

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Caracterização isotópica para avaliar autenticidade de
óleos vegetais refinados comercializados no Brasil**

Samuel Perri Gimenes

BOTUCATU

2022

Samuel Perri Gimenes

Caracterização isotópica para avaliar autenticidade de óleos vegetais refinados comercializados no Brasil

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa

BOTUCATU

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gimenes, Samuel Perri.

Caracterização isotópica para avaliar autenticidade de óleos vegetais refinados comercializados no Brasil / Samuel Perri Gimenes. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vladimir Eliodoro Costa

Capes: 90400003

1. Óleos vegetais - Adulteração e inspeção. 2. Isótopos estáveis. 3. Espectrometria de massa. 4. Contaminação de alimentos.

Palavras-chave: Autenticidade; Espectrometria de massa; Isótopos estáveis; Mistura; Óleos vegetais refinados.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que apoiaram e possibilitaram a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais e família pelo apoio, e também minha namorada Maria Eliza por toda companhia e alegria proporcionada durante este caminho.

Aos professores e funcionários do Centro de Isótopos estáveis, em especial ao professor Vladimir Eliodoro Costa pela orientação e pelo tempo dedicado.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

A pró-reitoria de pesquisa (PROPe) da UNESP pelo apoio financeiro

RESUMO

Este trabalho buscou caracterizar isotopicamente os óleos vegetais refinados de milho, girassol, canola, soja, algodão e dendê comercializados no Brasil. Houve uma desvalorização da moeda brasileira, desestabilizando o mercado de exportação de grãos utilizados para produção dos óleos a serem analisados. Quando o mercado externo se torna mais interessante e lucrativo, espera-se um déficit no fornecimento da matéria prima para o mercado interno, gerando motivação econômica para adulteração de produtos, onde o óleo de soja é o principal adulterante, por ser mais barato, seguido do óleo de milho. A caracterização dos óleos através da espectrometria de massa de razão isotópica permitiu estabelecer valores esperados para cada tipo de óleo, podendo servir como banco de dados para avaliação da autenticidade. Dessa maneira, a análise isotópica pode se tornar uma ferramenta rápida para avaliação da autenticidade de óleos vegetais refinados. Os resultados apresentados nos permitiram caracterizar com facilidade o óleo de milho devido ao seu ciclo fotossintético, e o óleo de canola devido a região onde é produzido.

Palavras-chave: Óleos vegetais refinados, isótopos estáveis, autenticidade, mistura, espectrometria de massa

ABSTRACT

This work sought to characterize isotopically the refined vegetable oils from corn, sunflower, canola, soybean, cotton and palm oil commercialized in Brazil. Due to a devaluation of the Brazilian currency, hence destabilizing the export market of grains used for the production of the oils to be analyzed. When the foreign market becomes more interesting and profitable, a deficit in the supply of raw materials for the domestic market is expected, generating economic motivation for adulteration of products, where soybean oil is the main adulterant, because it is cheaper, followed by corn oil. The characterization of the oils through isotope ratio mass spectrometry allowed us to establish expected values for each type of oil, which can serve as a database for authenticity evaluation. Thus, the isotopic analysis of vegetable oils is quick tool for assessing the authenticity of those oils. The results presented empowered us to easily characterize corn oil due to its photosynthetic cycle, and canola oil due to the region where it is produced.

Keywords: Refined vegetable oil, stable isotopes, authenticity, mixture, mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dispersão dos pontos com distribuição marginal em caixas dos valores $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de 47 amostras de óleos vegetais refinados. As caixas representam 25% e 75% percentis. Os fabricantes das amostras circuladas são indicados pelas letras C e D. 16

Figura 2 Dispersão dos pontos com distribuição marginal em caixas dos valores $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de 47 amostras de óleos vegetais refinados. As caixas representam 25% e 75% percentis. A amostra circulada pertence ao fabricante F. 17

Figura 3 Dispersão dos pontos com distribuição marginal em caixas dos valores $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ de 47 amostras de óleos vegetais refinados. As caixas representam 25% e 75% percentis. Os fabricantes das amostras circuladas são indicados pelas letras C, D e E. 18

Figura 4. Valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ para as misturas de óleos de milho (m) com soja (s) e de girassol (g) com milho (m). 20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de amostras de óleos vegetais refinados, marcas, fabricantes e representatividade dos fabricantes no mercado brasileiro. 11

Tabela 2. Identificação das amostras coletadas com 12 fabricantes (letra maiúscula), 22 marcas (número) e 6 tipos de acordo com a planta originária (letra minúscula) de óleo vegetal refinado. 12

Tabela 3. Proporções utilizadas para elaboração das misturas de óleos 13

Tabela 4. Valores isotópicos médios e desvio padrão de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ para cada tipo de óleo refinado, N representa o número de amostras. 19

Tabela 5. Percentual e erro de misturas esperadas e medidas de óleo de milho misturado com soja e óleo de girassol misturado com milho. Os valores do erro estão em módulo. 20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3. RESULTADOS	16
4. DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais refinados, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são produtos alimentícios obtidos unicamente de matéria prima vegetal, refinado através de processos tecnológicos adequados. Estes óleos estão presentes na alimentação das famílias brasileiras, se tratando de um alimento da cesta básica. Nos últimos dois anos houve um aumento no preço destes alimentos, e não se sabe o motivo exato por trás disso. Uma das possíveis explicações é a desvalorização do real mediante à crise econômica mundial em decorrência da pandemia do Covid-19, ou, de forma mais indireta, devido ao aumento do interesse de exportação das matérias primas, dado a maior lucratividade do mercado exterior em relação ao mercado brasileiro (G1 2021, G1 2022, BBC 2022).

A fraude de alimentos é descrita como a substituição, adição, adulteração ou distorção dos ingredientes ou do alimento, com finalidade de obter vantagens econômicas (WTO 2017). A adulteração pode ser sutil, e se trata da mistura de duas ou mais matérias primas em um mesmo produto. Esta prática é empregada na venda de produtos ditos de uma única matéria prima, quando na verdade são adulterados com uma outra, geralmente mais barata. A motivação é de caráter econômico, sendo que pode ser lucrativa para as indústrias, como visto em estudos de caso na literatura (MOYER; DEVRIES; SPINK, 2017).

Como mostrado no levantamento feito por (MOORE et al., 2012) e (TIBOLA et al., 2018), os principais métodos analíticos para detecção de fraude no Brasil são técnicas de cromatografia e identificação molecular. Técnicas quimiométricas, de espectroscopia e espectrometria também são citadas como métodos recorrentes para detecção de fraudes em alimentos. Dentre os métodos descritos a espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) usada para analisar os isótopos estáveis das amostras é apresentada como uma ferramenta capaz de identificar proteína de soja em produtos cárneos e presença de sacarose em sucos.

No Brasil, já foram relatadas fraudes de diversos produtos alimentícios a partir da avaliação da autenticidade usando análises dos isótopos estáveis e IRMS como: mel (SOUZA-KRULISKI et al., 2010), peixe (SANT'ANA; DUCATTI; RAMIRES, 2010), suco de goiaba (NOGUEIRA et al. 2016), vinho (ADAMI et al., 2010), (DUTRA et al., 2013), suco de uva (SPINELLI et al., 2016), água de coco (IMAZUMI et al., 2019), shoyu (MORAIS et al., 2018), cárneos (PERDIGÃO et al., 2021), cerveja (RENE & BROOKS et al., 2002), entre outros.

Os isótopos são átomos de um mesmo elemento químico, com o mesmo número de prótons, porém diferenciam-se pelo número de massa (número de prótons, mais número de nêutrons). Os elementos leves mais abundantes em amostras orgânicas como o carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre possuem, cada um deles, pelo menos dois isótopos estáveis, pois não emitem radiação. Os mesmos são quantificados pela sua razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$), e ocorrem naturalmente no ambiente (DUCATTI, 2007). A razão é geralmente expressa em valor- δ , correspondentes a uma diferença relativa da razão isotópica (COPLEN, 2011), podendo ser utilizada para quantificação dos isótopos estáveis e avaliação da autenticidade (FRY, 2006).

O oxigênio e o hidrogênio podem caracterizar isotopicamente as águas de diferentes regiões geográficas, pois os isótopos pesados são enriquecidos nos processos de evaporação da água e precipitação da chuva (PRIMROSE; WOOLFE; ROLLINSON, 2010). O carbono mostra diferença na razão isotópica de plantas com diferentes ciclos fotossintéticos C_3 ou C_4 ou CAM. Plantas denominadas C_3 , que usam a rota de fixação de dióxido de carbono do ciclo de Calvin-Benson, possuem uma razão isotópica de carbono diferente das plantas denominadas C_4 , cujo ciclo fotossintético ocorre através da via Hatch-Slack, que incorpora menos ^{13}C e as CAM possuem valores de C_3 e C_4 (RHODES et al., 2010).

Assim, podemos identificar componentes baseados na sua assinatura isotópica, que consiste na razão isotópica característica de uma amostra. Por isso, contanto que o produto seja de ciclo fotossintético diferente do adulterante, podemos identificar a presença de uma matéria prima C_3 (quase todas as frutas e grãos) em um produto C_4 (cana de açúcar, milho ou milheto), ou vice-versa (FARQUHAR; EHLERINGER; HUBICK, 1989).

Usando a diferenciação C_3 e C_4 , Rossell (1994) utilizou a análise dos isótopos estáveis de carbono para avaliar adulteração em amostras de óleos de milho, proveniente de planta C_4 , que apresentou valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -16‰ e -15‰ de diversas regiões como Turquia, América do Norte, América do Sul, Austrália, Nova Zelândia, África e Ásia. Neste estudo, as amostras de óleos provenientes de planta C_3 , apresentaram valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -30 a -24‰ das regiões: Malásia (óleo de palma) Sudão (óleo de gergelim), Nigéria (óleo de algodão), e Reino Unido (óleo de canola), concluindo que algumas amostras de óleo de milho estavam adulteradas com óleos de origem C_3 .

Vinte e três anos depois foi relatado que óleos de soja e azeite de oliva possivelmente adulterados com óleo de milho podem ser detectados usando a diferenciação C_3 e C_4 e analisando os isótopos estáveis de carbono pela técnica de IRMS. Neste estudo também foram preparadas e analisadas misturas de óleo de milho com azeite de oliva e óleo de soja e concluiu-

se que é possível detectar adulteração em misturas com proporção de até 5% de adulterante (HUANG et al., 2017).

No entanto, ainda não foi explorado a análise de isótopos estáveis de hidrogênio ($\delta^2\text{H}$) e oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) para óleos vegetais refinados, principalmente de milho, soja, girassol, canola, algodão e dendê (palma) que são amplamente comercializados no Brasil. Esta análise apresenta uma complexidade maior, pois necessita converter todo o hidrogênio e oxigênio da amostra em gases H_2 e CO por conversão em alta temperatura (GEHRE; STRAUCH, 2003). Entretanto, o uso do princípio do tratamento idêntico com padrões de mesma matriz pode facilitar a análise de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ em amostras orgânicas (CARTER; FRY, 2013). Diante dessa necessidade, foram preparados e comercializados padrões de várias matrizes orgânicas como mel, óleo, colágeno e farinha (SCHIMMELMANN et al., 2020).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi determinar a variação e os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ para caracterizar e avaliar a autenticidade de óleos vegetais refinados de milho, girassol, soja, canola, algodão e dendê, de diferentes marcas e fabricantes brasileiros.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem dos óleos vegetais refinados

Para a caracterização isotópica dos óleos vegetais refinados de milho, girassol, soja, canola, algodão e dendê, foram adquiridos, em frascos de um litro, os produtos comerciais disponíveis. Os frascos foram comprados entre março e junho de 2021 em estabelecimentos comerciais na região de Botucatu-SP, Brasil. Não foi realizado um estudo detalhado de preços, mas foi observado o valor crescente para os seguintes óleos: soja; milho; girassol; canola; algodão; dendê. Cada produto ou frasco representou uma amostra e foi classificada conforme suas descrições nas embalagens identificadas como: tipo (milho, soja, canola, algodão e dendê); marca (nome fantasia); lote de fabricação (número do lote); fabricante (produzido por).

Buscou-se obter a maior representatividade possível dos estabelecimentos registrados junto ao MAPA que produzem, processam ou embalam óleos vegetais refinados no mercado brasileiro. A lista completa dos estabelecimentos registrados junto ao MAPA foi acessada em

21/04/2021 no site “Indicadores de Qualidade Vegetal” (<https://indicadores.agricultura.gov.br/qualidadevegetal>). Neste trabalho será referido como fabricante de óleos vegetais refinados os estabelecimentos que possuem registro junto ao MAPA para atividade de produtor, industrializador, processador e embalador. Um resumo dos 47 produtos adquiridos com as diferentes marcas e fabricantes e representatividade do mercado brasileiro estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de amostras de óleos vegetais refinados, marcas, fabricantes e representatividade dos fabricantes no mercado brasileiro.

Óleo	Amostras	Fabricantes amostrados (total)	Representatividade dos fabricantes
Milho	10	3(5)	60,0%
Girassol	12	5(8)	62,5%
Soja	12	6(11)	54,5%
Canola	10	5(6)	83,3%
Algodão	01	1(3)	33,3%
Dendê	02	02	-
Total	47	20(33)	60,6%

Alguns produtos de fabricantes registrados não foram encontrados, entretanto foram adquiridos produtos de fabricantes cujo registro ainda não estava presente na relação disponível pelo MAPA. Além disso, nessa relação não havia nenhum fabricante de óleo de dendê, ou azeite de dendê e/ou óleo de palma. Apesar de ser comercializado no Brasil, o óleo de dendê não consta no atual regulamento técnico de Identidade e Qualidade de Óleos Vegetais Refinados descritos na Instrução Normativa nº 49, de 22/12/2006. Neste regulamento consta como óleos vegetais refinados apenas os óleos de algodão, canola, girassol, milho e soja.

No total, dos 47 frascos de óleos adquiridos foram amostrados 12 fabricantes e 22 marcas dos 6 tipos de óleos. Estas amostras estão categorizadas na tabela 2 de acordo com o fabricante, a marca e o tipo de óleo.

Tabela 2. Identificação das amostras coletadas com 12 fabricantes (letra maiúscula), 22 marcas (número) e 6 tipos, de acordo com a planta originária (letra minúscula) de óleo vegetal refinado.

Fabricante	Marca	Milho	Girassol	Soja	Canola	Algodão	Dendê
A	01	A01m	A01g	A01s	A01c		
C	02	C02m	C02g	C02s	C02c		
B	03	B03m	B03g	B03s	B03c		
B	04	B04m	B04g	B04s	B04c		
B	05	B05m	B05g	B05s	B05c		
C	06	C06m*	C06g	C06s	C06c		
B	07	B07m	B07g		B07c		
A	08	A08m	A08g				
C	09	C09m	C09g				
E	10		E10g	E10s	E10c		
D	11		D11g				
G	12		G12g				
C	13			C13s			
E	14			E14s			
H	15			H15s			
B	16			B16s			
I	17			I17s			
F	18				F18c		
A	19				A19c		
J	20					J20a	
K	21						K21d
L	22						L22d

*Amostra com dois lotes diferentes

Preparo das misturas de óleos vegetais refinados

Para avaliar o potencial da análise isotópica em distinguir misturas de óleos, foram preparadas em laboratório amostras de 2 misturas de dois óleos em 5 diferentes proporções de volume: 95:05; 75:25; 50:50; 25:75; 05:95; para óleo de milho misturado com soja e para óleo de girassol misturado com milho, conforme descrito na tabela 3. As misturas foram realizadas

em tubos de plástico translúcidos de 50 mL com tampa rosqueada e graduação. A relação usada para a proporção 50:50 foi 25 mL:25 mL, para 75:25 (37,5 mL:12,5 mL) e para 95:05 (47,5 mL:2,5 mL). Depois de misturadas, as amostras foram agitadas para homogeneizar as mesmas.

Tabela 3. Proporções utilizadas para elaboração das misturas de óleos

Milho com Soja		Girassol com Milho	
A01m	A01s	A01g	A01m
100%	0	100%	0
95%	5%	95%	5%
75%	25%	75%	25%
50%	50%	50%	50%
25%	75%	25%	75%
5%	95%	5%	95%
0	100%	0	100%

Análises isotópica

Para as análises dos isótopos estáveis de carbono, hidrogênio e oxigênio, foram determinadas as razões isotópicas $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$, $R(^2\text{H}/^1\text{H})$ e $R(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$, respectivamente, utilizando dois sistemas de espectrometria de massa de razão isotópica por fluxo contínuo (CF-IRMS). As determinações seguiram o princípio do tratamento idêntico (TI) (CARTER; FRY, 2013; WERNER; BRAND, 2001) utilizando 3 padrões de óleos (USGS84, USGS86 e USGS87) (SCHIMMELMANN et al., 2020) antes e depois de cada grupo de 15 amostras.

Primeiramente, as amostras e os padrões foram pesados em cápsulas de estanho (5,0 x 3,5 mm) com alíquotas de 50 µg a 80 µg para análise isotópica do carbono. Para análise isotópica simultânea de hidrogênio e oxigênio, as amostras foram pesadas em cápsulas de prata (5,0 x 3,5 mm) com alíquotas de 150 µg e 200 µg. Antes da pesagem, as amostras de óleos contidas nos frascos foram agitadas para evitar decantação. Para realizar as pesagens com precisão, foi utilizada uma balança analítica com resolução de 1 µg (MX5, Mettler Toledo, Switzerland). Depois das pesagens em cápsulas de prata, as amostras e padrões foram embalados a vácuo para evitar absorção da umidade ambiente até o momento da análise no CF-IRMS.

Para determinar a razão isotópica $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$, foi utilizado um CF-IRMS constituído de um analisador elementar (EA) por combustão com dois reatores oxidação/redução (Flash EA,

Thermo Scientific, Alemanha) acoplado a um IRMS (Delta V Advantage, Thermo Scientific, Alemanha) com interface de gases (ConFlo IV, Thermo Scientific, Alemanha). No EA-IRMS, foi utilizado um fluxo carreador de He (pureza de 99,9999%) de 100 mL/minuto, pulso de 12 mL de oxigênio para combustão no reator de oxidação e coluna de separação de CO₂ de 2 m com temperatura de 65 °C.

Para determinar as razões isotópicas $R(^2\text{H}/^1\text{H})$ e $R(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ simultânea em cada amostra, foi utilizado um CF-IRMS constituído de um amostrador automático livre de ar atmosférico (NoBlank, Thermo Scientific, Alemanha) conectado a um EA termoquímico – TC com fluxo reverso no reator de pirólise (TC/EA, Thermo Scientific, Alemanha) acoplado a um IRMS (Delta V Advantage, Thermo Scientific, Alemanha) com interface de gases (ConFlo IV, Thermo Scientific, Alemanha). Na purga do amostrador, foi utilizado fluxo de He (pureza de 99,9999%) de 30 mL/minuto, enquanto que no TC/EA-IRMS foi utilizado um fluxo carreador de He (pureza de 99,9999%) de 80 mL/minuto, coluna de separação de H₂ e CO com 0,6 m com temperatura de 75 °C.

Os resultados das razões isotópicas $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$, $R(^2\text{H}/^1\text{H})$ e $R(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ obtidos nos dois sistemas foram apresentados em diferença relativa da razão isotópica δ , também conhecida como valor delta (COPLEN, 2011), calculada a partir das razões isotópicas padrões $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}$, $R(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{VSMOW}}$ e $R(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{VSMOW}}$, conforme equação 2:

$$\delta^i E = \frac{R\left(\frac{iE}{jE}\right)_{\text{amostra}}}{R\left(\frac{iE}{jE}\right)_{\text{padrão}}} - 1, \quad (2)$$

onde E representa o elemento, iE o isótopo menos abundante e jE o isótopo mais abundante do elemento. Seguindo as diretrizes do Sistema Internacional de unidades (SI), os resultados foram expressos em mili Urey (mUr), conforme recomendação (BRAND; COPLEN, 2012). Assim, o valor isotópico tradicionalmente escrito -25‰ pode ser expresso como -25 mUr. Os resultados foram normalizados por ancoragem em múltiplos pontos (PAUL; SKRZYPEK; FÓRIZS, 2007), usando os valores isotópicos dos padrões de óleo USGS84, USGS86 e USGS87. A incerteza analítica da medida nos dois CF-IRMS foi estimada (n=10) em $\pm 0,10$ mUr, $\pm 0,9$ mUr e $\pm 0,50$ mUr para $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$, respectivamente.

Análise dos dados

Para determinar os valores médios, as médias aritméticas e desvio padrão foram avaliadas. Para a distribuição dos valores isotópicos, foram utilizados caixas com 25% dos dados e mediana. Para avaliar as proporções das misturas a partir dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ para os dois óleos, foi utilizada a equação 3:

$$mistura = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{oleo2}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{mistura}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{oleo2}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{oleo1}}}. \quad (3)$$

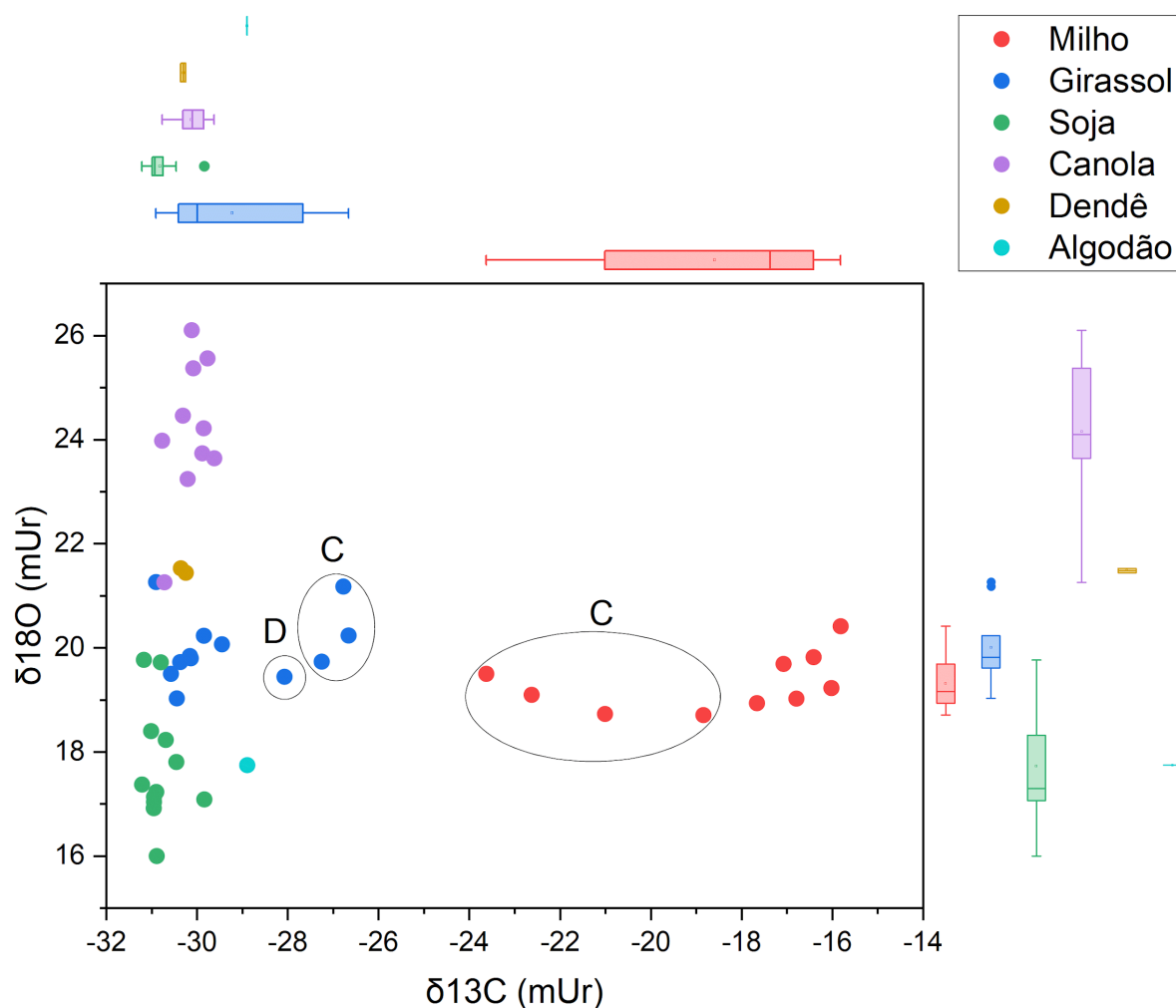
O erro analítico das proporções das misturas foi definido com base nos percentuais entre o esperado e o calculado conforme Nogueira et al. 2016.

3. RESULTADOS

Caracterização isotópica dos óleos vegetais refinados

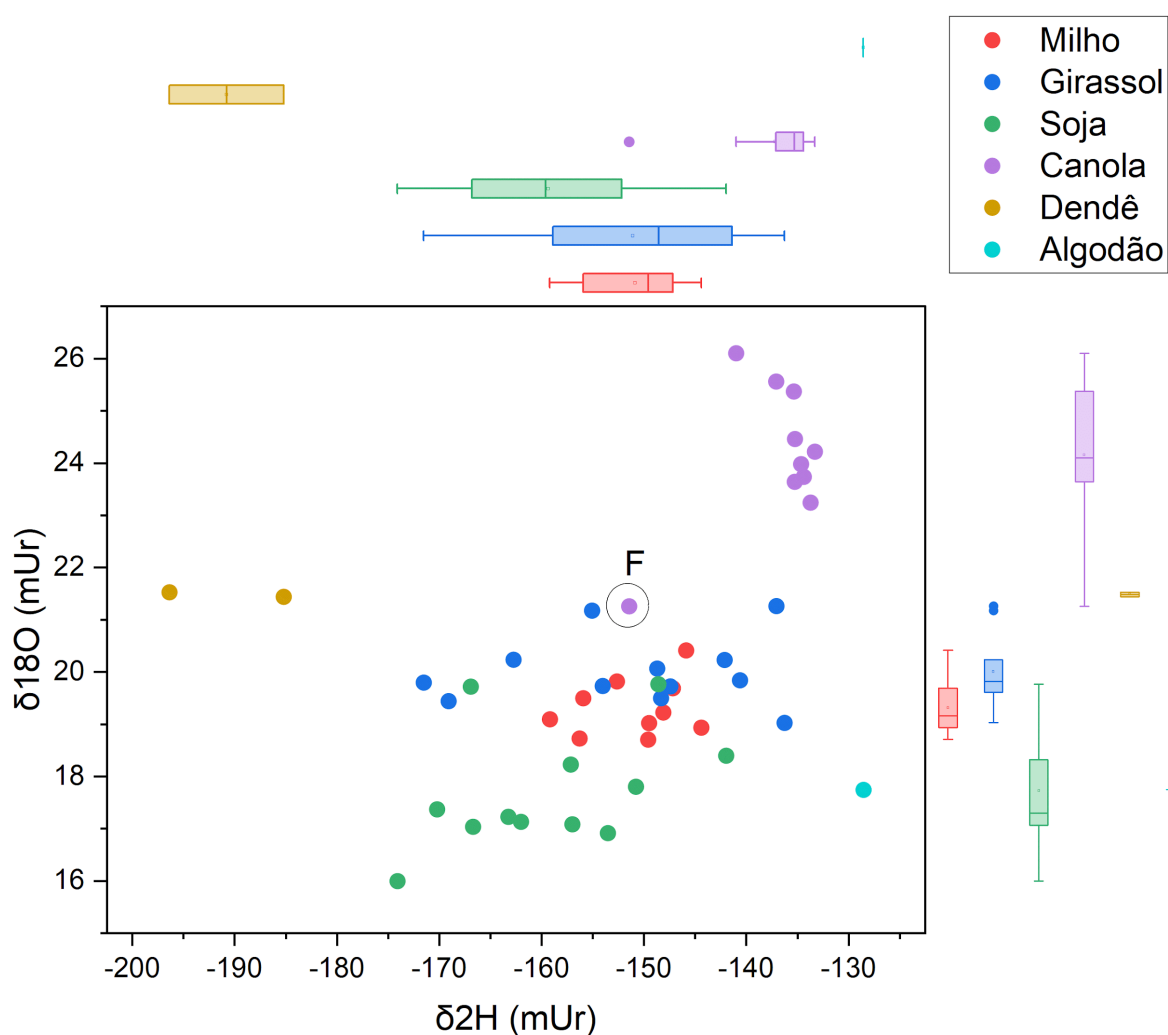
As figuras 1, 2 e 3 apresentam a dispersão dos pontos com distribuição marginal em caixas dos valores $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ para os óleos de milho, girassol, soja, canola, algodão e dendê. Nas figuras 1 e 3 é possível observar que os valores $\delta^{13}\text{C}$ para o óleo de milho são distintos, e não tem sobreposição com os outros tipos de óleo. Observa-se também, para os valores de $\delta^{13}\text{C}$, um grupo de amostras mais distantes da mediana para óleos de milho e girassol, não observado para os óleos de soja e canola.

Figura 1. Dispersão dos pontos com distribuição marginal em caixas dos valores $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de 47 amostras de óleos vegetais refinados. As caixas representam 25% e 75% percentis. Os fabricantes das amostras circuladas são indicados pelas letras C e D.



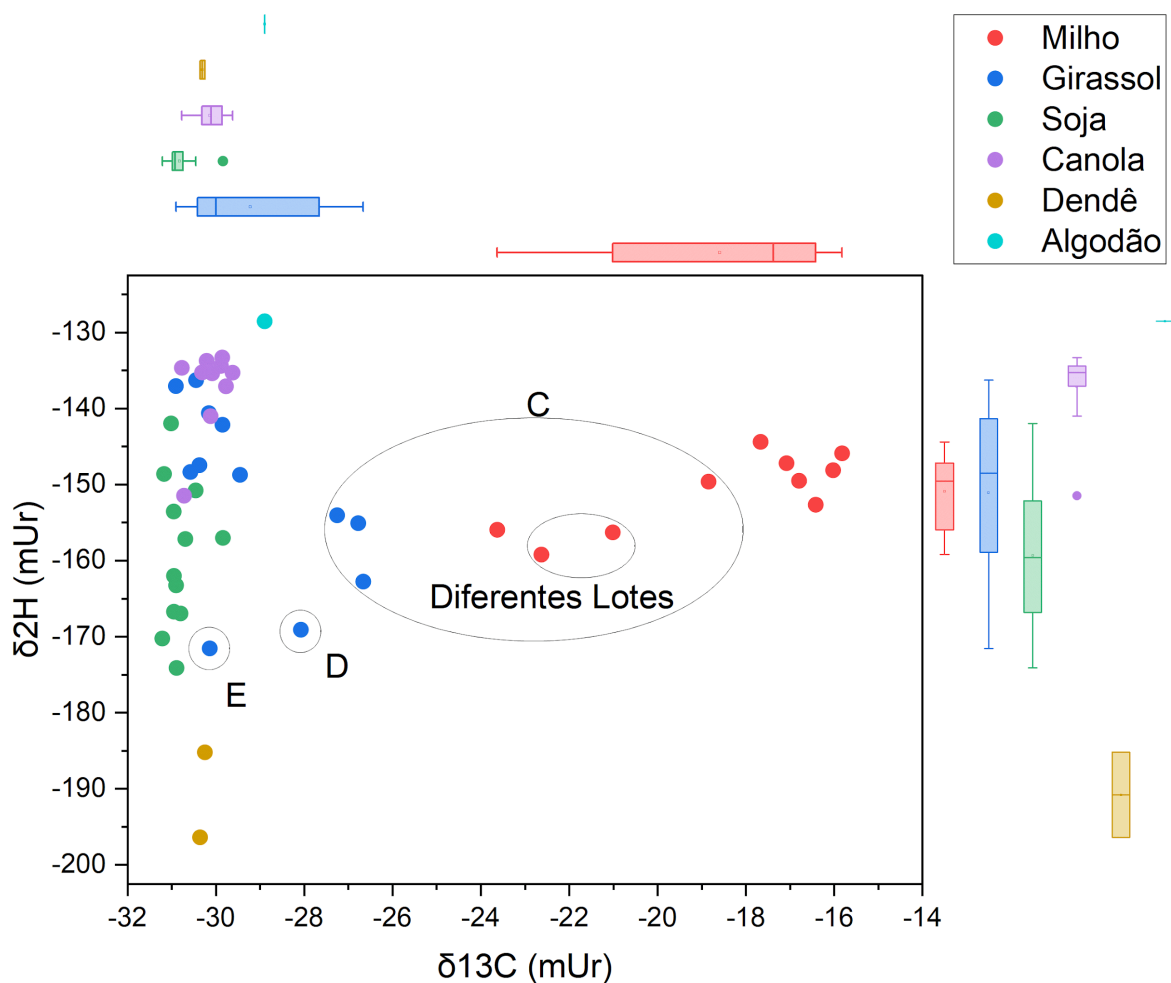
Nas figuras 1 e 2 os valores de $\delta^{18}\text{O}$ para o óleo de canola apresentaram-se distintos dos outros óleos e com uma única amostra em sobreposição com os valores de óleos de girassol. No entanto, as amostras C02m, os dois lotes C06m e C09m apresentam valores intermediários para milho, e outras 4 amostras C02g, C06g, C09g e D11g, para girassol. Nas figuras 2 e 3, a dispersão dos valores de $\delta^2\text{H}$ para as amostras de óleos analisadas apresenta sobreposição dos tipos soja, milho, girassol e canola, com uma amplitude de variação maior para os óleos de girassol e soja.

Figura 2 Dispersão dos pontos com distribuição marginal em caixas dos valores $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ de 47 amostras de óleos vegetais refinados. As caixas representam 25% e 75% percentis. A amostra circulada pertence ao fabricante F.



Na figura 2, a amostra F18c de óleo de canola apresentou valores isotópicos de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ distintos das outras amostras, também observado nas figuras 1 e 3. Além disso, tanto as amostras de óleos de algodão quanto as de dendê apresentaram valores isotópicos distintos de todos os outros tipos de óleo, principalmente para $\delta^2\text{H}$. Na figura 3, além da separação no $\delta^{13}\text{C}$ dos óleos de milho e também dos valores intermediários de milho e girassol dos fabricantes C e D, também é possível observar que a amostra E10g apareceu como mais uma amostra distante das outras do mesmo tipo de óleo, não observado nas figuras 1 e 2.

Figura 3 Dispersão dos pontos com distribuição marginal em caixas dos valores $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ de 47 amostras de óleos vegetais refinados. As caixas representam 25% e 75% percentis. Os fabricantes das amostras circulares são indicados pelas letras C, D e E.



O impacto que os óleos dos fabricantes destacados nas figuras 1, 2 e 3 exercem sobre os valores isotópicos médios e desvios padrão para cada tipo de óleo vegetal refinado estão apresentados na tabela 4

Tabela 4. Valores isotópicos médios e desvio padrão de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ para cada tipo de óleo refinado, em que N representa o número de amostras.

Óleo	N	$\delta^{13}\text{C}$ (mUr)	$\delta^{18}\text{O}$ (mUr)	$\delta^2\text{H}$ (mUr)
Milho	10	-18,59±2,85	+19,32±0,54	-150,9±4,9
Milho*	6	-16,63±0,69	+19,57±0,56	-148,0±2,9
Girassol	12	-29,68±1,58	+20,01±0,66	-149,6±11,8
Girassol*	7	-30,25±0,48	+19,95±0,70	-142,9±5,3
Canola	10	-30,14±0,38	+24,16±1,38	-137,2±5,5
Canola*	9	-30,07±0,34	+24,48±0,98	-135,6±2,3
Soja	12	-30,91±0,37	+17,86±1,13	-158,9±9,6
Algodão	1	-28,90	+17,75	-128,5
Dendê	2	-30,30±0,08	+21,48±0,06	-190,8±7,9

*Representa os grupos amostrais desconsiderando as amostras C02m, C06m, C09m, C02g, C06g, C09g, D11g, F18c e E10g, circuladas nas figuras 1, 2 e 3.

Autenticidade de óleo de milho pela razão isotópica do carbono

A figura 4 traz a relação entre os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ esperados e medidos nas misturas em diferentes proporções de óleo de milho com óleo de soja e óleo de girassol com óleo de milho. Pode-se observar que os valores medidos se encontram mais próximos dos valores esperados nas misturas onde há maior proporção de óleos de soja e girassol, enquanto que nas misturas com 50% e 75% de óleo de milho, os valores medidos estão mais distantes dos valores esperados.

Na tabela 5, são comparados os percentuais das misturas esperadas e medidos, e o erro desta comparação. Observa-se também um erro maior nas misturas medidas com 25% de óleo de milho. Portanto, o erro do método foi estimado na soma da média mais o desvio padrão, resultando em 5,90% para óleo de milho misturado com óleo de soja e 4,97% para óleo de girassol misturado com óleo de milho.

Figura 4. Valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ para as misturas de óleos de milho (m) com soja (s) e de girassol (g) com milho (m).

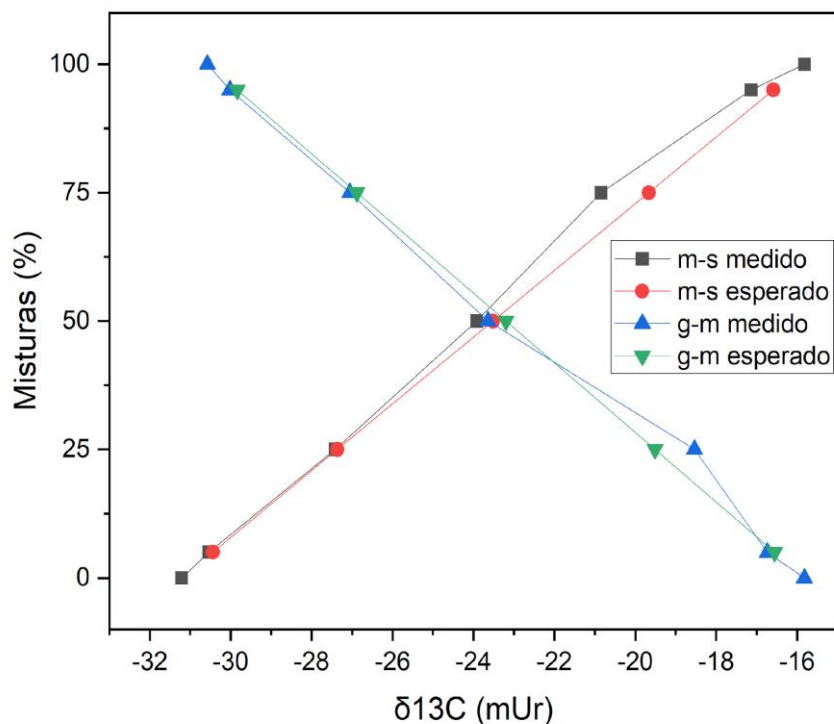


Tabela 5. Percentual e erro de misturas esperadas e medidas de óleo de milho misturado com soja e óleo de girassol misturado com milho. Os valores do erro estão em módulo.

Misturas	Milho com Soja		Girassol com Milho	
	Medido	Erro	Medido	Erro
100,00%	100%		100%	
95,00%	91,43%	3,57%	96,24%	1,24%
75,00%	67,37%	7,63%	76,13%	1,13%
50,00%	47,38%	2,62%	52,99%	2,99%
25,00%	24,64%	0,36%	18,43%	6,57%
5,00%	4,32%	0,68%	6,21%	1,21%
0,00%	0%		0%	
Média		2,97%		2,63%
Desvio Padrão		2,93%		2,34%

4. DISCUSSÃO

Este estudo determinou os valores isotópicos de 47 amostras de óleos vegetais refinados dos tipos milho, girassol, canola, soja, algodão e dendê, e também avaliou o potencial da análise de $\delta^{13}\text{C}$ para distinguir misturas de óleo de milho com soja e óleo de girassol com milho. Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ apresentaram diferenciação entre os tipos de óleo e a análise de $\delta^{13}\text{C}$ para as misturas mostraram-se com erro de até 5,90% do valor esperado. A diferenciação do óleo de milho obtida nas figuras 1 e 3 já era esperada, porque o milho é uma planta com ciclo fotossintético C_4 , diferente do girassol, soja, canola, dendê e algodão, que são plantas com ciclo fotossintético C_3 . A diferenciação isotópica nos valores de carbono $\delta^{13}\text{C}$ para plantas C_3 e C_4 é uma ferramenta importante na caracterização de óleos autênticos dessas plantas (CUCINOTTA et al., 2022; LI et al., 2018; MUHAMMAD et al., 2018; ROSSELL, 1994). Entretanto, a variação máxima dos valores $\delta^{13}\text{C}$ para óleos de milho e girassol nas figuras 1 e 3 deveriam ser menores, como ocorreu para óleos de soja e canola. A maior variação nos valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ para óleos de milho e girassol pode estar associada a presença de amostras adulteradas.

A distinção dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ nas figuras 1 e 2 para óleo de canola pode ter ocorrido devido a sua produção ser concentrada apenas na região sul do país, pois os valores isotópicos de oxigênio podem estar relacionados à localização geográfica. Os valores isotópicos de $\delta^2\text{H}$ nas figuras 2 e 3 também mostram uma menor variação para óleos de canola, enquanto os óleos de soja e girassol apresentam valores com maior variação, podendo ter relação com a origem geográfica das plantas, pois são cultivados em diferentes regiões do país. A relação dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ de óleos vegetais com a origem geográfica já foi explorada anteriormente, quando foi estabelecido padrões isotópicos com valores distintos $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$, onde utilizou-se óleos vegetais da Itália, Peru, Vietnam e EUA (SCHIMMELMANN et al., 2020).

Combinando a dispersão dos valores em dois isótopos, conforme apresentado nas figuras 1, 2 e 3, fica evidente a caracterização isotópica dos tipos de óleos. Na figura 1, as quatro amostras de óleos de milho do fabricante C ficaram separados dos demais óleos de mesmo tipo, tendo valores de $\delta^{13}\text{C}$ semelhantes ao valor visto na figura 4 para mistura de óleos de milho e soja, à uma proporção de 25% até 50%. Isso pode indicar uma adulteração com um óleo extraído de uma planta C_3 , provavelmente o óleo de soja, que possui um menor valor de mercado no Brasil. O mesmo ocorre para o óleo de girassol, porém tendo como possível adulterante o óleo de milho. Isso porque os óleos de girassol dos fabricantes C e D, presentes

na figura 1, possuem valores de $\delta^{13}\text{C}$ na faixa característica de óleo de girassol misturado com 25% de óleo de milho, conforme mostra a figura 4.

A amostra F18c de óleo de canola destacada na figura 2, também está distinta nas figuras 1 e 3, aproximando seus valores a outros tipos de óleos como soja ou girassol, mas não de milho, podendo significar uma adulteração, principalmente com óleo de soja. Outra hipótese seria esse óleo ter sido extraído de canola que foi cultivada em uma região diferente do restante dos óleos de mesmo tipo, podendo apresentar uma variação dos valores de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ não vistas para canola até então, mas já relatada para óleo de oliva (BONTEMPO et al., 2019). Este resultado também pode ter relação com a variação anual da planta, safras diferentes. Em outro estudo, foi comprovada a variação anual dos valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ para óleo de oliva (CHIOCCHINI et al., 2016).

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ apresentados na figura 3 reforçam a separação dos óleos de milho e girassol do fabricante C e o óleo de girassol do fabricante D, assim como na figura 1. Além disso, os resultados da figura 3 mostram a separação da amostra E10g de óleo de girassol, evidenciando a importância da dispersão combinada dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ para identificação de amostras distintas para óleo de girassol.

Os valores de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ para os óleos de algodão e dendê foram capazes de caracterizar as amostras destes óleos, como visto nas figuras 1, 2 e 3. Porém, se tratando de dois tipos de óleo com um baixo número amostral (1 e 2, respectivamente), os resultados não podem ser considerados conclusivos.

Observando os grupos de óleo de milho apresentados na tabela 4, com e sem as amostras circuladas anteriormente nas figuras 1 e 3, é possível notar que a média para $\delta^{13}\text{C}$ aumentou 1,96 mUr e o desvio padrão reduziu em 2,29 mUr. O valor médio de $-16,63 \pm 0,69$ mUr com $n=6$ para $\delta^{13}\text{C}$ no óleo de milho ficou mais próximo do valor de $-15,51 \pm 0,09$ mUr com $n=10$ para o padrão USGS87 de óleo de milho do EUA (SCHIMMELMANN et al., 2020). Para os valores de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$, não houve alteração significativa nas médias, quando excluídas as amostras distintas. Nos grupos de óleos de girassol e canola, não foi observada mudança nos valores médios, apenas no desvio padrão do $\delta^2\text{H}$, com uma diferença de 6,5 mUr para o óleo de girassol e 3,2 mUr para o óleo de canola. Embora apenas uma amostra tenha sido desconsiderada para óleo de canola, a ausência da mesma trouxe uma redução de 0,40 mUr no desvio padrão para o valor médio de $\delta^{18}\text{O}$.

Os resultados presentes na figura 4 e tabela 3 mostram que as misturas com 50% e 75% de óleo adulterante apresentaram o maior erro, porém, essas porcentagens, mesmo considerando o erro, não dispensam as amostras de serem caracterizadas como adulteradas,

embora a quantificação da adulteração não seja tão precisa quanto em proporções mais baixas de adulterante. Já para afirmar a precisão do método na mistura com 5% de adulterante, testes estatísticos seriam necessários.

5. CONCLUSÃO

A caracterização isotópica dos óleos vegetais refinados foi possível de ser realizada, principalmente para os óleos de milho e canola. Por se tratar de uma planta com ciclo fotossintético C_4 , o milho é facilmente diferenciável no $\delta^{13}C$. Já a canola, sendo uma planta cultivada apenas na região sul do país, possui valores característicos de δ^2H e $\delta^{18}O$. A soja é cultivada em regiões mais variadas do Brasil e, por este motivo, sua caracterização não é tão definida, embora seja o principal agente adulterante, e não um alvo de adulteração, devido ao seu valor. Para melhor definir as assinaturas isotópicas dos óleos de soja e girassol, se faz necessário um estudo mais focado na compreensão do fator de enriquecimento no processo de extração dos óleos, evitando e diminuindo as variáveis que podem dificultar a distinção dos dois óleos. Embora os óleos de algodão e dendê tenham se mostrado caracterizados através dos valores de δ^2H e $\delta^{18}O$, o tamanho amostral limitado dos dois tipos não nos permite resultados conclusivos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMI, Laurien; DUTRA, Sandra Valduga; MARCON, Ângela Rossi; CARNIELI, Gilberto João; ROANI, Carlos André; VANDERLINDE, Regina. Geographic origin of southern Brazilian wines by carbon and oxygen isotope analyses. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 24, p. 2943-2948, 22 set. 2010.
- BONTEMPO, L. et al. Characterisation and attempted differentiation of European and extra-European olive oils using stable isotope ratio analysis. **Food Chemistry**, v. 276, p. 782–789, 15 mar. 2019.
- BRAND, W. A.; COPLEN, T. B. Stable isotope deltas: tiny, yet robust signatures in nature. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 48, n. 3, p. 393–409, set. 2012.
- CARTER, J. F; FRY, B. Ensuring the reliability of stable isotope ratio data—beyond the principle of identical treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 405, p. 2799–2814, 30 dez. 2013.
- CHIOCCHINI, F. et al. Isoscapes of carbon and oxygen stable isotope compositions in tracing authenticity and geographical origin of Italian extra-virgin olive oils. **Food Chemistry**, v. 202, p. 291–301, 1 jul. 2016.
- COPLEN, T. B. Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results †, ‡. [s.d.].
- CUCINOTTA, L. et al. Simultaneous evaluation of the enantiomeric and carbon isotopic ratios of Cannabis sativa L. essential oils by multidimensional gas chromatography Published in the topical collection featuring Promising Early-Career (Bio)Analytical Researchers with guest editors Antje. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 1, p. 3, 2022.
- DUCATTI, C. Revista Brasileira de Zootecnia Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. 2007.
- DUTRA, S. V.; ADAMI, L.; MARCON, A. R.; CARNIELI, G. J.; ROANI, C. A.; SPINELLI, F. R.; LEONARDELLI, S.; VANDERLINDE, R. Characterization of wines according the geographical origin by analysis of isotopes and minerals and the influence of harvest on the isotope values. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 141, p. 2148-2153, 1 dez. 2013.
- FARQUHAR, G. D.; EHLERINGER, J. R.; HUBICK, K. T. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [S. l.], p. 503-537, 1 jun. 1989.
- FRY, Brian. **Stable isotope ecology**. 3. ed. Los Angeles: Springer, 2006.

- GEHRE, Matthias; STRAUCH, Gerhard. High-temperature elemental analysis and pyrolysis techniques for stable isotope analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 17, p. 1497-1503, 23 maio 2003.
- HUANG, J. et al. Detection of corn oil in adulterated olive and soybean oil by carbon stable isotope analysis. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 12, n. 3, p. 201–208, 2017.
- IMAZUMI, V. M. et al. Use of stable isotopes of carbon to detect coconut water adulteration. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 3, p. 261–265, 1 maio 2019.
- LI, Y. et al. Detection of olive oil adulteration with waste cooking oil via Raman spectroscopy combined with iPLS and SiPLS. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 189, p. 37–43, 15 jan. 2018.
- NOGUEIRA, ANDRESSA MILENE PARENTE et al. Análise isotópica do carbono e legalidade de polpas, sucos tropicais e néctares comerciais de goiaba. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, [S.l.], v. 34, n. 2, may 2018. ISSN 19839774. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/55941/33717>>. Acesso em: 21 maio 2022. doi:<http://dx.doi.org/10.5380/cep.v35i1.55941>.
- MORAIS, M. C. et al. Stable carbon isotopic composition indicates large presence of maize in Brazilian soy sauces (shoyu). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 70, p. 18–21, 1 jul. 2018.
- MOYER, D. C.; DEVRIES, J. W.; SPINK, J. The economics of a food fraud incident – Case studies and examples including Melamine in Wheat Gluten. **Food Control**, v. 71, p. 358–364, 1 jan. 2017.
- MUHAMMAD, S. A. et al. Variation of $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$ & $\delta^{13}\text{C}$ in crude palm oil from different regions in Malaysia: Potential of stable isotope signatures as a key traceability parameter. **Science & Justice**, v. 58, n. 1, p. 59–66, 1 jan. 2018.
- PAUL, D.; SKRZYPEK, G.; FÓRIZ, I. Normalization of measured stable isotopic compositions to isotope reference scales – a review. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 18, p. 3006–3014, 30 set. 2007.
- PERDIGÃO, A. et al. Identification of the production system of beef cattle by the stable isotope analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, p. 1–7, 8 jan. 2021.
- PRIMROSE, S.; WOOLFE, M.; ROLLINSON, S. Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 12, p. 582–590, 1 dez. 2010.

RENE, A. E. BROOKS, J. et al. Heavy and Light Beer: A Carbon Isotope Approach To Detect C 4 Carbon in Beers of Different Origins, Styles, and Prices. 2002.

RHODES, C. N. et al. The use of stable carbon isotopes to authenticate claims that poultry have been corn-fed. **Food Chemistry**, v. 118, n. 4, p. 927–932, 15 fev. 2010.

ROSSELL, J. B. Stable Carbon Isotope Ratios in Establishing Maize Oil Purity. **Lipid / Fett**, v. 96, n. 8, p. 304–308, 1 jan. 1994.

SANT'ANA, Léa Silvia; DUCATTI, Carlos; RAMIRES, Djalma Gonçalves. Seasonal variations in chemical composition and stable isotopes of farmed and wild Brazilian freshwater fish. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 122, p. 74-77, 1 set. 2010.

SCHIMMELMANN, A. et al. Food matrix reference materials for hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, and sulfur stable isotope-ratio measurements: Collagens, flours, honeys, and vegetable oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 39, p. 10852–10864, 2020.

SOUZA-KRULISKI, C. R. DE et al. Estudo de adulteração em méis brasileiros através de razão isotópica do carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 434–439, abr. 2010.

SPINELLI, F. R. et al. Detection of addition of apple juice in purple grape juice. **Food Control**, v. 69, p. 1–4, 1 nov. 2016.

TIBOLA, C. S. et al. **Economically Motivated Food Fraud and Adulteration in Brazil: Incidents and Alternatives to Minimize Occurrence**. **Journal of Food Science** Blackwell Publishing Inc., , 1 ago. 2018.

WERNER, R. A.; BRAND, W. A. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 7, p. 501–519, 15 abr. 2001.