificadas (*spiked*). A exatidão foi avaliada em amostras de linguiça fortificadas com proteína isolada de soja. A faixa de trabalho estabelecida foi de 0,63 a 4,74 %, com limite de quantificação de 0,63 %. O peptídeo FYLAGNQQEFLK foi utilizado como pico quantificador na transição

$m/z = 793,9/283,1$. A segunda transição mais intensa ($m/z = 793,9/424,2$) foi utilizada como pico qualificador. Foi observado que a utilização de amostras fortificadas (*spiked*) na curva analítica subestima os resultados ao quantificar amostras reais (que contêm proteína *incurred*). Esse fenômeno ocorre devido aos processamentos sofridos pelas amostras ao longo da cadeia produtiva, que modificam a estrutura das proteínas e dificultam sua solubilidade e capacidade de extração. Por essa razão, ajustes são necessários para viabilizar a aplicação do método quantitativo desenvolvido em amostras reais. Uma alternativa proposta é preparar a curva analítica com amostras do tipo *incurred* de concentração conhecida.

Abstract

Soy protein is commonly used industrially in many meat products, mainly because of the interesting physical properties it provides. Soy's products large availability and low commercial value turns it very attractive to fraudsters' actions. Further than the loss on quality of the product, the adulteration with soy protein may also cause public health's issues, since soy is one of the 8 most allergenic kinds of food worldwide. For that reason, the continued inspection is essential to avoid frauds. The objective of this work was the development and validation of an analytical methodology to determinate soy protein in processed meat products, aiming at their implementation on Federal Inspection routines of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply's laboratories. Besides, a correlation between the protein and isoflavone content was evaluated. The developed methods focused on attending the demand of Federal Inspection, with analytical protocols suitable for the daily laboratory routine, keeping lower cost and analysis time. The analytical technique used was liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with electrospray ionization (ESI). The shotgun approach developed consisted in extracting the proteins of the matrix, digest them with trypsin and then analyze the chosen soy marker peptides HFLAQSFNTNEDIAEK, EAFGVNMQIVR e FYLAGNQEQEFLK. The developed qualitative method was capable of safely detect the presence of the analites in concentrations as from 0.50 % (m/m) in many meat products tested, fulfilling the objective to confirm the presence of soy protein in processed meat products. The peptide EAFGVNMQIVR was chosen as qualifier peak (transition $m/z = 632.3/760.4$). For quantitative purposes, the developed method was validated for the matrix sausage, using a spiked external standard calibration curve. Trueness was evaluated in sausage samples spiked with soy protein isolate. The working range was stablished from 0.63 to 4.74 %, with limit of quantification of 0.63 %. The two most intense transitions of the peptide FYLAGNQEQEFLK was chosen as quantifier peak ($m/z = 793.9/283.1$) and qualifier peak ($m/z = 793.9/424.2$). It was observed that the spiked external standard calibration curve underestimates the results when used to quantify real

samples. It occurs due to the processing effects suffered by the samples during their industrial production, which modifies the protein structure and difficulties its solubility and extractability. For that reason, some adjustments are necessary in order to apply the quantitative developed methodology in real samples. An alternative proposed was to prepare the external standard calibration curve with incurred samples with known concentration of soy protein.

1. Introdução

A indústria alimentícia é um segmento em constante crescimento e evolução, sempre buscando novas tecnologias e desenvolvendo produtos que atendam às mais variadas demandas. Porém, por ser um mercado extremamente competitivo, cresce também a preocupação do consumidor e dos órgãos de fiscalização quanto à qualidade dos produtos comercializados. No Brasil, o órgão responsável pela fiscalização de produtos de origem animal é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ⁽¹⁾.

A adição de proteínas não-cárneas como extensores em embutidos é uma prática industrial muito comum, principalmente devido às características que elas são capazes de fornecer ao produto final. As proteínas vegetais em geral ganham destaque nessa aplicação, pois possuem uma grande capacidade de retenção de água e propriedades gelificantes, aliadas a uma qualidade nutricional alta e baixo conteúdo de gordura ⁽²⁾. Essas proteínas alternativas são atraídas pelas proteínas da carne, formando uma malha proteica interna e estabilizando o produto. Além disso, como consequência natural da adição de outra fonte proteica, o rendimento final do produto aumenta ⁽³⁾. Portanto, a utilização dessas matérias-primas deve ser controlada, visto que seu baixo custo em comparação à proteína cárnea induz à fraude econômica por adição indevida (quando proibido) ou em excesso (quando permitido até um limite determinado).

A fonte de proteína vegetal que mais tem sido utilizada na indústria de alimentos é a soja (*Glycine max*), por ser versátil e nutricionalmente muito rica, sendo a única fonte de proteína de origem vegetal que possui todos os aminoácidos essenciais. Além do baixo custo (devido a sua grande disponibilidade), a proteína de soja também possui propriedades que ajudam tecnologicamente na produção de embutidos: melhora a fatiabilidade, auxilia na retenção de água e ajuda a manter a estabilidade das emulsões, o que melhora a textura e homogeneidade dos produtos finais ^(4,5,6).

Em contrapartida, a soja está na lista dos oito alimentos com maior incidência de alergia no mundo, sendo que ao menos 21 das proteínas presentes no grão já foram citadas como alergênicas ⁽⁷⁾, o que torna a omissão da adição de soja na composição de um produto uma prática perigosa à saúde do consumidor e fortalece ainda mais a necessidade de fiscalização.

Do ponto de vista analítico, um dos parâmetros mais relevantes a ser fiscalizado nos alimentos é o teor de proteína e, portanto, é igualmente importante poder determinar sua origem. Para regulamentar os aspectos pertinentes à garantia da qualidade dos produtos e proteger o consumidor, o MAPA proíbe a adição de proteína não-cárnea em alguns produtos e define limites máximos de adição àqueles produtos em que se permite tal prática ⁽⁸⁾.

Atualmente, o método oficial de análise para determinação de proteína em produtos de origem animal no Brasil é o método de Kjeldahl ⁽⁹⁾, que consiste em etapas consecutivas de digestão, destilação e titulação da amostra. Porém, por tratar-se de um método indireto que transforma todo o conteúdo proteico em nitrogênio, sua confiabilidade é restrita. Ele é eficaz para determinar a quantidade de nitrogênio total da amostra, mas não possui a capacidade de distinguir a origem deste.

A cromatografia tem se destacado muito no campo da proteômica para resultados qualitativos e quantitativos, em substituição aos métodos enzimáticos, de DNA e de eletroforese normalmente utilizados para essa finalidade. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em modo tandem (CLAE-EM/EM) vem se mostrando uma técnica muito versátil na análise de alimentos para a determinação de diversos tipos de proteínas vegetais através de seus peptídeos constituintes ^(10,11,12).

Seguindo a técnica “*shotgun*”, uma etapa prévia de digestão com tripsina quebra a cadeia proteica e forma os fragmentos peptídicos que posteriormente são separados por cromatografia líquida e detectados no espectrômetro de massa em modo *MRM (Multiple Reaction Monitoring)* ⁽¹³⁾. Diversos peptídeos

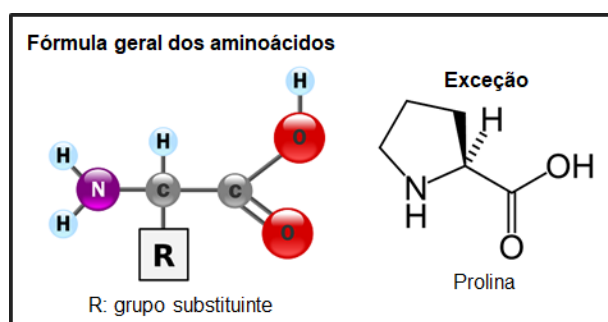
marcadores das proteínas de soja já foram identificados por essa técnica, e a aplicação se mostrou eficiente em diferentes tipos de matriz ^(2,6,10,14).

A partir destas considerações, o objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de um método analítico capaz de detectar e quantificar a proteína de soja em produtos cárneos e embutidos processados, com custo e tempo de análise viáveis para a implementação na rotina de Fiscalização Federal Agropecuária. Para tal, foram avaliadas a correlação entre proteínas e isoflavonas, bem como os métodos de quantificação por padronização externa e adição de padrão.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Proteína de soja

Proteínas são polímeros formados por diversos aminoácidos ligados sequencialmente em uma longa cadeia. Os aminoácidos, por sua vez, são pequenas moléculas orgânicas que possuem um grupo carboxila e um grupo amino ligado ao carbono α ⁽¹⁵⁾. A Figura 1 mostra a fórmula geral dos aminoácidos e a estrutura da prolina, que foge à regra, pois possui um ciclo no carbono α .

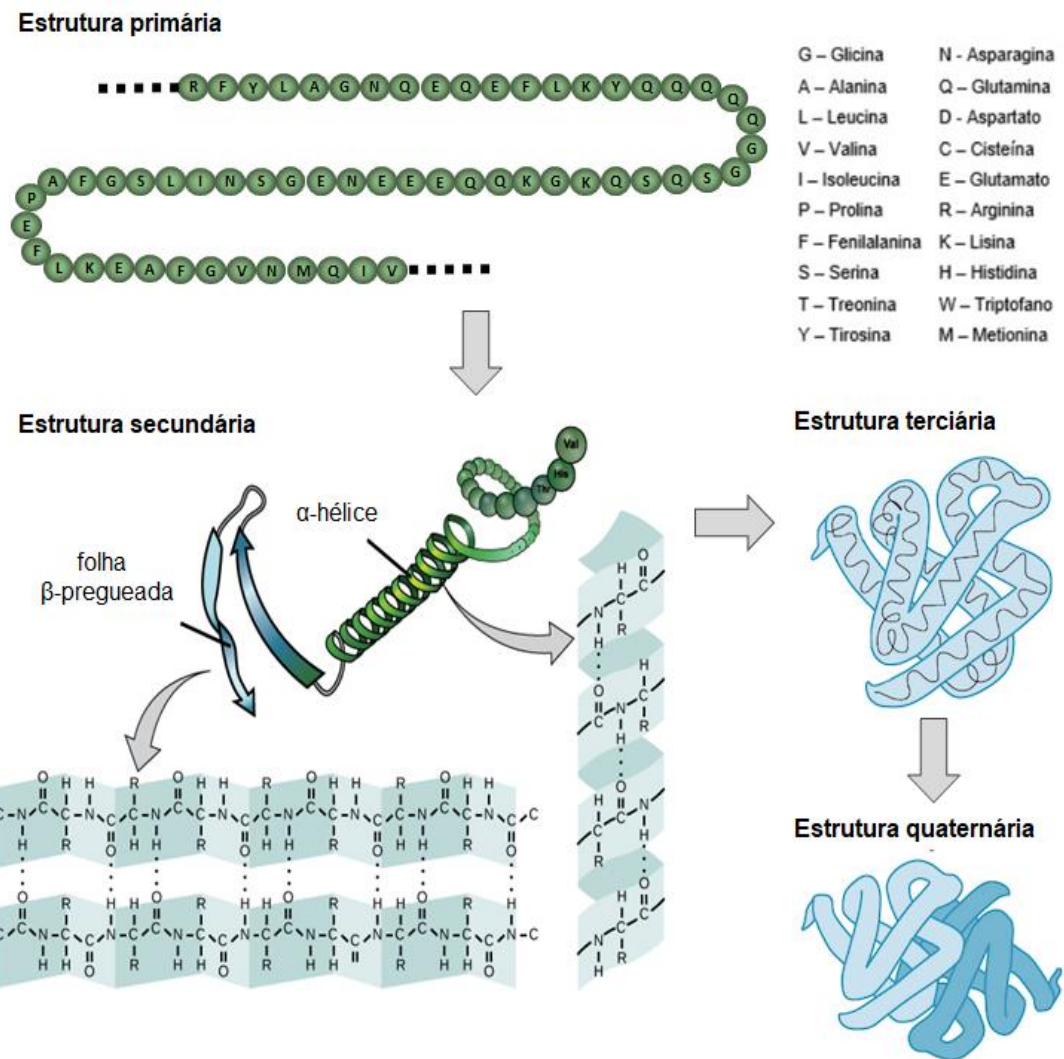


Fonte: Adaptado de Biosul ⁽¹⁶⁾.

Figura 1. Estrutura geral dos aminoácidos e da prolina, exceção à regra.

As proteínas se organizam em quatro tipos de estruturas, como mostra a Figura 2. A estrutura primária é a sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, enquanto a secundária é a conformação tridimensional dessas cadeias de peptídeos, decorrente das ligações de hidrogênio entre os H dos grupos amino e os O dos grupos carbonila. A estrutura secundária pode assumir diferentes formas, como a α -hélice (helicoidal) e a folha β -pregueada (formato de papel dobrado), dependendo dos aminoácidos constituintes e das interações e repulsões entre seus grupos $-R$ substituintes ^(15,17).

A estrutura terciária resulta do enovelamento da cadeia, e as forças predominantes são as intermoleculares dos grupos $-R$ dos aminoácidos. Por fim, a estrutura quaternária ocorre em proteínas que possuem mais de uma cadeia peptídica, e é o arranjo espacial decorrente da união de duas ou mais cadeias proteicas que, isoladamente, possuem as três estruturas anteriores ^(15,17).



Fonte: Adaptado de Khan Academy⁽¹⁷⁾.

Figura 2. Estruturas conformacionais das proteínas e siglas que representam cada aminoácido.

As massas moleculares das proteínas da soja variam de 8 a 600 kDa, com maior incidência na faixa de 110 a 350 kDa. Após submetê-las ao processo de ultracentrifugação, obtêm-se frações com coeficientes de sedimentação 2S, 7S, 11S e 15S, segundo a escala Svedberg¹.

¹ Svedberg (S) é uma unidade de coeficiente de sedimentação. Ela descreve o tamanho e peso das frações de macromoléculas a partir da sua taxa de sedimentação após o processo de ultracentrifugação. É comum caracterizar moléculas biológicas e proteínas por essa nomenclatura. 1 S = 10⁻¹³ segundos. O nome vem do cientista Theodor Svedberg, sueco ganhador do Prêmio Nobel de Química em 1926 por seu trabalho no estudo de colóides e pela invenção da ultracentrífuga⁽¹²⁷⁾.

A maioria das proteínas presentes na soja são globulinas, chamadas proteínas de "reserva" do grão, pois são sintetizadas durante o desenvolvimento deste. As globulinas 7S e 11S representam cerca de 70 % das proteínas contidas no grão de soja, enquanto a fração 2S equivale a aproximadamente 20 %. Os outros 10 % são proteínas da fração 15S, de estrutura ainda não totalmente elucidada, apesar de estudos indicarem que se tratam de dímeros da glicinina, na faixa de peso de 600 kDa ^(18,19,20,21).

A fração 7S é majoritariamente composta pela β -conglucina em forma de trímero, com diferentes combinações das suas subunidades α , α' e β , unidas por ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (Figura 3a). Contém, também, as enzimas β -amilase, lipoxigenase e hemaglutinina. Já a globulina 11S é conhecida como glicinina, está presente em forma de hexâmero unido por ligações de dissulfeto (Figura 3b e 3c). Representa cerca de 40 % do total e, por isso, é considerada a principal fonte de proteína do grão ^(20,22).

De acordo com a literatura, as frações 11S e 15S da soja são constituídas de proteínas puras, enquanto a fração 2S possui proteínas biologicamente ativas e inibidores de tripsina ^(18,20,21,22). A Figura 4 representa a composição das frações proteicas da soja de forma esquemática.

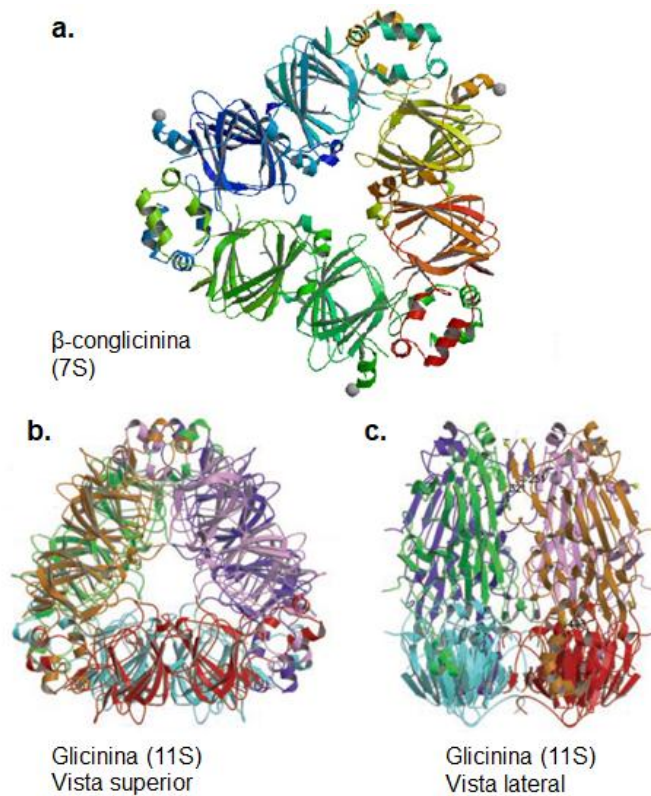
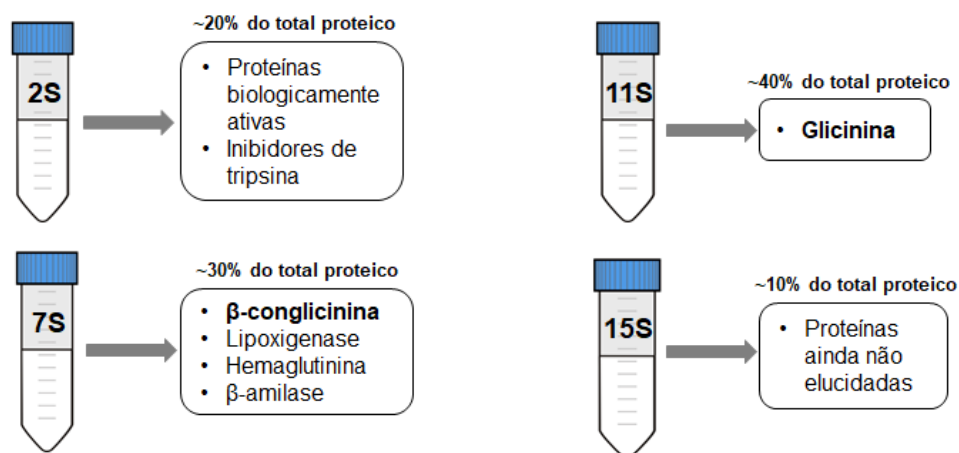


Figura 3. a) Estrutura de trímero da β -conglucina. (Fonte: adaptado de Maruyama *et al.*, 2004) ⁽²³⁾. b) Vista superior e c) vista lateral da estrutura hexam rica da glicinina, formada pela união de dois trímeros. (Fonte: adaptado de Adachi *et al.*, 2003) ⁽²⁴⁾.



Fonte: Autor.

Figura 4. Fra es da proteína de soja e seus respectivos constituintes.

A fração 11S, também conhecida como legumina, possui a maior concentração de aminoácidos sulfurados e tem menor tendência à dissociação (devido a sua estrutura oligomérica), necessitando pHs mais ácidos. Já a globulina 7S, também chamada de vicilina, resulta em um grande número de fragmentos polipeptídicos. Em geral as globulinas são insolúveis em água. Porém, dissolvem-se em soluções salinas diluídas em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico, que é na faixa de 4,7. Quando em solução, são sensíveis ao tratamento térmico. A glicinina (11S) desnatura na faixa de 85-95°C enquanto a β -conglucina (7S) desnatura a 65-75°C^(18,21).

Do ponto de vista alimentar, as proteínas são macronutrientes de importância vital e sua qualidade nutricional depende da quantidade, digestibilidade, absorção e utilização dos aminoácidos que a compõem. A proteína da soja é considerada a mais completa de origem vegetal, pois apresenta todos os aminoácidos essenciais necessários para alimentação humana ou animal: isoleucina, leucina, lisina, metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina, treonina, triptofano, valina e histidina. A maioria deles, com exceção dos sulfurados cisteína e metionina, está presente em quantidades próximas às requeridas para o consumo humano segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), organismo da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Além disso, o índice de digestibilidade da proteína de soja é semelhante ao das proteínas do ovo e da caseína do leite⁽²⁵⁾.

Em 1999 o *Food and Drug Administration* (FDA), departamento americano responsável pelo controle de alimentos e medicamentos, aprovou uma publicação sobre a proteína de soja, declarando que a ingestão de 25 gramas desta ao dia auxiliaria na redução do risco de doenças cardíacas⁽²⁶⁾.

No Brasil, a RDC nº 19 de 30 de abril de 1999 da ANVISA regulamenta os procedimentos para o registro de produtos que declarem no rótulo possuir propriedades funcionais ou de saúde⁽²⁷⁾. Posteriormente, em 2008, a publicação da Lista de Alegações de Propriedade Funcional declarou que “O consumo diário de pelo menos 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu

consumo deve estar associado a uma dieta balanceada e um estilo de vida saudável”.

2.1.1. *Características físico-químicas da soja e seus derivados*

O grão de soja contém aproximadamente 40 % de proteínas, 20 % de lipídeos, 23 % de carboidratos totais, 12 % de fibras e 5 % de cinzas (matéria seca). Possui, também, diversos minerais, como magnésio, fósforo, ferro, cálcio e zinco ⁽²⁸⁾. Devido ao seu alto teor proteico em comparação a outras leguminosas, com proteínas de fácil digestibilidade e grande diversidade de aminoácidos essenciais, a soja ganhou destaque na alimentação animal e humana, como matéria-prima de uso industrial para alimentos processados de diversos tipos e como substituto da carne em dietas vegetarianas e veganas ^(29,30).

Além dos macro e micronutrientes, o grão de soja possui outros compostos como esteróis, saponinas e fitoestrógenos flavonoides (isoflavonas) ⁽³⁰⁾. Muitos dos efeitos benéficos da soja para a saúde humana são atribuídos às isoflavonas. Contudo, apesar da grande quantidade de vantagens atreladas às características bioquímicas da soja, ela possui alguns antinutrientes (compostos biológicos ativos) que prejudicam seu valor nutricional e podem interferir no correto funcionamento do organismo ⁽³¹⁾.

Os principais antinutrientes presentes na soja são: inibidores de protease, que inibem a atuação das enzimas tripsina ou quimiotripsina e prejudicam a digestão proteica; lectinas, que aglutinam as células vermelhas do sangue, podendo causar coágulos, e reduzem a absorção de nutrientes no intestino delgado; ácido fítico, que causa alterações na tireoide e problemas de origem endocrinológica; e oligossacarídeos como a rafinose e a estaquiose, que são de difícil digestão, fermentam no cólon e causam flatulência. Muitos destes antinutrientes, principalmente os inibidores enzimáticos, podem ser inativados empregando tratamentos térmicos como aquecimento úmido e tostagem ^(30,31,32).

A soja está comercialmente disponível em formatos variados: como grão, farinha desengordurada, proteína concentrada, proteína isolada, proteína texturizada, extratos, leite de soja, etc. A RDC nº 268 de 22 de setembro de 2005 da ANVISA define os requisitos de composição de cada um dos derivados comerciais de soja ⁽³³⁾. O teor de proteína mínimo para cada um deles é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Teores de proteína mínimos exigidos para os derivados comerciais de soja.

Derivado de soja	Teor mínimo de proteína (base seca) x 6,25^a
Proteína Texturizada (PTS)	50%
Proteína concentrada (PCS)	68%
Proteína Isolada (PIS)	88%
Extrato em pó	40%
Extrato líquido	3%
Farinha desengordurada	45%

^a Fator de Kjeldahl utilizado para proteína de soja.

Fonte: ANVISA ⁽³³⁾

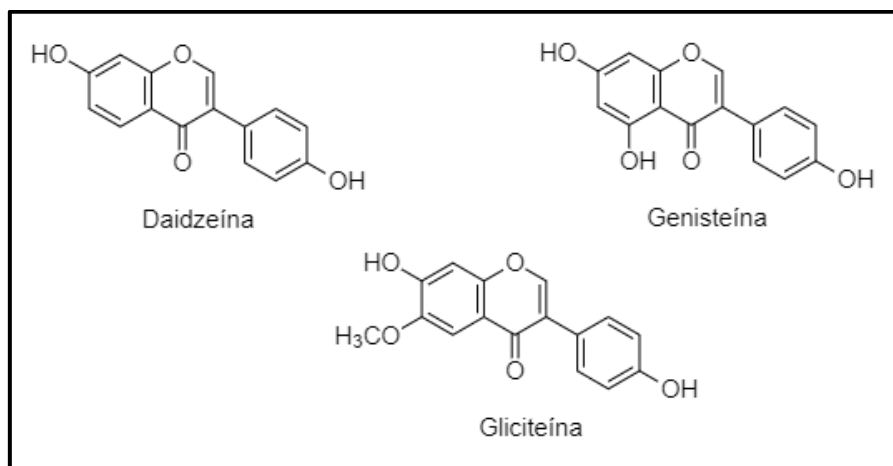
A composição bioquímica do grão de soja é diretamente alterada por diversos fatores, que vão desde o genótipo da semente, condições de plantio (como temperatura e umidade) até os tipos de processamento que transformam o grão cru nos seus diversos derivados consumíveis ⁽¹⁸⁾.

Da mesma forma, os subprodutos da soja variam muito em seus macro e micronutrientes constituintes. A composição química dos concentrados e isolados proteicos de soja é fortemente afetada pelos processamentos empregados em sua obtenção, inclusive o método de solubilização e a temperatura. Por exemplo, para extrair as proteínas da soja removendo os açúcares e oligossacarídeos pode-se utilizar água, álcool, ou uma mistura de ambos em diferentes proporções. A água remove alguns peptídeos de baixo peso molecular, enquanto o álcool retira boa parte das isoflavonas e outros fitoquímicos (como a saponina) que são solúveis nesse solvente, levando à produtos com composições consideravelmente diferentes ^(34,35).

2.1.1.1 Isoflavonas

Isoflavonas são compostos pertencentes a uma classe de flavonoides conhecida como fitoestrógenos, que possuem similaridade estrutural e funcional com o hormônio humano 17β -estradiol (estrogênio). Os fitoestrógenos ocorrem naturalmente como produtos de metabolismo secundário em diversos tipos de plantas, mais comumente em leguminosas, sendo a soja o grão que possui maior concentração. A presença de isoflavonas em produtos cárneos decorre exclusivamente da adição de condimentos, proteínas ou outros ingredientes vegetais ^(36,37,38).

As isoflavonas presentes na soja possuem 4 formas químicas e totalizam 12 isômeros: as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína (Figura 5); os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; os derivados glicosilados acetilados, 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina e os glicosilados malonilados, 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina ⁽³⁹⁾. Como agliconas, são diretamente absorvidas pelo organismo. Já as formas glicosídicas são previamente transformadas em agliconas pelas β -glicosidasas presentes no intestino para que ocorra a absorção ⁽⁴⁰⁾.



Fonte: Autor.

Figura 5. Estrutura química das formas agliconas das isoflavonas presentes na soja.

Atualmente, as isoflavonas são associadas a diversos benefícios à saúde e, por isso, são amplamente consumidas, inclusive como suplemento. O efeito mais difundido é como auxiliar nos sintomas da menopausa e osteoporose em mulheres, devido a sua atividade estrogênica. Mas também é associado a propriedades antioxidantes, antifúngicas, bactericidas, anti-inflamatórias, hipocolesterômicas, antimutagênicas e antitumorais, principalmente contra os cânceres de mama e próstata ^(37,41,42,43,44,45,46).

Apesar de tantos supostos benefícios, diversos estudos têm questionado a função biológica benéfica do consumo dos fitoestrógenos da soja. As isoflavonas foram associadas a disfunções de tireoide em adultos e crianças, inibição na síntese de estradiol e distúrbios hormonais (principalmente em bebês do sexo masculino), infertilidade em homens adultos e demência em idosos ⁽⁴⁷⁾.

Além dessa controvérsia, existe uma grande dificuldade em estipular o consumo ideal diário de isoflavonas e relacioná-lo às quantidades de consumo de produtos derivados da soja, principalmente os proteicos, visto que o processamento influencia drasticamente na concentração final. Mais estudos são necessários para avaliar com maior confiabilidade os efeitos do consumo de isoflavonas à saúde e estipular a quantidade segura de ingestão, seja por meio de alimentos que a contém ou por suplementação.

Diversos estudos apresentaram resultados incongruentes ao procurar analiticamente uma correlação entre o teor de isoflavonas e proteínas nos derivados ou grãos de soja ^(48,49,50,51,52,53,54). Se encontrada uma correlação forte entre a quantidade de isoflavonas e proteínas, seria possível utilizar as isoflavonas como marcadores na determinação analítica da proteína de soja. Em 2010, Daguer *et al.* apresentou um método capaz de detectar proteína de soja em lombo de suíno através do teor de isoflavonas, utilizando CLAE com detector PDA. Porém, essa abordagem se mostra viável somente se a curva analítica e as amostras são preparadas com a mesma matéria-prima de proteína de soja ⁽⁵⁵⁾.

2.1.2. A proteína de soja como alérgeno

O termo “alergia alimentar” é definido como uma resposta imunológica específica do corpo às proteínas de um determinado alimento e os sintomas variam de uma simples coceira ou inchaço nos lábios até um choque anafilático, podendo levar à óbito. Existem, também, vários tipos de reações adversas não-imunológicas aos alimentos, ocasionando sintomas como refluxo gastroesofágico, infecção, anormalidades gastrointestinais, dentre outros ⁽⁵⁶⁾.

Apesar de apresentar diversos aspectos nutricionais positivos, a soja está entre os 8 alimentos que mais causam alergia alimentar no mundo. Conhecidos como “*The big 8*”, leite, ovos, amendoim, crustáceos, castanhas, soja, trigo e peixe são responsáveis por aproximadamente 90 % dos casos de alergia. Esses alimentos são reconhecidos como alergênicos de relevância para a saúde pública pelo *Codex Alimentarius*, organismo da FAO e da OMS responsável pela harmonização internacional de regras para alimentos ^(56,57).

Ao menos 21 proteínas presentes na soja já foram associadas a processos alérgicos e, para indivíduos que possuem essa sensibilidade, o contato até mesmo com traços do alérgeno pode desencadear uma reação. A única forma efetiva de prevenir os sintomas clínicos é a restrição do consumo. Portanto, é imprescindível que o consumidor tenha acesso às informações nutricionais dos produtos de forma confiável. Para produtos embalados, a forma mais eficaz de difundir essa informação é através da rotulagem ^(56,57,58).

Por essa razão, o uso de qualquer derivado de soja deve ser declarado no rótulo do produto, conforme estabelecido pela RDC nº 26, de 2 de julho de 2015 da ANVISA. A iniciativa para essa regulamentação surgiu da importância da rotulagem dos alimentos embalados na proteção da saúde e melhoria da qualidade de vida dos indivíduos com alergias alimentares e, também, pela constatação de diversos problemas na transmissão de informações nos rótulos ^(57,59).

2.1.3. *Uso industrial da proteína de soja em produtos cárneos e as ferramentas analíticas atuais*

A indústria de cárneos utiliza diversos tipos de aditivos com a finalidade de conferir determinadas características físico-químicas ao produto final. As propriedades funcionais das proteínas que possuem relevância para aplicação nos alimentos são as organolépticas, as hidrofílicas (interações proteína-água), intermoleculares (interações proteína-proteína) e interfásicas (interações da proteína com outros componentes do produto) ⁽³⁾.

A proteína de soja é amplamente utilizada como extensor, emulsificante ou estabilizante, conferindo homogeneidade e textura ao produto final. Extensores são proteínas ou misturas de proteínas que servem para substituir parcialmente as proteínas naturais de origem animal, de forma a diminuir os custos mantendo uma qualidade similar no produto e aumentando seu rendimento. Os objetivos tecnológicos da adição da proteína de soja são: reduzir custos de produção; melhorar o rendimento de cocção, a fatiabilidade, a estabilidade da emulsão e o sabor; aumentar o conteúdo proteico e o rendimento; melhorar a retenção de água e de gordura ^(3,60).

Os derivados de soja utilizados como aditivos são principalmente as farinhas desengorduradas, proteínas texturizadas, os concentrados e os isolados proteicos, que contém no mínimo 30 %, 50 %, 70 % e 90 % de proteína, respectivamente. Cada derivado possui diferentes características e proporções dos nutrientes constituintes, oriundas do seu processamento, e aplicações industriais distintas que dependem do objetivo pretendido.

A solubilidade da proteína também depende dos seus tratamentos prévios ^(61,62). A Tabela 2 apresenta os principais derivados de soja utilizados para produtos cárneos e embutidos, bem como a motivação tecnológica do seu uso. Segundo Daguer *et al.* (2010) ⁽⁵⁵⁾, a proteína concentrada de soja (PCS) é o derivado mais utilizado no Brasil, seguida da proteína texturizada (PTS) e da proteína isolada de soja (PIS).

Tabela 2. Aplicações industriais dos derivados Farinha desengordurada de soja (FDS), Proteína concentrada de soja (PCS) e Proteína isolada de soja (PIS) em produtos cárneos.

Propriedade funcional	Objetivo	Aplicação	Derivado de soja
Absorção e retenção de água	Formação de pontes de hidrogênio, retenção de água	Cárneos, salsichas	FDS, PCS
Gelificação	Formação de matriz proteica	Cárneos	PCS, PIS
Coesão-adesão	Adesividade	Salsichas	FDS, PCS, PIS
Elasticidade	Pontes dissulfeto em géis deformáveis	Cárneos	PIS
Emulsificação	Formação e estabilização de emulsões como gordura	Salsichas	FDS, PCS, PIS
Absorção de óleo	Retenção de óleo livre	Cárneos, salsichas	FDS, PCS, PIS
Retenção de aroma	Adsorção, aprisionamento	Análogos de carne	PCS, PIS

Fonte: Adaptado de VIEIRA (2007) ⁽⁶²⁾.

Devido ao baixo custo e aos evidentes benefícios tecnológicos da adição de derivados da soja em produtos cárneos, é necessário manter vigilância constante quanto à quantidade adicionada, pois proteínas alternativas podem ser utilizadas de forma fraudulenta para substituir a presença de componentes mais nobres no produto. No Brasil, o MAPA regulamenta as especificações de composição de cada tipo de produto através da publicação de Instruções Normativas que estipulam os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ). A Tabela 3 apresenta em um compilado as adições máximas permitidas pela legislação para diversos produtos cárneos.

Tabela 3. Teores máximos de adição de proteína de soja em produtos cárneos segundo legislação do MAPA.

Produto	Adição máxima permitida	Exceções (adição não permitida)
Presunto tenro	1,0%	* Presuntos cru, serrano e parma
Bacon, barriga defumada, lombo, paleta, pepperoni, presunto cozido	2,0%	* Presunto cozido superior
Apresentado, fiambre, linguiça, paio	2,5%	* Linguiças Blumenau, calabresa, portuguesa, toscana e colonial
Patê	3,0%	-
Almôndega, empanados, hamburguer, kibe, mortadela, salsicha	4,0%	* Mortadelas bologna e italiana * Salsichas Viena e Frankfurt
Copa, CMS, salame, salaminho, corned beef, jerked beef	Adição não permitida	-
Produtos cárneos salgados	Adição não permitida	-

Fonte: MAPA – RTIQ cárneos e seus derivados ⁽⁸⁾.

Entretanto, apesar da existência de legislações dispendo sobre limites máximos e do risco agregado ao uso inadvertido de derivados de soja em produtos cárneos, a fiscalização permanece defasada em relação às fraudes, por carência de ferramentas analíticas mais adequadas.

O método de Kjeldahl ⁽⁹⁾ é um método indireto que quantifica o nitrogênio total presente na amostra. Por isso, o resultado inclui um fator (fator de Kjeldahl) que relaciona a quantidade de nitrogênio total da amostra com a que é proveniente das proteínas naquele tipo de matriz. No caso da soja, esse fator é 6,25. Devido a sua execução relativamente simples e boa precisão, esse método é o mais amplamente utilizado no mundo para determinação de proteína em diversas matrizes, alimentícias ou não.

Existem vários produtos cárneos e embutidos em que a legislação permite a adição de outros tipos de proteína (vegetal ou láctea) em quantidades limitadas

e, através do método de Kjeldahl, não é possível diferenciá-las e avaliar se esses limites estão sendo respeitados. Existem, ainda, produtos onde não é permitida a adição de proteína não-cárnea e essa fraude permanece indetectável com as ferramentas analíticas empregadas atualmente. A falta de especificidade do método de Kjeldahl permite, inclusive, a adição de qualquer composto rico em nitrogênio, mesmo não sendo uma substância própria para consumo, o que pode levar a fatalidades como a morte de crianças e animais ocorrida na China após o consumo de leite e ração adulterados com melamina ⁽⁶³⁾.

O método oficial internacionalmente estabelecido para quantificar a proteína de soja em amostras cárneas é da AOAC ⁽⁶⁴⁾, baseado em imunoabsorção enzimática ou ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Apesar de serem rápidos e facilmente aplicados na rotina laboratorial, métodos ELISA são indiretos e passíveis de resultados falso positivos. O tratamento térmico empregado na fabricação dos produtos cárneos afeta a performance e confiabilidade dos métodos enzimáticos, pois o aquecimento desnatura as proteínas, altera sua conformação e solubilidade ^(2,65,66). Além disso, detectam somente um composto por teste ⁽⁶⁷⁾ e possuem diversas limitações quando se utilizam matrizes complexas e alimentos processados. Já foram criticados por autoridades regulatórias ⁽⁶⁾ e são considerados como métodos semi-quantitativos ⁽⁶⁵⁾.

Uma outra alternativa bastante empregada são métodos baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que é uma técnica utilizada para amplificar um segmento de DNA em várias ordens de grandeza, gerando de milhares a milhões de cópias de uma determinada sequência de DNA, até que este possa ser analisado por outra técnica, como eletroforese ⁽⁶⁸⁾. Porém, os resultados dos métodos baseados em PCR são afetados devido aos tratamentos realizados nos produtos cárneos processados (que provocam degradação do DNA) e também pela complexidade da matriz, dentre outros fatores ^(68,69,70,71,72).

A maioria dos trabalhos publicados utilizam técnicas analíticas com base em detecção de DNA, eletroforese, ou otimizações a partir do atual método ELISA

da AOAC^(68,73). No Brasil foram desenvolvidos métodos utilizando as técnicas de razão isotópica⁽⁷⁴⁾ e espectroscopia no infravermelho próximo⁽⁷⁵⁾ e médio⁽⁷⁶⁾, mas são semi-quantitativos e de difícil aplicação em uma rotina analítica de fiscalização.

Mais recentemente, devido à modernização analítica, a AOAC publicou o método oficial para identificação de proteínas de ervilha, arroz e soja em matérias-primas e produtos acabados. Esse método utiliza CLAE-EM/EM e monitora 3 peptídeos da glicinina da soja. Entretanto, o método é qualitativo e possui um protocolo longo e dispendioso, utilizando peptídeos sintéticos comerciais como padrão interno⁽⁷⁷⁾.

Caracterizar a proteína de soja em produtos cárneos é uma necessidade constatada por diversos autores^(6,65,78,79,74), para que os parâmetros legais estabelecidos possam ser fiscalizados de fato. As maiores dificuldades a serem superadas no desenvolvimento de novas ferramentas analíticas são a complexidade e homogeneidade das matrizes, as modificações estruturais que o processamento pode causar nas proteínas e o tipo do derivado de soja utilizado como matéria-prima, tendo em vista as diferenças de composição existentes, discutidas na seção 2.1.1.

Na última década, a utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa têm se difundido como uma excelente alternativa analítica para especiação de proteínas de origem cárnea e vegetal em alimentos processados, inclusive com técnicas mais sofisticadas, como a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa em modo tandem (do inglês *UPLC-MS/MS*)⁽⁷⁸⁾ e a Cromatografia Líquida em Nanoescala acoplada a Espectrometria de Massa em modo tandem (do inglês *Nano-LC-MS/MS*)⁽⁸⁰⁾.

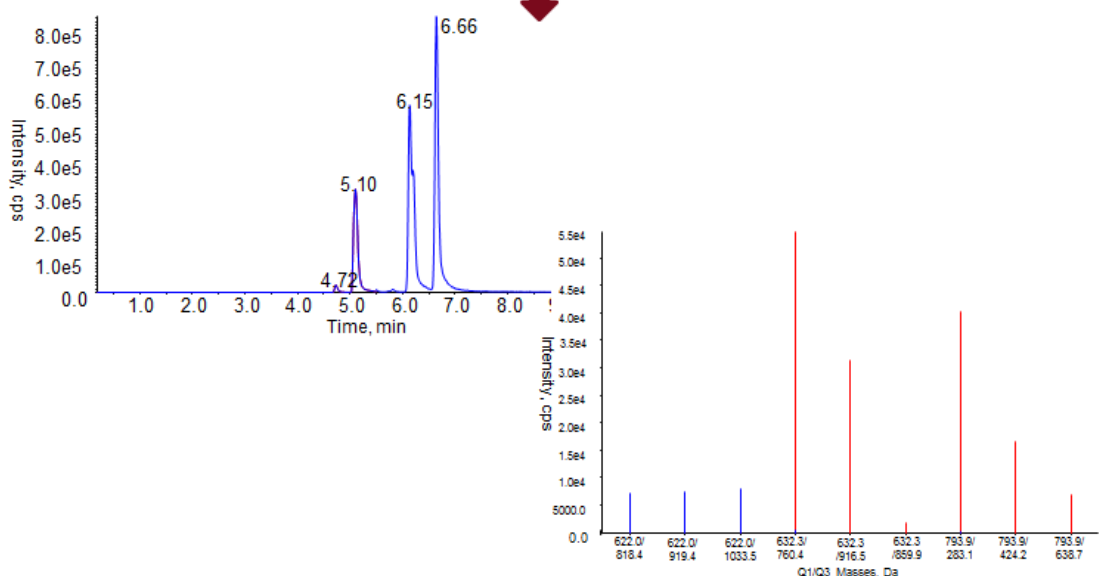
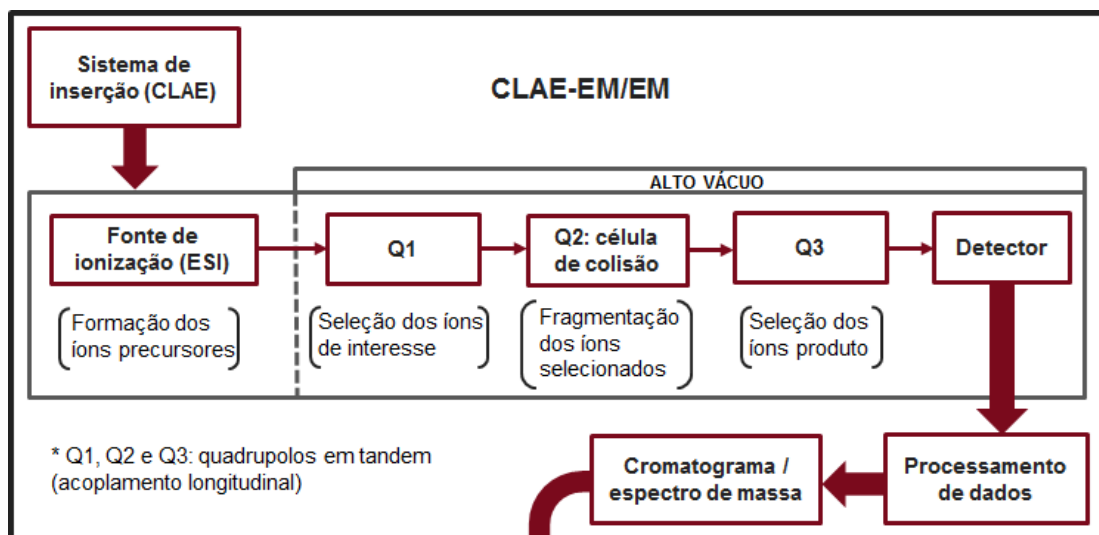
2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à Espectrometria de massa em modo tandem (CLAE-EM/EM)

A cromatografia é uma técnica química que permite a separação, identificação e determinação de componentes em misturas complexas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o tipo mais versátil e amplamente empregado de cromatografia por eluição, sendo útil para promover a separação de compostos biológicos, como proteínas.

A CLAE-EM/EM pode ser considerada a combinação ideal entre método de separação e detecção ⁽⁸¹⁾ e vem sendo utilizada em diversas áreas, como a farmacêutica, na pesquisa de novos compostos, estudos farmacocinéticos e metabólicos ⁽⁸²⁾; na medicina, para pesquisa do genoma humano e animal, análises em células e plasma ^(83,84); em resíduos de medicamentos e pesticidas nas mais diversas matrizes, com análises multiresíduos capazes de detectar dezenas de compostos em uma única corrida ^(85,86,87); e na área de alimentos, principalmente no controle de fraudes e contaminantes ^(88,89,90,91,92,93).

A técnica de espectrometria de massa consiste em transformar o analito em íons na fase gasosa, carregados positiva ou negativamente, e posteriormente separá-los em um analisador em função da sua razão massa/carga (m/z). A análise de proteínas e polipeptídeos de cadeia longa por EM não era possível até a década de 1980, devido a sua polaridade e natureza não-volátil. Essa realidade mudou após o desenvolvimento das técnicas de dessorção e ionização branda, ainda no final da mesma década, possibilitando a ionização no estado gasoso de macromoléculas de massa elevada ^(94,95).

Neste trabalho utilizou-se fonte de ionização por electrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*) e, como analisador de massa, um sistema triplo-quadrupolo (QqQ ou *tandem*), conforme mostra o esquema da Figura 6.



Fonte: Autor.

Figura 6. Esquema geral de cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado à espectrômetro de massa em modo tandem.

2.2.1. Aplicação em proteômica

No campo da proteômica existem duas estratégias principais para análise de proteínas por espectrometria de massa. Os métodos *top-down* focam na detecção das proteínas intactas, sem digestão prévia. São mais complexos e dispendiosos, devido a algumas barreiras técnicas, como a dificuldade de ionizar moléculas muito grandes, a complexidade dos espectros gerados e a escassez de padrões de proteínas puras disponíveis comercialmente ^(95,96). Além disso, a

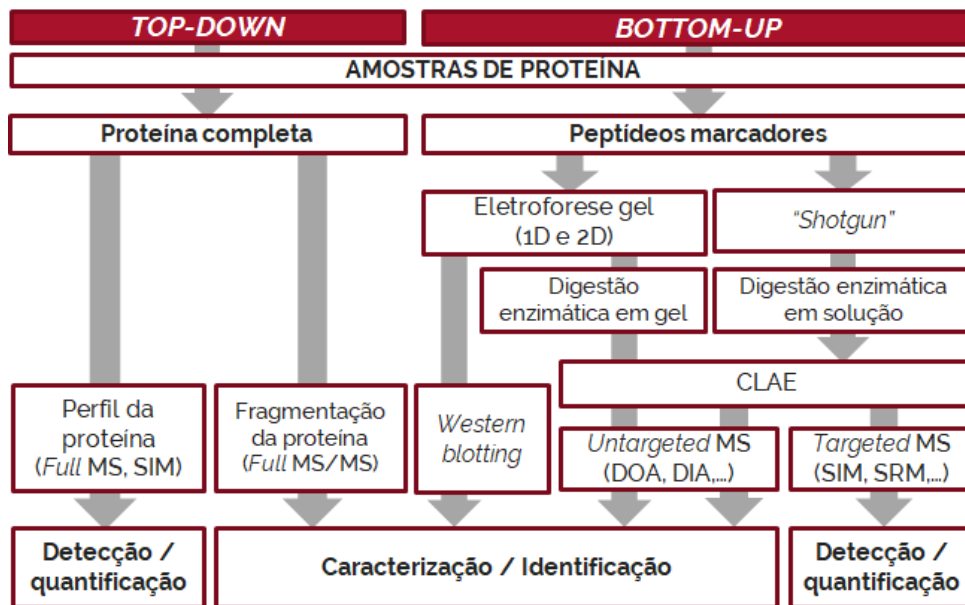
quantificação fica prejudicada principalmente em alimentos processados e matrizes complexas, pois as proteínas podem sofrer diversas modificações estruturais sob alta temperatura. Por essa razão, a estratégia *top-down* é normalmente utilizada para análise qualitativa, para a identificação e caracterização das proteínas ⁽⁹⁶⁾.

A abordagem *bottom-up* baseia-se na quebra da cadeia proteica seguida da análise dos fragmentos peptídicos formados. O primeiro passo consiste em definir os peptídeos marcadores da proteína de interesse e alguns critérios de escolha como singularidade, sensibilidade e estabilidade precisam ser considerados. É crucial que os peptídeos escolhidos como marcadores sejam específicos daquele tipo de proteína, para evitar falsa identificação.

A quebra da cadeia proteica pode ser realizada em gel (por eletroforese) ou sem gel, por uma abordagem conhecida como “*shotgun*”, que utiliza digestão enzimática em solução com o auxílio de enzimas peptidases. Por fim, os peptídeos são separados por CLAE, analisados no espectrômetro de massa e os resultados são comparados a bancos de dados. Métodos *shotgun* são amplamente empregados para quantificar e identificar proteínas indiretamente, através dos peptídeos oriundos da digestão proteolítica ^(94,96). A Figura 7 esquematiza os dois processos e suas etapas.

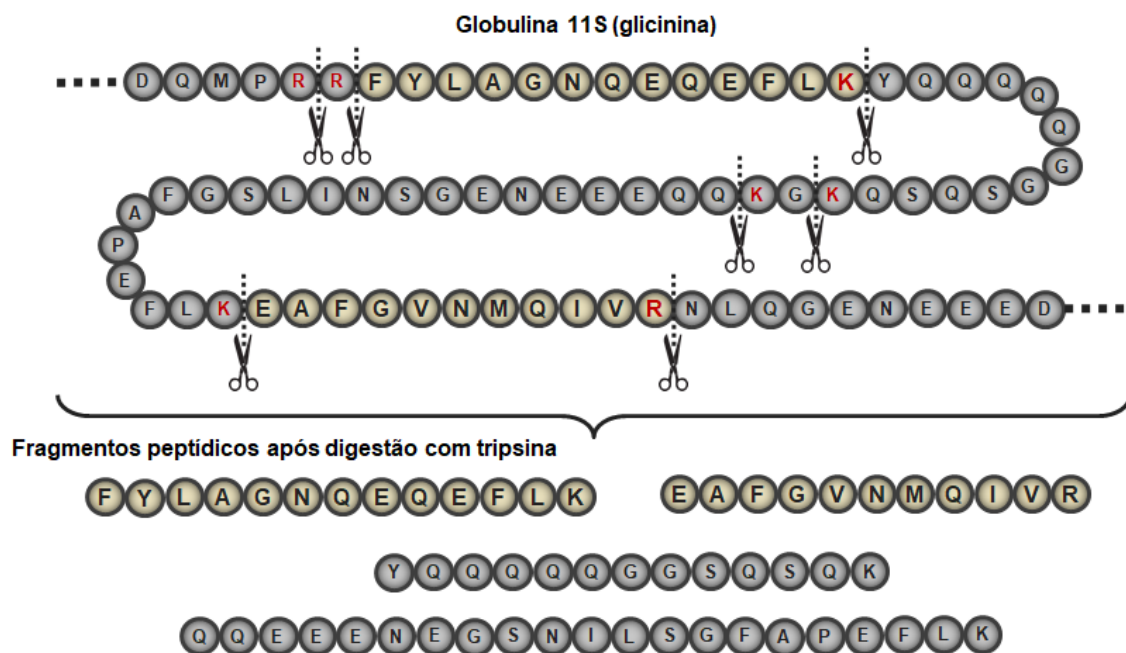
A enzima mais comumente utilizada para quebra proteica é a tripsina². Quando em solução, ela cliva as cadeias da proteína na carboxila dos resíduos de lisina (K) e arginina (R), exceto se o próximo aminoácido for uma prolina (P). Essa clivagem gera peptídeos estáveis em um processo chamado de digestão tríptica ^(94,95), como pode ser observado na Figura 8.

² Além de ser a enzima peptidase mais comumente utilizada para esse fim na literatura, optou-se por utilizar a tripsina pela disponibilidade no laboratório.



Fonte: Adaptada de MONACI *et al.* (2018) ⁽⁹⁶⁾

Figura 7. Etapas dos processos *Bottom-up* e *Top-down* de análises de proteína por espectrometria de massa.



Fonte: Autor.

Figura 8. Exemplo de quebra da estrutura da proteína glicinina (11S) da soja, após digestão com a enzima tripsina, formando os fragmentos peptídicos que podem ser detectados por espectrometria de massa.

A desnaturação da(s) proteína(s) é uma etapa crucial para promover sua solubilização adequada e o desdobramento das estruturas espaciais da cadeia proteica, permitindo o acesso da enzima aos pontos de clivagem. Para essa finalidade utilizam-se agentes caotrópicos, como a ureia, ou tensoativos, como o SDS (dodecil sulfato de sódio) ^(94,97).

O uso de tensoativos iônicos é eficiente na disruptura da proteína, mas pode ter efeitos negativos nas etapas seguintes. No caso do SDS, por exemplo, até mesmo pequenas quantidades são capazes de suprimir completamente o sinal gerado por ESI na espectrometria de massa, nos modos positivo ou negativo. Por essa razão, é necessária uma etapa de remoção desse reagente após a digestão trípica. A ureia, por outro lado, é facilmente retirada por fase reversa com colunas C18, mas ela pode interferir na etapa de digestão desnaturando a enzima protease, além de outros efeitos ^(98,99).

Muitas variações de preparo de amostra para análises *shotgun* com tripsina foram testadas e otimizadas na literatura, como o uso de ultrassom, variações na temperatura, pH e tempo de extração das proteínas, bem como variações no agente caotrópico ou tensoativo, proporção proteína/tripsina, temperatura e tempo de digestão. Naturalmente, a origem da proteína em questão influencia diretamente nesses parâmetros ^(2,10,97,100,101,102,103,104).

2.2.2. *Aplicação em análise de produtos cárneos*

Ao longo das últimas duas décadas, diversos trabalhos têm sido publicados na área de qualidade de alimentos utilizando a cromatografia acoplada com espectrometria de massa como ferramenta analítica, principalmente no que concerne à investigação de compostos utilizados para fraude econômica e com especial atenção aos agentes causadores de alergias alimentares.

Em 2006, Leitner *et al.* identificaram peptídeos marcadores da proteína de soja e testaram a detecção fortificando amostras de carne de frango, gado, porco e peru, utilizando cromatografia líquida multidimensional acoplada à espectrometria de massa em tandem ⁽⁶⁾. Em 2011, foi publicado o primeiro

método *multiplex* utilizando CLAE-EM/EM para a detecção de 7 alérgenos simultaneamente, dentre eles a soja (Heick *et al.*) ⁽⁶⁷⁾. Tolin *et al.* utilizaram a CLAE-EM/EM para analisar proteínas residuais de ovo e leite em vinhos ⁽¹⁰⁵⁾. Cucu *et al.* utilizaram Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo (do inglês *MALDI-TOF*) acoplado à espectrômetro de massa para identificar peptídeos marcadores de proteína de soja estáveis após diversos tratamentos e reações tipicamente decorrentes do processamento industrial ⁽¹⁴⁾.

Em 2016, um método *shotgun* utilizando CLUE-EM/EM, capaz de detectar traços de leite, ovos, soja e amendoim em matrizes de alimentos processados, foi desenvolvido por Planque *et al.* (2016) ⁽¹⁰⁶⁾. Hoffmann *et al.* validaram um método para determinar simultaneamente proteína de soja, ervilha e tremoço em produtos cárneos e embutidos, por CLAE-EM/EM ⁽¹⁰⁾.

Li *et al.* (2018) desenvolveram um método para determinação simultânea de peptídeos de 8 espécies de proteínas de animais e plantas (inclusive soja), testado em salsichas e presuntos de diferentes origens cárneas ⁽⁷⁸⁾. Em 2017, Montowska *et al.* detectaram vários peptídeos marcadores de soja, leite e clara de ovo em produtos cárneos utilizando cromatografia líquida com detector do tipo Quadrupolo-Tempo de voo ⁽²⁾. Em 2019, o mesmo grupo desenvolveu um método de quantificação absoluta para monitorar a abundância de peptídeos em misturas complexas de proteínas processadas, utilizando marcadores isotópicos de ¹³C e ¹⁵N como padrões internos ⁽¹⁰⁷⁾.

2.2.3. *Desafios na quantificação de proteínas em alimentos processados*

Ao longo da evolução das análises de alergênicos em alimentos, muitos desafios foram encontrados no desenvolvimento de métodos analíticos que utilizem as proteínas ou seus peptídeos como marcadores para a determinação do conteúdo proteico. Destaca-se o desenvolvimento de metodologias para análise de alimentos processados e ultra-processados.

As proteínas possuem cadeias longas e complexas, e a maioria das suas propriedades físico-químicas e funções biológicas dependem da sua conformação. Até mesmo a mistura da proteína com outros compostos, como gordura, carboidratos ou com outras proteínas, pode alterar sua funcionalidade. Por essa razão, é um grande desafio estabelecer todos os fatores que podem afetar o comportamento de uma determinada proteína durante o processo produtivo do alimento e no ambiente de uma matriz complexa ⁽¹⁰⁸⁾.

Alimentos processados e embutidos normalmente sofrem algum tipo de cozimento ou aquecimento durante sua produção. O calor desnatura as proteínas, promove modificações químicas e destrói sua estrutura tridimensional. Em alguns casos, dependendo da concentração proteica, condições de pH e força iônica do meio, o aquecimento também pode induzir a agregação das proteínas ^(109,110). Porém, para métodos *shotgun*, o maior problema decorrente do aquecimento reside na solubilidade.

Naturalmente, os peptídeos selecionados como marcadores precisam ser detectáveis antes e depois do processamento da matéria-prima que contém o analito. Mas proteínas desnaturadas são menos solúveis, e isso gera grande impacto na eficiência do processo de extração ⁽¹¹⁰⁾. Em uma amostra real, a proteína nela contida (*incurred*), que passou por todas as modificações inerentes às etapas do processo produtivo, é extraída de forma diferente da proteína adicionada no laboratório após os processamentos (*spiked*).

Isso significa que, ao quantificar uma amostra real utilizando uma curva de calibração externa em matriz *spiked*, o resultado apresenta uma tendência para baixo, pois a proteína que foi adicionada na matriz da curva será mais eficientemente extraída, resultando maiores valores de área do pico cromatográfico do que as da amostra *incurred*. Mesmo utilizando a técnica de adição de padrão para construir a curva analítica (que elimina outros problemas, como o efeito de matriz) observa-se essa tendência de resultado subestimado, devido à diferença entre as áreas dos picos dos pontos fortificados *spiked* e dos pontos da amostra sem fortificação (*incurred*).

Diversos trabalhos demonstraram a influência do aquecimento na eficiência de extração das proteínas. Monaci *et al.* (2011) compararam amostras de biscoito e estudaram o efeito do tempo de exposição ao aquecimento em proteínas do leite. Concluíram que, quanto maior o tempo de cozimento, mais afetadas eram as proteínas, chegando a um decréscimo de 80 % de proteína extraída de 3 para 10 minutos de cozimento⁽¹⁰⁸⁾. Gomaa e Boye (2013), também analisaram biscoitos e observaram, por ELISA, a diferença da recuperação das proteínas de soja antes ($\pm 83\%$) e após o cozimento ($\pm 25\%$)⁽¹¹¹⁾.

Pilloli *et al.* (2017) analisaram curvas de calibração *spiked* e *incurred* de vários alérgenos (dentre eles a soja) em biscoitos, e consideraram a perda de sensibilidade por efeito do processamento como sendo a diferença da inclinação das retas obtidas nos dois casos. O resultado obtido apontou uma redução de 83 % na sensibilidade dos peptídeos de soja após o cozimento⁽¹¹⁰⁾.

A temperatura do aquecimento e o tempo de exposição a ele influenciam diretamente na capacidade de extração das proteínas. Em temperaturas a partir de 100° C, por exemplo, outras reações começam a ocorrer, como a reação de Maillard, entre açúcares redutores e grupos amino livres da lisina. Dessa forma, espera-se que os testes realizados em biscoitos (que são aquecidos entre 180 e 200° C no cozimento) apresentem uma redução no rendimento de extração mais expressiva do que a realidade prevista para os produtos cárneos, que passam por aquecimento mais ameno e por menor tempo⁽¹¹⁰⁾.

Os embutidos refrigerados que não são dessecados, curados ou defumados, passam por preparos mais brandos. A salsicha, por exemplo, é aquecida a 74° C por 15 a 20 minutos durante sua produção, enquanto a mortadela permanece a 76° C por um período de 20 a 30 minutos³. Por serem temperaturas mais baixas, espera-se que o efeito do processamento não seja tão drástico na etapa de extração das proteínas de interesse. Porém, não foram encontrados estudos

³ Informações fornecidas pela indústria parceira, referentes aos seus produtos.

específicos dos efeitos do processamento nas proteínas em produtos de origem cárnea.

Os esforços dos pesquisadores têm sido no sentido de compreender e solucionar essas dificuldades que impossibilitam a quantificação adequada de proteínas em alimentos processados. Algumas técnicas são adotadas para avaliar e tentar compensar diferenças nas etapas de extração e digestão, como a utilização de peptídeos sintéticos com marcadores isotópicos como padrão interno, para corrigir desvios ocasionados nas etapas de extração e digestão⁽¹¹²⁾. Porém, essa prática requer um alto investimento financeiro e se torna inviável como rotina.

O método desenvolvido por Planque *et al.* (2016)⁽¹⁰⁶⁾ utilizando CLUE-EM/EM foi testado em amostras de biscoito, chocolate, molho de tomate e sorvete, através de curvas de calibração *incurred*. Em 2017, Planque *et al.* fizeram um estudo comparativo em biscoitos para avaliar os impactos do processamento e dos efeitos de matriz, com amostras *incurred*, *spiked* e *digested* (quando o analito é adicionado já digerido no extrato da amostra). Eles observaram que a sensibilidade do método variou consideravelmente entre as matrizes, o que impossibilitou utilizar uma curva única para quantificar todas as amostras. Além disso, adicionaram peptídeos sintéticos como padrão interno antes do cozimento, na tentativa de corrigir os efeitos oriundos do aquecimento, mas sem sucesso⁽¹¹³⁾.

Hoffmann *et al.* (2017) produziram suas próprias amostras de linguiça contendo diferentes níveis de proteínas vegetais para obter uma curva de calibração *incurred*. Eles utilizaram peptídeos sintéticos como padrão interno, substituindo um aminoácido da sequência, o que promove o mesmo efeito dos isótopos de ter uma massa total quase idêntica à do peptídeo de interesse. Porém, uma diferença de aproximadamente 4 minutos no tempo de retenção foi observada entre um dos peptídeos da soja e o seu padrão interno sintético. A recuperação obtida para o peptídeo mais intenso da soja foi de 60 % (média de 6 lotes)⁽¹⁰⁾.

Até o presente momento, não se tem conhecimento de uma metodologia que corrija totalmente os efeitos do processamento das amostras, das etapas de extração e digestão, ou dos diferentes tipos de matriz. A alternativa mais viável para minimizar a diferença de capacidade de extração das proteínas é trabalhar com curva de calibração externa *incurred*, ou seja, produzir amostras com diferentes (e conhecidas) concentrações dos analitos de interesse, submetê-las ao mesmo protocolo de preparo das amostras e construir a curva de calibração. Também é possível produzir uma única amostra com concentração alta do analito e uma amostra branca (com a matriz igual, exceto pela presença do analito) de forma que a curva de calibração possa ser preparada com diferentes diluições entre o extrato da amostra *incurred* e o da amostra branca.

A desvantagem dessa abordagem reside no fato de cada tipo de matriz necessitar uma curva de calibração em matriz distinta, aumentando o volume de trabalho e diminuindo a versatilidade e o rendimento operacional. Uma alternativa, atualmente já utilizada em rotinas laboratoriais, é preparar uma curva de calibração única como triagem e, no caso de amostras não-conformes, realizar a confirmação com uma curva de calibração na mesma matriz.

Outra dificuldade encontrada atualmente na pesquisa de alergênicos em produtos cárneos está na falta de materiais de referência e programas interlaboratoriais disponíveis, ou mesmo de Guias normatizados que orientem o desenvolvimento desse tipo de método, unificando parâmetros de validação e unidades de expressão dos resultados ⁽¹¹³⁾.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Solventes, reagentes e padrões

Solventes: água ultrapura (Mili-Q) com resistividade controlada em no máximo 18,2 Ωm , acetonitrila (JT Baker, 99,8 %). Os solventes utilizados nesse trabalho possuem pureza compatível com a técnica de espectrometria de massa.

Reagentes: éter dietílico P.A. (Qhemis), tripsina obtida de pâncreas suíno (Sigma), ácido fórmico P.A. (Vetec), ureia P.A. (Neon, 99,39 %), Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck, 99,89 %), ácido clorídrico P.A. (Alphatec), bicarbonato de amônio P.A. (Sigma, 100,5 %).

3.1.2. Preparo das soluções e fase móvel

Solução de tripsina (concentração final 1,0 mg mL⁻¹): foi preparada pela pesagem de 0,050 g do padrão e transferido para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi ajustado com água ultrapura e a solução foi fracionada e as porções congeladas a -20° C para conservação.

O tampão ureia-tris foi preparado com 8,0 mol L⁻¹ de ureia (48,0 g) e 50,0 mMolar de tris (60,5 mg) para cada 100 mL de solução, em água ultrapura. Para dissolver a ureia é necessário aquecer a solução, sob agitação, a aproximadamente 70° C. O pH foi ajustado com algumas gotas de uma solução de ácido clorídrico 1,8 mMolar em água ultrapura, até atingir pH 8,2. Depois de pronto, o tampão foi filtrado à vácuo com membrana 0,45 μm e conservado em geladeira.

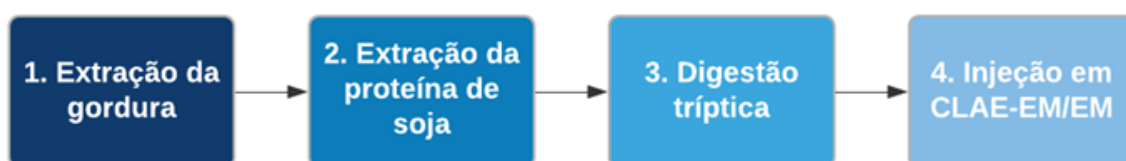
A solução de bicarbonato de amônio foi preparada na concentração de 0,40 % (m/v) em água ultrapura e conservada em geladeira.

A fase móvel A foi preparada com a adição de 0,10 % (v/v) de ácido fórmico em água ultrapura e a fase móvel B foi preparada adicionando-se 0,10 % (v/v)

de ácido fórmico em acetonitrila. Ambas foram filtradas em sistema de vácuo com membrana filtrante 0,45 µm.

3.1.3. Preparo das amostras

Os protocolos de preparo de amostra para análises *shotgun* podem ser divididos em 4 etapas principais, que são a purificação da matriz (retirando componentes que podem interferir nos resultados, como a gordura), a extração das proteínas de interesse, a digestão das proteínas e a análise cromatográfica (Figura 9).

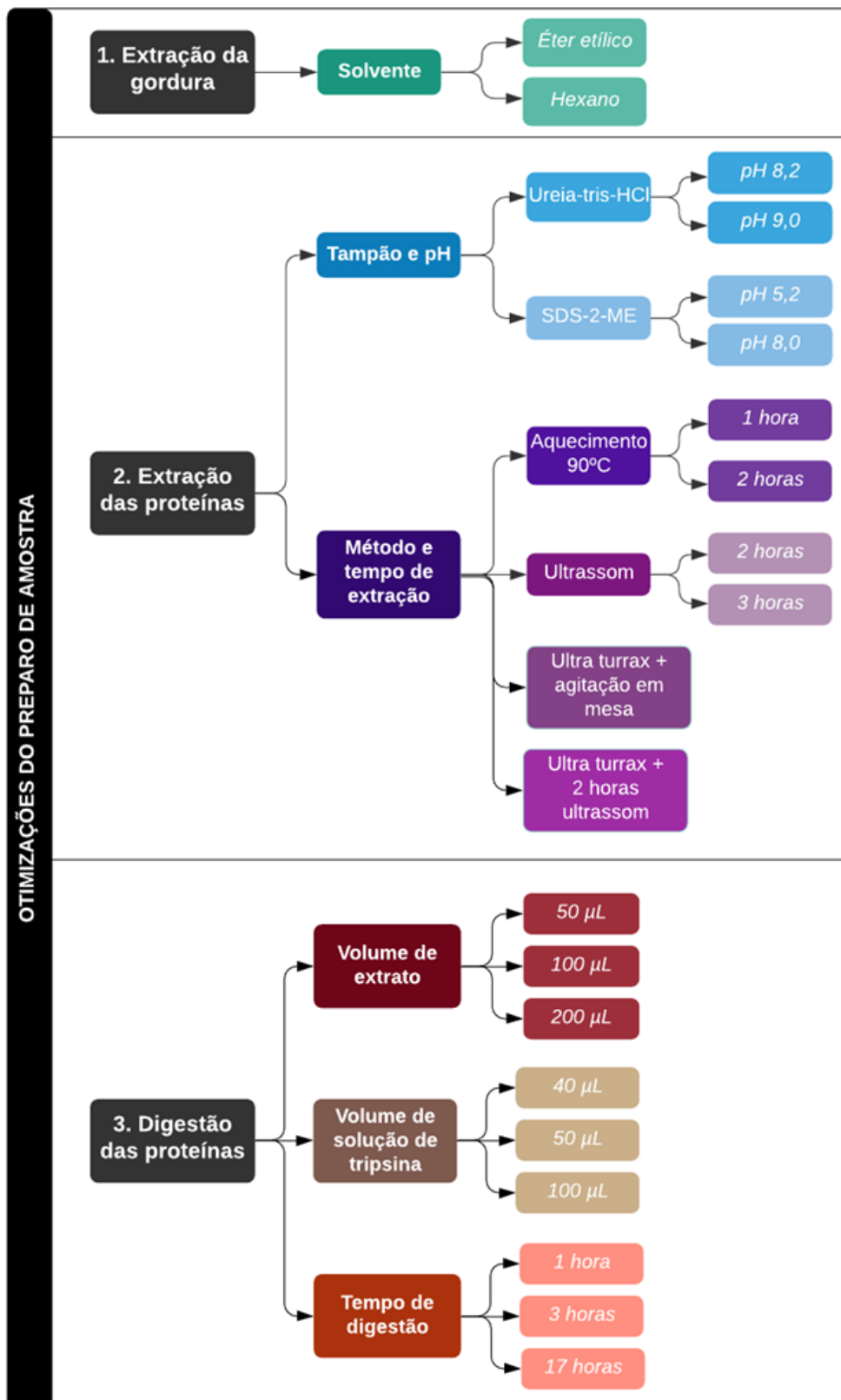


Fonte: Autor.

Figura 9. Esquema das etapas principais de métodos *shotgun* para análise de proteínas.

Todas essas etapas afetam diretamente o resultado da análise. Por essa razão, é de suma importância otimizar cada uma delas, visando obter a melhor resposta possível dos peptídeos de interesse na espectrometria de massa.

Neste trabalho foram realizados diversos testes de otimização, principalmente nas etapas de extração e digestão das proteínas, conforme apresentado no esquema da Figura 10. As otimizações descritas foram realizadas em amostras de proteínas de soja, salame, linguiça, salsicha e mortadela. Os resultados obtidos para os testes são apresentados e discutidos na seção 4.1.



Fonte: Autor.

Figura 10. Fluxograma dos testes de otimização realizados em cada etapa do preparo de amostra.

Após todas as otimizações realizadas, o protocolo de preparo de amostra ficou definido como apresentado a seguir.

Inicialmente, as amostras foram trituradas com o auxílio de um processador, até a obtenção de uma massa com partículas menores e homogêneas. Uma fração de aproximadamente 2,00 g da amostra triturada foi pesada em tubo falcon de 50,0 mL para proceder à análise.

Para extrair a gordura, a amostra foi submetida a 3 lavagens sucessivas com 5,0 mL de éter etílico, agitação em vórtex ou mesa agitadora e centrifugação a 4500 rpm e 5°C. Após as lavagens, a amostra foi colocada a 25° C por 5 minutos em um concentrador com fluxo de ar comprimido, a fim de remover o solvente residual. Alternativamente, pode-se utilizar uma estufa a $\pm 45^\circ$ C por 30 minutos ou o tempo necessário até que o odor do solvente não seja mais percebido.

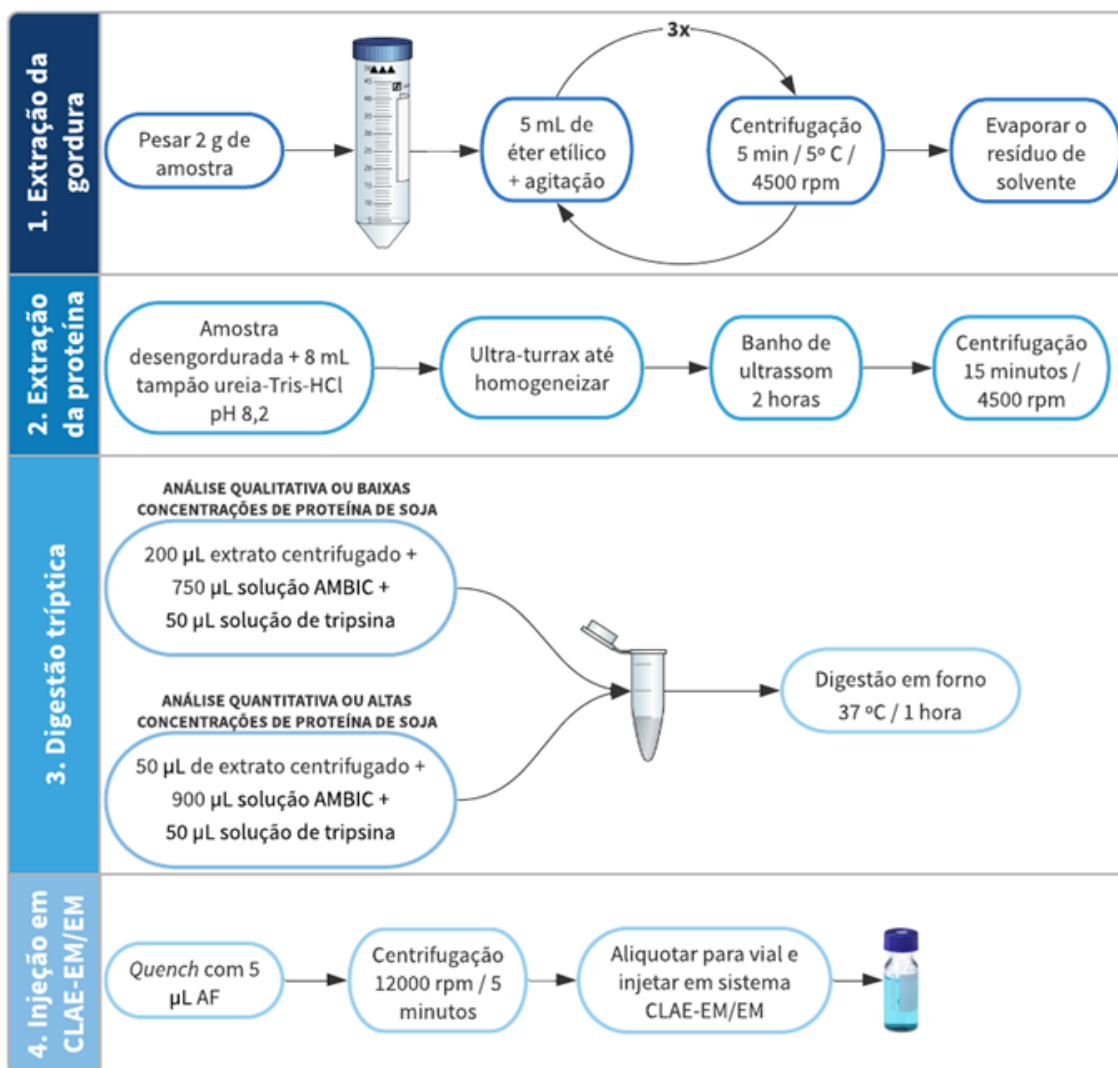
Na etapa de extração das proteínas, foram adicionados 8,0 mL da solução tampão ureia-tris-HCl (pH 8,2). Posteriormente, as amostras foram agitadas em dispersador até romper os grumos existentes e o sólido estar misturado à solução de forma homogênea, seguido de 2 horas de banho ultrassom a 37° C.

Após, as amostras foram centrifugadas novamente a 4500 rpm a 20° C por 15 minutos. Para ensaio qualitativo em amostras que supostamente não contenham (ou contenham baixo teor) de proteína de soja, 200 μ L do extrato sobrenadante são transferidos para eppendorf com capacidade de 1,5 mL. Caso as amostras contenham mais de 1,00 % de proteína soja, ou para proceder à análise quantitativa, utiliza-se 50 μ L do extrato sobrenadante.

Para a etapa de digestão tríptica, foram adicionados ao extrato anterior solução de bicarbonato de amônio 0,40 % (750 ou 900 μ L, para 200 ou 50 μ L de extrato da amostra, respectivamente) e 50 μ L da solução de tripsina 1,0 mg mL⁻¹. Posteriormente, as amostras foram levadas a um forno a 37° C durante 1 hora.

Transcorrido este tempo, para interromper a digestão da proteína (*“quench”* da reação), foram adicionados 5 μ L de ácido fórmico P.A., seguido de breve

agitação manual do eppendorf e centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, para decantar quaisquer impurezas que possam ter permanecido na amostra até essa etapa. Por fim, 800 µL do sobrenadante foram transferidos para vial e injetados no sistema CLAE-EM/EM para análise. A Figura 11 esquematiza o preparo descrito.



Fonte: Autor.

Figura 11. Esquema do protocolo de preparo de amostra otimizado.

3.2. Métodos

Para desenvolver as metodologias de CLAE-EM/EM, foi necessário otimizar os parâmetros do espectrômetro de massa para a fragmentação adequada e as condições de separação por cromatografia líquida. O equipamento utilizado no desenvolvimento da metodologia analítica deste trabalho foi um sistema CLAE-EM/EM, marca SCIEX, modelo API 5000 acoplado a um sistema modulado de cromatografia líquida da marca Agilent Technologies, modelo 1100 Series, acompanhado do software Analyst 1.6 para tratamento de dados. A otimização dos parâmetros de análise é descrita a seguir.

3.2.1. Parâmetros do Espectrômetro de Massa

Para determinar os parâmetros do espectrômetro de massa, introduziu-se uma amostra de solução de proteína isolada de soja $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (já digerida com tripsina) diretamente no equipamento por meio de infusão. Primeiramente, efetuou-se uma varredura na faixa de massa dos analitos para determinar os íons moleculares. No caso dos peptídeos, existe mais de um sítio de ionização e a carga das moléculas normalmente são do tipo $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, devido às suas massas moleculares elevadas. Os íons moleculares foram fragmentados e os fragmentos de maior intensidade foram selecionados para monitoramento em *MRM*.

Os íons precursores e seus fragmentos foram escolhidos com base nas melhores respostas obtidas de intensidade e eficiência de ionização. Os parâmetros para análise de espectrometria de massa foram definidos utilizando o modo de ionização por *electrospray* positivo (ESI+) para os peptídeos e negativo (ESI-) para as agliconas. Foram monitorados 3 peptídeos com 3 fragmentos cada. Já para determinar as isoflavonas, foram selecionados 3 fragmentos para a daidzeína e a gliciteína e 2 para a genisteína. A identificação dos peptídeos pela razão *m/z* foi feita com o auxílio do software *Skyline*. A Tabela 4 apresenta os íons escolhidos para monitoramento e outros parâmetros otimizados nesta etapa.

Tabela 4. Parâmetros do espectrômetro de massa para análise dos peptídeos e agliconas da soja.

Analito	Carga	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)	CXP (V)	DP (V)
HFLAQSFNTNEDIAEK (HFL)	+3	622,0	818,4	27	36	36
			919,4	27	36	36
			1033,5	24	36	36
EAFGVNMQIVR (EAF)	+2	632,3	760,4	30	36	36
			916,5	34	36	36
			859,9	30	36	36
FYLAGNQEQEFLK (FYL)	+2	793,9	283,1	45	36	36
			424,2	37	36	36
			638,7	34	36	36
Daidzeína	-1	253,208	133,0	-42	-15	-15
			208,1	-40	-21	-21
			223,0	-48	-27	-27
Genisteína	-1	269,223	132,7	-54	-51	-51
			132,0	-60	-55	-55
			268,0	-26	-13	-13
Gliciteína	-1	283,139	239,9	-34	-11	-11
			183,8	-48	-17	-17

CE: Collision energy; CXP: Collision cell exit potential; DP: Declustering potential

Posteriormente, foram otimizados os parâmetros de ionização dos compostos, para que a maior quantidade possível de moléculas do analito seja ionizada de forma eficaz e chegue ao analisador de massa. A Tabela 5 apresenta os parâmetros adotados no método.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18 de 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 3,5 µm. A fase móvel utilizada foi composta de água (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B), ambas com adição de 0,10 % de ácido fórmico (AF). O gradiente da fase móvel e outros parâmetros de coluna e injeção são mostrados na Tabela 6. O tempo de análise foi ajustado de forma a ganhar em eficiência sem comprometer a resolução dos picos.

Tabela 5. Parâmetros da fonte de ionização por *electrospray* do espectrômetro de massa.

Parâmetros da fonte de ionização	
Potencial de entrada (EP) isoflavonas	-10 V
Potencial de entrada (EP) peptídeos	10 V
Gás de colisão (CAD)	12 V
Gás de cortina (CUR)	25 V
Gás de nebulização (GS1)	55 psi
Gás auxiliar (GS2)	55 psi
Voltagem do spray eletrônico (isoflavonas)	-4500,0 V
Voltagem do spray eletrônico (peptídeos)	5500,0 V
Temperatura (TEM)	700,0 °C

3.2.2. Parâmetros da análise por cromatografia a líquido

Tabela 6. Parâmetros do método de cromatografia a líquido para a separação dos peptídeos marcadores.

Gradiente fase móvel		
Tempo (min.)	Fase A ^a (%)	Fase B ^b (%)
0	90	10
6	10	90
8	10	90
9	90	10
10	90	10
Outros parâmetros		
Fluxo	0,3 ml/min	
Temperatura coluna	40° C	
Volume de injeção	2 µL	
Tempo de análise	10 minutos	
Tempo de equilíbrio ^c	4 minutos	

^a Água ultrapura + 0,10 % de ácido fórmico

^b Acetonitrila + 0,10 % de ácido fórmico

^c Tempo de equilíbrio antes de cada injeção.

3.2.3. Validação das metodologias analíticas

Os critérios de avaliação a serem adotados na validação de um método variam de acordo com as características deste e o uso pretendido. Segundo a

Norma NBR ISO/IEC 17025:2017, validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos e “A validação deve ser tão abrangente quanto for necessária para atender às necessidades de uma determinada aplicação ou campo de aplicação”⁽¹¹⁴⁾.

O Documento DOQ-CGCRE-008_09 do Inmetro ⁽¹¹⁵⁾, pautado nos conceitos da ISO 17025:2017, orienta sobre a validação de métodos analíticos e estabelece quais critérios de desempenho devem ser avaliados de acordo com o tipo de método (Tabela 7). O Documento mostrou-se adequado para validar os métodos desenvolvidos neste trabalho, em conjunto com o “Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos” do MAPA ⁽¹¹⁶⁾, que o utiliza como referência.

Tabela 7. Critérios de avaliação para métodos qualitativos e quantitativos, segundo o INMETRO.

Parâmetros	Tipo de ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Seletividade / especificidade	X	X
Linearidade / faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade		X
Limite de detecção (LD)	X	X
Limite de quantificação (LQ)		X
Tendência / recuperação		X
Precisão		X
Robustez	(*)	(*)

(*): Parâmetro opcional

Fonte: INMETRO ⁽¹¹⁵⁾

Estes critérios estão sucintamente explicados nas seções 3.2.4 a 3.2.11.

3.2.4. Limite de detecção (LD)

Limite de detecção é o menor valor detectável com confiabilidade em uma amostra, mas não necessariamente quantificada. Em cromatografia é comum utilizar o ruído da linha de base como referência ⁽¹¹⁵⁾.

Para métodos qualitativos, o LD é a concentração acima da qual se considera o resultado positivo para a presença do analito, Para métodos quantitativos, o LD é a menor concentração do analito que produz um pico de área \geq a 3 vezes a relação sinal/ruído do equipamento ⁽¹¹⁵⁾.

3.2.5. Especificidade / Seletividade

É imprescindível que um método analítico seja capaz de discriminar a substância de interesse de outras substâncias semelhantes, como isômeros, metabólitos, produtos de degradação ou componentes da matriz, que possam ter a mesma razão m/z e tempo de retenção do analito. Para testar a seletividade/especificidade, analisa-se um número ($n \geq 20$) de amostras brancas distintas, que sejam representativas para potenciais interferentes e não contenham a substância de interesse. O objetivo é não obter nenhum resultado falso positivo proveniente de alguma interferência, como coeluição, por exemplo.

3.2.6. Linearidade

Considera-se linear um método que é capaz de produzir resposta diretamente proporcional à concentração do analito. O intervalo onde a concentração do analito é linearmente proporcional aos resultados obtidos na análise (faixa linear) permite o cálculo da concentração de amostras desconhecidas através da equação da reta proveniente de uma curva analítica ⁽¹¹⁷⁾.

A linearidade pode ser evidenciada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r), coeficiente de determinação (r^2) e pela análise dos resíduos, que é a diferença entre a resposta obtida para cada ponto da curva de calibração e o

valor predito. Os resíduos expressos graficamente devem demonstrar comportamento aleatório em torno dos valores preditos, de forma a não apresentar tendência na distribuição dos dados. Além disso, os resíduos individuais não devem ser maiores do que $\pm 20\%$ ⁽¹¹⁶⁾.

3.2.7. *Curva de calibração, sensibilidade e faixa de trabalho*

A curva analítica ou curva de calibração é construída adicionando-se concentrações conhecidas de um padrão da substância de interesse em um solvente ou em uma matriz branca. Quando a curva de calibração é usada para quantificação, deve-se preparar ao menos 4 níveis de concentração além do zero (amostra branca). O intervalo dos pontos máximo e mínimo da curva delimita a faixa de trabalho do método, pois é o intervalo no qual verifica-se a relação linear entre resposta e concentração. A faixa de aplicação do método deve estar compreendida pela faixa de trabalho, preferencialmente no centro desta ^(116,117).

Aplicando regressão linear nas concentrações adicionadas e respostas obtidas para os pontos da curva, obtém-se uma equação de reta do tipo:

$$y = ax + b \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde “a” é o coeficiente angular, “b” é o coeficiente linear e “y” é a resposta analítica. Com a equação da reta, é possível interpolar os valores de área de pico encontrados para as amostras desconhecidas (y) e calcular sua concentração (x). O coeficiente angular “a” representa, também, a sensibilidade do método. Quanto maior for o aumento de área frente a pequenos incrementos de concentração, mais sensível o método.

3.2.8. *Limite de quantificação (LQ)*

O limite de quantificação é a menor concentração do analito detectável com um nível aceitável de precisão e veracidade. O LQ é a menor concentração cuja área do pico é ≥ 10 vezes que a relação sinal/ruído, e, também, pode ser o primeiro ponto da curva de calibração, onde inicia-se a faixa de trabalho ⁽¹¹⁵⁾.

3.2.9. Precisão

Testes de repetibilidade e reprodutibilidade avaliam a precisão do método. A repetibilidade avalia a concordância entre resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, obtidas sob as mesmas condições e num curto espaço de tempo, como análises realizadas num mesmo dia, pelo mesmo analista, em um mesmo equipamento ⁽¹¹⁷⁾.

3.2.10. Precisão intermediária

A precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial é a concordância entre resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, no mesmo laboratório, sob diferentes condições de análise. Pode-se variar o operador, o equipamento, o dia da análise, etc ⁽¹¹⁷⁾.

Outro tipo de estudo de reprodutibilidade muito importante para a avaliação da validade de um método é realizado participando de comparações interlaboratoriais. Para tal, é necessário participar de programas desse tipo, organizados por provedores ou laboratórios organizadores.

3.2.11. Recuperação

A recuperação de um método está ligada à medida da exatidão. Para avaliar a exatidão, pode-se utilizar materiais de referência certificados (MRC), proceder a comparação dos resultados do método em desenvolvimento com métodos de referência ou participar de programas interlaboratoriais. Na ausência destes, é possível realizar ensaios de recuperação analítica ^(115,117). Nesse caso, várias replicatas de uma amostra branca são fortificadas em diferentes níveis (nível baixo, médio e alto da faixa de trabalho) e a recuperação é calculada através da Equação 3.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor médio das replicatas}}{\text{valor predito}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

O estudo de recuperação pode ser realizado concomitantemente ao de precisão.

3.2.12. Validação da metodologia qualitativa

O objetivo de um método qualitativo é detectar com segurança a presença do analito dentro de uma faixa de concentração estabelecida. Dessa forma, o método analítico qualitativo atende à fiscalização dos produtos cárneos em que a adição de proteína de soja é proibida pela legislação brasileira, pois somente a presença já caracteriza uma irregularidade.

O estudo qualitativo foi realizado com dois lotes de amostras. Foram monitorados 3 peptídeos da proteína de soja e as agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína. O objetivo de monitorar as agliconas foi avaliar a existência de correlação entre as proteínas e as isoflavonas, que permitisse utilizar as isoflavonas como marcadores da proteína de soja.

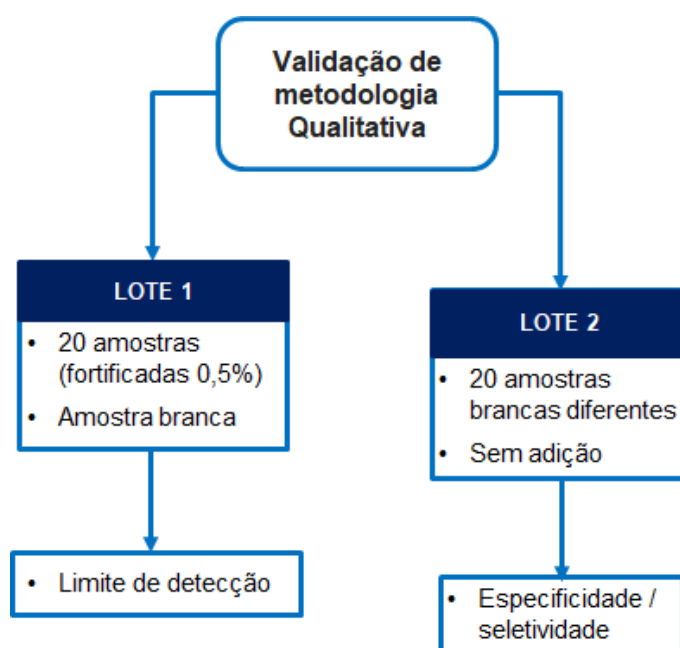
O primeiro lote de amostras, para determinar o limite de detecção (LD), consistiu em 21 replicatas de uma amostra branca de salame; 20 delas fortificadas com proteína isolada de soja (92,20 % em base seca), para verificar se o analito seria detectado em todas, e 1 via sem adição, para observar a ausência de picos interferentes de mesmo tempo de retenção e razão m/z do analito na amostra utilizada como branco.

Foi escolhida uma amostra de salame como branco por ser um produto em que a adição de proteína de soja não é permitida, além de ser uma matriz bastante complexa em ingredientes⁴. A adição das amostras fortificadas foi

⁴ A ideia inicial foi trabalhar com amostras de salsicha e mortadela, por serem produtos de menor valor agregado e possivelmente mais propensos à fraude. A maioria das otimizações do preparo de amostra foram realizadas com essas matrizes. Entretanto, a indisponibilidade de salsichas e mortadelas comerciais sem a presença de proteína de soja inviabilizou o processo.

realizada pesando a proteína isolada em pó diretamente sobre os 2,00 g de amostra e misturando mecanicamente para agregar o padrão à matriz.

O segundo lote, utilizado para estabelecer a especificidade/seletividade, foi composto por 20 amostras brancas de diferentes matrizes. Essas amostras não sofreram nenhum tipo de fortificação e o objetivo foi avaliar a eficiência do preparo de amostra na separação do analito de possíveis componentes da matriz que seriam capazes de interferir na identificação do pico cromatográfico de interesse. O esquema da Figura 12 ilustra o estudo de validação do método qualitativo e suas etapas.



Fonte: Autor.

Figura 12. Esquema do procedimento utilizado na validação do método qualitativo para detecção de proteína de soja em produtos cárneos.

Considerando que as adições industriais de derivados de soja em produtos cárneos são na faixa de porcentagem (em massa) e o objetivo desse trabalho é aplicar o método em pesquisa de fraude, não haveria sentido prático estabelecer limites muito baixos. Portanto, foi escolhido como LD um nível de concentração de 0,50 % (m/m). Para ampliar o escopo de aplicação do método e utilizá-lo para

avaliar contaminação cruzada ao invés de fraude, por exemplo, será necessário novo estudo para reduzir o valor do LD.

3.2.13. Métodos de quantificação

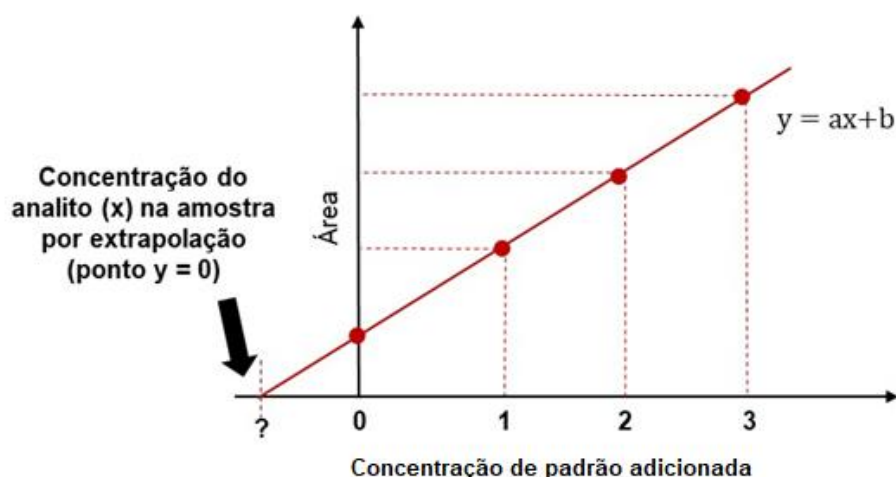
O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um método capaz de quantificar proteína de soja em produtos cárneos e embutidos. Tendo em vista a legislação brasileira, inicialmente focou-se em quantificar a proteína de soja em mortadela e salsicha, que são produtos de menor valor agregado e que possuem adição permitida de até 4,0 % de proteínas não-cárneas.

Para trabalhar com padronização externa em amostras complexas que provocam efeito de matriz, é necessária uma matriz branca (um produto com as mesmas características da amostra em estudo, mas sem a presença do analito) que permita fortificação com padrão de teor conhecido para construir a curva analítica. É possível utilizar uma matriz branca diferente da amostra na construção da curva, no entanto, é importante considerar que o efeito de matriz entre ambas pode causar supressão ou aumento do sinal analítico.

Não foram encontradas comercialmente salsichas e mortadelas que não contivessem algum derivado de proteína de soja nas suas formulações. A alternativa seria fabricar um pequeno lote especial de salsicha ou mortadela branca. Porém, devido à pandemia de coronavírus, os laboratórios parceiros dentro da UFRGS que poderiam auxiliar estão operando remotamente sem previsão de retorno. A indústria parceira, pela mesma razão, está com acesso e produção restritos sem previsão de normalização das atividades, impossibilitando a fabricação de amostras brancas ou de referência nesse momento.

Outra forma de quantificação possível é o método da adição de padrão. Nessa abordagem, o padrão é adicionado em diferentes níveis em uma matriz que já contenha o analito. É construída uma reta com a concentração adicionada de padrão no eixo x e área obtida pra cada ponto no eixo y. O ponto $x = 0$ corresponde à amostra sem adição e é o primeiro ponto da curva. Ele possui um

valor y associado, que é a área referente à concentração de analito que se deseja quantificar. Dessa forma, quando $y = 0$, extrapola-se a reta no eixo x , encontrando a concentração do analito presente na amostra. O exemplo da Figura 13 ilustra esse método de forma mais clara.



Fonte: Autor.

Figura 13. Gráfico ilustrativo do método de quantificação por adição de padrão.

Logo, se $y = ax + b$, no ponto $y = 0$ temos:

$$x = \frac{|b|}{a} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde x é a concentração de analito na amostra.

O método de adição de padrão minimiza efeitos de matriz que poderiam existir entre a amostra e a matriz branca utilizada para construir uma curva analítica por padronização externa. Entretanto, é necessário preparar ao menos 3 pontos de adição para cada amostra, o que aumenta consideravelmente o trabalho empregado em uma rotina analítica que lida com bateladas de, no mínimo, 15 amostras. Ainda assim, o método da adição de padrão poderia ser uma alternativa viável para contornar a falta de amostras brancas de algumas matrizes, como é o caso da mortadela e da salsicha.

Ante o exposto, foram avaliados os dois métodos de quantificação: padronização externa com curva analítica de proteína isolada de soja em linguiça branca e adição de padrão em salsicha e mortadela. Porém, a validação foi realizada somente pela padronização externa, como será debatido posteriormente na seção 4.3.

3.2.14. Validação de metodologia quantitativa por padronização externa

Para validar um método quantitativo, além da seletividade e do LD, outros parâmetros de avaliação são necessários. Foram avaliados os critérios de linearidade/faixa de trabalho, sensibilidade, limite de quantificação (LQ), recuperação, precisão e precisão intermediária, utilizando como amostra branca uma linguiça toscana sem proteína de soja.

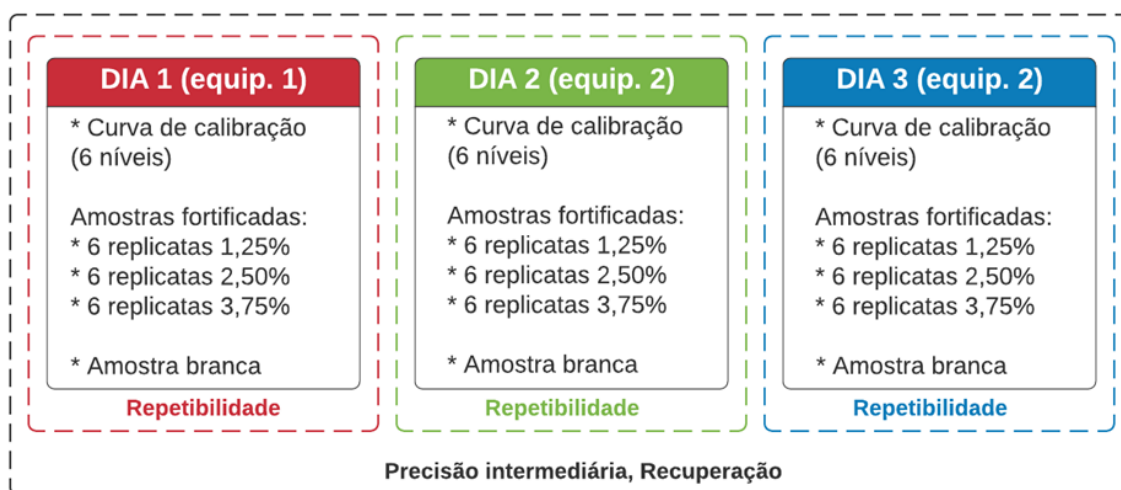
O limite máximo permitido (LMP) de adição de proteína de origem não-cárnea em linguiças é de 2,5 % (conforme RTIQ ⁽¹¹⁸⁾ disponível no anexo I), portanto, este valor foi estipulado como ponto central da curva de calibração. Os outros pontos definidos foram 0,63, 1,25, 3,75 e 5,00 %, correspondentes aos níveis 25, 50, 150 e 200 % do limite máximo permitido (LMP), respectivamente. Dessa forma estipulou-se a faixa de trabalho/linearidade do método e o limite de quantificação corresponde ao primeiro ponto da curva (0,63 %).

A abordagem realizada neste trabalho seguiu as orientações descritas pelo INMETRO ⁽¹¹⁵⁾. Foi preparada uma curva de calibração externa com 6 níveis e um conjunto de 18 replicatas da mesma amostra (de linguiça toscana) fortificadas com o analito (PIS 92,20 % de teor) nos níveis correspondentes a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o limite máximo permitido, sendo 6 replicatas para cada nível.

Para obter a repetibilidade, calculou-se a concentração para cada amostra fortificada, a média das concentrações, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV %), de acordo com a Equação 3.

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média das concentrações}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

A reprodutibilidade intralaboratorial foi avaliada repetindo-se o procedimento descrito para repetibilidade em 3 dias diferentes, em 2 equipamentos, pelo mesmo analista. Calculou-se o coeficiente de variação para o conjunto das 18 amostras (6 em cada dia), conforme demonstrado na Figura 14. A recuperação foi calculada com o mesmo conjunto de dados oriundo dos 3 dias de estudo de validação.



Fonte: Autor.

Figura 14. Planejamento experimental de validação quantitativa, avaliando a repetibilidade, precisão intermediária e recuperação.

4. Resultados e discussão

4.1. Testes de otimização do preparo de amostra

As propostas avaliadas para cada etapa visaram estabelecer procedimentos rápidos, utilizando insumos de menor custo e menor geração de resíduos, para viabilidade da sua implementação na rotina de controle do LFDA, onde um elevado número de amostras de produtos cárneos são analisadas por batelada (normalmente entre 10 e 30 amostras). As otimizações apresentadas na Figura 10 da seção 3.1.3 são descritas a seguir.

4.1.1. Otimização da extração da gordura

A gordura é um grande interferente nos produtos cárneos e precisa ser removida da matriz. Existem diversas maneiras de extrair a gordura, como cartuchos de extração em fase sólida (SPE), ou extração com líquido pressurizado (PLE) ⁽¹⁰⁾, utilizando solventes tais como etanol, metanol, água e acetona ^(2,119,120). O Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal ⁽⁹⁾ utiliza a técnica de extração de gordura com éter etílico na análise de carboidratos totais em produtos cárneos, que atende ao propósito de forma rápida e empregando insumos de baixo custo. Portanto, este procedimento foi avaliado. Alternativamente ao uso do éter etílico, testou-se o hexano.

A eficiência do hexano como solvente para desengordurar amostras de linguiça, mortadela e salsicha mostrou-se inferior ao éter etílico, que apresentou melhor performance na extração e gerou cromatogramas com menos ruído e melhor resolução dos picos⁵. Quando desengorduradas com hexano, as amostras também tenderam a se aglutinar, dificultando as etapas posteriores da marcha analítica. Além disso, a escolha do éter etílico facilitou a remoção do

⁵ Cromatogramas não apresentados neste trabalho.

resíduo do solvente ao final da extração, visto que o ponto de ebulição do hexano é de 68° C, enquanto o do éter é de 35° C. Portanto, o solvente considerado mais adequado à remoção da gordura foi o éter etílico.

4.1.2. Otimização do tampão de extração das proteínas de interesse

Uma das etapas mais importantes de um método *shotgun* é a extração da proteína de interesse das amostras complexas, pois ela deve ser eficiente para que se obtenham os peptídeos ao final da digestão. Para extrair a proteína presente nas amostras utiliza-se um tampão em pH determinado. Na literatura encontram-se diversas combinações, normalmente utilizando tampões de agentes caotrópicos e pH's na faixa entre 8,0 e 10,0.

Para estes testes de otimização foram utilizadas uma amostra de mortadela sem toucinho contendo 2 % de proteína de soja⁶ e uma amostra de proteína isolada de soja (PIS) com teor de proteína de 92,20 % (que foi diretamente dissolvida nos tampões, sem a presença de matriz). Dois tampões distintos foram avaliados: tampão ureia-tris-HCl em pH 8,2 e 9,0; e tampão SDS-2-mercaptoetanol (SDS-2-ME) em pH 5,2⁷ e 8,0. Ao final do processo foram avaliadas as áreas e a resolução dos picos cromatográficos dos peptídeos de interesse como medida da eficiência da extração com cada um dos tampões testados.

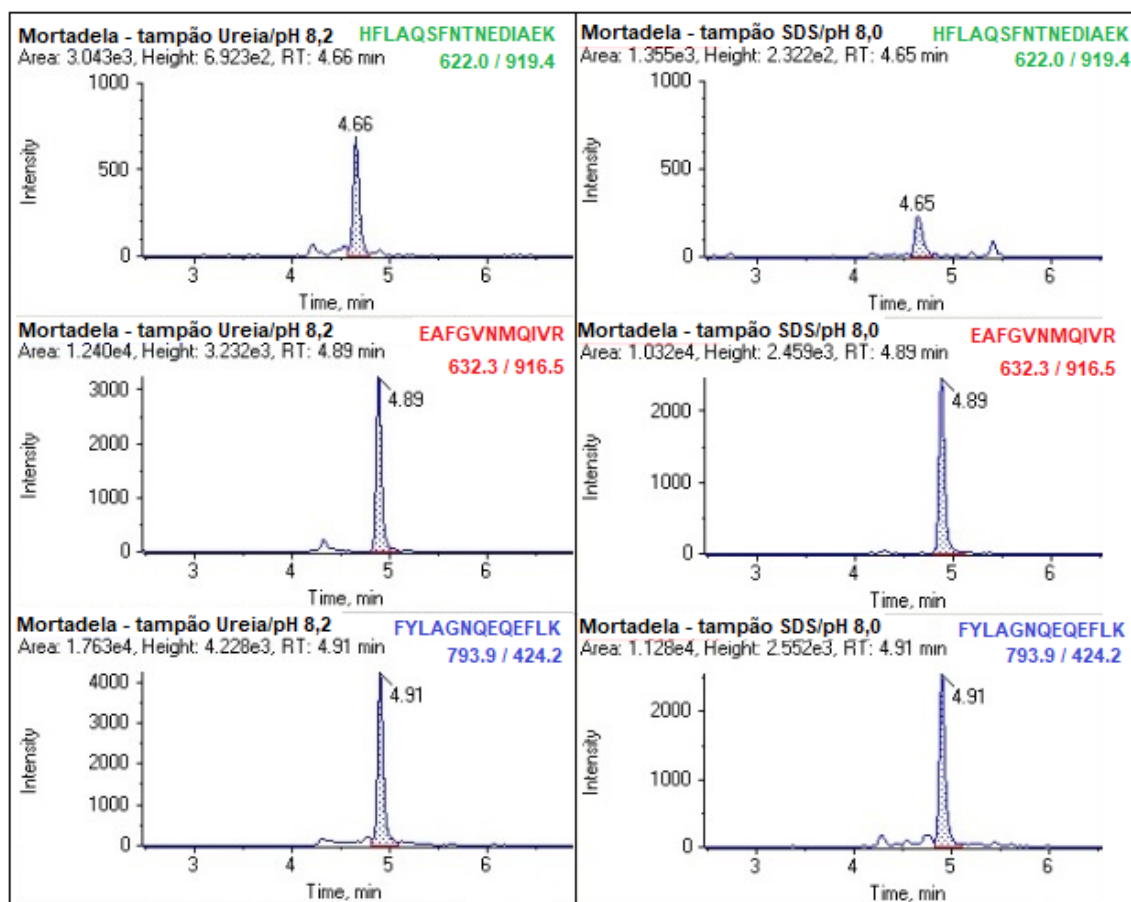
As amostras de PIS e mortadela tratadas com tampão ureia-tris-HCl resultaram em picos cromatográficos melhor definidos quando comparados aos resultados obtidos com o tampão SDS-2-ME. Além disso, a diferença nas áreas dos picos para os pH's 8,2 e 9,0 foi mínima.

O tampão contendo 1 % SDS + 7 % 2-mercaptoetanol não apresentou pico cromatográfico para nenhum dos peptídeos monitorados na amostra de PIS. Nas

⁶ Informação declarada no rótulo do produto.

⁷ Resultante da mistura dos reagentes sem nenhum ajuste de pH.

amostras de mortadela, obtiveram-se picos com boa resolução, mas com áreas menores ou equivalentes às amostras extraídas com ureia, conforme mostrado na Figura 15. Portanto, optou-se por trabalhar com o tampão ureia 8,0 M + Tris 50,0 mmol, ajustando-se o pH para 8,2 com HCl 1 mol L⁻¹.



Fonte: Autor.

Figura 15. Cromatogramas relativos às transições monitoradas nos três peptídeos para as amostras de mortadela, extraíndo as proteínas com tampão ureia-tris-HCl em pH 8,2 e tampão SDS-2-ME em pH 8,0.

4.1.3. Otimização do processo de extração das proteínas de interesse

Altas temperaturas promovem a quebra da estrutura proteica, e alguns trabalhos utilizam aquecimento na etapa de extração das proteínas, com este objetivo ^(10,67). Também podem ser empregadas etapas consecutivas de alquilação com iodoacetamida (IAA) e redução com ditioneitol (DTT) ^(2,6), para

romper as pontes de dissulfeto entre as proteínas, facilitando o acesso da enzima à cadeia e a digestão trípica. Entretanto, Hoffmann *et al.* ⁽¹⁰⁾, monitorando os mesmo peptídeos utilizados neste trabalho, fizeram testes de otimização avaliando a influência das etapas de alquilação e redução na extração das proteínas e concluíram que não houve diferença significativa.

Os processos de extração avaliados nesse trabalho e explanados nas seções 4.1.3.1 e 4.1.3.2 foram: i) agitação em ultrassom (por 2 e 3 horas); ii) aquecimento em banho-maria a 90° C (por 1 e 2 horas); iii) agitação em dispersador de alta-performance⁸ seguido de 30 minutos de agitação em mesa; iv) a combinação de agitação em dispersador de alta-performance seguida de 2 horas de ultrassom.

Os cromatogramas obtidos após todos os tratamentos foram avaliados e comparados com relação à área e resolução dos picos cromatográficos. O procedimento de extração considerado mais eficiente dentre os avaliados foi a combinação do dispersador com o ultrassom.

4.1.3.1. Avaliação da etapa de extração utilizando ultrassom e aquecimento

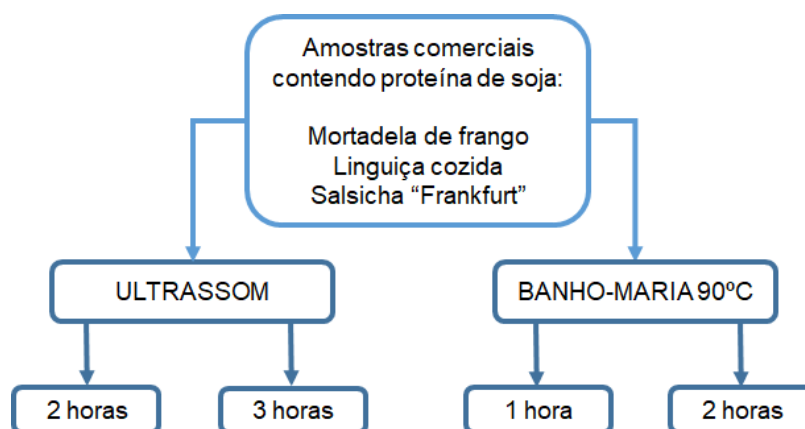
Quatro preparos de amostra com três matrizes comerciais foram avaliadas:

- a) Mortadela (4 % de proteína de soja declarada no rótulo),
- b) Linguiça cozida (2,5 % de proteína de soja declarada no rótulo)
- c) Salsicha Frankfurt, que não tem proteína de soja listada nos ingredientes, mas traz a mensagem “Pode conter soja” no rótulo.

Cada amostra foi pesada em quatro vias e o preparo seguiu o protocolo descrito no esquema da Figura 16.

⁸ Modelo IKA ultra-turrax T18.

As amostras que foram aquecidas apresentaram tendência a gelificar com facilidade, dificultando a separação do extrato, mesmo após centrifugação prolongada. Esse efeito foi mais pronunciado quanto maior o tempo de aquecimento. As amostras que passaram pelo processo de ultrassom, por outro lado, resultaram em extratos mais limpos e foram separadas facilmente quando centrifugadas.



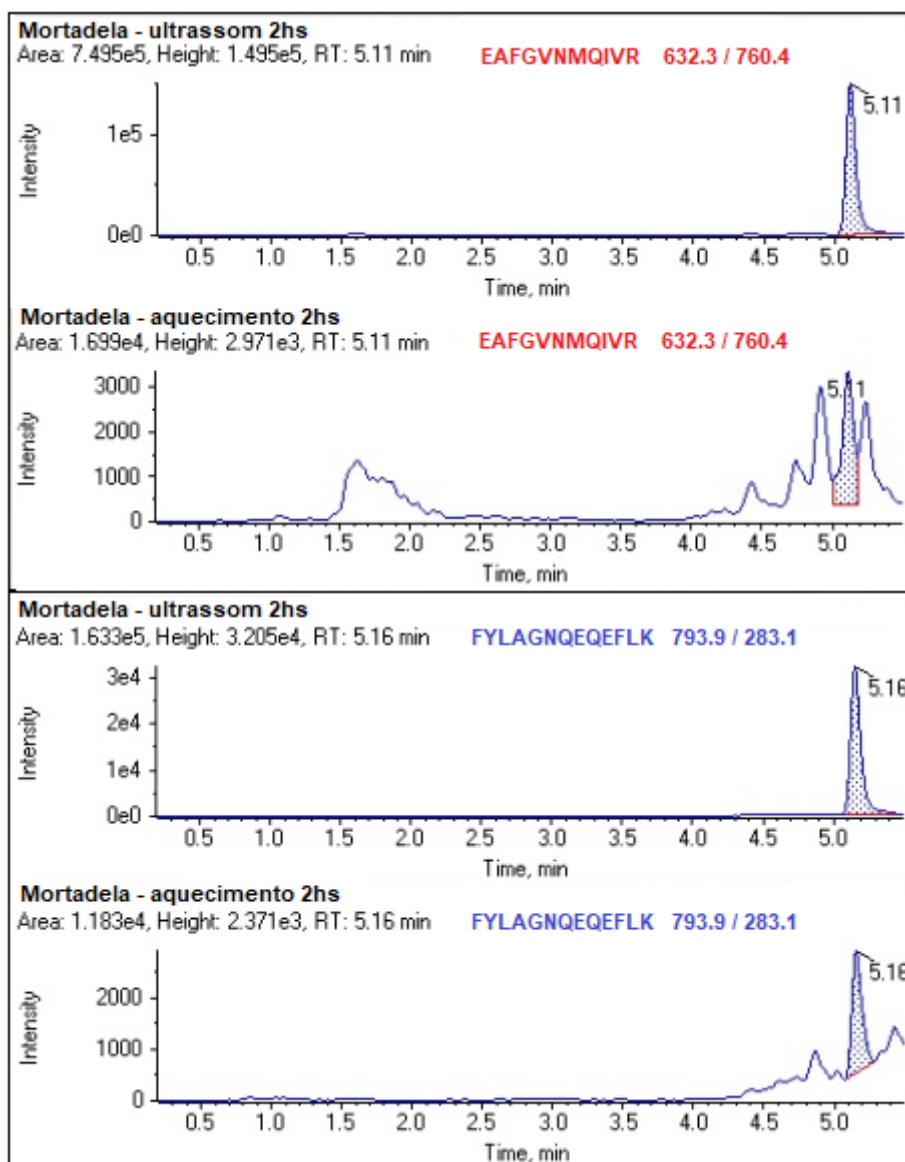
Fonte: Autor.

Figura 16. Protocolo de preparo dos testes de extração das proteínas de soja em mortadela, linguiça e salsicha, comparando os métodos de ultrassom e banho-maria.

Essa diferença da pureza dos extratos ficou evidente nos resultados da CLAE-EM/EM. As amostras aquecidas geraram cromatogramas com muito ruído e baixa resolução dos picos de interesse. Na amostra de salsicha Frankfurt, cujo teor de proteína de soja é menor do que as outras amostras, algumas transições não puderam ser observadas no preparo com aquecimento. Em contrapartida, as amostras tratadas com ultrassom resultaram em picos com resolução melhor, pouco ruído e todas as transições de interesse foram detectadas.

Os peptídeos EAF e FYL apresentaram maior abundância nas transições $m/z = 632,3/760,4$ e $m/z = 793,9/283,1$, respectivamente. Uma comparação dos resultados desses peptídeos entre amostras de mortadela é mostrada na Figura 17, onde em uma amostra as proteínas foram extraídas com 2 horas de ultrassom e na outra com 2 horas de aquecimento. A Figura 18 apresenta os

resultados das áreas destas transições obtidas para cada amostra nos preparos em função das transições monitoradas. As amostras foram analisadas em uma via.

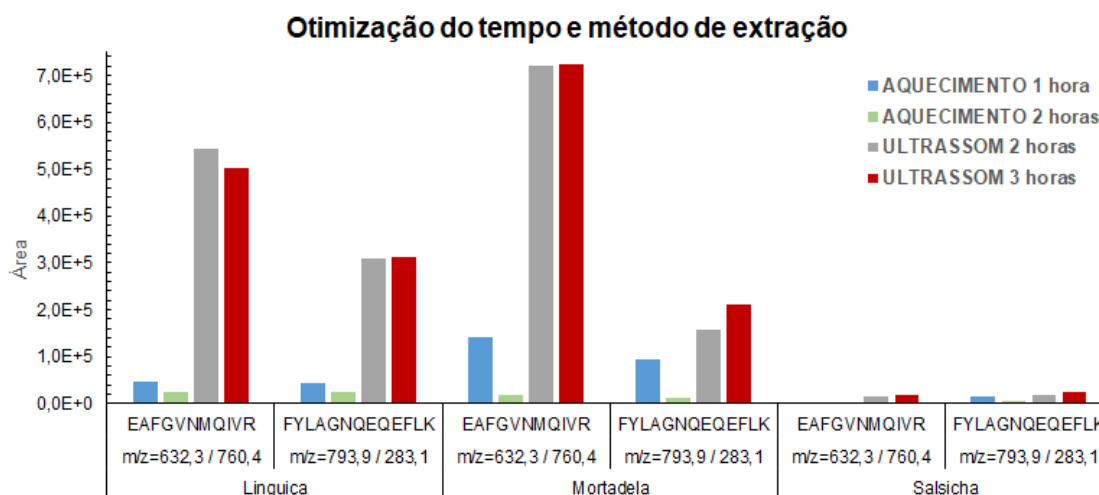


Fonte: Autor.

Figura 17. Cromatogramas dos peptídeos EAF ($m/z = 632,3/760,4$) e FYL ($m/z = 793,9/283,1$) para amostras de mortadela tratadas com ultrassom por 2 horas e aquecimento em banho-maria a 90° C por 2 horas.

A extração por ultrassom foi significativamente mais eficiente para todas as matrizes, com diferenças de área em torno de uma ordem de grandeza

quando comparadas às amostras aquecidas. Quanto ao tempo, tendo em vista que as amostras de 2 e 3 horas de ultrassom apresentaram pouca diferença entre si pra todas as matrizes testadas⁹, optou-se por adotar o tempo de 2 horas, dando celeridade ao processo.



Fonte: Autor.

Figura 18. Áreas obtidas comparando ultrassom e aquecimento como método de extração, em diferentes tempos, para amostras de linguica, mortadela e salsicha.

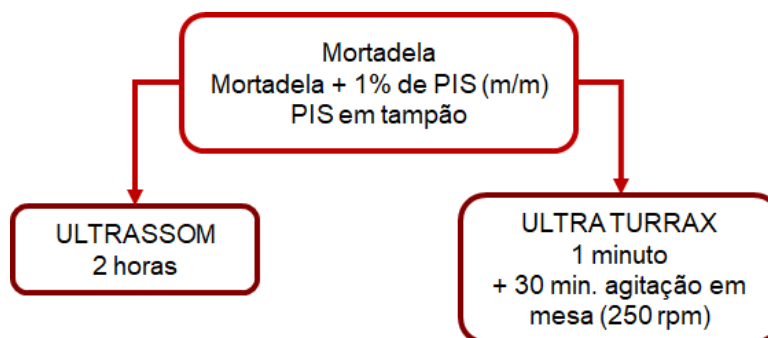
4.1.3.2. Avaliação da etapa de extração com ultrassom e dispersador

Para comparar a eficiência de extração do ultrassom e do dispersador, os dois processos foram avaliados em conjunto e separadamente. Para este estudo, foram utilizadas amostras de mortadela sem toucinho (contendo em torno de 2,00 % de proteína de soja), amostra de PIS (teor 92,20 % em base seca) dissolvida em tampão sem a presença de matriz, e uma amostra da mortadela adicionada com a mesma massa de PIS da amostra sem matriz (\pm

⁹ A diferença percentual entre as áreas dos picos resultantes dos preparos com ultrassom de 2 e 3 horas foi de 11,1 % para a amostra de salsicha, 0,3 % para a mortadela e 8,6 % para a linguica.

0,020 g, equivalente a 1,0 % m/m). As amostras foram analisadas em triplicata de preparo. A Figura 19 ilustra o processo.

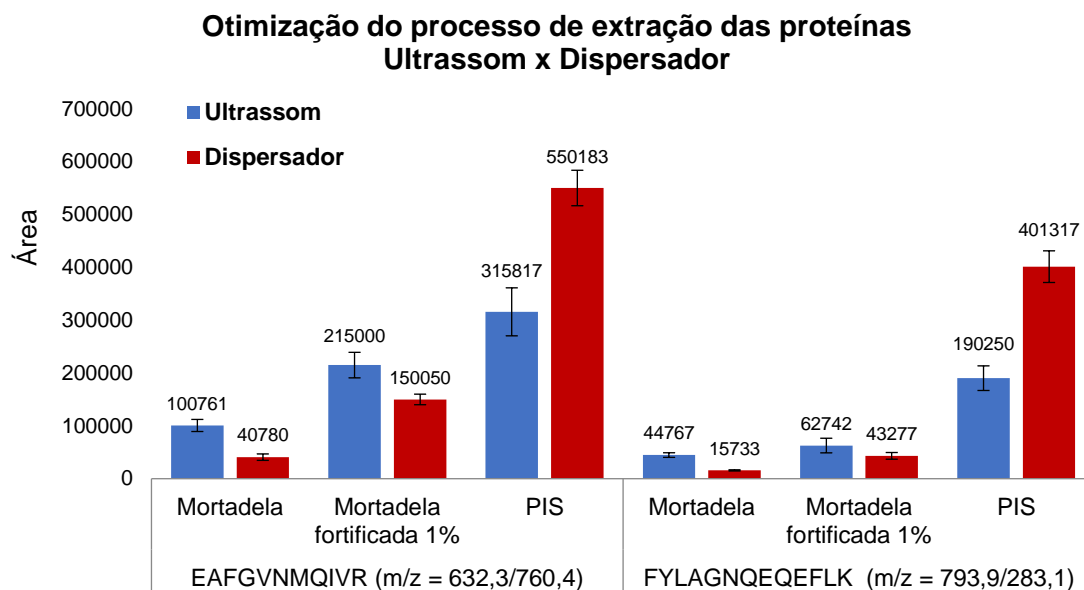
Em ambos os métodos observaram-se picos para todos os peptídeos monitorados e suas transições. O peptídeo EAF apresentou áreas mais intensas na transição $m/z = 632,3/760,4$, seguido do peptídeo FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$ (Figura 19).



Fonte: Autor.

Figura 19. Protocolo de preparo dos testes de extração das proteínas de soja em mortadela, mortadela fortificada e PIS, comparando os métodos de ultrassom e agitação em dispersador.

A amostra de PIS em tampão apresentou picos com áreas mais intensas na extração com dispersador. Entretanto, as amostras de mortadela e mortadela fortificada tiveram picos mais intensos no preparo com ultrassom, como mostra a Figura 20. Esse efeito é decorrente da disponibilidade da proteína no meio. O dispersador apresentou melhor desempenho na ausência de matriz, que não é o caso real das amostras de rotina. Portanto, o processo com ultrassom foi considerado mais eficaz para extrair as proteínas das amostras.



Fonte: Autor.

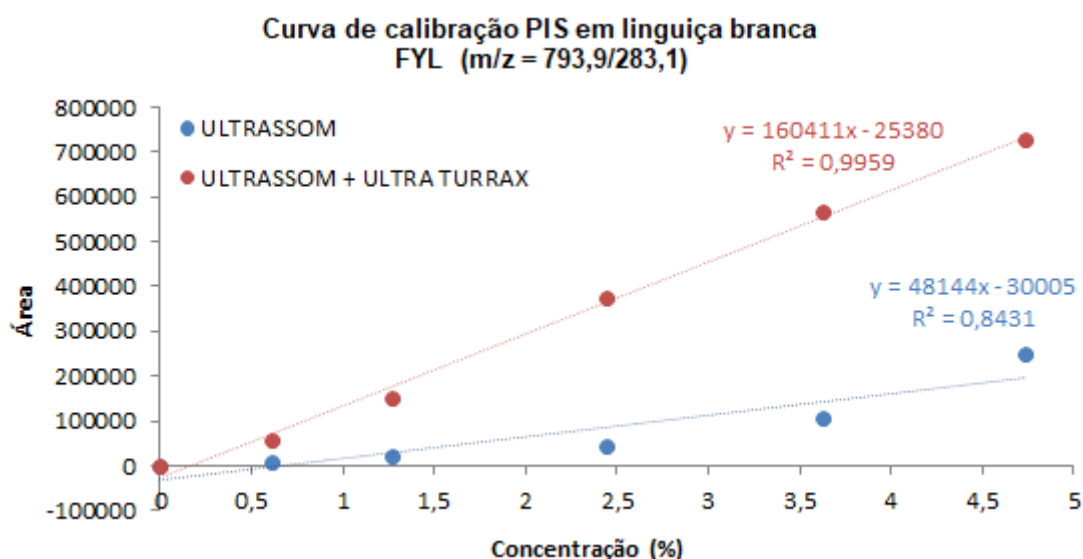
Figura 20. Áreas médias e desvios obtidos para os peptídeos EAF ($m/z = 632,3/760,4$) e FYL ($m/z = 793,9/283,1$) comparando os métodos de extração com ultrassom e dispersador, para amostras de mortadela, mortadela fortificada e PIS, analisadas em triplicata.

Porém, para algumas matrizes, como linguiça e mortadela, observou-se que a amostra apresentou tendência a se aglomerar formando grumos, principalmente após a adição da proteína de soja (nas amostras fortificadas) e a etapa de extração da gordura com solvente. Nestes casos, a agitação somente com vórtex posteriormente à adição da solução tampão não foi capaz de promover a devida dispersão da amostra em solução, e os grumos também não foram desfeitos após transcorrido o tempo de ultrassom. Se a amostra não for homogeneamente dispersa na solução tampão a etapa de extração fica comprometida, pois a proteína de soja presente na amostra pode ficar “encapsulada” nos grumos e inacessível à ação do tampão.

Devido a essa dificuldade experimental, optou-se por utilizar o dispersador como tratamento anterior ao ultrassom, combinando os benefícios observados em ambos. Dessa forma, o primeiro promove a homogeneização eficaz da

amostra na solução tampão, quebrando os grumos formados e potencializando a eficiência da extração na etapa de ultrassom.

A diferença da inclusão da etapa de homogeneização com dispersador fica evidente no gráfico da Figura 21, onde uma curva de calibração de linguixa com PIS (92,20 %) foi preparada com dispersador + ultrassom e somente com ultrassom, para efeitos de comparação. Os resultados demonstrados são oriundos da média das triplicatas para cada ponto de adição. O preparo combinando dispersador e ultrassom apresentou comportamento linear e sensibilidade muito melhores que o tratamento somente com ultrassom.



Fonte: Autor.

Figura 21. Resultados de uma curva de calibração de linguixa com PIS para o peptídeo FYL ($m/z = 793,9/283,1$) comparando os preparos de amostra somente com ultrassom e combinando dispersador (ultra-turrax T18) e ultrassom.

4.1.4. Otimização do volume de extrato e tempo de digestão

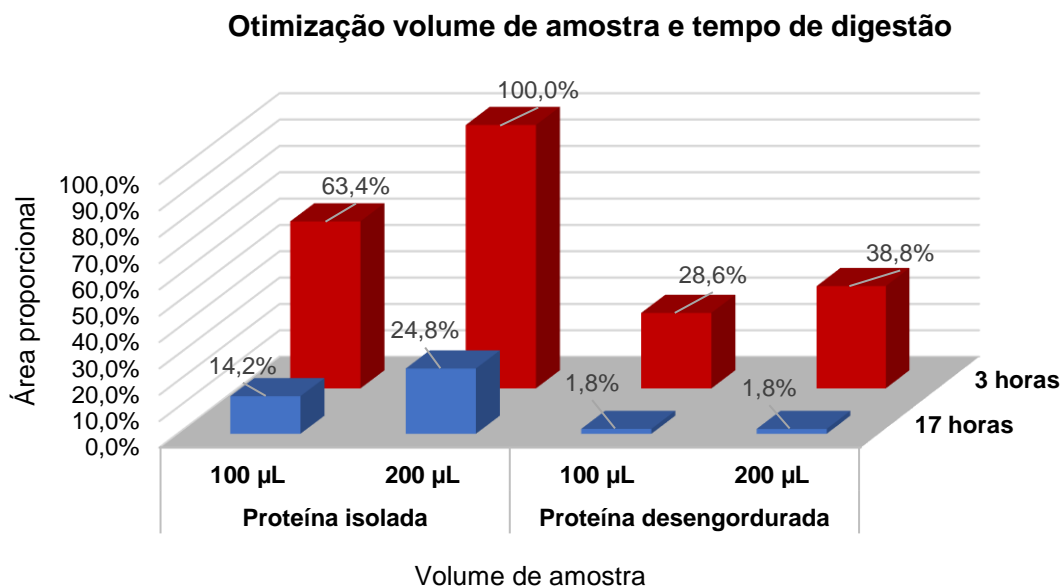
Foram otimizados o tempo de digestão com tripsina e o volume do extrato de amostra a ser digerido. Alguns trabalhos utilizam digestão *overnight*, de 12 a 18 horas. Porém, tais métodos fazem detecção de vários alérgenos em uma mesma corrida, optando por um tempo mais longo devido às diferenças na

quebra das proteínas de origens distintas. Métodos de *screening* de peptídeos marcadores também costumam utilizar digestão *overnight*, visando produzir um número maior de fragmentos peptídicos para posterior caracterização dos mesmos ^(2,6,78,107).

Uma vez definidos os peptídeos que serão monitorados, a próxima etapa consiste em estabelecer um preparo de amostra que otimize a formação destes. Hoffmann *et al.* ⁽¹⁰⁾ desenvolveram um método capaz de detectar proteínas de soja, ervilha e tremoço em produtos cárneos. Apesar de ser um método multialérgico, foram feitos testes verificando a resposta de cada uma destas proteínas para diferentes tempos de digestão e obtiveram-se boas respostas dos três peptídeos marcadores de proteína de soja com apenas 3 horas de digestão.

Por essa razão, neste trabalho primeiramente foi efetuado um teste em uma proteína isolada e uma proteína desengordurada de soja, comparando as áreas do peptídeo FYL (transição $m/z = 793,9/283,1$) obtidas com 3 e 17 horas de digestão trípica a 37° C e os volumes de 100 e 200 µL de extrato utilizado para digestão.

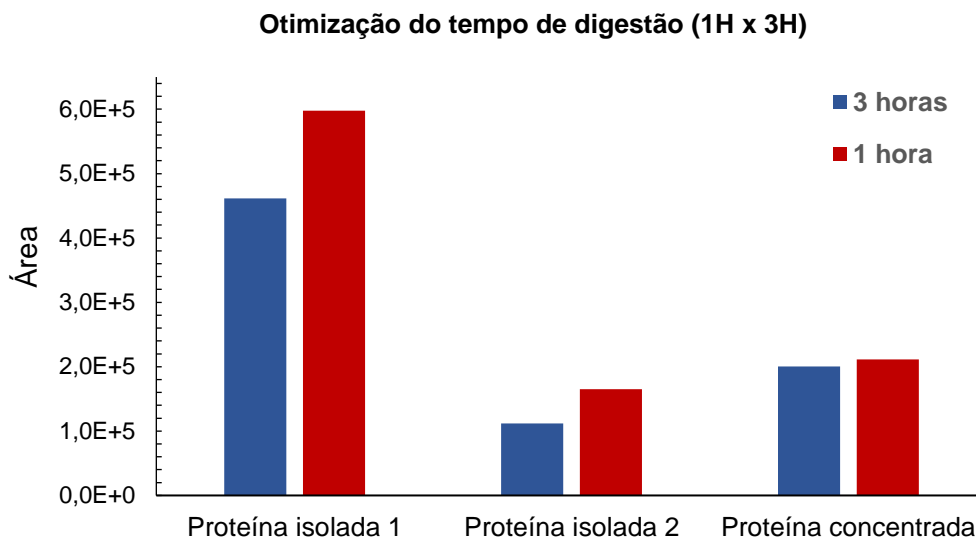
Foram analisadas proteínas puras para não haver influência da etapa de extração nos resultados, apresentados na Figura 22. Para melhor visualização, foram utilizadas as áreas médias das duplicatas analisadas, normalizadas em relação à mais alta. Observou-se que utilizando volume de 200 µL os picos foram mais intensos. Quanto ao tempo, a digestão de 3 horas teve melhor resposta de área e resolução dos picos cromatográficos.



Fonte: Autor.

Figura 22. Resultados das áreas médias normalizadas obtidas comparando os volumes 100 e 200 µL de extrato de amostra e 3 e 17 horas de digestão trípica, para o peptídeo FYL ($m/z = 793,9/283,1$) nas amostras de proteína isolada de soja e proteína desengordurada de soja.

Posteriormente, foram realizados testes em duas proteínas isoladas e uma proteína concentrada de soja, desta vez comparando os tempos de 1 e 3 horas de digestão trípica, a fim de avaliar a possibilidade de uma redução de tempo ainda maior. Para todas as amostras avaliadas, o tempo de digestão de 1 hora apresentou áreas mais intensas, indicando que a digestão foi mais eficiente. Portanto, este tempo foi adotado para o desenvolvimento do método. As amostras foram analisadas em uma única via e os resultados são apresentados no gráfico da Figura 23.



Fonte: Autor.

Figura 23. Comparação das áreas obtidas após 1 e 3 horas de digestão trípica, para o peptídeo FYL ($m/z = 793,9/283,1$), nas amostras de proteína isolada e proteína concentrada de soja.

4.1.5. Otimização do volume de solução de tripsina

Concomitante à otimização do tempo de extração, foram realizados testes para definir a quantidade da solução de tripsina, avaliando a resposta de área dos peptídeos para vários volumes da solução $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ da enzima.

O primeiro teste¹⁰ foi realizado com 4, 10, 20 e 40 μL de solução de tripsina, utilizando como matriz amostras de linguiça e mortadela, e somente o volume de 40 μL apresentou resposta para ambas. Posteriormente, foi realizado um segundo teste com 40, 50 e 100 μL de tripsina em amostras de linguiça, mortadela e salsicha. As médias das áreas obtidas são apresentadas no gráfico da Figura 24.

¹⁰ Resultados não apresentados neste trabalho.

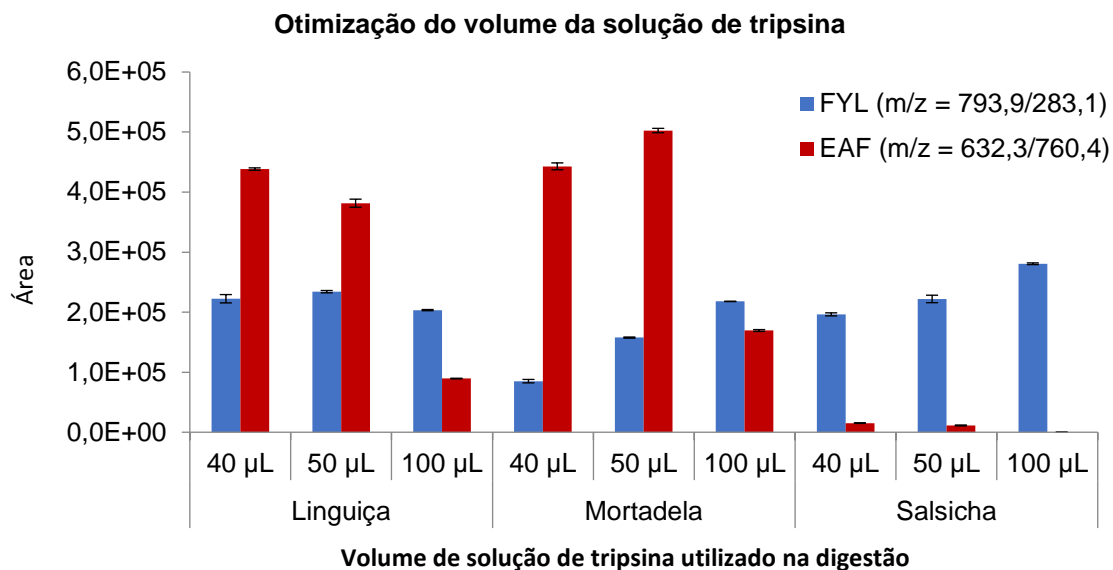


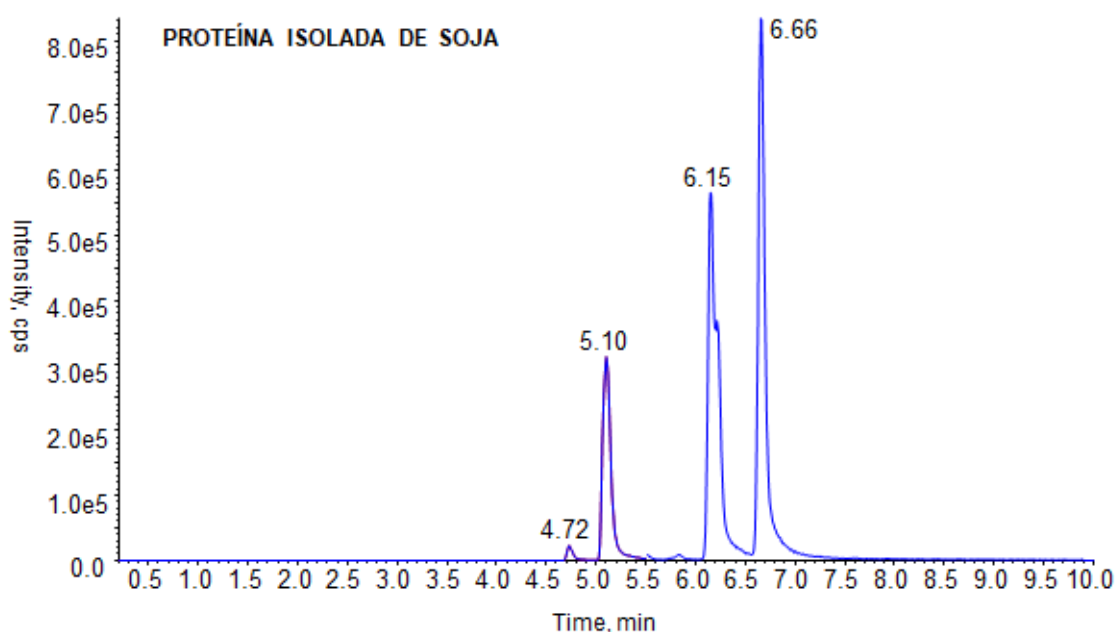
Figura 24. Médias das áreas das duplicatas obtidas utilizando 40, 50 e 100 µL de volume de solução de tripsina 1,0 mg mL⁻¹, na etapa de digestão trípica em amostras de mortadela, salsicha e linguiça, para os peptídeos EAF ($m/z = 632,3/760,4$) e FYL ($m/z = 793,9/283,1$).

De forma geral, observou-se que as duas transições mais intensas (EAF $m/z = 632,3/760,4$ e FYL $m/z = 793,9/283,1$) tiveram seus piores resultados com 100 µL de solução. Para a amostra de salsicha, não foi detectado pico do peptídeo EAF com 100 µL. O melhor desempenho de digestão foi obtido com 50 µL de solução de tripsina, correspondente a uma proporção de 1:4 com relação ao volume de extrato da amostra utilizado no ensaio (200 µL).

4.2. Metodologia qualitativa

A validação da metodologia qualitativa foi realizada conforme descrito na seção 3.2.12, avaliando especificidade e limite de detecção. No lote 1, utilizou-se uma amostra de salame como branco para realizar a análise em 20 replicatas (amostras 1 - 20) fortificadas no nível 0,50 % (m/m). Uma proteína isolada de soja comercial, com teor determinado em 92,20 % em base seca, foi utilizada para adição.

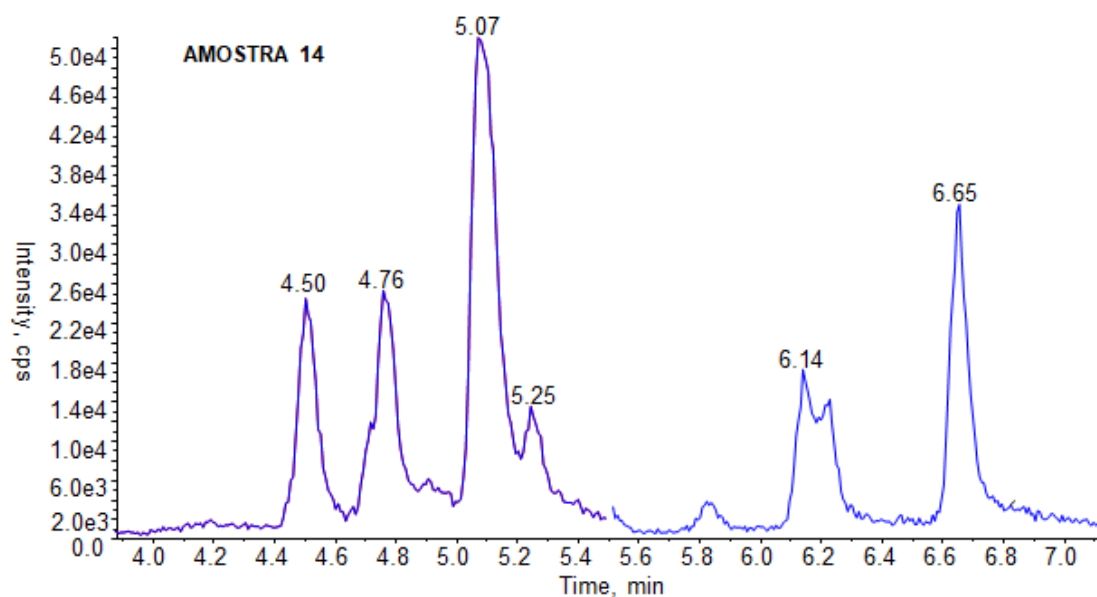
O lote 2 foi composto de 20 amostras brancas (amostras A - T) de diferentes matrizes cárneas, contemplando variados teores de proteína animal, gordura e carboidratos. As amostras foram preparadas conforme o protocolo descrito na Figura 11, seção 3.1.3. Foi preparada também uma amostra da proteína isolada de soja (solução 1,0 mg mL⁻¹) para confirmação dos tempos de retenção e avaliação dos efeitos de matriz. O cromatograma da proteína pura é mostrado na Figura 25. Os picos em 4,72 e 5,10 minutos referem-se aos peptídeos, enquanto os picos em 6,15 e 6,66 são das agliconas.



Fonte: Autor.

Figura 25. Cromatograma obtido para a proteína isolada de soja (1,0 mg mL⁻¹).

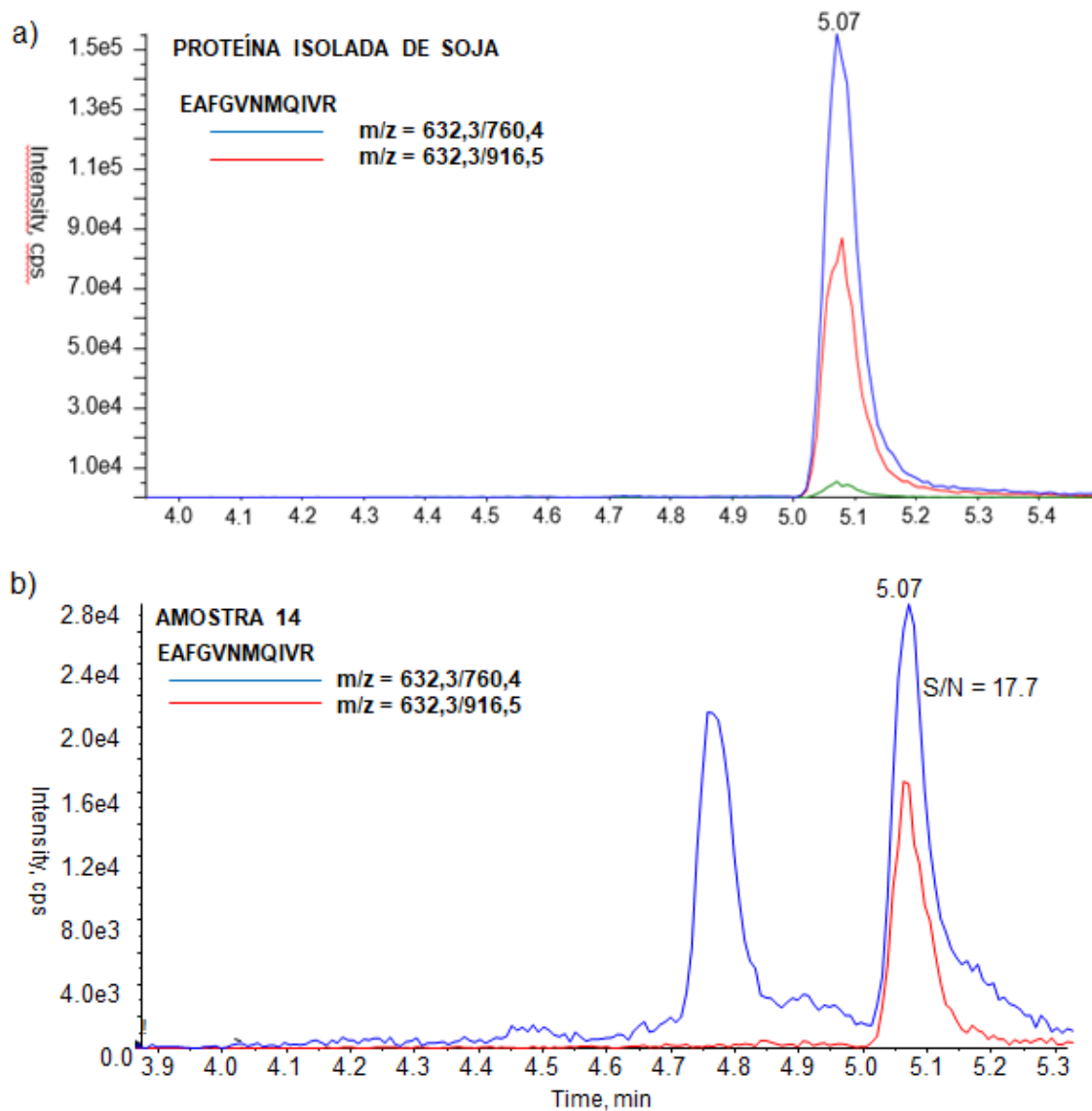
As agliconas apresentaram grande sensibilidade, com áreas aproximando-se de $2,0 \times 10^6$ na proteína isolada de soja. O peptídeo EAF foi o que apresentou picos de maior intensidade, na transição $m/z = 632,3/760,4$ com tempo de retenção entre 5,07 a 5,09 minutos. Por essa razão, foi escolhido como qualificador e a confirmação da identificação deu-se pela segunda transição mais intensa, $m/z = 632,3/916,5$. Na Figura 26 é apresentado o cromatograma de uma amostra fortificada (amostra 14).



Fonte: Autor.

Figura 26. Cromatograma obtido para a amostra “14” de salame fortificada com 0,50 % (m/m) de proteína isolada de soja.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Foram observados alguns picos de componentes da matriz, mas que não afetaram a resolução dos picos de interesse, e o limite de detecção foi validado em 0,50 %. Os mesmos tempos de retenção para as transições $m/z = 632,3/760,4$ e $m/z = 632,3/916,5$ do peptídeo EAF podem ser observados na amostra de proteína isolada de soja e nas amostras fortificadas (Figura 27).



Fonte: Autor.

Figura 27. Cromatogramas das transições $m/z = 632,3/760,4$ e $m/z = 632,3/916,5$ correspondentes ao peptídeo EAF, obtidos para a) solução de proteína isolada de soja $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$; b) Amostra fortificada “14”, que apresentou pico com relação sinal-ruído de 17,7.

As 20 amostras denominadas “brancas” não apresentaram picos nos tempos de retenção monitorados dos peptídeos de interesse, confirmando a especificidade da metodologia. Porém, três amostras (F, M e O) detectaram as agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína, provavelmente devido à presença de algum condimento ou tempero contendo outro vegetal.

Como abordado na seção 2.1.1.1, a soja é a maior fonte natural de isoflavonas, mas não a única. Por essa razão, verificou-se que monitorar isoladamente as isoflavonas realmente não fornece um resultado confiável para identificar a presença de soja. Da mesma forma, devido às diferenças oriundas do processamento dos derivados de soja discutidas anteriormente, não foi possível estabelecer uma correlação matemática entre as áreas das isoflavonas e proteínas nos derivados de soja utilizados ou nas amostras.

A Figura 28 apresenta os cromatogramas da amostra F nos tempos de retenção das agliconas. Dados mais detalhados dos resultados obtidos no método qualitativo são apresentados no Anexo II deste trabalho.

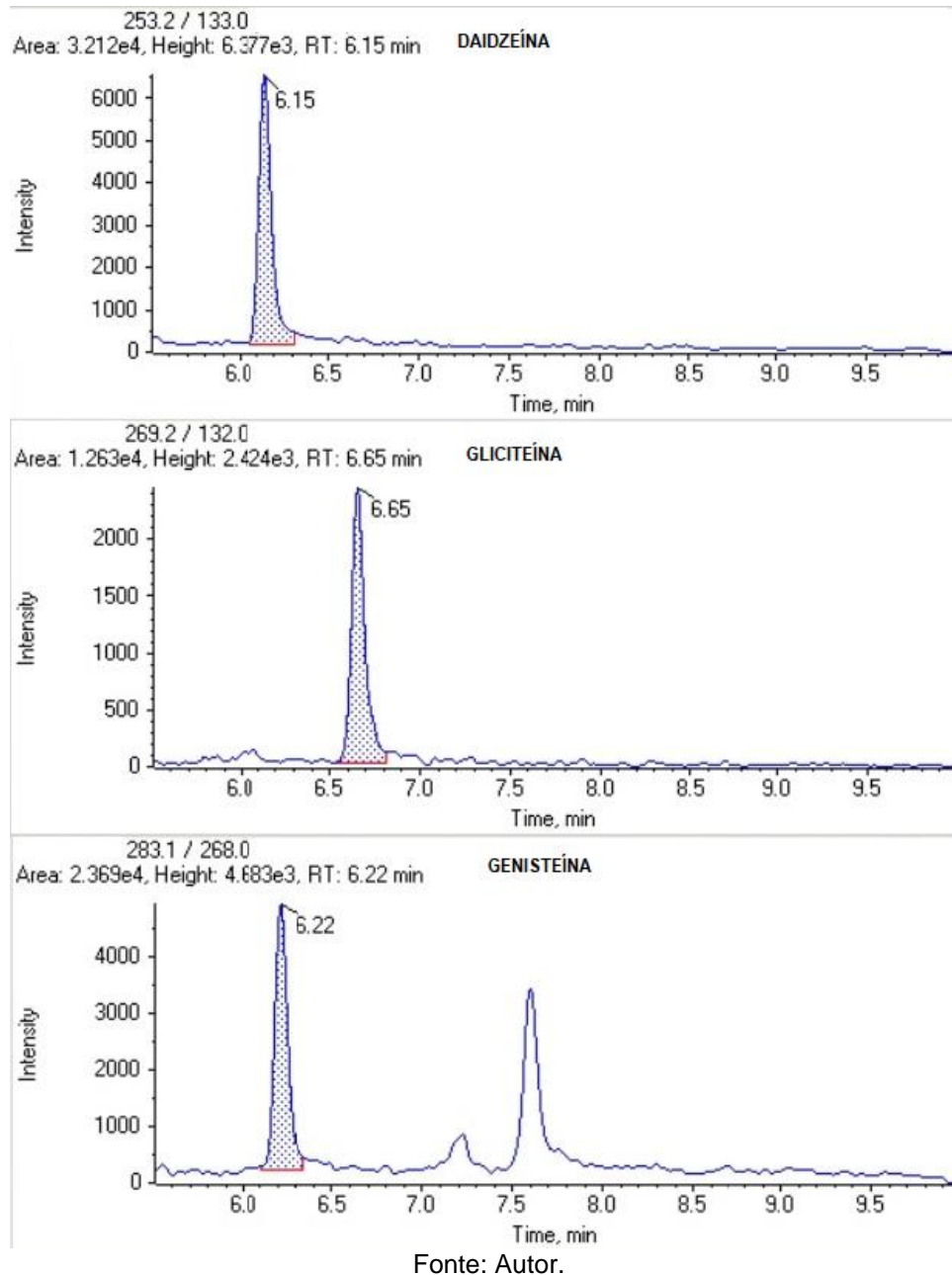


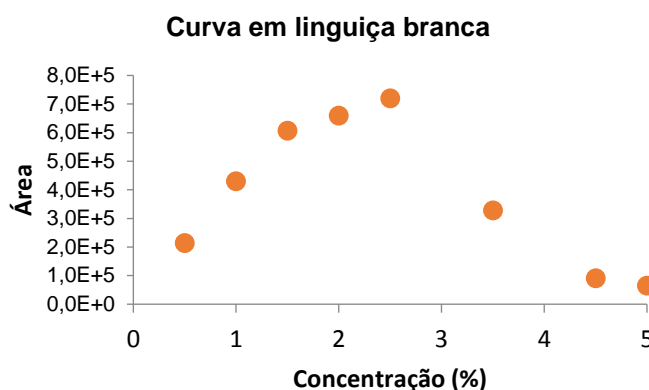
Figura 28. Cromatogramas das agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína para a amostra branca "F".

4.3. Metodologia quantitativa

4.3.1. Ajustes no preparo de amostra

O preparo de amostra oriundo das otimizações descritas na seção 4.1 é aplicável para ensaio qualitativo e amostras que contenham baixo teor de proteína de soja. Porém, ao utilizar o volume de extrato definido anteriormente

para construir curvas analíticas com teores de proteína mais elevados, observou-se uma redução das áreas dos picos cromatográficos acompanhando o aumento da concentração dos pontos da curva. Um exemplo desse comportamento é apresentado na Figura 29, de uma curva analítica preparada em linguiça branca com adições de 1,0 a 5,0 % (m/m) de proteína isolada de soja.



Fonte: Autor.

Figura 29. Curva de calibração em linguiça branca com adição de proteína isolada de soja, com 200 μ L de extrato.

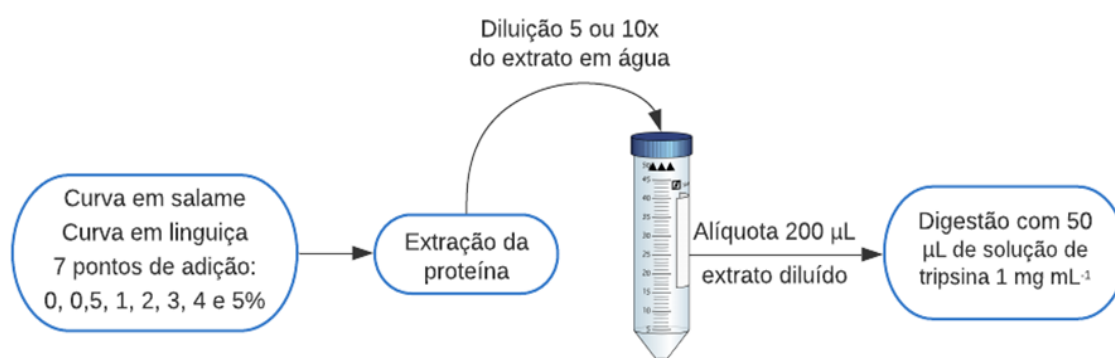
Um fator que exerce grande influência na eficiência da digestão é a razão entre a quantidade de amostra e quantidade de enzima tripsina. Ao trabalhar com amostras muito concentradas, a quantidade de tripsina utilizada para o método qualitativo pode não ser suficiente para promover a quebra das proteínas de forma eficaz, prejudicando os resultados. Porém, tripsina em excesso no meio pode promover autólise, processo em que a enzima passa a digerir ela mesma em competição com as proteínas de interesse, o que também compromete a eficiência da digestão.

Portanto, novas otimizações para alguns parâmetros foram necessárias, a fim de ajustar o método para operar com concentrações mais altas de proteína de soja. Duas abordagens foram avaliadas: realizar uma diluição prévia das amostras com água ultrapura (visando diluir também o efeito da matriz e não somente do analito), e utilizar um volume menor de extrato centrifugado na digestão, anteriormente estipulado em 200 μ L.

4.3.2. Testes com diluição do extrato

Devido à limitação de solubilidade da proteína de soja no tampão de trabalho, não foi possível preparar uma solução padrão de proteína em uma concentração alta o suficiente que permitisse obter pontos com concentração em porcentagem através de adição volumétrica de solução padrão. A alternativa encontrada foi pesar diretamente a proteína de soja em pó sobre a amostra já aliqüotada e misturar mecanicamente os sólidos até agregação. Todos os pontos das curvas analíticas e amostras fortificadas deste trabalho foram preparados desta forma.

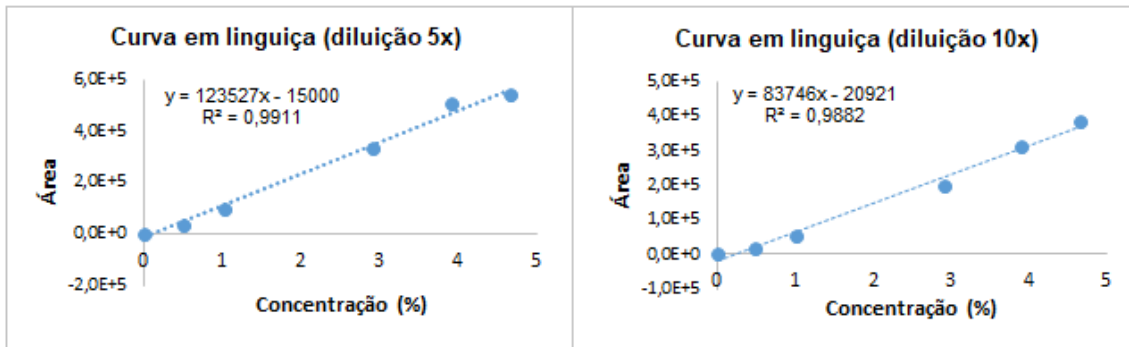
Foram preparadas duas curvas analíticas com 7 pontos, sendo uma em linguiça branca e uma em salame, contemplando concentrações até 5,0 % de adição de proteína de soja. Na etapa anterior à digestão, os extratos da curva em linguiça foram diluídos 5 e 10 vezes, e os da curva em salame foram diluídos 10 vezes. Posteriormente, 200 μL dos extratos diluídos foram aliqüotados e levados à digestão com 50 μL de solução de tripsina 1,0 mg mL^{-1} . O processo está ilustrado no esquema da Figura 30.



Fonte: Autor.

Figura 30. Representação esquemática da etapa de diluição prévia à digestão, realizada em curvas de linguiça e salame com adição de PIS.

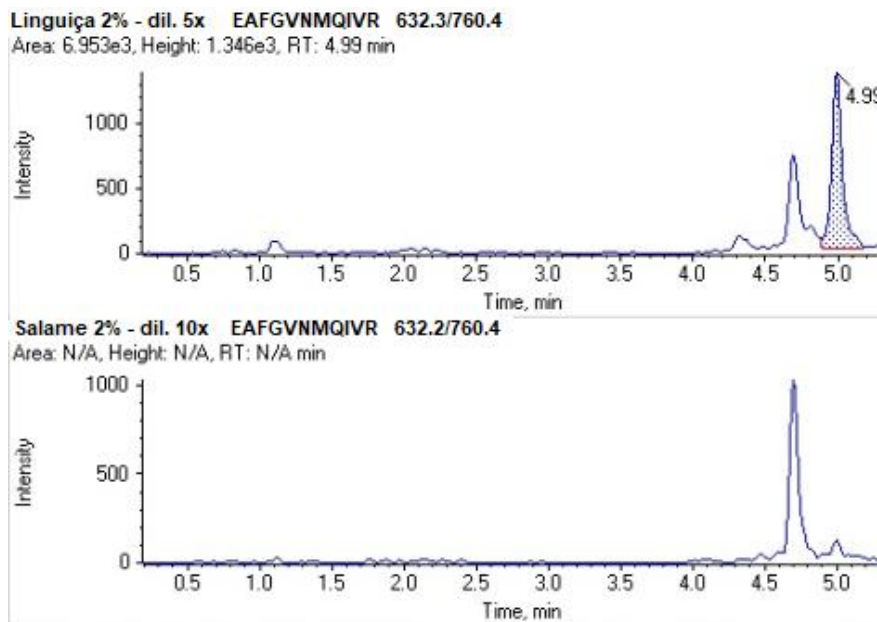
A curva em linguiça apresentou boa resposta em ambas diluições para o peptídeo FYL ($m/z = 793,9/283,1$), na faixa de 0,5 a 5,0 %, conforme mostram os gráficos da Figura 31. O ponto 2,0 % foi excluído para melhor ajuste da linearidade da curva.



Fonte: Autor.

Figura 31. Curvas de calibração preparadas em linguiça branca e proteína isolada de soja, com diluição dos extratos pré-digestão, em 5 e 10 vezes.

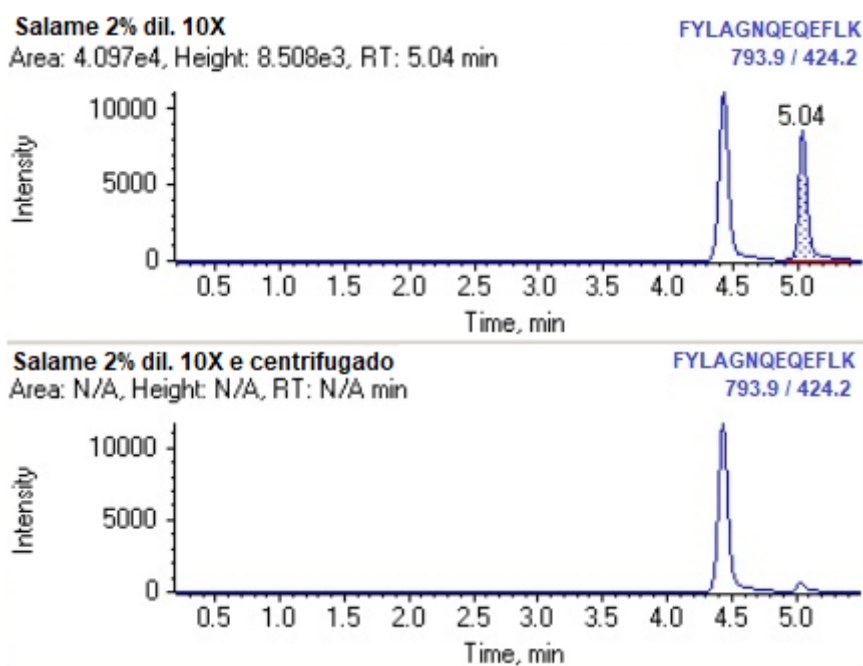
O peptídeo EAF praticamente não foi observado com diluição de 10x e na diluição de 5x formou picos de pouca intensidade que não apresentaram comportamento linear. A Figura 32 apresenta dois cromatogramas obtidos para o peptídeo EAF na transição $m/z = 632,3/760,4$.



Fonte: Autor.

Figura 32. Cromatogramas obtidos para o peptídeo EAF ($m/z = 632,3/760,4$) no ponto de concentração 2,0 %, na curva em linguiça com diluição de 5x e na curva em salame com diluição de 10x.

A diluição de 10x na curva em salame provocou a precipitação das proteínas, mesmo com a água ultrapura ajustada no pH da solução tampão de trabalho. De fato, como abordado na seção 2.1, as proteínas da soja possuem solubilidade limitada em água. Para confirmar que o precipitado continha as proteínas de interesse, as amostras diluídas foram centrifugadas e o sobrenadante foi analisado. Nenhuma das amostras centrifugadas gerou picos para os peptídeos monitorados (Figura 33).



Fonte: Autor.

Figura 33. Cromatogramas do peptídeo FYL ($m/z = 793,9/424,2$) antes e após centrifugação nas amostras da curva em salame com 10x de diluição que apresentaram precipitação.

Diluir a amostra foi eficaz para minimizar o efeito de saturação e possibilitou a construção de curvas de calibração de 0,5 a 5,0 % com boa linearidade e r^2 de aproximadamente 0,99. Porém, pode promover a precipitação das proteínas de interesse e o peptídeo EAF, normalmente o mais intenso, não apresentou boa resposta frente à diluição. Além disso, trabalhar com diluição significa acrescentar uma etapa a mais em um processo já extenso, o que dificulta a adaptação do método a uma rotina analítica executável em dois turnos.

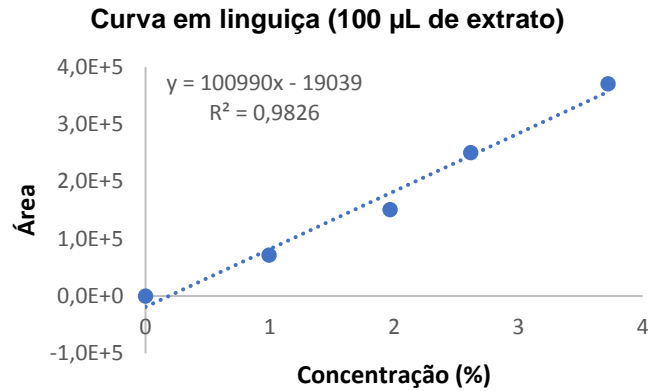
4.3.3. Testes com redução do volume de extrato digerido

Preparou-se uma curva analítica em linguiça com concentrações de 0,99 a 5,55 % de proteína isolada de soja (m/m), para comparação das respostas obtidas utilizando 100 e 200 µL de extrato. As concentrações adicionadas foram corrigidas com o teor da proteína isolada em base seca (92,20 %).

O peptídeo FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$ apresentou picos cromatográficos mais intensos e melhor linearidade. Digerindo 200 µL de extrato, as áreas começaram a decrescer no ponto correspondente à concentração de 2,62 %. A Tabela 8 apresenta os dados experimentais obtidos, sendo que os valores em vermelho mostram os pontos de valor decrescente. Com 100 µL de extrato, foi possível construir uma curva até 3,72 % de concentração, com $r^2 = 0,9826$, como mostra a Figura 34.

Tabela 8. Dados das áreas para a curva de calibração de proteína isolada de soja em linguiça, peptídeo FYL (transição $m/z = 793,9/283,1$), utilizando 100 e 200 µL de extrato na digestão com tripsina.

Ponto	Concentração adicionada (%)	Área	
		100 µL	200 µL
0	0	0	0
1	0,99	71620	161100
2	1,97	151200	319700
3	2,62	250600	198500
4	3,72	370900	67480
5	4,64	356500	16870
6	5,55	378900	31040



Fonte: Autor.

Figura 34. Curva de calibração de proteína isolada de soja em linguiça, utilizando 100 µL de extrato na digestão com tripsina, para o peptídeo FYL (transição $m/z = 793,9/283,1$).

Os resultados obtidos com 100 µL de extrato apresentaram a possibilidade de reduzir ainda mais o volume aliqotado, visando atingir concentrações maiores sem perder a resposta linear.

Com o intuito de observar o comportamento de amostras que já continham proteína de soja, foram testadas uma mortadela sem toucinho e uma salsicha “hot dog” com o método da adição de padrão, utilizando os volumes 50, 100 e 200 µL de extrato de amostra na digestão triptica. A curva analítica foi construída com 5 pontos de adição (1,0 a 5,0 %) e as amostras sem adição foram preparadas em quintuplicata.

As amostras de mortadela e salsicha utilizadas nestes experimentos foram cedidas em parceria pela Companhia Minuano de Alimentos, juntamente com amostras da matéria-prima de soja utilizada na fabricação (proteína texturizada de soja e proteína concentrada de soja). Dessa forma, foi possível analisar a umidade (por gravimetria) e a proteína (por Kjeldahl) das matérias-primas, estabelecer o teor de proteína em base seca e a concentração de proteína de soja adicionada nos produtos, como apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Concentração calculada de proteína de soja nas amostras de mortadela e salsicha, considerando os teores de proteína em base seca das matérias-primas utilizadas.

	Mortadela s/ toucinho	Salsicha Golden	Salsicha Hot Dog	Mortadela Bologna
Total lote (Kg)	3200,00	2807,00	3718,00	600,00
Total PTS ^a adicionado (Kg)	128,00	84,21	148,72	9,00
Total PCS ^b adicionado (Kg)	-	-	-	6,00
Concentração de PS^c na amostra (%)	2,01	1,51	2,01	1,47

^a Proteína texturizada de soja, com teor em base seca de 50,21 %

^b Proteína concentrada de soja, proteína concentrada de soja, com teor em base seca de 71,21 %

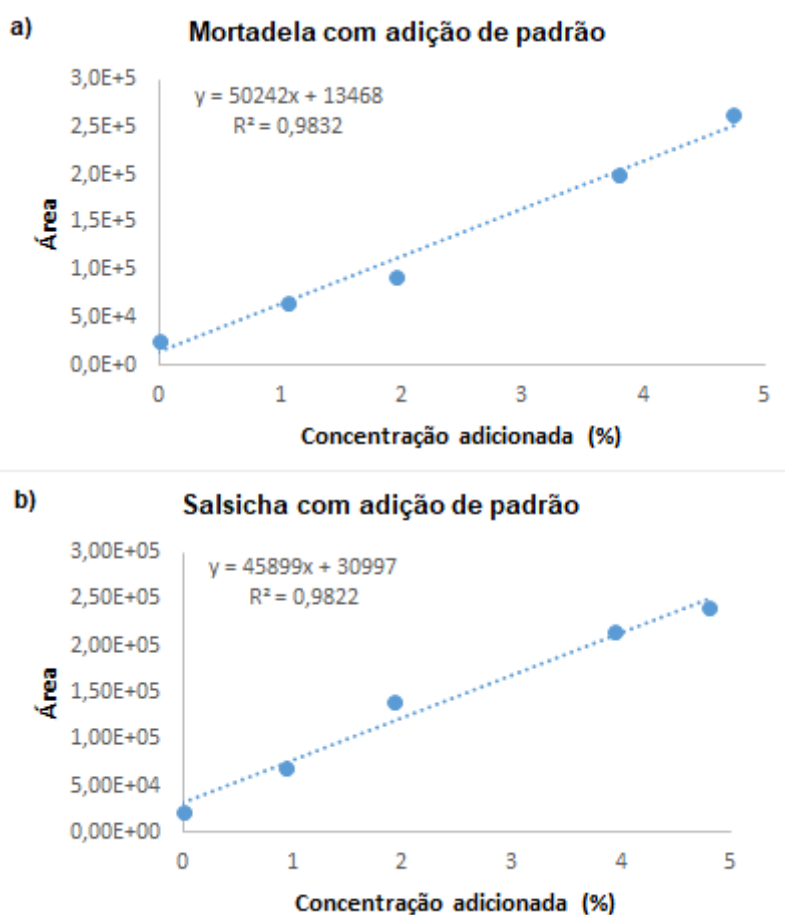
^c Proteína de soja

As amostras com 200 µL de extrato apresentaram tendência decrescente já no segundo ponto de adição, como previsto. Em contrapartida, as amostras com 50 µL de extrato permitiram a construção de curvas de até 5,0 % de adição de proteína de soja. Os dados obtidos estão compilados na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10. Dados de área obtidos para as amostras de mortadela e salsicha com adição de padrão, volumes 50, 100 e 200 µL de extrato digerido, peptídeo FYL (transição $m/z = 793,9/283,1$).

Amostra	Área		
	50 µL	100 µL	200 µL
Mortadela s/ adição (média)	25938	21285	51558
Mortadela 1,0 %	66580	79050	121400
Mortadela 2,0 %	92600	113700	50680
Mortadela 3,0 %	128300	173100	40360
Mortadela 4,0 %	200500	164500	17310
Mortadela 5,0 %	262900	120500	8766
Salsicha s/ adição (média)	22592	42408	61250
Salsicha 1,0 %	68310	114200	68240
Salsicha 2,0 %	139700	153000	13170
Salsicha 3,0 %	201800	147100	9572
Salsicha 4,0 %	215800	71450	6695
Salsicha 5,0 %	241300	51710	6076

No método por adição de padrão cada amostra gera um gráfico diferente, visto que ela é considerada como ponto zero da curva e entra na regressão linear junto aos pontos fortificados. A Figura 35 apresenta os gráficos obtidos para as curvas resultantes das amostras de mortadela sem toucinho e salsicha *hot dog*, considerando como ponto zero a média obtida para as quintuplicatas analisadas das amostras sem adição. O ponto 3,0 % foi retirado para melhor ajuste das retas. Os valores de r^2 obtidos foram 0,9832 (mortadela) e 0,9822 (salsicha).



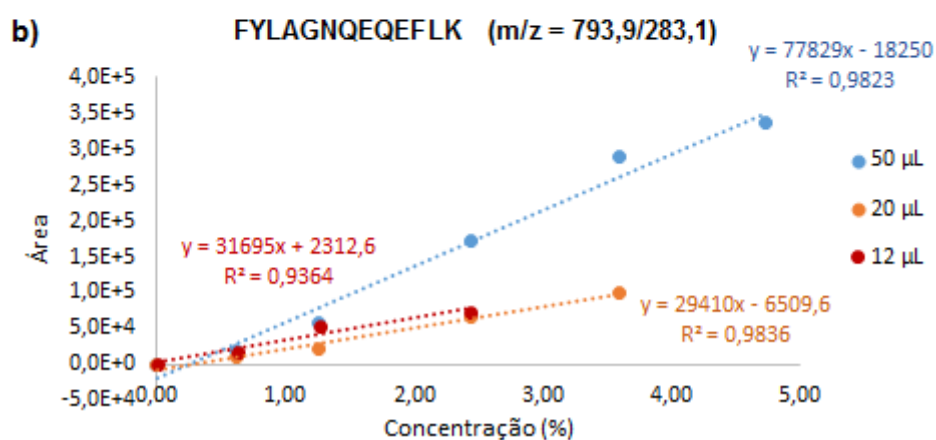
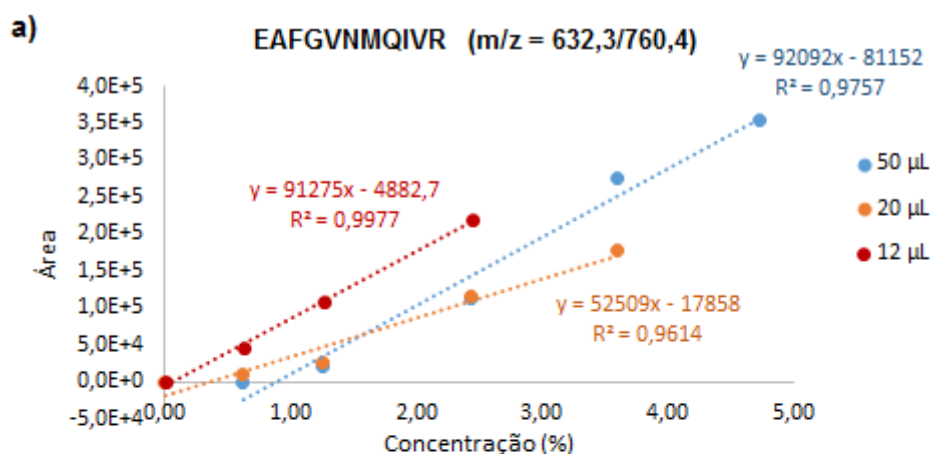
Fonte: Autor.

Figura 35. Curvas analíticas para a adição de padrão, peptídeo FYL transição $m/z = 793,9/283,1$. a) Em amostra de mortadela sem toucinho, com 50 μL de extrato digerido. b) Em amostra de salsicha *hot dog*, com 50 μL de extrato digerido.

Dessa forma, ficou evidenciado que digerindo 50 μL de extrato ao invés de 200 μL é possível obter respostas lineares em maiores faixas de concentração de proteína de soja, sem que seja necessário incluir novas etapas no protocolo de preparo de amostra.

Porém, ao trabalhar com uma alíquota de 50 μL de extrato de amostra e 50 μL de solução de tripsina, altera-se a proporção anteriormente estabelecida de 4:1 para 1:1. Nessas condições de preparo, o peptídeo mais intenso é o FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$.

Por fim, foi avaliada uma curva analítica de linguiça branca adicionada de PIS, para verificar as respostas dos dois peptídeos mais intensos. Utilizando 50 μL de extrato de amostra, comparou-se os volumes 12, 20 e 50 μL de tripsina, visando adequar a proporção, caso necessário. A Figura 36 apresenta os gráficos com as retas obtidas e suas equações, enquanto a Tabela 11 compila os valores de área obtidos. Os valores de área em vermelho indicam comportamento divergente à tendência linear crescente da concentração de PIS.



Fonte: Autor.

Figura 36. Curvas de calibração de linguíça branca com adição de PIS, utilizando 12, 20 e 50 μL de solução de tripsina, para os peptídeos: a) EAF na transição $m/z = 632,3/760,4$ e b) FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$.

Tabela 11. Áreas obtidas para os peptídeos EAF na transição $m/z = 632,3/760,4$ e FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$ em curva de linguíça branca com PIS digerida com 12, 20 e 50 μL de solução de tripsina.

Concentração (%)	EAFGVNMQIVR			FYLAGNQEQEFLK		
	12 μL	20 μL	50 μL	12 μL	20 μL	50 μL
0,00	0	0	0	0	0	0
0,62	46370	9104	0	16890	9335	19750
1,26	108700	25750	19700	55050	22610	58300
2,44	219700	114900	111800	74230	67320	171900
3,60	22210	176800	274400	3561	101100	288700
4,73	6737	175800	353200	2716	98580	336300

Para os dois peptídeos monitorados neste teste, 12 μL de solução de tripsina 1,0 mg mL^{-1} foram insuficientes para promover a digestão de concentrações superiores a 2,44 % de proteína de soja. Já com 20 μL , foi possível digerir até o ponto 3,60 %. Somente com 50 μL de solução de tripsina foi possível digerir concentrações acima de 4,50 %.

A razão entre as quantidades de tripsina e extrato da amostra determina qual peptídeo será o mais intenso. Utilizando 12 μL de solução de tripsina (proporção 1:4) tem-se o EAF duas vezes mais intenso que o FYL. A partir de 20 μL (proporção de aproximadamente 1:2), entretanto, ambos apresentam intensidades semelhantes.

A resposta do peptídeo EAF apresentou grande variação com a mudança da quantidade de enzima envolvida na digestão. O comportamento foi linear e com boa sensibilidade na faixa até 2,44 % de adição para 12 μL de solução de tripsina. Porém, a partir dessa concentração a digestão perdeu a eficiência, como observa-se pelo decréscimo das áreas. Em contrapartida, com 50 μL de solução de tripsina o primeiro ponto de adição (0,62 %) não apresentou resposta e somente de 2,44 % em diante observa-se tendência linear.

O peptídeo FYL apresentou comportamento linear satisfatório com 50 μL de solução de tripsina, compreendeu a maior faixa de aplicação sem perder a linearidade ($r^2 = 0,9823$) e com boa sensibilidade. Por essa razão, mostrou-se o mais adequado para atender às condições de aplicação deste trabalho.

A faixa de 0,62 a 4,73 % compreende uma variação bastante grande de quantidade de analito. Avaliando os resultados, entende-se que o ideal é adequar a quantidade de solução de tripsina de acordo com o uso pretendido. Pode-se utilizar uma razão 1:4 de tripsina/amostra trabalhando em faixas mais estreitas e concentrações menores (até 2,50 %), e, em ocasiões em que seja necessária uma faixa ampla de varredura ou concentrações altas, pode-se optar por trabalhar com uma proporção de 1:1.

Tanto o peptídeo EAF ($m/z = 632,3/760,4$) quanto o FYL ($m/z = 793,9/283,1$) podem ser utilizados para quantificação, a depender da aplicação pretendida. As condições e concentrações de trabalho irão definir o mais intenso e mais adequado em cada caso.

4.3.4. Quantificação por adição de padrão

Otimizadas as condições de trabalho para concentrações mais altas de analito, as amostras de mortadela sem toucinho, mortadela Bologna, salsicha *Hot dog* e salsicha *Golden* foram quantificadas com o método de adição de padrão. Os resultados foram calculados com os valores da inclinação e interceptação das retas obtidas para cada amostra, conforme a Equação 2, apresentada na seção 3.2.13.

O valor teórico máximo de proteína de soja nestas amostras seria 2,01 % (descrito na Tabela 9), portanto, as curvas foram encurtadas para 3 a 4 pontos, na faixa de 0,50 a 1,50 %. As amostras sem adição (referentes ao ponto zero da curva) foram preparadas em quintuplicata, e os valores suspeitos foram avaliados pelo teste de Grubbs para *outliers*. As Tabelas 14 a 17 do Anexo III mostram os dados brutos e tratamentos realizados para esses ensaios.

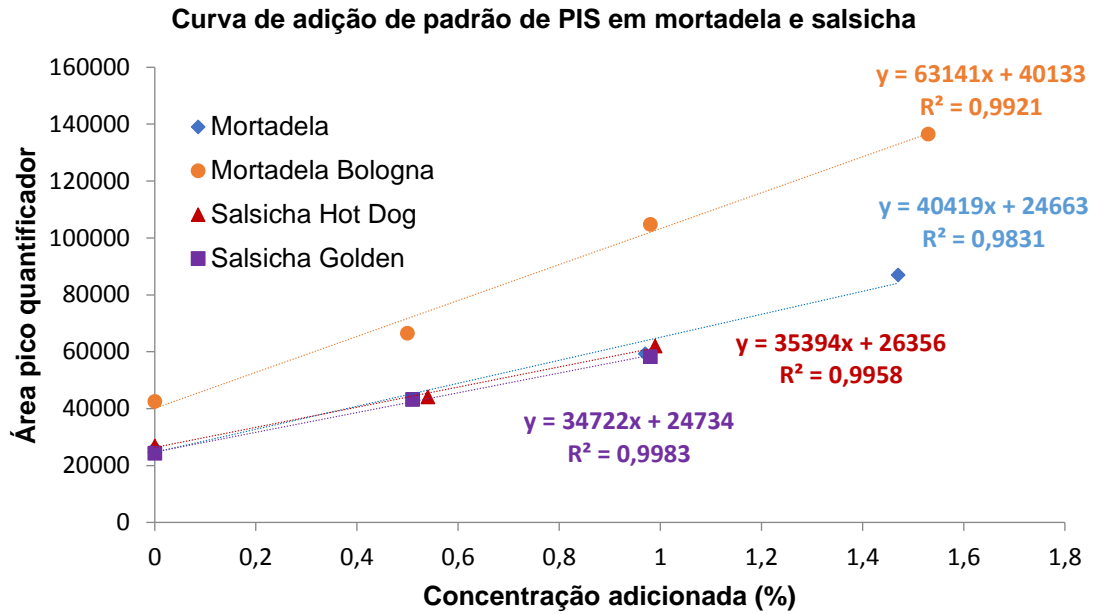
Conforme abordado na seção 2.2.3, uma das maiores dificuldades em quantificar a proteína de soja existente na amostra é a diferença de capacidade de extração que existe entre a proteína que foi adicionada durante a produção (*incurred*) e a proteína adicionada no laboratório, que não passa pelos demais processos (*spiked*). Devido a essa diferença, é esperado um resultado subestimado ao quantificar amostras *incurred* com curvas de adição *spiked*, mesmo que a fortificação seja na própria matriz.

Tal comportamento foi observado na quantificação das amostras de mortadela e salsicha por adição de padrão, conforme mostrado nos dados da Tabela 12 e da Figura 37. O peptídeo FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$ teve maior intensidade e melhor linearidade na construção da curva e foi utilizado como quantificador para os cálculos. O pico da segunda transição mais intensa,

$m/z = 793,9/424,2$, foi utilizado como qualificador. A Figura 38 apresenta um cromatograma de uma das replicatas de mortadela sem toucinho, onde é possível visualizar os picos quantificador e qualificador do peptídeo FYL.

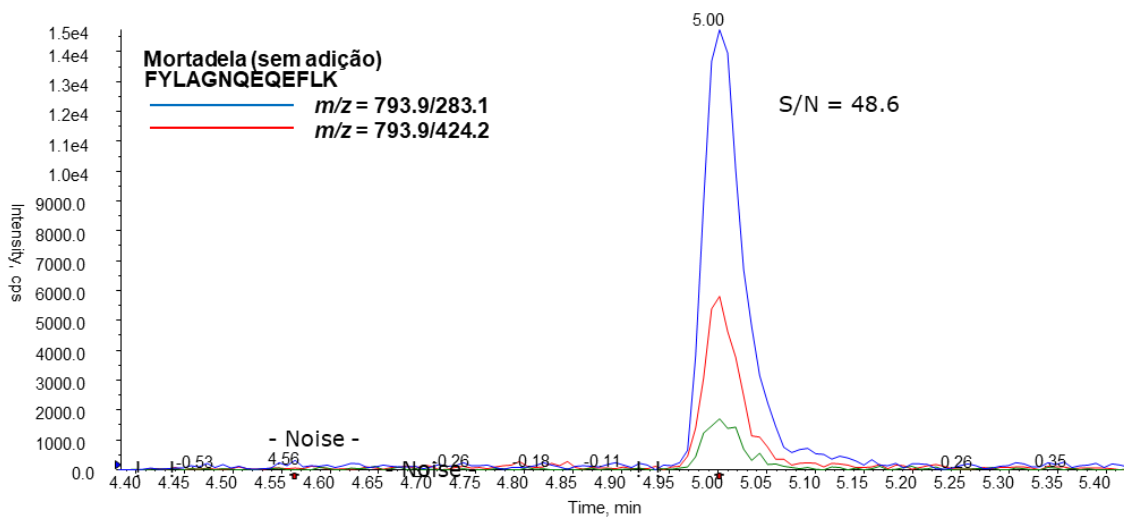
Tabela 12. Resultados calculados para amostras de mortadela sem toucinho, mortadela Bologna, salsicha *hot dog* e salsicha *Golden*.

	Conc. PIS adic. (%)	Área pico Quantificador (FYL $m/z = 793,9/283,1$)	r	r ²	Área pico Qualificador (FYL $m/z = 793,3/424,2$)	Conc. PS calculada (%)	Conc. esperada amostra (%)	Exatidão (Recup.) (%)
Mortadela	0	26195			8431			
	0,97	59367	0,9915	0,9831	19607	0,61	2,01	30,35
	1,47	87050			31053			
Mortadela Bologna	0	42588			15434			
	0,50	66533	0,9960	0,9921	23263	0,64	1,47	43,54
	0,98	104867			35710			
	1,53	136600			46147			
Salsicha Hot Dog	0	26954			9115			
	0,54	44153	0,9979	0,9958	14600	0,74	2,01	36,82
	0,99	62113			22137			
Salsicha Golden	0	24342			8431			
	0,51	43260	0,9991	0,9983	13733	0,71	1,51	47,02
	0,98	58337			19607			



Fonte: Autor.

Figura 37. Curvas de calibração obtidas por adição de padrão para as amostras mortadela sem toucinho, mortadela Bologna, salsicha *Hot dog* e salsicha *Golden*, para o peptídeo FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$, utilizado como quantificador.



Fonte: Autor.

Figura 38. Cromatograma das transições mais intensas do peptídeo FYL em amostra de mortadela sem toucinho.

Os resultados encontrados ficaram consideravelmente abaixo dos valores teóricos de referência¹¹ calculados para as amostras. A exatidão foi avaliada pela recuperação, e variou entre 30,35 e 47,02 %.

Não é possível avaliar, somente com estes dados, a real influência da diferença de extração das proteínas *spiked* e *incurred* na baixa recuperação observada. Porém, nestas condições de trabalho, o método de adição de padrão não apresentou uma alternativa adequada à quantificação das proteínas de soja em matrizes cárneas processadas.

4.3.5. Quantificação por calibração externa

Para o método de quantificação por calibração externa foi utilizada uma linguiça toscana sem proteína de soja como matriz branca (Figura 39) e foram preparados 6 pontos fortificados com PIS (teor 92,20 %), compreendendo concentrações de 0,63 a 5,00 %.

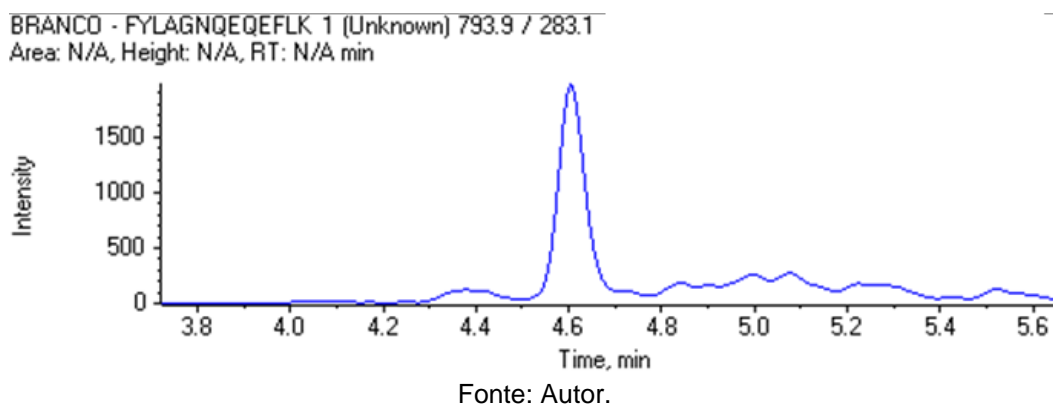


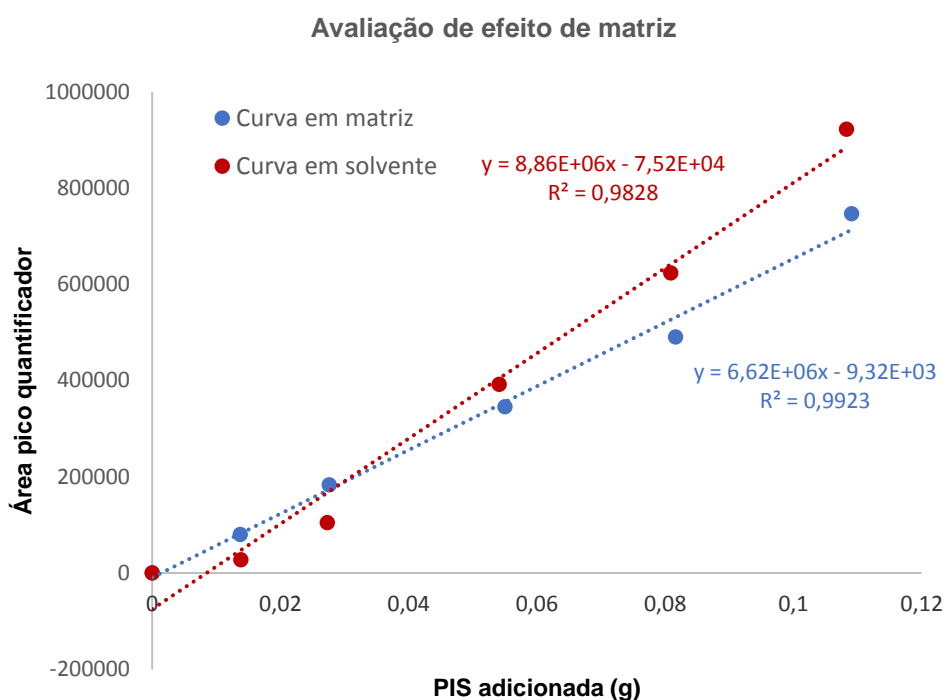
Figura 39. Cromatograma da linguiça toscana branca utilizada na validação, sem picos no tempo de retenção característico do peptídeo FYL (4,98 minutos).

O método foi avaliado por um estudo de validação de 3 dias, onde em cada dia foram preparadas 18 amostras fortificadas em 3 níveis, conforme descrito no

¹¹ Os valores teóricos de referência foram calculados de acordo com as informações obtidas com a empresa parceira que forneceu as amostras.

esquema da Figura 14, na seção 3.2.14. O peptídeo monitorado como quantificador foi o FYL na transição $m/z = 793,9/283,1$, e o qualificador foi a segunda transição mais intensa, com $m/z = 793,3/424,2$. O tempo de retenção do variou de 4,96 a 5,00 minutos.

O efeito de matriz foi avaliado preparando duas curvas de calibração com a mesma quantidade de níveis e concentrações de analito; sendo uma curva somente com o analito em tampão ureia-tris-HCl e a outra em presença da matriz (linguiça toscana branca). Visualmente, as retas não apresentaram o paralelismo esperado entre duas curvas analíticas equivalentes, como mostrado na Figura 40.



Fonte: Autor.

Figura 40. Curvas em matriz branca fortificada e tampão ureia-tris-HCl, para verificação do efeito de matriz.

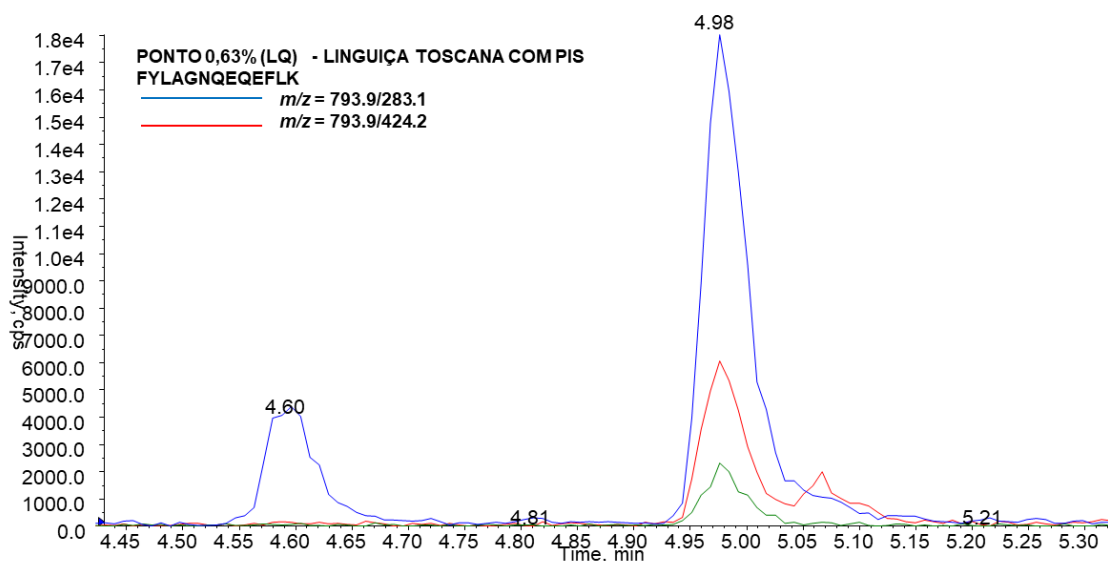
O critério utilizado para avaliar a presença de efeito de matriz foi a razão das inclinações (RI) das duas curvas. Se $RI = 1,0 \pm 0,1$, considera-se que não há efeito de matriz⁽¹²¹⁾. O valor encontrado foi de 1,34, portanto, considera-se que

o efeito existe, e é indicado trabalhar com curvas analíticas preparadas em matriz a fim de minimizá-lo.

Para avaliar a linearidade das curvas de calibração utilizaram-se os critérios de aceitabilidade descritos no Manual de Garantia da Qualidade Analítica⁽¹¹⁶⁾. O coeficiente de Pearson (r), que deve ser $\geq 0,99$, ficou estipulado em 0,9944, 0,9981 e 0,9979, para os dias 1, 2 e 3, respectivamente.

Os resíduos percentuais devem ser representados graficamente, não devem apresentar comportamento tendencioso e precisam atender ao limite de $\pm 20\%$ para os valores individuais. Uma das replicatas para o nível de fortificação 1,25% apresentou resíduo individual de 24,0%. Conforme preconizado no Manual, até um valor de resíduo acima do limite pode ser aceito para cada nível da curva, se submetido a um teste de *outlier*. O valor suspeito foi aceito pelo teste de Grubbs, e os demais resíduos ficaram dentro da faixa aceitável. Os dados, gráficos e informações complementares encontram-se no Anexo IV.

O LQ do método ficou definido em 0,63%, valor adequado à finalidade proposta, que consiste na pesquisa de fraude por adição de proteína de soja. Para aplicação do método em faixas mais baixas, como análise de contaminação cruzada de produtos com proteína de soja, por exemplo, é necessário novo estudo de LQ e adequação da faixa de trabalho. A Figura 41 apresenta um cromatograma do ponto 0,63% da curva analítica do Dia 3, para o peptídeo FYL nas duas transições mais intensas.



Fonte: Autor.

Figura 41. Cromatograma do peptídeo FYL nas transições $m/z = 793,9/283,1$ (quantificador) e $m/z = 793,9/424,2$ (qualificador), para o primeiro ponto da curva analítica (0,63 %) que também representa o LQ do método.

Tendo em vista que as adições do analito foram realizadas em massa, foi possível calcular a concentração predita para cada ponto da curva e cada amostra fortificada. Por essa razão, os níveis de fortificação previstos de 1,25, 2,50 e 3,75 %, foram calculados em 1,35, 2,64 e 3,90 %, respectivamente, pelas médias dos valores reais de adição.

Os resultados compilados para os cálculos de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial são apresentados na Tabela 13. Todos os valores de concentração determinada foram submetidos ao teste de Grubbs com 95 % de confiança para avaliação de *outliers*, intra-dia (usando $G_{\text{crítico}}$ para 6 valores) e inter-dia (usando $G_{\text{crítico}}$ para 18 valores). Nenhum *outlier* foi detectado. Os dados brutos e tratamentos estatísticos dos 3 dias do estudo de validação são apresentados mais detalhadamente no Anexo IV.

Tabela 13. Resultados de Repetibilidade, Reprodutibilidade intralaboratorial e Recuperação (%) obtidos nos 3 dias de validação.

	Nível de fortificação 1,35 %			Nível de fortificação 2,64%			Nível de fortificação 3,90%		
	Concentração determinada (%)	CV (%)	CV _{máximo} (%)	Concentração determinada (%)	CV (%)	CV _{máximo} (%)	Concentração determinada (%)	CV (%)	CV _{máximo} (%)
Repetibilidade (Dia 1 - 6 vias)	1,19	8,7	4,0	2,31	5,2	3,6	3,83	5,9	3,3
	1,20			2,43			3,52		
	1,24			2,29			3,91		
	1,17			2,31			3,86		
	1,06			2,56			3,73		
	0,98			2,56			3,36		
Repetibilidade (Dia 2 - 6 vias)	1,03	7,7	4,0	2,24	2,4	3,6	3,42	7,3	3,3
	0,92			2,24			3,50		
	0,99			2,20			3,94		
	0,99			2,14			4,13		
	1,15			2,11			3,69		
	1,07			2,20			3,89		
Repetibilidade (Dia 3 - 6 vias)	1,15	6,3	4,0	2,33	3,0	3,6	3,92	2,7	3,3
	1,01			2,32			3,82		
	1,04			2,26			3,71		
	1,17			2,26			3,93		
	1,13			2,16			3,69		
	1,03			2,34			3,87		
Precisão Intermediária (18 vias)	---	8,4	10	---	5,4	10	---	5,5	10
Recuperação (%) (18 vias)	80,3			86,8			96,5		

Segundo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica ⁽¹¹⁶⁾ e o INMETRO ^(115,117), o CV_{máximo} aceito para repetibilidade é calculado pela Equação de Horwitz (Equação 5), que leva em consideração a concentração do analito (C).

$$CV_{máximo} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad \text{(Equação 5)}$$

Para analitos nessa faixa de concentração (%), o valor de CV_{máximo} calculado por Horwitz torna-se bastante restritivo, assim como para concentrações muito baixas (na faixa de ppb ou inferior) ele permite variações tão elevadas que é necessário estipular um valor fixo ⁽¹²²⁾. Observa-se que somente 3 valores de CV intra-dia (em verde) ficaram dentro do critério para repetibilidade. Esse resultado

também pode ser reflexo de dificuldades de homogeneidade na amostra, visto que as adições de padrão na matriz são realizadas em massa.

O CV_{máximo} para reprodutibilidade intralaboratorial, segundo Albano e Raya-Rodriguez (2009)⁽¹¹⁷⁾, é de 10 % para concentrações acima de 1.000 µg Kg⁻¹. A reprodutibilidade intralaboratorial para os 3 níveis de fortificação testados ficou dentro dos critérios de aceitabilidade.

A recuperação total para cada nível de fortificação variou de 80,3 a 96,5 %, sendo o maior valor observado para o nível 3,90 %. As recuperações esperadas para concentrações de porcentagem do analito é entre 97 e 103 %, segundo o INMETRO⁽¹¹⁵⁾. Entretanto, essa não é a realidade que se observa em métodos *shotgun* por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

O *Standard Method Performance Requirements for Detection and Quantitation of Selected Food Allergens*⁽¹²³⁾ é o primeiro esboço de normatização para desenvolvimento de métodos de análise de alergênicos. O documento destina-se às matrizes leite, ovos, castanha e amendoim, e estipula valores mais flexíveis e realistas de CV para repetibilidade (até 20 %), reprodutibilidade intralaboratorial (até 30 %) e recuperação (60 a 120 %). Ainda assim, muitas vezes esses limites não conseguem ser atendidos.

Hoffmann *et al.* (2017)⁽¹⁰⁾ obtiveram recuperação média de 60 % para proteína de soja em salsichas, utilizando curva analítica em matriz *incurred*. Pilloli *et al.* (2018)⁽¹²⁴⁾ obtiveram recuperação média de 70 % para o peptídeo FYL da soja em biscoitos, sem utilizar correção com peptídeos sintéticos para padronização interna. Planque *et al.* (2019)⁽¹²⁵⁾, avaliaram as recuperações do peptídeo EAF da soja em chocolate, geleia de pêra e maçã, biscoito, presunto de frango, maionese, compota, molho e tempero. Os resultados de recuperação nas amostras (sem nenhum tipo de correção por padronização interna) variaram de 50 a 181 %.

Portanto, é preciso avaliar no caso concreto se os valores obtidos de precisão atendem ao propósito da aplicação pretendida do método, levando em

consideração variações aceitáveis inerentes à técnica analítica utilizada e à natureza do analito. Apesar da falta de detalhamento e pequeno escopo de aplicação, o *SMPR* 2016.002 da *AOAC*⁽¹²³⁾ representa uma previsão otimista na criação normas específicas para desenvolvimento de métodos de compostos alergênicos, que atendam às dificuldades inerentes a esse tipo de análise com limites adequados.

5. Conclusão

Neste trabalho foram apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento e validação de um método qualitativo e quantitativo para determinação de proteína de soja em produtos cárneos e embutidos por CLAE-EM/EM, pela abordagem *shotgun*.

O objetivo de aplicação do método desenvolvido foi a implementação no programa oficial de Fiscalização de produtos de origem animal do MAPA, atendendo demandas vigentes de pesquisa de fraude por adição de proteína de soja.

O método desenvolvido mostrou-se apto para fins qualitativos em diversas matrizes cárneas, segundo os critérios de seletividade/especificidade e limite de detecção de 0,50 %. Pode ser utilizado na rotina analítica do LFDA para produtos em que a adição de proteína de soja é proibida pela legislação.

Não foi encontrada correlação entre a quantidade de proteína de soja e a de isoflavonas, impossibilitando a utilização destas para fins de quantificação. Além disso, as isoflavonas não fornecem uma identificação segura da presença de soja na amostra, pois estão presentes em outros tipos de vegetais.

Para análise quantitativa, o método validado para linguiça apresentou repetibilidade, reprodutibilidade intralaboratorial e recuperação satisfatórios para a aplicação proposta. Embora os valores de repetibilidade e recuperação tenham ficado acima dos limites estabelecidos pelo INMETRO para a faixa de concentração de trabalho, estão concordantes com a literatura para o analito e os peptídeos de interesse.

Antes da implementação na rotina analítica, porém, é necessário avaliar se a curva analítica em matriz *incurred* é capaz de corrigir parte dos efeitos do processamento observados que subestimam a quantificação. Além disso, para ampliar o escopo do método a outras matrizes, é preciso realizar estudo formal

de repetibilidade e reprodutibilidade, seguindo os procedimentos de Qualidade já existentes no LFDA.

6. Referências

- 1 MINISTÉRIO da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>.
- 2 MONTOWSKA, M.; FORMAL, E. Detection of peptide markers of soy, milk and egg white allergenic proteins in poultry products by LC-Q-TOF-MS/MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 310-317, 2018.
- 3 OLIVO, R. Tecnologia de extensão cárnea. In: SHIMOKOMAKI, M., et al. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006. p. 175-184.
- 4 GUJRAL, H. S. et al. Effect of liquid whole egg, fat and textured soy protein on the textural and cooking properties of raw and baked patties from goat meat. **Journal of Food Engineering**, v. 53, p. 377-385, 2002.
- 5 ULU, H. Effect of wheat flour, whey protein concentrate and soya protein isolate on oxidative processes and textural properties of cooked meatballs. **Food Chemistry**, v. 87, p. 523-529, 2004.
- 6 LEITNER, A. et al. Identification of Marker Proteins for the Adulteration of Meat Products with Soybean Proteins by Multidimensional Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 2424-2430, 2006.
- 7 WILSON, S.; BLASCHEK, K.; DE MEIJA, E. G. Allergenic Proteins in Soybean: Processing and Reduction of P34 Allergenicity. **Nutrition Reviews**, v. 63, n. 2, p. 47-58, 2005.
- 8 RTIQ cárneos e seus derivados. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-carneos-e-seus-derivados-1>>. Acesso em: 20 setembro 2020.

9 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. 2ª. ed. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2019. 19 p.

10 HOFFMANN, B. et al. A sensitive HPLC/MS-MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea and soy proteins in meat products. **Food Control**, v. 71, p. 200-209, 2017.

11 MACMAHON, S. et al. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1220, p. 101-107, 2012.

12 MAMONE, G. et al. Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7130-7142, 2009.

13 MONACI, L.; VISCONTI, A. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 581-591, 2009.

14 CUCU, T.; DE MEULENAER, B.; DEVREESE, B. MALDI based identification of soybean protein markers – Possible analytical targets for allergen detection in processed foods. **Peptides**, v. 33, p. 187-196, 2012.

15 ALBERTS, B. et al. Fundamentos da Biologia Celular. 4ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 55-56.

16 ATIVIDADES biológicas de proteínas. **Biosul Fertilizantes**. Disponível em: <<https://www.biosul.com/noticia/atividades-biologicas-de-proteinas>>. Acesso em: 20 janeiro 2020.

17 ORDENS da estrutura da proteína. **Khan Academy**. Disponível em: <<https://khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/orders-of-protein-structure>>. Acesso em: 22 de Fevereiro de 2020.

- 18 LIU, K. **Soybeans: Chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997.
- 19 LIU, K. et al. **Soybeans as functional foods and ingredients**. Champaign: AOCS Press, 2004.
- 20 BADLEY, R. A. et al. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 412, n. 2, p. 214-228, 1975.
- 21 WOLF, W. J. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, p. 969-976, 1970.
- 22 MURPHY, P. A. Soybean Proteins. In: JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. **Soybeans: Chemistry, production, processing, and utilization**. [S.I.]: AOCS Press, 2008. Cap. 8, p. 229-267.
- 23 MARUYAMA, Y. et al. Structure of the core region of the soybean B-conglycinin α' -subunit. **Acta Crystallographica Section D**, v. D60, p. 289-297, 2004.
- 24 ADACHI, M. et al. Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homo-hexamer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 7395-7400, 2003.
- 25 FAO EXPERT CONSULTATION. **Dietary protein quality evaluation in human nutrition**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, p. 79. 2013. (FAO Food and nutrition paper 92).
- 26 FDA. **Food Labeling, health claims, soy protein and coronary heart disease**. Food and Drug Administration. [S.I.], p. Title 21, Volume 2, Seção 101.82. 1999.

27 ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 19 de 30 de abril de 1999. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/26345>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2020.

28 PAULO, U. D. S. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos versão 7.0**, 2019. Disponível em: <http://www.tbca.net.br/base-dados/int_composicao_estatistica.php?cod_produto=C0049T>. Acesso em: 07 de dezembro de 2019.

29 FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. n.3, p. 1069-1086, 2001.

30 RIZZO, G.; BARONI, L. Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. **Nutrients**, v. 10, n. 43, 2018.

31 ANTUNES, P. L. Algumas propriedades físico-químicas e nutricionais das proteínas da soja. **Faculdade de Tecnologia de Alimentos , Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, v. Tese (Doutorado) , p. 92p., 1974.

32 DA SILVA, C. O.; ANDRADE, G. F.; DANTAS, M. I. D. S. Influência do processamento na qualidade proteica de novos cultivares de soja destinados à alimentação humana. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 389-397, 2010.

33 ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 268 de 22 de setembro de 2005. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/27595>>. Acesso em: 17 de novembro de 2019.

34 ERDMAN, J. W. et al. Not all soy products are created equal: caution needed in interpretation of research results. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 5, p. 1229S-1233S, 2004.

- 35 BELLOQUE, J. et al. Analysis of soyabean proteins in meat products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 5, p. 507-532, 2002.
- 36 MUNRO, I. C. et al. Soy isoflavones: A safety review. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 1, p. 1-33, 2003.
- 37 AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 323-334, 2002.
- 38 MELLENTHIN, O.; GALENSA, R. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 594-602, 1999.
- 39 LEE, Y. W. et al. Isoflavone characterisation and antioxidant activity of Ohio soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2647-2651, 2004.
- 40 SETCHELL, K. D. R. et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 447-453, 2002.
- 41 BARBOSA, A. C. L. et al. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 921-926, 2006.
- 42 WEI, P. et al. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 243-248, 2012.
- 43 TAKU, K. et al. Soy isoflavones for osteoporosis: An evidence-based approach. **Maturitas**, v. 70, p. 333-338, 2011.

44 KHAN, S. A. et al. Soy Isoflavone Supplementation for Breast Cancer Risk Reduction: A Randomized Phase II Trial. **Cancer Prevention Research**, v. 5, p. 309-319, 2012.

45 KO, K.-P. Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 17, 2014.

46 MUJIC, I. et al. Isoflavone content and antioxidant properties of soybean seeds. **Croatian Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2011.

47 DE AZEVEDO, E. Riscos e controvérsias na construção social do conceito de alimento saudável: o caso soja. **Saúde Pública**, v. 45, n. 4, p. 781-788, 2011.

48 MURPHY, S. E. et al. Association of seed and agronomic traits with isoflavone levels in soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 89, n. 3, p. 477-484, 2009.

49 ÁVILA, M. R. et al. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 111-127, 2007.

50 CHARRON, C. S. et al. Correlations of Oil and Protein with Isoflavone Concentration in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7128-7135, 2005.

51 CHIARI, L. et al. Genetic parameters relating isoflavone and protein content in soybean seeds. **Euphytica**, v. 138, p. 55-60, 2004.

52 SEGUIN, P. et al. Isoflavone content of soybean cultivars grown in eastern Canada. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1327-1332, 2004.

53 AL-TAWAHA, A. M.; SEGUIN, P. Seeding date, row spacing, and weed effects on soybean isoflavone concentrations and other seed characteristics. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 1079-1082, 2006.

54 PRIMOMO, V. S. et al. Agronomic Performance of Recombinant Inbred Line Populations Segregating for Isoflavone Content in Soybean Seeds. **Crop Science**, v. 45, n. 6, p. 2203-2212.

55 DAGUER, H. et al. Detecção de soja pelo teor de isoflavonas em lombo injetado de suíno. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 990-993, 2010.

56 HO, M. H. K.; WONG, W. H. S.; CHANG, C. Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 46, p. 225-240, 2014.

57 BRASIL. **Perguntas e Respostas - Rotulagem de alimentos alergênicos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, p. 40. 2017.

58 HUSSAIN, Z. Soy Allergy. **Scholarly Journal of Food and Nutrition**, v. 1, n. 4, 2018.

59 ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 26 de 3 de julho de 2015. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**.

60 PEARSON, A. M. **Processed Meats**. 3ª ed. ed. Dordrecht: Springer-Science, 1996.

61 SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades - degradações - modificações**. 1ªed. ed. São Paulo: Varela, 1996.

62 VIEIRA, T. M. F. D. S. **Estrutura, funcionalidade e aplicações de proteínas de soja**. XII Congresso Latinoamericano de Óleos e Gorduras. Florianópolis: [s.n.]. 2007.

63 XIN, H.; STONE, R. Tainted milk scandal. Chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine. **Science**, v. 322, n. 5906, p. 1310-1311, 2008.

64 METHOD, A. O. 988.10 Soy protein in raw and heat processed meat products, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Official Methods of Analysis**, Gaithersburg, 1998.

65 CASTRO-RUBIO, F. et al. Simple and Inexpensive Method for the Reliable Determination of Additions of Soybean Proteins in Heat-Processed Meat Products: An Alternative to the AOAC Official Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 220-226, 2005.

66 SPYCHAJ, A. et al. Detection of allergenic additives in processed meat products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 98, p. 4807-4815, 2018.

67 HEICK, J.; FISCHER, M.; PÖPPING, B. First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 938-943, 2011.

68 CELLERINO, K. et al. Development of a Competitive Enzyme Immunoassay Technique for the Detection of Soy Traces in Meat Products. **Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 2, p. 57-62, 2017.

69 WOOLFE, M.; PRIMROSE, S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 222-226, 2004.

70 DI PINTO, A. et al. Occurrence of mislabeling in meat products using DNA-based assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2479-2484, 2015.

71 MURRAY, S. R. et al. Use of Quantitative Real-Time PCR To Estimate Maize Endogenous DNA Degradation after Cooking and Extrusion or in Food Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2231-2239, 2007.

72 VAN HENGEL, A. J. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 111-118, 2007.

73 DELLA TORRE, J. C. D. M. Proteínas de soja e colágeno: validação das metodologias de quantificação e avaliação tecnológica do uso em produtos cárneos. **Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos**, Campinas, v. Tese (doutorado), p. 277p, 2004.

74 DUCATTI, R. Análises microbiológicas e quantificação de proteína de soja pela metodologia isotópica (^{13}C e ^{15}N) em hambúrgueres bovinos de marcas comerciais brasileiras: qualidade higiênico-sanitária e adulteração em hambúrgueres. **Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. Dissertação (mestrado), p. 103p, 2014.

75 FORCHETTI, D. D. A. P. Avaliação de adulteração em alimentos por espectroscopia de imagem na região do infravermelho próximo e tratamentos quimiométricos. **Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.**, Campinas, v. Tese (doutorado), p. 105p, 2017.

76 MARTINS, O. J. S. Aplicação de espectroscopia no infravermelho médio para detecção de adulteração em produto à base de frango. **Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.**, Belo Horizonte, v. Dissertação (mestrado), p. 151p, 2015.

77 METHOD, A. O. 2017.11 Identification of Pea, Rice, and Soy Proteins in Raw Materials and Finished Goods. **Official Methods of Analysis**, 2018.

78 LI, Y. et al. Simultaneous determination of heat stable peptides for eight animal and plant species in meat products using UPLC-MS/MS method. **Food Chemistry**, v. 245, p. 125-131, 2018.

79 MACEDO-SILVA, A. et al. Textured Soy Protein Quantification in Commercial Hamburger. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 469-478, 2001.

80 LI, L. et al. Proteome profiles of digested products of commercial meat sources. **Frontiers in Nutrition**, v. 4, p. 1-8, 2017.

81 SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; HOLLER, F. J. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, v. p.841, 2009.

82 KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p. 1357-1367, 2005.

83 BARTON, C. et al. Development of High-Throughput Chemical Extraction Techniques and Quantitative HPLC-MS/MS (SRM) Assays for Clinically Relevant Plasma Proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 333-340, 2010.

84 HONDA, A. et al. Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC–ESI–MS/MS. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, p. 556-564, 2010.

85 AVAR, P. et al. HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. **Drug Test. Analysis**, v. 8, p. 123-127, 2016.

86 DEBAYLE, D.; DESSALCES, G.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 1011-1020, 2008.

87 PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. V. Multi-residue analytical methods for the determination of pesticides and PPCPs in water by LC-MS/MS: a review. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 876-899, 2012.

88 MENG, J.-F. et al. Melatonin in grapes and grape-related foodstuffs: A review. **Food Chemistry**, v. 231, 2017.

89 ZHANG, J. et al. Determination of bovine lactoferrin in dairy products by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry based on tryptic signature peptides employing an isotope-labeled winged peptide as internal standard. **Analytica Chimica Acta**, v. 829, p. 33-39, 2014.

90 TEKKELI, S. E. K.; ÖNAL, C.; ÖNAL, A. A Review of Current Methods for the Determination of Acrylamide in Food Products. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 29-39, 2012.

91 LANGE, F. T.; SCHEURER, M.; BRAUCH, H.-J. Artificial sweeteners—a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 2503-2518, 2012.

92 HICKERT, S. et al. A new approach using micro HPLC-MS/MS for multi-mycotoxin analysis in maize samples. **Mycotoxin Research**, n. 31, p. 109-115, 2015.

93 QI, P. et al. Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 101-110, n. 181, 2015.

94 ZHANG, Y. et al. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2343-2394, 2013.

95 EMIDIO, N. B. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3-4, p. 101-111, 2015.

96 MONACI, L. et al. Comprehensive overview and recent advances in proteomics MS based methods for food allergens analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 106, p. 21-36, 2018.

97 ZHENG, Y. Z.; DEMARCO, M. L. Manipulating trypsin digestion conditions to accelerate proteoly simplify digestion workflows in development of protein mass

spectrometric assays for the clinical laboratory. **Clinical Mass Spectrometry**, v. 6, p. 1-12, 2017.

98 BOTELHO, D. et al. Top-Down and Bottom-Up Proteomics of SDS-Containing Solutions Following Mass-Based Separation. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2863-2870, 2010.

99 CHEN, E. I. et al. Optimization of Mass Spectrometry-Compatible Surfactants for Shotgun Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 2529-2538, 2007.

100 NORRGRAN, J. et al. Optimization of digestion parameters for protein quantification. **Analytical Biochemistry**, v. 393, p. 48-55, 2009.

101 HILDONEN, S.; HALVORSEN, T. G.; REUBSAET, L. Why less is more when generating tryptic peptides in bottom-up proteomics. **Proteomics**, v. 14, p. 2031-2041, 2014.

102 WU, S. et al. Urea free and more efficient sample preparation method for mass spectrometry based protein identification via combining the formic acid-assisted chemical cleavage and trypsin digestion. **Talanta**, v. 86, p. 429-435, 2011.

103 EGELAND, S. V.; REUBSAET, L.; HALVORSEN, T. G. The pros and cons of increased trypsin-to-protein ratio in protein analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 123, p. 155-161, 2016.

104 FANG, P. et al. Controlling nonspecific trypsin cleavages in LC-MS/MS-based shotgun proteomics using optimized experimental conditions. **Analyst**, v. 140, p. 7613–7621, 2015.

105 TOLIN, S. et al. Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens. **Food Control**, v. 28, p. 321-326, 2012.

106 PLANQUE, M. et al. Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several foodallergens in complex and processed foodstuffs. **Journal of Chromatography A**, v. 1464, p. 115-123, 2016.

107 MONTOWSKA, M.; FORNAL, E. Absolute quantification of targeted meat and allergenic protein additive peptide markers in meat products. **Food Chemistry**, v. 274, p. 857-864, 2019.

108 MONACI, L. et al. Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. **Food Chemistry**, v. 127, p. 669-75, 2011.

109 HUANG, L. et al. Changes in the structure and dissociation of soybean protein isolate induced by ultrasound-assisted acid pretreatment. **Food Chemistry**, v. 232, p. 727-732, 2017.

110 PILOLLI, R.; DE ANGELIS, E.; MONACI, L. Streamlining the analytical workflow for multiplex MS/MS allergen detection in processed foods. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1747-1753, 2017.

111 GOMAA, A.; BOYE, J. I. Impact of thermal processing time and cookie size on the detection of casein, egg, gluten and soy allergens in food. **Food Research International**, v. 52, p. 483-489, 2013.

112 BRUN, V. et al. Isotope-labeled Protein Standards. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, p. 2139-2149, 2007.

113 PLANQUE, M. et al. Highlight on Bottlenecks in Food Allergen Analysis: Detection and Quantification by Mass Spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 4, p. 1126-1130, 2017.

114 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Requisitos gerais para a competência de laboratórios, ABNT NBR ISO/17025**. ABNT. [S.I.], p. 12. 2017.

115 INSITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008-Rev.09**. [S.I.]. 2020.

116 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2015. 21-36 p.

117 ALBANO, F. D. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais**. 1. ed. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009.

118 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa Nº 4 de 31 de março de 2000, Anexo III**. Secretaria de Defesa Agropecuária. [S.I.]. 2000.

119 CASTRO, F.; GARCIA, M. C.; RODRIGUEZ, R. Determination of soybean proeins in commercial heat-processed meat products prepared with chicken, beef or complex mixtures of meats from different species. **Food Chemistry**, v. 100, p. 468-476, 2007.

120 CRIADO, M.; CASTRO-RUBIO, F.; GARCÍA-RUIZ, C. Detection and quantitation of additions of soybean proteins in cured-meat products by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 987-995, 2005.

121 JANK, L. Avaliação da incidência de antimicrobianos em produtos de origem animal. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Química**, Porto Alegre, p. 157, 2017.

122 THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Comission Decision 675**. Brussels. 2002.

123 PAEZ, V. et al. Standard Method Performance Requirements for Detection and Quantitation of Selected Food Allergens. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 4, p. 1122-1124, 2016.

124 PILOLLI, R.; DE ANGELIS, E.; LINDA, M. In house validation of a high resolution mass spectrometry Orbitrap-based method for multiple allergen detection in a processed model food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 5653-5662, 2018.

125 PLANQUE, M. et al. Development of a strategy for the quantification of food allergens in several food products by mass spectrometry in a routine laboratory. **Food Chemistry**, v. 274, p. 35-45, 2019.

126 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1681>>. Acesso em: 24 de Fevereiro de 2020.

127 THEODOR H.E. Svedberg. **Britannica**. Disponível em: <<https://www.britannica.com/biography/Theodor-Svedberg>>. Acesso em: 06 fevereiro 2021.

Anexo I – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade

REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LINGUIÇA (120)

1. Alcance

1.1. Objetivo: Fixar a identidade e as características mínimas de qualidade que deverá apresentar o produto cárneo denominado Linguiça.

1.2. Âmbito de Aplicação: O presente regulamento refere-se ao produto Linguiça, destinado ao comércio nacional e/ou internacional.

2. Descrição

2.1. Definição: Entende-se por Linguiça o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado.

2.2. Classificação: Variável de acordo com a tecnologia de fabricação.

Trata-se de um:

produto fresco

produto seco, curado e/ou maturado

produto cozido

outros.

De acordo com a composição da matéria-prima e das técnicas de fabricação:

Linguíça Calabresa: É o produto obtido exclusivamente de carnes suína, curado, adicionado de ingredientes, devendo ter o sabor picante característico da pimenta calabresa submetidas ou não ao processo de estufagem ou similar para desidratação e ou cozimento, sendo o processo de defumação opcional.

Linguíça Portuguesa: É o produto obtido exclusivamente de carnes suína, curado, adicionado de ingredientes, submetido a ação do calor com defumação.

Nota: A forma de apresentação consagrada do produto é a de uma "ferradura", e com sabor acentuado de alho.

Linguíça Toscana: É o produto cru e curado obtido exclusivamente de carnes suína, adicionada de gordura suína e ingredientes.

Paio: É o produto obtido de carnes suína e bovina (máximo de 20%) embutida em tripas natural ou artificial comestível, curado e adicionado de ingredientes, submetida a ação do calor com defumação.

Nas linguiças denominadas Tipo Calabresa, Tipo Portuguesa e Paio, que são submetidas ao processo de cozimento, será permitido a utilização de até 20% de CMS – Carne Mecanicamente Separada, desde que seja declarado no rótulo de forma clara ao consumidor a expressão "carne mecanicamente separada de" (espécie animal), além da obrigatoriedade de constar na relação de ingredientes a expressão "contém..." ou "com CMS (espécie animal)".

Nota: a CMS utilizada poderá ser substituída pôr carne de diferentes espécies de animais de açougue, até o limite máximo de 20 %.

2.3. Designação (Denominação de Venda): O produto será designado de Linguiça, seguido de denominação ou expressões que o caracterizem, de acordo com a sua apresentação para venda, tais como:

Linguiça de Carne Bovina

Linguiça de Carne Suína

Linguiça de Lombo Suíno

Linguiça de Lombo e Pernil Suíno

Linguiça de Carne Suína Defumada

Linguiça Calabresa

Linguiça Portuguesa

Linguiça Toscana

Linguiça de Carne de Peru

Linguiça de Carne de Frango

Linguiça Mista

Linguiça Tipo Calabresa

Linguiça Tipo Portuguesa

Linguiça Cozida de ...

Paio

Outros

3. Referências

- Código de Defesa do Consumidor. Lei nº 8.078 de 11 de Setembro de 1990, Brasil.

- Code of Federal Regulations, Animal and Animal Products, USA, 1982.
- Codex Alimentarius - Volume 10 - Programa conjunto FAO/ OMS sobre Normas Alimentarias, Comisión del Codex Alimentarius, Roma, 1994.
- ICMSF- Microorganismus in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. University of Toronto. Press, 1974.
- Decreto nº 63.526 de 04 de Novembro de 1968, Ministério da Agricultura, Brasil.
- European Parliament and Council Directive nº 95/2/EC of 20 February 1995. Official Journal of the European Communities No L61/1, 18/03/95.
- Portaria INMETRO nº 88 de 24 de Maio de 1996, Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo, Brasil.
- Padrões Microbiológicos. Portaria nº 451 de 19/09/97 – Publicada no DOU de 02/07/98, Ministério da Saúde - Brasil.
- Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Portaria nº 110 de 26 de Agosto de 1996, Ministério da Agricultura, Brasil.
- Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA - Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.
- Resolução 91/94- Mercosul, Portaria 74 de 25/05/95, Ministério da Ind., Com. e Turismo, Brasil.
- Resolução GMC 36/93- Mercosul, 1993.
- Portaria nº 368, de 04/09/97 – Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos - Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasil.
- Portaria nº 371, de 04/09/97 – Regulamento técnico para Rotulagem de Alimentos – Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasil.
- Normas ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) – Plano de Amostragem e Procedimentos na Inspeção por atributos- 03.011- NBR 5426 – Jan/1985
- Portaria n ° 1004 de 11.12.98 – Regulamento Técnico Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximo de uso para a Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos – Ministério da Saúde, Brasil
- Instrução Normativa n. 20 de 21.07.99, publicada no DOU de 09.09.99 – Métodos Analíticos Físico-químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes – Sal e Salmoura – SDA – Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasil.

4. Composição e Requisitos

4.1. Composição

4.1.1. Ingredientes Obrigatórios: Carne das diferentes espécies de animais de açougue e sal.

4.1.2. Ingredientes Opcionais

Gordura

Água

Proteína vegetal e/ou animal

Açúcares

Plasma

Aditivos intencionais

Aromas, especiarias e condimentos.

Nota: Permite-se a adição de proteínas não cárnicas, no teor máximo de 2,5% (dois vírgula cinco por cento), como proteína agregada. Não é permitida a adição de proteínas não cárnicas em linguças toscana, calabresa, portuguesa, blumenau e colonial.

4.2. Requisitos

4.2.1. Características Sensoriais: São definidas de acordo com o processo de obtenção.

4.2.1.1. Textura: Característica

4.2.1.2. Cor: Característica

4.2.1.3. Sabor: Característico

4.2.1.4. Odor: Característico

	FRESCAIS	COZIDAS	DESSECADAS
Umidade (máx)	70%	60%	55%
Gordura (máx)	30%	35%	30%
Proteína (min)	12%	14%	15%
Cálcio (base seca) (máx)	0,1%	0,3%	0,1%

4.2.3. Fatores essenciais de qualidade

4.2.3.1. É proibido o uso de CMS (carne mecanicamente separada) em Linguças Frescais (cruas e dessecadas).

4.2.3.2. O uso de CMS em Linguças Cozidas, fica limitado em 20%.

4.2.4. Acondicionamento

Envoltórios naturais

Envoltórios artificiais

Embalagens plásticas ou similares

Caixas

4.2.4.1 Os envoltórios poderão estar protegidos por substâncias glaceantes, que deverão estar aprovadas junto ao órgão competente.

5. Aditivos e Coadjuvantes de Tecnologia/ Elaboração

De acordo com o regulamento específico vigente.

6. Contaminantes

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores ao limites estabelecido pelo Regulamento Vigente.

7. Higiene

7.1. Considerações Gerais

7.1.1. As práticas de higiene para a elaboração do produto recomenda-se estar de acordo com o estabelecido no: "Código Internacional Recomendado de Práticas de Higiene para os Produtos Cárnicos Elaborados" (Ref. CAC/RCP 13 - 1976 (rev. 1, 1985).

"Código Internacional Recomendado de Práticas de Higiene para a Carne Fresca" (CAC/RCP 11-1976 (rev. 1, 1993).

"Código Internacional Recomendado de Práticas - Princípios Gerais de Higiene dos Alimentos" (Ref.: CAC/RCP 1 - 1969 (rev. 2 - 1985) - Ref. Codex Alimentarius, vol. 10, 1994.

7.1.2. Toda a carne usada na elaboração de Lingüiças, deverá ter sido submetida aos processos de inspeção prescritos no RIISPOA - "Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal" - Decreto nº 30691, de 29/03/1952.

7.1.3. As Lingüiças deverão ser tratadas termicamente em conformidade com as seções 7.5 e 7.6.1. à 7.6.7. do "Código Internacional Recomendado de Práticas de Higiene para Alimentos pouco ácidos e Alimentos acidificados envasados".

7.1.4. Após ter sido inspecionado a carne para Lingüiças, não deverá ficar exposta à contaminação ou adicionada de qualquer substância nociva para o consumo humano.

7.1.5. As carnes para produção de Lingüiças e as Lingüiças já elaboradas, deverão ser manipuladas, armazenadas e transportadas em locais próprios de forma que as Lingüiças estejam protegidas da contaminação e deteriorização.

7.1.6. As Lingüiças curadas e dessecadas, defumadas ou não, poderão apresentar em sua superfície externa "mofos", que deverão ser de gênero não nocivos a saúde humana.

7.2. Critérios Macroscópicos/ Microscópicos: O produto não deverá conter substâncias estranhas de qualquer natureza.

7.3. Critérios Microbiológicos: O produto deve obedecer à legislação específica em vigor.

8. Pesos e Medidas

Aplica-se o Regulamento vigente

9. Rotulagem

Aplica-se o Regulamento vigente (Portaria nº 371, de 04/09/97 – Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos – Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasil).

9.1. Será designado de Lingüiça, seguida da expressão que lhe for atribuída, de acordo com a matéria-prima utilizada, processo tecnológico ou região de origem.

10. Métodos de Análises Físico-Químicos

- Instrução Normativa n. 20 de 21.07.99, publicada no DOU de 09.09.99 – Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes – Sal e Salmoura – SDA – Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasil.

11. Amostragem

Seguem-se os procedimentos recomendados pela norma vigente (ABNT).

Anexo II – Dados da validação de metodologia qualitativa

Tabela 14. Resultados das 20 amostras fortificadas e 20 amostras brancas da validação do método qualitativo.

AMOSTRAS FORTIFICADAS			AMOSTRAS BRANCAS			
Identificação	Peptídeos	Isoflavonas	Identificação	Produto	Peptídeos	Isoflavonas
1	Detectado	Detectado	A	Sobrecoxas de frango temperadas	N.D. ^a	N.D. ^a
2	Detectado	Detectado	B	<i>Dried cooked beef</i>	N.D.	N.D.
3	Detectado	Detectado	C	Bacon	N.D.	N.D.
4	Detectado	Detectado	D	Salame italiano	N.D.	N.D.
5	Detectado	Detectado	E	Salame milano light	N.D.	N.D.
6	Detectado	Detectado	F	<i>Dried cooked beef</i>	N.D.	Detectado
7	Detectado	Detectado	G	Copa	N.D.	N.D.
8	Detectado	Detectado	H	Lombo suíno	N.D.	N.D.
9	Detectado	Detectado	I	Carne moída de frango	N.D.	N.D.
10	Detectado	Detectado	J	Salame milano	N.D.	N.D.
11	Detectado	Detectado	K	Bacon	N.D.	N.D.
12	Detectado	Detectado	L	Copa	N.D.	N.D.
13	Detectado	Detectado	M	Embutido de carne suína (queijo de porco)	N.D.	Detectado
14	Detectado	Detectado	N	Salame italiano	N.D.	N.D.
15	Detectado	Detectado	O	Salame italiano	N.D.	Detectado
16	Detectado	Detectado	P	Linguiça dessecada	N.D.	N.D.
17	Detectado	Detectado	Q	Papada de suíno defumada	N.D.	N.D.
18	Detectado	Detectado	R	Linguiça frescal	N.D.	N.D.
19	Detectado	Detectado	S	Carne temperada congelada de frango	N.D.	N.D.
20	Detectado	Detectado	T	Linguiça frescal	N.D.	N.D.

^a Não detectado.

Anexo III – Dados da quantificação por adição de padrão em salsichas e mortadelas

Tabela 15. Dados da adição de padrão na amostra de mortadela sem toucinho.

Mortadela sem toucinho												
Amostra	m _{MTD} (g)	m _{PIS} (g)	Conc. Real (%)	Área FYL Quantificador (m/z = 793,9/283,1)			Área média	Área FYL Qualificador (m/z = 793,9/424,2)			Área média	Razão qualificador / quantificador
				Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3		Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3		
MTD 1	2,0047	-	-	45490	-	-	-	16840	-	-	-	0,37
MTD 2	2,0044	-	-	23140	-	-	-	8408	-	-	-	0,36
MTD 3	2,0040	-	-	27560	-	-	26195	9490	-	-	9002,25	0,34
MTD 4	2,0043	-	-	24610	-	-	-	8031	-	-	-	0,33
MTD 5	2,0042	-	-	29470	-	-	-	10080	-	-	-	0,34
Desvio padrão				8976								
G				1,720	(> G crítico tabelado 1,715)							
MTD 0.5%	2,0028	0,0114	0,52	35340	36040	36530	35970	11230	13000	11630	11953	0,33
MTD 1%	2,0037	0,0212	0,97	57450	60190	60460	59367	19660	18700	20240	19533	0,33
MTD 1.5%	2,0028	0,0324	1,47	86140	86420	88590	87050	29210	28550	30340	29367	0,34

* Valor suspeito em vermelho descartado pelo teste de Grubbs

X	Y	Coef. Angular (a)	40419
0	26195	Coef. Linear (b)	24664
0,97	59367	Pearson (r)	0,9915
1,47	87050	r ²	0,9831

* Ponto 0,5% excluído da curva para melhor ajuste linear

Teste de Grubbs para outliers

$$G = \frac{|\text{valor suspeito} - \bar{x}|}{s}$$

Valores Críticos de G (P=0,05)

Número de Medidas	Valores Críticos
5	1,715
6	1,887
7	2,020

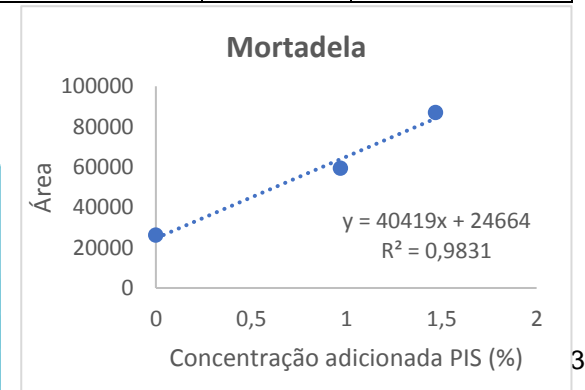


Tabela 16. Dados da adição de padrão na amostra de mortadela Bologna.

Mortadela Bologna												
Amostra	m _{MTD} (g)	m _{PIS} (g)	Conc. Real (%)	Área FYL Quantificador (m/z = 793,9/283,1)			Área média	Área FYL Qualificador (m/z = 793,9/424,2)			Área média	Razão qualificador / quantificador
				Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3		Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3		
MTD BOL 1	2,0003	-	-	42570	-	-	42588	14350	-	-	15434	0,34
MTD BOL 2	2,0019	-	-	34880	-	-		13380	-	-		0,38
MTD BOL 3	2,0022	-	-	43490	-	-		14710	-	-		0,34
MTD BOL 4	2,0015	-	-	46260	-	-		18250	-	-		0,39
MTD BOL 5	2,0011	-	-	45740	-	-		16480	-	-		0,36
			Desvio padrão	4573								
			G	1,686	(< G crítico tabelado 1,715)							
MTD BOL 0.5%	2,0023	0,0109	0,50	65880	66170	67550	66533	23720	23640	22430	23263	0,35
MTD BOL 1%	2,0021	0,0214	0,98	104500	104900	105200	104867	35980	36260	34890	35710	0,34
MTD BOL 1.5%	2,0027	0,0339	1,53	140600	136500	132700	136600	43850	47460	47130	46147	0,34

* Valor suspeito em verde aceito pelo teste de Grubbs

X	Y	Coef. Angular (a)	63141
0	42588	Coef. Linear (b)	40133
0,50	66533	Pearson (r)	0,9960
0,98	104867	r²	0,9921
1,53	136600		

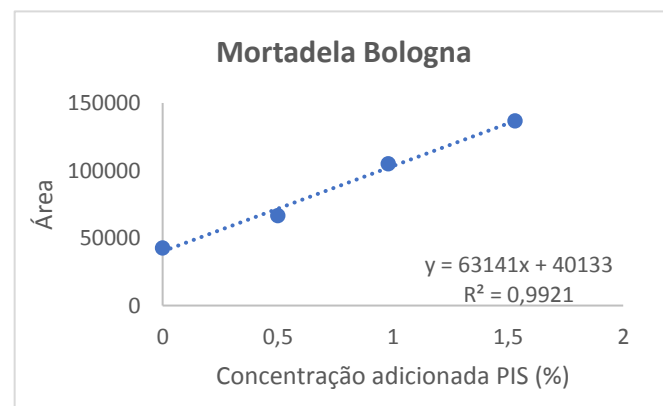


Tabela 17. Dados da adição de padrão na amostra de salsicha *Hot Dog*.

Salsicha <i>Hot Dog</i>												
Amostra	m _{MTD} (g)	m _{PIS} (g)	Conc. Real (%)	Área FYL Quantificador (m/z = 793,9/283,1)			Área média	Área FYL Qualificador (m/z = 793,9/424,2)			Área média	Razão qualificador / quantificador
				Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3		Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3		
SSC 1	2,0013	-	-	28810	-	-	26954	10020	-	-	9115	0,35
SSC 2	2,0014	-	-	26190	-	-		8769	-	-		0,33
SSC 3	2,0005	-	-	22990	-	-		8999	-	-		0,39
SSC 4	2,0015	-	-	28460	-	-		9304	-	-		0,33
SSC 5	2,0023	-	-	28320	-	-		8485	-	-		0,30
Desvio padrão				2443								
G				1,623	(< G crítico tabelado 1,715)							
SSC 0,5%	2,0014	0,0118	0,54	44740	44450	43270	44153	14210	14690	14900	14600	0,33
SSC 1%	2,0007	0,0217	0,99	61380	63100	61860	62113	21620	21890	22900	22137	0,36
SSC 1,5%	2,0016	0,0340	1,54	113600	109000	114200	112267	39020	36420	40140	38527	0,34

* Valor suspeito em verde aceito pelo teste de Grubbs

X	Y	Coef. angular (a)	35393
0	26954	Coef. Linear (b)	26356
0,54	44153	Pearson (r)	0,9979
0,99	62113	r²	0,9958

* Ponto 1,5% excluído da curva para melhor ajuste linear

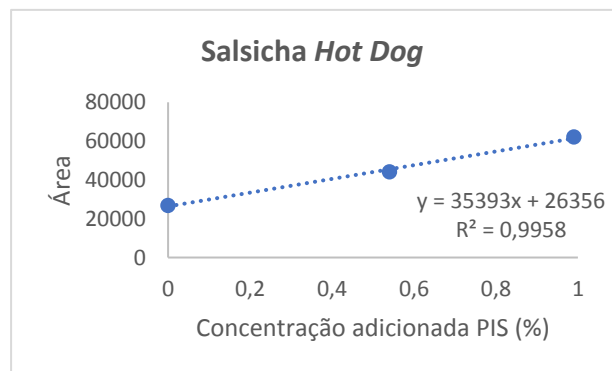
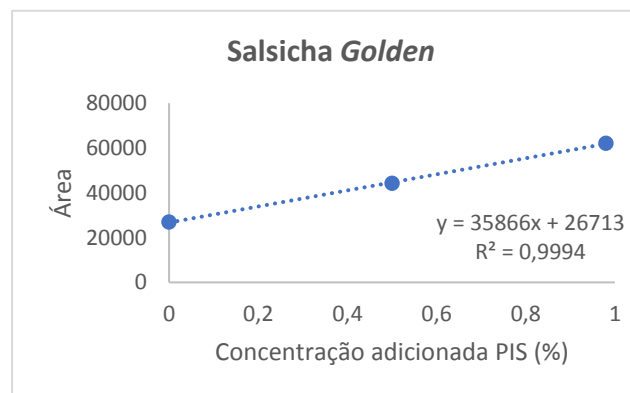


Tabela 18. Dados da adição de padrão na amostra de salsicha *Golden*.

Salsicha <i>Golden</i>												
Amostra	m _{MTD} (g)	m _{PIS} (g)	Conc. Real (%)	Área FYL Quantificador (m/z = 793,9/283,1)			Área média	Área FYL Qualificador (m/z = 793,9/424,2)			Área média	Razão qualificador / quantificador
				Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3		Inj. 1	Inj. 2	Inj. 3		
SSC GOL 1	2,0002	-	-	35060	-	-	24342	11540	-	-	8431	0,33
SSC GOL 2	2,0002	-	-	21640	-	-		7832	-	-		0,36
SSC GOL 3	2,0002	-	-	24450	-	-		8102	-	-		0,33
SSC GOL 4	2,0014	-	-	21890	-	-		7978	-	-		0,36
SSC GOL 5	2,0000	-	-	18670	-	-		6701	-	-		0,36
			Desvio padrão	6332								
			G	1,693	(< G crítico tabelado 1,715)							
SSC GOL 0,5%	2,0001	0,0112	0,51	43650	43920	42210	43260	13420	13860	13920	13733	0,32
SSC GOL 1%	2,0004	0,0215	0,98	57650	59020	58340	58337	18810	20810	19200	19607	0,34
SSC GOL 1,5%	2,0019	0,0334	1,51	95700	95070	97360	96043	30780	31140	31240	31053	0,32

* Valor suspeito em verde aceito pelo teste de Grubbs

X	Y	Coef. Angular (a)	35866
0	26954	Coef. Linear (b)	26713
0,50	44153	Pearson (r)	0,9997
0,98	62113	r²	0,9994



Anexo IV - Dados da validação de metodologia quantitativa por calibração externa

Resumo

Nível de Fortificação 0,5xLMP 1,35 (g/100g)

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Replicata 1	1,19	1,03	1,15
Replicata 2	1,20	0,92	1,01
Replicata 3	1,24	0,99	1,04
Replicata 4	1,17	0,99	1,17
Replicata 5	1,06	1,15	1,13
Replicata 6	0,98	1,07	1,03
Média	1,14	1,03	1,09
D.P. (%)	0,10	0,08	0,07
C.V. (%)	8,66	7,66	6,32
Recuperação %	84,3	76,0	80,6

Média Total (%)	1,08
Desvio Padrão Total	0,09
C.V. Total (%)	8,40
Recuperação Total%	80,3

Outliers - Grubbs p/ Repe (6 valores)		
Valor crítico (P = 95%) 1,887		
Dia 1	Dia 2	Dia 3
0,485	0,072	0,854
0,608	1,370	1,154
1,022	0,417	0,684
0,294	0,409	1,167
0,779	1,572	0,648
1,630	0,553	0,831

Outliers - Grubbs p/ Repro (18 valores)		
Valor crítico (P = 95%) 2,681		
Dia 1	Dia 2	Dia 3
1,120	0,577	0,688
1,253	1,820	0,827
1,700	0,998	0,472
0,913	0,991	0,925
0,248	0,717	0,533
1,169	0,162	0,583

Nível de Fortificação LMP 2,64 (g/100g)

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Replicata 1	2,31	2,24	2,33
Replicata 2	2,43	2,24	2,32
Replicata 3	2,29	2,20	2,26
Replicata 4	2,31	2,14	2,26
Replicata 5	2,56	2,11	2,16
Replicata 6	2,56	2,20	2,34
Média	2,41	2,19	2,28
D.P. (%)	0,13	0,05	0,07
C.V. (%)	5,20	2,42	2,97
Recuperação %	91,3	82,9	86,3

Média Total (%)	2,29
Desvio Padrão Total	0,12
C.V. Total (%)	5,42
Recuperação Total%	86,8

Outliers - Grubbs p/ Repe (6 valores)		
Valor crítico (P = 95%) 1,887		
Dia 1	Dia 2	Dia 3
0,783	0,940	0,724
0,139	0,940	0,654
0,934	0,253	0,260
0,807	0,838	0,260
1,211	1,549	1,760
1,174	0,253	0,903

Outliers - Grubbs p/ Repro (18 valores)		
Valor crítico (P = 95%) 2,681		
Dia 1	Dia 2	Dia 3
0,152	0,424	0,278
1,082	0,424	0,240
0,000	0,717	0,259
0,128	1,184	0,259
2,165	1,488	1,077
2,128	0,717	0,376

Nível de Fortificação 1,5xLMP 3,90 (g/100g)

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Replicata 1	3,83	3,42	3,92
Replicata 2	3,52	3,50	3,82
Replicata 3	3,91	3,94	3,71
Replicata 4	3,86	4,13	3,93
Replicata 5	3,73	3,69	3,69
Replicata 6	3,36	3,89	3,87
Média	3,70	3,76	3,82
D.P. (%)	0,22	0,28	0,10
C.V. (%)	5,93	7,31	2,66
Recuperação %	94,9	96,5	98,0

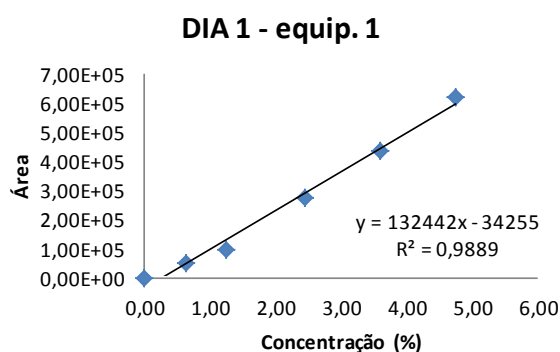
Média Total (%)	3,76
Desvio Padrão Total	0,21
C.V. Total (%)	5,46
Recuperação Total%	96,5

Outliers - Grubbs p/ Repe (6 valores)		
Valor crítico (P = 95%)		
Dia 1	Dia 2	Dia 3
0,585	1,243	0,970
0,832	0,966	0,003
0,970	0,630	1,122
0,736	1,354	1,010
0,113	0,252	1,268
1,572	0,477	0,414

Outliers - Grubbs p/ Repro (18 valores)		
Valor crítico (P = 95%)		
Dia 1	Dia 2	Dia 3
0,325	1,664	0,779
1,190	1,294	0,297
0,737	0,846	0,257
0,487	1,816	0,799
0,179	0,336	0,329
1,981	0,640	0,504

DIA 1 - Equipamento 1

Pico Quantificação					
Amostra	Conc. Padrão adicionada (%)	m/z = 793.9 / 283.1	Áreas médias pico Quantif.	Conc. Calculada (%)	Média Conc. (%)
Padrão 1		0		0,00	
Padrão 1	0,00	0	0,00	0,00	0,00
Padrão 1		0		0,00	
Padrão 2		48260		0,62	
Padrão 2	0,63	50380	49900	0,64	0,64
Padrão 2		51060		0,64	
Padrão 3		95610		0,98	
Padrão 3	1,25	102800	99000	1,03	1,01
Padrão 3		98590		1,00	
Padrão 4		256900		2,20	
Padrão 4	2,46	281700	273833	2,39	2,33
Padrão 4		282900		2,39	
Padrão 5		413300		3,38	
Padrão 5	3,61	436000	434067	3,55	3,54
Padrão 5		452900		3,68	
Padrão 6		650100		5,17	
Padrão 6	4,76	619200	621967	4,93	4,95
Padrão 6		596600		4,76	
Branco	0	0	0	0,26	
1	1,31	122800		1,19	
2	1,35	124400		1,20	
3	1,33	129800		1,24	
4	1,33	120300		1,17	1,14
5	1,36	106300		1,06	
6	1,35	95200		0,98	
8	2,66	271800		2,31	
10	2,66	287100		2,43	
11	2,62	269300		2,29	2,41
12	2,65	271400		2,31	
13	2,65	304900		2,56	
14	2,63	304300		2,56	
15	3,89	472800		3,83	
16	3,90	431600		3,52	
17	3,91	484000		3,91	3,70
18	3,92	477200		3,86	
19	3,88	459100		3,73	
21	3,92	410100		3,36	



Curva de Calibração

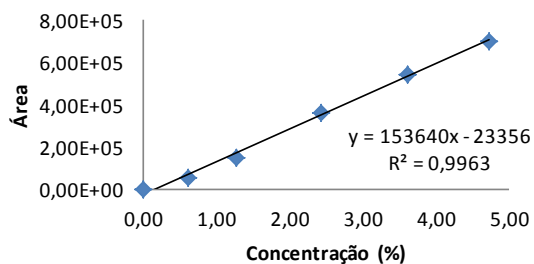
Intercepção (b)	-34255
Inclinação (a)	132442
r	0,9944
r ²	0,9889

	Nível de Fortificação (%)		
	1,35	2,64	3,90
Média	1,14	2,41	3,70
D.P.	0,10	0,13	0,22
C.V. (%)	8,66	5,20	5,93
Recup.(%)	84,30	91,25	94,88
n	6	6	6

DIA 2 - Equipamento 2

Pico Quantificação					
Amostra	Conc. Padrão adicionada (%)	m/z = 793.9 / 283.1	Áreas médias pico Quantif.	Conc. Calculada (%)	Média Conc. (%)
Padrão 1		0		0,00	
Padrão 1	0,00	0	0,00	0,00	0,00
Padrão 1		0		0,00	
Padrão 2		55410		0,51	
Padrão 2	0,61	52140	53267	0,49	0,50
Padrão 2		52250		0,49	
Padrão 3		154900		1,16	
Padrão 3	1,27	151300	149933	1,14	1,13
Padrão 3		143600		1,09	
Padrão 4		377800		2,61	
Padrão 4	2,44	370000	359867	2,56	2,49
Padrão 4		331800		2,31	
Padrão 5		547400		3,71	
Padrão 5	3,62	561800	542767	3,81	3,68
Padrão 5		519100		3,53	
Padrão 6		697500		4,69	
Padrão 6	4,73	774700	698467	5,19	4,70
Padrão 6		623200		4,21	
Branco	0	0	0	0,15	
1	1,35	135100		1,03	
2	1,32	117700		0,92	
3	1,35	129200		0,99	1,03
4	1,34	129300		0,99	
5	1,37	153200		1,15	
6	1,33	140900		1,07	
8	2,67	320700		2,24	
9	2,65	320700		2,24	
10	2,65	315100		2,20	2,19
11	2,67	306200		2,14	
13	2,64	300400		2,11	
14	2,64	315100		2,20	
15	3,92	502100		3,42	
16	3,89	513800		3,50	
18	3,91	581300		3,94	3,76
19	3,94	611900		4,13	
20	3,89	544000		3,69	
21	3,94	574800		3,89	

DIA 2 - Equip. 2



Curva de Calibração

Intercepção	-23356
Inclinação	153640
r	0,9981
r ²	0,9963

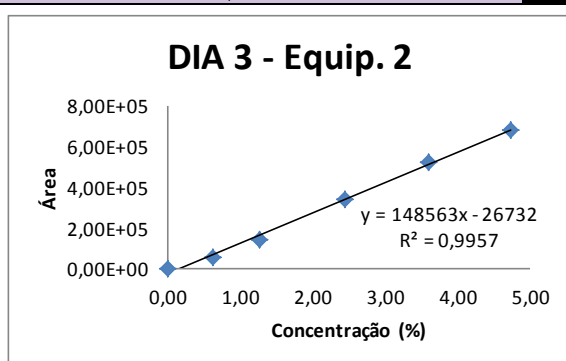
Nível de Fortificação (%)

	1,35	2,64	3,90
Média	1,03	2,19	3,76
Desvio Padrão	0,08	0,05	0,28
C.V. (%)	7,66	2,42	7,31
Recup.(%)	75,98	82,93	96,46
n	6	6	6

DIA 3 - Equipamento 2

Pico Quantificação

Amostra	Conc. Padrão adicionada	793.9 / 283.1	Áreas médias pico Quantif.	Concentração Calculada (%)	Média Conc. (%)
Padrão 1		0		0,00	
Padrão 1	0,00	0	0,00	0,00	0,00
Padrão 1		0		0,00	
Padrão 2		52000		0,53	
Padrão 2	0,62	52360	50543	0,53	0,52
Padrão 2		47270		0,50	
Padrão 3		136100		1,10	
Padrão 3	1,26	140100	137567	1,12	1,11
Padrão 3		136500		1,10	
Padrão 4		335400		2,44	
Padrão 4	2,44	350100	337867	2,54	2,45
Padrão 4		328100		2,39	
Padrão 5		534800		3,78	
Padrão 5	3,60	506300	516800	3,59	3,66
Padrão 5		509300		3,61	
Padrão 6		687700		4,81	
Padrão 6	4,73	635300	676000	4,46	4,73
Padrão 6		705000		4,93	
Branco	0	0	0	0,18	
1	1,35	143600		1,15	
2	1,34	123100		1,01	
3	1,35	127900		1,04	1,09
5	1,36	146800		1,17	
6	1,36	141500		1,13	
7	1,36	126400		1,03	
9	2,63	318900		2,33	
10	2,64	318200		2,32	2,28
11	2,65	309000		2,26	
12	2,65	309000		2,26	
13	2,62	293900		2,16	
14	2,65	320700		2,34	
15	3,91	555900		3,92	
16	3,91	541200		3,82	3,82
18	3,90	524300		3,71	
19	3,90	556500		3,93	
20	3,90	522100		3,69	
21	3,90	547500		3,87	



Curva de Calibração

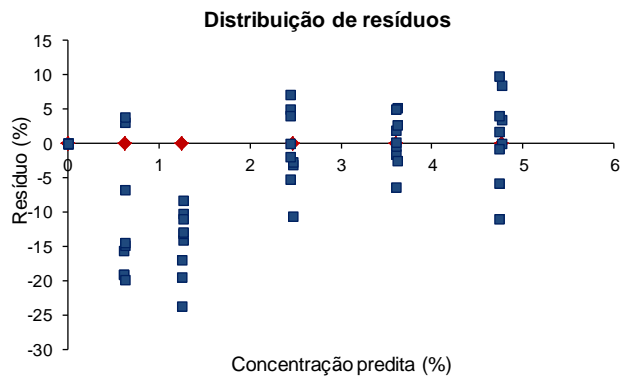
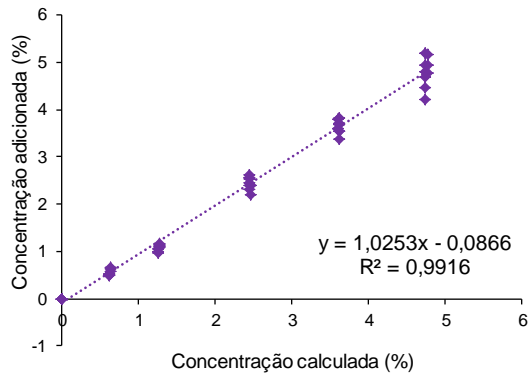
Intercepção	-26732
Inclinação	148563
r	0,9979
r ²	0,9957

Nível de Fortificação (%)

	1,35	2,64	3,90
Média	1,09	2,28	3,82
Desvio Padrão	0,07	0,07	0,10
C.V. (%)	6,32	2,97	2,66
Recup.(%)	80,58	86,27	98,03
n	6	6	0

DISTRIBUIÇÃO DE RESÍDUOS INDIVIDUAIS

Conc. calculada pela regressão linear (%)	Conc. Adicionada (%)	Resíduo (C _{calc} - C _{add})	Resíduo (%)
0	0	0,000	0
0	0	0,000	0
0	0	0,000	0
0,585	0,63	-0,042	-7
0,646	0,63	0,019	3
0,651	0,63	0,025	4
0,957	1,25	-0,297	-24
1,041	1,25	-0,212	-17
1,009	1,25	-0,244	-19
2,202	2,46	-0,261	-11
2,389	2,46	-0,074	-3
2,398	2,46	-0,065	-3
3,381	3,61	-0,228	-6
3,552	3,61	-0,057	-2
3,680	3,61	0,071	2
5,166	4,76	0,401	8
4,933	4,76	0,168	4
4,763	4,76	-0,002	0
0,000	0	0,000	0
0,000	0	0,000	0
0,000	0	0,000	0
0,513	0,61	-0,095	-16
0,491	0,61	-0,116	-19
0,492	0,61	-0,115	-19
1,160	1,27	-0,105	-8
1,137	1,27	-0,128	-10
1,087	1,27	-0,178	-14
2,611	2,44	0,174	7
2,560	2,44	0,123	5
2,312	2,44	-0,125	-5
3,715	3,62	0,096	3
3,809	3,62	0,189	5
3,531	3,62	-0,089	-2
4,692	4,73	-0,035	-1
5,194	4,73	0,467	10
4,208	4,73	-0,519	-11
0,00	0	0,000	0
0,00	0	0,000	0
0,00	0	0,000	0
0,53	0,62	-0,092	-15
0,53	0,62	-0,089	-14
0,50	0,62	-0,124	-20
1,10	1,26	-0,166	-13
1,12	1,26	-0,139	-11
1,10	1,26	-0,164	-13
2,44	2,44	0,002	0
2,54	2,44	0,101	4
2,39	2,44	-0,047	-2
3,78	3,60	0,180	5
3,59	3,60	-0,012	0
3,61	3,60	0,009	0
4,81	4,73	0,080	2
4,46	4,73	-0,273	-6
4,93	4,73	0,196	4



Avaliação de Outliers - Nível 1,25%		
0,957	1,160	1,10
1,041	1,137	1,12
1,009	1,087	1,10
Média	1,079	
Desvio	0,07	

Grubbs crítico para 9 valores = 2,215		
Teste de Grubbs		
1,875	1,253	0,266
0,579	0,893	0,680
1,067	0,122	0,308
Valor aberrante aceito.		