

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Amanda Lemes Silveira Carvalho

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CACHAÇAS  
UTILIZANDO ESPECTROFLUORIMETRIA E MODELOS QUIMIOMÉTRICOS**

Belo Horizonte

2022

UFMG/ICEX/DQ. 1496<sup>a</sup>

T. 681<sup>a</sup>

Amanda Lemes Silveira Carvalho

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CACHAÇAS  
UTILIZANDO ESPECTROFLUORIMETRIA E MODELOS QUIMIOMÉTRICOS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências - Química.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Jorge Sanches Barbeira

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

C331d Carvalho, Amanda Lemes Silveira.  
2022 Desenvolvimento de métodos analíticos para cachaças  
T utilizando espectrofluorimetria e modelos  
quimiométricos [manuscrito] / Amanda Lemes Silveira  
Carvalho. 2022.  
95 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Paulo Jorge Sanches Barbeira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Cachaça - Teses.  
3. Bebidas destiladas - Teses. 4. Espectroscopia de  
fluorescência - Teses. 5. Análise discriminante -  
Teses. 6. Mínimos quadrados - Teses. 7. Cromatografia  
de gás - Teses. 8. Espectrometria de massa - Teses. 9.  
Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses. 10.  
Preparação de amostra (Química) - Teses. I. Barbeira,  
Paulo Jorge Sanches, Orientador. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**"Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Cachaças Utilizando Espectrofluorimetria e Modelos Quimiométricos"**

**Amanda Lemes Silveira Carvalho**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Paulo Jorge Sanches Barbeira - Orientador  
UFMG

Prof. Rodinei Augusti  
UFMG

Profa. Leticia Malta Costa  
UFMG

Prof. Maria das Graças Cardoso  
UFLA

Prof. Patterson Patrício de Souza  
CEFET-MG

Belo Horizonte, 29 de abril de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Patterson Patricio de Souza, Usuário Externo**, em 03/05/2022, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodinei Augusti, Professor do Magistério Superior**, em 03/05/2022, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Jorge Sanches Barbeira, Professor do Magistério Superior**, em 04/05/2022, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Malta Costa, Professora do Magistério Superior**, em 29/06/2022, às 13:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1428663** e o código CRC **78C8D67B**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por tantas bênçãos recebidas;

Ao meu orientador professor Dr. Paulo Jorge Sanches Barbeira, pela orientação, apoio e confiança durante toda a realização deste trabalho. Agradeço principalmente por me ajudar enxergar saídas em momentos de escuridão;

Aos meus pais, Mauro Lúcio Silveira e Maria Margarida Lemes Silveira, minhas maiores fontes de inspiração e exemplos de força, coragem e resiliência. Obrigada por me ensinarem todos os meus valores e a importância da educação!

Ao meu esposo Vinícius Costa Carvalho, por todo apoio, companheirismo, carinho e compreensão. Obrigada por caminhar sempre comigo!

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e torcida;

À UFMG, pela minha formação e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do curso;

À coordenação, secretaria e aos professores do programa de pós-graduação em Química, pelos ensinamentos;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao LEC-UFMG, por possibilitar o uso de suas instalações e insumos para a execução deste trabalho. A todos os colegas do laboratório pelos ensinamentos, apoio e amizade;

Aos amigos do DQ que tornaram mais leve esta caminhada, em especial à Vânia Teles, Giselle Vaz, Lucas Silva, Juliana Cardoso e Gabriela;

Às alunas que tive oportunidade de acompanhar: Isabelle, Letícia, Clarissa e Tâmila. Agradeço pela amizade, empenho e por contribuírem para a minha formação;

À banca examinadora, por aceitarem avaliar o meu trabalho e pelas valiosas contribuições;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

## Resumo

O objetivo desta tese é a aplicação de métodos quimiométricos em conjunto com a técnica espectrofluorimétrica para a análise de bebidas alcoólicas destiladas, especialmente cachaças, contribuindo para estudos que visam a melhoria do controle da qualidade da bebida símbolo do Brasil. Na primeira aplicação, foi proposto um modelo quimiométrico de classificação supervisionada usando espectros de fluorescência síncrona para discriminar amostras comerciais de cachaça e rum. Os espectros foram pré-processados empregando a primeira derivada com o alisamento Savitzky-Golay, tendo os parâmetros de tamanho da janela e grau do polinômio otimizados usando um planejamento composto central de face centrada. O melhor modelo baseado na análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) foi obtido usando os espectros síncronos registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm conseguindo-se discriminar as duas bebidas com taxas de eficiência de 98%, sensibilidade de 100 e 94% e especificidade de 100 e 92%, nos conjuntos de treinamento e de teste, respectivamente, e baixas taxas de falsos-positivos e falsos-negativos. Na segunda aplicação, foi proposta a classificação de cachaças pela madeira de envelhecimento usando espectros de fluorescência síncrona de amostras comerciais envelhecidas e armazenadas em bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana, em combinação com a PLS-DA. O melhor modelo foi construído usando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm, apresentando taxas de eficiência de 91 a 100%, sensibilidade de 81 a 100% e especificidade de 91 a 100%, nos conjuntos de treinamento e de teste. Na terceira e última aplicação, cachaças comerciais foram classificadas em armazenadas e envelhecidas, também usando os espectros de fluorescência síncrona. O melhor modelo PLS-DA foi obtido usando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm, obtendo taxas de sensibilidade de 86 e 81%, especificidade de 77 e 71% e eficiência de 80 e 75%, nos conjuntos de treinamento e de teste, respectivamente.

*Palavras-chave:* Cachaça. Rum. Espectrofluorimetria. Classificação supervisionada. Espectroscopia de fluorescência síncrona. PLS-DA.

## Abstract

This thesis aimed at the application of chemometric methods in combination with spectrofluorimetry for the analysis of distilled beverages, especially cachaças, contributing to improve the quality control of such symbolic Brazilian beverage. In the first application, a supervised classification model for the discrimination between cachaça samples aged in oak and rum using the synchronous fluorescence spectra was developed. The spectra were preprocessed employing the first derivative with the Savitzky-Golay smoothing, with the parameters (namely, filter width and polynomial order) optimized using a face-centered central composite design. The best suited partial least squares - discriminant analysis (PLS-DA) model was obtained using the synchronous spectra recorded at  $\Delta\lambda = 10$  nm, which was able to discriminate the two classes of beverages with an efficiency of 98%, sensitivity of 100 and 94%, and specificity of 100 and 92%, in the training and test sets, respectively, and low false-positive and false-negative rates. In the second application, a method for the classification of cachaças aged in different woods (namely, bálsamo, oak, jequitibá, and umburana) using the synchronous fluorescence spectra, combined with PLS-DA, of commercial samples aged and stored in barrels was proposed. The best suited model was built using the spectra recorded at  $\Delta\lambda = 30$  nm, showing efficiency rates ranging from 91 to 100%, sensitivity from 81 to 100%, and specificity from 91 to 100%, in the training and test sets. Commercial cachaças were classified as stored and aged using synchronous fluorescence spectra in the third (and last) application. The best PLS-DA model was obtained using the spectra recorded at  $\Delta\lambda = 20$  nm, reaching sensitivity rates of 86 and 81%, specificity of 77 and 71%, and efficiency of 80 and 75%, in the training and test sets, respectively.

*Keywords:* Cachaça. Rum. Spectrofluorimetry. Supervised classification. Synchronous fluorescence spectroscopy. PLS-DA.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de estabelecimentos produtores de Cachaça registrados por regiões e estados do Brasil - 2020. ....	19
Figura 2 - Número de marcas de Cachaça registradas por regiões e estados do Brasil - 2020.	19
Figura 3 - Consumo global (A) e nacional (B) de bebidas alcoólicas - 2018. ....	21
Figura 4 - Diagrama parcial de níveis de energia em um sistema fotoluminescente. ....	22
Figura 5 - Planejamento fatorial $2^2$ com ponto central (A), planejamento composto central $2^2$ em estrela (B) e planejamento composto central $2^2$ de face centrada (C).....	28
Figura 6 - Medidas de pH (A), condutividade elétrica (B) e nefelometria (C) das amostras de rum e cachaça envelhecidas em barris de carvalho .....	39
Figura 7 - Picos cromatográficos registrados em 280 nm para amostras comerciais de rum e cachaça envelhecidas em barris de carvalho .....	40
Figura 8 - Mapa de contorno de espectros de fluorescência síncrona total (A) e espectros de fluorescência síncrona registrados nos diferentes $\Delta\lambda$ (nm) (B) de amostra de cachaça .....	41
Figura 9 - Mapa de contorno de espectros de fluorescência síncrona total (A) e espectros de fluorescência síncrona registrados nos diferentes $\Delta\lambda$ (nm) (B) de amostra de rum.....	42
Figura 10 - Erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e de teste para os experimentos usando os espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 10$ nm .....	43
Figura 11 - Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) para erros de classificação mínimos em conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 10$ nm.....	44
Figura 12 - Espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 10$ nm obtidos para todas as amostras de cachaça (A) e rum (B) .....	46
Figura 13 - Gráfico de escores da PCA construída usando os espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 10$ nm (variância explicada): escores de PC1 (A); escores de PC2 (B); escores de PC3 (C). ....	47
Figura 14 - Previsões de $Y$ para modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 10$ nm para classe de cachaça. ....	48
Figura 15 - Probabilidade de previsão de $Y$ 1 para modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 10$ nm para classe de cachaça. ....	49
Figura 16 - VIP escores do modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 10$ nm para classificação de cachaças e rums .....	50
Figura 17 - Vetores de regressão do modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 10$ nm para classificação de cachaças e rums.....	50
Figura 18 - Medidas de pH (A), condutividade elétrica (B) e nefelometria (C) das amostras de cachaça armazenadas ou envelhecidas em barris de bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana .....	56
Figura 19 - Picos cromatográficos registrados em 280 nm para amostras comerciais de cachaça armazenadas ou envelhecidas em barris de bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana .....	57

Figura 20 - Espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 10$ a 100 nm para cachaças comerciais envelhecidas em barris de bálsamo (A), carvalho (B), jequitibá (C) e umburana (D) .....	58
Figura 21 - Espectros de fluorescência síncrona dos marcadores químicos de envelhecimento de bebidas em madeira: ácido elágico (A), ácido gálico (B), ácido siríngico (C), ácido vanílico (D), cumarina (E), sinapaldeído (F), siringaldeído (G) e vanilina (H); e corante caramelo (I) 59	59
Figura 22 - Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) para erros de classificação mínimos no conjunto teste para espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 30$ nm .....	62
Figura 23 - Espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 30$ nm obtidos para as amostras de cachaça envelhecidas em bálsamo (A), carvalho (B), jequitibá (C) e umburana (D). .....	63
Figura 24 - Gráfico de escores da PCA construída usando os espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 30$ nm (variância explicada): escores de CP1 (A); escores de CP2 (B); escores de CP3 (C); escores de CP4 (D); escores de CP5 (E).....	64
Figura 25 - Previsões de $Y$ para modelo PLS2-DA construído usando espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 30$ nm para cachaça envelhecida por madeira utilizada no processo de envelhecimento: bálsamo (A); carvalho (B); jequitibá (C); e umburana (D). .....	66
Figura 26 - VIP escores do modelo PLS2-DA construído usando espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 30$ nm para a classificação de cachaças pela madeira utilizada no processo de envelhecimento: bálsamo (A); carvalho (B); jequitibá (C); e umburana (D).....	68
Figura 27 - Evolução das medidas de pH (A), condutividade elétrica (B) e nefelometria (C) das amostras de cachaça armazenadas em A (amendoim), B (bálsamo), C (carvalho), J (jequitibá) e U (umburana) em função do tempo de armazenamento.....	74
Figura 28 - Medidas de pH (A), condutividade elétrica (B) e nefelometria (C) das amostras de cachaça comerciais armazenadas e envelhecidas em A (amendoim), B (bálsamo), C (carvalho), J (jequitibá) e U (umburana) .....	76
Figura 29 - Evolução dos picos cromatográficos registrados em 280 nm para amostra de cachaça armazenada em barris de A (amendoim), B (bálsamo), C (carvalho), J (jequitibá) e U (umburana).....	77
Figura 30 - Espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 20$ nm de cachaça armazenada em barris de amendoim (A), bálsamo (B), carvalho (C), jequitibá (D) e umburana (E) por períodos de 1, 3, 6, 12 e 24 meses.....	78
Figura 31 - Erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para os modelos PLS-DA construídos usando os espectros de fluorescência síncrona registrados nos diferentes $\Delta\lambda$ .....	79
Figura 32 - Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) para erros de classificação mínimos nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 20$ nm .....	80
Figura 33 - Previsões de $Y$ para modelo PLS-DA construído usando espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 20$ nm para cachaças armazenadas e envelhecidas em amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana por período de envelhecimento: armazenadas e envelhecidas.....	81

Figura 34 - VIP escores do modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm para classificação de cachaças em armazenadas e envelhecidas ..82

Figura 35 - Vetores de regressão do modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm para classificação de cachaças em armazenadas e envelhecidas.....82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de estudos usando espectroscopia de fluorescência síncrona na análise de diferentes bebidas .....	24
Tabela 2 - Planejamento composto central de face centrada para os parâmetros do alisamento Savitzky-Golay nos espectros de fluorescência síncrona .....	32
Tabela 3 - Matriz do planejamento composto central de face centrada para avaliação dos fatores do alisamento Savitzky-Golay nos espectros de fluorescência síncrona.....	32
Tabela 4 - Resumo de estudos envolvendo a diferenciação entre cachaça e rum .....	35
Tabela 5 - Resumo de estudos envolvendo a discriminação de bebidas por tipos usando a SFS .....	36
Tabela 6 - Tamanho da janela, grau do polinômio e erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para cada modelo $\Delta\lambda$ (nm) .....	45
Tabela 7 - Número de amostras, $\Delta\lambda$ (nm) e desempenho dos modelos de classificação supervisionada usando SFS aplicados a outras bebidas .....	51
Tabela 8 - Resumo de estudos descritos na literatura para diferenciação de cachaças armazenadas e envelhecidas em diferentes barris de madeira.....	53
Tabela 9 - Propriedades de fluorescência e potenciais fluoróforos em cachaças envelhecidas	61
Tabela 10 - Erros de classificação no conjunto de teste para as classes <i>B</i> (bálsamo), <i>C</i> (carvalho), <i>J</i> (jequitibá) e <i>U</i> (umburana) nos modelos PLS2-DA construídos para cada $\Delta\lambda$ .....	61
Tabela 11 - Parâmetros de desempenho estimados para o modelo PLS2-DA construído com espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 30$ nm para a discriminação de cachaças pela madeira utilizada no processo de envelhecimento. <i>B</i> (bálsamo); <i>C</i> (carvalho); <i>J</i> (jequitibá); <i>U</i> (umburana).....	67
Tabela 12 - Número de amostras e desempenho dos modelos de classificação supervisionada para classificação de cachaças por madeira utilizada no envelhecimento.....	69
Tabela 13 - Resumo de estudos envolvendo a separação e discriminação de bebidas alcoólicas destiladas por tempo de envelhecimento .....	70
Tabela 14 - Parâmetros de desempenho estimados para o modelo PLS-DA construído com espectros de fluorescência síncrona registrados em $\Delta\lambda = 20$ nm para a discriminação de cachaças em armazenadas ( <i>A</i> ) e envelhecidas ( <i>E</i> ) .....	81
Tabela 15 - Desempenho de modelos de discriminação de cachaça por período de envelhecimento .....	83

## **LISTA DEQUADROS**

Quadro 1 - Limites de componentes presentes na aguardente de cana e na cachaça.....17

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANN** *Artificial Neural Network* (rede neural artificial)
- CCD** *Central Composite Design* (planejamento composto central)
- CP** Componente principal
- CVCE** *Cross Validation Classification Error* (erro de classificação na validação cruzada)
- EEM** *Excitation-Emission Matrix* (matriz de excitação-emissão)
- EFF** Taxa de eficiência
- ESI-MS** *ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry* (espectrometria de massas com ionização por *electrospray*)
- DSA** *Descriptive Sensory Analysis* (análise sensorial descritiva)
- FN** Resultado falso-negativo
- FP** Resultado falso-positivo
- GC-FID** *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector* (cromatografia gasosa – detector de chama)
- GC-MS** *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (cromatografia gasosa - espectrometria de massa)
- GCO** *Gas Chromatography-Olfactometry* (cromatografia gasosa – olfatometria)
- GDA** *General Discriminant Analysis* (análise discriminante geral)
- GCxGC-MS** *two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry* (cromatografia gasosa bidimensional – espectrometria de massa)
- HCA** *Hierarchical Cluster Analysis* (análise de agrupamentos por métodos hierárquicos)
- HPA's** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
- HPLC** *High Performance Liquid Chromatograph* (cromatografia líquida de alta eficiência)
- IBRAC** Instituto Brasileiro da Cachaça
- Inmetro** Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- k-NN** *k-Nearest Neighbor* (método dos k-ésimos vizinhos mais próximos)
- LDA** *Linear Discriminant Analysis* (análise linear discriminante)
- MAPA** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- N-PLS-DA** *N-way Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (análise discriminante por quadrados mínimos parciais multilinear)
- PARAFAC** *Parallel Factor Analysis* (análise de fatores paralelos)
- PCA** *Principal Component Analysis* (análise de componentes principais)
- PLS** *Partial Least Squares* (quadrados mínimos parciais)

**PLS-DA** *Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (análise discriminante por quadrados mínimos parciais)

**RAC** Regulamento de Avaliação de Conformidade da Cachaça

**SEN** Taxa de sensibilidade

**SFS** *Synchronous Fluorescence Spectroscopy* (espectroscopia de fluorescência síncrona)

**SPE** Taxa de especificidade

**SVM** *Support Vector Machines* (máquinas de vetores de suporte)

**TFN** Taxa de falso-negativos

**TFP** Taxa de falso-positivos

**UV-Vis** Espectrofotometria molecular na região ultravioleta-visível

**VL** Variável latente

**VN** Resultado verdadeiro negativo

**VP** Resultado verdadeiro positivo

## SUMÁRIO

1. Relevância do trabalho .....	15
2. Introdução.....	17
2.1. Cachaça.....	17
2.2. Espectroscopia de Fluorescência Síncrona.....	21
2.3. Análise Discriminante pelo Método dos Quadrados Mínimos Parciais.....	25
2.4. Planejamento Composto Central .....	28
3. Objetivos .....	29
3.1. Objetivos gerais .....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. Experimental .....	30
4.1. Análises físico-químicas.....	30
4.1.1. pH .....	30
4.1.2. Condutividade elétrica.....	30
4.1.3. Nefelometria .....	30
4.2. Cromatografia Líquida de alta eficiência.....	30
4.3. Espectroscopia de fluorescência síncrona .....	31
4.4. Análise de dados.....	31
4.4.1. Pré-processamento dos espectros .....	31
4.4.2. Análise Exploratória.....	32
4.4.3. Classificação Supervisionada .....	32
5. Discriminação de amostras comerciais de cachaça e de rum.....	34
5.1. Revisão Bibliográfica .....	34
5.2. Amostras.....	37
5.3. Resultados e Discussão.....	37
6. Discriminação de cachaças por madeira utilizada no envelhecimento .....	52
6.1. Revisão Bibliográfica .....	52
6.2. Amostras.....	54
6.3. Resultados e Discussão.....	55
7. Discriminação de cachaças comerciais segundo o tempo de envelhecimento.....	70
7.1. Revisão Bibliográfica .....	70
7.2. Amostras.....	73
7.3. Resultados e Discussão.....	73
8. Conclusões gerais e perspectivas .....	84
9. Referências .....	85



## 1. Relevância do trabalho

Este trabalho apresenta impacto direto na área de Química de Alimentos e Bebidas, através do desenvolvimento de métodos analíticos para a classificação de bebidas alcoólicas destiladas, especialmente a cachaça. Os métodos foram desenvolvidos usando a espectrofluorimetria síncrona, em conjunto com a análise quimiométrica, que auxiliou na otimização e no tratamento multivariado dos dados. As informações obtidas nesse trabalho são importantes para fiscalização e investigações para mapeamento de fraudes, por meio de ensaios simples e rápidos.

Uma abordagem da tese envolve o processo de envelhecimento de cachaças em recipientes de madeira, uma importante etapa na produção de aguardentes, influenciando fortemente a sua composição química, o aroma, o sabor e a cor. Várias reações estão associadas a este processo, que é altamente dependente de fatores como a madeira, o tamanho e o pré-tratamento dos barris, as condições ambientais de armazenamento e o tempo de envelhecimento. Considerando que o processo de envelhecimento é a etapa mais demorada e que mais agrega valor na produção de bebidas alcoólicas, atividades fraudulentas podem ocorrer tanto na declaração de realização do envelhecimento, quando este processo não foi realizado, quanto na declaração de tempo de envelhecimento superior ao que foi de fato realizado, bem como na declaração distinta da madeira utilizada no processo. O controle e o entendimento desses fatores são importantes para a verificação da qualidade da bebida e de padrões de envelhecimento, juntamente com a autenticidade das informações fornecidas ao consumidor dessas bebidas.

Na primeira aplicação desta tese, foi proposto um modelo quimiométrico de classificação supervisionada usando espectros de fluorescência molecular síncrona para discriminar amostras comerciais de cachaça e rum. Segundo o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, a cachaça é produzida exclusivamente no Brasil, a partir da destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, enquanto o rum é produzido a partir da destilação do fermentado do melaço ou da mistura de destilados de fermentados de melaço e de caldo de cana [1]. A distinção das duas bebidas é importante, uma vez que podem ocorrer problemas durante a sua comercialização.

Na segunda aplicação, foi desenvolvido um modelo de classificação de cachaças pela madeira utilizada em seu armazenamento ou envelhecimento, também utilizando a espectroscopia de fluorescência molecular síncrona. O desenvolvimento de um método rápido

e simples, como o proposto, pode auxiliar no controle fiscal desta bebida, por meio da comprovação da madeira utilizada para o envelhecimento.

A terceira e última aplicação desta tese apresenta a classificação supervisionada das amostras comerciais de cachaça entre armazenadas e envelhecidas, em função do tempo de armazenamento em barris de madeira. Segundo a Instrução Normativa n° 13, de 29 de junho de 2005, a cachaça só é considerada envelhecida quando pelo menos 50% do seu conteúdo foi envelhecido em barris de madeira de até 700 L de capacidade por período mínimo de um ano [2]. As demais cachaças que passam por barris de madeira são consideradas armazenadas. Este método foi desenvolvido com o objetivo de buscar padrões de agrupamento para as cachaças armazenadas e envelhecidas em barris de carvalho e madeiras nativas (amendoim, bálsamo, jequitibá e umburana), a partir de um modelo quimiométrico de classificação supervisionada, utilizando também a espectroscopia de fluorescência molecular síncrona, contribuindo para a fiscalização dessa bebida.

## 2. Introdução

### 2.1. Cachaça

A produção de cachaça iniciou-se pouco tempo depois do início da produção de açúcar no Brasil, a partir da observação de que o caldo obtido no processo fermentava espontaneamente, produzindo um líquido com cheiro e sabor diferenciados. Esse líquido, após destilado, era transparente e ardente, dando origem ao nome aguardente de cana [3].

Segundo o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54 % v v<sup>-1</sup>, a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou por meio da destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até a concentração de 6 g L<sup>-1</sup>, expressos em sacarose. Já a cachaça é a aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% v v<sup>-1</sup>, a 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L<sup>-1</sup> [1]. A Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, determina os padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça, entre os quais estão os limites dos congêneres presentes para as bebidas [2] (Quadro 1).

Quadro 1 - Limites de componentes presentes na aguardente de cana e na cachaça

Componente	Unidade	Limites	
		Mínimo	Máximo
Acidez volátil, em ácido acético	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	-	150
Ésteres, em acetato de etila	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	-	200
Aldeídos, em aldeído acético	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	-	30
Furfural + hidroximetilfurfural	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	-	5
Álcoois superiores*	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	-	360
Congêneres**	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	200	650
Açúcares***	g L <sup>-1</sup>	-	30
Álcool metílico	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	-	20
Carbamato de etila	µg L <sup>-1</sup>	-	210
Acroleína	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	-	5
Álcool sec-butílico	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	-	10
Álcool n-butílico	mg 100 mL <sup>-1</sup> álcool anidro	-	3

\* Álcoois superiores = soma dos álcoois isobutílico, isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol).

\*\* Congêneres = soma da acidez volátil, aldeídos, ésteres totais, furfural + hidroximetilfurfural e álcoois superiores.

\*\*\* Aguardente de cana e cachaça "adoçada" = máximo 30,0 g L<sup>-1</sup>.

Fonte: Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005 [2]

A qualidade da aguardente de cana-de-açúcar e da cachaça é influenciada por diversos fatores, como a matéria-prima utilizada e os processos envolvidos na fermentação, destilação e armazenamento, além do envelhecimento. Levando em consideração todas as combinações de variedades de cana-de-açúcar, tipos de solo e seus nutrientes, temperatura, clima e índice de chuvas, o universo sensorial nestas bebidas é muito vasto. Além disso, quando a cachaça é envelhecida em tonéis de madeira, este universo aumenta mais ainda, uma vez que são empregadas diversas madeiras, como o tradicional carvalho, e diferentes nativas brasileiras como umburana, jequitibá, freijó, amendoim, ipê e bálsamo, dentre outras. Ainda podem ser realizadas misturas ou *blends* - quando diferentes proporções de cachaça são envelhecidas por diferentes períodos ou em diferentes tipos de madeira, o que também aumenta a variedade sensorial da cachaça, conferindo uma elevada complexidade à bebida.

Segundo a Instrução Normativa nº 13, a cachaça apresenta coloração incolor quando armazenada em recipientes de madeira que não agregam cor à bebida ou em recipientes de aço inox ou outro material permitido. Nestes casos, poderá ser associada à marca a expressão “*prata*”, clássica ou tradicional. Quando a cachaça apresenta tonalidades variando do amarelo ao marrom, significa que a bebida foi armazenada em recipientes de madeira e, quando há alteração substancial da sua coloração, poderá ser associada à marca a expressão “*ouro*”. Além disso, é vedado o uso de corantes de qualquer tipo, extrato, lascas de madeira, maravalhas ou outras substâncias para correção ou modificação da coloração original do produto armazenado ou envelhecido, com exceção do corante caramelo para correção e/ou padronização da cor da cachaça envelhecida [2].

Conforme dados do Anuário da Cachaça, os produtores de cachaça e aguardente de cana totalizaram 1.131 estabelecimentos registrados em 2020 [4]. Entretanto, segundo o Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC), existem mais de 11.000 estabelecimentos produtores de cachaça no Brasil, embora o número de registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) seja muito menor [5], o que evidencia a elevada informalidade do setor. Minas Gerais concentra o maior número de estabelecimentos produtores, seguido por São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Figura 1). A produção de cachaça foi realizada em todos os estados brasileiros em 2020, com exceção apenas de Roraima e Amapá [4].

O número de marcas registradas em 2020 foi de 4.743, com o estado de Minas Gerais apresentando o maior número, seguido por São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. A concentração de marcas de produto cachaça permanece na região Sudeste, representando cerca de 70% (Figura 2). Em relação ao ano de 2019, os números de estabelecimentos produtores e marcas registradas cresceram cerca de 7 e 18%, respectivamente [4]. O município mineiro de

Salinas se destacou com o maior número de marcas e registros e recentemente recebeu o título de Capital Nacional da Cachaça [6].

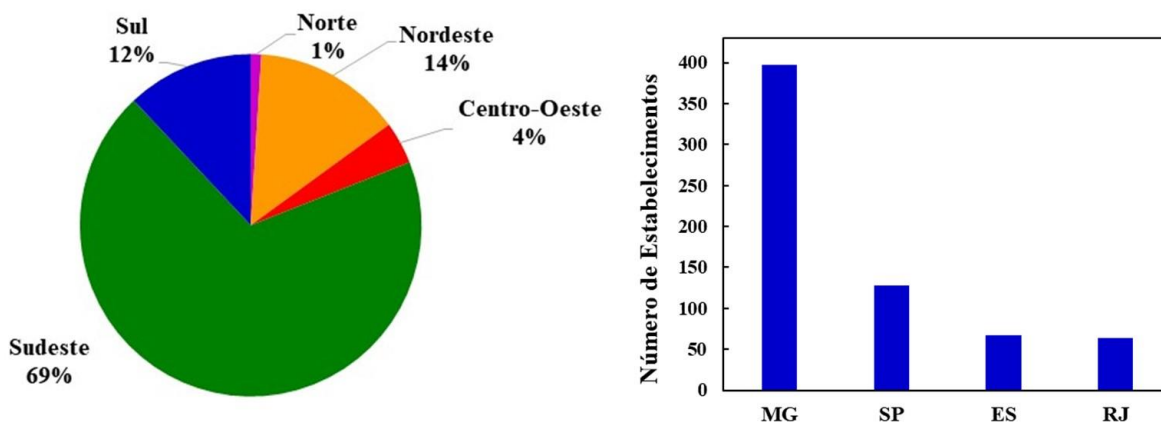


Figura 1 - Número de estabelecimentos produtores de Cachaça registrados por regiões e estados do Brasil - 2020.

Adaptado de [4]

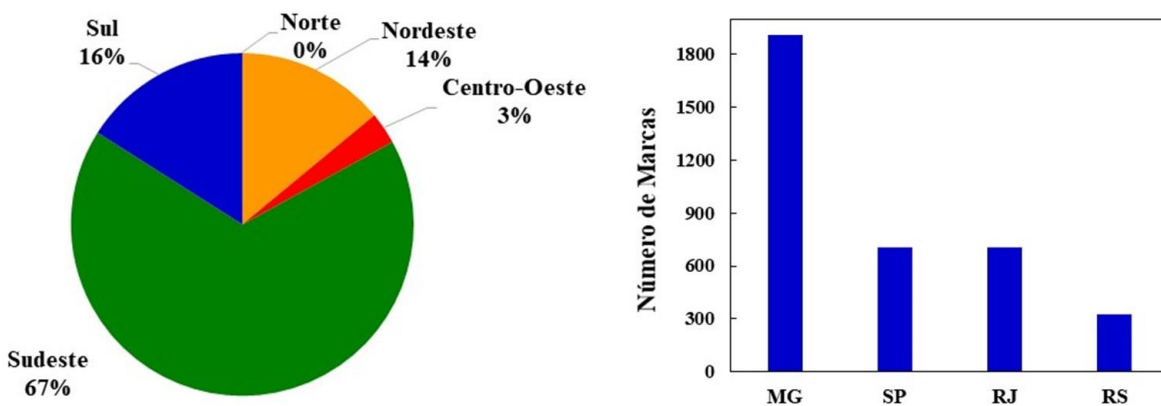


Figura 2 - Número de marcas de Cachaça registradas por regiões e estados do Brasil - 2020.

Adaptado de [4]

Segundo dados do IBRAC, a produção anual de cachaça no Brasil é menor que 800 milhões de litros, embora a capacidade instalada de produção seja de cerca de 1,2 bilhões de litros [5]. No ano de 2021, foram exportados mais de 7 milhões de litros de cachaça para 67 países, gerando a receita de US\$ 13,2 milhões. Em relação ao ano de 2020, houve um crescimento de quase 30% em volume e de mais de 38% na receita [5]. Os principais destinos da cachaça em 2021 foram Paraguai, Alemanha, Estados Unidos, Portugal e França. O estado

de São Paulo se destacou como o maior exportador de cachaça no ano de 2021, com 43,7% em volume exportado e os seis maiores estados exportadores (São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Ceará, Minas Gerais e Paraná) somaram quase US\$ 9 milhões, representando cerca de 93% das exportações [5].

Atualmente, a cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil, sendo superada apenas pela cerveja. No mercado interno, os esforços dos setores públicos e privados, visando o fortalecimento e o aumento do mercado consumidor da bebida, objetivam a sua valorização e a difusão da cultura de seu consumo consciente. A certificação, atestado concedido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) comprovando que a produção da bebida seguiu o Regulamento de Avaliação de Conformidade da Cachaça (RAC) é muito positiva para o mercado consumidor, pois transmite confiabilidade quanto às boas práticas nas etapas de produção, demonstrando sinais favoráveis de sustentabilidade, segurança alimentar, responsabilidade social e proteção ao meio ambiente [7]. Essa medida também objetiva a expansão do consumo da cachaça no mercado externo. Atualmente a cachaça é o terceiro destilado produzido localmente mais consumido no mundo, superado pelo soju coreano e a vodka [5]. O Brasil está entre os maiores mercados consumidores de destilados no mundo, atrás apenas da China, Índia, Estados Unidos, Coreia do Sul e Rússia.

Segundo dados do Euromonitor International, o consumo global de bebidas alcoólicas no ano de 2017 foi de mais de 22 trilhões de litros LAE (álcool equivalente), representando a receita de cerca de US\$ 1,6 trilhão [8]. Segundo dados da OMS, as bebidas destiladas são as bebidas alcoólicas mais consumidas no mundo, seguido pela cerveja e pelo vinho, enquanto no Brasil, a cerveja lidera o consumo, seguido dos destilados e do vinho (Figura 3). O consumo estimado de álcool puro por pessoa, com 15 anos ou mais, em 2018 foi de 6,2 litros no mundo e de 7,4 litros no Brasil. Preocupantemente, estima-se que mais de 25% do álcool consumido no mundo em 2018 teve origem ilegal, ou seja, resultante de contrabando, falsificações, não pagamento de impostos ou produção informal não registrada. No Brasil, a porcentagem de consumo de álcool ilegal foi estimada em cerca de 15% do consumo anual [9].

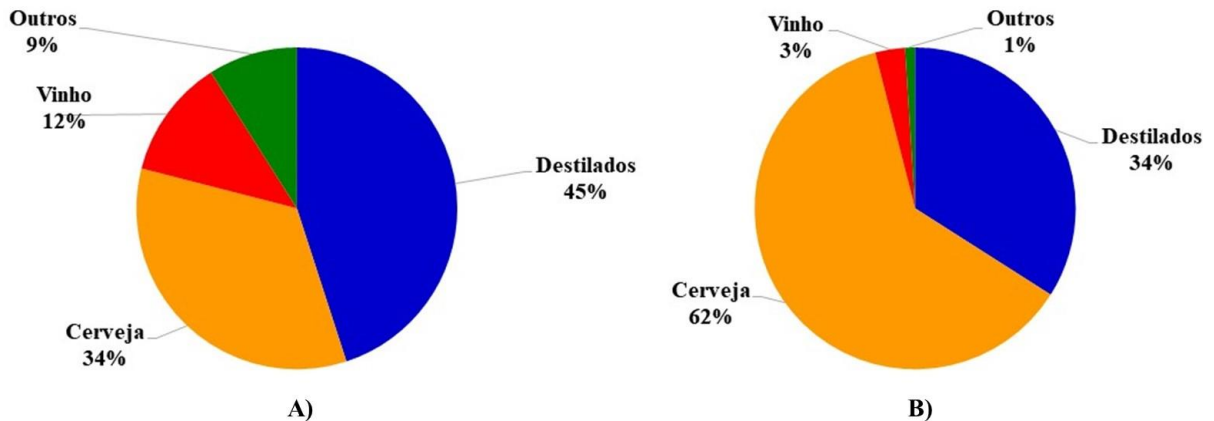


Figura 3 - Consumo global (A) e nacional (B) de bebidas alcoólicas - 2018.  
Adaptado de [9]

O mercado global de bebidas alcoólicas tem apresentado pequeno crescimento nos últimos anos, em razão da forte retração das vendas de cervejas e do aumento das vendas de destilados, que tem se beneficiado pelo maior interesse pelas bebidas consideradas “*premium*”. Essas tendências têm proporcionado um crescimento um pouco maior em receita, apesar do baixo crescimento em volume. Em 2020, a pandemia do COVID-19 atingiu fortemente as vendas de bebidas alcoólicas no mercado de bares, restaurantes e hotéis, que é o principal canal de vendas desse tipo de produto. Além das consequências de curto prazo para as vendas, a pandemia pode trazer mudanças importantes no comportamento do consumidor no médio e longo prazo, o que poderá remodelar a indústria de bebidas alcoólicas [10].

## 2.2. Espectroscopia de Fluorescência Síncrona

Espectroscopia molecular, cromatografia e espectrometria de massas em conjunto com análises multivariadas, são técnicas comumente utilizadas para avaliação da autenticidade de bebidas [11]. Dentre as técnicas espectroscópicas, a fluorescência molecular vem sendo amplamente utilizada devido à sua simplicidade, elevadas sensibilidade e seletividade, bem como ao uso conjunto com a quimiometria [12]. As principais vantagens da espectrofluorimetria em comparação com a espectroscopia eletrônica são as maiores sensibilidade e seletividade e a característica multidimensional [12,13].

Na fluorescência molecular, a excitação dos elétrons acontece por meio da absorção de fótons e as transições eletrônicas não envolvem uma mudança do spin eletrônico e, por isso, os estados excitados possuem tempo de vida mais curto ( $<10^{-5}$  s) do que comparado a fosforescência ( $>10^{-4}$  s), um outro fenômeno fotoluminescente. Uma molécula

fotoluminescente em um estado eletrônico fundamental singlete ( $S_0$ ) absorve um fóton ( $10^{-14}$  a  $10^{-15}$  s) e o elétron pode ser promovido aos vários níveis vibracionais dos estados eletrônicos excitados singlete ( $S_1$  e  $S_2$ ). A emissão de fluorescência acontece em um tempo significativamente maior ( $10^{-5}$  a  $10^{-10}$  s) quando o elétron retorna ao estado eletrônico fundamental [14] (Figura 4).

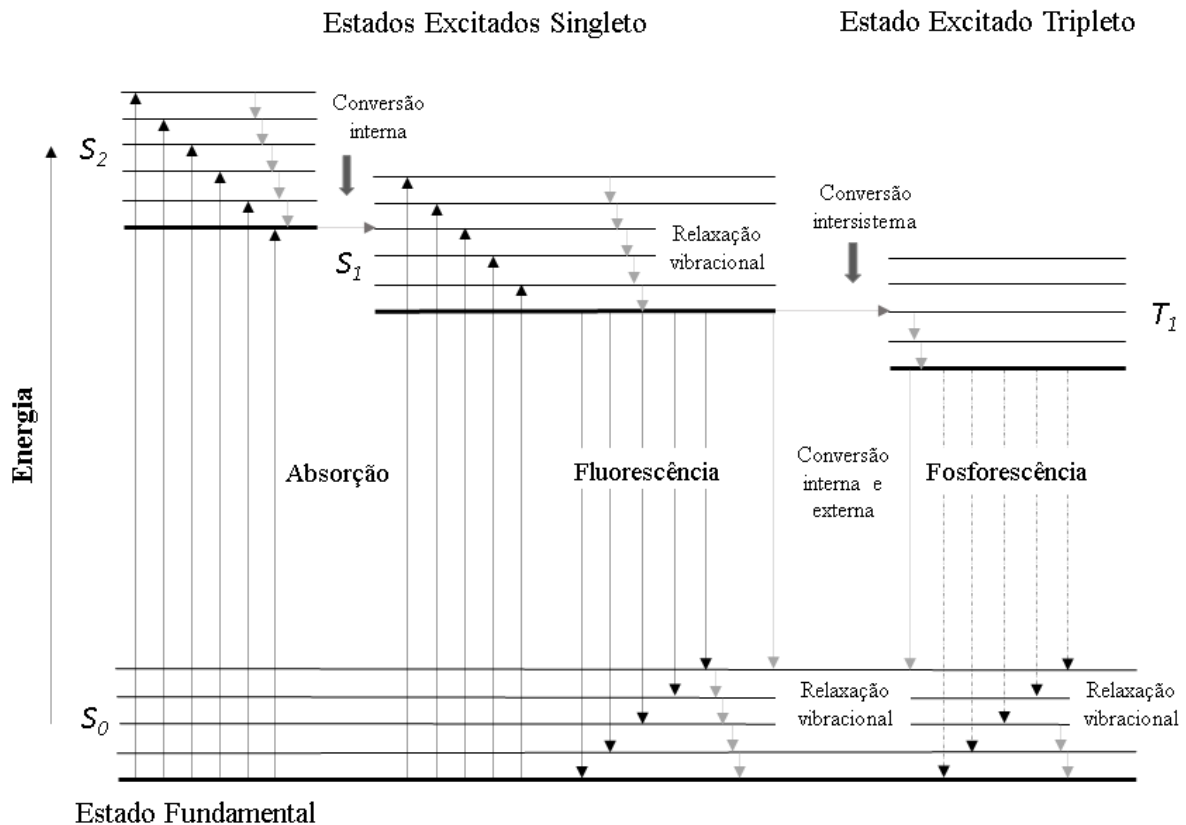


Figura 4 - Diagrama parcial de níveis de energia em um sistema fotoluminescente.  
Adaptado de [16]

Um espectro de emissão é obtido pela varredura de uma faixa de comprimentos de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) quando uma amostra é excitada em um comprimento de onda de excitação fixo ( $\lambda_{ex}$ ). No entanto, a resolução em uma análise multicomponente é insatisfatória, e os espectros de emissão das bebidas são compostos por bandas fluorescentes sobrepostas contendo informações químicas e estruturais de todos os componentes presentes na amostra. Uma caracterização mais extensa de sistemas multifluoróforos é obtida usando espectroscopia de fluorescência síncrona (*Synchronous Fluorescence Spectroscopy*, SFS). Na SFS,  $\lambda_{em}$  e  $\lambda_{ex}$  podem ser varridos simultaneamente com velocidade de varredura constante, resultando em um intervalo de comprimento de onda fixo entre eles ( $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ ) [15]. As principais vantagens



da SFS, em comparação com a espectrofluorimetria convencional, são melhor seletividade, maior sensibilidade e menor interferência de dispersão de radiação [15].

A presença de componentes fluorescentes torna a fluorescência molecular uma técnica altamente relevante em estudos de bebidas. A fluorescência é geralmente observada em compostos orgânicos aromáticos contendo ligações duplas conjugadas e moléculas rígidas e planas, principalmente nas transições de baixa energia  $\pi \rightarrow \pi^*$  [16]. Embora os principais componentes das bebidas não sejam fluorescentes, um número considerável de compostos pertencentes a diferentes classes, e presentes em menores concentrações, exibem fluorescência. As propriedades fluorescentes desses compostos são dependentes do meio, sendo influenciadas pelo solvente, acidez e presença de outros compostos. Os principais componentes fluorescentes em bebidas incluem aminoácidos aromáticos, polifenóis e antocianinas [12].

Em geral, os fluorímetros e espectrofluorímetros empregam a ótica de feixe duplo, com a fonte de radiação dividida em dois feixes. O feixe superior da amostra passa inicialmente pelo monocromador de excitação de comprimento de onda, o qual transmite a radiação que excita a fluorescência, mas exclui ou limita a radiação do comprimento de onda de emissão fluorescente. A fluorescência é emitida pela amostra em todas as direções, sendo mais convenientemente observada em ângulos retos ao feixe de excitação, para minimizar as contribuições do espalhamento da radiação intensa da fonte. Em seguida, a radiação emitida passa pelo monocromador de emissão radiação, que isola a emissão de fluorescência. Esta radiação isolada atinge um fototransdutor, onde é convertido em sinal elétrico para a medida. O feixe de referência passa por um atenuador que reduz sua potência para valor próximo da radiação de fluorescência, atingindo um segundo transdutor, onde é convertido em sinal elétrico. Então o sistema computacional processa o sinal para calcular a razão entre as intensidades de emissão de fluorescência e da fonte de excitação e produz o espectro resultante. Alguns desses equipamentos permitem a realização da varredura simultânea dos comprimentos de onda de excitação e de emissão com uma diferença de comprimento de onda entre eles, resultando no espectro síncrono [16].

A SFS tem sido utilizada com sucesso em combinação com diferentes métodos de classificação e de calibração multivariada para discriminações e quantificações de analitos de interesse em diferentes bebidas. Uma breve descrição desses estudos é apresentada na Tabela 1, com os objetivos, métodos quimiométricos empregados e os tipos de bebidas analisadas.

Tabela 1 - Relação de estudos usando espectroscopia de fluorescência síncrona na análise de diferentes bebidas

<b>Objetivo</b>	<b>Método Quimiométrico</b>	<b>Bebida</b>	<b>Referência</b>
Classificação	PCA, LDA e PARAFAC	Cerveja	[17]
	PCA-LDA e PLS-DA	Cerveja	[18]
	PCA, k-NN, PLS-DA e SVM	Vodca	[19]
	PARAFAC, PLS-DA	Bebidas de frutos	[20]
	PCA e LDA	Vinho branco	[21]
	PCA, PLS-DA, SVM e ANN	Baijiu	[22]
	PCA, PARAFAC e LDA	Brandy	[23]
	PCA e LDA	Vinho	[24]
	HCA, PCA e LDA	Aguardente de ameixa	[25]
	PCA, PLS-DA	Suco de maçã	[26]
	-	Cerveja	[27]
	PCA e LDA	Aguardente de ameixa	[28]
	PCA e LDA	Vinho	[29]
	PCA e LDA	Cerveja	[30]
	PCA, LDA e GDA	Destilados de frutas	[31]
	PCA, PARAFAC e LDA	Destilados de zimbro	[32]
	LDA, GDA, k-NN e SVM	Destilados de zimbro	[33]
	PCA, HCA e LDA	Brandy e vinhos destilados mistos	[34]
	HCA e PCA	Brandy e vinhos destilados	[35]
	PCA	Brandy, uísque, aguardente de ameixa e destilados de zimbro	[36]
-	Cerveja	[37]	
PCA, k-NN e LDA	Cerveja	[38]	
k-NN e LDA	Cerveja	[39]	
Quantificação	PCA e PLS	Cerveja	[40]
	PLS	Vinho	[41]
	-	Vinho	[42]
	PLS	Suco de maçã	[43]
	PLS, MCR-ALS, PARAFAC e MLR	Suco de maçã	[44]
	PLS e MLR	Chá	[45]
	PLS	Brandy	[46]

Objetivo	Método Quimiométrico	Bebida	Referência
Quantificação	PLS	Bebidas tipo cola e energéticas	[47]
	-	Chá	[48]
	-	Bebidas nutricionais	[49]
	PLS	Cerveja	[50]
	PLS	Cerveja	[51]
	-	Água	[52]
Classificação e quantificação	-	Brandy e vinhos destilados mistos	[53]

ANN artificial neural network, GDA general discriminant analysis, HCA hierarchical cluster analysis, k-NN k-nearest neighbor analysis, LDA linear discriminant analysis, MCR-ALS multivariate curve resolution – alternating least squares, MLR multi linear regression, PARAFAC parallel factor analysis, PCA principal component analysis, PLS partial least squares, PLS-DA partial least squares discriminant analysis, SVM support vector machines

Conforme mostrado na Tabela 1, diversas bebidas envelhecidas em recipientes de madeira e não envelhecidas têm sido analisadas usando a SFS, entre elas bebidas alcóolicas fermentadas como cerveja e vinho, e fermento-destiladas como vodca, uísque, brandy, baijiu e aguardentes de frutas e de zimbro. A técnica de SFS tem sido usada em combinação com diferentes métodos de classificação supervisionada para discriminar bebidas por tipo, origem geográfica, marca e tempo de colheita da matéria-prima, além da identificação de amostras adulteradas e monitoramento do armazenamento das bebidas. A SFS também foi usada em combinação com calibração multivariada para a determinação de constituintes nos diferentes tipos de bebidas.

### 2.3. Análise Discriminante pelo Método dos Quadrados Mínimos Parciais

A análise discriminante pelo método dos quadrados mínimos parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*, PLS-DA) é um método multivariado de classificação supervisionada, ou seja, a determinação da classe à qual pertence uma amostra desconhecida é baseada em informações fornecidas inicialmente ao sistema. Neste método, a construção do modelo é muito semelhante a regressão pelo método dos quadrados mínimos parciais (*Partial Least Squares*, PLS) [54]. Na PLS-DA, relaciona-se a matriz de dados espectrais  $X$  (variáveis independentes) com o vetor  $y$  ou matriz  $Y$  (variáveis dependentes), que contém a propriedade de interesse. Valores iguais a 1 ou 0 são atribuídos ao bloco  $Y$ , indicando o pertencimento ou

não a uma determinada classe, respectivamente. Se  $y$  é um vetor, temos um modelo PLS1-DA e se  $Y$  é uma matriz, temos a PLS2-DA, prevendo mais de duas classes simultaneamente. Neste caso, o número de colunas da matriz  $Y$  é igual ao número de classes. Quando são avaliadas mais de duas classes, não obrigatoriamente deve-se usar o modelo PLS2-DA, pode-se também usar o PLS1-DA, prevendo uma classe de cada vez [55].

Os valores previstos pelo modelo PLS-DA não são idealmente iguais a  $1$  ou  $0$ , mas valores reais que devem ser aproximados desses números. Como não são exatos, um limite (*threshold*) é estabelecido para delimitar as classes e se o valor previsto está acima deste limite, a amostra é considerada pertencente à classe em questão. Este *threshold* pode ser calculado baseado na estatística bayesiana, estimado de modo a minimizar os erros de classificação, assumindo que a variância de  $y$  segue uma distribuição semelhante à que será observada para as futuras amostras [56].

Quando a composição das amostras não é controlada, é necessário algum método sistemático para separar as amostras mais representativas do conjunto para a construção do modelo. Esse objetivo é alcançado utilizando diferentes algoritmos tais como o de Kennard-Stone, que realiza a seleção de amostras com maior variabilidade do conjunto total [57]. Para se obter boa representatividade de amostras de todas as classes, o algoritmo deve ser aplicado para cada classe individualmente.

Os blocos  $X$  e  $Y$  são decompostos simultaneamente em uma soma de variáveis latentes ( $VL$ ). As  $VL$  são combinações lineares das variáveis originais, que descrevem simultaneamente a maior parte das informações nos dois blocos de dados. Para a construção de um bom modelo preditivo é essencial a escolha do número correto de  $VL$ , que deve ser realizada por meio da validação cruzada. A estratégia mais comum de validação cruzada para conjuntos de amostras pequenos é o *leave-one-out*, no qual treina-se o modelo com  $n-1$  dados, e o avalia utilizando a observação restante. O procedimento é repetido  $n$  vezes, excluindo em cada momento uma observação diferente. Quando o conjunto amostral é maior, são utilizados os blocos contínuos, os subconjuntos aleatórios ou *venetian blinds*. Em geral, no processo de validação cruzada, vários modelos prévios são construídos, nos quais um bloco de amostras do treinamento é retirado e, com as restantes, constrói-se o modelo e estima-se a classe do bloco de amostras retirado, e isso é repetido para todas as amostras. A média dos erros de previsão é calculada para cada número de  $VL$  e o que apresentar o menor erro será o número de  $VL$  sugerido para o modelo. Este erro é chamado de erro de classificação de validação cruzada (*cross validation classification error, CVCE*).

A detecção de amostras anômalas é realizada a partir da análise do gráfico dos valores de Hotelling ( $T^2$ ) e os resíduos ( $Q$ ) para todas as amostras. A estatística  $T^2$  é dada pela soma dos escores normalizados ao quadrado, e é uma medida da variação de cada amostra no modelo. São excluídas aquelas amostras que apresentam altos valores de  $T^2$  e  $Q$ , simultaneamente, com 95% de confiança, respeitando o limite de remoção de, no máximo, 2/9 do número total de amostras [58,59].

Depois de construído e validado com um conjunto de amostras externas, ou seja, amostras que não foram utilizadas em seu treinamento, o modelo de classificação supervisionada deve ser avaliado quanto aos seus parâmetros de qualidade. A sensibilidade é a habilidade do método em detectar amostras verdadeiramente positivas como positivas enquanto a taxa de sensibilidade ( $SEN$ ) corresponde à probabilidade de um método classificar como positiva uma amostra sabidamente positiva. De maneira análoga, a especificidade ou seletividade corresponde à habilidade do método em detectar amostras verdadeiramente negativas como negativas, sendo a taxa de especificidade ( $SPE$ ) a probabilidade de o método classificar como negativa uma amostra sabidamente negativa [60]. A taxa de falso-positivos ( $TFP$ ) é definida como a razão entre o número de resultados falso-positivos ( $FP$ ) e a soma deste com o número de resultados verdadeiro-negativos ( $VN$ ) e a taxa de falso-negativos ( $TFN$ ) é a razão entre o número de resultados falso-negativos ( $FN$ ) e a soma de  $FN$  com o número de resultados verdadeiro-positivos ( $TP$ ). Eficiência ( $EFF$ ), também denominada de acurácia, é um valor global único para medir o desempenho do modelo de classificação [60].

Esses parâmetros são calculados separadamente para os conjuntos de treinamento e teste, conforme as Equações 1 a 5.

$$SEN = \frac{VP}{VP+FN} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

$$SPE = \frac{VN}{VN+FP} \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

$$EFF = \frac{VN+VP}{VN+FP+VP+FN} \times 100\% \quad \text{Equação 3}$$

$$TFP = \frac{FP}{FP+VN} \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

$$TFN = \frac{FN}{FN+VP} \times 100\% \quad \text{Equação 5}$$

## 2.4. Planejamento Composto Central

O conhecimento sobre quais as variáveis (fatores) afetam um sistema em estudo, bem como a extensão desta influência, são importantes para a melhoria do processo de uma maneira geral. Na abordagem multivariada, são conduzidos o menor número de experimentos necessários para extrair o máximo de informação dos dados coletados para avaliar e/ou otimizar um produto ou processo. Para isto, todos os fatores são alterados simultaneamente em um conjunto de experimentos pré-determinados e as respostas são utilizadas para a construção de modelos matemáticos que descrevem o seu comportamento dentro do domínio experimental investigado [61].

O planejamento composto central (*central composite design*, CCD) é uma ampliação natural do planejamento fatorial com ponto central (Figura 5A), no qual são adicionados pontos axiais que fornecem os níveis adicionais para o cálculo dos coeficientes do modelo quadrático. A distância dos pontos axiais ao centro do planejamento é igual a  $\pm \alpha$ , sendo que  $\alpha$  pode variar de 1 até  $\sqrt{k}$ , onde  $k$  é o número de fatores. O valor de  $\alpha$  depende das propriedades desejáveis para o planejamento e da possibilidade de realização de experimentos ao longo do domínio experimental. Quando  $\alpha = \sqrt{k}$ , temos um planejamento em estrela, com os pontos em uma distribuição octogonal (Figura 5B). Quando  $\alpha = 1$ , os pontos axiais estão localizados sobre as arestas do quadrado para um planejamento fatorial  $2^2$  (Figura 5C) e sobre as faces de um cubo para um planejamento  $2^3$  e é chamado planejamento composto central de face centrada [61-63].

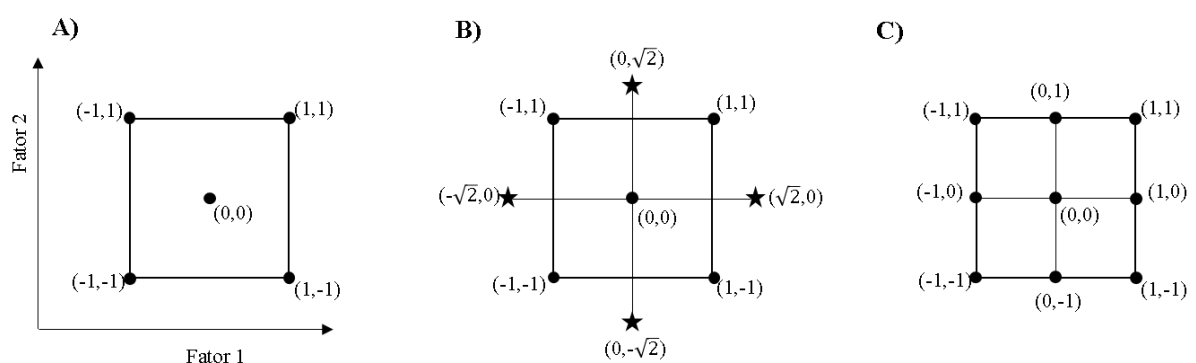


Figura 5 - Planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central (A), planejamento composto central  $2^2$  em estrela (B) e planejamento composto central  $2^2$  de face centrada (C)

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Estudar o envelhecimento da cachaça em diferentes madeiras e desenvolver novos métodos analíticos simples e rápidos para a discriminação de bebidas destiladas utilizando a técnica espectrofluorimétrica em conjunto com a análise quimiométrica, contribuindo para o controle de qualidade dessas bebidas e identificação de fraudes e/ou adulterações.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar diferentes bebidas destiladas a partir de medidas de pH, condutividade elétrica, turbidez e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Discriminar amostras comerciais de cachaça das de rum, utilizando espectrofluorimetria síncrona e PLS-DA;
- Discriminar amostras comerciais de cachaça armazenadas ou envelhecidas em bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana, segundo a madeira de envelhecimento, utilizando espectrofluorimetria síncrona e PLS-DA;
- Discriminar amostras comerciais de cachaça armazenadas e envelhecidas em amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana, segundo o tempo de envelhecimento, utilizando espectrofluorimetria síncrona e PLS-DA.

## **4. Experimental**

### **4.1. Análises físico-químicas**

#### **4.1.1. pH**

O pH das bebidas foi medido em um pHmetro Nova Técnica (Piracicaba, Brasil). Para o ajuste do equipamento, foram utilizadas soluções tampão de pH  $7,00 \pm 0,05$  e  $9,00 \pm 0,05$  adquiridas da Imbralab Química e Farmacêutica Ltda (Ribeirão Preto, Brasil). Após o ajuste do equipamento, o pH das amostras foi medido em triplicata.

#### **4.1.2. Condutividade elétrica**

A leitura da condutividade elétrica das bebidas foi realizada em um medidor de condutividade Nova Técnica (Piracicaba, Brasil) em célula de condutividade com constante de  $0,1 \text{ cm}^{-1}$ . O equipamento foi ajustado usando solução padrão de condutividade  $146,7 \mu\text{S cm}^{-1} \pm 0,5\%$  adquirida da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Indaiatuba, Brasil). Após o ajuste do equipamento, a condutividade elétrica das amostras foi medida em triplicata.

#### **4.1.3. Nefelometria**

A intensidade do sinal da radiação espalhada foi medida no comprimento de onda de emissão de 500 nm, utilizando o mesmo comprimento de onda para a excitação, no espectrofluorímetro RF-5301PC Shimadzu (Duisburg, Alemanha) equipado com uma lâmpada de xenônio, utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. As leituras foram realizadas em triplicata.

### **4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência**

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector com arranjo de diodo (HPLC-DAD) Shimadzu, em coluna Shim-pack CLC ODS (25 cm; 4,6 mm i.d.; 5  $\mu\text{m}$ ) adquirida da Shimadzu (Duisburg, Alemanha). A fase móvel foi composta de metanol de grau HPLC Merck (Darmstadt, Alemanha), ácido acético glacial J.T. Baker (Hampton, EUA) e água tipo I obtida por sistema Milli-Q (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel A foi composta por ácido acético a 2% em água e a fase móvel B composta de metanol - água - ácido acético (70: 28: 2 % v v<sup>-1</sup>). As amostras foram eluídas com os seguintes gradientes: 0 a 110 min (0-100% de B); 110 a 115 min (100-0% de B); 115 a



120 min (0% de B). O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, a vazão da fase móvel foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 20 µL.

### 4.3. Espectroscopia de fluorescência síncrona

Os espectros de fluorescência síncrona foram coletados usando o espectrofluorímetro RF-5301PC Shimadzu (Duisburg, Alemanha) equipado com uma lâmpada de xenônio, em uma cubeta de quartzo de 10 mm x 10 mm x 45 mm. As fendas de excitação e de emissão foram fixadas em 10 nm e a resolução espectral em 1 nm. Os espectros foram coletados varrendo simultaneamente os monocromadores de excitação e emissão, partindo de  $\lambda_{ex} = 220$  nm e da faixa de  $\lambda_{em}$  230-650 nm, com  $\Delta\lambda$  constante entre eles, de 10 a 100 nm em intervalos de 10 nm. As medições de fluorescência foram realizadas em triplicata, e os valores médios foram plotados em função do  $\lambda_{em}$  e como mapas de contorno. O espectrofluorímetro foi verificado diariamente usando uma amostra controle.

### 4.4. Análise de dados

Os modelos quimiométricos foram obtidos utilizando os softwares MATLAB versão 7.10 (R2010A) (The Math Works, Natick, EUA) e PLS Toolbox versão 5.2.2 (Eigenvector Technologies, Manson, EUA). Os planejamentos experimentais foram realizados usando o software Design Expert 11.0 (Stat-Ease, Minneapolis, EUA).

#### 4.4.1. Pré-processamento dos espectros

Para cada  $\Delta\lambda$ , os espectros de fluorescência síncrona foram organizados em uma matriz bidimensional (amostras  $\times$   $\lambda_{em}$ ), e os dados foram tratados separadamente. Os espectros de fluorescência foram pré-processados por meio da primeira derivada com alisamento de Savitzky-Golay [64] e depois os espectros foram centrados na média.

Os parâmetros do alisamento Savitzky-Golay: tamanho da janela e o grau do polinômio foram determinados pelos planejamentos compostos centrais de face centrada (Tabelas 2 e 3). Para selecionar as melhores combinações, os erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste nos modelos PLS-DA foram adotados como resposta.

Tabela 2 - Planejamento composto central de face centrada para os parâmetros do alisamento Savitzky-Golay nos espectros de fluorescência síncrona

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	(-)	0	(+)	$+\alpha$
Tamanho da Janela	11	11	15	19	19
Grau do Polinômio	2	2	4	6	6

Tabela 3 - Matriz do planejamento composto central de face centrada para avaliação dos fatores do alisamento Savitzky-Golay nos espectros de fluorescência síncrona

Experimento	Tamanho da Janela	Grau do Polinômio
1	11	2
2	19	2
3	11	6
4	19	6
5	11	4
6	19	4
7	15	2
8	15	6
9	15	4

#### 4.4.2. Análise Exploratória

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) foi utilizada como uma análise exploratória não supervisionada para visualizar a distribuição das amostras no espaço multivariado e identificar agrupamentos naturais nas amostras que poderiam influenciar a análise de classificação supervisionada.

#### 4.4.3. Classificação Supervisionada

Para a construção dos modelos PLS-DA, os espectros foram divididos em dois conjuntos usando o algoritmo Kennard-Stone aplicado a cada classe separadamente, em que amostras representativas e uniformemente distribuídas foram selecionadas [57]. Assim, os conjuntos de treinamento e teste, compostos por 2/3 e 1/3 das amostras, foram usados para construir e validar os modelos, respectivamente. O bloco de variáveis independentes (bloco  $X$ ) continha as intensidades de fluorescência, e o bloco de variáveis dependentes (bloco  $Y$ ) consistia em uma matriz com valores 1 e 0, dependendo se a amostra pertencia ou não a uma classe específica, respectivamente. Os valores de *threshold* foram calculados usando estatística bayesiana. Se um

valor previsto estivesse acima do limite, a amostra era considerada pertencente à classe. Os blocos  $X$  e  $Y$  foram decompostos simultaneamente em  $VL$ , que foram selecionadas com base no menor valor do  $CVCE$  estimado por validação cruzada de *venetian blinds*.

As amostras que apresentaram simultaneamente resíduo  $Q$  e  $T^2$  de Hotelling acima dos valores críticos a um nível de confiança de 95% foram consideradas anômalas pelo modelo e, conseqüentemente, excluídas. As amostras remanescentes foram novamente processadas e avaliadas quanto aos valores de resíduo  $Q$  e  $T^2$ , sendo excluídas as amostras anômalas respeitando-se o limite de remoção de, no máximo, 2/9 do número total de amostras.

Parâmetros de desempenho como taxas de falso-positivo ( $TFP$ ) e falso-negativo ( $TFN$ ) sensibilidade ( $SEN$ ), especificidade ( $SPE$ ) e eficiência ( $EFF$ ) foram calculados separadamente para conjuntos de treinamento e de teste para avaliar a qualidade do modelo.

## 5. Discriminação de amostras comerciais de cachaça e de rum

### 5.1. Revisão Bibliográfica

Segundo o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, rum é a bebida com graduação alcoólica de 35 a 54% v v<sup>-1</sup>, a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de melão ou de mistura de destilados de caldo de cana-de-açúcar e de melão, envelhecido total ou parcialmente, em recipientes de carvalho ou madeira equivalente, podendo ser adicionado açúcares até 6 g L<sup>-1</sup>. Esse decreto também apresenta três denominações para a bebida: “leve”, quando o coeficiente de congêneres é inferior a 200 mg por 100 mL de álcool anidro; “pesado”, quando o coeficiente de congêneres é de 200 a 500 mg por 100 mL de álcool anidro; e “envelhecido” ou “velho”, quando a bebida foi envelhecida em sua totalidade por um período mínimo de dois anos. A legislação brasileira permite somente os seguintes aditivos: álcool retificado, água, caramelo e xarope de açúcar [1].

O processo de fabricação do rum é dividido em quatro etapas básicas. Inicialmente, é realizada a fermentação, que pode ser conduzida a partir do caldo de cana-de-açúcar ou do melão, que precisam ser diluídos para um teor de sólidos solúveis adequado. Na produção de rums pesados, o tempo de fermentação é mais elevado para possibilitar a ocorrência da fermentação bacteriana. Em seguida, é realizada a destilação, por batelada ou contínua, de forma que o coração obtido é submetido a uma segunda destilação. A aguardente recém-destilada apresenta graduação alcoólica de 60 a 70% v v<sup>-1</sup> e é submetida ao processo de envelhecimento, em várias etapas e diferentes graduações alcoólicas ou em uma única etapa e um grau alcoólico. Por fim, o rum é extraído dos barris de envelhecimento e transferido para os tanques de armazenamento. O rum pode ser submetido a tratamentos com carvão ativado, para eliminação de aromas indesejáveis ou correção de cor. Também são realizadas filtrações, por meio de placas de celulose, e filtros de cerâmica para eliminação da turbidez [65].

Cachaça e rum são bebidas alcoólicas destiladas obtidas da mesma matéria-prima: a cana-de-açúcar. A cachaça é o destilado do mosto fermentado do caldo de cana e produzido exclusivamente no Brasil, enquanto o rum é o destilado alcoólico do melão ou a mistura de destilados do caldo de cana e melão [1]. O rum tem origem caribenha, e sua separação em categorias é mais difícil devido às diferentes definições legais dos países produtores, sendo a maioria dos rums feita de melão. Uma exceção é o *Rhum Agricole*, um tipo de rum produzido em países de colonização francesa, como Guadalupe, Martinica e Haiti, obtido a partir da fermentação do caldo de cana fresco [66]. Normalmente, o rum é envelhecido em barris de

carvalho, e a cachaça é envelhecida em recipientes de madeiras nativas brasileiras, além do carvalho [1].

O caldo da cana é constituído principalmente de água, carboidratos fermentáveis como sacarose, glicose e frutose, que representam cerca de 20% de sua composição, além de compostos nitrogenados, gorduras, ácidos e minerais, que estão presentes em baixas concentrações [67]. O melão, principal subproduto da produção de açúcar, é o resíduo da extração do açúcar cristalizado após a fervura do caldo de cana e contém cerca de 55% de açúcares fermentáveis, compostos não açucarados e quantidades significativas de minerais e outros elementos [66,68,69].

O caldo de cana e o melão apresentam a mesma principal fonte de carbono no processo de fermentação: a sacarose [68]. No entanto, o uso do melão durante a produção do rum faz com que sua composição química seja diferente da cachaça. A distinção entre essas bebidas é necessária uma vez que problemas podem surgir durante sua comercialização [70]. Discriminações entre cachaça e rum são relatadas nos níveis de teores de metais e compostos orgânicos [71,72], teores de voláteis [73-75] e caracterização de impressões digitais [76]. Um breve resumo desses estudos contendo objetivos, técnicas analíticas e métodos quimiométricos empregados é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Resumo de estudos envolvendo a diferenciação entre cachaça e rum

<b>Objetivo</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>	<b>Referência</b>
Compostos orgânicos e metais	GC-MS, GC-FID, HPLC-UV-Vis, ICP-AES	PCA, HCA, PLS-DA, k-NN	[71]
Aminoácidos	HPLC-FL	-	[72]
Compostos voláteis	GCO, DSA	-	[73]
Ésteres	GC-MS	-	[74]
Compostos voláteis	GCxGC-MS	-	[75]
Impressão digital	ESI-MS	PCA, HCA	[76]
Compostos voláteis	GCxGC-MS	PLS-DA	[77]

DSA descriptive sensory analysis, ESI-MS electrospray ionization-mass spectrometry, HCA hierarchical cluster analysis, HPLC-FL high performance liquid chromatography fluorescence detector, HPLC-UV-Vis high performance liquid chromatography UV-Vis detector, GC-FID gas chromatography-flame ionization detector, GCxGC-MS two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS gas chromatography-mass spectrometry, GCO gas chromatography-olfactometry, k-NN k-nearest neighbor analysis, PCA principal component analysis, PLS-DA partial least squares discriminant analysis

No presente estudo, a SFS foi usada para discriminar amostras comerciais de cachaça e rum. A discriminação ou separação de diferentes bebidas usando a SFS tem sido reportada com sucesso na literatura e um resumo desses trabalhos é mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Resumo de estudos envolvendo a discriminação de bebidas por tipos usando a SFS

<b>Bebida</b>	<b>Discriminação</b>	<b>Método Quimiométrico</b>	<b>Referência</b>
Cerveja	Marcas e armazenamento	-	[37]
Cerveja	Marcas	k-NN e LDA	[39]
Destilados	Brandy, uísque, slivovice e destilados de zimbro	PCA	[36]
Destilados	Brandy e vinhos destilados	PCA e HCA	[35]
Destilados	Brandy e vinhos destilados	-	[53]
Destilados	Brandy e vinhos destilados mistos	PCA, HCA e LDA	[34]
Destilados de frutas	Maçã, damasco, pera e ameixa	PCA, LDA e GDA	[31]
Destilados de zimbro da Eslováquia	Produtor/ Regiões: Liptovský Mikuláš, Trenčín, Košice, Stará Ľubovňa, Bratislava	LDA, GDA, k-NN e SVM	[33]
Destilados de zimbro	Eslováquia, Bélgica, Alemanha, República Tcheca, Inglaterra	PCA, PARAFAC e LDA	[32]
Vinhos Cabernet Sauvignon chineses	Regiões: Bohai Bay, Helan Mountains, Shacheng District, Wuwei, Xinjiang	PCA e LDA	[29]
Aguardente de ameixa	República Tcheca, Hungria e Eslováquia	PCA e LDA	[28]
Cerveja	Marcas	-	[27]
Suco de maçã	Tipos comerciais	PCA e PLS-DA	[26]
Vinhos botritizados de Tojak	Tipos: quatro pontas, cinco pontas, seis pontas, essência/ adulteradas e autênticas	PCA e LDA	[24]
Baijiu	Marcas	PCA, PLS-DA, SVM e ANN	[22]
Brandy	Bulgária, Grécia, Espanha, França, Geórgia, Eslováquia, Moldova, Ucrânia, Romênia	PCA, PARAFAC e LDA	[23]

<b>Bebida</b>	<b>Discriminação</b>	<b>Método Quimiométrico</b>	<b>Referência</b>
Vinhos brancos de Tojak	Variedades: Furmint, Lipovina e Muscat blanc	PCA e LDA	[21]
Sucos de frutos	Chokeberry, groselha preta, framboesa e morango	PARAFAC e PLS-DA	[20]
Vodca	Adulteradas e autênticas	PCA, k-NN, PLS-DA e SVM	[19]
Cerveja	Armazenagem	PCA, PARAFAC e LDA	[17]

GDA general discriminant analysis, HCA hierarchical cluster analysis, k-NN k-nearest neighbors, LDA linear discriminant analysis, PARAFAC parallel factor analysis, PCA principal component analysis, PLS-DA partial least squares discriminant analysis, SVM support vector machines

## 5.2. Amostras

Um total de 90 amostras comerciais de cachaça e rum adquiridos em lojas de bebidas locais e virtuais foram utilizadas neste estudo. Para cada bebida destilada foi atribuído um código: *C* (cachaça,  $n = 50$ ) e *R* (rum,  $n = 40$ ). Todas as amostras de cachaça e rum são designadas em seus rótulos como armazenadas ou envelhecidas em barris de carvalho, exceto duas amostras de rum que não foram armazenadas ou envelhecidas em recipientes de madeira. As amostras de rum tiveram origem em sete países diferentes, incluindo o Brasil. Todas as amostras foram acondicionadas em temperatura ambiente em seus recipientes originais de comercialização e não foram submetidas a nenhum preparo prévio.

Para a construção e validação dos modelos PLS-DA foram utilizadas 60 (*C*,  $n = 33$ ; *R*,  $n = 27$ ) e 30 (*C*,  $n = 17$ ; *R*,  $n = 13$ ) amostras, nos conjuntos de treinamento e de teste, respectivamente.

## 5.3. Resultados e Discussão

Inicialmente, as bebidas foram caracterizadas com base em medidas de pH, condutividade elétrica, turbidez e análise cromatográfica HPLC-DAD, com comprimento de onda fixado em 280 nm.

Embora o pH represente o potencial hidrogeniônico em soluções aquosas, o pH das bebidas destiladas pode ser avaliado a título de comparação, sendo relacionado com a acidez. A acidez das bebidas alcoólicas é fortemente dependente do processo de fermentação, como a pureza, o tempo, a temperatura e o manejo do mosto [3]. A acidez também pode estar associada

ao controle da qualidade das bebidas, uma vez que a proliferação de bactérias acéticas – devido às contaminações da cana ou do mosto na estocagem – leva a fermentação acética, resultando na elevação da acidez [3]. Conforme apresentado na Figura 6A, o pH médio das amostras de cachaça foi de  $4,99 \pm 0,22$ . As amostras de rum apresentaram valor médio de pH ( $6,22 \pm 0,54$ ) diferente estatisticamente das amostras de cachaça, ao nível de 95% de confiança.

A condutividade elétrica se relaciona com a presença de íons na solução, como traços de sais minerais e compostos orgânicos ionizáveis. A condutividade das amostras analisadas variou de 10,7 a  $240 \mu\text{S cm}^{-1}$ , conforme mostrado na Figura 6B. As amostras de cachaça representam o grupo com maior valor médio de condutividade elétrica, de  $70 \pm 9,9 \mu\text{S cm}^{-1}$ . A condutividade elétrica média das amostras de rum foi de  $47 \pm 11 \mu\text{S cm}^{-1}$  e as dispersões das medidas de condutividade para as duas bebidas foram semelhantes.

A nefelometria envolve a medida da radiação espalhada por partículas em suspensão (turbidez), que pode afetar o aspecto da bebida e, portanto, está relacionado à sua qualidade. Conforme mostrado na Figura 6C, as intensidades das bandas nefelométricas das amostras de cachaça, medidas em 500 nm, apresentaram valor médio maior que as amostras de rum. Além disso, as amostras de cachaça apresentaram maior dispersão nas medidas.

Embora as amostras de cachaça tenham apresentado, na média, maiores acidez, condutividade elétrica e turbidez, a elevada dispersão dos valores para cada propriedade não permite uma distinção nítida das amostras de rum.

Com relação ao número de picos observados nos cromatogramas registrados em 280 nm (Figura 7), foi observado grande variabilidade tanto para as cachaças quanto para os rums. Para as cachaças, o número de picos variou de 10 a 49, e para as amostras de rum esse número variou de 7 a 32. As cachaças apresentaram maior número médio de picos, mas os valores não diferem estatisticamente dos valores obtidos para as amostras de rum. Os picos cromatográficos observados nessa análise são referentes aos compostos orgânicos oriundos dos processos de fermentação, destilação e envelhecimento, cuja formação é dependente de vários fatores envolvidos na fabricação das bebidas. A variedade do perfil cromatográfico das amostras avaliadas demonstra a grande complexidade dessas bebidas.



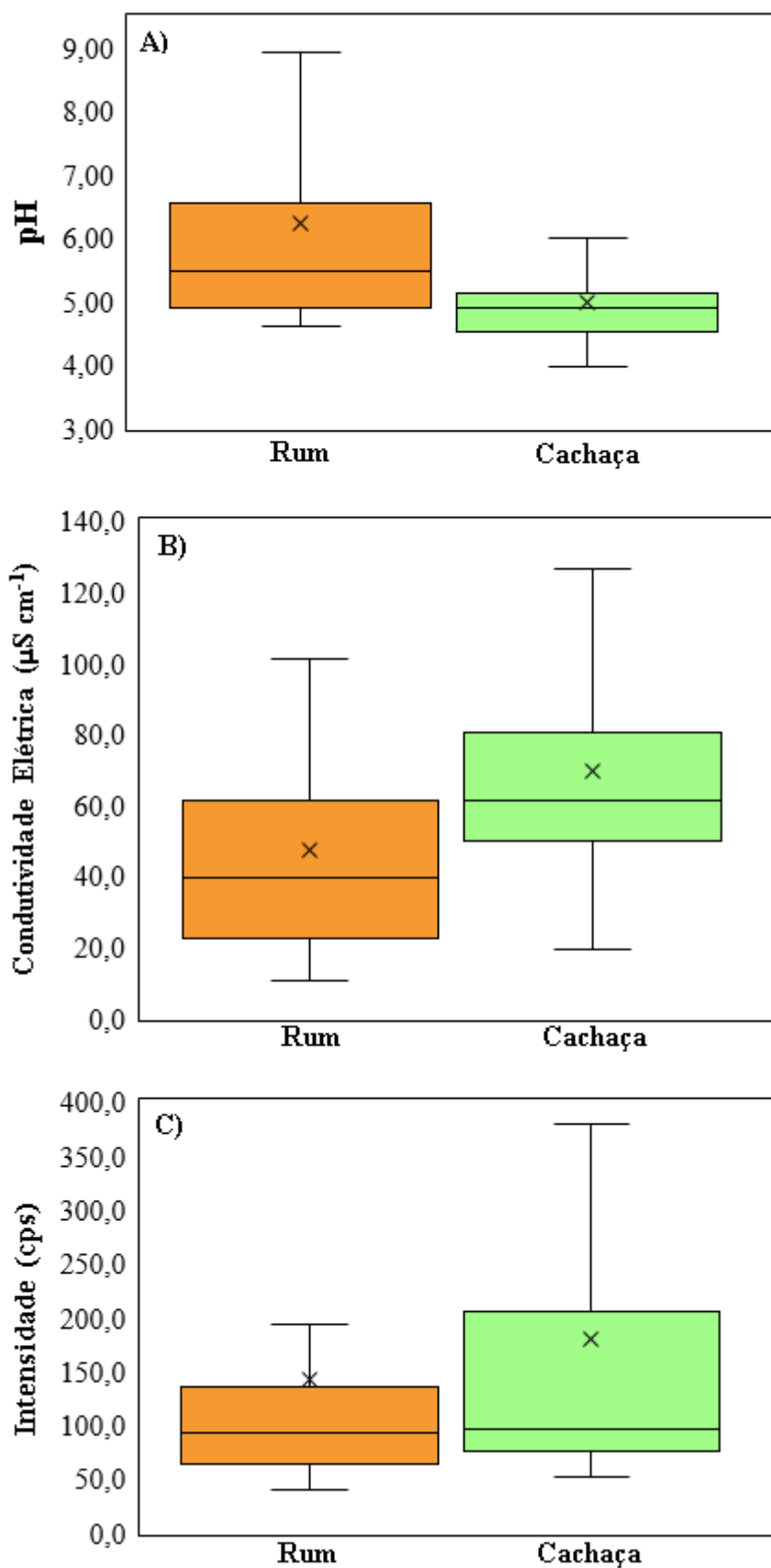


Figura 6 - Medidas de pH (A), condutividade elétrica (B) e nefelometria (C) das amostras de rum e cachaça envelhecidas em barris de carvalho

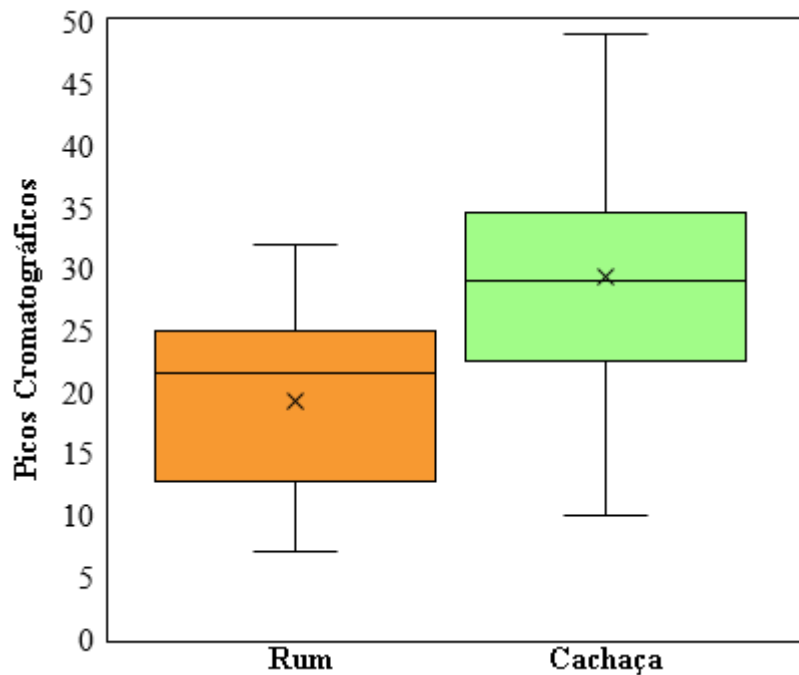


Figura 7 - Picos cromatográficos registrados em 280 nm para amostras comerciais de rum e cachaça envelhecidas em barris de carvalho

Os espectros de fluorescência síncrona total de uma amostra de cachaça e de uma amostra de rum são apresentados nos mapas de contorno, com a intensidade de fluorescência em função de  $\lambda_{em}$  e  $\Delta\lambda$ ; e na intensidade de fluorescência em função de  $\lambda_{em}$  para cada  $\Delta\lambda$  (Figuras 8 e 9). Conforme mostrado nas figuras, os espectros de fluorescência síncrona da cachaça e do rum são muito semelhantes. O mapa de contorno da amostra de cachaça (Figura 8A) mostrou máximos de fluorescência em 350 nm para  $\Delta\lambda = 90$  a 100 nm, e mapa de contorno espalhado na faixa de 280 a 570 nm. Os espectros também apresentaram uma banda em 280 nm e “ombros”, devidos à sobreposição parcial de diferentes bandas de emissão, em 330 e 470 nm.

Em relação à amostra de rum (Figura 9), o mapa de contorno se espalhou na faixa de 300 a 550 nm e máximos de fluorescência em 360 nm para  $\Delta\lambda = 70$  a 100 nm. Os espectros da amostra de rum também apresentaram uma banda em 330 nm e “ombros” em 280 e 470 nm. Para as amostras de cachaça e rum, a banda na região de 470 nm é mais claramente vista em  $\Delta\lambda = 10$  nm. Em geral, os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm apresentaram outras bandas e “ombros” não observados para os demais  $\Delta\lambda$ s.

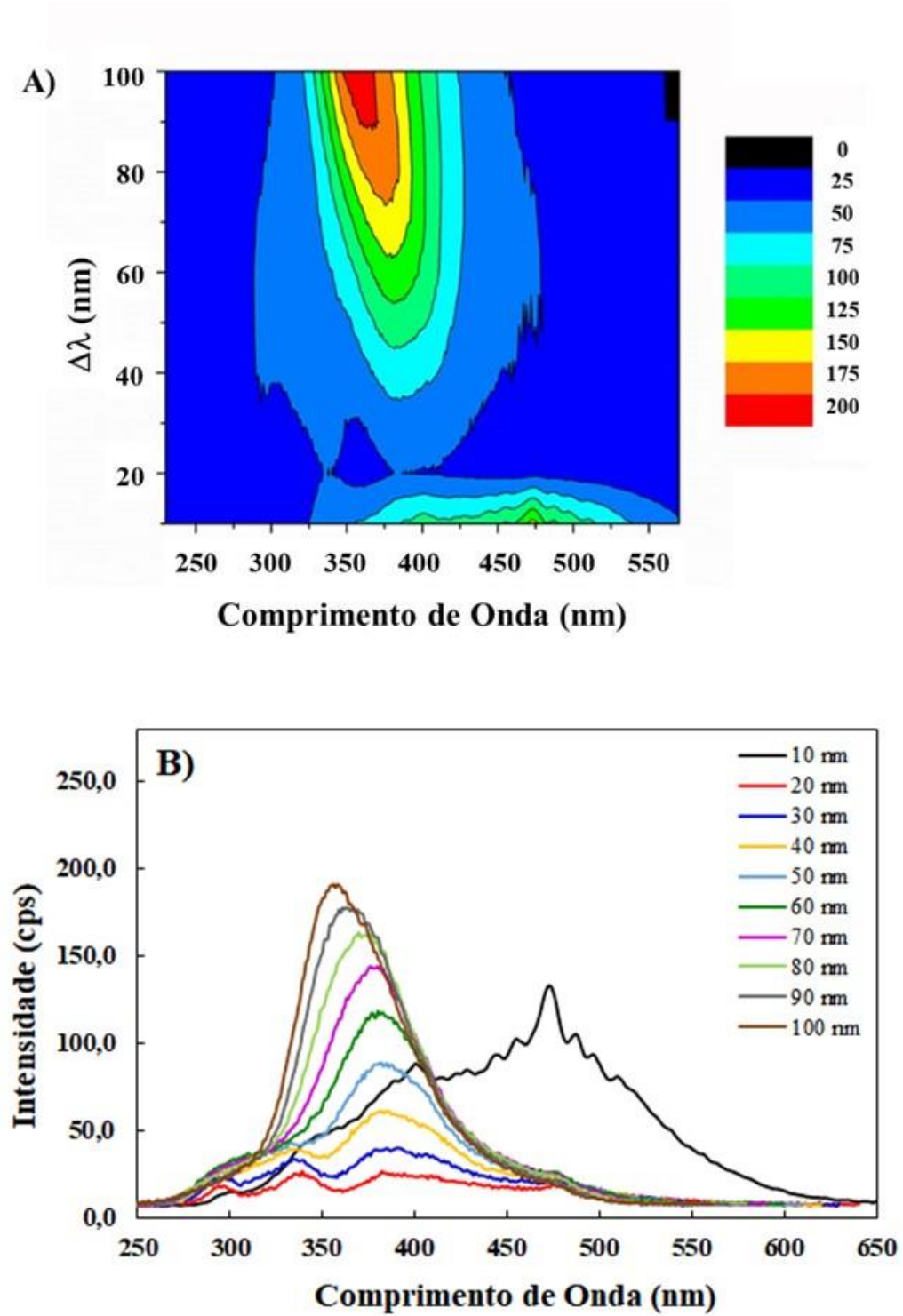


Figura 8 - Mapa de contorno de espectros de fluorescência síncrona total (A) e espectros de fluorescência síncrona registrados nos diferentes  $\Delta\lambda$  (nm) (B) de amostra de cachaça

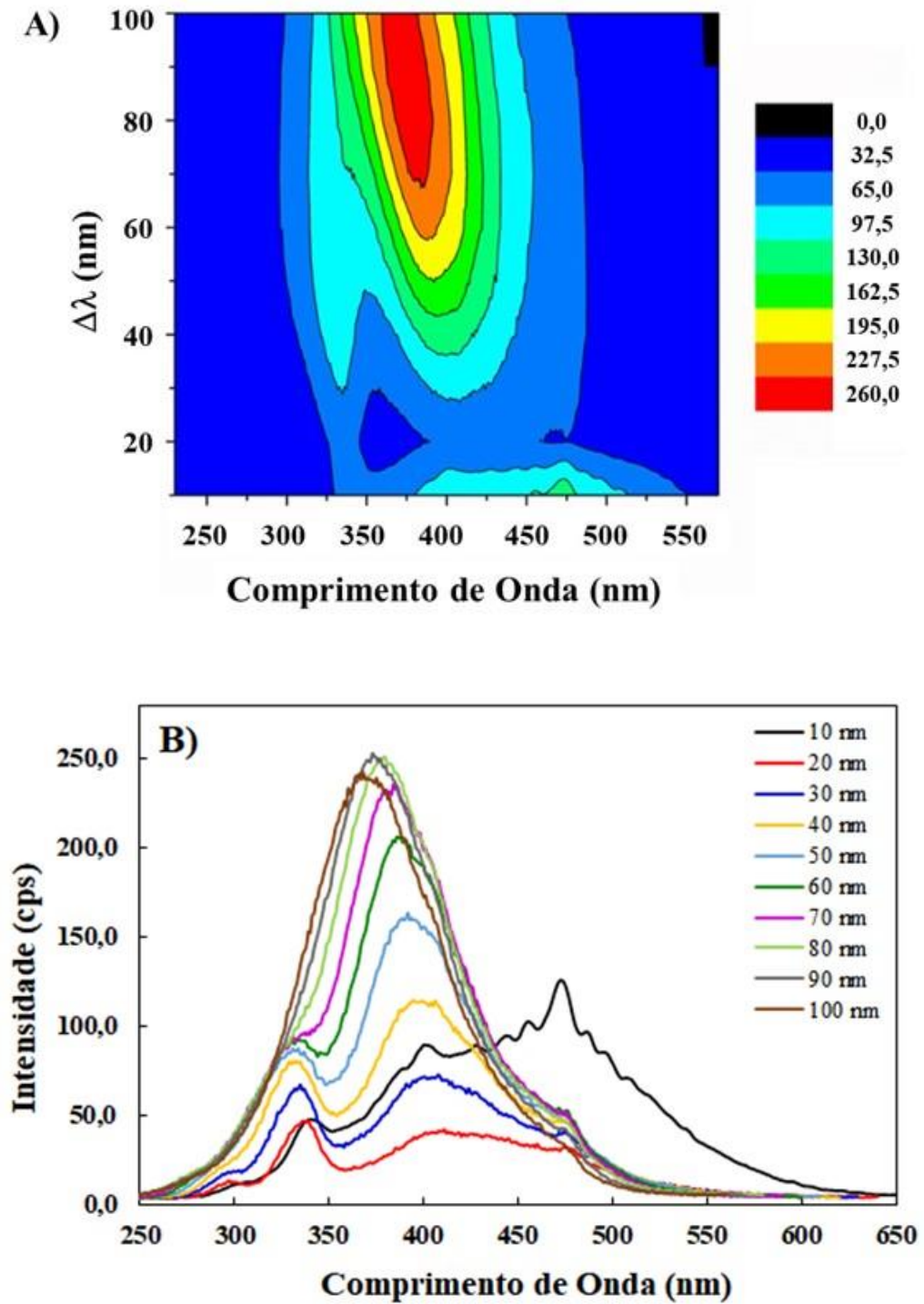


Figura 9 - Mapa de contorno de espectros de fluorescência síncrona total (A) e espectros de fluorescência síncrona registrados nos diferentes  $\Delta\lambda$  (nm) (B) de amostra de rum

Durante a construção de modelos multivariados, o pré-processamento é extremamente importante e deve ser otimizado. Neste estudo, os espectros de fluorescência síncrona das bebidas foram pré-processados por meio da primeira derivada com alisamento usando o algoritmo de Savitzky-Golay. A combinação do alisamento com a primeira derivada visa atenuar os desvios da linha de base e o ruído espectral e aumentar a variação das bandas espectrais [55], devendo sempre haver um compromisso entre a redução de ruído e a distorção do sinal. Após suavização e derivatização, os espectros foram centrados na média.

Para determinação dos parâmetros de alisamento de Savitzky-Golay (tamanho da janela e grau do polinômio) mais adequados para cada  $\Delta\lambda$ , foram realizados planejamentos compostos centrais de face centrada, visando os erros mínimos de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste. Este tipo de planejamento foi empregado para a construção das superfícies de resposta devido a limitação experimental no fator grau do polinômio, em que os níveis só poderiam ser variados de 1 a 6 usando o software PLSToolBox.

Na Figura 10 são apresentados os erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e de teste para o planejamento realizado usando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm e a Figura 11 apresenta a superfície de resposta e o diagrama de contorno, indicando que a melhor combinação foi de janela de 13 pontos e polinômio de 5ª ordem.

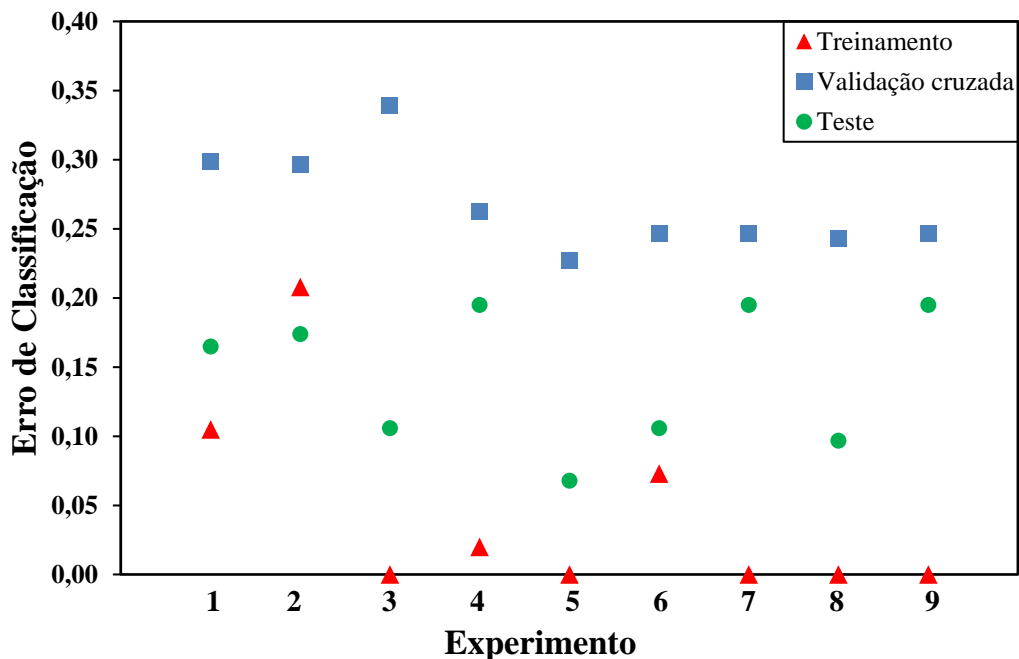


Figura 10 - Erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e de teste para os experimentos usando os espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm

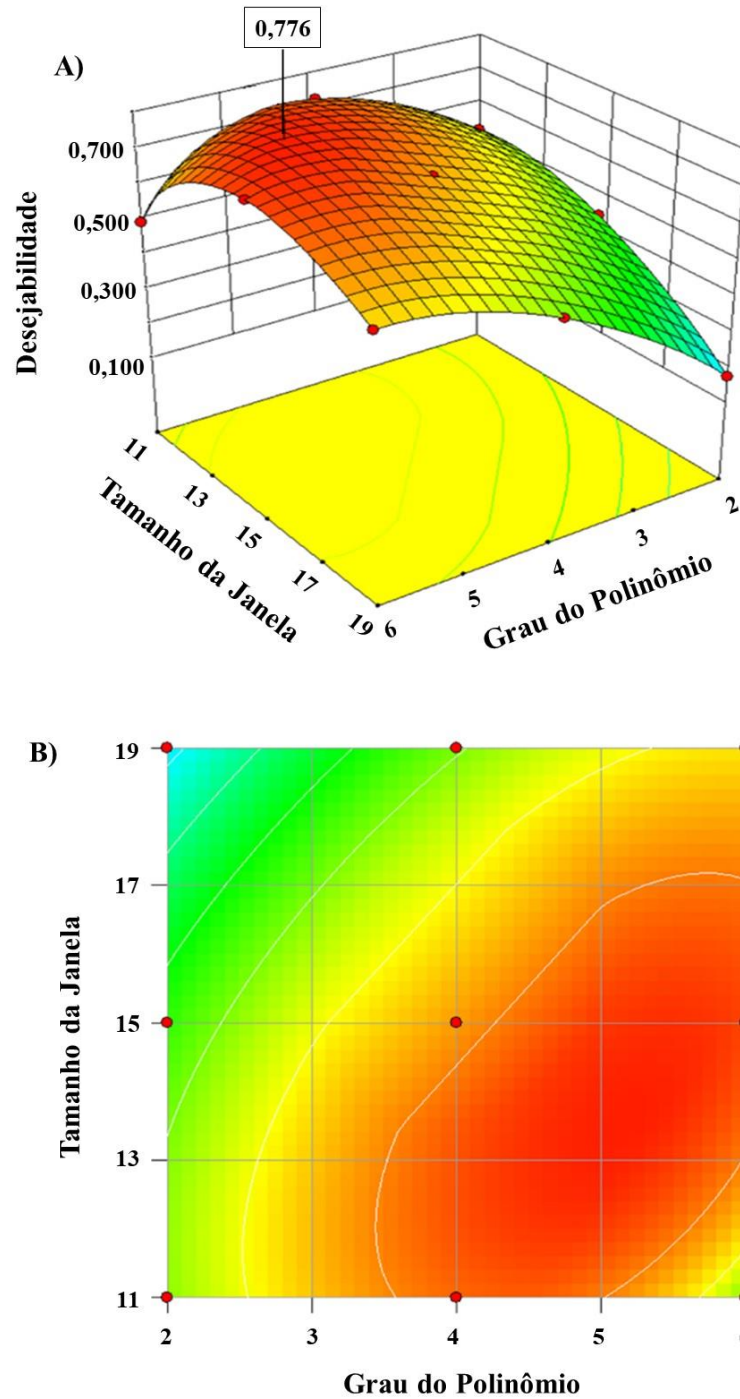


Figura 11 - Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) para erros de classificação mínimos em conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm

O mesmo procedimento foi realizado para os demais  $\Delta\lambda$ s e os melhores modelos, para cada  $\Delta\lambda$ , foram construídos utilizando o tamanho da janela e grau do polinômio indicados nas superfícies de resposta. Os erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para cada modelo são mostrados na Tabela 6. Como pode ser observado, cada

$\Delta\lambda$  apresentou uma combinação ótima de tamanho de janela e grau do polinômio e o modelo  $\Delta\lambda = 10$  nm apresentou os menores erros de classificação nos conjuntos de treinamento e teste.

Tabela 6 - Tamanho da janela, grau do polinômio e erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para cada modelo  $\Delta\lambda$  (nm)

Modelo $\Delta\lambda$ (nm)	Tamanho da Janela	Grau do Polinômio	Erro de Classificação		
			Treinamento	Validação cruzada	Teste
10	13	5	0,00	0,26	0,07
20	15	6	0,11	0,23	0,22
30	13	5	0,02	0,31	0,17
40	15	4	0,00	0,25	0,19
50	19	2	0,24	0,24	0,19
60	15	4	0,23	0,30	0,19
70	19	6	0,23	0,26	0,13
80	19	4	0,14	0,24	0,40
90	19	2	0,20	0,20	0,21
100	11	5	0,05	0,23	0,29

Os espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm, pré-processados empregando o algoritmo de Savitzky-Golay (janela de 13 pontos e polinômio de 5ª ordem), obtidos para todas as amostras de cachaça e rum analisadas neste trabalho são mostrados na Figura 12. Em geral, as intensidades de fluorescência máximas variaram entre as amostras, tanto para cachaças quanto para rums. Além disso, foram observadas bandas de fluorescência não comuns a todas as amostras da mesma classe, não sendo possível, portanto, classificar as amostras apenas pela inspeção visual dos espectros.

Os espectros de SFS de amostras de cachaça e rum são resultado da sobreposição espectral de várias espécies formadas durante os processos de fermentação, destilação e envelhecimento, como taninos, compostos fenólicos e cumarinas - formados por reações envolvendo a bebida e a madeira; bem como outros compostos que podem apresentar diferentes características de fluorescência [78-80]. Alguns compostos fluorescentes, como eugenol,  $\beta$ -damascenona, 4-etilguaiaicol, vanilina, dietil acetal,  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octalactona e ácidos fenólicos, já foram identificados em amostras de cachaça e rum [73,81]. O caramelo também pode contribuir para a fluorescência observada, uma vez que seu uso é permitido para correção de cor [1].

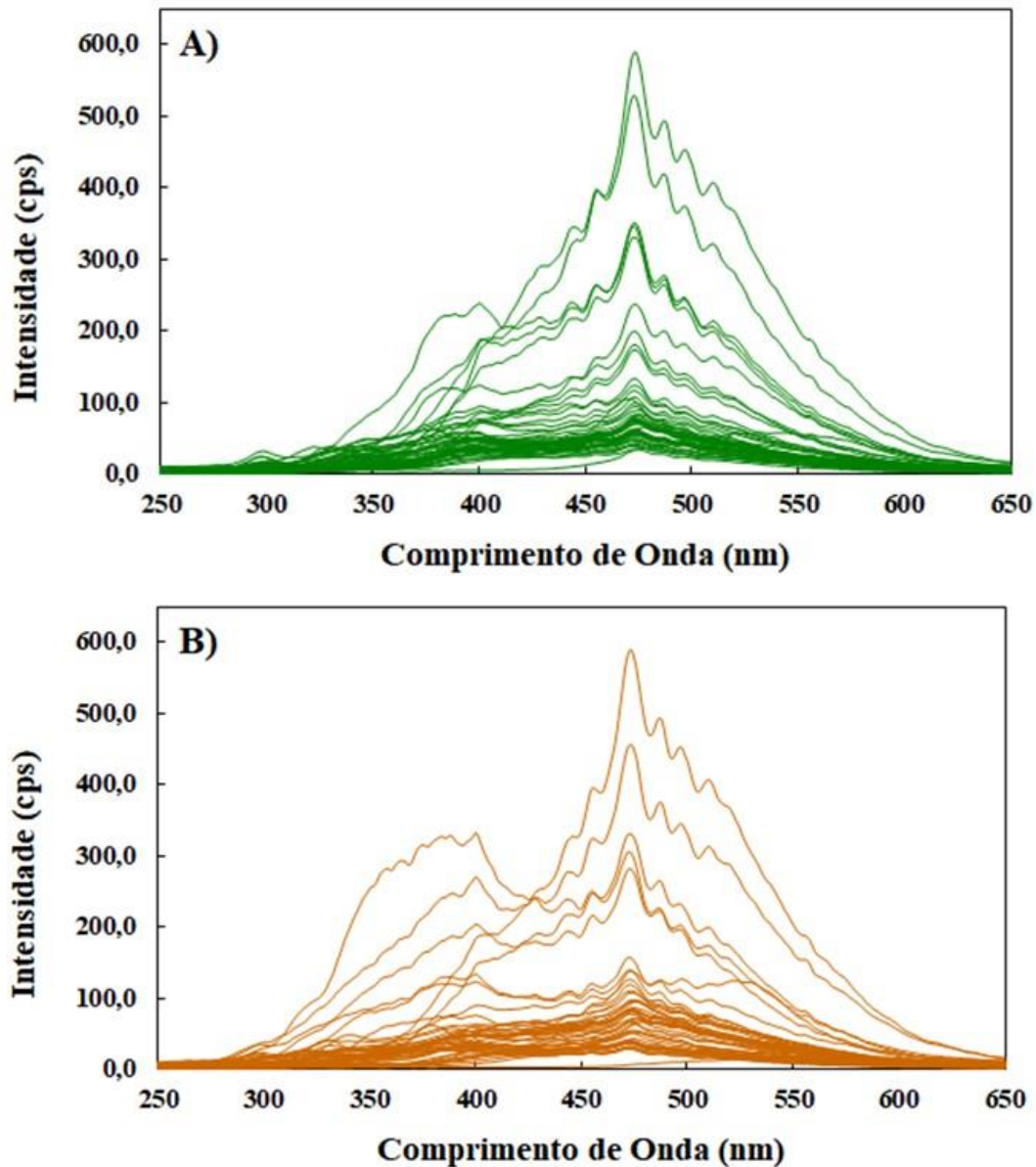


Figura 12 - Espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm obtidos para todas as amostras de cachaça (A) e rum (B)

A PCA aplicada aos espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm apresentando três componentes principais (CP), responsáveis por 84% da variância total dos dados, não apresentou nenhuma separação ou tendência clara de separação entre as amostras, provavelmente devido à grande variabilidade nos processos de produção dessas bebidas (Figura 13). As diferenças observadas entre os espectros de fluorescência síncrona das amostras podem estar relacionadas não apenas ao uso de melão ou caldo de cana em sua produção, mas também aos períodos de envelhecimento, variedades de cana e procedimentos envolvidos nos processos de fermentação e destilação, mas, mesmo assim, uma clara diferenciação entre cachaça e rum foi possível usando a classificação supervisionada.



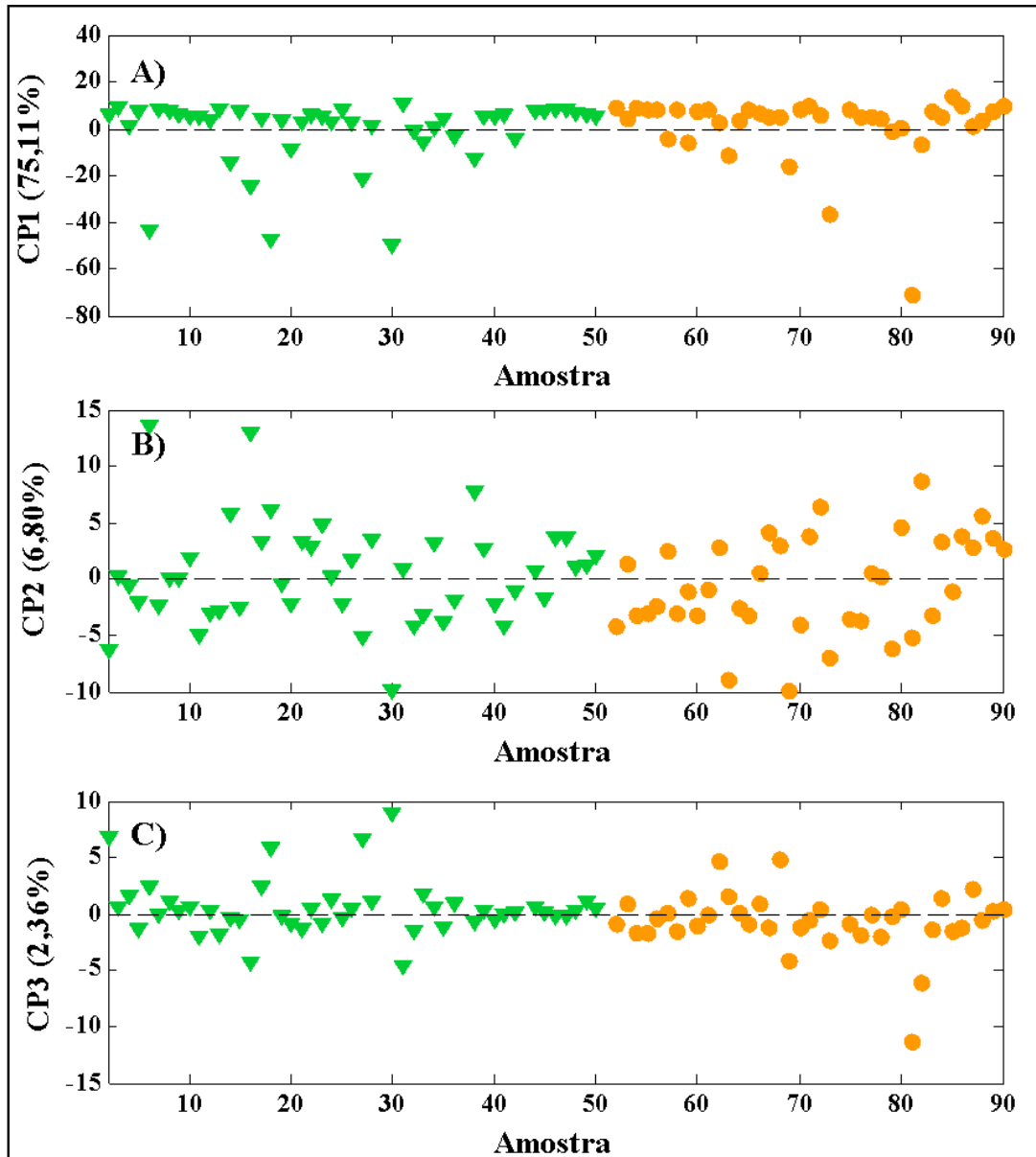


Figura 13 - Gráfico de escores da PCA construída usando os espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm (variância explicada): escores de PC1 (A); escores de PC2 (B); escores de PC3 (C).

Símbolos: triângulos invertidos verdes para cachacas e círculos laranjas para rums

O melhor modelo PLS-DA usando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm foi construído com sete *VL*, que responderam por 99 e 88% das variâncias em *X* e em *Y*, respectivamente, após a remoção de cinco outliers (dois *C* e três *R*). O *threshold* foi de 0,53 (Figura 14) e o modelo apresentou excelentes parâmetros de desempenho: *EFF* de 98%, *SEN* e *SPE* de 100% no conjunto de treinamento; e *SEN* e *SPE* de 94% e 92%, no conjunto de teste, respectivamente.

Conforme mostrado no gráfico previsões de  $Y$  (Figura 14), este modelo forneceu excelentes resultados de classificação, sendo confirmado pelos valores de probabilidade de  $Y$  previsto (Figura 15). No conjunto de treinamento, todas as amostras foram classificadas corretamente. No conjunto de teste, apenas uma amostra de cachaça foi classificada incorretamente como rum e uma amostra de rum foi classificada incorretamente como cachaça. Além disso, com exceção das duas amostras incorretamente previstas no conjunto de teste, todas as amostras de cachaça dos dois conjuntos apresentaram pelo menos 90% de probabilidade de serem classificadas como pertencentes à classe  $C$ ; enquanto todas as amostras de rum apresentaram menos de 15% de probabilidade de serem classificadas como cachaça. A única cachaça classificada incorretamente usa o melão como matéria-prima, segundo informações do produtor que a designa como “cachaça de melão”, embora a legislação brasileira defina cachaça como sendo o destilado do mosto fermentado do caldo da cana-de-açúcar [1]. A ocorrência de amostras de cachaça classificadas como rum pode estar relacionada à falsificação, uma vez que são amostras comerciais, e não se pode garantir sua autenticidade.

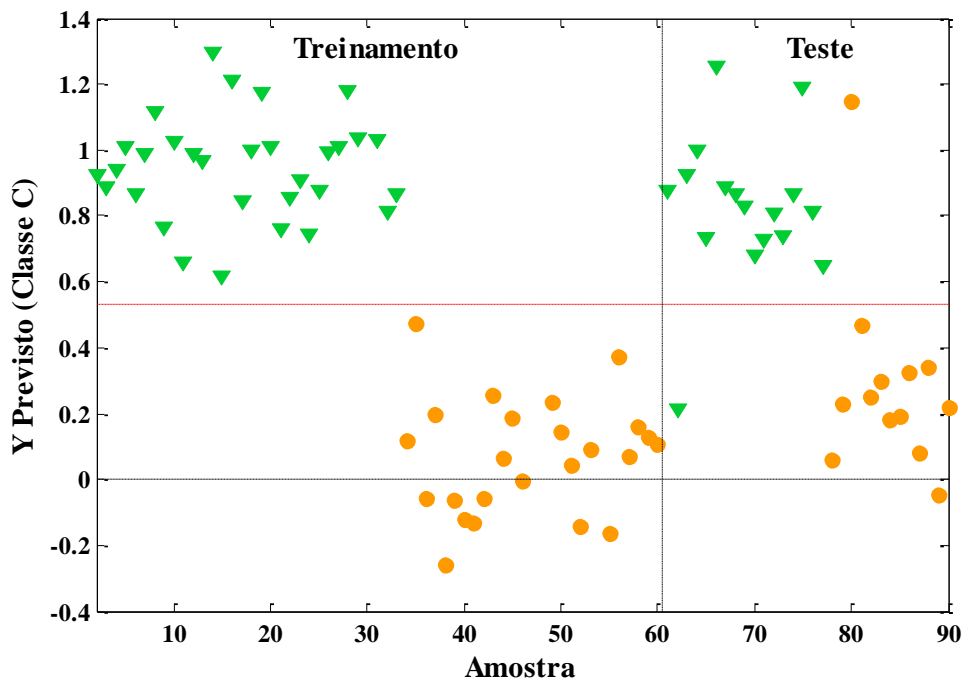


Figura 14 - Previsões de  $Y$  para modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm para classe de cachaça.

A linha tracejada vertical separa as amostras de treinamento e de teste, e a linha tracejada horizontal vermelha indica o *threshold*. Símbolos: triângulos invertidos verdes para cachaças e círculos laranjas para rums

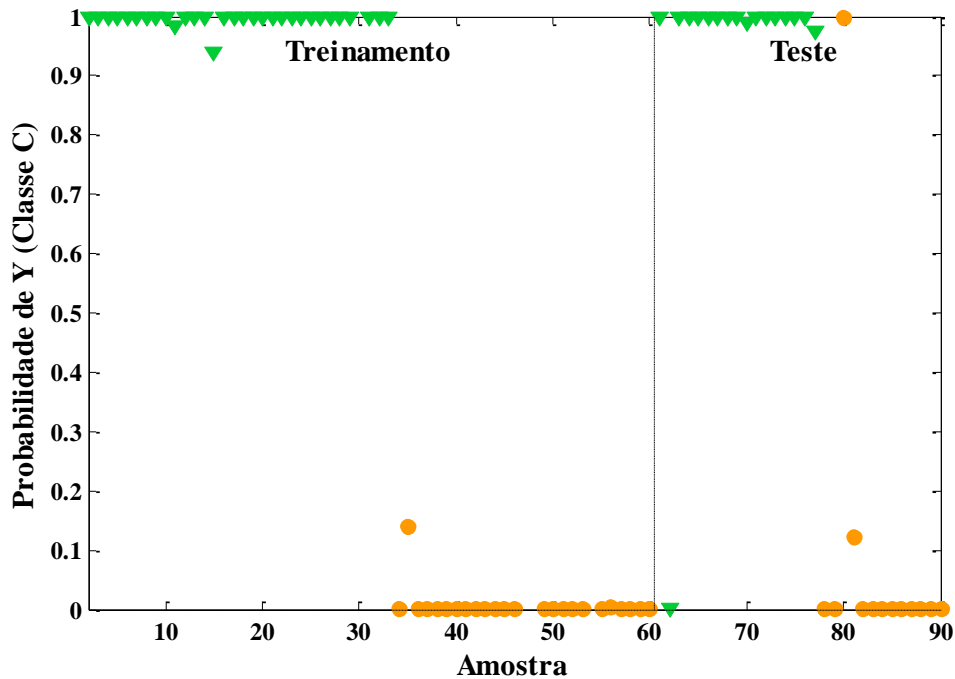


Figura 15 - Probabilidade de previsão de  $Y$  1 para modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm para classe de cachaça.

A linha tracejada vertical separa as amostras de treinamento e de teste. Símbolos: triângulos invertidos verdes para cachaaças e círculos laranjas para rums

Os comprimentos de onda que mais contribuíram para a classificação entre amostras de cachaça e rum são mostrados nos gráficos de importância das variáveis na projeção (*variable importance in projection*, *VIP* escores) (Figura 16) e de vetores de regressão (Figura 17). Conforme mostrado nessas figuras, os comprimentos de onda mais importantes são 305, 368, 385, 419, 471, 491 e 650 nm. A atribuição desses comprimentos de onda específicos é difícil, pois a SFS não é uma técnica comumente usada para impressão digital.

O modelo desenvolvido no presente estudo apresentou melhores parâmetros de desempenho e maior número de amostras (*EFF* de 98% e 90 amostras comerciais) comparando-se com outros trabalhos relatados na literatura (Tabela 4). Cardoso e colaboradores classificaram corretamente as seis amostras de cachaça e rum utilizadas no conjunto externo de validação, tanto no modelo k-NN quanto no modelo PLS-DA. No entanto, foram usadas apenas 38 amostras de cachaça e rum para a construção dos modelos preditivos [71]. De Souza e colaboradores separaram oito rums e 29 cachaaças envelhecidas em madeiras brasileiras usando apenas as análises exploratórias PCA e HCA [76]. Frantiza e colaboradores alcançaram 88% de classificação correta em um modelo PLS-DA usando as frações voláteis analisadas por GC×GC-MS na classificação de 51 amostras de rum fabricados a partir do caldo de cana e de melão [77].

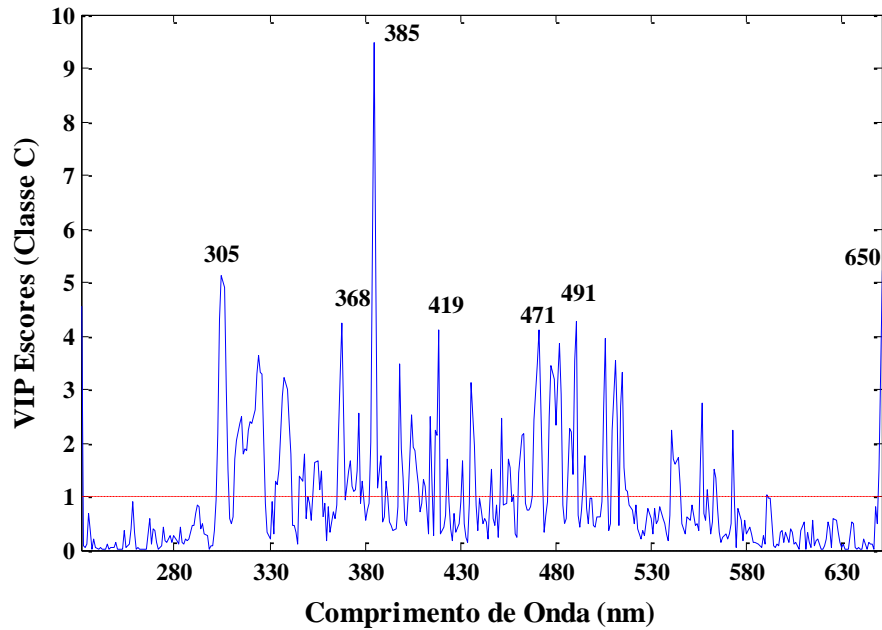


Figura 16 - VIP escores do modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm para classificação de cachaças e rums

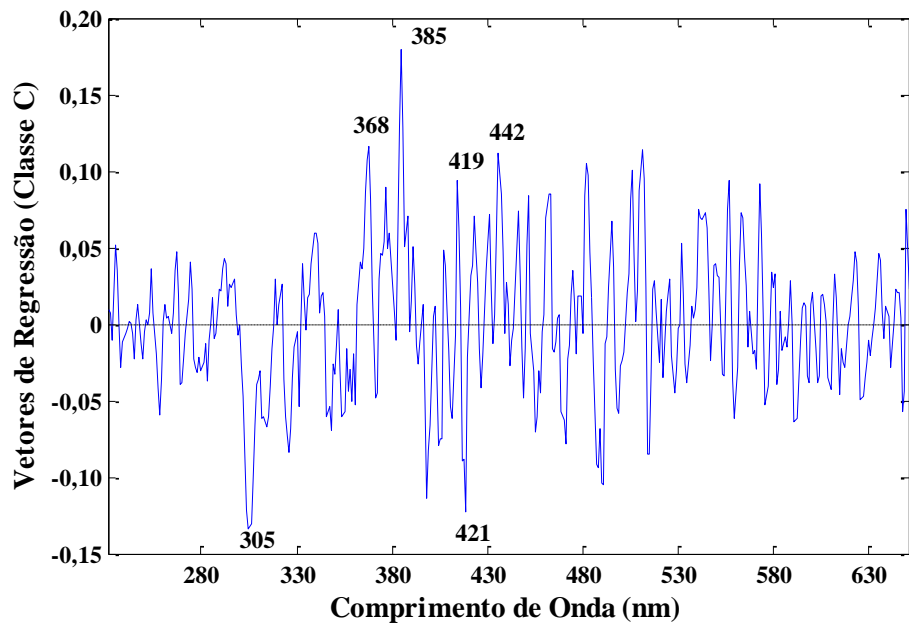


Figura 17 - Vetores de regressão do modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm para classificação de cachaças e rums

Além disso, a técnica espectrofluorimétrica apresenta algumas vantagens frente a outras técnicas analíticas empregadas nos estudos de classificação, como a simplicidade, rapidez, baixo custo e ainda dispensa o preparo de amostras, tendo sido utilizada com sucesso em modelos envolvendo classificação de outras bebidas, com parâmetros de desempenho semelhantes aos obtidos no presente estudo (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de amostras,  $\Delta\lambda$  (nm) e desempenho dos modelos de classificação supervisionada usando SFS aplicados a outras bebidas

Método de Classificação	Amostras	$\Delta\lambda$ (nm)	Desempenho	Referência
PLS-DA e SVM	24	30	92 e 100% de acurácia	[19]
PLS-DA	48	40	<i>SEN</i> e <i>SPE</i> de 91,7 a 100%	[20]
PCA-LDA	60	40 e 100	100% de classificação correta	[21]
SVM	192	10 – 160	100% de classificação correta no treinamento e 97% no teste	[22]
PCA-LDA	44	20 e 60	96% de classificação correta na validação cruzada	[23]
PCA-LDA	60	80 e 100	60-100% de classificação correta	[24]
PCA-LDA	44	60	94% de classificação correta no treinamento e 100% no teste	[28]
PCA-LDA	31	30, 60, 90 e 120	79% de classificação correta	[29]
GDA	63	10, 90 e 100	100% de classificação correta	[31]
PCA-LDA	59	10	100% de classificação correta no treinamento e 94% no teste	[32]
GDA e SVM	52	10	100% de classificação correta	[33]
LDA	46	80	99,6% de classificação correta	[34]

GDA general discriminant analysis, LDA linear discriminant analysis, PCA-LDA principal component analysis – linear discriminant analysis, PLS-DA partial least squares discriminant analysis, *SEN* sensibilidade, *SPE* especificidade, SVM support vector machines

Portanto, a SFS oferece uma abordagem eficiente e que pode ser facilmente implementada para análises de rotina para a autenticação de cachaças e rums. Este modelo pode ser utilizado para análises de rotina como método de triagem, auxiliando no combate a fraudes, visto que, em geral, os rums apresentam maior valor comercial em relação às cachaças, principalmente os importados.

## 6. Discriminação de cachaças por madeira utilizada no envelhecimento

### 6.1. Revisão Bibliográfica

A aguardente recém-destilada - produto constituído majoritariamente de água e álcool, contendo aldeídos, ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, e outros compostos em menores concentrações - é incolor e apresenta sabor ardente, não sendo indicado o seu consumo imediato. É recomendada a realização do processo de envelhecimento, por meio do armazenamento da bebida em recipientes de madeira, promovendo um conjunto de reações entre o destilado e os compostos da madeira, produzindo substâncias que conferem características sensoriais mais agradáveis à bebida [3].

Embora a legislação brasileira não obrigue a realização do envelhecimento de cachaças, sabe-se que o processo agrega valor ao produto final, uma vez que a sua composição química é alterada, melhorando o aroma e o sabor da bebida [82]. Segundo a Instrução Normativa nº 13, a bebida é considerada envelhecida quando pelo menos 50% de cachaça ou aguardente de cana são envelhecidas em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período mínimo de um ano [2].

Vários processos ocorrem durante o envelhecimento, como a extração de compostos da madeira e suas reações com o destilado; migração de constituintes da madeira para o destilado; e formação e degradação de diversos compostos. Devido à permeabilidade dos barris de madeira, os álcoois são oxidados e esterificados, formando ácidos carboxílicos, aldeídos e ésteres. Além disso, o armazenamento em ambientes úmidos e frescos causa a diminuição do volume e do teor alcoólico devido às perdas por evaporação [82]. É desejável que o processo de envelhecimento ocorra em condições naturais e que seja lento, até alcançar o equilíbrio, quando a bebida adquire aspecto, odor, coloração e sabor de melhor qualidade.

O carvalho (*Quercus* sp.) é a madeira tradicionalmente empregada para fabricação de barris na Europa e nos EUA para o envelhecimento de uísque, brandy, rum, vinho e outras bebidas alcoólicas, devido as suas características de permeabilidade, durabilidade e facilidade de manipulação [83]. Para o envelhecimento da cachaça no Brasil, são utilizados os barris de carvalho, usados previamente para outras bebidas, e barris de madeiras nativas [3], que são uma alternativa para redução do custo desse processo, pois o carvalho não é uma árvore típica de climas tropicais. Dentre as madeiras mais utilizadas destacam-se o amendoim (*Pterogyne nitens*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), umburana (*Amburana cearensis*), jatobá (*Hymenaea carbouril*), jequitibá (*Cariniana estrellensis*), freijó (*Cordia goeldiana*) e ipê (*Tabebuia* sp.) [3].

As características avaliadas na escolha da madeira para o armazenamento e envelhecimento de bebidas alcoólicas são: densidade e permeabilidade, que devem ser baixas; cor, que é dependente da presença de diversos compostos orgânicos, tais como taninos e resinas; aroma, que deve ser imperceptível; gosto, que está relacionado à presença dos taninos e também deve ser imperceptível ou levemente adstringente; resistência mecânica, que deve ser de média a alta; durabilidade natural, que deve ser preferencialmente elevada; e trabalhabilidade, que está associada ao grau de facilidade ou dificuldade de processamento [3].

A madeira exerce grande influência nas características finais da cachaça (sabor, aroma e cor) e, conseqüentemente, no preço da bebida, o que favorece a ocorrência de atividades fraudulentas. Daí a importância da realização de estudos para o melhor entendimento sobre o processo de envelhecimento em diferentes madeiras e para a verificação de padrões que possam caracterizar essas bebidas. Na Tabela 8 são apresentados estudos em que cachaças armazenadas e envelhecidas em diversas madeiras foram diferenciadas usando várias técnicas analíticas e métodos quimiométricos. Nestes trabalhos, as diferenciações foram obtidas principalmente em função dos diferentes perfis de congêneres de maturação - compostos fenólicos, cumarinas e furfural - das cachaças armazenadas ou envelhecidas em diferentes madeiras.

Tabela 8 - Resumo de estudos descritos na literatura para diferenciação de cachaças armazenadas e envelhecidas em diferentes barris de madeira

<b>Madeira utilizada no Armazenamento/ Envelhecimento</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>	<b>Referência</b>
carvalho americano e carvalho francês	Análise sensorial, GC-FID, HPLC-UV-Vis, espectroscopia eletrônica	-	[84]
carvalho e umburana	HPLC-DAD	PCA	[85]
carvalho francês e carvalho americano	HPLC-UV-Vis	PCA, GMM	[86]
umburana, castanheira, cabreúva	GC-MS	-	[87]
freijó, carvalho e umburana	imagem digital	PCA-LDA, PCA-QDA, k-NN, PLS-DA, SPA-LDA e SPA-QDA	[88]
bálsamo, jatobá, carvalho, peroba e umburana	HPLC-DAD e espectroscopia eletrônica	PCA	[89]
amendoim, bálsamo, jequitibá, carvalho e umburana	espectroscopia eletrônica e espectrofluorimetria	PLS-DA e NPLS-DA	[90]
castanheira, carvalho e umburana	imagem	LDA, QDA, k-NN, MLP, SVM	[91]

Madeira utilizada no Armazenamento/ Envelhecimento	Técnica Analítica	Método Quimiométrico	Referência
amendoim, ararúva, cabreúva, carvalho, cerejeira, grápia, ipê roxo, jequitibá, jequitibá rosa, pereira	espectroscopia eletrônica e GC-MS	-	[92]
castanheira, carvalho e umburana	espectroscopia eletrônica, GC-FID e imagem digital	ANN e k-NN	[93]
bálsamo, canela, jatobá, jequitibá, castanheira, carvalho e umburana	HPLC-DAD	PCA	[94]
jequitibá e carvalho	GC-MS, espectroscopia eletrônica e análise sensorial	PCA e HCA	[95]
bálsamo, jequitibá, carvalho e umburana	ESI-MS	PCA e HCA	[96]
amarelo, amendoim, bálsamo, jatobá, louro, carvalho, pau d'arco, pau d'óleo e pereiro	espectroscopia eletrônica	PCA	[97]
umburana, bálsamo, jequitibá, jatobá, ipê, carvalho europeu	HPLC-UV-Vis	-	[98]

ANN artificial neural network, ESI-MS electrospray ionization-mass spectrometry, GC-FID gas chromatography-flame ionization detector, GC-MS gas chromatography-mass spectrometry, GMM gaussian mixture model, HCA hierarchical cluster analysis, HPLC-DAD high performance liquid chromatography-diode array detector, HPLC-UV-Vis high performance liquid chromatography-UV Vis detector, k-NN k-nearest neighbors, LDA linear discriminant analysis, MLP multi-layer perceptron, NPLS-DA N-way partial least squares -discriminant analysis, PCA principal component analysis, PLS-DA partial least squares discriminant analysis, QDA quadratic discriminant analysis, SVM support vector machines

No presente estudo, a discriminação de cachaças comerciais pela madeira utilizada no processo de armazenamento e envelhecimento (bálsamo, jequitibá, carvalho e umburana) foi realizada por meio da SFS juntamente com a PLS-DA.

## 6.2. Amostras

Um total de 148 cachaças comerciais adquiridas em lojas de bebidas locais e virtuais foram utilizadas neste estudo. Para cada classe de cachaça foi atribuído um código, indicando a madeira utilizada no processo de armazenamento ou envelhecimento: *B* (bálsamo,  $n = 34$ ), *C* (carvalho,  $n = 55$ ), *J* (jequitibá,  $n = 32$ ) e *U* (umburana,  $n = 27$ ). Todas as amostras comerciais de cachaça são designadas em seus rótulos como armazenadas ou envelhecidas em barris de madeira. As amostras comerciais foram acondicionadas em temperatura ambiente, no próprio



recipiente de comercialização, e não foram submetidas a nenhum preparo. Além dessas amostras, foram analisadas 24 amostras de cachaça armazenada por pelo menos quatro meses nessas quatro madeiras (seis amostras de cada uma) no laboratório.

Para a construção dos modelos, foram selecionadas as amostras mais significativas de cada classe, mantendo quantidades aproximadas de amostras para cada classe, totalizando 141 amostras ( $B, n = 33$ ;  $C, n = 39$ ;  $J, n = 36$ ;  $U, n = 33$ ).

Neste estudo, as quatro classes analisadas ( $B, C, J$  e  $U$ ) foram previstas simultaneamente em um único modelo de classificação supervisionada PLS-DA e, portanto, este modelo é chamado de PLS2-DA. Para a construção dos modelos PLS2-DA, os conjuntos de treinamento e de teste foram usados para construir e validar os modelos, e foram compostos por 94 amostras ( $B, n = 22$ ;  $C, n = 26$ ;  $J, n = 24$ ;  $U, n = 22$ ) e 47 amostras ( $B, n = 11$ ;  $C, n = 13$ ;  $J, n = 12$ ;  $U, n = 11$ ), respectivamente.

### 6.3. Resultados e Discussão

As amostras de cachaça armazenadas ou envelhecidas em cada madeira foram caracterizadas segundo os valores de pH, condutividade elétrica, turbidez e quantidade de picos cromatográficos identificados por HPLC-DAD em comprimento de onda fixado em 280 nm.

Os valores de pH e condutividade elétrica medidos para as amostras de cachaça armazenadas ou envelhecidas nas diferentes madeiras (Figuras 18A e 18B) não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, ao nível de 95% de confiança, reforçando que a maior acidez da cachaça, em relação a outras bebidas, se deve às características da matriz alcoólica, fruto da matéria-prima e do processo de fermentação. Os valores médios do pH e da condutividade elétrica foram  $4,93 \pm 0,11$  e  $57,9 \pm 5,8 \mu\text{S cm}^{-1}$ , respectivamente. Na Figura 18C são apresentados os valores de intensidade da radiação espalhada para as amostras de cachaça armazenadas ou envelhecidas em bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana. Embora as amostras armazenadas e envelhecidas em umburana tenham apresentado maior valor médio ( $503 \pm 100$ ), esses valores não diferem estatisticamente dos valores obtidos para as outras madeiras. Além disso, as amostras armazenadas ou envelhecidas em bálsamo e em umburana apresentaram maior dispersão. Isso se deve às características inerentes de cada madeira, proporcionando a extração de diferentes compostos com diferentes solubilidades. Da mesma forma que no estudo anterior, não há uma diferença nítida destas propriedades entre as diferentes madeiras, devido à grande dispersão de valores, que permita uma discriminação.

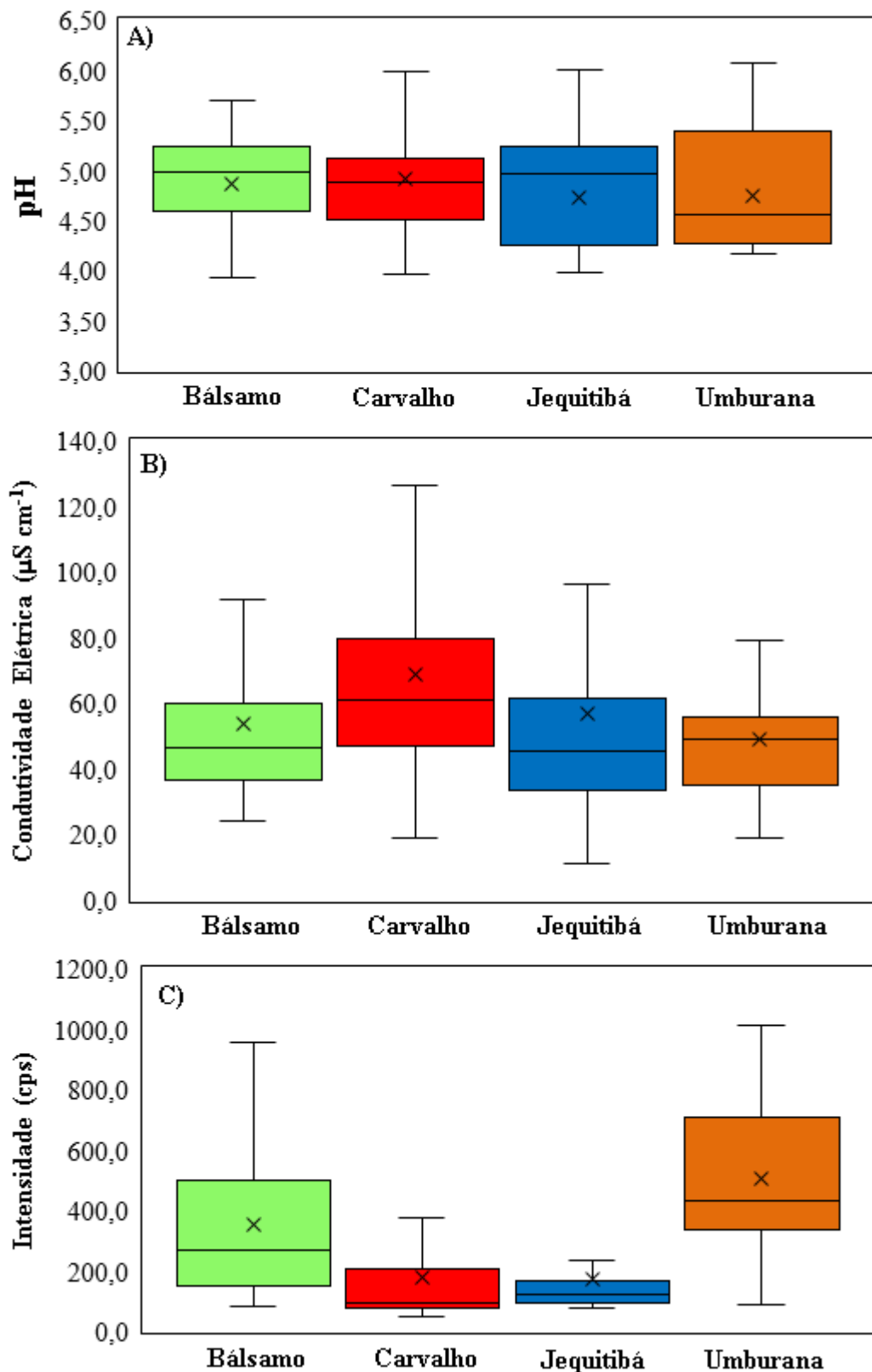


Figura 18 - Medidas de pH (A), condutividade elétrica (B) e nefelometria (C) das amostras de cachaça armazenadas ou envelhecidas em barris de balsamo, carvalho, jequitibá e umburana

Sobre o número de picos cromatográficos registrados em 280 nm (Figura 19), uma grande variabilidade e dispersão de valores foi observada para as amostras comerciais envelhecidas nas diferentes madeiras, com destaque para as amostras armazenadas ou envelhecidas em umburana, que apresentaram maior número de picos – variando de 11 a 73, seguido das amostras armazenadas ou envelhecidas em bálsamo (6 a 56 picos), carvalho (10 a 49 picos) e jequitibá (5 a 32 picos). Foram identificados um total de 200 picos cromatográficos para as quatro madeiras estudadas, com cada amostra apresentando picos não coincidentes até mesmo para uma mesma madeira avaliada. Esse resultado reforça a complexidade das cachaças armazenadas e envelhecidas, principalmente as amostras comerciais.

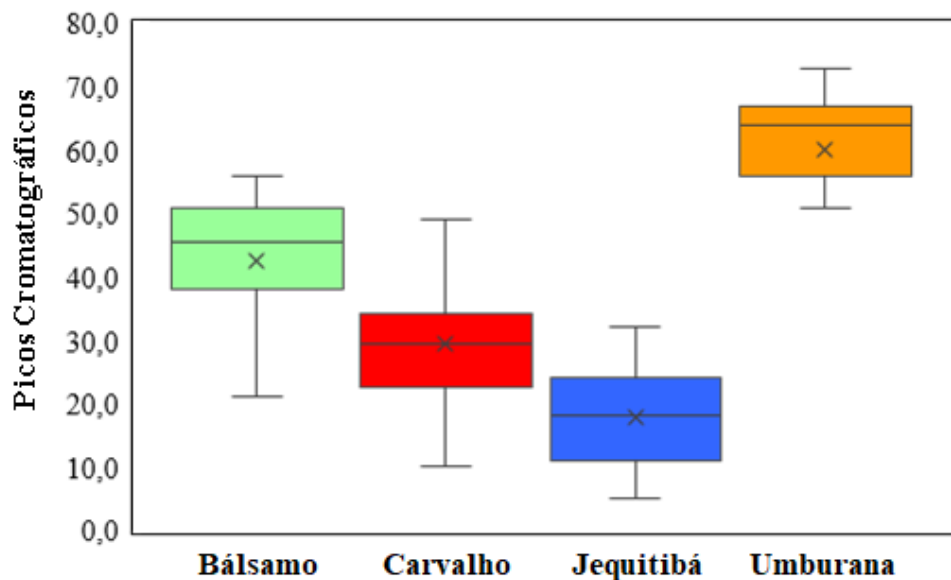


Figura 19 - Picos cromatográficos registrados em 280 nm para amostras comerciais de cachaça armazenadas ou envelhecidas em barris de bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana

Os espectros de fluorescência síncrona das cachaças envelhecidas nas quatro madeiras apresentaram duas ou três bandas de fluorescência principais, sendo o máximo de fluorescência em 355 nm para  $\Delta\lambda = 100$  nm (Figura 20). A banda próxima a 280 nm está presente nos espectros de cachaças envelhecidas em barris de bálsamo e carvalho, e a banda em torno de 330 nm foi observada nos espectros de cachaças envelhecidas em barris de bálsamo, carvalho e jequitibá. A forma e a intensidade das bandas dos espectros de fluorescência síncrona e, conseqüentemente, a discriminação pela madeira utilizada no processo de armazenamento e envelhecimento das cachaças, dependem do valor de  $\Delta\lambda$  escolhido. Um aumento da intensidade de fluorescência, simultaneamente com o alargamento da banda, foi aparente para os maiores

valores de  $\Delta\lambda$  e, em geral, os espectros em valores de  $\Delta\lambda$  menores apresentaram mais bandas e foram os que mais apresentaram diferenças visuais entre as amostras.

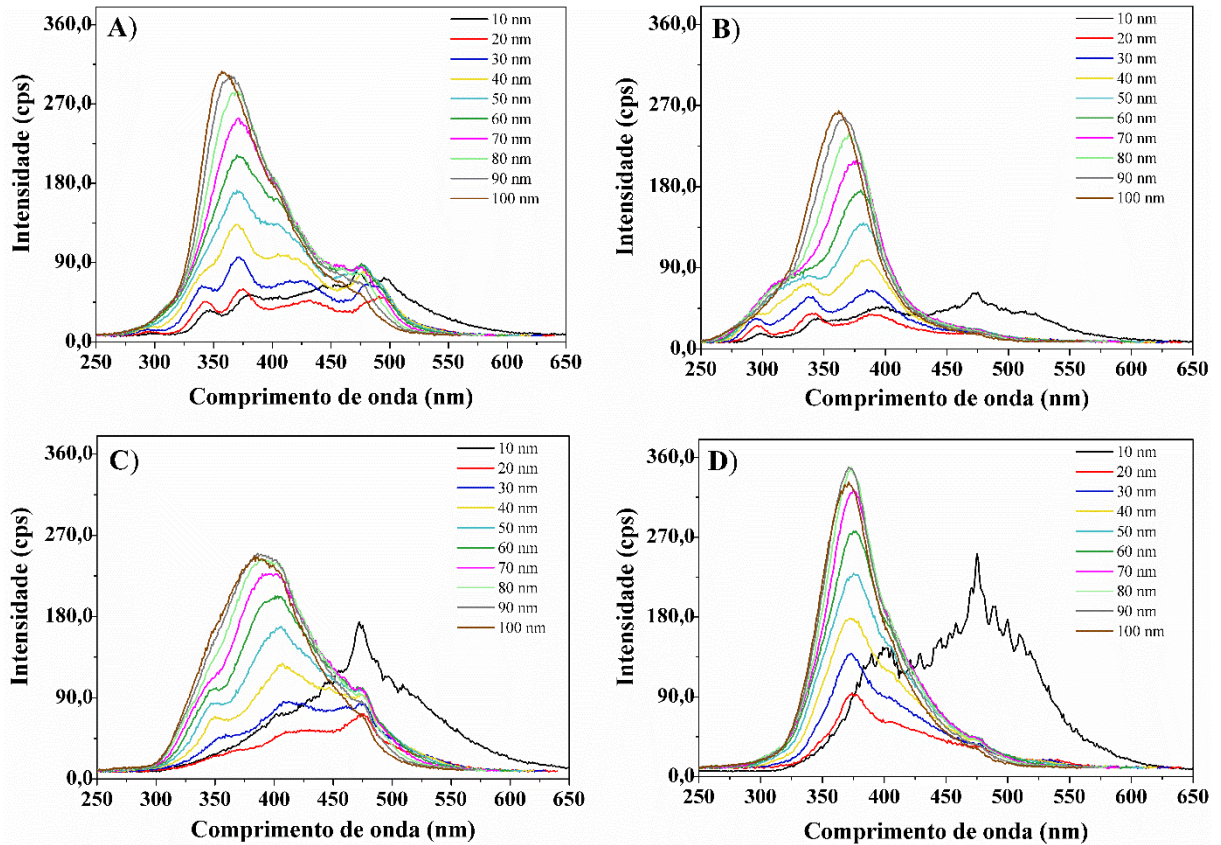


Figura 20 - Espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 10$  a 100 nm para cachaças comerciais envelhecidas em barris de bálsamo (A), carvalho (B), jequitibá (C) e umburana (D)

Soluções estoque de sete compostos fenólicos e cumarina foram preparadas em solução etanol: água (40:60 % v v<sup>-1</sup>) na concentração de 0,4 g L<sup>-1</sup> e analisadas sob as mesmas condições descritas para as amostras. Adicionalmente, o corante caramelo em solução etanol: água (40:60 % v v<sup>-1</sup>) também foi analisado. A Figura 21 mostra que os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 10$  nm apresentaram mais bandas que nos demais  $\Delta\lambda$ s. Os ácidos fenólicos (vanílico, siríngico, gálico e elágico) foram caracterizados pelos máximos de fluorescência registrados em  $\Delta\lambda = 40, 50$  ou 30 nm e  $\lambda_{em}$  entre 350 e 430 nm. Estes ácidos - principalmente o vanílico, o siríngico e o elágico - apresentaram bandas mais intensas comparando-se com os demais. Os aldeídos fenólicos (siringaldeído, vanilina e sinapaldeído) apresentaram máximos de emissão em 420, 490 e 510 nm nos espectros registrados em  $\Delta\lambda = 20, 40$  e 40 nm, respectivamente. A cumarina e o corante caramelo foram caracterizados pelas máximas emissões a 390 nm e  $\Delta\lambda = 50$  nm, e 450 nm e  $\Delta\lambda = 70$  nm, respectivamente.

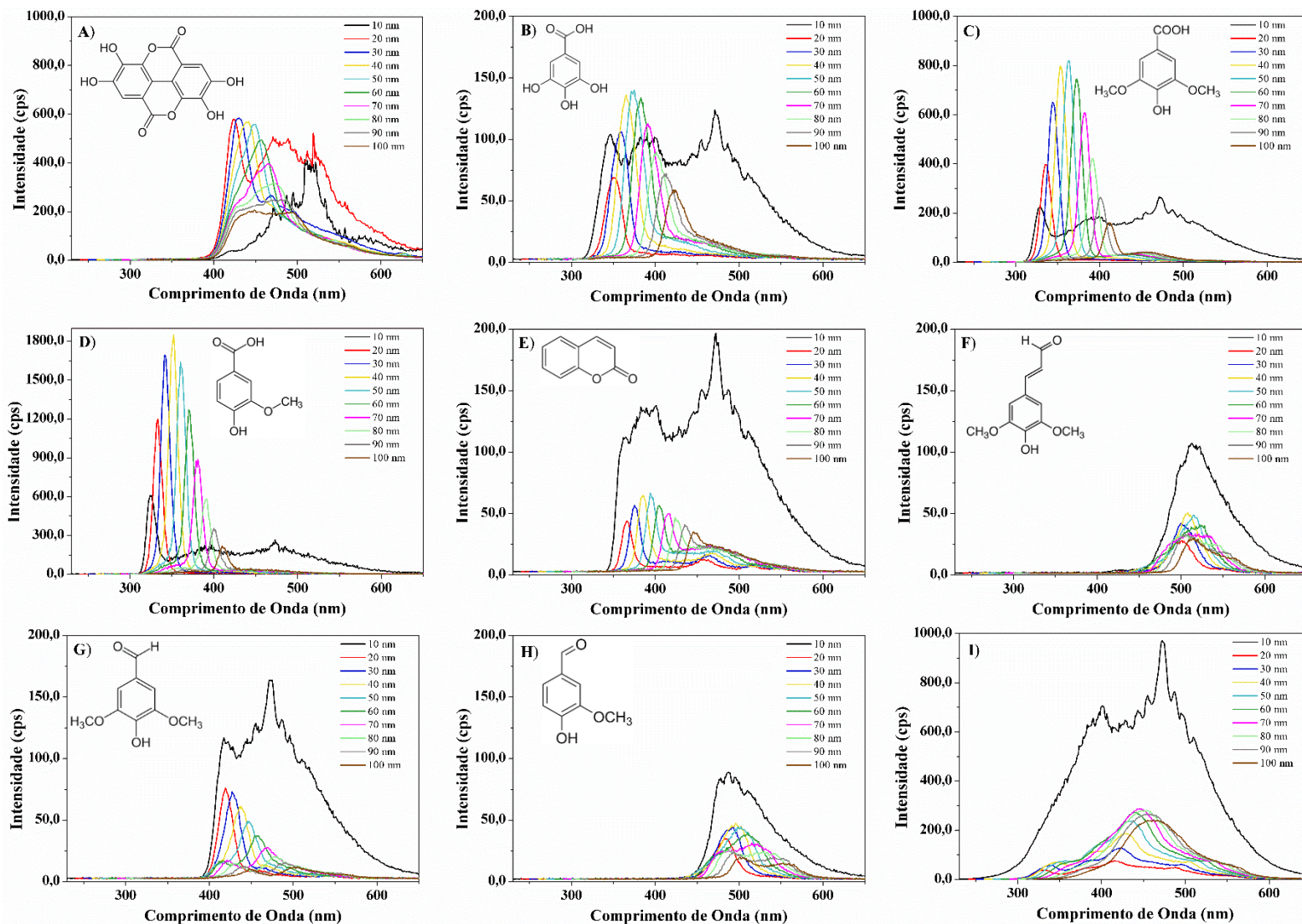


Figura 21 - Espectros de fluorescência síncrona dos marcadores químicos de envelhecimento de bebidas em madeira: ácido elágico (A), ácido gálico (B), ácido sirínico (C), ácido vanílico (D), cumarina (E), sinpaldeído (F), sirinaldeído (G) e vanilina (H); e corante caramelo (I)

Os espectros de fluorescência são baseados em interações e reações moleculares, absorção e radiação de diversos grupos orgânicos, principalmente em compostos que apresentam estruturas rígidas e planas [16]. Embora os espectros das cachaças pareçam semelhantes, eles diferem nas posições e intensidades das bandas. Essas diferenças surgem principalmente de diferentes fluoróforos e suas concentrações, resultantes dos vários tipos de barris e períodos de armazenamento e envelhecimento. Os fluoróforos presentes nas bebidas armazenadas/envelhecidas são derivados da oxidação da lignina na presença de álcool, que leva a formação de compostos fenólicos e polifenólicos, incluindo aldeídos e ácidos. Além desses compostos, também são extraídos da madeira lactonas, taninos, álcoois, hidrocarbonetos, açúcares e substâncias inorgânicas [82], o que pode ser influenciado pelas características do barril, como espécie da madeira, tratamento térmico e tamanho; condições de armazenamento (temperatura e umidade); e operações tecnológicas [99].

Diferenças nos teores fenólicos de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira de mesmo tamanho, para o mesmo período de envelhecimento e condições de armazenamento foram observadas em alguns estudos [84,98,100]. Carvalho e colaboradores observaram diferenças nas regiões de fluorescência dos espectros da cachaça não envelhecida e da cachaça envelhecida ao desenvolverem um método para quantificação de fenólicos totais em cachaça envelhecida em barris de umburana. A cachaça pura apresentou maior intensidade de fluorescência que a cachaça envelhecida, sendo observado o desaparecimento de algumas bandas de fluorescência após o processo de envelhecimento [79]. No espectro da cachaça envelhecida, o meio suprime as bandas características da cachaça sem envelhecimento devido a várias propriedades dos componentes, como o rendimento quântico e os efeitos de “*quenching*” [16].

Durante o processo de envelhecimento, as características sensoriais da cachaça são modificadas devido à formação de diversos compostos, dentre os quais alguns compostos fluoróforos. Esses compostos podem ser responsáveis pela cor, sabor ou odor da bebida. Alguns compostos voláteis fluorescentes, como eugenol,  $\beta$ -damascenona, 4-etilguaiacol, vanilina, dietil acetal e  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octalactona, já foram identificados em amostras de cachaça envelhecida [73]. Outros compostos como naringenina, pectolinarigenina, liquiritigenina, genisteína, biochanina A, dimetilgenisteína e ácido elágico também foram identificados em cachaças envelhecidas e podem contribuir para a cor e sabor desta bebida [96]. Caramelo, um corante permitido para correção de cor, também pode contribuir para a fluorescência observada. Embora a atribuição completa das bandas de fluorescência esteja além do escopo deste estudo,

algumas atribuições foram apresentadas na Tabela 9, com base em outros estudos envolvendo as medidas de fluorescência de bebidas alcoólicas envelhecidas.

Tabela 9 - Propriedades de fluorescência e potenciais fluoróforos em cachaças envelhecidas

Propriedades de Fluorescência	Potenciais Fluoróforos	Referência
Espectro síncrono ( $\Delta\lambda = 90$ nm): $\lambda = 331$ nm	Caramelo (IV)	[101]
Espectro síncrono ( $\Delta\lambda = 90$ nm): $\lambda = 322$ nm	Caramelo (III)	[101]
EEM ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ): 282/307	Eugenol	[102]
EEM ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ): 250-280/350-360	Ácido benzóico	[103]
EEM ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ): 260-280/420	Ácido cinâmico	[103]
EEM ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ): 340/425	Cumarinas	[103]

EEM excitation emission matrix

Os erros de classificação no conjunto de teste para os modelos PLS2-DA construídos usando os parâmetros de alisamento de Savitzky-Golay mais adequados (tamanho da janela e grau do polinômio) para cada  $\Delta\lambda$ , são mostrados na Tabela 10. O modelo  $\Delta\lambda = 30$  nm apresentou os menores erros de classificação no conjunto teste em comparação com os modelos construídos com outros  $\Delta\lambda$ s. A superfície de resposta e o diagrama de contorno obtidos usando os erros de classificação no conjunto de teste nos modelos PLS2-DA construídos no planejamento para os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm são mostrados na Figura 22. A superfície de resposta indicou que a melhor combinação foi janela de 13 pontos e polinômio de 5° grau.

Tabela 10 - Erros de classificação no conjunto de teste para as classes *B* (bálsamo), *C* (carvalho), *J* (jequitibá) e *U* (umburana) nos modelos PLS2-DA construídos para cada  $\Delta\lambda$

Modelo $\Delta\lambda$ (nm)	Erros de Classificação no Conjunto de Teste			
	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>J</i>	<i>U</i>
10	0,332	0,099	0,265	0,136
20	0,210	0,014	0,068	0,042
30	0,105	0,000	0,044	0,087
40	0,091	0,042	0,015	0,042
50	0,119	0,029	0,115	0,043
60	0,136	0,119	0,092	0,000
70	0,087	0,139	0,145	0,042
80	0,029	0,000	0,169	0,029
90	0,090	0,000	0,093	0,074
100	0,042	0,181	0,077	0,139

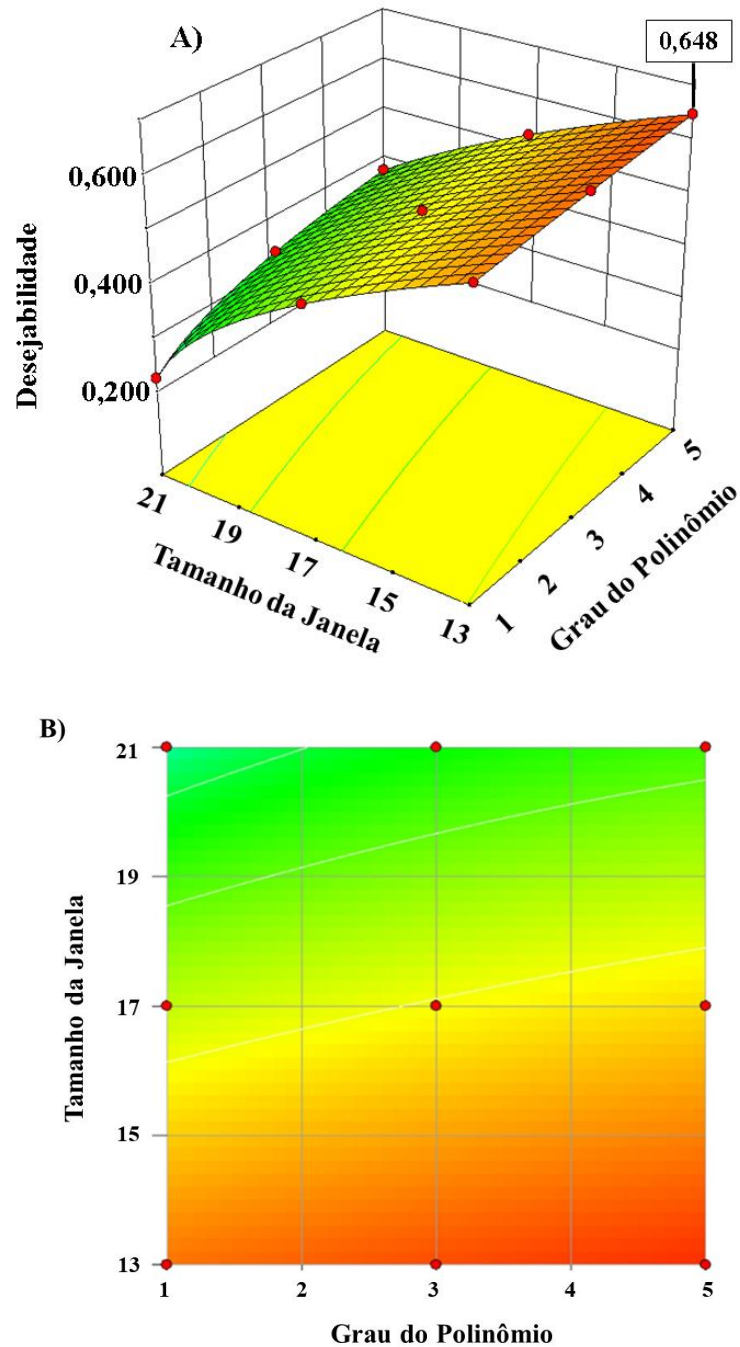


Figura 22 - Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) para erros de classificação mínimos no conjunto teste para espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm

Os espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm, pré-processados empregando o algoritmo Savitzky-Golay (janela de 13 pontos e polinômio de 5ª ordem), obtidos para todas as amostras de cachaça analisadas neste estudo são mostrados na Figura 23, indicando que as intensidades de fluorescência e a forma dos espectros variou significativamente entre as amostras, inclusive na mesma classe, impossibilitando a classificação das amostras apenas pela inspeção visual dos espectros.



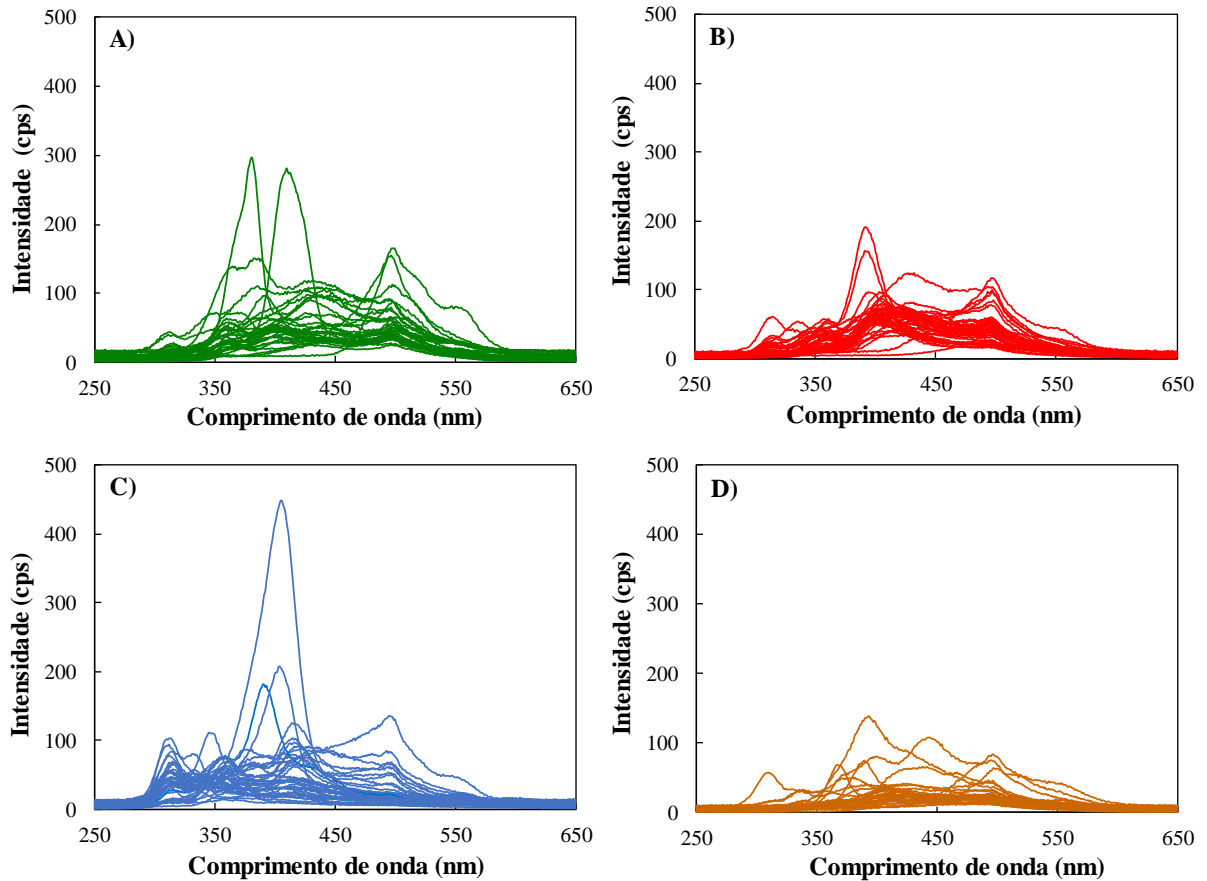


Figura 23 - Espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm obtidos para as amostras de cachaça envelhecidas em bálsamo (A), carvalho (B), jequitibá (C) e umburana (D).

A PCA aplicada aos espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm apresentando cinco *CP*, respondeu por 65% da variância total dos dados. Os escores em cada *CP* são mostrados na Figura 24. A *CP1* (Figura 24A) apresentou uma tendência de separação das cachaças envelhecidas em barris de jequitibá, na região positiva, das cachaças envelhecidas em bálsamo e em carvalho, na parte negativa. A *CP2* (Figura 24B) apresentou uma tendência de separação das cachaças envelhecidas em carvalho (região positiva) para cachaças envelhecidas em umburana (região negativa). *CP3* (Figura 24C) mostrou uma separação entre as amostras de carvalho (região positiva) e jequitibá e umburana (região negativa). A *CP4* (Figura 24D) não apresentou separação ou tendência clara entre as amostras de cachaça pela madeira utilizada no processo de envelhecimento, com os grupos de todas as classes centrados em torno de zero e sobrepostos. Em *CP5* (Figura 24E), observou-se uma tendência de separação das amostras de bálsamo e umburana.

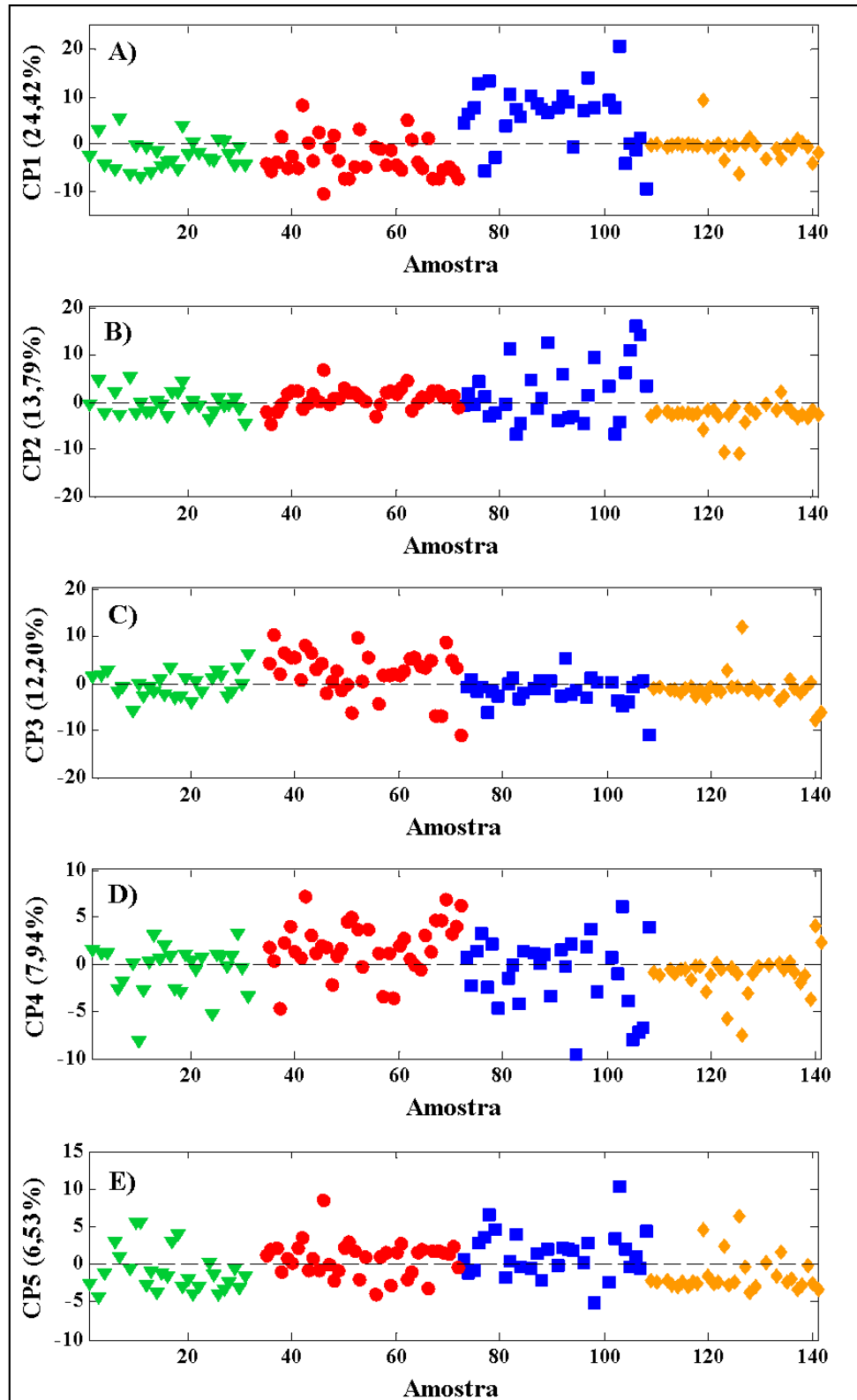


Figura 24 - Gráfico de escores da PCA construída usando os espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm (variância explicada): escores de CP1 (A); escores de CP2 (B); escores de CP3 (C); escores de CP4 (D); escores de CP5 (E).

Símbolos: triângulos invertidos verdes para cachaça envelhecida em barris de bálsamo, círculos vermelhos para carvalho, quadrados azuis para jequitibá e diamantes laranjas para umburana

A separação entre cachaças pela madeira utilizada no processo de armazenamento e envelhecimento não ficou muito clara na PCA. Este resultado indica que as diferenças nos espectros de fluorescência síncrona podem estar relacionadas também aos diferentes procedimentos envolvidos nos processos de fermentação, destilação e envelhecimento, além da madeira utilizada no processo de envelhecimento. Uma clara diferenciação das cachaças envelhecidas foi possível através da construção de um modelo de classificação supervisionada (PLS2-DA) utilizando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm, com bons parâmetros qualitativos de desempenho.

O melhor modelo PLS2-DA usando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm foi construído usando 11 VL, indicadas pela validação cruzada *venetian blinds*. Estas VL explicaram 98 e 62% da variância total nos blocos X e Y, respectivamente, após a remoção de quatro amostras anômalas. A Figura 25 apresenta as previsões de Y para as amostras de cachaça envelhecidas dos conjuntos de treinamento e de teste. Em geral, este modelo apresentou boas previsões para todas as classes, apresentando baixos erros de classificação. Vale ressaltar que as amostras utilizadas neste estudo foram adquiridas em comércios locais e virtuais, sem garantia da madeira utilizada no envelhecimento e se de fato foi realizado o procedimento, uma vez que foram usadas as informações contidas no rótulo. A ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos também pode estar associada à prática comum de *blending* de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira, e essa informação pode não ser fornecida pelo produtor.

Para a discriminação de cachaças envelhecidas em barris de bálsamo de cachaças envelhecidas em outros barris de madeira (Figura 25A), foram observados quatro falso-negativos e quatro falso-positivos no conjunto de treinamento, e dois falso-negativos e apenas um falso-positivo no conjunto de teste. Para as cachaças envelhecidas em barris de carvalho (Figura 25B), foram observados três falso-negativos e cinco falso-positivos no conjunto de treinamento, e três falso-positivos e nenhum falso-negativo no conjunto de teste. Para a discriminação das cachaças envelhecidas em barris de jequitibá (Figura 25C), não foram observados falso-negativos e seis falso-positivos no conjunto de treinamento, e todas as amostras foram classificadas corretamente no conjunto de teste. Para a classe umburana (Figura 25D), apenas um falso-negativo e dois falso-positivos foram observados no conjunto de treinamento, e apenas um falso-negativo e três falso-positivos no conjunto de teste.

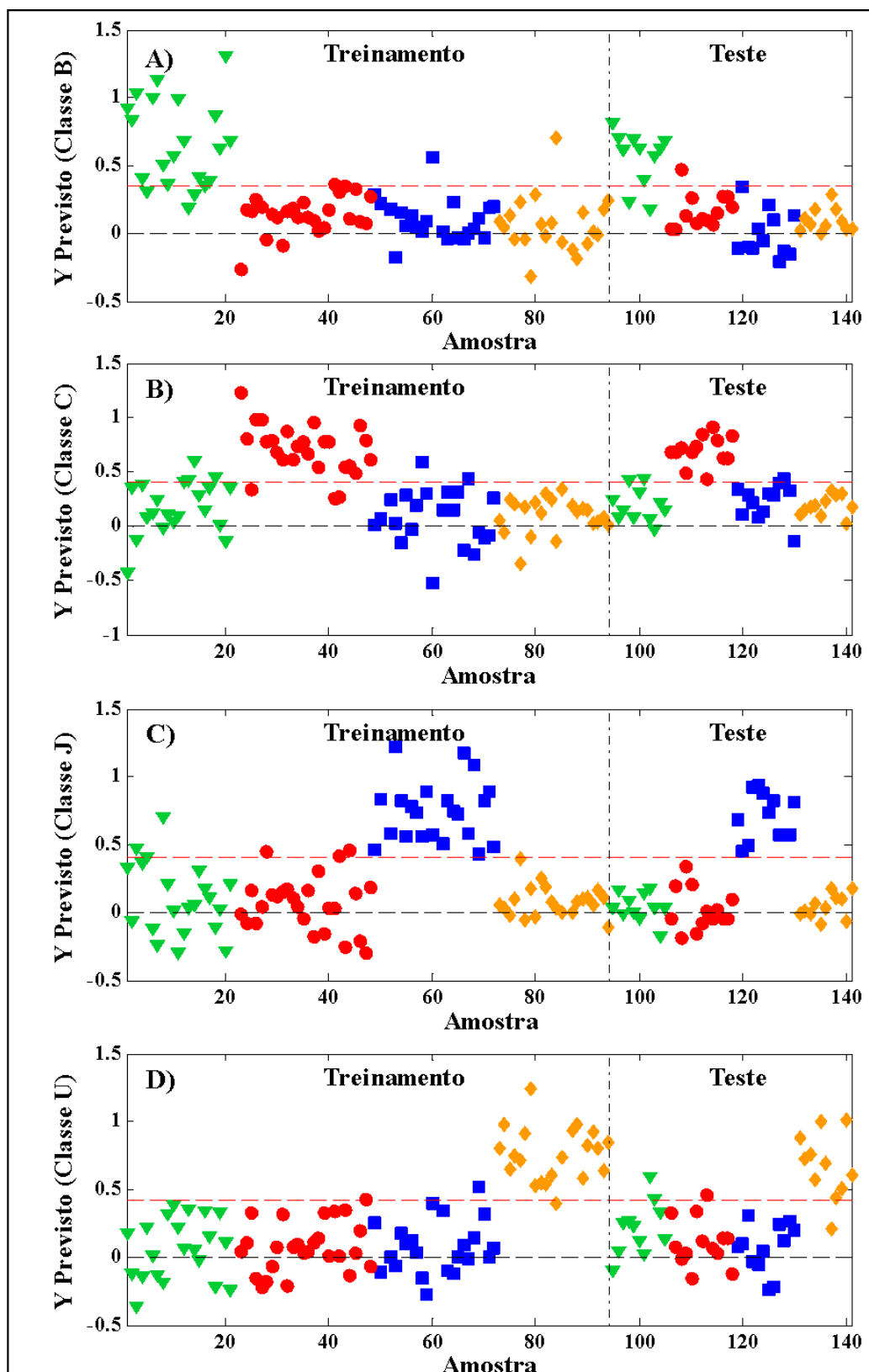


Figura 25 - Previsões de  $Y$  para modelo PLS2-DA construído usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm para cachaça envelhecida por madeira utilizada no processo de envelhecimento: bálsamo (A); carvalho (B); jequitibá (C); e umburana (D).

A linha tracejada vertical separa os conjuntos de treinamento e teste, e a linha tracejada horizontal vermelha indica o *threshold*. Símbolos: triângulos invertidos verdes para cachaças envelhecidas em barris de bálsamo, círculos vermelhos para carvalho, quadrados azuis para jequitibá e diamantes laranjas para umburana

A qualidade do modelo pode ser avaliada calculando parâmetros de desempenho qualitativos apropriados. A Tabela 11 apresenta esses parâmetros calculados para os conjuntos de treinamento e teste para todas as classes, que demonstraram um bom desempenho para discriminação entre as cachaças pela madeira utilizada no processo de envelhecimento. A *SEN* foi superior a 81% para todas as classes e a *SPE* foi superior a 91% no conjunto de treinamento. *SEN* e *SPE* foram superiores a 82 e 92%, respectivamente, no conjunto de teste. Os melhores resultados foram observados para as classes carvalho e jequitibá, com *SEN* de 100% e *SPE* de 94 e 100%, respectivamente, no conjunto de teste. Esses parâmetros de desempenho foram resumidos pela determinação da *EFF*, que apresentaram taxas superiores a 91% (bálsamo e carvalho, no conjunto de treinamento; e umburana, no conjunto de teste) para todas as classes. Para a discriminação de cachaças envelhecidas em barris de jequitibá, a *EFF* foi de 100% no conjunto teste.

Tabela 11 - Parâmetros de desempenho estimados para o modelo PLS2-DA construído com espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm para a discriminação de cachaças pela madeira utilizada no processo de envelhecimento. *B* (bálsamo); *C* (carvalho); *J* (jequitibá); *U* (umburana)

Conjunto	Parâmetros de Qualidade (%)	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>J</i>	<i>U</i>
Treinamento	<i>SEN</i>	81	89	100	95
	<i>SPE</i>	94	92	91	97
	<i>TFN</i>	21	12	0	5
	<i>TFP</i>	6	8	9	3
	<i>EFF</i>	91	91	93	97
Teste	<i>SEN</i>	82	100	100	91
	<i>SPE</i>	97	94	100	92
	<i>TFN</i>	18	0	0	9
	<i>TFP</i>	3	9	0	8
	<i>EFF</i>	94	94	100	91

*EFF* eficiência, *SEN* sensibilidade, *SPE* especificidade, *TFN* taxa de falso-negativos, *TFP* taxa de falso-positivos

Avaliando os vetores informativos do modelo PLS2-DA, é possível identificar os principais comprimentos de onda associados à discriminação das cachaças por cada madeira. Os comprimentos de onda que mais contribuíram para a classificação da cachaça pela madeira utilizada no processo de maturação, indicados pelos valores mais altos de *VIP* scores, são apresentados na Figura 26.

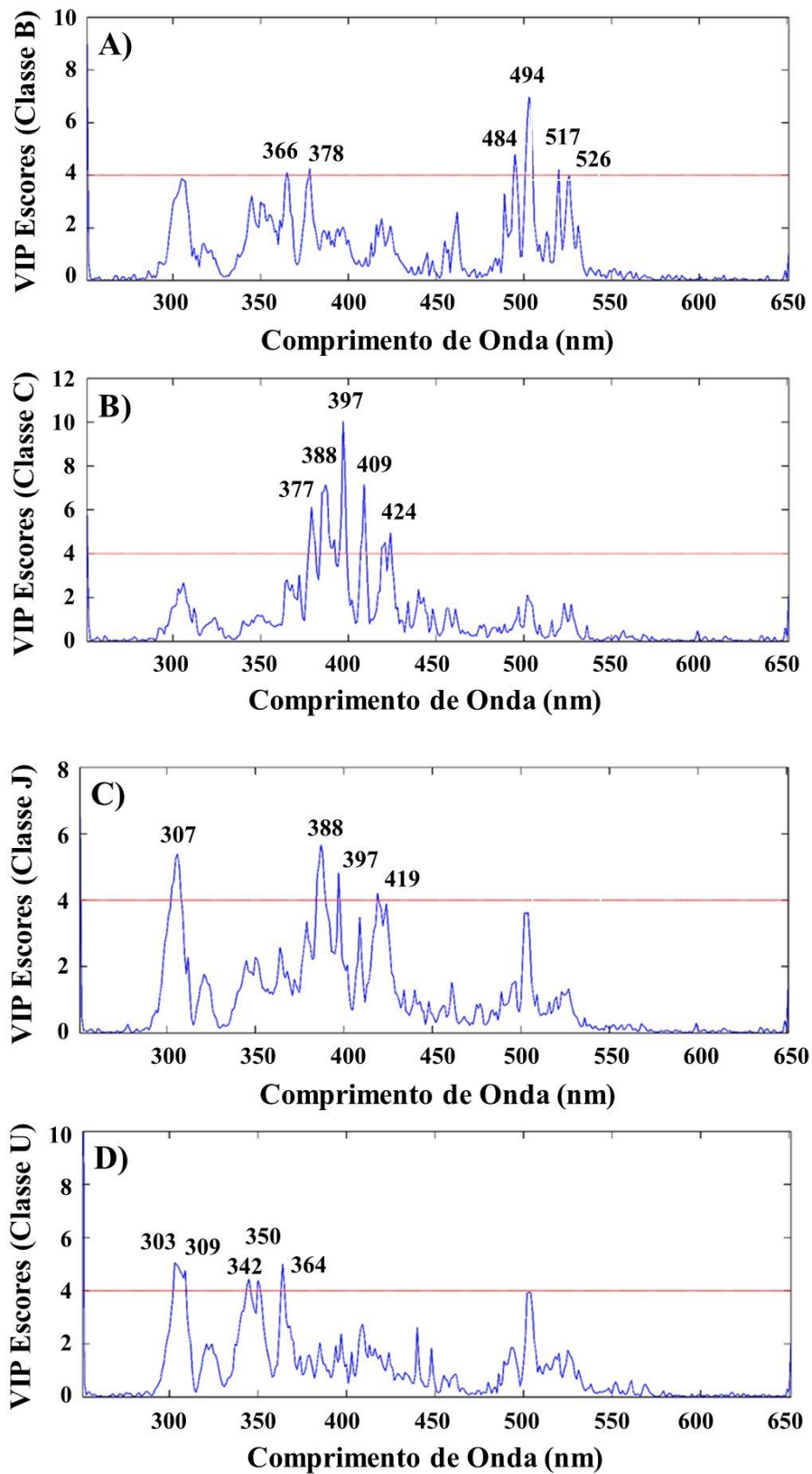


Figura 26 - VIP escores do modelo PLS2-DA construído usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm para a classificação de cachças pela madeira utilizada no processo de envelhecimento: balsamo (A); carvalho (B); jequitibá (C); e umburana (D)

Comparando-se o modelo PLS2-DA desenvolvido neste estudo com outros modelos de classificação supervisionada segundo a madeira utilizada no envelhecimento de cachaças, este é mais simples, rápido, menos dispendioso e apresenta a vantagem de não precisar de nenhum preparo de amostra (Tabela 12).

Tabela 12 - Número de amostras e desempenho dos modelos de classificação supervisionada para classificação de cachaças por madeira utilizada no envelhecimento

<b>Método</b>	<b>Amostras</b>	<b>Desempenho - Acurácia</b>	<b>Referência</b>
k-NN e ANN	144	100%	[93]
QDA	105	100%	[91]
PLS-DA	109	56 - 100% no treinamento e 60 - 94% no teste	[90]
SPA-LDA	122	74% no treinamento e 90% no teste	[88]

ANN artificial neural network, k-NN k-nearest neighbor, PLS-DA partial least squares discriminant analysis, QDA quadratic discriminant analysis, SPA-LDA successive projections algorithm- linear discriminant analysis

Embora os modelos desenvolvidos por Rodrigues e colaboradores apresentem melhores parâmetros de desempenho qualitativo, não foram utilizadas amostras comerciais para sua construção e validação, reduzindo significativamente a variância dos dados e, conseqüentemente, a aplicabilidade e robustez desses modelos [91,93]. Além disso, mais uma desvantagem apresentada pelo modelo desenvolvido por Rodrigues e colaboradores é a necessidade de realização de métodos complexos de processamento de imagens em várias etapas [91]. O modelo desenvolvido no presente estudo apresentou parâmetros de desempenho semelhantes aos modelos de Fernandes e colaboradores [88], e parâmetros de desempenho melhores que os de Bernardes e Barbeira, que discriminaram amostras comerciais de cachaças envelhecidas em amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana, usando a fusão das técnicas de espectroscopia eletrônica e espectrofluorimetria convencional [90].

No presente estudo, a SFS foi usada com sucesso para diferenciar amostras comerciais de cachaça envelhecidas em quatro diferentes barris de madeira (bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana). As principais vantagens desta metodologia foram a simplicidade e rapidez, uma vez que esta análise não requer nenhuma etapa de preparação da amostra nem reagentes analíticos, reduzindo assim o tempo de análise. A aplicação do método de classificação supervisionada PLS2-DA permitiu a discriminação simultânea das cachaças envelhecidas e a detecção dos principais comprimentos de onda para cada classe, sendo uma abordagem eficiente para uso em análises de rotina como método de triagem, auxiliando na inspeção das bebidas.

## 7. Discriminação de cachaças comerciais segundo o tempo de envelhecimento

### 7.1. Revisão Bibliográfica

Os processos de armazenamento e envelhecimento em barris de madeiras são empregados na produção de diversas bebidas alcoólicas, como uísque, rum, brandy e vinho, visando a melhoria das características sensoriais: aroma, sabor e cor, agregando valor ao produto final. O envelhecimento promove mudanças na composição química através de um complexo conjunto de reações envolvendo, entre outras, a extração de compostos da madeira e a degradação/formação de diversos compostos [82]. Essas mudanças dependem das características do barril (espécie de madeira, torragem e tamanho) e das condições de envelhecimento, como temperatura, umidade e, principalmente, do período de envelhecimento.

Devido à comercialização em larga escala e os preços relativamente altos, a falsificação e adulteração de bebidas alcoólicas destiladas são comuns em todo o mundo. As atividades fraudulentas associadas à declaração de tempo de envelhecimento superior ao real podem ocorrer, uma vez que o envelhecimento é geralmente o processo mais demorado da produção e o que agrega mais valor às bebidas. Na Tabela 13 é mostrado um resumo de estudos envolvendo a identificação ou separação de bebidas destiladas em função do tempo de envelhecimento.

Tabela 13 - Resumo de estudos envolvendo a separação e discriminação de bebidas alcoólicas destiladas por tempo de envelhecimento

<b>Bebida</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Método Quimiométrico</b>	<b>Referência</b>
Cachaça	Imagem	LDA, QDA, k-NN, MLP, SVM	[91]
Cachaça	Espectroscopia eletrônica, GC-FID e imagem digital	ANN e k-NN	[93]
Aguardente de cana	Nariz eletrônico e HS-MS	PLS	[104]
Uísque	ESI-FT-ICR-MS	-	[105]
Uísque	FT-IR	DA	[106]
Uísque	ESI-FT-ICR-MS	PLS-DA	[107]
Aguardente	GC-MS e GC-IMS	PLS	[108]
Baijiu	HS-GC-IMS	PLS	[109]
Tequila	Espectroscopia eletrônica	PCA, HCA, k-NN, QDA, PLS-DA, SIMCA	[110]
Uísque	Espectroscopia eletrônica	PCA, LDA, PLS-DA	[111]

ANN artificial neural network, DA discriminant analysis, ESI-FT-ICR-MS electrospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT-IR Fourier transform infrared spectroscopy, GC-FID gas chromatography-flame ionization detector, GC-IMS gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-MS gas chromatography-mass spectrometry, HCA hierarchical cluster analysis, HS-GC-IMS headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry, HS-MS headspace-mass spectrometry, k-NN k-nearest neighbor analysis, LDA linear discriminant analysis, MLP multi-layer perceptron, PCA principal component analysis, PLS partial least squares, PLS-DA partial least squares discriminant analysis, QDA quadratic discriminant analysis, SIMCA soft independent modeling of class analogy, SVM support vector machines



Assim como outras bebidas fermento-destiladas, a cachaça também pode ser envelhecida em barris de madeira. A legislação brasileira classifica a cachaça envelhecida nos seguintes tipos: “envelhecida”, “premium” e “extra premium”. Essa classificação é relacionada ao período de envelhecimento, à capacidade do barril de madeira e à quantidade de cachaça envelhecida. A cachaça é denominada “envelhecida” quando ao menos 50% da cachaça é envelhecida em barril de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por pelo menos um ano. A cachaça “premium” contém 100% de cachaça envelhecida em barril de madeira com capacidade máxima de 700 L por um período não inferior a um ano. Por fim, a cachaça “extra premium” contém 100% de cachaça envelhecida por no mínimo três anos [2]. Quando a cachaça não se enquadra na definição de envelhecida, mas passa por recipientes de madeira, é considerada “armazenada”. Além do carvalho (*Quercus* sp.), as cachaças também são envelhecidas em diferentes recipientes de madeiras nativas brasileiras [3].

Substâncias consideradas marcadoras do processo de envelhecimento têm sido avaliadas ao longo dos processos de armazenamento e envelhecimento de cachaças. Dos Anjos e colaboradores observaram uma correlação positiva entre a concentração de compostos fenólicos e o tempo de envelhecimento, com destaque para os analitos siringaldeído e ácido gálico [112]. Os compostos fenólicos são importantes principalmente para o aroma e cor das bebidas e os resultados observados neste trabalho corroboram com outros estudos [113-115].

Após o processo de armazenamento de cachaças em barris de carvalho, por um período de 180 dias, Alcarde e colaboradores observaram que as concentrações de álcoois superiores, ésteres, aldeídos e ácidos fenólicos aumentaram, provocando elevação da acidez na bebida; e a concentração de etanol diminuiu, devido à evaporação e a oxidação a acetaldeído, que teve sua concentração aumentada. Os autores também observaram que a concentração de ácido acético aumentou significativamente, sendo um produto da oxidação de etanol e da degradação da hemicelulose, e a concentração de cobre diminuiu, podendo estar associado à absorção ou adsorção pela madeira do barril [116].

Neste trabalho, Alcarde e colaboradores também observaram um aumento na concentração dos compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural, que podem ser formados quando a madeira é submetida a tratamentos térmicos durante a fabricação dos barris, sendo posteriormente transferidos para a cachaça. Essas substâncias são importantes para coloração e *flavor* da bebida, mas contribuem para características desagradáveis quando em concentrações elevadas [116]. Em outro estudo, Bortoletto e Alcarde observaram que a concentração de furfural foi mais elevada em cachaças armazenadas com lascas tostadas de carvalho comparado com as amostras envelhecidas em barris da mesma madeira [117]. Posteriormente, Bortoletto e

colaboradores avaliaram a influência da requeima dos barris de carvalho na composição da cachaça envelhecida por 24 meses, observando que a bebida armazenada em barril submetido a requeima mais intensa apresentou maior concentração de furfural em relação às bebidas armazenadas em barris de requeima média [84].

Outra substância estudada para caracterizar o processo de envelhecimento é o glicerol, o segundo álcool mais abundante na cachaça e produzido inicialmente durante o processo de fermentação. Essa substância contribui positivamente para o sabor e a viscosidade da bebida e a sua concentração também é aumentada após o processo de envelhecimento, por meio da extração e/ou hidrólise de gorduras, resinas e triglicerídeos presentes na madeira [118].

A concentração de carbamato de etila também já foi avaliada após processo de envelhecimento, por ser um contaminante com potencial carcinogênico formado principalmente durante a fermentação e também sendo identificado em outras bebidas destiladas como uísque, rum, vodca e tiquira [119]. O principal mecanismo de formação dessa substância envolve a degradação enzimática da arginina, formando a ureia, que reage com etanol [85]. Santiago e colaboradores observaram que a concentração do carbamato de etila aumenta durante a destilação, mas após o envelhecimento de amostras de cachaça em barris de carvalho, a concentração dessa substância não foi alterada [120]. Este resultado também foi observado por Andrade-Sobrinho e colaboradores [119]. No entanto, outros trabalhos mostraram que durante o processo de armazenamento, tanto em tonéis de carvalho, como em recipientes de vidro, a concentração de carbamato de etila é aumentada significativamente [121].

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) são contaminantes ambientais com potencial carcinogênico formados a partir da queima incompleta de material orgânico. Além da queima da cana-de-açúcar, a presença de HPA's em cachaças também pode ser atribuída a contaminações no processo de produção, incluindo o armazenamento e envelhecimento da bebida em barris de madeira tratada termicamente [3]. Chávez avaliou o tempo de tosta dos barris de carvalho e a sua influência nos teores de HPA's na cachaça envelhecida, observando que o armazenamento da bebida em barris de carvalho submetidos a tosta aumentou a concentração de HPA's, principalmente quando o tratamento térmico é de baixa duração [122].

O presente estudo teve como objetivo estabelecer uma correlação entre o tempo de envelhecimento e os espectros de fluorescência síncrona de amostras de cachaças comerciais e amostras envelhecidas em laboratório, através da classificação multivariada baseada em PLS-DA, para separar amostras de cachaça armazenadas das envelhecidas em barris de amendoim, bálsamo, jequitibá, carvalho e umburana.

## 7.2. Amostras

Um total de 212 amostras de cachaças armazenadas e envelhecidas em amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana foram analisadas nesse estudo, das quais 143 são amostras comerciais adquiridas em lojas de bebidas locais e virtuais, e 69 amostras de cachaças armazenadas por períodos de dois a 24 meses nas cinco madeiras no laboratório. As cachaças foram codificadas de acordo com o tempo de armazenamento/ envelhecimento: *A* (armazenadas,  $n = 145$ ) e *E* (envelhecidas,  $n = 67$ ). As amostras são consideradas armazenadas quando são mantidas em recipientes de madeira por menos de um ano e envelhecidas quando são mantidas em barris de madeira por pelo menos um ano. As amostras comerciais foram acondicionadas em temperatura ambiente, no próprio recipiente de comercialização, e não foram submetidas a nenhum preparo.

O armazenamento das cachaças no laboratório foi realizado em barris não tostados de 10 L de capacidade fabricados com as cinco madeiras estudadas, utilizando uma cachaça recém destilada para o preenchimento completo dos mesmos. Durante o processo de armazenamento, alíquotas de 100 mL das amostras foram coletadas do barril, de tempos em tempos, e acondicionados em frascos âmbar, protegidos da luz e a temperatura ambiente.

No desenvolvimento dos modelos PLS-DA, os conjuntos de treinamento e de teste foram usados para construir e validar os modelos, e foram compostos por 141 (*A*,  $n = 100$ ; *E*,  $n = 41$ ) e 71 (*A*,  $n = 45$ ; *E*,  $n = 26$ ) amostras, respectivamente.

## 7.3. Resultados e Discussão

Os valores de pH, condutividade elétrica e turbidez para a cachaça armazenada em barris de amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana em laboratório são apresentados, em função do tempo, na Figura 27. Em geral, foram observados a diminuição do pH e aumento da condutividade elétrica com o aumento do tempo de armazenamento em todas as madeiras estudadas. Quanto a intensidade da radiação espalhada, não foi observada alguma tendência clara em função do tempo de armazenamento.

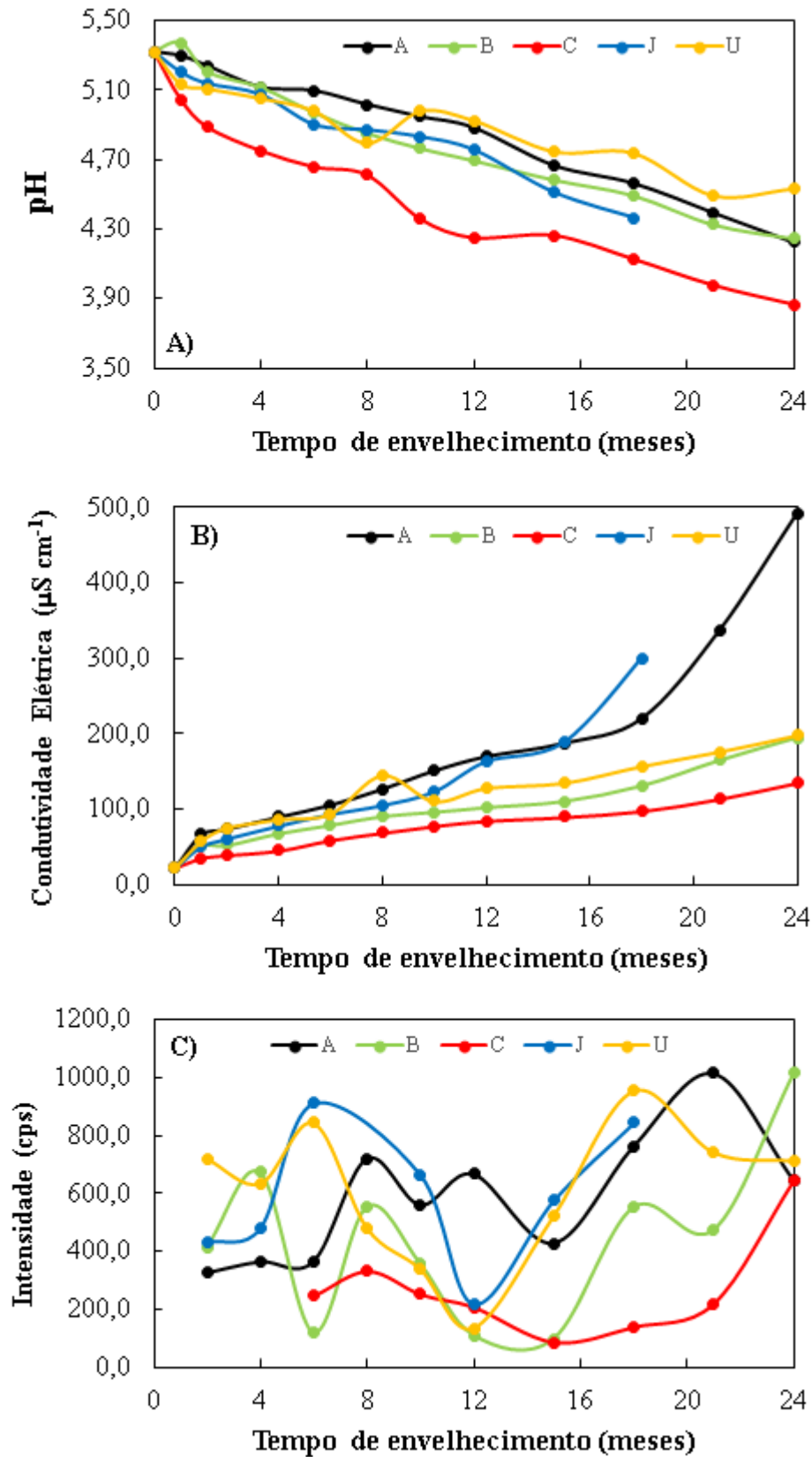


Figura 27 - Evolução das medidas de pH (A), condutividade elétrica (B) e nefelometria (C) das amostras de cachaça armazenadas em A (amendoim), B (bálsamo), C (carvalho), J (jequitibá) e U (umburana) em função do tempo de armazenamento

Cores: preto para cachaças armazenadas em barris de amendoim, verde para bálsamo, vermelho para carvalho, azul para jequitibá e amarelo para umburana

As propriedades avaliadas neste trabalho podem ser relacionadas ao processo de armazenamento e envelhecimento das bebidas em recipientes de madeira. É esperado o aumento da acidez nas cachaças durante essa etapa, devido à extração dos ácidos orgânicos presentes na madeira bem como às reações de oxidação de álcoois e aldeídos levando a formação de compostos ácidos. O aumento da condutividade elétrica também é esperado, sendo associado aos compostos extraídos da madeira e os compostos ácidos formados. A turbidez também pode ser relacionada ao processo de armazenamento e envelhecimento, uma vez que o contato da bebida com a madeira pode resultar no aparecimento de partículas em suspensão. Outros trabalhos na literatura relatam o aumento da acidez, condutividade elétrica e da turbidez ao longo do armazenamento de cachaças em recipientes de madeira [123-125].

As medidas de pH, condutividade elétrica e intensidade da radiação espalhada obtidas para as amostras comerciais de cachaça armazenadas e envelhecidas nas cinco madeiras são apresentadas em função do tempo de envelhecimento declarado na Figura 28. Não foram observadas tendências para essas propriedades em função do tempo de envelhecimento e uma grande dispersão de valores para as amostras em um mesmo período de envelhecimento. Esse resultado pode ser atribuído à variedade de procedimentos adotados durante a fabricação das cachaças, o que contribui para a elevada variabilidade sensorial dessa bebida.

Sobre os picos cromatográficos observados em 280 nm, para a amostra de cachaça armazenada nas cinco madeiras em nosso laboratório (Figura 29), foi observado que o número se manteve constante durante todo o processo avaliado (do 1° ao 24° mês, para amendoim, bálsamo, carvalho e umburana, e do 1° ao 18° mês, para jequitibá). O armazenamento em amendoim forneceu o maior número de picos para a cachaça, seguido do bálsamo, umburana, carvalho e jequitibá. Conforme discutido anteriormente, os compostos identificados nas cachaças armazenadas e envelhecidas em recipientes de madeira são dependentes de diversos fatores, principalmente da madeira utilizada no processo. O tempo de armazenamento, por sua vez, afeta a concentração dos compostos extraídos da madeira, uma vez que os picos identificados durante o processo de envelhecimento se mantiveram constantes, mas as suas áreas variaram no decorrer do processo.

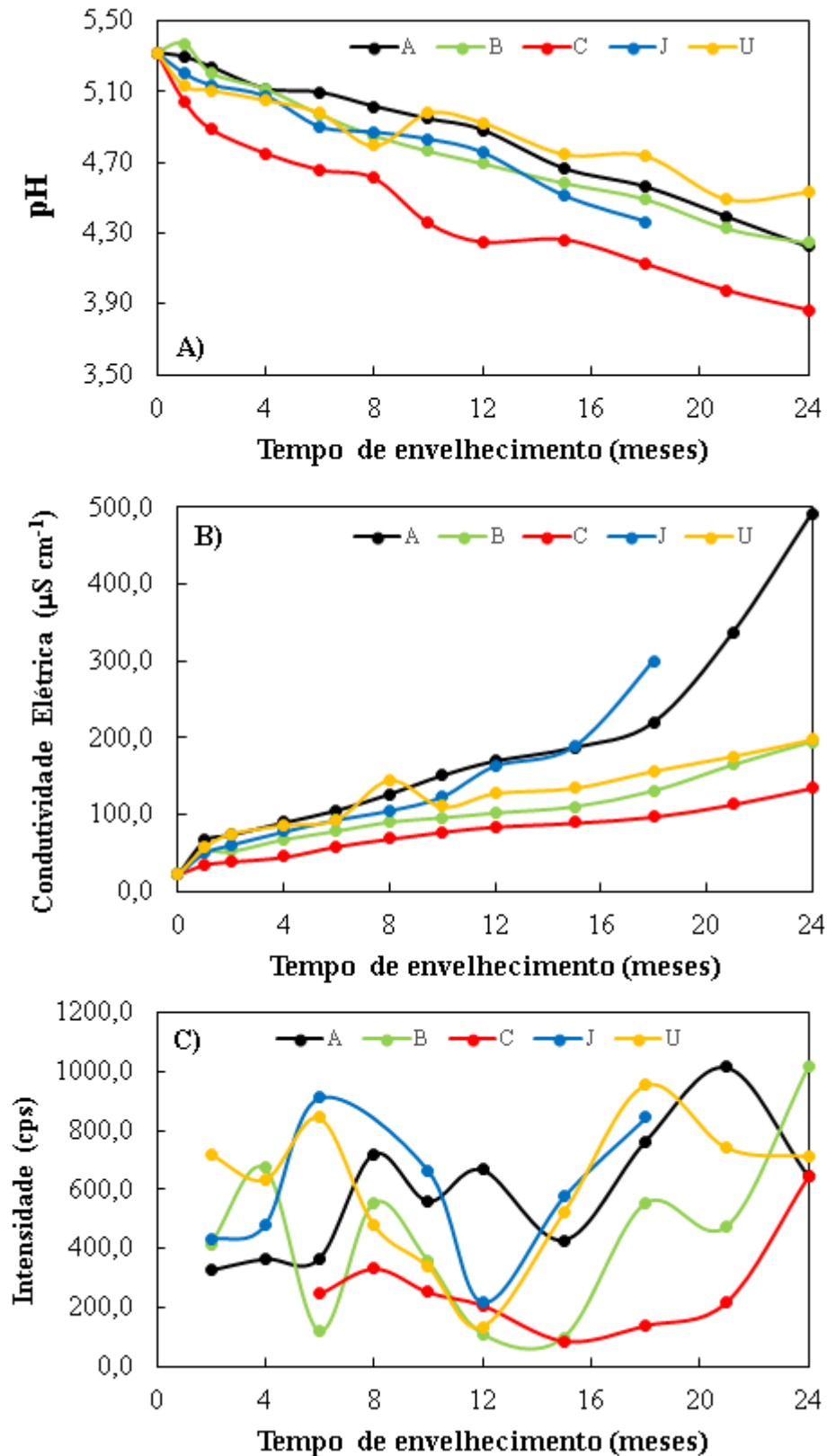


Figura 28 - Medidas de pH (A), condutividade elétrica (B) e nefelometria (C) das amostras de cachaça comerciais armazenadas e envelhecidas em A (amendoim), B (bálsamo), C (carvalho), J (jequitibá) e U (umburana)

Cores: preto para cachaças armazenadas em barris de amendoim, verde para bálsamo, vermelho para carvalho, azul para jequitibá e amarelo para umburana

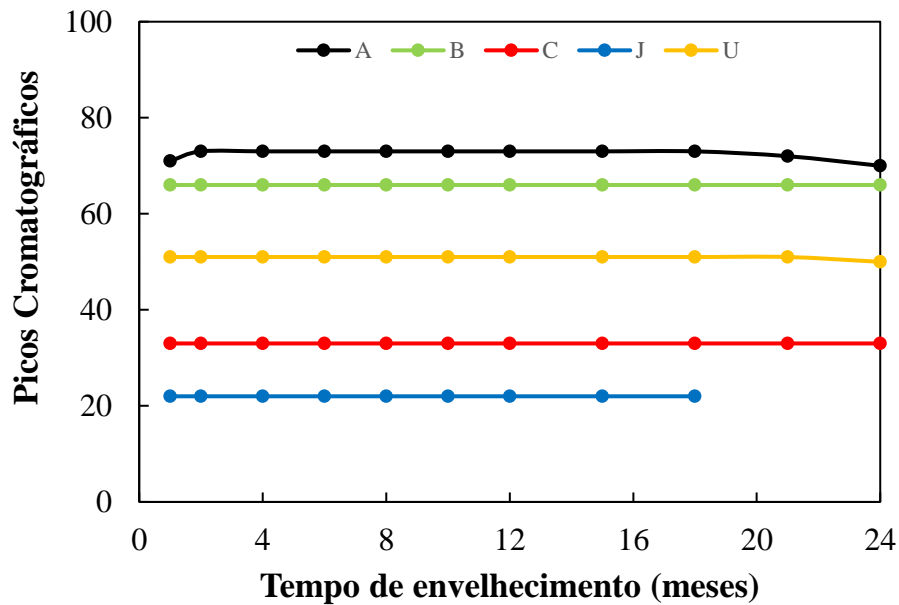


Figura 29 - Evolução dos picos cromatográficos registrados em 280 nm para amostra de cachaça armazenada em barris de A (amendoim), B (bálsamo), C (carvalho), J (jequitibá) e U (umburana)

Cores: preto para cachaças armazenadas em barris de amendoim, verde para bálsamo, vermelho para carvalho, azul para jequitibá e amarelo para umburana

Os espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm para amostra de cachaça armazenada em barris de amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana em nosso laboratório por períodos de 1, 3, 6, 12 e 24 meses são apresentados na Figura 30. Os espectros apresentaram bandas de fluorescência comuns na região próxima a 480 e 550 nm. A banda em 480 nm foi a mais intensa nos espectros da amostra armazenada nas cinco diferentes madeiras e apresentou um aumento na intensidade de fluorescência até 6 ou 12 meses de envelhecimento, seguido pelo decréscimo na intensidade. A banda em 550 nm apresentou um aumento de intensidade com o aumento do tempo de armazenamento. Os espectros da amostra envelhecida em amendoim e em carvalho apresentaram um maior número de bandas (350 e 380 nm) que as demais madeiras. As bandas próximas a 350 e 380 nm apresentaram decréscimo na intensidade de fluorescência em função do tempo de envelhecimento.

Conforme discutido nos capítulos anteriores, os espectros das amostras diferem principalmente pela madeira utilizada, mas também pelos diferentes períodos de armazenamento ou envelhecimento, devido ao aumento da concentração de fluoróforos extraídos dos barris de madeira e à presença de componentes altamente fluorescentes, e à supressão resultante de reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia e formação de complexos no estado fundamental.

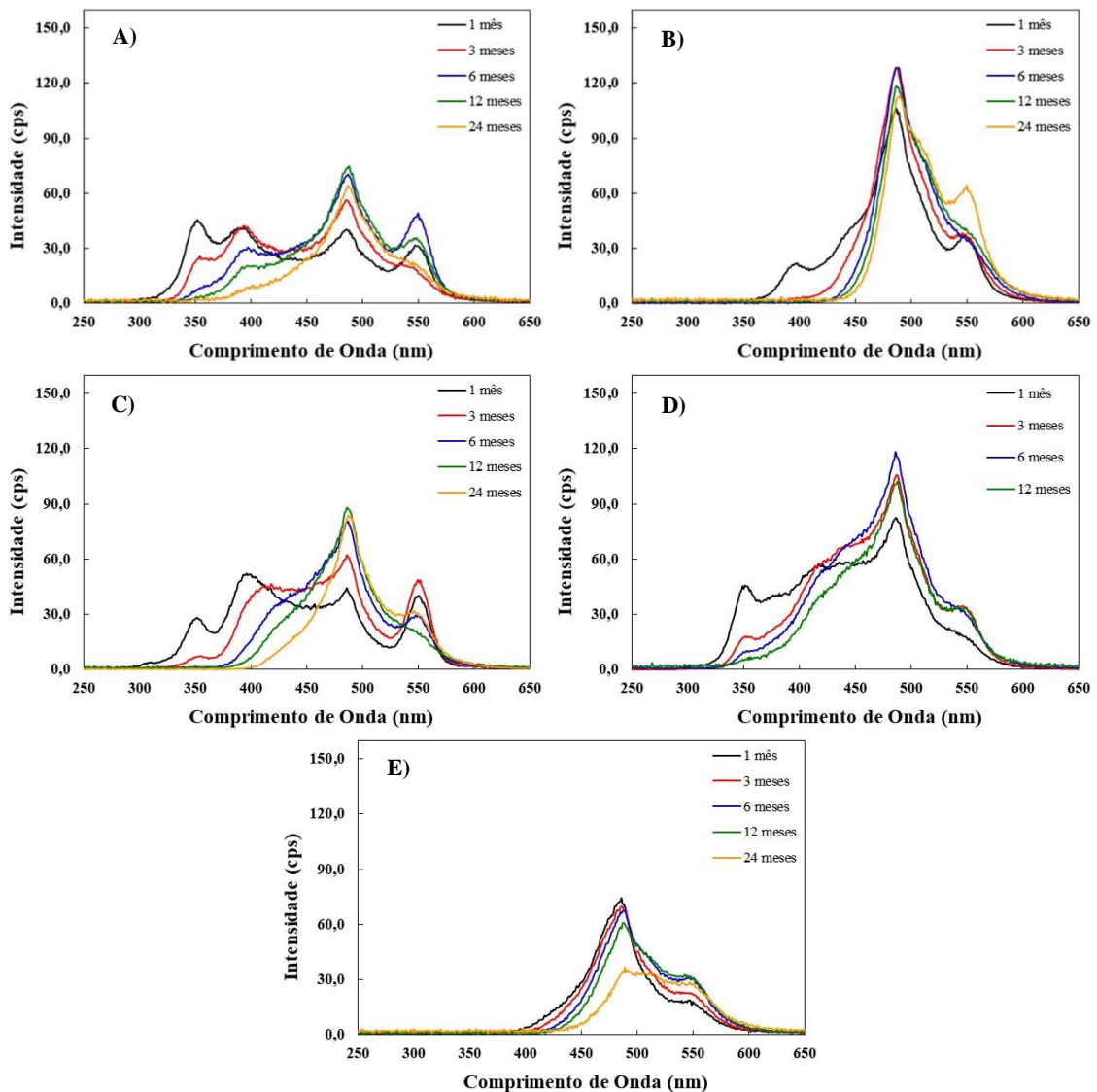


Figura 30 - Espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm de cachaça armazenada em barris de amendoim (A), bálsamo (B), carvalho (C), jequitibá (D) e umburana (E) por períodos de 1, 3, 6, 12 e 24 meses

Os erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para os modelos PLS-DA construídos usando os parâmetros de alisamento de Savitzky-Golay mais adequados (tamanho da janela e grau do polinômio) para cada  $\Delta\lambda$ , são mostrados na Figura 31. O modelo construído usando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm apresentou a menor combinação de erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste. Embora o modelo construído usando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 30$  nm tenha apresentado erro de classificação no conjunto de treinamento levemente menor que o obtido para o modelo  $\Delta\lambda = 20$  nm, os erros nos conjuntos de teste e de validação cruzada foram superiores. Por isso, os espectros síncronos registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm forneceram o melhor modelo PLS-DA para a finalidade deste trabalho.



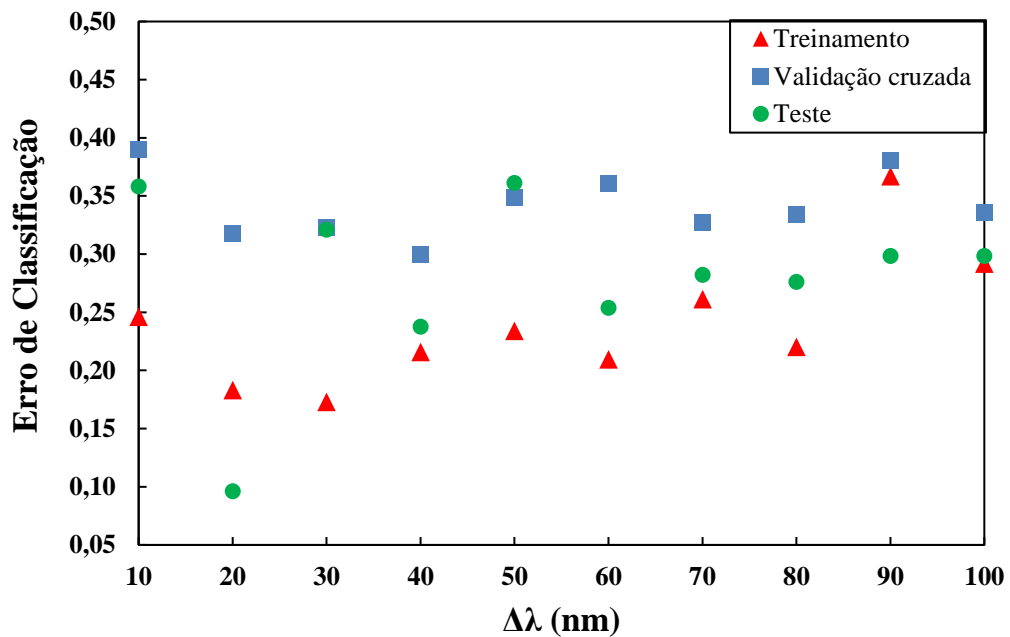


Figura 31 - Erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para os modelos PLS-DA construídos usando os espectros de fluorescência síncrona registrados nos diferentes  $\Delta\lambda$

A superfície de resposta e o diagrama de contorno obtidos usando os erros de classificação nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para o planejamento usando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm são mostrados na Figura 32. Como pode ser observado, as melhores combinações de tamanho de janela e grau do polinômio envolveram uma ampla região, entre elas o tamanho de janela de 15 pontos e o polinômio de grau 4, que foi selecionado neste estudo.

O melhor modelo PLS-DA usando os espectros registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm foi construído com sete *VL*, que responderam por 80 e 42% das variâncias em *X* e em *Y*, respectivamente. Este modelo foi obtido após a remoção de 21 amostras anômalas segundo o critério descrito anteriormente, e o *threshold* calculado foi de 0,38 (Figura 33). Este modelo apresentou bons parâmetros de desempenho, com *SEN* e *SPE* acima de 80 e 70%, respectivamente e *EFF* acima de 75% (Tabela 14).

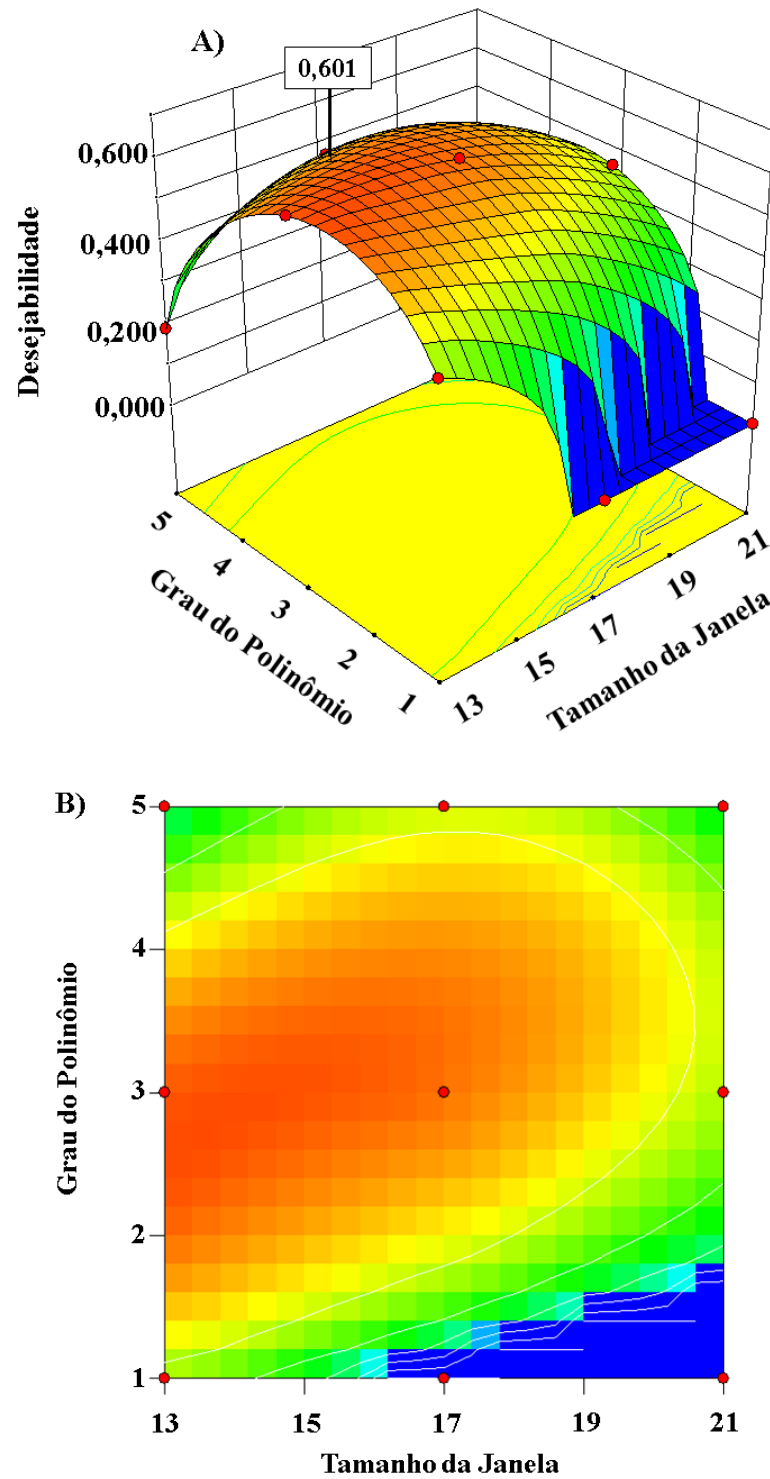


Figura 32 - Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) para erros de classificação mínimos nos conjuntos de treinamento, validação cruzada e teste para espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm

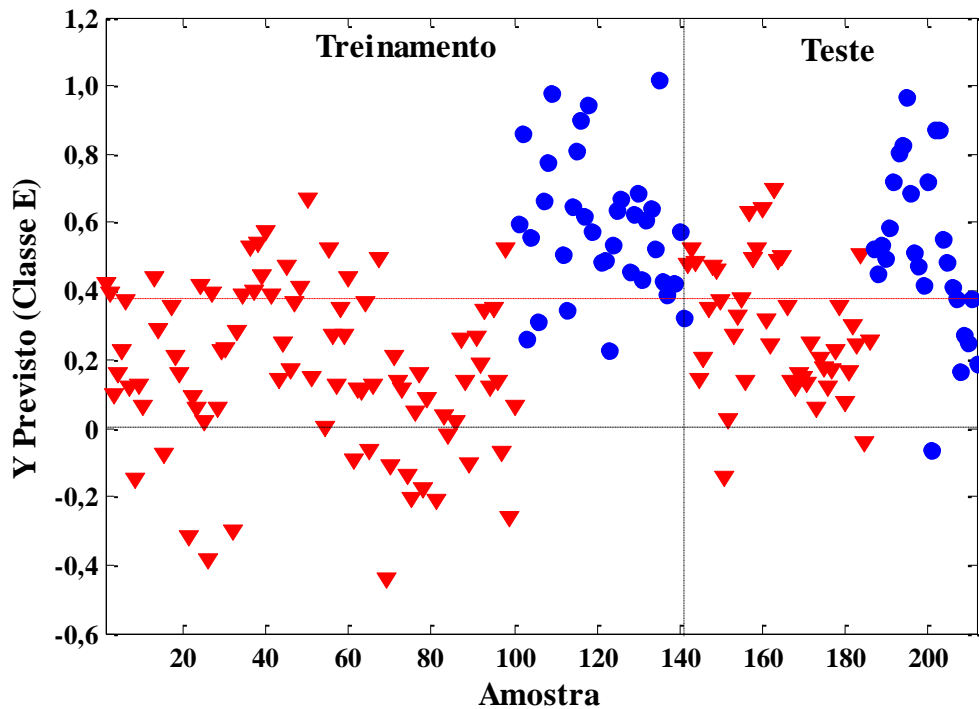


Figura 33 - Previsões de  $Y$  para modelo PLS-DA construído usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm para cachaças armazenadas e envelhecidas em amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana por período de envelhecimento: armazenadas e envelhecidas.

A linha tracejada vertical separa os conjuntos de treinamento e teste, e a linha tracejada horizontal vermelha indica o *threshold*. Símbolos: triângulos invertidos vermelhos para cachaças armazenadas e círculos azuis para cachaças envelhecidas

Tabela 14 - Parâmetros de desempenho estimados para o modelo PLS-DA construído com espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm para a discriminação de cachaças em armazenadas ( $A$ ) e envelhecidas ( $E$ )

Conjunto	Parâmetros de Qualidade (%)	
Treinamento	<i>SEN</i>	86
	<i>SPE</i>	77
	<i>EFF</i>	80
Teste	<i>SEN</i>	81
	<i>SPE</i>	71
	<i>EFF</i>	75

*SEN* sensibilidade, *SPE* especificidade, *EFF* eficiência

Os comprimentos de onda mais importantes para a classificação entre amostras de cachaça armazenadas e envelhecidas nas cinco madeiras analisadas são apresentados nos gráficos *VIP* scores (Figura 34) e de vetores de regressão (Figura 35). Conforme mostrado nessas figuras, os comprimentos de onda principais são 354, 481, 484, 495 e 516 nm.

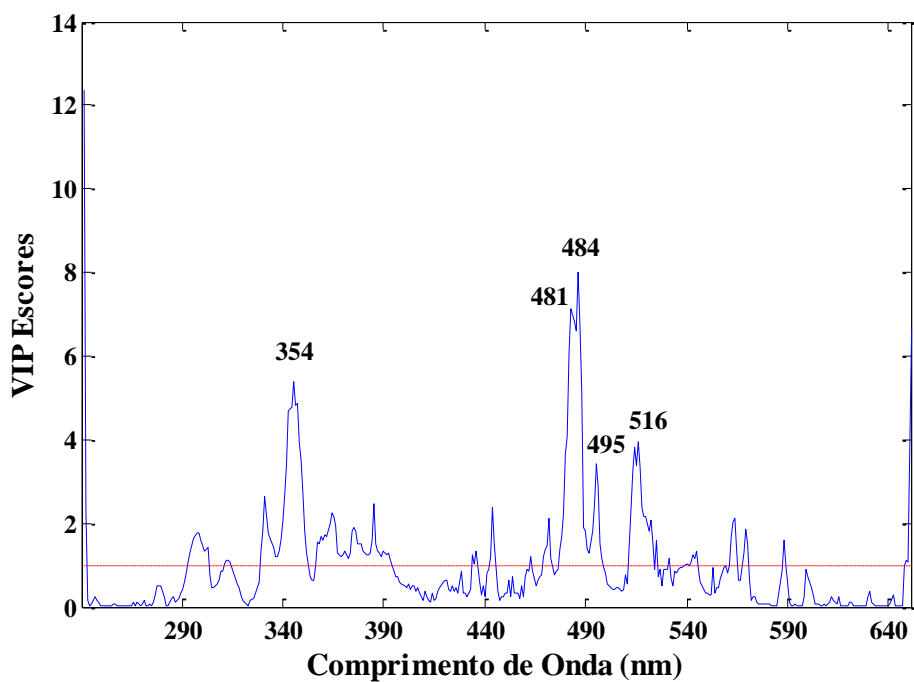


Figura 34 - VIP escores do modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm para classificação de cachaças em armazenadas e envelhecidas

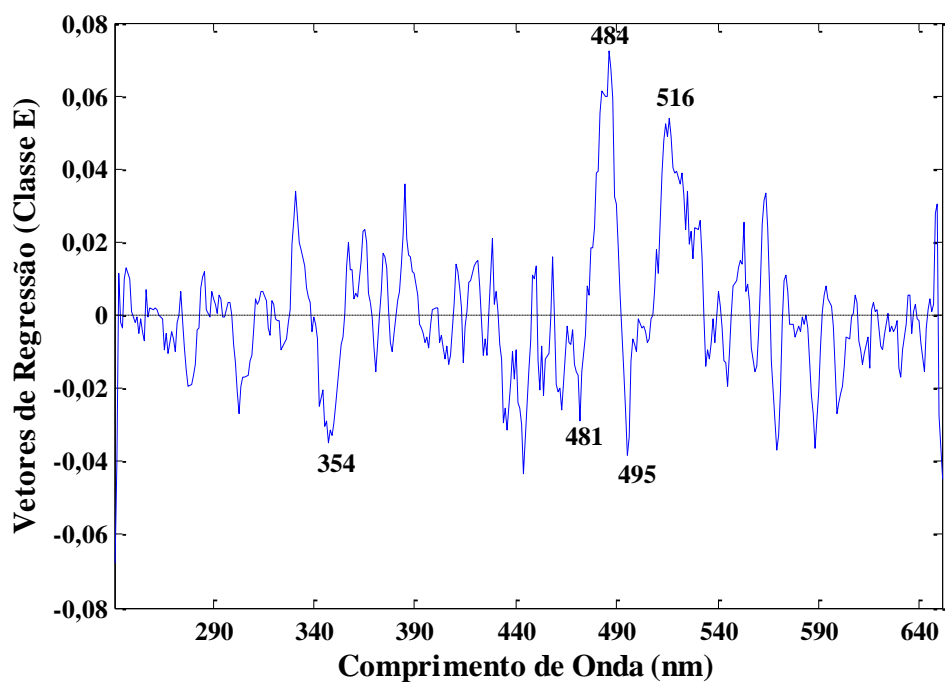


Figura 35 - Vetores de regressão do modelo PLS-DA usando espectros de fluorescência síncrona registrados em  $\Delta\lambda = 20$  nm para classificação de cachaças em armazenadas e envelhecidas

Na literatura não são citados outros estudos envolvendo a separação de amostras de cachaças em armazenadas e envelhecidas em barris de madeira. No entanto, alguns estudos envolvem a separação ou discriminação dessas bebidas segundo a classificação também de acordo com a legislação brasileira, em “envelhecidas”, “premium” e “extra premium” (Tabela 15).

Tabela 15 - Desempenho de modelos de discriminação de cachaça por período de envelhecimento

<b>Método de Classificação</b>	<b>Amostras</b>	<b>Desempenho – Acurácia (%)</b>	<b>Referência</b>
ANN	144	97	[93]
LDA, QDA, k-NN, MLP, SVM	105	85,71	[91]

ANN artificial neural network, k-NN k-nearest neighbor analysis, LDA linear discriminant analysis, MLP multi-layer perceptron, QDA quadratic discriminant analysis, SVM support vector machines

Os parâmetros de desempenho dos modelos citados acima são melhores que os obtidos no modelo desenvolvido no presente estudo (*EFF* de 80 e 75% nos conjuntos de treinamento e de teste, respectivamente). Entretanto, os estudos citados envolvem a análise apenas de bebidas envelhecidas em laboratório, o que reduz a variabilidade dos dados e afasta a aplicação dos modelos para amostras comerciais, que são submetidas aos processos de armazenamento e envelhecimento em condições muito variadas. É importante ressaltar que das 212 amostras utilizadas no presente estudo, 143 são amostras comerciais, adquiridas em comércio local e em lojas virtuais, portanto, sem garantia do tempo em que foram envelhecidas. Além disso, o tempo de armazenamento e envelhecimento das amostras analisadas é muito variado, de 6 meses a 12 anos. Amostras com diferentes períodos de armazenamento e envelhecimento foram utilizadas com o objetivo de aumentar a variabilidade do conjunto de dados, melhorando a aplicabilidade e robustez do modelo.

Neste estudo, a SFS foi usada com sucesso para diferenciar amostras comerciais de cachaça armazenadas e envelhecidas em cinco diferentes madeiras (amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana) de acordo com o tempo de envelhecimento. Devido à simplicidade, rapidez e baixo custo da análise, que não requer nenhuma etapa de preparação da amostra nem reagentes analíticos, essa técnica oferece uma abordagem rápida para uso em análises de rotina como método de triagem, contribuindo para a inspeção das cachaças armazenadas e envelhecidas em recipientes de madeira.

## 8. Conclusões gerais e perspectivas

As aplicações presentes nesta tese tiveram como principal objetivo contribuir com os estudos sobre a cachaça, bebida destilada muito importante economicamente e culturalmente no Brasil. As três aplicações envolveram o uso da espectroscopia de fluorescência síncrona em conjunto com métodos quimiométricos, que possibilitaram a análise dos dados multivariados obtidos nesta tese.

Modelos simples e rápidos que podem facilitar a fiscalização de diferentes madeiras utilizadas no envelhecimento da cachaça; do tempo de envelhecimento da cachaça em diferentes madeiras e a classificação entre cachaça e rum, bebidas produzidas pela mesma matéria-prima – cana-de-açúcar, foram satisfatoriamente desenvolvidos.

Como perspectivas, devem ser realizados estudos para identificação e quantificação dos compostos fluorescentes mais importantes e responsáveis pelas classificações, buscando os marcadores químicos para cada aplicação abordada. Além disso, devem ser realizados estudos com envelhecimento de cachaça com tempos mais longos, em parceria com produtores, para a obtenção de um perfil mais abrangente do processo, o que facilitaria a comparação do envelhecimento da cachaça e de outras bebidas fermento-destiladas. Outra perspectiva é desenvolver modelos de regressão para estimar o tempo de envelhecimento das cachaças usando os espectros de fluorescência síncrona.

Finalmente, o uso de métodos quimiométricos na análise de espectros obtidos usando a técnica espectrofluorimétrica pode ser avaliado para a identificação e quantificação de congêneres, aditivos e contaminantes presentes nas cachaças e em outras bebidas destiladas. É importante a utilização de técnicas analíticas sensíveis, uma vez que as concentrações destes compostos nas bebidas são muito baixas.

## 9. Referências

- [1] Brasil. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura>. Acesso em: 20 mar 2018.
- [2] Brasil. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura>. Acesso em: 20 mar 2018.
- [3] Cardoso, M.G. Produção de Aguardente de Cana. 4 ed. Editora UFLA: Lavras, 2020.
- [4] Anuário da Cachaça - A Cachaça no Brasil. Dados de registros de cachaças e aguardentes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal. Coordenação-Geral de Vinhos e Bebidas. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura>. Acesso em: 14 fev 2022.
- [5] Instituto Brasileiro da Cachaça. IBRAC. Disponível em: <http://www.ibrac.net>. Acesso em: 14 fev 2022.
- [6] Brasil. Lei nº 13.773, de 19 de dezembro de 2018. Confere ao Município de Salinas, no Estado de Minas Gerais, o título de Capital Nacional da Cachaça. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br>. Acesso em: 14 fev 2022.
- [7] Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. SEBRAE - Análise de Tendência: Saiba mais sobre tendência do mercado de cachaça. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/saiba-mais-sobre-tendencia-do-mercado-de-cachaca>. Acesso em: 14 fev 2022.
- [8] Euromonitor International. Size and Shape of the Global Illicit Alcohol Market. 2018. Disponível em: <https://go.euromonitor.com/white-paper-alcoholic-drinks-2018-size-and-shape-of-the-global-illicit-alcohol-market.html?refresh=1>. Acesso em: 14 fev 2022.
- [9] Álcool e a Saúde dos Brasileiros. CISA – Centro de Informações sobre Saúde e Álcool. Disponível em: <https://cisa.org.br/index.php/biblioteca/downloads/artigo/item/304-panorama2021>. Acesso em: 14 fev 2022.
- [10] Indústria de bebidas alcoólicas. Caderno Setorial ETENE. Fernando Luiz E. Viana, 2020. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/handle/123456789/332>. Acesso em: 14 fev 2022.
- [11] Kamiloglu, S. **Authenticity and traceability in beverages**. Food Chem, 227 (2019) 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.091>
- [12] Sikorska, E. **Fluorescence spectroscopy and chemometrics in analysis of beverages**. In *Quality Control in the Beverage Industry: The Science of Beverages*, edition no. 1; A.M. Grumezescu, A.M. Holban, Eds.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2019; 161–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816681-9.00005-9>

- [13] Sádecká, J.; Tóthová, J. **Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification – a review**. Czech J Food Sci, 25 (2007) 159–173. <https://doi.org/10.17221/687-CJFS>
- [14] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 1 ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2001.
- [15] Andrade-Eiroa, A.; de-Armas, G.; Estela, J.-M.; Cerda, V. **Critical approach to synchronous spectrofluorimetry. I**. Trends Analyt Chem, 29 (2010) 885-901. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.04.010>
- [16] Holler F.J.; Skoog, F.J.; Stanley, R.C. *Princípios de Análise Instrumental*, 6 ed. Bookman: Porto Alegre, 2009, p. 413-436.
- [17] Pale, W.-Y.; Djiedeu, N.; Lissouck, D.; Mbogning, W.F.; Issac, A.; Owono, L.C.; Kenfack, C.A. **Impact of temperature and sunlight exposition on locally brewed beers composition revealed by fluorescence spectroscopy coupled with chemometric methods**. J Food Sci, 86 (2021) 5175-5187. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15962>
- [18] Tan, J.; Li, M-F. **Rapid and nondestructive identification of Belgian and Netherlandish trappist beers by front -face synchronous fluorescence spectroscopy coupled with multiple statistical analysis**. Qual Assur Saf Crop Foods, 13 (2021) <https://doi.org/10.15586/qas.v13i1.839>
- [19] Facci, R.R.; Cezário, P.S.O.; Gois, J.S.; Luna, A.S.; Pacheco, W.F. **Identification of counterfeit vodka by synchronous fluorescence spectroscopy and chemometric analysis**. Anal Lett, (2020) <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1810694>
- [20] Sikorska, E.; Wlodarska, K.; Khmelinskii, I. **Application of multidimensional and conventional fluorescence techniques for classification of beverages originating from various berry fruit**. Methods Appl Fluoresc, 8 (2020) 015006. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab6367>
- [21] Sádecká, J.; Jakubíková, M. **Varietal classification of white wines by fluorescence spectroscopy**. J Food Sci Technol, 57(7) (2020) 2545-2553. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04291-y>
- [22] Zhu, Z.-W.; Chen, G.-Q.; Wu, Y.-M.; Xu, Y.; Zhu, T. **Discrimination of brands of strong aroma type liquors using synchronous fluorescence spectroscopy**. J Appl Spectrosc, 85 (2019) 1101-1106. <https://doi.org/10.1007/s10812-019-00765-w>
- [23] Sádecká, J.; Uricková, V.; Májek, P.; Jakubíková, M. **Comparison of different fluorescence techniques in brandy classification by region of production**. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 216 (2019) 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.018>
- [24] Sádecká, J.; Jakubíková, M.; Májek, P. **Fluorescence spectroscopy for discrimination of botrytized wines**. Food Control, (2018) <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.033>
- [25] Jakubíková, M.; Sádecká, J.; Kleinová, A. **On the use of the fluorescence, ultraviolet-visible and near infrared spectroscopy with chemometrics for the discrimination between plum brandies of different varietal origins**. Food Chem, 239 (2018) 889-897. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.008>



- [26] Wlodarska, K.; Khmelinskii, I.; Sikorska, E. **Authentication of apple juice categories based on multivariate analysis of the synchronous fluorescence spectra**. *Food Control*, 86 (2018) 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.004>
- [27] Gordon, R.; Cozzolino, D.; Chandra, S.; Powe, A.; Roberts, J.J.; Chapman, J. **Analysis of Australian beers using fluorescence spectroscopy**. *Beverages*, 57(3) (2017) <https://doi.org/10.3390/beverages3040057>
- [28] Sádecká, J.; Jakubíková, M.; Májek, P.; Kleinová, A. **Classification of plum spirit drinks by synchronous fluorescence spectroscopy**. *Food Chem*, 196 (2016) 783-790. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.001>
- [29] Tan, J.; Li, R.; Jiang, Z.-T.; Zhang, Y.; Hou, Y.-M.; Wang, Y.-R.; Wu, X.; Gong, L. **Geographical classification of Chinese Cabernet Sauvignon wines by data fusion of ultraviolet-visible and synchronous fluorescence spectroscopies: the combined use of multiple wavelength differences**. *Aust J Grape Wine Res*, 22 (2016) 358-365.
- [30] Tan, J.; Li, R.; Jiang, Z.-T. **Chemometric classification of Chinese lager beers according to manufacturer based on data fusion fluorescence, UV and visible spectroscopies**. *Food Chem*, 184 (2015) 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.085>
- [31] Tomková, M.; Sádecká, J.; Hrobonová, K. **Synchronous fluorescence spectroscopy for rapid classification of fruit spirits**. *Food Anal Methods*, 8 (2015) 1258–1267. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0010-9>
- [32] Sádecká, J.; Urícková, V.; Hrobonová, K.; Májek, P. **Classification of juniper-flavoured spirit drinks by multivariate analysis of spectroscopic and chromatographic data**. *Food Anal Methods*, 8 (2015) 58-69. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9869-8>
- [33] Urícková, V.; Sádecká, J.; Májek, P. **Classification of Slovak juniper-flavoured spirit drinks**. *J Food Nutr Res*, 54 (2015) 298-307.
- [34] Urícková, V.; Sádecká, J.; Májek, P. **Right-angle fluorescence spectroscopy for differentiation of distilled alcoholic beverages**. *Nova Biotechnol Chim*, 12 (2013) 83-92. <https://doi.org/10.2478/nbec-2013-0010>
- [35] Sádecká, J.; Tóthová, J.; Májek, P. **Classification of brandies and wine distillates using front face fluorescence spectroscopy**. *Food Chem*, 117 (2009) 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.053>
- [36] Tóthová, J.; Ziak, L.; Sádecká, J. **Characterization and classification of distilled drinks using total luminescence and synchronous fluorescence spectroscopy**. *Acta Chim Slo*, 1 (2009) 265-275.
- [37] Insinska-Rak, M.; Sikorska, E.; Czerwinska, I.; Kruzinska, A.; Nowacka, G.; Sikorski, M. **Fluorescence spectroscopy for analysis of beer**. *Pol J Food Nutr Sci*, 57(4) (2007) 239-243.
- [38] Sirorska, E.; Górecki, T.; Khmelinskii, I.V.; Sikorski, M.; Keukeleire, D. **Monitoring beer during storage by fluorescence spectroscopy**. *Food Chem*, 96 (2006) 632-639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.045>

- [39] Sirorska, E.; Górecki, T.; Khmelinskii, I.V.; Sikorski, M.; Keukeleire, D. **Fluorescence spectroscopy for characterization and differentiation of beers.** *J Inst Brew*, 110(4), 267-275, 2004. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00621.x>
- [40] Rodrigues, A.P.; Gois, J.S.; Costa, M.A.J.L.; Silva, C.S.; Xavier, V.L.; Luna, A.S. **Exploring multivariate linear regression methods for the prediction of total phenolic content in standard American lager beers using synchronous fluorescence spectroscopy fused data.** *Chemometr Intell Lab Syst*, 206 (2020) 104168. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104168>
- [41] Hrobonová, K.; Sádecká, J. **Coumarins content in wine: application of HPLC, fluorescence spectrometry, and chemometric approach.** *J Food Sci Technol*, <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04048-2>
- [42] Condé, B.; Robinson, A.; Bodet, A.; Monteau, A.-C.; Fuentes, S.; Scollary, G.; Smith, T.; Howell, K.S. **Using synchronous fluorescence to investigate chemical interactions influencing foam characteristics in sparkling wines.** *Beverages*, 5(3) (2019) <https://doi.org/10.3390/beverages5030054>
- [43] Wlodarska, K.; Pawlak-Lemanska, K.; Khmelinskii, I.; Sikorska, E. **Screening of antioxidant properties of the apple juice using the front-face synchronous fluorescence and chemometrics.** *Food Anal Methods*, 10 (2017) 1582-1591. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0711-3>
- [44] Wlodarska, K.; Pawlak-Lemanska, K.; Khmelinskii, I.; Sikorska, E. **Multivariate curve resolution – alternating least squares analysis of the total synchronous fluorescence spectra: An attempt to identify polyphenols contribution to the emission of apple juices.** *Chemometr Intell Lab Syst*, 164 (2017) 94-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.02.011>
- [45] Poláček, R.; Májeck, P.; Hrobonová, K.; Sádecká, J. **Fluorescence spectroscopy as a tool for determination of coumarins by multivariate calibration.** *J Fluoresc*, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1508-2>
- [46] Ziak, L.; Sádecká, J.; Májek, P.; Hrobonová, K. **Simultaneous determination of phenolic acids and scopoletin in brandies using synchronous fluorescence spectrometry coupled with partial least squares.** *Food Anal Methods*, 7 (2014) 563–570. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9656-y>
- [47] Ziak, L.; Májek, P.; Hrobonová, K.; Cacho, F.; Sádecká, J. **Simultaneous determination of caffeine, caramel and riboflavin in cola-type and energy drinks by synchronous fluorescence technique coupled with partial least squares.** *Food Chem*, 159 (2014) 282-286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.034>
- [48] Li, X.-Y.; Li, N.; Luo, H.-D.; Lin, L.-R.; Zou, Z.-X.; Jia, Y.-Z.; Li, Y.-Q. **A novel synchronous fluorescence spectroscopic approach for the rapid determination of three polycyclic aromatic hydrocarbons in tea with simple microwave-assisted pretreatment of sample.** *J Agric Food Chem*, 59 (2011) 5899-5905. <https://doi.org/10.1021/jf104873g>

- [49] Wang, Y.; Zhu, P.-H.; Tian, T.; Tang, J.; Wang, L.; Hu, X.-Y. **Synchronous fluorescence as a rapid method for the simultaneous determination of folic acid and riboflavin in nutritional beverages.** *J Agric Food Chem*, 59 (2011) 12629-12634. <https://dx.doi.org/10.1021/jf202536m>
- [50] Sikorska, E.; Gliszczynska-Swiglo, A.; Insinska-Rak, M.; Khmelinskii, I.; Keukeleire, D.; Sikorski, M. **Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids beer using fluorescence and multivariate calibration methods.** *Anal Chim Acta*, 613 (2008) 2007-217. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.063>
- [51] Sikorska, E. **Analysis of vitamin B2 using front-face intrinsic beer fluorescence.** *Eur Food Res Technol*, 225 (2007) 43-48. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0380-3>
- [52] Reynolds, D.M. **Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy.** *Water Res*, 37 (2003) 3055-3060. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00153-2)
- [53] Sádecká, J.; Tóthová, J. **Determination of caramel in non-aged mixed wine spirits by synchronous fluorescence spectroscopy.** *Eur Food Res Technol*, 230 (2010) 797-802 <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1221-y>
- [54] Barker, M.; Rayens, W. **Partial least squares for discrimination.** *J Chemom*, 17 (2003) 166-173. <https://doi.org/10.1002/cem.785>
- [55] Santana, F.B.; Souza, A.M.; Almeida, M.R.; Breikreitz, M.C.; Filgueiras, P.R.; Sena, M.M., Poppi, R.J. **Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: um tutorial, parte V.** *Quim Nova*, 43 (2020) 371-381. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170480>
- [56] Wise, B.M.; Gallagher, N.B.; Bro, R.; Shaver, J.M.; Windig, W.; Koch, R.S. **Chemometrics Tutorial for PLS\_Toolbox and Solo**, Eigenvector Reserch, Inc., Wenatchee, 2006.
- [57] Kennard, R.W.; Stone, L. **A Computer aided design of experiments.** *Technometrics*, 11 (1969) 137-148. <https://doi.org/10.2307/1266770>
- [58] Horwitz, W. **Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies.** *Pure Appl Chem*, 67 (1995) 331-343.
- [59] Souza, S.V.C.; Junqueira, R.G. **A procedure to assess linearity by ordinary least squares method.** *Anal Chim Acta*, 552 (2005) 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043>
- [60] Lopéz, M.I.; Callao, M.P.; Ruisánchez, I. **A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach.** *Anal Chim Acta*, 891 (2015) 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.032>
- [61] Breikreitz, M.C.; Souza, A.M.; Poppi, R.J. **Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III.** *Quim Nova*, 37(3) (2014) 564-573. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140092>

- [62] Montgomery, D.C. *Design and Analysis of Experiments*. 8 ed. John Wiley & Sons: Hoboken, 2012.
- [63] Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. *Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Editora Unicamp: Campinas, 2001.
- [64] Savitzky, A.; Golay, M.J.E. **Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures**. *Anal Chem*, 36 (1964) 1627-1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>
- [65] Venturini Filho, W.G. *Bebidas Alcoólicas. Ciência e Tecnologia; Bebidas vol. 1*. Blucher: São Paulo, 2009.
- [66] Medeiros, A.B.P.; Matos, M.E. de; Monteiro, A.P.; Carvalho, J.C. de; Soccol, C.R. **Cachaça and Rum**. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*, edition no. 1; A. Pandey, M.A. Sanromán, G. Du, C.R. Socool, C-G. Dussap, Eds.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2017; 451–468. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63666-9.00016-9>
- [67] Prati, P.; Camargo, G.A. **Características do caldo de cana e sua influência na estabilidade da bebida**. *Rev Bras Eng Biosistemas*, 2 (2008) 37-44. <http://dx.doi.org/10.18011/bioeng2008v2n1p37-44>
- [68] Walker, G.M.; Stewart, G.G. **Saccharomyces cerevisiae in the production of fermented beverages**. *Beverages*, 2 (2016) 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- [69] Valli, V.; Gómez-Caravaca, A.M.; Danesi, F.; Caboni, M.F.; Bordoni, A. **Sugar cane and sugar beet molasses, antioxidante-rich alternatives to refined sugar**. *J Agric Food Chem*, 60 (2012) 12508-12515. <https://doi.org/10.1021/jf304416d>
- [70] Oliveira, S.; Fernandes, D.D.S.; Vêras, G. **Overview of Analytical Techniques Associated with Pattern Recognition Methods in Sugarcane Spirits Samples**. *Crit Rev Anal Chem*, 49 (2019) 477-487. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1548926>
- [71] Cardoso, D.R.; Andrade-Sobrinho, L.G.; Leite-Neto, A.L.; Reche, R.V.; Isique, W.D.; Ferreira, M.M.C.; Lima-Neto, B.S.; Franco, D.W. **Comparison between Cachaça and Rum Using Pattern Recognition Methods**. *J Agric Food Chem*, 52 (2004) 3429–3433. <https://doi.org/10.1021/jf035262+>
- [72] Aquino, F.W.B.; Boso, L.M.; Cardoso, D.R.; Franco, D.W. **Amino acids profile of sugar cane spirit (cachaça), rum, and whisky**. *Food Chem*, 108 (2008) 784-793. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.021>
- [73] De Souza, M.D.C.A.; Vásquez, P.; Del Mastro, N.L.; Acree, T.E.; Lavin, E. H. **Characterization of Cachaça and Rum Aroma**. *J Agric Food Chem*, 54 (2006) 485–488. <https://doi.org/10.1021/jf0511190>
- [74] Nascimento, E.S.P.; Cardoso, D.R.; Franco, D.W. **Quantitative ester analysis in cachaça and distilled spirits by chromatography – mass spectrometry (GC-MS)**. *J Agric Food Chem*, 56 (2008) 5488-5493. <https://doi.org/10.1021/jf800551d>

- [75] Cardeal, Z.L.; Marriott, P.J. **Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian cachaça and selected spirits.** *Food Chem*, 112 (2009) 747-755. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.057>
- [76] De Souza, P.P.; Augusti, D.V.; Catharino, R.R.; Siebald, H.G.L.; Eberlin, M.N.; Augusti, R. **Differentiation of rum and Brazilian artisan cachaça via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting.** *J Mass Spectrom*, 42 (2007) 1294-1299. <https://10.1002/jms.1197>
- [77] Franitza, L.; Nicolotti, L.; Granvogl, M.; Schieberle, P. **Differentiation of Rums Produced from Sugar Cane Juice (Rhum Agricole) from Rums Manufactured from Sugar Cane Molasses by a Metabolomics Approach.** *Food Chem*, 66 (2018) 3038-3045. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00180>
- [78] Coelho, C.; Brottier, C.; Beuchet, F.; Elichiry-Ortiz, P.; Bach, B.; Lafarge, C.; Tourdot-Maréchal, R. **Effect of aging on lees and distillation process on fermented sugarcane molasses for the production of rum.** *Food Chem*, 303 (2020) 125405, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125405>
- [79] Carvalho, D.G.; Ranzan, L.; Trierweiler, L.F.; Trierweiler, J.O. **Determination of the concentration of total phenolic compounds in aged cachaça using two-dimensional fluorescence and mid-infrared spectroscopy.** *Food Chem*, 329 (2020) 127-142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127142>
- [80] Sádecka, J.; Urícková, V.; Jakubíková, M. **Fluorescence Spectroscopy for the Analysis of Spirit Drinks.** In *Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences*, edition no. 1; Stauffer, M., Ed.; IntechOpen: London, United Kingdom, 2016; p. 339-362. <https://doi.org/10.5772/64002>
- [81] De Aquino, F.W.B.; Rodrigues, S.; do Nascimento, R.F.; Casimiro, A.R.S. **Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits.** *Food Chem*, 98 (2006) 569-574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.034>
- [82] Mosedale JR, Puech J-L. **Wood maturation of distilled beverages.** *Trends Food Sci Technol*, 9 (1998) 95-101. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00024-7)
- [83] Singleton, V.L. **Maturation of wines and spirits: comparison, facts and hypotheses.** *Am J Enol Vitic*, 46 (1995) 98-115.
- [84] Bortoletto, A.M.; Correa, A.C.; Alcarde, A.R. **Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça.** *Food Res Int*, 86 (2016) 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.003>
- [85] Santiago, W.D.; Cardoso, M.G.; Santiago, J.A.; Gomes, M.S.; Rodrigues, L.M.A.; Brandão, R.M.; Cardoso, R.R.; d'Avila, G.B.; Silva, B.L.; Caetano, A.R.S. **Comparison and Quantification of the Development of Phenolic Compounds during the Aging of Cachaça in Oak (*Quercus* sp) and Amburana (*Amburana cearensis*) Barrels.** *Am J Plant Sci*, 5 (2014) 3140-3150. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.521330>

- [86] Silvello, G.C.; Bortoletto, A.M.; Castro, M.C.; Alcarde, A.R. **New approach for barrel-aged distillates classification based on maturation level and machine learning: a study of cachaça**. *LWT*, 140 (2021) 110836. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110836>
- [87] Bortoletto, A.M.; Silvello, G.C.; Alcarde, A.R. **Aromatic profiling of flavor active compounds in sugarcane spirits aged in tropical wooden barrels**. *Braz J Food Tech*, 24 (2021) e201971. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.07119>
- [88] Fernandes, D.D.S.; Almeida, V.E.; Fontes, M.M.; Araújo, M.C.U.; Véras, G. **Simultaneous identification of the wood types in aged cachaças and their adulterations with wood extracts using digital images and SPA-LDA**. *Food Chem*, 273 (2019) 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.035>
- [89] Santiago, W.D.; Cardoso, M.G.; Nelson, D.L. **Cachaça stored in casks newly constructed of oak (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaeae carbouril*), balsam (*Myroxylon peruiferum*) and peroba (*Paratecoma peroba*): alcohol content, phenol composition, colour intensity and dry extract**. *J Inst Brew*, 123 (2017) 232-241. <https://doi.org/10.1002/jib.414>
- [90] Bernardes, C.D., Barbeira, P.J.S. **Different Chemometric Methods for the Discrimination of Commercial Aged Cachaças**. *Food Anal Methods*, 9 (2016) 1053-1059. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0284-6>
- [91] Rodrigues, B.U.; Soares, A.S.; Costa, R.M.; Van Baalen, J.; Salvini, R.L.; Silva, F.A.; Caliari, M.; Cardoso, K.C.R.; Ribeiro, T.I.M.; Federson, F.M.; Coelho, C.J.; Laureano, G.T.; Lima, T.W. **A feasibility cachaça type recognition using computer vision and pattern recognition**. *Comput Electron Agr*, 123 (2016) 410-414. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2016.03.020>
- [92] Bortoletto, A.M.; Correa, A.C.; Alcarde, A.R. **Fatty acid profile and glycerol concentration in cachaças aged in different wood barrels**. *J Inst Brew*, 122 (2016) 293-298. <https://doi.org/10.1002/jib.313>
- [93] Rodrigues, B.U.; Costa, R.M.; Salvini, R.L.; Soares, A.S.; Silva, F.A.; Caliari, M.; Cardoso, K.C.R.; Ribeiro, T.I.M. **Cachaça Classification Using Chemical Features and Computer Vision**. *Procedia Comput Sci*, 29 (2014) 2024–2033. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2014.05.186>
- [94] Zacaroni, L.M.; Cardoso, M.G.; Santiago, W.D.; Mendonça, J.G.P.; Nunes, C.A.; Duarte, F.C. **Avaliação multivariada da composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira**. *Científica*, 42 (2014) 101-107. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2014v42n2p101-107>
- [95] Odello, L.; Braceschi, G.P.; Seixas, F.R.F.; Silva, A.A.; Galinaro, C.A.; Franco, D.W. **Avaliação sensorial de cachaça**. *Quim Nova*, 32 (2009) 1839-1844. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700029>
- [96] Souza, P.P.; Siebald, H.G.L.; Augusti, D.V.; Neto, W.B.; Amorim, V.M.; Catharino, R.R.; Eberlin, M.N.; Augusti, R. **Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Brazilian Artisan Cachaça Aged in Different Wood Casks**. *J Agric Food Chem*, 55 (2007) 2094-2102. <https://doi.org/10.1021/jf062920s>

- [97] Faria, J.B.; Cardello, H.M.A.B.; Boscolo, M.; Isique, W.D.; Odello, L.; Franco, D.W. **Evaluation of Brazilian woods as an alternative to oak for cachaças aging.** *Eur Food Res Technol*, 218 (2003), 83–87. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-003-0795-z>
- [98] Dias, S.; Maia, A.; Nelson, D. **Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida.** *Food Sci Technol*, 18 (3) (1998) <https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000300014>
- [99] Canas, S. **Phenolic Composition and Related Properties of Aged Wine Spirits: Influence of Barrel Characteristics. A Review.** *Beverages*, 3 (2017) 1-22. <https://doi.org/10.3390/beverages3040055>
- [100] Zacaroni, L.M.; Cardoso, M.G.; Saczk, A.A.; Moraes, A.R.; Dos Anjos, J.P.; Machado, A.M.R.; Nelson, D.L. **Determination of phenolic compounds and coumarins in sugar cane spirit aged in different species of wood.** *Anal Lett*, (2011). <https://doi.org/10.1080/00032719.2010.546017>
- [101] Ziak, L.; Májek, P.; Hrobonová, K.; Cacho, F.; Sádecká, J. **Simultaneous determination of caffeine, caramel and riboflavin in cola-type and energy drinks by synchronous fluorescence technique coupled with partial least squares.** *Food Chem*, 159 (2014) 282-286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.034>
- [102] Sádecká, J.; Urícková, V.; Hrobonová, K.; Májek, P. **Classification of juniper-flavoured spirit drinks by multivariate analysis of spectroscopic and chromatographic data.** *Food Anal Methods*, 8 (2015) 58-69. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9869-8>
- [103] Tóthová, J.; Sádecká, J.; Májek, P. **Total luminescence spectroscopy for differentiating between brandies and wine distillates.** *Czech J Food Sci*, 27 (2009) 425-432. <https://doi.org/10.17221/125/2008-CJFS>
- [104] Martí, M.P.; Pino, J.; Boqué, R.; Busto, O.; Guasch, J. **Determination of ageing time of spirits in oak barrels using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) electronic nose system and multivariate calibration.** *Anal Bioanal Chem*, 382 (2005) 440-443. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2969-3>
- [105] Garcia, J.S.; Vaz, B.G.; Corilo, Y.E.; Ramires, C.F.; Saraiva, S.A.; Sanvido, G.B.; Schmidt, E.M.; Maia, D.R.J.; Cosso, R.G.; Zacca, J.J.; Eberlin, M.N. **Whisky analysis by electrospray ionization-Fourier transform mass spectrometry.** *Food Res Int*, 51 (2013) 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.027>
- [106] Sujka, K.; Koczon, P. **The application of FT-IR spectroscopy in discrimination of differently originated and aged whisky.** *Eur Food Res Technol*, (2018). <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3113-5>
- [107] Roullier-Gall, C.; Signoret, J.; Coelho, C.; Hemmler, D.; Kajdan, M.; Lucio, M.; Scafer, B.; Gougeon, R.D.; Schmitt-Kopplin, P. **Influence of reffonality and maturation time on the chemical fingerprint of whisky.** *Food Chem*, 323 (2020) 126748. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126748>

- [108] Li, S.; Yang, H.; Tian, H.; Zou, J.; Li, J. **Correlation analysis of the age of brandy and volatiles in brandy by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-ion mobility spectrometry.** *Microchem J*, 157 (2020) 104948. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104948>
- [109] Chen, S.; Lu, J.; Qian, M.; He, H.; Li, A.; Zhang, J.; Shen, X.; Gao, J.; Xu, Y. **Untargeted headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry in combination with chemometrics for detecting the age of Chinese Liquor (Baijiu).** *Foods*, 10 (2021) 2888. <https://doi.org/10.3390/foods10112888>
- [110] Pérez-Caballero, G.; Andrade, J.M.; Olmos, P.; Molina, Y.; Jiménez, I.; Durán, J.J.; Fernandez-Lozano, C.; Miguel-Cruz, F. **Authentication of tequilas using pattern recognition and supervised classification.** *Trends Anal Chem*, 94 (2017) 117 – 129. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.008>
- [111] Cantarelli, M.A.; Azcarate, S.M.; Savio, M.; Marchevsky, E.J.; Caminã, J.M. **Authentication and discrimination of whiskies of high commercial value by pattern recognition.** *Food Anal Methods*, 8 (2015) 790-798. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9958-8>
- [112] Dos Anjos, J.P.; Cardoso, M.G.; Saczk, A.A.; Dórea, H.S.; Santiago, W.D.; Machado, A.M.R.; Zacaroni, L.M.; Nelson, D.L. **Evolution of the concentration of phenolic compounds in Cachaça during aging in an oak (Quercus sp.) barrel.** *J Braz Chem Soc*, 22(7) (2011) 1307-1314. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000700016>
- [113] Miranda, M.B.; Martins, N.G.S.; Belluco, A.E.S.; Horii, J.; Alcarde, A.R. **Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho.** *Food Sci Technol*, 28 (2008) 84-89. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500014>
- [114] Castro, M.C.; Bortoletto, A.M.; Silvello, G.C.; Alcarde, A.R. **Lignin-derived phenolic compounds in cachaça aged in new barrels made from two oak species.** *Heliyon*, 6 (2020) e05586. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05586>
- [115] Castro, M.C.; Bortoletto, A.M.; Silvello, G.C.; Alcarde, A.R. **Maturation related phenolic compounds in cachaça aged in new oak barrels.** *J Inst Brew*, 127 (2021) 70-77. <https://doi.org/10.1002/jib.629>
- [116] Alcarde, A.R.; Souza, L.M.; Bortololetto, A.M. **Formation of volatile and maturation-related congeners during the aging of sugarcane spirit in oak barrels.** *J Inst Brew*, 120 (2014) 529-536. <https://doi.org/10.1002/jib.165>
- [117] Garcia, A.C.; Serafim, F.A.T.; De Keukeleire, D.; Franco, D.W. **Evaluation of glycerol profiles in sugarcane spirits (Cachaças).** *J Braz Chem Soc*, 26(1) (2015) 57-63. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140213>
- [118] Bortoletto, A.M.; Alcarde, A.R. **Aging marker profile in cachaça is influenced by toasted oak chips.** *J Inst Brew*, 121 (2015) 70-77. <https://doi.org/10.1002/jib.202>
- [119] Andrade-Sobrinho, L.G.; Boscolo, M.; Lima-Neto, B.S.; Franco, D.W. **Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa).** *Quim Nova*, 25 (6) (2002) 1074-1077. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000700005>



- [120] Santiago, W.D.; Cardoso, M.G.; Duarte, F.C.; Saczk, A.A.; Nelson, D.L. **Ethyl carbamate in the production and aging of cachaça in oak (*Quercus* sp.) and amburana (*Amburana cearensis*) barrels.** J Inst Brew, 120 (2014) 507-511. <https://doi.org/10.1002/jib.158>
- [121] Dos Anjos, J.P.; Cardoso, M.G.; Saczk, A.A.; Zacaroni, L.M.; Santiago, W.D.; Machado, A.M.R. **Identificação do carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro.** Quim Nova, 34(5) (2011) 874-878. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000500025>
- [122] Chavéz, I.P.A. Dos teores de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em aguardentes acondicionadas em tonéis de Carvalho. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.
- [123] Oliveira, M.C. Avaliação da qualidade físico-química e sensorial da cachaça orgânica envelhecida. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista (2016)
- [124] Alcarde, A.R.; Souza, P.A.; Belluco, A.E.S. **Aspectos da composição química e aceitação sensorial da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de diferentes madeiras.** Food Sci Technol, 30 (2010) 226-232. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500035>
- [125] Catão, C.G.; Paes, J.B.; Gomes, J. P.; Araújo, G.T. **Qualidade da madeira de cinco espécies florestais para o envelhecimento da cachaça.** Rev Bras de Eng Agrícola e Ambient, 17(7) (2011) 741-747. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662011000700013>