



Tatiane Melina Guerreiro

**“ANÁLISE DE MARCADORES QUÍMICOS DE ADULTERAÇÃO DE VINAGRE
BALSÂMICO POR *SILICA PLATE LASER DESORPTION/IONIZATION MASS
SPECTROMETRY* (SP-LDI-MS)”**

**“ANALYSIS OF ADUTERATION CHEMICAL MARKERS OF BALSAMIC
VINEGARS BY *SILICA PLATE LASER DESORPTION/IONIZATION
MASS SPECTROMETRY* (SP-LDI-MS)”**

Campinas
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Tatiane Melina Guerreiro

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

**“ANÁLISE DE MARCADORES QUÍMICOS DE ADULTERAÇÃO DE VINAGRE
BALSÂMICO POR SILICA PLATE LASER DESORPTION/IONIZATION MASS
SPECTROMETRY (SP-LDI-MS)”**

**“ANALYSIS OF ADUTERATION CHEMICAL MARKERS OF BALSAMIC
VINEGARS BY SILICA PLATE LASER DESORPTION/IONIZATION
MASS SPECTROMETRY (SP-LDI-MS)”**

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

*Dissertation presented to the College of Medical Sciences of the
University of Campinas as part of the requirements for obtaining
the degree of Master in Sciences.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA TATIANE MELINA GUERREIRO, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2015

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

G937a Guerreiro, Tatiane Melina, 1987-
Análise de marcadores químicos de adulteração de
vinagre balsâmico por *silica plate laser mass
spectrometry* (SP-LDI-MS) / Tatiane Melina Guerreiro. --
Campinas, SP : [s.n.], 2015.

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

1. Vinagre balsâmico. 2. Contaminação de
alimentos. 3. Propriedades químicas. I. Catharino,
Rodrigo Ramos, 1977-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of adulteration chemical markers of balsamic vinegars
by silica plate mass spectrometry (SP-LDI-MS)

Palavras-chave em inglês:

Balsamic vinegar

Food contamination

Chemical properties

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Rodrigo Ramos Catharino [Orientador]

Luciana Maria de Hollanda

Izabela Dutra Alvim

Data de defesa: 23-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

TATIANE MELINA GUERREIRO

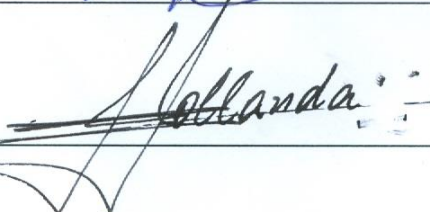
Orientador (a) PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO

MEMBROS:

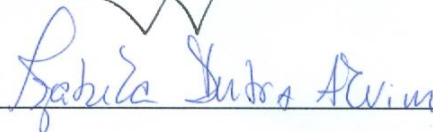
1. PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO



2. PROF(A). DR(A). LUCIANA MARIA DE HOLLANDA



3. PROF(A). DR(A). IZABELA DUTRA ALVIM



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

Data: 23 de fevereiro de 2015

RESUMO

O Vinagre Balsâmico é um produto italiano de grande valor, bastante apreciado em todo o mundo devido ao seu sabor característico e aos seus potenciais benefícios à saúde. Ao longo dos últimos anos, diversos pesquisadores realizaram estudos que avaliaram a sua composição físico-química, microbiana e suas propriedades benéficas. Devido ao alto número de estudos que confirmam o seu caráter antioxidante e suas propriedades anti-hipertensivas e antiglicêmicas, o vinagre balsâmico é um produto alvo de fraudes e adulterações. Desta forma, há uma preocupação acerca dos balsâmicos autênticos, que possuam certificação tanto para sua origem (região ou país), como para suas condições de processamento, garantindo sua qualidade e originalidade. Por isso, o esforço para a redução de fraudes, bem como a garantia da qualidade dos balsâmicos são de grande interesse tanto para saúde do consumidor, quanto do ponto de vista econômico. Buscando encontrar estratégias analíticas confiáveis, capazes de avaliar rapidamente a qualidade do vinagre balsâmico, este trabalho emprega a técnica de Espectrometria de Massas por Ionização/Dessorção a Laser em Placa de Sílica (SP-LDI-MS) para a rápida caracterização química de amostras de vinagres balsâmicos comercial e com indicação geográfica protegida (IGP), e identificação de suas amostras adulteradas com vinagres de baixo custo, provenientes de maçã, álcool e vinhos branco e tinto.

ABSTRACT

The Balsamic Vinegar is a valuable Italian product, very popular worldwide due to its distinctive flavor and potential health benefits. Several studies have been conducted to assess physicochemical and microbial compositions as well as with respect to its beneficial properties. Due to the high number of studies that confirm its antioxidant character and their antihypertensive and antiglycemic properties, balsamic vinegar is a potential target for frauds and adulterations. Thus, there is growing concern about the search for authenticated balsamics, so make sure your origin (region or country) as well as their processing conditions, which guarantee quality and originality of balsamic vinegar. Striving for fraud reduction and ensuring the quality and safety of food through reliable analytical strategies to quickly assess the quality of balsamic vinegar are of great interest to health and the economic point of view. In this context, this work employs the technique of Silica Plate Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SP-LDI-MS) for rapid chemical characterization of samples of commercial balsamic vinegars and with protected geographical indications (PGI) and identification their samples adulterated with inexpensive vinegars from apple, alcohol and red and white wines.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS	15
CAPÍTULO 1 – ANÁLISE DE ALTO RENDIMENTO UTILIZANDO SP-LDI-MS PARA RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM VINAGRES BALSÂMICOS COMERCIAIS	16
<i>Abstract</i>	17
<i>Introduction</i>	18
<i>Materials and Method</i>	20
<i>Results and Discussion</i>	21
<i>Conclusions</i>	29
<i>References</i>	30
CONCLUSÕES GERAIS	33

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, Luis Carlos, Solange e Aline, por todo o amor, apoio e confiança que depositam em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiro aos meus pais, Luis Carlos e Solange, pois sem o esforço de vocês eu não teria chegado até aqui. Por causa de tudo que fizeram que eu me tornei a pessoa que sou hoje. Obrigada por todo apoio e incentivo, por todo amor, carinho, alguns “puxões de orelha” e pela confiança que depositam em mim. Pai e mãe, eu amo muito vocês!

À minha irmã, Aline, por todo o companheirismo, por todas as nossas brigas e conversas. Obrigada por estar sempre ao meu lado! Você é muito importante para mim e saiba que sempre que você precisar eu vou estar aqui!

Ao meu namorado, Fernando, por todo amor, carinho, apoio e confiança. Obrigada por sempre estar ao meu lado.

Aos meus amigos (e amikis!) do Laboratório Innovare: Diogo, Cibele, Mônica, Gustavo, Estela e Maico. Obrigada por toda a ajuda que vocês me deram, por toda paciência, por todas conversas e por todos os bons momentos que passamos juntos!

À todos os meus amigos que sempre torceram por mim! Muito obrigada, vocês são muito especiais!

E por fim, ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino, por todas as nossas conversas e orientações, tanto pessoais quanto profissionais. Obrigada por sempre me ajudar e confiar no meu trabalho. Sou muito grata de ter você como meu professor e por fazer parte do time Innovare! Só alegria!

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema simplificado do processo de obtenção do Vinagre Balsâmico	15
Figura 2	Ionização por MALDI	22
Figura 3	Esquema que ilustra o experimento de MS/MS	23
Figure 4	SP-LDI-MS fingerprints of Balsamic vinegar and vinegar samples. Positive ion mode	37
Figure 5	SP-LDI-MS fingerprints of Balsamic vinegar and vinegar samples. Negative ion mode	38
Figure 6	SP-LDI(-)-MS fingerprints of adulterated balsamic vinegar samples (A10 = balsamic vinegar added 10% of alcohol vinegar; A25 = balsamic vinegar added 25% of alcohol vinegar; A50 balsamic vinegar added 50% of alcohol vinegar)	41
Figure 7	PCA score plots of (A) SP-LDI(-)-MS and (B) SP-LDI(+)-MS metabolic fingerprinting data of vinegar samples	42
Figure 8	PCA score plots of SP-LDI(-)-MS fingerprint of adulterated samples of vinegar	43

LISTA DE TABELAS

Table 1	Identification of the detected compounds in balsamic and non-balsamic vinegars	39
----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESI	Ionização por elétron-spray (<i>Electrospray ionization</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
IV	Infravermelho
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MF	Impressão Digital Metabólica (<i>Metabolic Fingerprinting</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas em modo <i>tandem</i>
MSn	Fragmentação Molecular
PDO	Denominação de Origem Protegida (<i>Protected Designation of Origin</i>)
PGI	Indicação Geográfica Protegida (<i>Protected Geographical Indication</i>)
SP-LDI-MS	Espectrometria de Massas por Ionização/Dessorção a Laser em Placa de Sílica (<i>Silica Plate Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry</i>)
UV	Ultravioleta
VB	Vinagre Balsâmico

INTRODUÇÃO GERAL

Vinagre Balsâmico

O Vinagre Balsâmico (VB) é um produto típico de duas regiões: Modena e Emilia-Romagna (Itália) e tornou-se bastante popular nos últimos anos. Sua obtenção ocorre através do processo de dupla fermentação de diversos tipos de uvas, ao contrário de vinagres comuns que podem ser obtidos de uma variedade de matérias-primas (p. ex.: vinho branco e tinto, de cidra, malte de cevada, mel, álcool, etc.). As suas propriedades químicas e organolépticas são determinadas pelo sistema de acetificação utilizado, a matéria-prima utilizada como substrato, e, em alguns casos, pelo período de tempo que é envelhecido em madeira [1].



Figura 1. Esquema simplificado da obtenção do Vinagre Balsâmico.

O seu aspecto é de um líquido denso, xaroposo e escuro no qual as notas ácidas são bem equilibradas com o fundo doce. Para obtenção do VB é necessário o cozimento do mosto de uvas, sendo esta etapa responsável pelas reações de caramelização e de Maillard, originando compostos que são responsáveis pelo aroma característico do produto [2]. O VB é o resultado de duas

etapas de fermentação que ocorrem após este cozimento: a primeira etapa é fermentação alcoólica que ocorre espontaneamente devido à presença de açúcares no mosto. A segunda etapa é a oxidação do etanol formado, que ocorre através da ação de diferentes microorganismos capazes de oxidar o etanol a ácido acético [3]. Após esta etapa o VB passa pelo período de maturação ou envelhecimento, antes de ser comercializado. O processo resumido de obtenção do VB está representado na Figura 1.

Nas últimas duas décadas, as propriedades físico-químicas [2, 4-12] e microbiológicas [3, 13-16] do VB foram amplamente estudadas. Além disso, este possui diversas propriedades benéficas à saúde, ressaltando-se o seu caráter antioxidante, devido à quantidade de compostos fenólicos e outras substâncias que já foram relatadas em vinagres [17-21]. Além disso, o ácido acético, que está presente em quantidade significativa em vinagres, possui propriedades anti-hipertensivas, provocando a queda da pressão arterial através da redução da atividade da renina, devido ao aumento da absorção de cálcio [22, 23].

Outras propriedades documentadas a respeito dos benefícios dos compostos presentes em vinagres seriam: ação antiglicêmica [24-26], aumento da oxidação de ácidos graxos concomitante com redução do acúmulo de gordura corporal [27], baixa toxicidade de seus compostos (α -dicarbonil) [29] e redução do risco e progressão da arteriosclerose [29].

Qualidade e Adulteração

A autenticação ou certificação de alimentos que comprove sua procedência (p. ex.: país ou região de origem) e suas condições de processamento tornou-se preocupante para os consumidores e os órgãos reguladores mundiais. Com a crescente globalização dos mercados, os alimentos e as bebidas podem se originar das mais variadas localidades do mundo. Logo, a determinação de autenticidade e de adulterações torna-se necessária para satisfazer tanto demandas regulatórias, como as do mercado. Estas práticas limitam as fraudes e confirmam a identidade do produto frente ao consumidor [30].

Atualmente o VB é comercializado sob a marca do Consórcio de Produtores, atestando que o produto foi submetido a controle de qualidade. Por ser uma autoridade regulatória, o Consórcio tem a tarefa de organizar e coordenar a atividade de certificação, garantindo que o consumidor receberá um produto cujos padrões visual, olfativo e gustativo estejam de acordo [32]. Um sistema de score é usado para atribuir ao VB a sua classe comercial adequada. A acidez total e a densidade também são medidas para completar os requisitos legais [33].

Além disso, o VB é reconhecido legalmente com um produto tradicional de regiões específicas da Itália [33,34], sendo assim certificado pela União Européia através de um selo de Denominação de Origem Protegida (PDO – *Protected Designation of Origin*) ou Indicação Geográfica Protegida (PGI - *Protected Geographical Indication*). Este selo comprova a qualidade e autenticidade do VB [2].

Espectrometria de Massas em Alimentos

Atualmente, criou-se a tendência do investimento em pesquisas capazes de realizar análises essenciais para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos. A avaliação e o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para as necessidades de um país produtor como o Brasil precisam de dados confiáveis e assertivos sobre os alimentos comercializados ou potencialmente comercializáveis, tanto no país quanto no exterior.

O desenvolvimento de uma infraestrutura analítica eficiente garante à população alimentos de valor nutritivo agregado, com altos níveis de segurança em relação a contaminantes e, portanto, alimentos de alta qualidade. Além disso, é possível evitar a rejeição de produtos com potencial para exportação, visto que uma infraestrutura analítica eficiente possibilita adequação com os mais altos padrões de qualidade internacionais. Dessa forma, o uso de técnicas instrumentais rápidas, com alta precisão, exatidão, versatilidade e simplicidade operacional torna-se extremamente desejável dentro do escopo de análise de alimentos [35, 36]. Nesse segmento, figuram com grande destaque as técnicas baseadas em espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* – MS). O

desenvolvimento de novas fontes de ionização, as melhorias em analisadores (como o aumento da sensibilidade e especificidade) e a criação de sistemas de aquisição de dados com grande rapidez qualitativa e quantitativa contribuíram em grande escala para a aplicação da MS na análise de moléculas e ativos encontrados em alimentos [37, 38].

Diante deste cenário altamente promissor, a espectrometria de massas tornou-se a principal ferramenta em metabolômica de alimentos. Com início no final dos anos 90, a análise do metaboloma e a impressão digital metabólica (*Metabolic Fingerprinting* – MF) conquistaram grande aplicação em rotinas de análises de alimentos [39, 40]. Rapidez, fácil interpretação de dados e métodos simplificados na elucidação do perfil químico das amostras são características que trouxeram grande interesse na última década, tanto por parte da indústria quanto pela academia, visando incorporar e desenvolver essas metodologias em laboratórios especializados. Além disso, a exigência de estratégias analíticas altamente refinadas para garantir a qualidade de produtos que possuem alto valor nutricional fazem com que a plataforma metabolômica esteja em nível privilegiado, inclusive, nos próximos anos [39, 41].

Metabolômica em Alimentos

A definição mais aceita de Metabolômica é a de que esse ramo da ciência trata da pesquisa e análise qualitativa e/ou quantitativa de todos os metabólitos em um sistema ou processo bioquímico [42]. Esses metabólitos são intrínsecos ao nível de atividade bioquímica (ou fisiopatológica) desse organismo, via metabólica ou processo, facilitando sua correlação com o fenótipo ou resultado desenvolvido. A expansão da utilização de estratégias metabolômicas é salientada em estudos de diferentes áreas do conhecimento, como doenças humanas [43], toxicologia [44], análise de plantas [45], nutrição humana [46] e, mais recentemente, controle de qualidade e processo [47].

Atualmente a metabolômica em alimentos ocupa um lugar de destaque [48]. A preocupação em relação aos alimentos deixou de ser apenas com a prevenção de sua deterioração e extensão de sua vida de prateleira, mas se concentra hoje

nos macronutrientes e micronutrientes que os compõem (água, carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais). Evidências crescentes demonstram que há uma estreita relação entre a dieta e as doenças humanas, o que acarretou em grandes investimentos, tanto governamentais como particulares, em países desenvolvidos e intensas atividades de pesquisa em metabolômica [48, 49]. As propriedades médico-preventivas, além do valor nutricional dos constituintes naturais dos alimentos, de um lado, e os efeitos tóxicos de constituintes e contaminantes do outro, tornaram prioritário o conhecimento da total composição química dos alimentos através do emprego das mais diversas técnicas instrumentais utilizando a ferramenta ômica [49]. Nos países cujo o coeficiente de desenvolvimento é maior, hoje não é mais permitida a comercialização de alimentos sem que a sua composição seja do conhecimento do consumidor. Os benefícios decorrentes da diminuição do sofrimento humano e dos gastos com medicamentos e atendimento hospitalar, aliados à maior produtividade que resulta em uma população mais sadia, retribuem os investimentos nas pesquisas visando proporcionar uma dieta adequada e saudável para a população, esforços que requerem aplicação constante da ferramenta metabolômica em alimentos [48].

De forma geral, a metabolômica é didaticamente dividida em duas estratégias: análise de moléculas-alvo (*“target analysis”*) ou análise de identidade amostral (*“metabolic fingerprinting”*). Como os próprios nomes sugerem, na primeira deseja-se estabelecer o foco em uma via metabólica ou molécula em particular, onde métodos bastante específicos são desenvolvidos para essa finalidade. Sua contrapartida, por sua vez, tem por finalidade estabelecer uma “impressão digital” da amostra, baseando-se em sinais característicos de um grupo particular de moléculas/classes de compostos presentes na mesma, estabelecendo um “padrão químico”, muitas vezes mesmo sem a necessidade de quantificação e/ou elucidação estrutural [50]. Os compostos identificados através destas estratégias metabolômicas podem ser validados e, posteriormente, utilizados como biomarcadores, também chamados de “compostos identificadores”, que conferem à amostra características importantes do ponto de

vista de processamento, controle de qualidade, segurança e autenticidade de alimentos, sempre mediante à sua presença ou ausência [51].

No Brasil existe escassez de dados em pesquisa de metabolômica como ferramenta para o controle e rastreabilidade de alimentos [52]. A população está, portanto, exposta ao consumo de alimentos que não possuem qualidade controlada, tanto relacionado ao valor nutricional, quanto para a presença de contaminantes tóxicos. Desta forma, o uso da análise metabolômica suportada por técnicas instrumentais rápidas com alta precisão, exatidão e versatilidade tornam-se indispensáveis na área de alimentos. As técnicas de MS ocuparam um papel de destaque na última década, por exatamente preencherem tais requisitos [52]. Assim, aliar a metabolômica à técnica de MS torna-se uma tarefa de suma importância tecnológica e econômica para o Brasil.

Técnicas analíticas para determinação de substâncias em alimentos utilizando a Metabolômica

A consolidação da espectrometria de massas como técnica de referência no âmbito de química analítica quali e quantitativa ocorreu nas décadas de 60 e 70. Porém, sua utilização em alimentos foi, por muito tempo, restrita por impedimentos tecnológicos. Estes foram contornados através de melhorias e desenvolvimento de duas técnicas de ionização: a ionização por spray de elétrons (*Electrospray Ionisation* - ESI) [38] e a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization* - MALDI) [37]. Ademais, o desenvolvimento de novos analisadores e as melhorias nas técnicas e controle de reações de fragmentação molecular (MSn) permitiram a aplicação da espectrometria de massas altamente específica na elucidação estrutural de compostos, ampliando ainda mais seu leque na área de alimentos. Assim, segmentos como segurança alimentar e toxicologia de alimentos são desafios auxiliados por meio desse desenvolvimento tecnológico.

MALDI-MS

Esta técnica de ionização preconiza essencialmente a utilização de uma matriz, composta de moléculas orgânicas de caráter ácido e baixo peso molecular, para o recobrimento da amostra. Um feixe de laser (infravermelho – IV ou ultravioleta – UV) incide, ocorrendo o aquecimento localizado e seletivo que fornece a energia pontual necessária para evaporação rápida da matriz e da molécula ionizada. Esta matriz, devido a suas características químicas, auxilia a ionização dos analitos presentes na amostra através da doação ou retirada de íons H^+ , gerando íons positivos do tipo $[M + H]^+$ ou negativos do tipo $[M - H]^-$. As moléculas ionizadas e no estado gasoso são aceleradas pelo potencial aplicado à sonda em direção ao analisador de massas e, posteriormente, detectadas [37, 53].

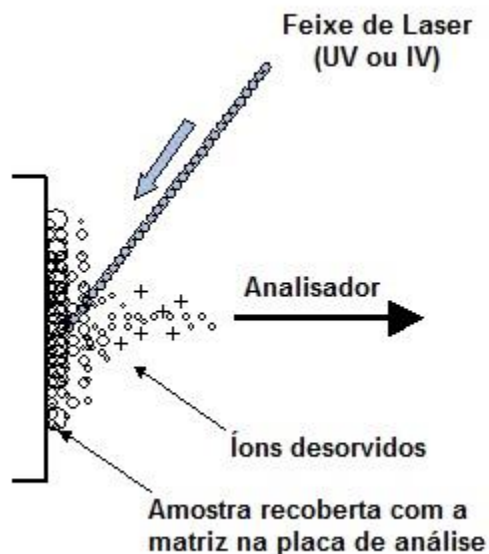


Figura 2. Ionização por MALDI.

Tandem MS (MS/MS)

A técnica de espectrometria de massas em modo tandem, também chamada de MS/MS ou ainda MS2, utiliza dois ou mais analisadores de massas em sequência, logo após a fonte de ionização. Os íons precursores são selecionados primeiro por um analisador de massas e focados na região de colisão, na qual sofrem nova fragmentação, originando produtos iônicos que

serão, então, caracterizados por um segundo analisador de massas [de Hoffmann, 1996]. Abaixo está representado o funcionamento da técnica na Figura 3.

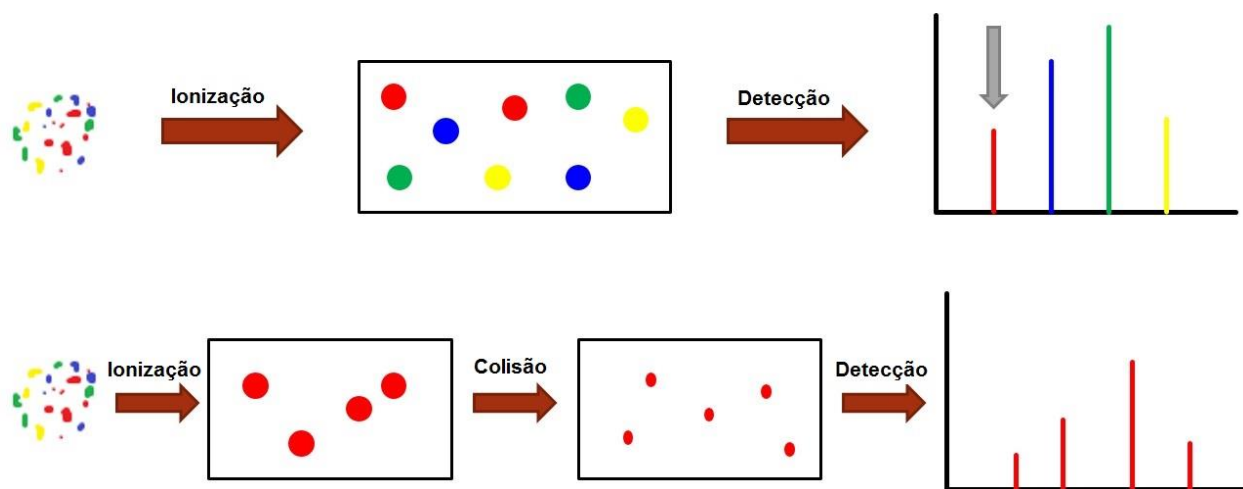


Figura 3. Esquema que ilustra o experimento de MS/MS.

Um dos equipamentos de MS/MS mais comuns é o do tipo triplo quadrupolo, onde as moléculas são selecionadas pelo primeiro analisador de massas (quadrupolo 1, Q1), dissociadas por dissociação induzida por colisão (CID) no quadrupolo 2 (Q2) ou câmara de colisão hexapolar (h), e os fragmentos analisados no quadrupolo 3 (Q3). A Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography* – LC) e a Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography* – GC) são as técnicas de separação comumente acopladas à MS/MS, sendo utilizadas para separar os compostos, ionizá-los e introduzi-los no primeiro analisador de massas [55, 56].

A grande vantagem do uso de MS/MS é o fato de ser uma técnica confirmatória, pois cada pico/sinal pode ser verificado através de seu espectro de massas obtidos nos diferentes modos de operação. Assim, é altamente indicada para a análise e quantificação de moléculas presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, como alimentos [57, 58].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Natera R, Castro R, de Valme García-Moreno M, Hernández MJ, García-Barroso C. Chemometric studies of vinegars from different raw materials and processes of production. *J Agric Food Chem* 2003; 51:3345-3351.
- [2] Chinnici F, Guerrero ED, Sonni F, Nadia N, Marín RN, Riponi C. Gas Chromatography – Mass spectrometry (GC-MS) Characterization of volatile compounds in quality vinegars with protected european geographical indication. *J Agric Food Chem* 2009; 57, 4784-4792.
- [3] Solieri L, Giudici P. Yeasts associated to tradicional balsamic vinegar: Ecological and technological features. *Int J Food Microbiol* 2008; 125, 36-45.
- [4] Corradini F, Marcheselli L, Franchini G, Marchetti A, Preti C, Biancardi C. Analysis of heavy metals in aceto balsamico tradizionale di modena by flame atomic absorption spectroscopy. *Int J AOAC* 1994; 77:714-718.
- [5] Cocchi M, Lambertini P, Manzini D, Marchetti A, Ulrici A. Determination of carboxylic acids in vinegars and in aceto balsamico tradizionale di modena by HPLC and GC methods. *J Agric Food Chem* 2002; 50:5255-5261.
- [6] Chinnici F, Masino F, Antonelli A. Determination of furanic compounds in traditional balsamic vinegars by ion-exclusion liquid chromatography and diode array detection. *J Chromatogr Sci* 2003; 41:305-310.
- [7] Sanarico D, Motta S, Bertolini L, Antonelli A. HPLC determination of organic acids in traditional balsamic vinegar of Reggio Emilia. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2006; 26:2161-2171.
- [8] Cocchi M, Franchini G, Manzini D, Manfredini M, Marchetti A, Ulrici A. A chemometric approach to the comparison of different sample treatments for metals determination by atomic absorption spectroscopy in aceto balsamico tradizionale di modena. *J Agric Food Chem* 2004; 52:4047-4056.
- [9] Cocchi M, Durante C, Grandi M, Lambertini P, Manzini D, Marchetti A. Simultaneous determination of sugars and organic acids in aged vinegars and chemometric data analysis. *Talanta* 2006; 69:1166-1175.

- [10] Plessi M, Bertelli D, Miglietta F. Extraction and identification by GC–MS of phenolic acids in traditional balsamic vinegar from Modena. *J Food Compost Anal* 2006; 19:49-54.
- [11] Falcone PM & Giudicci P. Molecular Size and Molecular Size Distribution Affecting Traditional Balsamic Vinegar Aging. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 7057–7066.
- [12] Massino F, Chinnici F, Bendini A, Montevecchi G, Antonelli A.. A study on relationships among chemical, physical, and qualitative assessment in traditional balsamic vinegar. *Food Chem* 2008; 106, 90-95.
- [13] De Vero L, Gala E, Gullo M, Solieri L, Landi S, Giudici P. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Int J Food Microbiol* 2006; 23:809-813.
- [14] Gullo M, Caggia C, De Vero L, Giudici P. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *Int J Food Microbiol* 2006; 106:209-212.
- [15] Solieri L, Landi S, De Vero L, Giudici P. Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. *J Appl Microbiol* 2006; 101:63-71.
- [16] Gullo M & Giudici P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *Int J Food Microbiol* 125 (2008) 46–53.
- [17] Devalos A, Bartolomé B, Gómez-Córdovez C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chem* 93 (2005) 325–330.
- [18] Verzelloni E, Tagliazucchi D, Conte A. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chem* 105 (2007) 564–571,
- [19] Verzelloni E, Taglia zucchi D, Conte A. From balsamic to healthy: Traditional balsamic vinegar melanoidins inhibit lipid peroxidation during simulated gastric digestion of meat. *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 2097–2102.
- [20] Quingping X, Wenyi T, Zonghua A. Antioxidant activity of vinegar melanoidins. *Food Chem* 2007; 102, 841-849.

- [21] Greco E, Cervelatti R, Litterio ML. Antioxidant capacity and total reducing power of balsamic and traditional balsamic vinegar from Modena and Reggio Emilia by conventional chemical assays. *International Journal Food Science and Technology* (2013) 48, 114–120.
- [22] Kondo S, Tayama K, Tsukamoto Y, Ikeda K, Yamori Y. Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2001, 65 (12) 2690-2694.
- [23] Honsho S, Sigiyama A, Takahara A, Satoh Y, Nakamura Y, Hashimoto K. A Red Wine Vinegar Beverage can Inhibit the Renin-Angiotensin System: Experimental Evidence in Vivo. *Biol Pharm Bull* 28(7) 1208—1210 (2005)
- [24] Johnston CS & Gaas C. Vinegar: Medicinal Uses and Antiglycemic Effect. *MedGenMed*. 2006; 8(2): 61.
- [25] Johnston CS, Steplewska I, Long CA, Harris LN, Rayls RH. Examination of the Antiglycemic Properties of Vinegar in Healthy Adults. *Ann Nutr Metab* (2010) 56:74–79
- [26] Salbe AD, Johnston CS, Buyukbese A, Tsitouras PD, Harman M. Vinegar lacks antiglycemic action on enteral carbohydrate absorption in human subjects. *Nutrition Research* 29 (2009) 846–849
- [27] Kondo T, Kishi M, Fushimi T, Kaga T. Acetic Acid Upregulates the Expression of Genes for Fatty Acid Oxidation Enzymes in Liver To Suppress Body Fat Accumulation. *J Agric Food Chem* 2009, 57, 5982–5986
- [28] Daglia M, Amoroso A, Rossi D, Mascherpa D, Maga G. Identification and quantification of α -dicarbonyl compounds in balsamic and traditional balsamic vinegars and their cytotoxicity against human cells. *Journal of Food Composition and Analysis* 31 (2013) 67–74.
- [29] Iizuka M, Tani M, Kishimoto Y, Saita E, Toyozaki M, Kondo K. Inhibitory effects of balsamic vinegar on LDL oxidation and lipid accumulation in THP-1 macrophages. *J Nutr Sci Vitaminol* 56 (2010) 421-427.
- [30] Takeoka GR, Ebeler SE. Progress in Authentication of Food and Wine. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2011. (Publication Date (Web): November 17, 2011 | doi:10.1021/bk-2011-1081.ch001)

- [31] Mattia G. Balsamic vinegar of Modena: From product to market value: competitive strategy of a typical Italian product. *J Br Food* 2004; 106:722-745
- [32] Giacomini C. La disciplina delle denominazioni tutelate: i Regolamenti CEE 2081/92 e 2082/92 come parte integrante della politica comunitaria della qualità. Rapporto 1997 sull Agricoltura, 1998.
- [33] Law 93/1986. *Gaz. Uff. Rep. Ital.* 82, April 9, 1986.
- [34] European Council Regulation (EC), No. 813 (17 April 2000)
- [35] Gupta K., Jain V., Jain S., Dhawan K. and Talwar G. (2003) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, ed. C. Editor-in-Chief: Benjamin, Academic Press, Oxford, 2003, p. 206-215.
- [36] Ramos L. (2012) Chapter 1 - Basics and Advances in Sampling and Sample Preparation, in *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. Academic Press: Boston. p. 3-24.
- [37] Karas M. and Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20): p. 2299-2301.
- [38] Fenn J.B., Mann M., MEng C.K., Wong S.F. and Whitehouse C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246(4926): p. 64-71.
- [39] Patti G.J., Yanes O. and Siuzdak G. (2012) Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4): p. 263-269.
- [40] Oms-Oliu G., Odriozola-Serrano I., and Martín-Belloso O. (2013) Metabolomics for assessing safety and quality of plant-derived food. *Food Research International*, 54(1): p. 1172-1183.
- [41] Mazzei P. and Piccolo A. (2012) ¹H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry*, 132(3): p. 1620-1627.
- [42] Lei Z., Huhman D.V. and Sumner L.W. (2011) Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29): p. 25435-25442.
- [43] Wu H., Xue R., Lu C., Deng C., Liu T., Zeng H., Wang Q. and Shen X. (2009) Metabolomic study for diagnostic model of oesophageal cancer using gas

chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 877(27): p. 3111-3117.

[44] Van Ravenzwaay B., Herold M., Kapp M.D., Fabian E., Looser R., Krennrich G., MELLert W., Prokoudine A., Walk T. and Wiemer J. (2012) Metabolomics: A tool for early detection of toxicological effects and an opportunity for biology based grouping of chemicals—From QSAR to QBAR. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 746(2): p. 144-150.

[45] Glauser G., Veyrat N., Rochat J., Wolfender J. and Turlings T. (2013) Ultra-high pressure liquid chromatography–mass spectrometry for plant metabolomics: A systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1292: p. 151-159.

[46] Orešič M. (2009) Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(11): p. 816-824.

[47] de Oliveira D.N., de Bona Sartor S., Ferreira M.S., Catharino R.R. (2013) Cosmetic Analysis Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI). *Materials* 6: p. 1000-1010

[48] Scalbert A., Brennan L., Fiehn O., Hankemeier T., Kristal B. S., van Ommen B., Pujos-Guillot E., Verheij E., Wishart D., Wopereis S. (2009) Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* 5 (4): p. 435-458.

[49] Dragsted L.O. (2010) Biomarkers of meat intake and the application of nutrigenomics. *Meat Science* 84(2): p. 301-307

[50] Dudley E., Yousef M., Wang Y., Griffiths W.J. (2010) Targeted metabolomics and mass spectrometry. *Adv Protein Chem Struct Biol* 80: p. 45-83.

[51] Cevallos-Cevallos J.M. and Reyes-De-Corcuera J.I. (2012) *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, 67: p. 1-24.

[52] Cevallos-Cevallos J. M.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; Etxeberria, E.; Danyluk, M. D.; Rodrick, G. E.(2009) Metabolic analysis in food science. *Trends in Food Science & Technology* 20: p. 557-566

- [53] Kussmann M., Nordhoff E., RahbekNielsen H., Haebel S., RosselLarsen M., Jakobsen L., Gobom J., Mirgorodskaya E., KrollKristensen A., Palm L., Roepstorff P. (1997) Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *Journal of Mass Spectrometry* 32 (6): p. 593-601.
- [54] de Hoffmann E. (1996) Tandem mass spectrometry: A primer. *Journal of Mass Spectrometry* 31(2): p. 129-137.
- [55] Huang C.H. and Sedlak D.L. (2001) Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1): p. 133-139.
- [56] Bosco G.L. (2010) The development of LC-MS – the marriage of the bird and the fish. *Trends in Analytical Chemistry* 29(8): p. 781-794.
- [57] Bolaños P.P., Frenich A.G. and Vidal J.L.M. (2007) Application of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in the quantification-confirmation of pesticides and polychlorinated biphenyls in eggs at trace levels. *Journal of Chromatography A* 1167(1): p. 9-17.
- [58] Tranchida P.Q., Franchina F.A., Zoccali M., Pantô S., Sciarrone D., Dugo P. and Mondello L. (2013) Untargeted and targeted comprehensive two-dimensional GC analysis using a novel unified high-speed triple quadrupole mass spectrometer. *Journal of Chromatography A*. 1278: p. 153-159.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar os componentes do Vinagre Balsâmico (VB) e de vinagres comuns provenientes de variadas matérias primas (vinho tinto, vinho branco, maçã e álcool) utilizando técnicas baseadas em Espectrometria de Massas.

Objetivos Específicos

- Determinar os componentes do VB e de vinagres comuns (vinho tinto, vinho branco, maçã e álcool) através de análise direta, utilizando uma nova metodologia baseada na Espectrometria de Massas;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de VB dopadas com os demais tipos de vinagres comuns para analisar possíveis marcadores de adulteração do produto.

CAPÍTULO I

ANÁLISE DE ALTO RENDIMENTO UTILIZANDO SP-LDI-MS PARA RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM VINAGRES BALSÂMICOS COMERCIAIS

High-throughput analysis by SP-LDI-MS for fast identification of adulterations in commercial balsamic vinegars

*Tatiane Melina Guerreiro, Diogo Noin de Oliveira, Mônica Siqueira Ferreira,
Rodrigo Ramos Catharino*

Abstract: Balsamic vinegar (BV) is a typical and valuable Italian product, worldwide appreciated thanks to its characteristic flavors and potential health benefits. Several studies have been conducted to assess physicochemical and microbial compositions of BV, as well as its beneficial properties. Due to highly-disseminated claims of antioxidant, antihypertensive and antiglycemic properties, BV is a known target for frauds and adulterations. For that matter, product authentication, certifying its origin (region or country) and thus the processing conditions, is becoming a growing concern. Striving for fraud reduction as well as quality and safety assurance, reliable analytical strategies to rapidly evaluate BV quality are very interesting, also from an economical point of view. This work employs silica plate laser desorption/ionization mass spectrometry (SP-LDI-MS) for fast chemical profiling of commercial BV samples with protected geographical indication (PGI) and identification of its adulterated samples with low-priced vinegars, namely apple, alcohol and red/white wines.

Key words: Balsamic Vinegar, Adulteration, Chemical profiling

1. Introduction

Balsamic vinegar (BV) is a characteristic Italian product, which has become a very popular condiment worldwide in recent years. Commercial versions for everyday use are designated as Aceto Balsamico di Modena and, to meet minimum requirements to claim protected geographical indication (PGI), must be aged from a minimum of two months (regular) up to three years (invecchiato). A double fermentation using a variety of raw materials (white and red wine, cider, malted barley, honey, pure alcohol, etc.) may be used in the production. Both its chemical and organoleptic properties, as well as the product category (Tradizionale, Condimento or commercial) are determined by a number of factors, such as the acetification system used, the raw material used as the substrate and the length of time it is aged in wood [1].

The regular process of BV production includes four basic steps: cooking the grape must, alcoholic fermentation, acetic oxidation and aging. The cooking process is very important, since it is responsible for caramelization and Maillard reactions, yielding compounds that compose the characteristic aroma of the product [2]. The fermentative steps that occur after the cooking are divided into alcoholic fermentation, which happens spontaneously and forms ethanol, and the acetic fermentation, which oxidizes the previously-formed ethanol into acetic acid through the action of microorganisms [3].

A large number of studies have already been developed regarding the physical–chemical properties and the composition of BV [4–9], as well as the microorganisms associated with it [3,10–13]. Furthermore, beneficial health properties associated with BV consumption have also been explored in previous studies. These highlight its antioxidant power due to the amount of phenolic compounds and other antioxidant substances [14–18] contained, its antihypertensive effect through the reduction of renin activity [19,20], its antglycemic effect [21–23] and reduction in the risk and progression of atherosclerosis [24].

BV authentication or certification permits attesting to the source (country or region of origin) and the processing conditions, and is becoming a growing concern

for consumers and regulatory agencies worldwide. With markets becoming globalized, food and drinks can originate from many different locations around the world. Therefore, the determination of authenticity and even adulteration in food, either by market demand or by regulatory demand is necessary in order to limit fraud, which ensures confirmation of product identity and its recognition by the market.

Balsamic vinegar of Modena, regardless of its final denomination, is currently marketed under the Consortium of Producers' trade-mark, testifying that the product underwent strict quality control. As the regulatory authority, the Consortium has the task of organizing and coordinating certification activity, ensuring that the consumer only be presented with a product whose visual, olfactory and gustatory standards are in line with the approved ones. The final score is used to assign BV to its proper commercial class. Total acidity and density are also measured to complete the legal requirements.

Furthermore, BV is legally recognized as a traditional product of specific regions of Italy (Law 93/1986; European Council Regulation), so certified by the European Union through a seal Protected Designation of Origin (PDO – Protected Designation of Origin) or Protected Geographical Indication (PGI – Protected Geographical Indication). This seal proves the quality and authenticity of BV [2].

Traditionally, the quality control aspects of BV are carried out using chromatographic approaches, especially gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC–MS) [2,7,25]. The characteristic of great resolution on low-molecular weight compounds still makes GC–MS the obvious choice for BV analyses. For its great economical importance, BV quality control demands great attention; fast analytical approaches with reliable results are very desirable, since time-consuming techniques may delay the obtainment of results. With regard to chemical composition, metabolic fingerprinting using direct analysis by silica plate laser desorption/ionization mass spectrometry (SP-LDI-MS) emerges as a suitable alternative by offering a fast and simple technique for direct food analysis, compound characterization of compounds and possible adulteration markers.

The analytical workflow of a SP-LDI-MS experiment requires as little sample preparation as possible: analytes are directly deposited on a porous silica (PSi) plate (suitable for thin-layer chromatography, TLC) and sent straight to analysis, with no extractive or separation phases required. Recent publications describe several different applications of direct analysis on silica plates, using fast fingerprinting methods in cosmetics, drugs and even for single-cell analyses [26–28].

In this path, we hereby present a similar approach focused in quality control for fast identification of adulterations on two distinct commercial balsamic vinegar types: regular and invecchiato, using SP-LDI-MS with after statistical analysis to help identifying adulteration markers.

2. Materials and method

2.1. Chemicals reagents and samples

The utilized BV samples have PGI certification from the region of Modena (Italy). The other vinegars that are used are from the following raw materials: red wine, white wine, apple and alcohol. All products were purchased from commercial establishments in the city of Campinas, Brazil. Methanol and formic acid solutions were purchased from J. T. Baker (Xalostoc, Mexico) and used with no further purification. Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, USA).

2.2. SP-LDI-MS

Vinegar samples were diluted (10:90 v/v) in a solution of methanol and water (50:50 v/v); for measurements in the negative ion mode, 10.0 mL of concentrated NH₄OH aqueous solution was added to the sample mixture to a total volume of 1000 mL yielding a final concentration of 1.0%. A volume of 1.0 mL was then directly spotted onto silica 60 Å TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany) and sent for mass spectrometric analysis. A MALDI-LTQ-XL quadrupole linear trap instrument (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) with nitrogen laser was employed for MS acquisition. General operating conditions were as follows: 20 mJ

laser power, 3 shots per step and acquisition over 60 s. Mass spectra were acquired in the m/z range between 50 and 1000, both in the positive and negative ion modes. For structural analysis, MS/MS was performed using helium as the buffer gas for collision-induced dissociation (CID) with normalized energies of 30–50 eV.

2.3. Data handling

Obtained SP-LDI-MS fingerprints were processed using Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), and tables of m/z values as functions of intensities were extracted from the bulk spectra. In order to identify chemical markers of each vinegar samples, principal component analysis (PCA) was performed using the Unscrambler 9.7 (Camo Software, Oslo, Norway).

2.4. Structural proposals

Structures of the identified molecules were proposed using our MS/MS data and comparing with both literature information and software calculations using Mass Frontier software (v. 6.0, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

3. Results and discussion

Figs. 4 and 5 present the comparative mass spectra of vinegars as to their characteristic fingerprints. This preliminary analysis shows that it is already possible to infer visual differences between the samples of commercial balsamic vinegars of two different conditions (A = regular and B = invecchiatto) from the other four regular vinegar samples (C = alcohol vinegar; D = apple vinegar; E = white wine vinegar and F = red wine vinegar), in both operating ion modes.

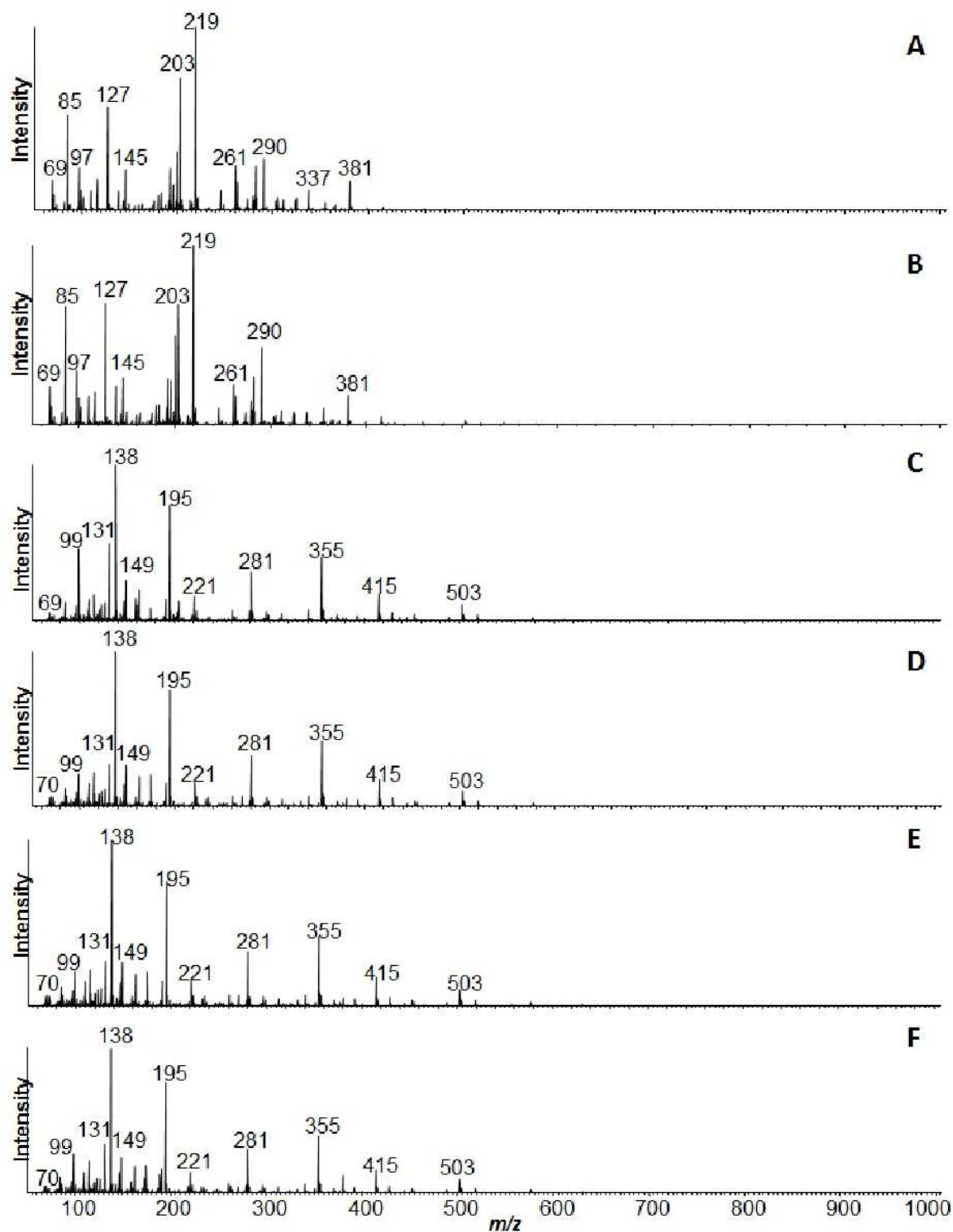


Figure 4. SP-LDI-MS fingerprints of Balsamic vinegar and vinegar samples. Positive ion mode.

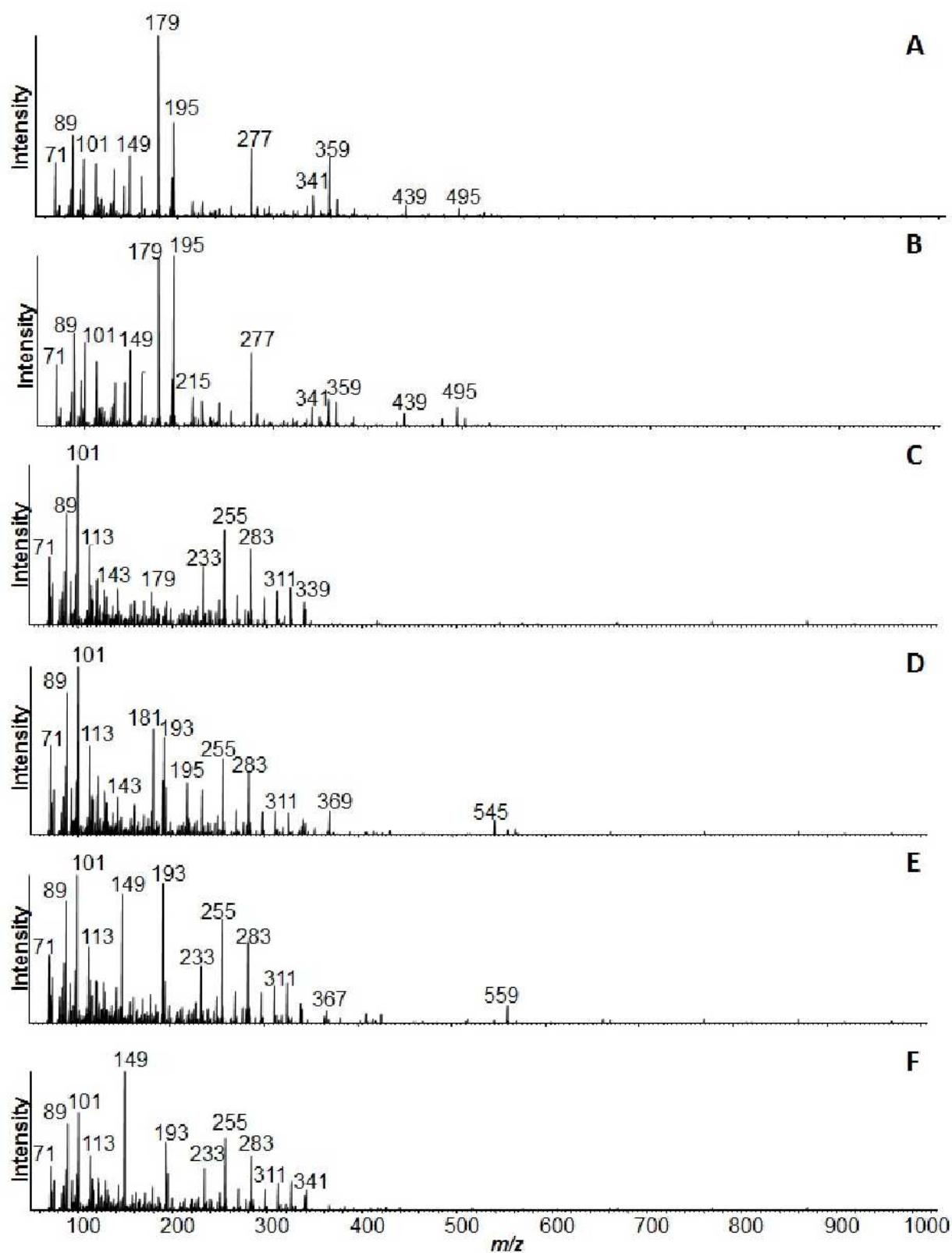


Figure 5. SP-LDI-MS fingerprints of Balsamic vinegar and vinegar samples. Negative ion mode.

It is evident that spectra of both BV samples (A and B) display the same characteristic signals. In the positive ion mode, the m/z values of 127, 203 and 219 are the most prominent ones. In the negative ion mode, the characteristic signals are at m/z 179 and 195. When further analyzing Figs.4 and 5, it is possible to identify common ions for the rest of the vinegar samples, such as m/z 138 and 195 in positive ion mode and m/z 89, 101, 149 and 193 in the negative ion mode. These ions are also provided after principal component analysis, statistically proving the visual aspect, and thus making it an easy task to differentiate the balsamic from other types of vinegar. The characterized compounds are organized in Table 1.

Mode	Vinegar	Ion	m/z	MS/MS	Compound
Positive	Balsamic	$[M+H]^+$	127	109.0; 99.0; 81.0	4-hydroxymethylpyran-2-one
		$[M+Na]^+$	203	185.0; 143.0; 113.0; 86.1	Glucose, Fructose
		$[M+K]^+$	219	203.1, 201.1, 145.0, 117.0, 74.5	Glucose, Fructose
	Non-Balsamic	$[M+H]^+$	138	110.0, 83.0, 69.0	2-Pyridylacetic acid
		$[M+H]^+$	195	138.1	Caffeine
Negative	Balsamic	$[M-H]^-$	89	74.7	Lactic acid
		$[M-H]^-$	179	161.0, 74.7	Glucose; Fructose
		$[M-H]^-$	195	129.0, 159.0, 177.0	Gluconic acid
		$[M+Na-2H]^-$	359	338.9, 166.0	Ascorbic acid-2-glucoside
	Non-Balsamic	$[M-H]^-$	149	74.7, 87.1, 103.0	Tartaric acid
		$[M-H]^-$	193	74.7, 113.0	Iduronic acid, Glucuronic acid
		$[M-H]^-$	225	179.0, 161.0, 143.0, 89.0	Glucoheptonic acid

Table 1. Identification of the detected compounds in balsamic and non-balsamic vinegars.

These results show us that carbohydrates are the molecular class that differentiates balsamic vinegars from the other samples; it is possible to see in Table 1 that monosaccharides such as glucose and fructose are identified both in the positive and in the negative ion modes. This is consistent with the balsamic vinegar production process, where sugar-rich grape juice fermentation occurs [3]. Since this process is not entirely efficient, it is possible to find these species in the

final product, confirming previous reports using different techniques [5,9].

Still observing the spectrum in the positive mode for the nonbalsamic vinegars, it is very evident that ions m/z 138 and 195 are the marker ions. These represent the respective compounds: 2-pyridylacetic acid and caffeine. Vinegars have a natural acidic characteristic, so finding organic acids in its composition was expected, as reported in many works [2]. Caffeine is a xanthine alkaloid and is found in some plants, your presence in vinegar is reported also like caffeic acid [7].

In the negative spectrum ions markers would be m/z 179 and 195 for balsamic vinegar and m/z 89, 149 and 193 for non-balsamic vinegars. Again we can see that the presence of sugar in balsamic vinegar is crucial to distinguish this of the non-balsamic vinegars, in the same way as in positive mode. For the non-balsamic vinegars we can identify a number of organic acids, responsible for the acidic characteristic of vinegar and already reported in other works [5,6,9].

Fig. 6 shows the SP-LDI(-)-MS fingerprints of adulterated balsamic vinegar samples (AN), made from the mixture of samples of balsamic vinegar with alcohol vinegar in increasing concentrations. Note that as much as the proportion of alcohol vinegar increases in the adulterated samples increases the intensity of ions m/z 89 in the spectrum. This increase is not linear but the spectra seem to indicate the amount of adulteration vinegar added. Because of this, SP-LDI(-)-MS fingerprinting is capable to differentiate balsamic vinegar from non-balsamic and adulterated balsamic vinegar samples. However, it was not possible to differentiate the different types of non-balsamic samples.

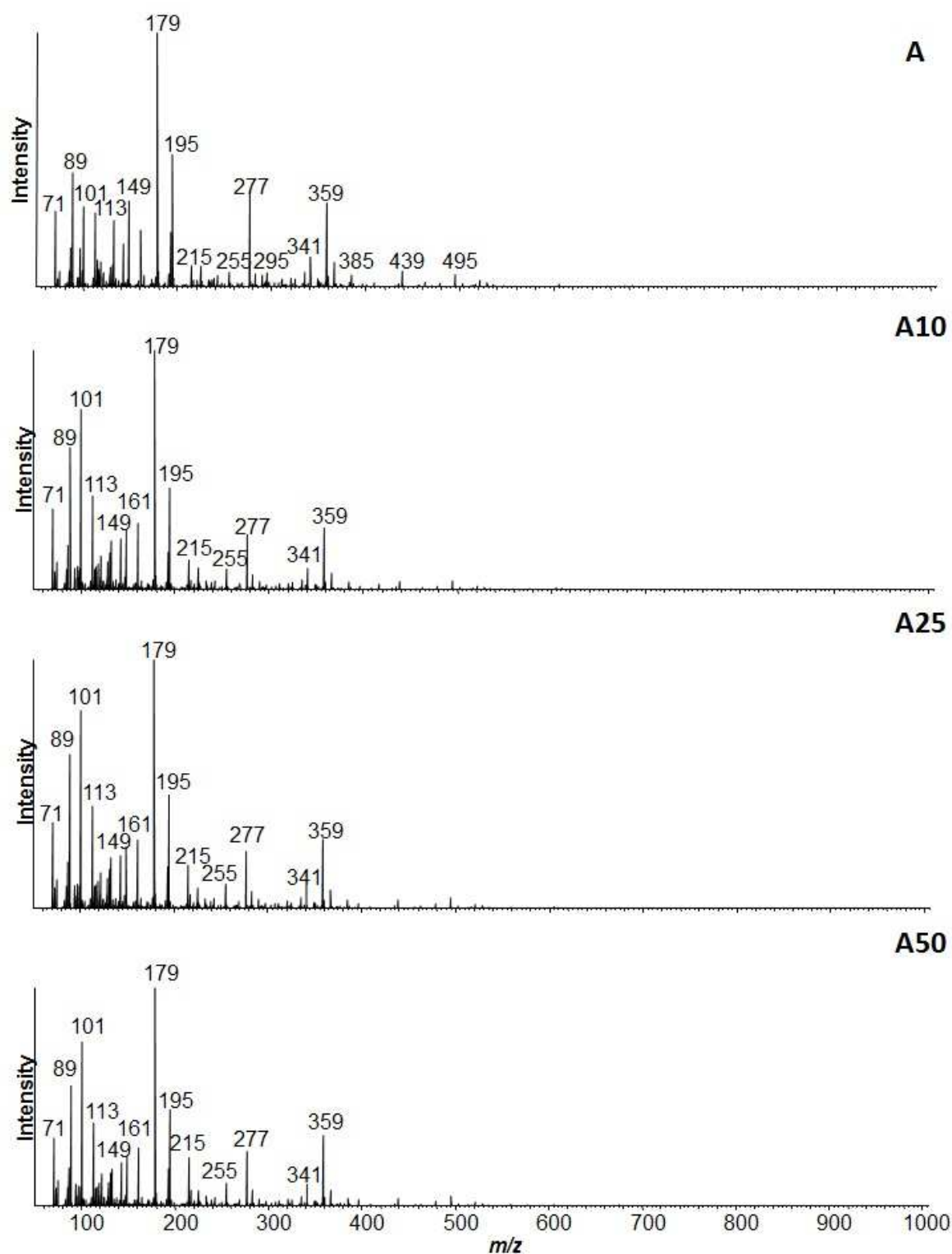


Figure 6. SP-LDI(-)-MS fingerprints of adulterated balsamic vinegar samples (A10 = balsamic vinegar added 10% of alcohol vinegar; A25 = balsamic vinegar added 25% of alcohol vinegar; A50 balsamic vinegar added 50% of alcohol vinegar).

To test the performance of SP-LDI-MS for assertive classification of vinegars, PCA data treatment was performed. Fig. 7 shows a scatter plot of PC1 versus PC2 for the SP-LDI(-)-MS spectra of balsamic, alcohol, apple, white wine, red wine vinegar samples.

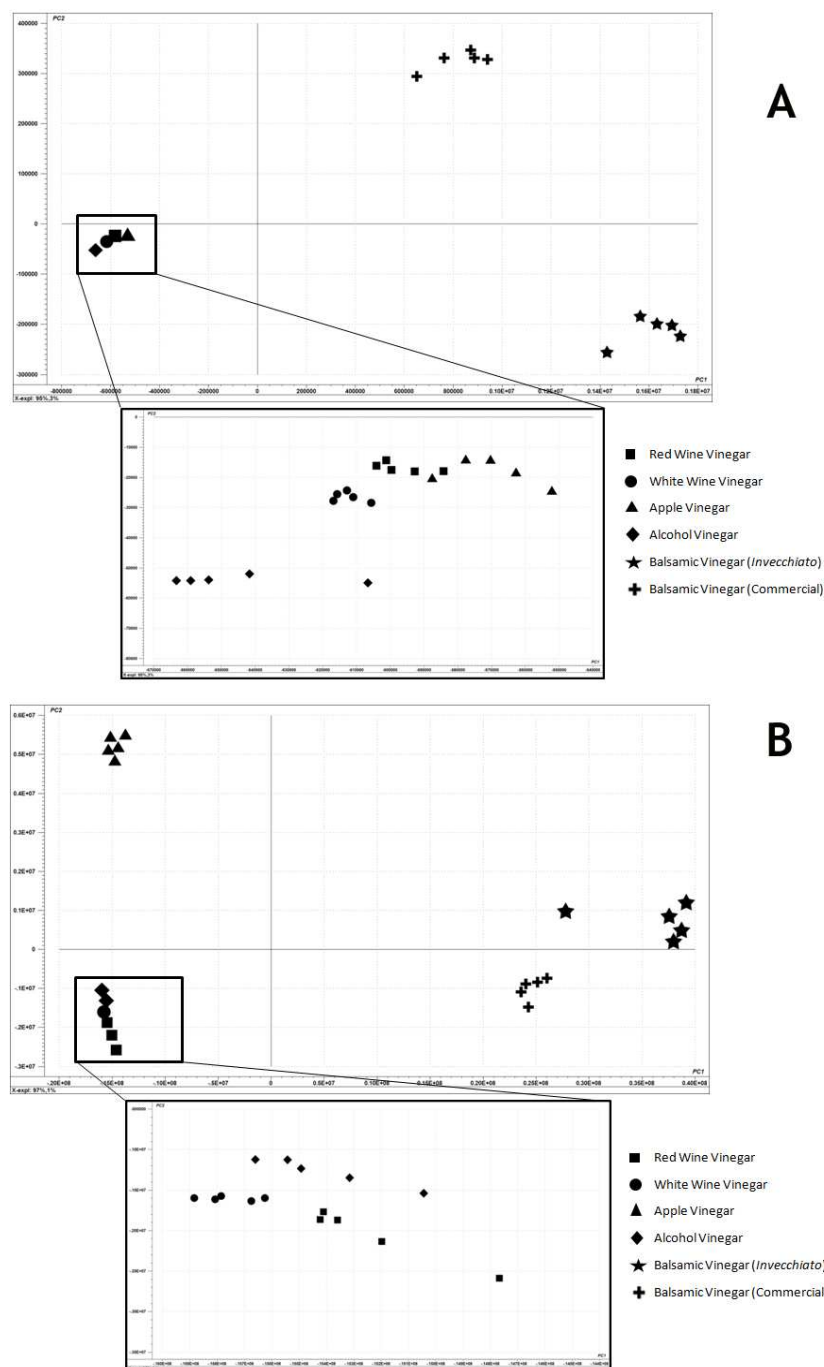


Figure 7. PCA score plots of (A) SP-LDI(-)-MS and (B) SP-LDI(+)-MS metabolic fingerprinting data of vinegar samples.

The PCA of SP-LDI(-)-MS data clearly distinguish balsamic from non-balsamic vinegar and can also distinguish the types of nonbalsamic vinegar in the PCA of SP-LDI(+)-MS. The last PCA corresponding of SP-LDI(-)-MS data of adulterated samples (Fig. 8) and here is possible identify the adulterated samples differentiate of balsamic vinegar samples. Through these data we can see that the SP-LDI-MS technique is capable of performing the distinction of samples adulterated vinegars, even when there are only traces of contaminants, in this case non balsamic vinegars, because it is a very and sensitive technique.

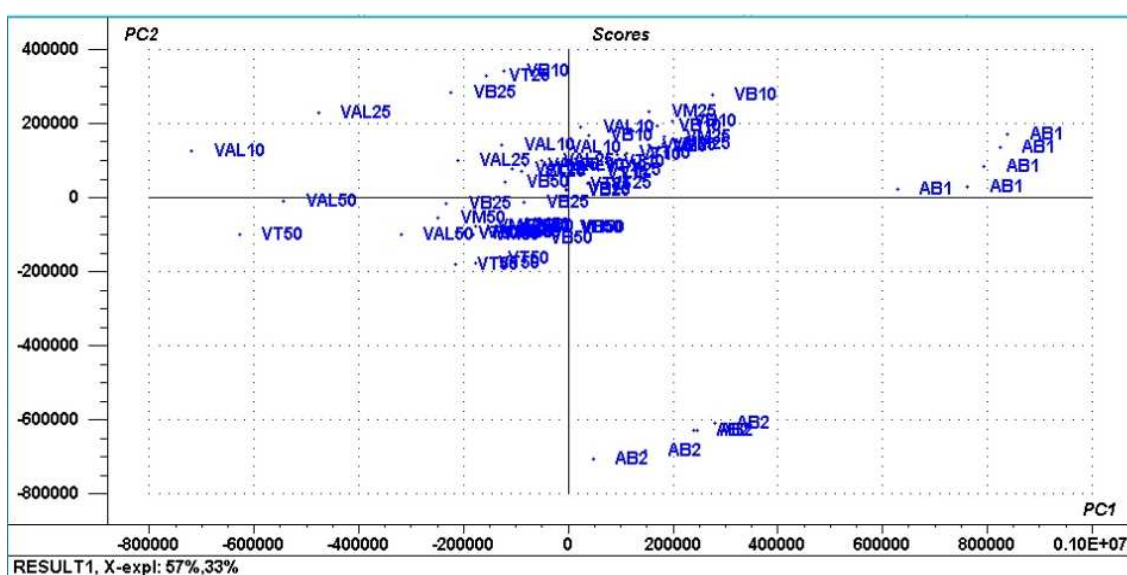


Figure 8. PCA score plots of SP-LDI(-)-MS fingerprint of adulterated samples of vinegar.

Still analyzing these results we can see that there was differentiation between samples of authentic balsamic vinegar. This is due to one of the marks used to be *invecchiato*, an official designation where the product even with high commercial production is aging in barrels for three years. Thus we can see that through the technique of SP-LDI-MS can be identified, in addition to possible adulteration, differences due to maturation of BV, illustrating the sensitivity of the technique.

What clearly distinguishes the different types of BVs is the presence of sugars (mono and disaccharides) in their final composition. For AB1, these substances are actual product characteristic markers, whereas in AB2, there is a predominance of acid-derived molecules. PCA clearly shows this difference between the two types of balsamic vinegars, as it identifies Ascorbic acid 2-glucoside (359 m/z) as the main marker of AB1, due a strong presence of sugars in this product; in return, the main AB2 marker is identified as two organic acids: tartaric acid (149 m/z) and Glucoheptonic acid (225 m/z). This corroborates the increased acidity of this type of balsamic and can be directly related to the absence of maturation in AB2 (regular) when compared to AB1 (invecchiato), chemically attesting that this process is indeed crucial for quality and denomination of origin.

4. Conclusions

A new approach based on SP-LDI-MS fingerprinting for the fast and reliable detection of balsamic vinegar adulteration has been demonstrated. Sample preparation is minimal and methanol/water dilution permits the detection, as protonated molecules, of characteristic diagnostic compounds present in different types of vinegar. As exemplified in this study SP-LDI-MS provides a direct, robust and reliable chemical fingerprinting method for the fast screening of food products. Nearly instantaneous detection of counterfeit samples and the counterfeiting proportion is achieved with high confidence. Future actions for signal improvement and increased specificity for molecule classes lean towards the functionalization of porous silicon surfaces (PSi), which are already being developed and will be presented in future contributions.

Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES and FAPESP (process 11/ 50400-0 and process 14/00084-2) for the financial support that helped this work to be developed.

References

- [1] R. Natera, R. Castro, M. de Valme García-Moreno, M.J. Hernández, C. García-Barroso, Chemometric studies of vinegars from different raw materials and processes of production, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3345–3351.
- [2] F. Chinnici, E. Durán Guerrero, F. Sonni, N. Natali, R.N. Natera Marín, C. Riponi, Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) characterization of volatile compounds in quality vinegars with protected European Geographical indication, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4784–4792.
- [3] L. Solieri, P. Giudici, Yeasts associated to traditional balsamic vinegar: ecological and technological features, *Int. J. Food Microbiol.* 125 (2008) 36–45.
- [4] F. Corradini, L. Marcheselli, A. Marchetti, C. Preti, C. Biancardi, Analysis of heavy metals in Aceto Balsamico Tradizionale di Modena by flame atomic absorption spectroscopy, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 714.
- [5] M. Cocchi, C. Durante, M. Grandi, P. Lambertini, D. Manzini, A. Marchetti, Simultaneous determination of sugars and organic acids in aged vinegars and chemometric data analysis, *Talanta* 69 (2006) 1166–1175.
- [6] D. Sanarico, S. Motta, L. Bertolini, A. Antonelli, HPLC determination of organic acids in traditional balsamic vinegar of Reggio Emilia, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 26 (2003) 2177–2187.
- [7] M. Plessi, D. Bertelli, F. Miglietta, Extraction and identification by GC–MS of phenolic acids in traditional balsamic vinegar from Modena, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 49–54.
- [8] P.M. Falcone, P. Giudici, Molecular size and molecular size distribution affecting traditional balsamic vinegar aging, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 7057–7066.
- [9] F. Masino, F. Chinnici, A. Bendini, G. Montevecchi, A. Antonelli, A study on relationships among chemical, physical, and qualitative assessment in traditional balsamic vinegar, *Food Chem.* 106 (2008) 90–95.
- [10] L. De Vero, E. Gala, M. Gullo, L. Solieri, S. Landi, P. Giudici, Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar, *Food Microbiol.* 23 (2006) 809–813.

- [11] L. Solieri, S. Landi, L. De Vero, P. Giudici, Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar, *J. Appl. Microbiol.* 101(2006) 63–71.
- [12] M. Gullo, C. Caggia, L. De Vero, P. Giudici, Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”, *Int. J. Food Microbiol.* 106 (2006) 209–212.
- [13] M. Gullo, P. Giudici, Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection, *Int. J. Food Microbiol.* 125 (2008) 46–53.
- [14] A. Dávalos, B. Bartolomé, C. Gómez-Cordovés, Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars, *Food Chem.* 93 (2005) 325–330.
- [15] E. Verzelloni, D. Tagliazucchi, A. Conte, Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar, *Food Chem.* 105 (2007) 564–571.
- [16] E. Verzelloni, D. Tagliazucchi, A. Conte, From balsamic to healthy: traditional balsamic vinegar melanoidins inhibit lipid peroxidation during simulated gastric digestion of meat, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 2097–2102.
- [17] Q. Xu, W. Tao, Z. Ao, Antioxidant activity of vinegar melanoidins, *Food Chem.* 102 (2007) 841–849.
- [18] E. Greco, R. Cervellati, M.L. Litterio, Antioxidant capacity and total reducing power of balsamic and traditional balsamic vinegar from Modena and Reggio Emilia by conventional chemical assays, *Int. J. Food Sci. Technol.* 48 (2013) 114–120.
- [19] S. Kondo, K. Tayama, Y. Tsukamoto, K. Ikeda, Y. Yamori, Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 2690–2694.
- [20] S. Honsho, A. Sugiyama, A. Takahara, Y. Satoh, Y. Nakamura, K. Hashimoto, A red wine vinegar beverage can inhibit the renin-angiotensin system: experimental evidence in vivo, *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2005) 1208–1210.
- [21] C.S. Johnston, C.A. Gaas, Vinegar: medicinal uses and antiglycemic effect, *MedGenMed* 8 (2006) 61.

- [22] C.S. Johnston, I. Steplewska, C.A. Long, L.N. Harris, R.H. Ryals, Examination of the antiglycemic properties of vinegar in healthy adults, *Ann. Nutr. Metab.* 56(2010) 74–79.
- [23] A.D. Salbe, C.S. Johnston, M.A. Buyukbese, P.D. Tsitouras, S.M. Harman, Vinegar lacks antiglycemic action on enteral carbohydrate absorption in human subjects, *Nutr. Res.* 29 (2009) 846–849.
- [24] M. Iizuka, M. Tani, Y. Kishimoto, E. Saita, M. Toyozaki, K. Kondo, Inhibitory effects of balsamic vinegar on LDL oxidation and lipid accumulation in THP-1 macrophages, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 56 (2010) 421–427.
- [25] M. Cirlini, A. Caligiani, L. Palla, G. Palla, HS-SPME/GC–MS and chemometrics for the classification of Balsamic vinegars of Modena of different maturation and ageing, *Food Chem.* 124 (2011) 1678–1683.
- [26] D.N. de Oliveira, M. Siqueira, S. Sartor, R. Catharino, Direct analysis of lipsticks by Sorptive tape-like extraction laser desorption/ionization mass spectrometry imaging, *International, J. Cosmet. Sci.* 35 (2013) 467–471.
- [27] M.M. Eiras, D.N. de Oliveira, M.S. Ferreira, M. Benassi, S.O.S. Cazenave, R.R. Catharino, Fast fingerprinting of cannabinoid markers by laser desorption ionization using silica plate extraction, *Anal. Methods* (2014).
- [28] M.S. Ferreira, D.N. de Oliveira, R.F. Gonçalves, R.R. Catharino, Lipid characterization of embryo zones by silica plate laser desorption ionization mass spectrometry imaging (SP-LDI-MSI), *Anal. Chim. Acta* 807 (2014) 96–102.

CONCLUSÕES GERAIS

A proposta de determinação dos compostos presentes no Vinagre Balsâmico e em vinagres comuns (maça, álcool, vinho branco e tinto) através da técnica *Silica Plate Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry* (SP-LDI-MS) se mostrou satisfatória.

Utilizando a nova técnica desenvolvida foi possível identificar marcadores químicos responsáveis por diferenciar tanto as amostras de VB dos vinagres comuns, quanto o VB de amostras adulteradas inclusive utilizando-se quantidades mínimas de adulterante. Além disso, ao observarmos os resultados presentes no PCA, há possibilidade de diferenciar diferentes tipos de VB, de acordo com o seu tempo de maturação, assim como diferentes tipos de vinagres comuns, de acordo com as matérias-primas das quais se originam. Porém seriam necessários novos experimentos para confirmarmos estas hipóteses.

A metodologia proposta apresenta muitas vantagens em relação às técnicas comumente utilizadas, como mínimo preparo de amostra, tempo de análise reduzido e análise realizada diretamente no alimento.

A identificação eficaz dos vinagres apresentada pela técnica possibilitaria seu uso tanto para verificação de fraudes ou adulterações quanto para verificação de qualidade do produto, inclusive contribuindo para que laboratórios ou agências governamentais possam atender às necessidades de segurança dos consumidores.