

UFMG-ICE_x/DQ.1.075^a
T.486^a

CRISTINA DONIZETI BERNARDES

**Métodos Analíticos para Cachaças Utilizando Técnicas
Espectrométricas, Cromatográficas e Quimiométricas**

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

Belo Horizonte
2015

B35m
2015
T BERNARDES, Cristina Donizeti.
Métodos analíticos para cachaças utilizando
técnicas espectrométricas, cromatográficas e
quimiométricas [manuscrito] /Cristina Donizeti
Bernardes. 2015.
144 f.: il.

Orientador: Paulo Jorge Sanches Barbeira.

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

1. Cachaça - Teses 2. Química analítica - Teses
3. Compostos fenólicos - Teses 4. Furaldeído - teses 5.
Quimiometria - Teses I. Barbeira, Paulo Jorge
Orientador II. Título.

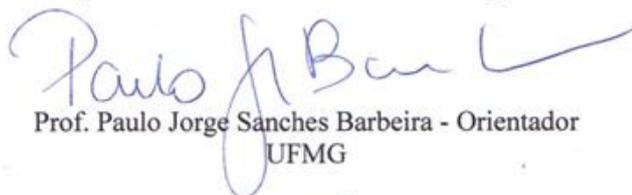
CDU 043



"Métodos Analíticos para Cachaças Utilizando Técnicas Espectrométricas,
Cromatográficas e Quimiométricas"

Cristina Donizeti Bernardes

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Paulo Jorge Sanches Barbeira - Orientador
UFMG


Prof. Marco Flôres Ferrão
UFRGS


Prof. Reinaldo Francisco Teófilo
UFV


Profª. Zenilda de Lourdes Cardeal
UFMG


Profª. Leticia Malta Costa
UFMG

Belo Horizonte, 05 de março de 2015.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Jorge Sanches Barbeira, pelo profissionalismo, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança durante todos estes anos.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por fornecer toda a estrutura física, tecnológica e humana necessárias para a realização deste trabalho.

À todos os professores do Departamento de Química, em especial aos professores do setor de Química Analítica, por todo o conhecimento transmitido.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelas bolsas concedidas.

À todos os funcionários do LEC que não pouparam esforços para me auxiliar em todas as análises que foram realizadas lá. Em especial, gostaria de agradecer à Mirra e à Nilva por todo o auxílio nas análises cromatográficas.

Ao Leandro, ex-técnico do Laboratório de Espectroscopia no Ultravioleta-Visível do Departamento de Química, pelo auxílio durante as medidas espectrofluorimétricas.

Às secretárias Paulete, Kátia, Lílian, Marane, Alessandra e Fernanda pela atenção e auxílio com a parte burocrática.

À Júnia e ao Bruno, por todas as discussões quimiométricas e, principalmente, pela amizade.

À minha amiga Mariana, pelas discussões quimiométricas, pelo auxílio com a análise dos dados com imagens e MCR e claro, pela amizade.

À todo o grupo de pesquisa do prof. Marcelo Sena, pelo acolhimento em suas reuniões durante estes anos e pela troca de conhecimentos em quimiometria.

Às minhas queridas amigas, mais que especiais, do LIMA, Ariane, Jaqueline e Rosilene. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo convívio. Só consegui porque vocês estavam lá comigo!

À professora e amiga, Luiza de Marilac, por ter me ensinado tanto quando da disciplina de Treinamento à Docência e pela amizade. Os cafés no LIMA não seriam os mesmos sem a sua presença.

Ao professor Valmir, pela convivência sempre agradável e por todo o auxílio durante estes anos.

À todos os colegas que compartilharam o LIMA durante este tempo: Gisele, Pedro, Conny, Danniell, Helga e Bethânia. Obrigada pela boa convivência!

Aos alunos de iniciação científica que me auxiliaram por um tempo, como voluntários, Jéssica e Lucas. Obrigada pela ajuda.

À Meliza e ao Vitor que, mais que alunos de iniciação científica, se tornaram amigos. Meu muito obrigada pela ajuda e, principalmente, pela amizade.

Aos meus ex-alunos do Colégio Scala (Caconde-SP), da Escola Estadual Bruno Pieroni (Sertãozinho-SP), do Colégio Estadual Rui Brasil (Goiânia-GO), do Colégio Estadual José Honorato (Goiânia-GO), do Colégio Estadual Juscelino Kubstichek (Goiânia-GO) e aos ex e atuais alunos da FUNCESI (Itabira-MG) pela oportunidade de aprendizado, pelo carinho, pela ótima convivência e por sempre torcerem por mim.

Ao Prof. Miguel Luiz da Silveira por ter me incentivado a cursar Licenciatura em Química e por todos os conhecimentos transmitidos.

Às minhas queridas amigas que, apesar da distância, torceram por mim, me apoiaram e me incentivaram durante este doutorado, em especial à Ana Dalva, Maria Silvia, Mona Line e Maria do Rosário.

Aos meus pais, José e Maria (*in memoriam*): obrigada pelo amor que me dedicaram, pela educação e pelos princípios que me transmitiram.

Ao meu esposo, Marcelo, por me incentivar, me ajudar e, principalmente, por sempre caminhar comigo durante todos estes anos. *"O amor só é lindo quando encontramos alguém que nos transforme no melhor que podemos ser"*. (Mário Quintana)

Aos meus irmãos e irmãs: Inácia, Lázaro, José Francisco (*in memoriam*), Lia, Donizetti, Valdecir, Claudete (*in memoriam*) e Ivonete. Às minhas sobrinhas e sobrinhos: Edna, Sandra, Reginaldo, Cíntia, Ricardo, Eliza, Denis, Jaqueline, Tiago, Rosana (*in memoriam*), Glécia e Luciana. Aos meu sobrinhos de segundo grau: Maria Luiza, João Francisco, Gabriela, Miguel e Pedro Lucas. À minha cunhada e madrinha Neuza. Ao meu padrinho Daniel. A todos os meus tios, tias, primos e primas. Obrigada a todos pela torcida. *"Apenas em torno de uma mulher que ama se pode formar uma família"*. (Friedrich Von Schelegel)

Aos funcionários, colegas e amigos do Departamento de Química e a todas as pessoas que, de uma forma ou outra, contribuíram para realização deste trabalho, meu muito obrigada.

Resumo

Título: Métodos Analíticos para Cachaças utilizando Técnicas Espectrométricas, Cromatográficas e Quimiométricas

Autora: Cristina Donizeti Bernardes

Orientador: Prof. Dr. Paulo Jorge Sanches Barbeira

O objetivo desta tese é a aplicação de métodos quimiométricos, técnicas espectrométricas e cromatografia líquida para a análise de cachaças, contribuindo para estudos que visam a melhoria do controle da qualidade da bebida símbolo do Brasil. Na primeira aplicação foram desenvolvidos diversos modelos quimiométricos para a discriminação de amostras de cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeira, utilizando espectros UV-Vis, espectros de emissão de fluorescência e superfícies de fluorescência. O melhor modelo PLS-DA foi obtido a partir da fusão dos dados das duas técnicas analíticas conseguindo-se discriminar com boas taxas de confiabilidade, quatro das cinco classes de cachaças envelhecidas. Na segunda aplicação, foi proposto um método direto para a determinação do teor de compostos fenólicos totais em cachaças usando espectros UV-Vis de amostras comerciais envelhecidas e PLS. Foram obtidos resultados satisfatórios na faixa de concentração de 0,73 a 82,34 mg EAG L⁻¹ (mg equivalentes de ácido gálico por litro), fornecendo RMSEP de 4,11 mg EAG L⁻¹. Na terceira aplicação, cachaças foram envelhecidas durante um ano em barris de amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana. Durante o envelhecimento, foram analisados compostos fenólicos, acidez total, teor alcoólico e perda por evaporação. Através de PCA verificou-se que este período é suficiente para diferenciar apenas uma das cinco madeiras estudadas: a umburana. Tal madeira pode ser caracterizada devido aos maiores teores de cumarina, ácido vanílico, sinapaldeído e acidez total. Na última aplicação, foi proposto um método para a quantificação do contaminante furfural em cachaças. Foram propostas modificações no método oficial, de Hewitt, que tem baixa sensibilidade, de forma que a faixa de trabalho contemplasse a maioria das amostras, as quais contêm este contaminante em baixas concentrações: entre 0,015 e 0,574 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro. Assim, desenvolveu-se um método que não diferiu estatisticamente do método cromatográfico, utilizado como referência para a determinação deste analito.

Palavras-chave: cachaça, marcadores do envelhecimento, compostos fenólicos, furfural, quimiometria.

Abstract

Title: Analytical Methods for Cachaças using Spectrometric, Chromatographic and Chemometric Techniques

Author: Cristina Donizeti Bernardes

Adviser: Prof. Dr. Paulo Jorge Sanches Barbeira

The goal of this thesis is the application of chemometric methods, spectrometric techniques and liquid chromatography for analyzing cachaças, thus contributing to studies aiming at improving the quality control of the distillate symbol of Brazil. The first application developed several chemometric models for discriminating cachaça samples aged in different types of woods using UV-Vis spectra, fluorescence emission spectra and excitation-emission matrices. The best PLS-DA model was obtained with the fusion of the data from the two analytical techniques, which discriminated with good reliability rates for four out of the five classes of aged cachaças analyzed. In the second application, it was proposed a method for direct determination of total content of phenolic compounds in cachaças using UV-Vis spectra of commercial aged samples and PLS. Satisfactory results were obtained in the concentration range from 0.73 to 82.34 mg GAE L⁻¹ (mg of gallic acid equivalents per liter) providing a RMSEP of 4.11 mg GAE L⁻¹. In the third application, cachaças were aged for a year in amendoim, balsam, oak, jequitibá and umburana barrels. During aging phenolic compounds, total acidity, alcohol and evaporation loss were analyzed. Using PCA, it was found that this period was sufficient to distinguish only one of the five studied woods: umburana. This wood can be characterized due to higher levels of coumarin, vanillic acid, sinapaldehyde and total acidity. The last application proposed a method for the quantification of the contaminant furfural in cachaças. Modifications have been proposed for the official Hewitt method, which has low sensitivity. The working range was expanded in order to include all the analyzed samples, since some of them had low concentrations of this contaminant: between 0.015 and 0.574 mg 100 mL⁻¹ of anhydrous alcohol. Thus, it was developed a method that was not statistically different from chromatographic one, used as reference for the determination of this analyte.

Keywords: cachaça, aging markers, phenolic compounds, furfural, chemometrics.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Pesquisa realizada na base de dados "Web of Science" com os termos "cachaca or spirit cane sugar" no campo tópicos, realizada em 12/03/2015. 24
- Figura 2.** Espectros UV-Vis típicos para cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeiras: amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—) e umburana (—)..... 49
- Figura 3.** Coeficientes de regressão para o modelo PLS-DA UV-Vis para a classificação de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras: amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—) e umburana (—)..... 50
- Figura 4.** Espectros UV-Vis de soluções estoque 10,00 mg L⁻¹ de compostos marcadores do envelhecimento de bebidas em madeira: (A) sinapaldeído, (B) coniferaldeído, (C) siringaldeído, (D) vanilina, (E) ácido vanílico, (F) ácido gálico, (G) ácido siríngico, (H) ácido elágico, (I) cumarina. 51
- Figura 5.** Mapas de contorno das superfícies de fluorescência típicas para cachaças envelhecidas em diferentes madeiras: (A) amendoim, (B) bálsamo, (C) carvalho, (D) jequitibá e (E) umburana. 55
- Figura 6.** Mapas de contorno das superfícies de fluorescência dos marcadores químicos de envelhecimento de bebidas em madeira: (A) sinapaldeído, (B) coniferaldeído, (C) siringaldeído, (D) vanilina, (E) ácido vanílico, (F) ácido gálico, (G) ácido siríngico, (H) ácido elágico e (I) cumarina. 56
- Figura 7.** Coeficientes de regressão para o modelo NPLS-DA para a classificação de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras: (A) amendoim, (B) bálsamo, (C) carvalho, (D) jequitibá e (E) umburana..... 58
- Figura 8.** Fluxograma de fusão de dados de baixo nível. 59
- Figura 9.** Matriz obtida da concatenação dos espectros UV-Vis com os espectros de emissão de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação de 250, 260, 330, 340 e 380 nm. Perfis espectrais típicos para cachaças envelhecidas em: amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—) e umburana (—)..... 60
- Figura 10.** Coeficientes de regressão do modelo PLS-DA com a fusão de UV-Vis + λ_{exc} (250 + 260 + 330 + 340 + 380 nm): amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—) e umburana (—). 62
- Figura 11.** Teor de fenólicos totais determinados para as cachaças envelhecidas analisadas: amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—), umburana (—) e blend (—)..... 68

Figura 12. Coeficientes de regressão para o modelo PLS para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas.	70
Figura 13. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas, respectivamente: amostras de calibração (○) e amostras de validação (▼).	73
Figura 14. Estrutura parcial da lignina.	78
Figura 15. Extração e evolução da lignina.	79
Figura 16. Barris de amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana que foram utilizados para o envelhecimento da cachaça analisada.	83
Figura 17. Variação da massa dos barris devido à perda por evaporação durante o envelhecimento da cachaça: amendoim (◆), bálsamo (■), carvalho (▲), jequitibá (●) e umburana (●).	84
Figura 18. Variação do teor alcoólico das cachaças durante o envelhecimento: amendoim (◆), bálsamo (■), carvalho (▲), jequitibá (●) e umburana (●).	85
Figura 19. Variação da acidez total das cachaças durante o envelhecimento: amendoim (◆), bálsamo (■), carvalho (▲), jequitibá (●) e umburana (●).	86
Figura 20. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de AMENDOIM nos tempos de 1mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido siríngico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído.	88
Figura 21. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de BÁLSAMO nos tempos de 1mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido siríngico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído.	89
Figura 22. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de CARVALHO nos tempos de 1mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido siríngico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído.	90
Figura 23. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de JEQUITIBÁ nos tempos de 1mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido siríngico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído.	91
Figura 24. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de UMBURANA nos tempos de 1mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido siríngico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído, 8) cumarina.	92
Figura 25. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de AMENDOIM: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).	93

Figura 26. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de AMENDOIM: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).	94
Figura 27. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de BÁLSAMO: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).	95
Figura 28. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de BÁLSAMO: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).	95
Figura 29. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de CARVALHO: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).	96
Figura 30. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de CARVALHO: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).	96
Figura 31. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de JEQUITIBÁ: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).	97
Figura 32. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de JEQUITIBÁ: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).	97
Figura 33. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de UMBURANA, destacando a predominância da cumarina: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●), vanilina (●) e cumarina (●).	98
Figura 34. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de UMBURANA: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).	99
Figura 35. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de UMBURANA, destacando a predominância do ácido vanílico: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).	99
Figura 36. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de UMBURANA: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).	100
Figura 37. Gráfico biplot de CP1 versus CP2 para as amostras de cachaças envelhecidas durante um ano em barris de amendoim (▼), bálsamo (*), carvalho (■), jequitibá (★) e umburana (◆).	101
Figura 38. Gráfico biplot de CP1 versus CP3 para as amostras de cachaças envelhecidas durante um ano em barris de amendoim (▼), bálsamo (*), carvalho (■), jequitibá (★) e umburana (◆).	102
Figura 39. Estruturas do furfural (A) e 5-hidroximetilfurfural (B).	106
Figura 40. Representação da reação química entre anilina e furfural.	109

Figura 41. Estudo da estabilidade do composto formado no método de Hewitt modificado nas seguintes concentrações: 0,5 mg L ⁻¹ (◆); 1,0 mg L ⁻¹ (■); 3,0 mg L ⁻¹ (▲)..	111
Figura 42. Estudo da estabilidade do composto formado no método de Hewitt modificado nas seguintes concentrações: 0,5 mg L ⁻¹ (◆); 1,0 mg L ⁻¹ (■); 3,0 mg L ⁻¹ (▲), após a adição de tampão e sais de estanho ao meio reacional.	111
Figura 43. Espectro de emissão de fluorescência típico para uma amostra quantificada pelo método de Hewitt modificado ($\lambda_{\text{excitação}} = 500 \text{ nm}$).	113
Figura 44. Teores de furfural determinados cromatograficamente para cachaças comerciais: amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—), umburana (—), não envelhecida (—), plástico (—) e composta (—).....	114
Figura 45. Cromatogramas das cachaças analisadas para a quantificação de furfural. Amendoim 2 (—), bálsamo 15 (—), carvalho 6 (—), jequitibá 19 (—), umburana 20 (—), pura 11 (—), plástico 1(—). Picos: 1) 5-hidroximetilfurfural. 2) furfural.	115

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição química e requisitos de qualidade da aguardente de cana e da cachaça estabelecidas pela legislação brasileira.	26
Tabela 2. Taxas de sensibilidade (TSB) e seletividade (TST) para os vários modelos quimiométricos para a classificação de cachaças comerciais envelhecidas.	53
Tabela 3. Taxas de confiabilidade para os vários modelos obtidos para a classificação de cachaças comerciais envelhecidas em diferentes madeiras (os melhores resultados estão em itálico).	54
Tabela 4. Otimização do modelo PLS através da detecção de amostras anômalas (resultados finais em itálico)	71
Tabela 5. Figuras de mérito estimadas para o método PLS para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas	72
Tabela 6. Gradiente de eluição empregado para o método cromatográfico	82
Tabela 7. Parâmetros calculados para as curvas dos analitos quantificados em cachaças envelhecidas	87
Tabela 8. Parâmetros da curva para a quantificação de furfural em cachaças comerciais por cromatografia líquida.	113
Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos para os três diferentes métodos para quantificação de furfural em cachaças comerciais.	116

Lista de Abreviaturas

AMPAQ Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade

CP Componente principal

DPR Desvio padrão relativo

EAG Equivalentes de ácido gálico

EEM *Excitation-emission matrix* (matriz de excitação-emissão)

ESI-MS *Electrospray ionization mass spectrometry* (espectrometria de massas com ionização por *electrospray*)

FC Folin-Ciocalteu

FN *False negative* (resultado falso-negativo)

FP *False positive* (resultado falso-positivo)

HPLC *High performance/pressure liquid chromatograph* (cromatografia líquida de alta eficiência)

IBRAC Instituto Brasileiro da Cachaça

IDLH *Immediately Dangerous to Life OR Health Air Concentration*

INPI Instituto Nacional de Propriedade Industrial

LDA *Linear discriminant analysis* (análise linear discriminante)

LD Limite de detecção

LQ Limite de quantificação

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MQO Mínimos quadrados ordinários

NAS *Net Analyte Signal* (sinal analítico líquido)

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

OSC *Orthogonal Signal Correction* (correção do sinal ortogonal)

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)

PRÓ-CACHAÇA Programa Mineiro de Incentivo à Produção de Aguardente

RER Razão de intervalo de erro

RMSEC *Root mean square error of calibration* (erro quadrático médio de calibração)

RMSECV *Root mean square error of cross validation* (raiz quadrada do erro médio da validação cruzada)

RMSEP *Root mean square error of prediction* (raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão)

RPD Relação de desempenho do desvio

SEL Seletividade

SEN Sensibilidade

TCF Taxa de confiabilidade

TFN Taxa de falso-negativos

TFP Taxa de falso-positivos

TN *True negative* (resultado negativo verdadeiro)

TSB Taxa de sensibilidade

TST Taxa de seletividade

UV-Vis Espectrofotometria molecular na região ultravioleta-visível

VL Variável latente

Índice

Resumo	6
Abstract	7
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	12
Lista de Abreviaturas	13
1. Relevância do Trabalho	20
2. Revisão Bibliográfica	23
2.1. Cachaça.....	23
2.1.1. Composição química e requisitos de qualidade.....	25
2.2. Espectrofotometria no Ultravioleta Visível na análise de bebidas	27
2.3. Espectrofluorimetria na análise de bebidas	27
2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência na análise de bebidas	29
2.5. Técnicas Quimiométricas	29
2.5.1. PCA.....	30
2.5.2. PLS	31
2.5.2.1. Pré-processamentos	32
2.5.2.2. Validação Analítica de Métodos Multivariados	32
2.5.2.2.1. Detecção de amostras anômalas (<i>outliers</i>)	33
2.5.2.2.2. Figuras de Mérito.....	34
2.5.3. PLS-DA	39
2.5.4. NPLS-DA	40
2.5.5. Fusão de Dados	42
3. Objetivos	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos Específicos	44
4. Diferentes métodos quimiométricos para a discriminação de cachaças comerciais envelhecidas	46
4.1. Introdução	46
4.2. Materiais e Métodos	47
4.2.1. Instrumentação e processamento dos dados	47
4.2.2. Materiais e amostras	48

4.2.3. Procedimentos.....	48
4.3. Resultados e Discussão.....	48
4.3.1. Modelo PLS-DA com espectros UV-Vis	48
4.3.2. Modelo NPLS-DA com EEM.....	55
4.3.3. Modelo PLS-DA com Fusão de Dados	59
4.4. Conclusão	63
5. Desenvolvimento de um modelo PLS para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas	65
5.1. Introdução	65
5.2. Parte experimental	66
5.2.1. Instrumentação e processamento dos dados	66
5.2.2. Materiais e amostras	66
5.2.3. Procedimentos.....	67
5.3. Resultados e Discussão.....	67
5.3.1. Método de referência	67
5.3.2. Desenvolvimento do modelo PLS	68
5.3.2.1. Otimização dos modelos - detecção de <i>outliers</i>	70
5.3.2.2. Figuras de Mérito.....	72
5.3.2.2.1. Veracidade, precisão e faixa de trabalho	73
5.3.2.2.2. Seletividade, sensibilidade, sensibilidade analítica, LD e LQ.....	74
5.3.2.2.3. Bias, RPD e RER.....	74
5.4. Conclusão	75
6. Evolução de compostos químicos responsáveis pelo envelhecimento de cachaças armazenadas em diferentes madeiras.....	77
6.1. Introdução	77
6.2. Parte Experimental.....	80
6.2.1. Instrumentação e processamento de dados	80
6.2.2. Materiais e amostras	81
6.2.3. Procedimentos.....	81
6.3. Resultados e Discussão.....	82
6.3.1. Perdas por evaporação durante o envelhecimento.....	83

6.3.2. Teor alcoólico das cachaças durante o envelhecimento	84
6.3.3. Acidez total das cachaças durante o envelhecimento	85
6.3.4. Análise cromatográfica para quantificação de marcadores de envelhecimento em cachaças	86
6.3.4.1. Escolha do comprimento de onda	86
6.3.4.2. Identificação dos analitos	87
6.3.4.3. Condições da separação	87
6.3.4.4. Curvas de calibração e limites de detecção e quantificação	87
6.3.4.5. Quantificação dos marcadores nas cachaças envelhecidas	92
6.3.4.5.1. Cachaça envelhecida em barris de amendoim	93
6.3.4.5.2. Cachaça envelhecida em barris de bálsamo	94
6.3.4.5.3. Cachaça envelhecida em barris de carvalho	96
6.3.4.5.4. Cachaça envelhecida em barris de jequitibá	97
6.3.4.5.5. Cachaça envelhecida em barris de umburana	98
6.3.5. Análise exploratória	100
6.4. Conclusão	104
7. Modificação do método de Hewitt para a determinação de furfural em cachaças	106
7.1 Introdução	106
7.2. Parte Experimental	107
7.2.1. Instrumentação	107
7.2.2. Materiais e amostras	108
7.2.3. Procedimentos	108
7.3. Resultados e Discussão	109
7.3.1. Método de Hewitt oficial	110
7.3.2. Método de Hewitt modificado	110
7.3.3. Método cromatográfico para determinação de furfural em cachaça	113
7.3.4. Comparação entre os métodos	115
7.4. Conclusão	117

8. Conclusões Gerais e Perspectivas	119
9. Referências Bibliográficas	122
Anexos	134
Anexo I. Localização geográfica dos produtores de todas as cachaças analisadas nesta tese.....	134
Anexo II. Tabela contendo todas as amostras utilizadas nos modelos de classificação (Capítulo 4)	135
Anexo III. Tabela contendo todas as amostras utilizadas no modelo PLS (Capítulo 5).....	139
Anexo IV. Tabela contendo todas as amostras utilizadas para quantificação de furfural (Capítulo 7).....	143

Capítulo 1

Relevância do Trabalho

1. Relevância do Trabalho

Dados do Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC) apontam que há no país cerca de 40 mil produtores de cachaça, com uma produção anual de 1,2 bilhão de litros por ano. Desse total, 99% das empresas são de micro e pequeno porte e apenas 15% delas estão registradas no Ministério da Agricultura. Em relação aos locais de produção, os estados brasileiros que mais se destacam são: São Paulo, Pernambuco, Ceará, Minas Gerais e Paraíba, sendo que o estado de Minas Gerais é o maior produtor de cachaças de alambique do país.

A informalidade representa um entrave ao desenvolvimento do setor da cachaça, pois a bebida advinda da produção ilegal necessita de controle de qualidade. Sem a padronização na produção da cachaça, a imagem do destilado nacional fica prejudicada, desestimulando o aumento do consumo nacional e a exportação.

Um dos entraves à legalização da produção, além dos impostos a serem pagos é a exigência de análises químicas que garantam a qualidade do produto. Segundo muitos produtores, o preço dessas análises desestimula a busca pela legalização. Assim, a motivação para o desenvolvimento das aplicações que compõem esta tese foi a busca por métodos de análise mais simples, rápidos e baratos, além de métodos que facilitem o controle fiscal da bebida. Neste sentido, três aplicações foram desenvolvidas.

Na primeira delas, a partir de espectros no ultravioleta visível e fluorescência molecular foi desenvolvido um método usando estatística multivariada para a classificação do tipo de madeira utilizado no envelhecimento da cachaça, sendo que este é um aspecto importante, uma vez que o envelhecimento agrega valor à bebida. O desenvolvimento de um método rápido, como o proposto, pode auxiliar no controle fiscal destas bebidas, comprovando o envelhecimento e a madeira utilizada para o mesmo.

Na segunda aplicação, também com a análise de cachaças envelhecidas, foi proposto um método quimiométrico para quantificar o teor de compostos fenólicos totais das cachaças envelhecidas. Segundo a legislação brasileira, a detecção de compostos fenólicos é a única análise exigida para a comprovação do envelhecimento da cachaça. Aqui também foram utilizados espectros no ultravioleta visível de amostras diluídas.

A terceira aplicação desta tese apresenta as seguintes análises de cachaças envelhecidas: determinação cromatográfica de marcadores químicos do envelhecimento, teor alcoólico, acidez total e perda por difusão-evaporação. Estas quantificações têm por objetivo

buscar padrões de agrupamento para as cachaças envelhecidas em barris de carvalho e madeiras nativas (amendoim, bálsamo, jequitibá e umburana), a partir de um método quimiométrico de análise não supervisionada.

Finalmente, uma quarta aplicação foi proposta, na qual, através da modificação de um método já estabelecido, o método de Hewitt para a quantificação de furfural em cachaças, foi possível quantificar este importante contaminante em faixa de concentração significativamente menor, o que só podia ser conseguido anteriormente com análises cromatográficas, de custo elevado.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Cachaça

A aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% em volume, a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L⁻¹, expressos em sacarose. Já cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% em volume, 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⁻¹, expressos em sacarose [1].

A cachaça é a terceira bebida destilada mais consumida no mundo e a primeira no Brasil, sendo que cerca de 75% da produção total é proveniente da fabricação industrial e 25%, da produção artesanal. Segundo o IBRAC, apesar da capacidade instalada de produção de 1,2 bilhão de litros, menos de 1% da cachaça produzida anualmente é exportada. No ano de 2013, a cachaça foi exportada para 59 países, gerando receita de US\$ 16,59 milhões, com um volume total de 9,21 milhões de litros. Os principais mercados compradores foram Alemanha, Estados Unidos, Portugal, França, Paraguai e Itália [2].

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de cachaça de alambique do país, sendo que sua exportação é um item importante para a economia estadual [3]. A produção da genuína cachaça de alambique mineira gera atualmente cerca de 115.000 empregos diretos e acumula ao longo do seu ciclo produtivo uma receita anual de R\$1,4 bilhão. O estado possui 8.466 estabelecimentos produtores, dos quais 85% operam na ilegalidade, ou seja, não possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) [4].

O mercado produtor de cachaça vem recebendo grande atenção por parte dos setores públicos e privados, devido ao seu grande potencial social e econômico, visando o fortalecimento do meio rural e também o aumento do mercado consumidor da bebida. Como exemplos temos a criação da Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade (AMPAQ), em 1988 [5]; o Programa Mineiro de Incentivo à Produção de Aguardente (PRÓ-CACHAÇA), em 1992; a Lei Estadual nº 13.949 de 2001, que instituiu a cachaça de Minas como produto exclusivamente mineiro [6] e a Instrução Normativa nº 56 do MAPA, de 2002, que regulamentou as normas relativas aos requisitos e procedimentos para registro de

estabelecimentos produtores de cachaça organizados em cooperativas legalmente constituídas [7].

No ano de 2012, foi firmado um acordo comercial entre o Brasil e os Estados Unidos, no qual este país reconhece a cachaça como produto típico e exclusivo do Brasil. Antes do acordo a cachaça era taxada como "*Brazilian Rum*". Tal acordo amplia as possibilidades comerciais do nosso destilado no importante mercado norte-americano. Também foi em 2012 que a região mineira de Salinas, importante produtora de cachaças do estado, recebeu o selo de indicação geográfica do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Com a conquista do selo, as cachaças desta região ganham valor e buscam uma concorrência mercadológica mais justa, otimizando a exportação do produto, que adquire status e reconhecimento diferenciado.

O interesse crescente pela cachaça, visto nos últimos anos, estendeu-se também à área da pesquisa acadêmica. Para ilustrar tal fato, realizou-se uma busca na base de dados "Web of Science" utilizando os termos "cachaca or spirit cane sugar" no campo de busca tópicos, e os resultados obtidos foram ordenados de acordo com o ano de publicação. O gráfico dessa pesquisa é apresentado na Figura 1, onde é possível observar um aumento significativo na produção de artigos relacionados ao tema nos últimos anos.

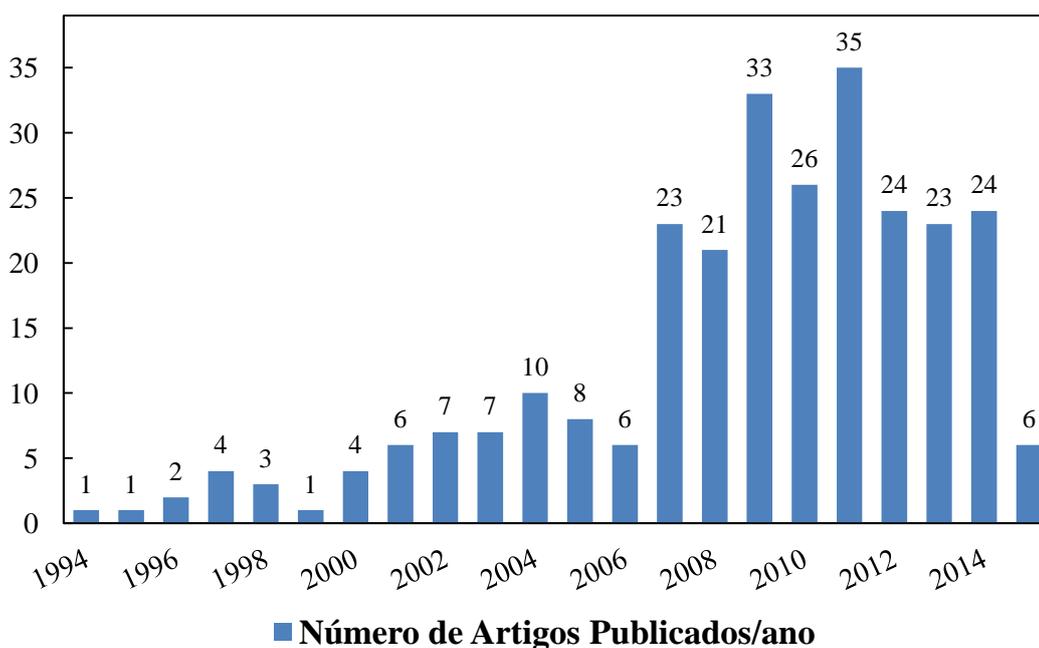


Figura 1. Pesquisa realizada na base de dados "Web of Science" com os termos "cachaca or spirit cane sugar" no campo tópicos, realizada em 12/03/2015.

O número de trabalhos publicados é liderado pelo estudo das leveduras associadas à fermentação do mosto de cana para a produção de cachaças, assim como o desenvolvimento de novas cepas que garantem características específicas ao destilado [8-14]. Os trabalhos publicados na área de desenvolvimento de métodos analíticos têm como temas: estudos relacionados ao envelhecimento da bebida em carvalho e em madeiras nativas [15-21]; controle de qualidade da bebida [22-27]; determinação do contaminante carbamato de etila [28-36]; quantificação de compostos voláteis [37-40]; quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [35, 40-44]; quantificação de metais [25, 45-48] diferenciação entre cachaça e rum [49-51] e diferenciação entre cachaças de alambique e coluna [52, 53].

2.1.1. Composição química e requisitos de qualidade

A composição química e os requisitos de qualidade para a aguardente de cana e para a cachaça no Brasil são fixados pela Instrução Normativa nº 13, do MAPA [1]. Os limites mínimos e máximos para estes componentes podem ser vistos a seguir, na Tabela 1.

Os métodos oficiais recomendados para as análises físico-químicas de cachaças incluem titulações e medidas espectrofotométricas efetuadas na região do visível [54]. No entanto, outras técnicas instrumentais mais modernas também são utilizadas: o coeficiente de congêneres e contaminantes orgânicos em cachaças são determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama; o carbamato de etila é determinado por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas e os contaminantes inorgânicos são quantificados por absorção atômica com forno de grafite [54].

Tabela 1. Composição química e requisitos de qualidade da aguardente de cana e da cachaça estabelecidas pela legislação brasileira.

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Gradação alcoólica aguardente de cana	% em volume de álcool etílico a 20 °C	38	54
Gradação alcoólica cachaça	% em volume de álcool etílico a 20 °C	38	48
Acidez volátil, em ácido acético	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	-	150
Ésteres, em acetato de etila	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	-	200
Aldeídos, em aldeído acético	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	-	30
Furfural + hidroximetilfurfural	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	-	5
Álcoois superiores*	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	-	360
Congêneres**	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	200	650
Açúcares***	g L ⁻¹	-	30
Partículas em suspensão (resíduo sólido)	-	ausentes	ausentes
Álcool metílico	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	-	20
Carbamato de etila	µg L ⁻¹ da bebida	-	210
Acroleína (2-propenal)	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	-	5
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	-	10
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg 100 mL ⁻¹ álcool anidro	-	3
Cobre	mg L ⁻¹ da bebida	-	5
Chumbo	µg L ⁻¹ da bebida	-	200
Arsênio	µg L ⁻¹ da bebida	-	100

* 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⁻¹.

**** A legislação para carbamato de etila entrou em vigor no dia 11/08/2014.

2.2. Espectrofotometria no Ultravioleta Visível na análise de bebidas

A espectrofotometria molecular na região ultravioleta-visível (UV-Vis) do espectro eletromagnético pode ser definida como um tipo de espectroscopia que se destina a examinar a capacidade que um analito tem de interagir com o raio ultravioleta ou com a luz visível por meio de absorção. A absorção tanto do raio ultravioleta quanto da luz visível, em especial na faixa de 200-780 nm, costuma envolver transições eletrônicas em moléculas por elétrons π ou elétrons não ligantes (n), enquanto passam para um estado de elétrons excitados, π^* [55].

A espectrofotometria UV-Vis é uma técnica analítica muito empregada, em função de sua robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas. Os procedimentos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivação química e acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo. Além disso, constitui-se em uma importante ferramenta para determinação de parâmetros físico-químicos, tais como constantes de equilíbrio e de velocidade de reações [56].

A espectrofotometria UV-Vis tem sido utilizada para a análise de bebidas destiladas conjuntamente com técnicas de análise multivariada, por exemplo na determinação de caramelo [57], na discriminação de tequila [58], na identificação e quantificação de compostos furânicos em tequila e mezcal [59] e na detecção de adulterações [24]. Especificamente na análise de cachaças, esta técnica tem sido utilizada para a discriminação de madeiras utilizadas no envelhecimento da bebida [20, 60, 61], na quantificação de cobre [47] e na determinação do teor de fenólicos totais oriundos do envelhecimento em barris [21].

2.3. Espectrofluorimetria na análise de bebidas

Na espectrofluorimetria as moléculas do analito são excitadas por absorção de radiação no ultravioleta/visível para resultar em uma espécie excitada cujo espectro de emissão fornece informação para análise qualitativa ou quantitativa. Ela é uma técnica analítica consagrada, que permite a realização de determinações com grande sensibilidade (os limites de detecção típicos estão na faixa de ng mL^{-1}) e seletividade, embora a sua aplicação seja limitada a espécies que apresentem o fenômeno da fluorescência molecular (ou que possam ser convertidas a moléculas fluorescentes, estratégia conhecida como *derivatização*) [62].

Essa técnica analítica tem sido muito usada na análise de numerosos compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial. Além da alta sensibilidade e seletividade, podemos citar como vantagem da espectrofluorimetria sua ampla faixa linear de resposta. A estas características devem ser adicionadas a simplicidade instrumental e o baixo custo de manutenção e análise, quando comparados com outros métodos analíticos [63].

A cachaça, mesmo quando não envelhecida, apresenta compostos fluorescentes, mas o envelhecimento torna a cachaça bem mais complexa em relação à quantidade de fluoróforos. Isto porque inúmeras reações químicas acham-se associadas ao processo de envelhecimento de bebidas destiladas, dentre elas as reações entre os compostos secundários provenientes da destilação; a extração direta de componentes da madeira; a decomposição de algumas macromoléculas da madeira (lignina, celulose e hemicelulose), com a subsequente incorporação dos produtos na bebida e as reações de compostos da madeira com os componentes originais do destilado [64].

Dentre os componentes das madeiras comumente usadas para o envelhecimento de bebidas alcoólicas estão um grande número de ácidos, aldeídos, álcoois, flavonoides, taninos e cumarinas. Entre os fenóis mais simples, de baixo peso molecular, estão os derivados da degradação da lignina, tais como vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído e p-hidroxibenzaldeído. Os fenóis mais complexos incluem as cumarinas, que possuem duas unidades fenilpropano interligadas de diferentes maneiras e os flavonoides [65]. Como grande parte destas moléculas apresentam fluorescência natural, a espectrofluorimetria tem um alto potencial para ser usada na análise de cachaças.

Quando a fluorescência de uma amostra é medida em diversos comprimentos de onda de emissão para diversos comprimentos de onda de excitação, obtém-se uma superfície ou matriz de excitação-emissão (EEM, *excitation-emission matrix*). Quando um conjunto de amostras é medido nessas mesmas condições, obtém-se um arranjo de dados multidimensional (tridimensional). Quando se tem interesse na análise de uma matriz complexa, contendo vários compostos fluorescentes, a aquisição e análise de superfícies de fluorescência poderá proporcionar vantagens.

A espectrofluorimetria em conjunto com a análise multivariada já foi utilizada para monitorar cervejas durante o período de estocagem [66] e também na determinação de caramelo em aguardente de vinho não envelhecida [67]. Também a combinação de superfícies de fluorescência e métodos quimiométricos é uma estratégia já utilizada para a análise de

bebidas, especialmente na indústria de vinhos. São exemplos dessas aplicações a busca da impressão digital de vinhos [68] e a classificação dessas bebidas com relação à indicação geográfica [69, 70] e ao tempo de envelhecimento [71].

2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência na análise de bebidas

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes compostos.

Devido a facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise [72].

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance/pressure liquid chromatograph*) se distingue por usar a fase móvel à alta pressão. Na HPLC as amostras não precisam ser voláteis nem termicamente estáveis (requisitos para o uso da cromatografia gasosa), basta que sejam solúveis na fase móvel. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade [72]. A HPLC é a principal técnica utilizada para a análise dos marcadores de envelhecimento em bebidas alcoólicas, incluindo a cachaça [15-16, 18-19, 73-75].

2.5. Técnicas Quimiométricas

De acordo com a *International Chemometrics Society*, a quimiometria é a disciplina da química que usa métodos matemáticos e estatísticos para: planejar ou selecionar condições ótimas de medidas ou experimentos e extrair o máximo de informação de dados químicos. As atividades de pesquisa em quimiometria podem ser agrupadas em oito áreas principais, a saber: calibração multivariada, análise exploratória e de classificação, planejamento e otimização de experimentos, resolução de curvas multivariada, processamento de sinal,

controle estatístico multivariado de processos, figuras de mérito, métodos “*multi-way*” e de inteligência artificial [76].

Na presente tese, com o objetivo de buscar padrões de agrupamento foi utilizada a análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*). As análises discriminantes por quadrados mínimos parciais (PLS-DA, *Partial Least Squares - Discriminant Analysis*) e por quadrados mínimos parciais multilinear (N-PLS-DA, *N-way Partial Least Squares - Discriminant Analysis*) foram ferramentas empregadas para classificação supervisionada e, finalmente, calibração multivariada por quadrados mínimos parciais (PLS, *Partial Least Squares*) foi usada na construção de modelos quantitativos.

2.5.1. PCA

A PCA, um método de classificação não supervisionado, é uma ferramenta importante para a redução da dimensão de dados. Seu principal objetivo é encontrar relações entre amostras e classificá-las de acordo com suas similaridades, tornando possível a detecção de amostras anômalas. O modelo PCA decompõe a matriz de dados em vetores de escores e pesos (*loadings*), calculados por ajuste de quadrados mínimos. Estes vetores são ordenados decrescentemente, em função da porcentagem de variância capturada. A combinação deste par de vetores é chamada de componente principal (CP). O vetor de escore contém informação da relação entre as amostras e o vetor de *loading*, da relação entre as variáveis. A equação básica para o método PCA é escrita como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_R \mathbf{p}_R^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

ou

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

onde \mathbf{X} ($I \times J$) é uma matriz de dados; \mathbf{T} ($I \times R$) são os escores; \mathbf{P} ($J \times R$) são os pesos (*loadings*) e \mathbf{E} ($I \times J$) são os resíduos. R é o número de CP usados para descrever \mathbf{X} . A escolha do número de CP é importante no modelo PCA. Uma estratégia para esta escolha é a análise de um gráfico de autovalores pelo número de CP: quando o número de autovalores ficar constante com o aumento do número de CP, este será o número de CP ideal para o modelo, ou seja, quando a porcentagem de variância explicada for maior que o nível do ruído. A detecção de amostras anômalas também é importante e pode ser feita pela análise do gráfico de T^2 de Hotelling pelos resíduos (Q). O valor de T^2 de Hotelling indica a influência da amostra no modelo. Amostras com altos resíduos (mal modeladas) e altos valores de T^2 devem ser

consideradas anômalas. Geralmente intervalos de confiança são estimados para estas análises, pois espera-se que as distribuições de Q e T^2 sigam a normalidade.

2.5.2. PLS

O PLS é o método de calibração multivariada mais usado em química. No PLS relaciona-se a matriz de dados espectrais \mathbf{X} (variáveis independentes) com o vetor \mathbf{y} ou matriz \mathbf{Y} (variáveis dependentes), este último caso se mais de uma propriedade for prevista simultaneamente. Caso \mathbf{y} seja um vetor, temos o PLS1 e caso \mathbf{Y} seja uma matriz, temos o PLS2. Quando se avalia mais de uma propriedade, não necessariamente deve-se usar o PLS2, pode-se usar o PLS1, prevendo uma propriedade de cada vez.

No PLS a matriz \mathbf{X} e o vetor \mathbf{y} (ou matriz \mathbf{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. Uma maneira de representar o método PLS pode ser vista nas equações a seguir, nas quais as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} são decompostas usando uma matriz de escores (\mathbf{T}) comum a ambas:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} = \sum t_f \mathbf{p}_f^t + \mathbf{E} \quad (2)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TQ}^t + \mathbf{F} = \sum t_f \mathbf{q}_f^t + \mathbf{F} \quad (3)$$

onde \mathbf{T} é a matriz de escores; \mathbf{P} e \mathbf{Q} são as matrizes de pesos (*loadings*) para \mathbf{X} e \mathbf{Y} , e \mathbf{E} e \mathbf{F} são as matrizes de resíduos. O produto de \mathbf{T} e \mathbf{P}^t é uma aproximação das variáveis independentes (ex: espectros) e o produto \mathbf{T} e \mathbf{Q}^t é uma aproximação das variáveis dependentes (ex: concentrações; classes). A concentração de novas amostras é estimada a partir dos novos escores \mathbf{T}^* , e dos pesos do modelo, \mathbf{Q} , de acordo com a equação:

$$\mathbf{Y}_{\text{new}} = \mathbf{T}^* \mathbf{Q}^t \quad (4)$$

Se a calibração é natural, ou seja, a composição das amostras não é controlada, é necessário algum método sistemático para se encontrar as amostras mais representativas do conjunto. O algoritmo de Kennard-Stone é muito utilizado para se separar as amostras em conjuntos de calibração e validação [77]. Normalmente, este algoritmo é utilizado para realizar a seleção de amostras que irão compor o conjunto de calibração, uma vez que este atua selecionando as amostras com maior variabilidade do conjunto total.

Para a construção de um bom modelo preditivo é essencial a escolha do número correto de VL, através da validação cruzada. Para conjuntos pequenos de amostras a estratégia mais comum de validação cruzada é o *leave-one-out*. Quando se trata de conjuntos maiores de

amostras há os blocos contínuos, as venezianas (*venetian blinds*) ou os subconjuntos aleatórios. No processo de validação cruzada, vários modelos prévios são construídos, nos quais uma amostra da calibração é retirada (ou um bloco de amostras) e, com as restantes, constrói-se o modelo e estima-se a concentração da amostra (ou do bloco de amostras) retirada, 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 a raiz quadrada do erro médio da validação cruzada (RMSECV, *root mean square error of cross validation*), de acordo com a Equação 5, onde y_i é o valor de referência, \hat{y}_i é o valor estimado e n_c é o número de amostras presentes no conjunto de calibração.

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_c}} \quad (5)$$

2.5.2.1. Pré-processamentos

A distribuição inadequada dos dados experimentais originais dificulta a extração de informações úteis e a interpretação dos mesmos. Com o objetivo de resolver este problema, antes de construir os modelos, o analista pode lançar mão de pré-processamentos [78].

Os métodos de pré-processamento mais utilizados consistem em centrar na média ou autoescalar os dados. Para o alisamento dos espectros há o algoritmo Savitzky-Golay. Este algoritmo reduz matematicamente o ruído, aumentando a relação sinal/ruído. Além destes pré-processamentos, também foi utilizada a correção do sinal ortogonal (OSC, *orthogonal signal correction*) em duas aplicações desta tese. O OSC é um filtro que remove informação espectral ortogonal à informação de \mathbf{Y} [79], ou seja, recomenda-se aos modelos em que a primeira VL explica muita variância no bloco \mathbf{X} e pouca variância no bloco \mathbf{Y} .

2.5.2.2. Validação Analítica de Métodos Multivariados

Após a construção do modelo é necessária a sua validação para se comprovar que o modelo realmente atende aos objetivos para os quais foi proposto. Apesar da ausência de normatização multivariada na regulamentação da maioria das áreas é cada vez mais comum que trabalhos com o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada apresentem a validação analítica através do cálculo de figuras de mérito [80].

2.5.2.2.1. Detecção de amostras anômalas (*outliers*)

Uma etapa importante durante a construção de um modelo é a identificação e remoção de amostras anômalas (*outliers*) dos conjuntos de calibração e validação. Amostras anômalas são definidas como amostras que diferem muito do grupo de origem, devido à erros na aquisição dos dados, ou simplesmente porque essas amostras não fazem parte daquela população. A detecção e remoção de amostras anômalas é especialmente importante no desenvolvimento de modelos com amostras obtidas naturalmente, quando não se tem um controle completo de sua composição química, como as amostras de cachaças predominantemente utilizadas nas aplicações desta tese.

Diversos critérios podem ser utilizados para a remoção de amostras anômalas, mas nesta tese foi usada uma metodologia robusta, que avalia valores de *leverage* extremos, resíduos elevados no bloco **X** e no bloco **Y** [81-83]. Para a avaliação no bloco **X**, amostras com $s(e_i) > 2,0s(e)$ são removidas, onde $s(e)$ é o desvio padrão total da informação espectral não modelada e $s(e_i)$ é o desvio padrão específico de cada amostra. Amostras anômalas no bloco **Y** são detectadas quando apresentam erro de predição duas vezes maior que o erro quadrático médio de calibração (RMSEC, *root mean square error of calibration*). Por último, amostras com um *leverage* maior que o valor limite (três vezes o número de VL mais um, dividido pelo número de amostras de calibração) também devem ser removidas. O *leverage* (h) é uma medida da influência de cada amostra no modelo e é calculado pela Equação 6, onde **T** é a matriz de escores das amostras de calibração, t_i é o vetor de escores para a amostra i e A é o número de VL.

$$h_i = \mathbf{t}_{A,i}^T (\mathbf{T}_A^T \mathbf{T})^{-1} \mathbf{t}_{A,i} \quad (6)$$

As amostras anômalas devem ser removidos respeitando-se o limite de $\frac{2}{9}$ (22,2%) do número total de amostras [84, 85]. Além disso, não mais do que três rodadas de detecção destas *amostras* (quatro modelos) devem ser realizados, de forma a evitar o "*efeito bola de neve*", quando rodadas repetitivas continuam a identificar amostras anômalas [81]. Para o conjunto de validação usou-se o teste *Jacknife*, no qual as amostras são avaliadas de acordo com o valor do resíduo de previsão. Se este valor for maior que um determinado valor crítico, então a amostra é considerada anômala [84].

2.5.2.2.2. Figuras de Mérito

Na estimativa de figuras de mérito para métodos de calibração de primeira e segunda ordens, a parte do sinal que se relaciona unicamente com o analito de interesse é mais importante do que o sinal total. Essa parte única do sinal é denominada sinal analítico líquido (NAS, *net analyte signal*), conceito que foi proposto pioneiramente por Lorber, em 1986 [86]. O NAS é definido como a parte do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos interferentes presentes na amostra. Quando todos os interferentes podem ser modelados, o NAS pode ser estimado através de amostras do branco [87]. Nas situações de calibração natural isto não é possível e o vetor NAS, $\hat{\mathbf{x}}_{A,i}^{nas}$, pode ser estimado para cada amostra i , através do vetor de regressão do modelo, \mathbf{b} , com \mathbf{A} variáveis latentes, de acordo com a Equação 7.

$$\hat{\mathbf{x}}_{A,i}^{nas} = \mathbf{b} (\mathbf{b}^T \mathbf{b})^{-1} \mathbf{b}^T \mathbf{x}_i \quad (7)$$

A norma de cada vetor NAS fornece um escalar $n\hat{a}s$, para cada amostra, que é análogo a um sinal analítico univariado. A estimativa do NAS é útil na validação multivariada, pois é utilizada no cálculo de algumas figuras de mérito, como seletividade, sensibilidade e limites de detecção e quantificação [80, 88].

A seguir, são apresentadas as figuras de mérito abordadas na segunda aplicação desta tese.

Veracidade: é o grau de concordância entre o valor previsto e o valor de referência (valor verdadeiro). Normalmente, em calibração multivariada, a veracidade é avaliada pelo cálculo da raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão (RMSEP, *root mean square error of prediction*), de acordo com a Equação 8, onde y_i é o valor de referência, \hat{y}_i é o valor estimado e n_v é o número de amostras presentes no conjunto de validação.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_v}} \quad (8)$$

Calcula-se também o RMSEC, mas este parâmetro não é suficientemente robusto para avaliar a exatidão, uma vez que ele avalia o erro de previsão das amostras do conjunto de calibração, ou seja, as mesmas amostras que foram utilizadas para construir o modelo, o que torna este parâmetro viciado. No entanto, a sua comparação com o valor de RMSEP é importante para avaliar se há presença de sobreajuste no modelo. O RMSEC é calculado de acordo com a Equação 9, onde y_i é o valor de referência, \hat{y}_i é o valor estimado e v é o número de graus de liberdade. v é igual a $(n_c - n_{VL} + 1)$, onde n_c é o número de amostras presentes no

conjunto de calibração e n_{VL} é o número de variáveis latentes do modelo ($+ 1$, caso os dados tenham sido centrados na média).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{v}} \quad (9)$$

Do ponto de vista teórico, a Equação 9 está correta. No entanto, muitos softwares comerciais, como o PLS_Toolbox usado neste trabalho, utilizam n_c ao invés de v , no denominador da Equação 9. Embora isto não seja estritamente correto, é aceito pela maior parte da literatura, pois quando se tem um grande número de amostras, a diferença se torna insignificante.

Precisão: é a estimativa da dispersão dos resultados repetidos de uma amostra. Para se avaliar a precisão, não existe diferença entre os conceitos uni e multivariado.

Existem três níveis nos quais a precisão pode ser expressa: i) a repetitividade, que trata da concordância entre os resultados de medições efetuados sob as mesmas condições, mesmo dia e mesmo analista. ii) a precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial, que se refere a replicatas analisadas no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, por analistas diferentes e, às vezes, equipamentos diferentes. iii) a reprodutibilidade, que representa um procedimento analítico que somente pode ser estimado mediante a participação em um ensaio interlaboratorial colaborativo e, assim, toda a análise será repetida em outro laboratório.

A repetitividade é avaliada analisando-se seis replicatas de três amostras de níveis de concentrações diferentes no mesmo dia, e a precisão intermediária, com diferentes analistas analisando estas mesmas amostras.

Linearidade: é a capacidade do modelo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito. Na calibração univariada se usa a curva de calibração para avaliar tal parâmetro, mas a impossibilidade de se obter uma curva de calibração multivariada faz com que a linearidade seja uma figura de mérito que apresenta dificuldade de harmonização em métodos multivariados. Em calibração multivariada, a linearidade costuma ser avaliada por meio do coeficiente de correlação (r) do ajuste entre os valores previstos e de referência, mas o valor de (r) isoladamente não é capaz de garantir a linearidade do modelo [89].

Com o objetivo de estabelecer uma melhor avaliação da linearidade, alguns autores têm sugerido uma maneira adicional, proveniente de métodos univariados, que é verificar a aleatoriedade dos resíduos através da comprovação de algumas de suas propriedades assumidas como premissas: i) normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner; ii) homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe; iii) independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson [83, 84, 90].

Faixa de trabalho: é definida como o intervalo no qual o método apresenta linearidade, veracidade e precisão aceitáveis.

Seletividade (SEL): é o grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes, ou seja, é a porcentagem do sinal total que é referente ao analito [80]. Para os métodos univariados, deseja-se que a SEL seja o mais próxima de 100%, indicando a ausência de interferentes. No entanto, quando se trata de métodos multivariados, não existe a necessidade de exigência de um valor limite de SEL, porque se o sinal analítico for totalmente seletivo, a análise multivariada não é necessária. A SEL pode ser estimada de acordo com a Equação 10, onde $\|x_i\|$ é a norma do vetor NAS para a amostra i e X_i é o vetor da amostra i . Com este cálculo é possível obter um valor de SEL para cada amostra, então a média destes valores é usada para descrever o método [82].

$$SEL_i = \frac{\|x_i\|}{\|X_i\|} \quad (10)$$

Sensibilidade (SEN): é definida como a fração de sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração do analito. A SEN pode ser estimada como o inverso da norma do vetor de coeficientes de regressão do modelo PLS (Equação 11). A SEN é dependente da técnica analítica utilizada. Assim, não é possível fazer comparações entre métodos com técnicas diferentes e, por isso, outra figura de mérito deve ser calculada, a sensibilidade analítica [82].

$$SEN = \frac{1}{\|b\|} \quad (11)$$

Quando o vetor NAS é determinado, o vetor de SEN para cada amostra do conjunto de calibração pode ser determinado a partir do vetor S_i^{NAS} (Equação 12) e este vetor é o mesmo

para todas as amostras, então calcula-se a norma deste vetor para, finalmente, se ter o valor de SEN (Equação 13). Nas Equações 11 e 12 S_i^{NAS} é o vetor de SEN para cada amostra e y é o vetor concentração.

$$S_i^{NAS} = \frac{x_i^{NAS}}{y} \quad (12)$$

$$SEN = \|S_i^{NAS}\| \quad (13)$$

Sensibilidade Analítica: a sensibilidade analítica (γ) expressa a sensibilidade em função da unidade de concentração que se está medindo. A γ é definida como a razão entre a SEN e o ruído instrumental (ε), como mostrado na Equação 14. Para estimar o ruído são necessários de 10 a 15 medidas do branco para construir uma matriz de brancos e, então, calcula-se o desvio padrão combinado desta matriz [82].

$$\gamma = \frac{SEN}{\varepsilon} \quad (14)$$

O inverso da sensibilidade analítica (γ^{-1}) é uma estimativa da diferença mínima que é discernível pelo método, considerando que a única fonte de erro é o ruído instrumental aleatório.

Limites de Detecção e Quantificação: O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser observada com o método (Equação 15) e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser medida (Equação 16). LD e LQ são calculados a partir de γ^{-1} , e por isso a única fonte de erro considerada no cálculo é o erro aleatório instrumental.

$$LD = 3,3 (\gamma^{-1}) \quad (15)$$

$$LQ = 10 (\gamma^{-1}) \quad (16)$$

Viés (bias): o termo *bias*, ou viés, é relativo à presença de erros sistemáticos no modelo. De acordo com a norma E1655 da ASTM [91] a avaliação deste parâmetro é feita por meio de um teste t para as amostras de validação ao nível de 95% de confiança. O *bias* médio para o conjunto de validação é calculado pela Equação 17. A seguir, o desvio padrão dos erros de validação é estimado através da Equação 18 e, por fim, o valor de t é obtido da Equação 19. Se o valor t calculado for maior que o t crítico para n_v graus de liberdade, a presença de

erro sistemático é confirmada. Nas Equações 17, 18 e 19 y_i é o valor de referência, \hat{y}_i é o valor estimado e n_v é o número de amostras presentes no conjunto de validação.

$$bias = \frac{\sum_{i=1}^{n_v} y_i - \hat{y}_i}{n_v} \quad (17)$$

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum [(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{n_v - 1}} \quad (18)$$

$$t_{bias} = \frac{|bias| \sqrt{n_v}}{SDV} \quad (19)$$

Relação de desempenho do desvio (RPD): a razão entre o desvio padrão do conjunto de calibração (s_{cal}) e o erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV, *root mean square error of cross validation*) é a relação de desempenho do desvio da calibração (RPD_{cal}), conforme pode ser visto na Equação 20. A relação de desempenho do desvio de validação (RPD_{val}) é obtida dividindo-se o desvio padrão do conjunto de validação (s_{val}) pelo RMSEP, conforme a Equação 21. De acordo com a literatura, bons modelos devem possuir valores de RPD acima de 2,4, enquanto valores entre 2,4 e 1,5 são considerados satisfatórios. Modelos com RPD menores que 1,5 não devem ser utilizados [92].

$$RPD_{cal} = \frac{s_{cal}}{RMSECV} \quad (20)$$

$$RPD_{val} = \frac{s_{val}}{RMSEP} \quad (21)$$

Razão de intervalo de erro (RER): a razão de intervalo de erro é calculada dividindo-se a amplitude da faixa de concentração de um dado analito pelo RMSECV do modelo, conforme a Equação 22. Este parâmetro é utilizado para determinar a utilidade prática de um modelo. Modelos com RER menor que 3 têm pouca utilidade prática; modelos com RER entre 3 e 10 têm utilidade prática limitada e modelos com RER maior que 10 têm alta utilidade prática [93].

$$RER = \frac{\text{amplitude (y)}}{RMSECV} \quad (22)$$

2.5.3. PLS-DA

O PLS-DA é um método multivariado para a classificação supervisionada de amostras. A construção do modelo é muito semelhante ao PLS, sendo que a única diferença está no vetor \mathbf{y} (ou na matriz \mathbf{Y}). No PLS-DA, a variável independente \mathbf{y} indica a classe a qual pertence a amostra; quando no conjunto de dados só existe duas classes, \mathbf{y} é um vetor (PLS1). Quando se tem três ou mais classes, a variável independente é uma matriz \mathbf{Y} (PLS2), com o número de colunas igual ao número de classes. Valores iguais a 1 ou 0 são atribuídos, os quais indicam o pertencimento ou não a uma determinada classe, respectivamente.

Os valores previstos pelo modelo PLS-DA não são idealmente os valores 0 ou 1, mas valores aproximados. Se não são exatos, então um limite (*threshold*) é estabelecido e se o valor previsto está acima deste limite, a amostra pertence à classe. Nas versões mais atuais do software PLS_Toolbox este *threshold* é calculado com base na estatística bayesiana [94]: o *threshold* para cada classe é estimado de modo a minimizar os erros de classificação, assumindo que a variância de \mathbf{y} segue uma distribuição semelhante à que será observada para as futuras amostras [95].

Todos os procedimentos normalmente usados no PLS para selecionar o melhor modelo costumam ser usados também no PLS-DA, tais como a separação da matriz \mathbf{X} em conjuntos de treinamento e teste usando o algoritmo de Kennard-Stone, a validação cruzada, a detecção de amostras anômalas, etc. Para modelos qualitativos com amostras naturais, ou seja, não planejadas, é recomendável que o Kennard-Stone seja rodado para cada classe individualmente, para garantir que amostras de todas as classes sejam selecionadas para os conjuntos de treinamento e de teste.

A detecção de amostras anômalas é feita a partir da análise de gráficos nos quais são plotados os valores de Hotelling (T^2) e os resíduos (Q) para todas as amostras. A estatística T^2 de Hotelling 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, $\frac{2}{9}$ do número total de amostras [84, 85, 96].

Quando se tem um modelo de classificação, dois parâmetros estatísticos são muito importantes para avaliar seu desempenho: as taxas de sensibilidade e seletividade, sendo que ambas estão intimamente relacionadas com as taxas de falsos resultados. A sensibilidade, também chamada de poder do teste, é a habilidade do método em detectar amostras

verdadeiramente positivas como positivas enquanto a taxa de sensibilidade (TSB) corresponde à probabilidade de um método classificar como positiva uma amostra sabidamente positiva. De maneira análoga, a seletividade corresponde à habilidade do método em detectar amostras verdadeiramente negativas como negativas, sendo a taxa de seletividade (TST) a probabilidade de o método classificar como negativa uma amostra sabidamente negativa [97].

A TSB é definida como a razão entre a quantidade de resultados positivos (TP) e a soma deste com a quantidade de resultados falso-negativos (FN), multiplicada por 100.

$$TSB = \frac{TP}{TP+FN} \times 100 \quad (23)$$

A TST é definida como a razão entre a quantidade de resultados negativos corretos (TN) e a soma deste com a quantidade de resultados falso positivos (FP), multiplicada por 100.

$$TST = \frac{TN}{TN+FP} \times 100 \quad (24)$$

A taxa de confiabilidade (TCF) é definida como a diferença entre o total de resultados (100%) e a soma da taxa de falso-positivos (TFP) e a taxa de falso-negativos (TFN).

$$TCF = 100 - TFP - TFN \quad (25)$$

Sendo que a TFP é definida como a razão entre o número de resultados FP e a soma deste com o TN, multiplicada por 100.

$$TFP = \frac{FP}{FP+TN} \times 100 \quad (26)$$

Já TFN é a razão entre FN e a soma deste com TP, multiplicada por 100.

$$TFN = \frac{FN}{FN+TP} \times 100 \quad (27)$$

Estes parâmetros são calculados separadamente para os conjuntos de treinamento e teste para a avaliação do desempenho do modelo.

2.5.4. NPLS-DA

O NPLS é um método quimiométrico para construção de modelos de regressão para dados de ordem superior, realizado entre grupos de pares: variáveis independentes (chamado de \mathbf{X}) e dependentes (chamado de \mathbf{y}) [99]. O NPLS é uma extensão do algoritmo bidimensional PLS para casos nos quais o grupo independente é um tensor de ordem maior que dois, que objetiva encontrar a máxima covariância entre as variáveis dependentes. No

caso da calibração com superfícies de fluorescência molecular, o grupo independente é um tensor de três dimensões formado pelas medidas de intensidade de fluorescência de várias amostras e o dependente é um vetor de concentrações. O algoritmo do NPLS decompõe um arranjo de dados multidimensionais $\underline{\mathbf{X}}$ em um conjunto de tríades. Cada tríade é equivalente a uma VL no PLS e consiste de um vetor de escores, \mathbf{t} , relacionado à dimensão das amostras e dois vetores de pesos (*weights*), \mathbf{w}^J e \mathbf{w}^K , relacionados às outras duas dimensões dos dados (ex: comprimentos de onda de emissão e excitação para o caso de dados de superfícies de fluorescência molecular).

A base estrutural do modelo é dada pela Equação 28, onde e_{ijk} são os resíduos, t_{if} , w_{jf}^J e w_{kf}^K são os elementos dos f vetores \mathbf{t} , \mathbf{w}^J e \mathbf{w}^K , respectivamente, e F é o número de tríades ou fatores.

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F t_{if} w_{jf}^J w_{kf}^K + e_{ijk} \quad (28)$$

Este método de regressão, combinado com a análise discriminante, o NPLS-DA, permite a classificação supervisionada de amostras, separando-as por classes com um elevado grau de similaridade [100]. Apesar do uso de uma maior quantidade de dados (cada amostra é um cubo de dados), o NPLS apresenta várias vantagens quando comparado ao unfold-PLS, pois usa menos parâmetros, produz resultados mais facilmente interpretáveis e é mais robusto à influência de ruído nos dados [101]. Assim como no PLS-DA, os procedimentos normalmente usados no PLS para selecionar o melhor modelo costumam ser usados também no NPLS-DA, tais como separação em conjuntos de treinamento e teste, validação cruzada, detecção de amostras anômalas, etc.

O algoritmo de Kennard-Stone é utilizado para a separação em conjuntos de treinamento e teste, mas este algoritmo não funciona com matrizes cúbicas, como as utilizadas no NPLS, então antes de utilizar o algoritmo é necessário desdobrar a matriz cúbica e, após a separação dos conjuntos, reorganizar os cubos usando a função *reshape* do Matlab.

Como pré-processamento as versões mais atuais do PLS_Toolbox trazem a opção de centrar uma das dimensões na média, o que normalmente é feito na primeira dimensão (as amostras). Para modelos NPLS-DA a remoção de *outliers* também é baseada na remoção daquelas amostras com altos T^2 de Hotelling e Q . O *threshold* também é bayesiano, mas aqui ele não é calculado pelo PLS_Toolbox automaticamente, mas em linha, utilizando a função *plsdtres*, presente no software PLS_Toolbox [102]. Finalmente também são calculadas as

taxas de sensibilidade, seletividade e confiabilidade para avaliar a eficácia do modelo qualitativo.

2.5.5. Fusão de Dados

A fusão de dados mescla as informações fornecidas por vários instrumentos analíticos ou sensores e permite que um grande número de diferentes sinais multivariados possa ser manuseado, exigindo assim a utilização de ferramentas quimiométricas [103]. Para cada amostra, todas as variáveis espectrais obtidas a partir de diferentes tipos de instrumentos e fontes são concatenadas em um único vetor, conhecido como meta-espectro. A compilação de dados de diferentes técnicas fornece interpretações complementares e facilita a descrição completa do produto [104]. Podem-se destacar as seguintes vantagens da aplicação da fusão de dados: maior relação sinal-ruído; maior robustez e confiabilidade; melhor qualidade de resolução; redução da incerteza; aumento da confiança [105].

Desde o final da década de 1980, esta estratégia tem sido aplicada a campos da engenharia e robótica [106]. Nos últimos anos, a fusão de dados tem sido utilizada em química analítica para o desenvolvimento de modelos de classificação e de calibração multivariada, principalmente na análise de amostras complexas, tais como azeite [107-109], bebidas [104, 110], corante [111] e carne [112], mas também na análise de outras matrizes, tais como pigmentos em obras de arte [113].

As técnicas espectroscópicas mais utilizadas na fusão de dados são: UV-Vis, infravermelho médio e próximo, Raman, fluorescência e espectrometria de massa. A fusão de dados pode ser classificada em três níveis: baixo, médio e alto [114]. A fusão de baixo nível consiste em combinar diretamente os sinais originais (espectros) após as etapas de pré-processamento. A fusão de nível médio envolve a extração das características de cada conjunto de dado com a posterior seleção de variáveis antes de fusão de dados. Finalmente, na fusão de alto nível, um modelo multivariado é construído separadamente para cada técnica e as respostas individuais são combinadas para produzir o resultado final [115].

Nesta tese serão apresentados modelos nos quais a fusão de baixo nível foi aplicada em dados espectroscópicos para classificar cachaças comerciais envelhecidas em diferentes tipos de madeiras.

Capítulo 3

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Diante do cenário de crescente interesse acadêmico e comercial pela cachaça e de sua importância econômica para o país, o objetivo geral da presente tese é o desenvolvimento de metodologias analíticas simples e rápidas, para amostras de cachaças, utilizando medidas espectrométricas e análise cromatográfica com a posterior análise quimiométrica dos dados.

3.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos a seguir estão relacionados à execução do trabalho:

- Comparar o desempenho de diferentes métodos quimiométricos para a discriminação do tipo de madeira utilizado para o envelhecimento de cachaças comerciais.
- Desenvolver um método quimiométrico para a previsão do teor de compostos fenólicos totais presente em cachaças envelhecidas.
- Avaliar o perfil de compostos marcadores de envelhecimento em cachaças envelhecidas durante um ano em barris de diferentes madeiras, utilizando análise cromatográfica e um método quimiométrico de análise não supervisionada.
- Adaptar o método de Hewitt para a quantificação espectrofluorimétrica de furfural em cachaças, de forma a quantificar este importante contaminante em faixa de concentração significativamente menor que o método oficial.

Capítulo 4

Diferentes métodos quimiométricos para a discriminação de cachaças comerciais envelhecidas

4. Diferentes métodos quimiométricos para a discriminação de cachaças comerciais envelhecidas

4.1. Introdução

A cachaça, assim como outras bebidas destiladas, muitas vezes passa pelo processo de envelhecimento em barris de madeira. Esta etapa, além de melhorar o seu sabor e a sua aceitabilidade pelo consumidor, aumenta o seu valor comercial. De acordo com a legislação brasileira [1], é considerada envelhecida a cachaça armazenada em barris de madeira durante um ano ou mais, recebendo classificações diferentes, dependendo do tempo de envelhecimento e da proporção de destilado envelhecido no produto final. Segundo essa classificação, cachaça envelhecida é aquela que contém no mínimo 50% de cachaça envelhecida durante um ano em barris de no máximo, 700 L; cachaça premium é aquela que contém 100% de cachaça envelhecida durante um ano em barris de no máximo 700 L e cachaça extra premium é aquela que contém 100% de cachaça envelhecida durante três anos em barris de no máximo 700 L.

A informação de classificação da cachaça envelhecida no rótulo só é permitida para o produto cujo processo de envelhecimento tiver sido acompanhado pela inspeção e certificação do MAPA. Devido às dificuldades inerentes a este processo de certificação, muitos produtores envelhecem sua cachaça e a rotulam simplesmente como "armazenada".

A madeira mais comumente usada para fazer barris para envelhecimento de bebidas é o carvalho (*Quercus sp*). No entanto, como o carvalho não é uma árvore típica de climas tropicais, barris dessa madeira são importados, chegando até os produtores brasileiros a um preço muito alto. Assim, uma alternativa é a utilização de madeiras nativas para a confecção de barris. Madeiras nativas como umburana (*Amburana cearensis*), jequitibá (*Cariniana estrellensis*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) e amendoim (*Pterogyne nitens*) são amplamente utilizados na confecção de barris utilizados para o envelhecimento da cachaça produzida em Minas Gerais e em outros estados.

Com o aumento do consumo interno de cachaça de qualidade e a crescente demanda do mercado externo, tornam-se necessários métodos rápidos que permitam a discriminação da cachaça pelo tipo de madeira utilizada no envelhecimento. Isso evita que um produto de baixa qualidade seja vendido como sendo de boa qualidade, contribuindo para a consolidação de uma boa imagem do destilado símbolo do Brasil.

Para classificar cachaças de acordo com a madeira utilizada para o envelhecimento, alguns autores têm publicado estudos utilizando métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões como o PCA e métodos de discriminação, como a análise linear discriminante (LDA, *linear discriminant analysis*), analisando principalmente espectros UV-Vis [20,52], mas também espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS, *electrospray ionization mass spectrometry*) [116], e HPLC [18]. Estes trabalhos relatam o uso de técnicas espectroscópicas para discriminar ou classificar as cachaças segundo a madeira utilizada no envelhecimento, mas não existem estudos nos quais estas técnicas sejam comparadas ou combinadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho da espectrofotometria UV-Vis e da espectrofluorimetria, individual e combinadamente, aliadas às técnicas quimiométricas PLS-DA e NPLS-DA para a classificação de cachaças de acordo com a madeira utilizada no envelhecimento. Um aspecto importante deste estudo foi o emprego de um grande número de amostras disponíveis comercialmente, totalizando 109 cachaças.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Instrumentação e processamento dos dados

Os espectros UV-Vis foram registrados num espectrofotômetro de arranjo de diodos Hewlett-Packard modelo 8451 A, em uma cubeta de quartzo (10 mm) de 190 a 500 nm (incrementos de 2 nm).

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, usando uma cubeta de quartzo de 10 mm. Todos os espectros de fluorescência em 2D (excitação-emissão) foram obtidos no intervalo de excitação de 240 a 500 nm (passo de 10 nm) e na faixa de emissão de 260 a 600 nm (incrementos de 2 nm). As larguras das fendas dos monocromadores de excitação e de emissão foram ambas 5 nm e a velocidade de varredura foi de 9600 nm min⁻¹.

Os programas MATLAB, versão 7.9 (The Math Works, Natick, MA, EUA) e PLS Toolbox, versão 6.5 (Eigenvector Technologies, Manson, WA, EUA) foram utilizados para as análises dos dados .

4.2.2. Materiais e amostras

As amostras foram diluídas com etanol (99%, Synth) e água deionizada. Foram analisadas 109 amostras de cachaças envelhecidas (provenientes de seis diferentes estados): 19 amostras de barris de amendoim; 23 de bálsamo; 21 de carvalho; 23 de jequitibá e 23 de umburana. Também foram analisadas 15 amostras de cachaças envelhecidas no laboratório. Este envelhecimento ocorreu em barriletes de 1,5 L, durante seis meses. O Anexo I contém um mapa com a localização geográfica de todas as amostras utilizadas nesta tese e o Anexo II contém uma tabela com informações sobre as 109 amostras utilizadas nesta aplicação.

Os padrões de ácido gálico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido elágico, vanilina, sinapaldeído, siringaldeído, coniferaldeído e cumarina foram comprados todos da Sigma-Aldrich.

4.2.3. Procedimentos

Para a aquisição dos espectros UV-Vis as amostras foram diluídas 30 vezes com uma solução etanol: água (40:60% v/v) na própria cubeta. Para as análises de fluorescência as amostras não foram submetidas a qualquer etapa de preparo.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Modelo PLS-DA com espectros UV-Vis

Os espectros UV-Vis típicos para as cachaças envelhecidas analisadas são mostrados na Figura 2. A maioria das amostras estudadas apresenta duas bandas características com comprimentos de onda máximos em 200 nm e entre 250 e 300 nm. Estes comprimentos de onda estão associados com a absorção do grupo benzeno, substituído por grupos hidroxila - grupo substituinte encontrado em compostos fenólicos presentes em cachaças envelhecidas.

A matriz de dados (124x156) foi centrada na média, alisada com o método de Savitsky-Golay (filtro de 15 pontos e polinômio de ordem zero) e corrigida com o OSC (um componente, zero iteração e 99,9% de tolerância). Utilizando-se o algoritmo de Kennard-Stone o conjunto de treinamento foi construído com 82 amostras (15 amostras de barris de amendoim; 17 de bálsamo; 16 de carvalho, 17 de jequitibá e 17 de umburana), enquanto 42 amostras (sete amostras de barris de amendoim; nove de bálsamo; oito de carvalho; nove

para jequitibá e nove para umburana) foram utilizados no conjunto de teste. O algoritmo PLS2 foi utilizado, pois ofereceu um desempenho de classificação similar ao PLS1 para estes dados.

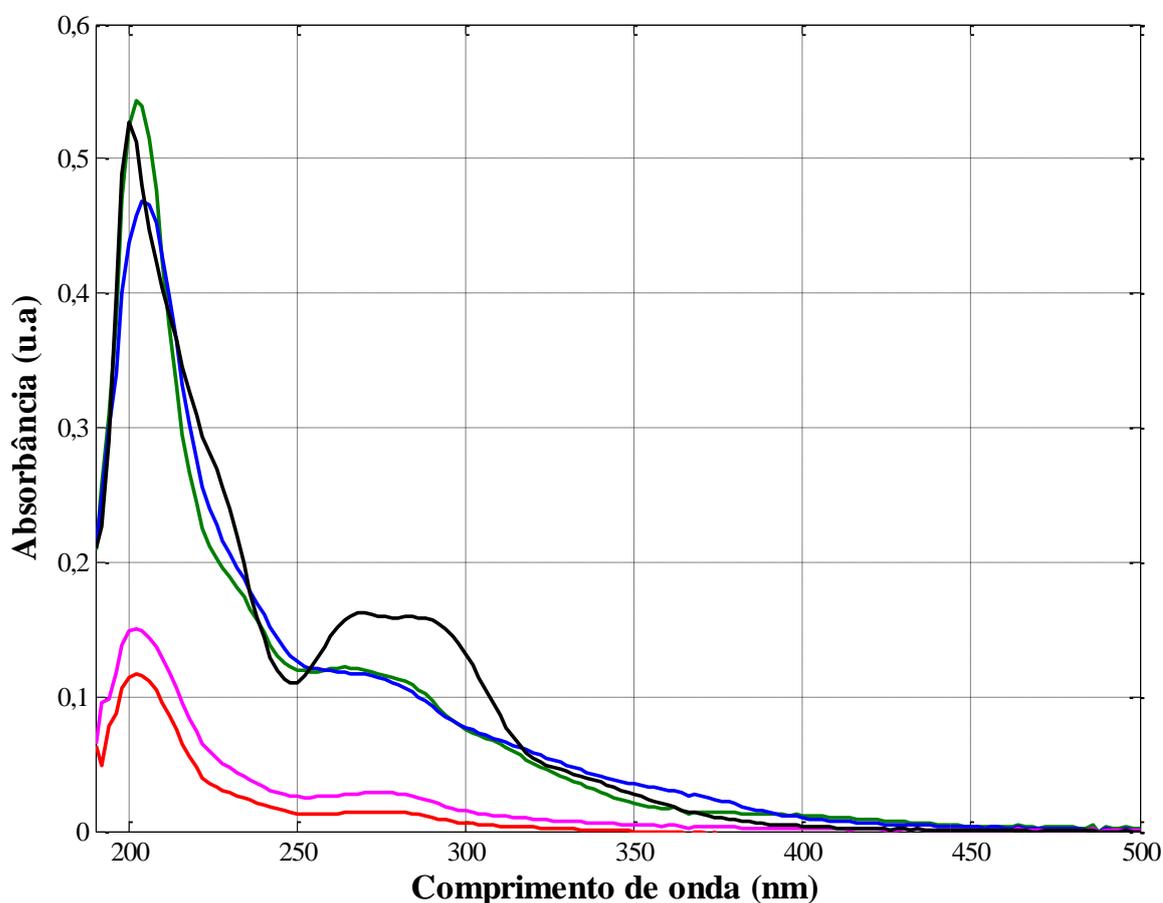


Figura 2. Espectros UV-Vis típicos para cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeiras: amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—) e umburana (—).

O modelo foi selecionado inicialmente com quatro VL, indicadas pela validação cruzada por subconjuntos aleatórios que responderam por 98% e 27% da variância em \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente. Depois que o modelo PLS-DA foi construído, ele foi otimizado através da remoção de amostras que apresentavam, simultaneamente, altos valores de T^2 de Hotelling e resíduos Q , ao nível de confiança de 95%. As amostras anômalas foram removidas dentro do limite de 22,2% do número total de amostras e foi respeitada a restrição do número de rodadas para a exclusão de amostras (três modelos foram construídos).

O modelo final foi construído com quatro VL que responderam por 98% e 33% da variância de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente, após a remoção de seis amostras (uma amostra de amendoim; duas amostras de bálsamo e três amostras de umburana). Os coeficientes de

regressão do modelo PLS-DA para a classificação de cachaças envelhecidas são mostrados na Figura 3.

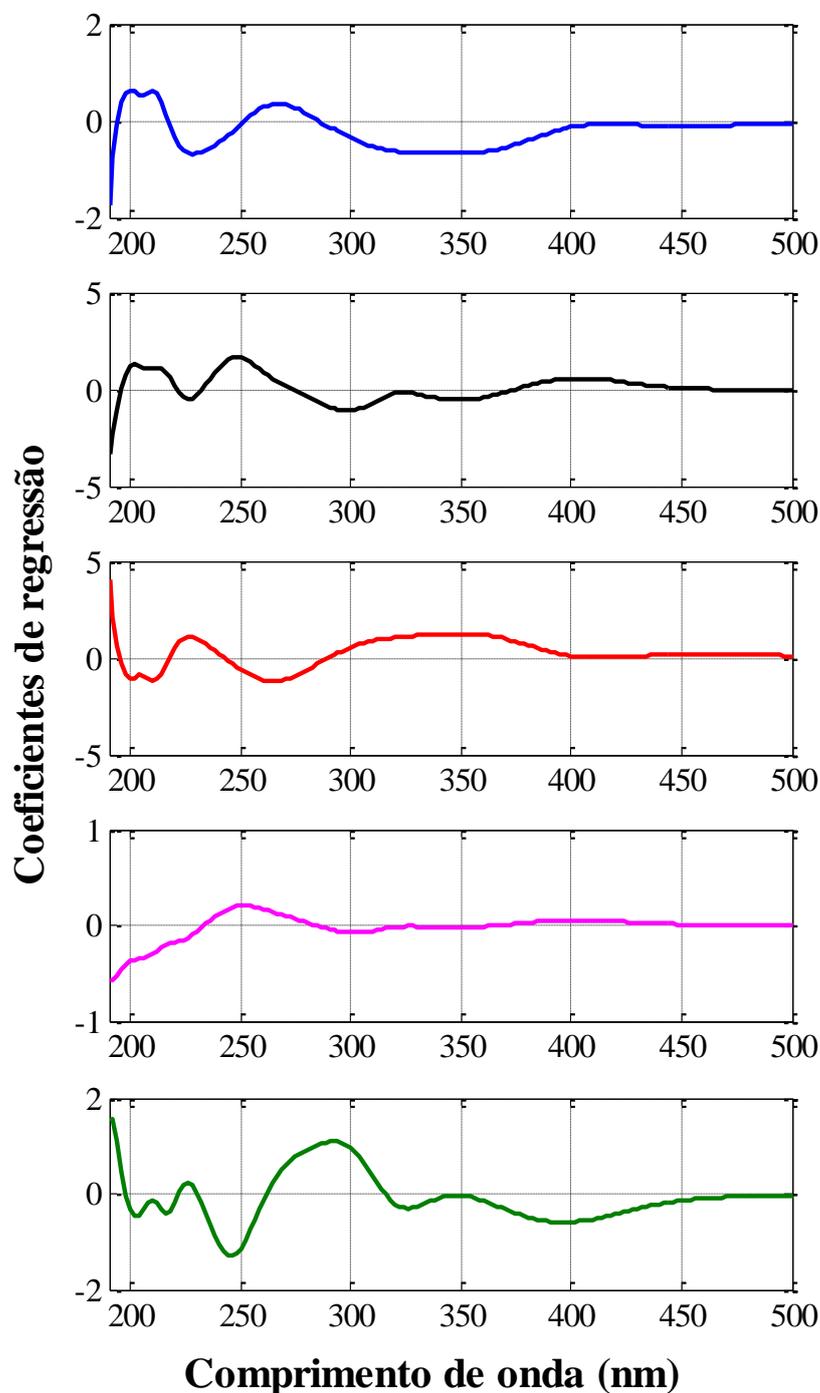


Figura 3. Coeficientes de regressão para o modelo PLS-DA UV-Vis para a classificação de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras: amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—) e umburana (—).

Através da análise destes coeficientes, foi possível identificar os comprimentos de onda que mais contribuem para a classificação. A atribuição destes comprimentos de onda específicos aos marcadores encontrados em cachaças envelhecidas é difícil, considerando-se que a técnica de espectrofotometria UV-Vis não é comumente usada para *fingerprint*. No entanto, soluções estoque de oito compostos fenólicos e a cumarina, reconhecidamente marcadores químicos do envelhecimento de bebidas em madeiras, foram preparadas em solução etanol:água (40:60%) na concentração de 10,00 mg L⁻¹ e analisadas. Na Figura 4 podem ser vistos os espectros UV-Vis obtidos.

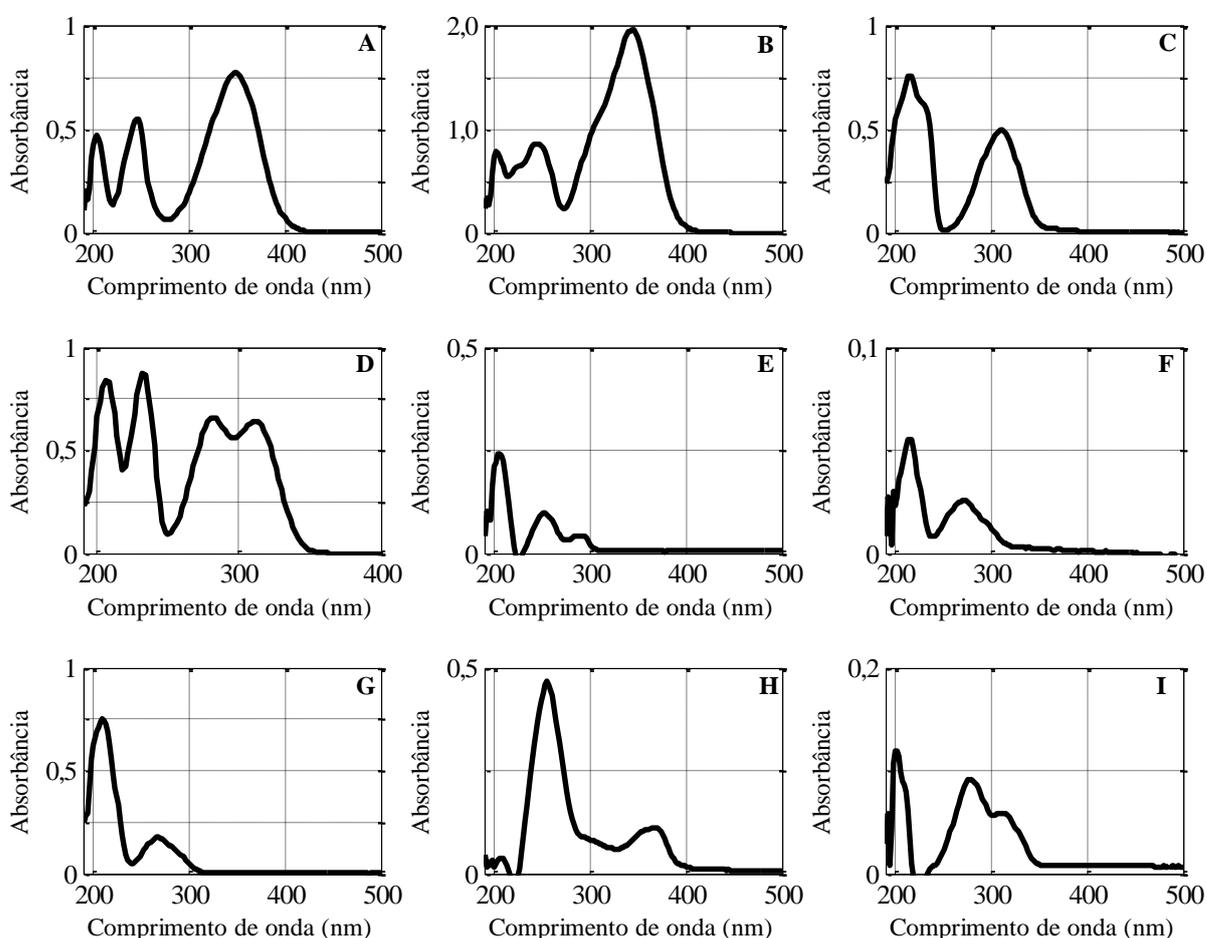


Figura 4. Espectros UV-Vis de soluções estoque 10,00 mg L⁻¹ de compostos marcadores do envelhecimento de bebidas em madeira: (A) sinapaldeído, (B) coniferaldeído, (C) siringaldeído, (D) vanilina, (E) ácido vanílico, (F) ácido gálico, (G) ácido siríngico, (H) ácido elágico, (I) cumarina.

Assim, os seguintes coeficientes de regressão puderam ser atribuídos: ácido siríngico (210 nm) contribuiu positivamente para a classificação das amostras de amendoim e o sinapaldeído (350 nm) contribuiu negativamente; ácido gálico (214 nm) e sinapaldeído

(248 nm) tiveram uma contribuição positiva para a classificação de amostras de bálsamo; para a classificação de amostras de carvalho o sinapaldeído (350 nm) teve uma contribuição positiva e cumarina (200 nm) e ácido siríngico (210 nm) tiveram contribuição negativa; coniferaldeído (250 nm) teve uma contribuição positiva para a classificação de amostras de jequitibá e, finalmente, para a classificação de amostras de umburana, ácido vanílico (292 nm) teve uma contribuição positiva e sinapaldeído (246 nm) teve uma contribuição negativa.

Após o desenvolvimento do modelo, foram estimadas as taxas de sensibilidade, seletividade e confiabilidade para os conjuntos de treinamento e de teste e os resultados estão listados nas Tabelas 2 e 3. Analisando-se estes resultados vê-se que as taxas de confiabilidade variaram entre 51% e 76% para os conjuntos de treinamento e de 45% a 89% para os conjuntos de teste. Silva e co-autores, também usando espectros de UV-Vis e o método LDA obtiveram precisão entre 80 e 100% na classificação de cachaças envelhecidas [20]. Tais resultados são melhores que os obtidos nesta aplicação e, acredita-se que este fato possa ser atribuído à menor variabilidade amostral, pois todas as 50 amostras analisadas por eles tinham garantia do envelhecimento em madeira por um período de um ano. Convém reforçar que as 109 amostras utilizadas no presente estudo foram compradas no comércio local, portanto, sem garantia da madeira utilizada, uma vez que foram usadas as informações presentes no rótulo. Como as amostras são rotuladas como "armazenadas", não se tem garantia do envelhecimento. Além disso o tempo de envelhecimento também variou bastante nestas 109 amostras (6 meses a 10 anos). Assim, buscando-se por resultados mais satisfatórios para este conjunto amostral, um novo modelo de classificação foi construído usando EEM.

Tabela 2. Taxas de sensibilidade (TSB) e seletividade (TST) para os vários modelos quimiométricos para a classificação de cachaças comerciais envelhecidas.

Modelos	AMENDOIM				BÁLSAMO				CARVALHO				JEQUITIBÁ				UMBURANA			
	Conjunto Treinamento		Conjunto Teste		Conjunto Treinamento		Conjunto Teste		Conjunto Treinamento		Conjunto Teste		Conjunto Treinamento		Conjunto Teste		Conjunto Treinamento		Conjunto Teste	
	TSB	TST	TSB	TST																
UV-Vis PLS-DA	71	90	57	88	60	95	56	97	81	83	75	97	88	63	100	57	86	90	89	100
NPLS-DA	73	78	43	86	76	65	100	61	80	71	87	65	59	85	55	88	88	85	100	91
λ_{exc} 250 nm	75	86	29	94	82	77	67	79	87	57	50	59	50	85	33	94	94	87	100	67
λ_{exc} 260 nm	67	91	0	97	88	89	56	91	6	98	0	100	60	93	33	97	94	88	100	69
λ_{exc} 330 nm	75	78	71	86	87	90	89	100	81	97	100	94	69	80	78	85	94	75	100	76
λ_{exc} 340 nm	57	76	71	77	71	95	100	100	75	92	63	91	94	38	89	46	88	62	100	67
λ_{exc} 380 nm	73	41	100	46	69	68	89	76	67	83	100	85	94	36	100	39	94	48	100	49
Fusão λ_{exc} (250+260+330+ 340+380 nm)	54	86	33	91	82	97	67	97	94	95	100	100	53	88	67	94	100	95	100	97
Fusão UV-Vis + λ_{exc} (250+260+330+ 340+380 nm)	100	83	71	83	88	88	100	97	80	66	75	71	88	73	89	76	100	100	89	97

Tabela 3. Taxas de confiabilidade para os vários modelos obtidos para a classificação de cachaças comerciais envelhecidas em diferentes madeiras (os melhores resultados estão em *itálico*).

Modelos	TAXAS DE CONFIABILIDADE (%)									
	AMENDOIM		BÁLSAMO		CARVALHO		JEQUITIBÁ		UMBURANA	
	Treinamento	Teste	Treinamento	Teste	Treinamento	Teste	Treinamento	Teste	Treinamento	Teste
UV-Vis	61	45	55	53	64	72	51	57	76	89
NPLS-DA	51	29	41	61	51	52	44	43	73	91
λ_{exc} 250 nm	61	23	59	46	44	9	35	27	81	67
λ_{exc} 260 nm	58	0	77	47	4	0	53	30	82	69
λ_{exc} 330 nm	53	57	77	89	78	94	49	63	69	76
λ_{exc} 340 nm	33	48	66	100	67	54	32	35	50	67
λ_{exc} 380 nm	14	46	37	65	50	85	30	39	42	49
Fusão λ_{exc} (250+260+330+340+380 nm)	40	24	79	64	89	100	41	61	95	97
Fusão UV-Vis + λ_{exc} (250+260+330+340+380 nm)	83	54	76	97	46	46	61	65	100	86

4.3.2. Modelo NPLS-DA com EEM

Mapas de contorno das superfícies de fluorescência típicas para as cachaças envelhecidas analisadas são mostrados na Figura 5. Os fluoróforos presentes em cachaças envelhecidas são originados principalmente da oxidação da lignina na presença de álcool, o que leva à formação de aldeídos fenólicos que posteriormente são oxidados aos seus ácidos fenólicos [117].

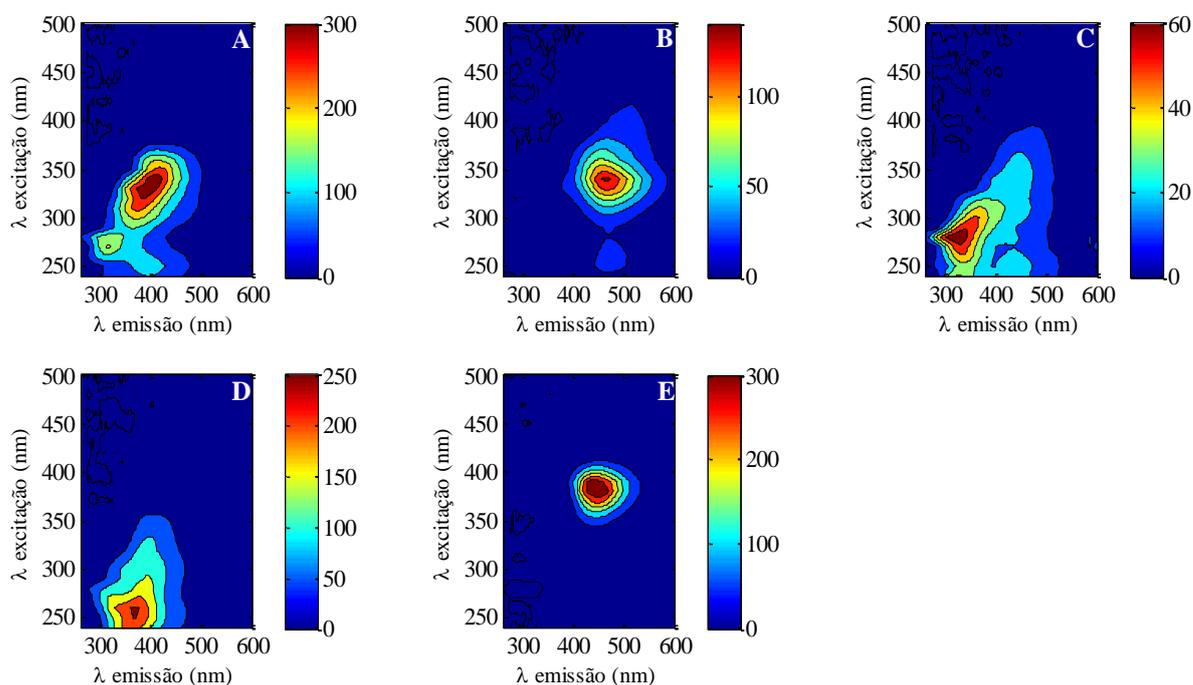


Figura 5. Mapas de contorno das superfícies de fluorescência típicas para cachaças envelhecidas em diferentes madeiras: (A) amendoim, (B) bálsamo, (C) carvalho, (D) jequitibá e (E) umburana.

Assim, como relatado na seção anterior, soluções estoque de oito compostos fenólicos e cumarina foram preparadas em solução etanol: água (40:60%) e analisadas sob as mesmas condições descritas para as amostras, na concentração de $10,00 \text{ mg L}^{-1}$. Os mapas de contorno das superfícies de fluorescência para estes compostos podem ser vistos na Figura 6. Verifica-se que os ácidos fenólicos (gálico, siríngico, vanílico, elágico) e a cumarina foram caracterizados pela sua máxima excitação a 250 nm e emissão a 300 nm e os aldeídos fenólicos (sinapaldeído, coniferaldeído, siringaldeído, vanilina) apresentaram máximo de excitação a 350 nm e de emissão entre 400 e 450 nm.

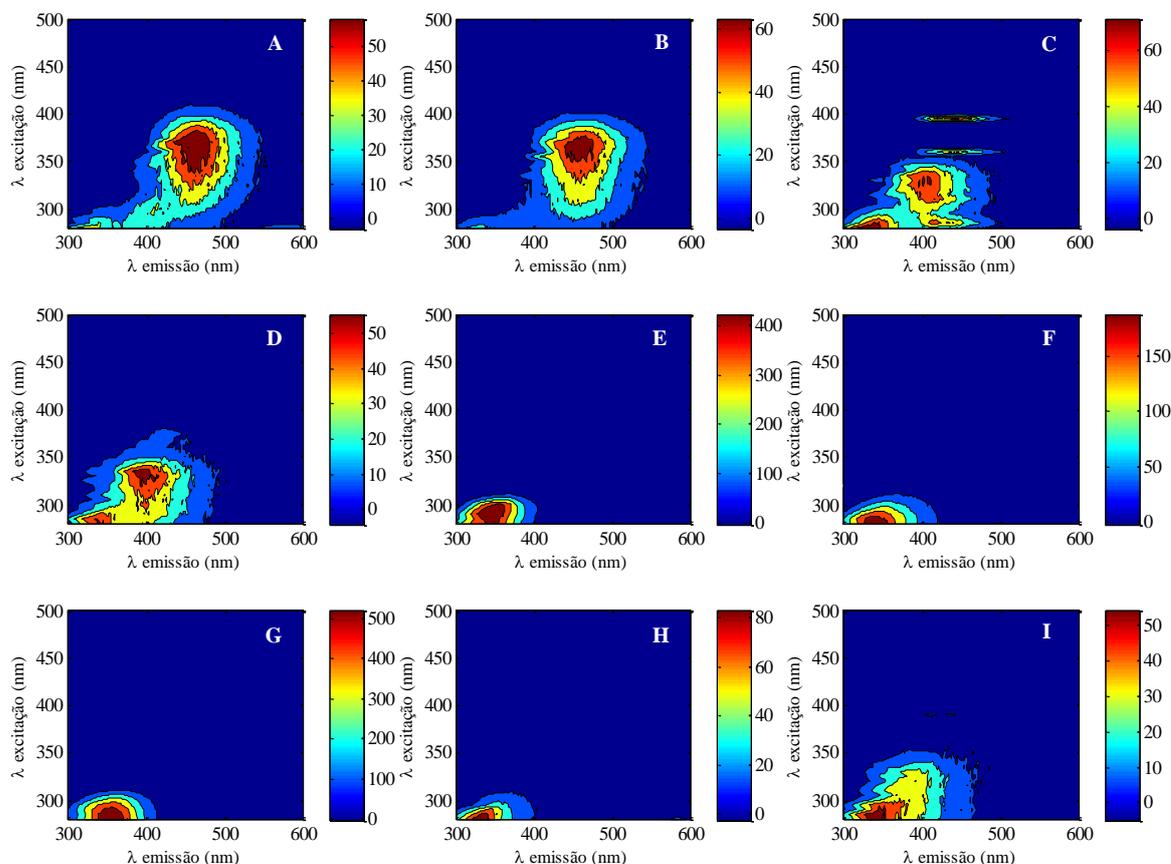


Figura 6. Mapas de contorno das superfícies de fluorescência dos marcadores químicos de envelhecimento de bebidas em madeira: (A) sinapaldeído, (B) coniferaldeído, (C) siringaldeído, (D) vanilina, (E) ácido vanílico, (F) ácido gálico, (G) ácido siríngico, (H) ácido elágico e (I) cumarina.

O modelo NPLS-DA obtido foi NPLS2-DA, ou seja, todas as classes foram previstas através de um único modelo. A matriz tridimensional gerada foi 124 x 171 x 27 (amostras x $\lambda_{\text{emissão}}$ x $\lambda_{\text{excitação}}$). A matriz foi pré-processada para remover os espalhamentos Rayleigh e Raman [118] e os modelos foram obtidos após a primeira dimensão do cubo de dados ser centrada na média.

Os conjuntos de treinamento e teste foram construídos com o mesmo número de amostras que o do modelo PLS-DA UV-Vis e para selecionar as amostras utilizando o algoritmo de Kennard-Stone, o cubo de dados foi desdobrado (comprimentos de onda de excitação x comprimentos de onda de emissão) e após a separação dos conjuntos, as matrizes foram reorganizadas em um arranjo cúbico.

O modelo final foi construído com três VL, indicadas pela validação cruzada por blocos subconjuntos aleatórios, que responderam por 82% e 20% da variância em X e Y, respectivamente, após a remoção de cinco amostras (quatro amostras de amendoim e uma

amostra de carvalho). Os critérios para remoção de amostras anômalas foram os mesmos que os descritos para o modelo PLS-DA UV-Vis.

Os coeficientes de regressão do modelo NPLS-DA para a classificação de cachaças envelhecidas são mostrados na Figura 7. Analisando estes coeficientes de regressão foi possível identificar os comprimentos de onda que mais contribuíram para a classificação de cada classe: para as amostras envelhecidas em amendoim, comprimentos de onda de excitação de 260 e 380 nm com emissões em 340 e 450 nm, respectivamente; para as amostras envelhecidas em bálsamo comprimentos de onda de excitação de 325 e 380 nm com emissões ambas em 480 nm; os comprimentos de onda de excitação de 340 e 380 nm com emissões em 480 e 440 nm, respectivamente, contribuíram para a classificação das amostras de carvalho; já para as amostras envelhecidas em jequitibá, os comprimentos de onda de excitação de 260 e 350 nm com emissões em 350 e 480 nm, respectivamente foram os que mais contribuíram; finalmente, para as amostras envelhecidas em umburana os comprimentos de onda de excitação de 240, 325 e 380 nm com emissões em 425, 480 e 425 nm respectivamente tiveram maior contribuição.

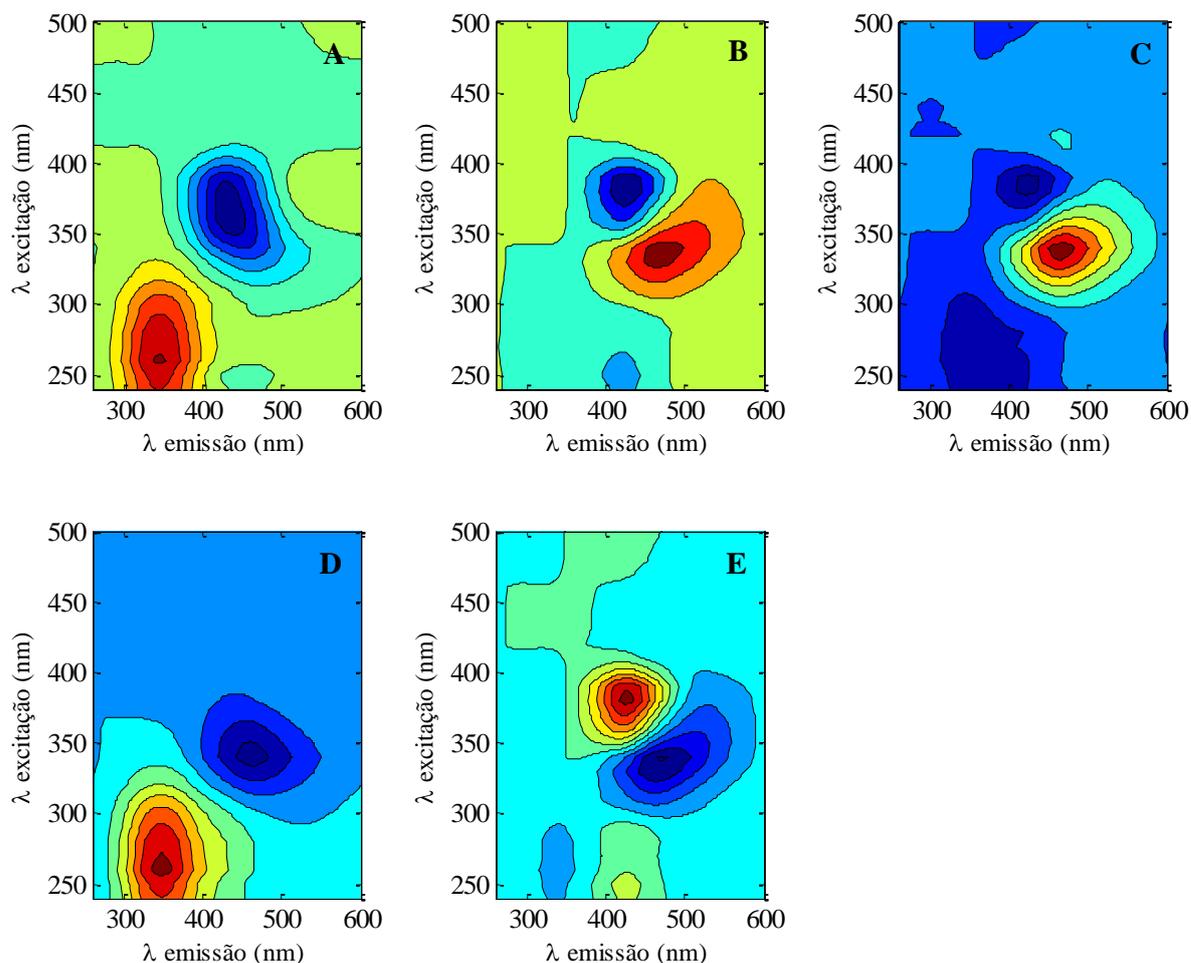


Figura 7. Coeficientes de regressão para o modelo NPLS-DA para a classificação de cachaças envelhecidas em diferentes madeiras: (A) amendoim, (B) bálsamo, (C) carvalho, (D) jequitibá e (E) umburana.

Como descrito anteriormente nesta seção, a maioria destes comprimentos de onda de excitação e emissão são característicos de aldeídos e ácidos fenólicos, que são os marcadores químicos de bebidas envelhecidas em madeira. Analisando os resultados apresentados na Tabela 3, vê-se que as taxas de confiabilidade variaram entre 41% e 73% para os conjuntos de treinamento e entre 29% e 91% para os conjuntos de teste. De modo geral, os resultados foram piores quando comparados com os obtidos a partir do modelo PLS-DA UV-Vis, apesar do modelo NPLS-DA usar uma quantidade maior de dados (uma EEM para cada amostra) e a técnica espectrofluorimétrica ser mais sensível e seletiva que a espectrofotometria UV-Vis.

4.3.3. Modelo PLS-DA com Fusão de Dados

Por causa das vantagens da espectrofluorimetria e dos bons resultados obtidos com a espectrofotometria UV-Vis, concatenou-se estes dois tipos de dados para a construção de um modelo que poderá classificar corretamente o maior número de amostras com boas taxas de confiabilidade: o modelo PLS-DA com fusão de dados. A Figura 9 mostra um fluxograma da fusão de dados de baixo nível, que foi utilizada nesta aplicação.

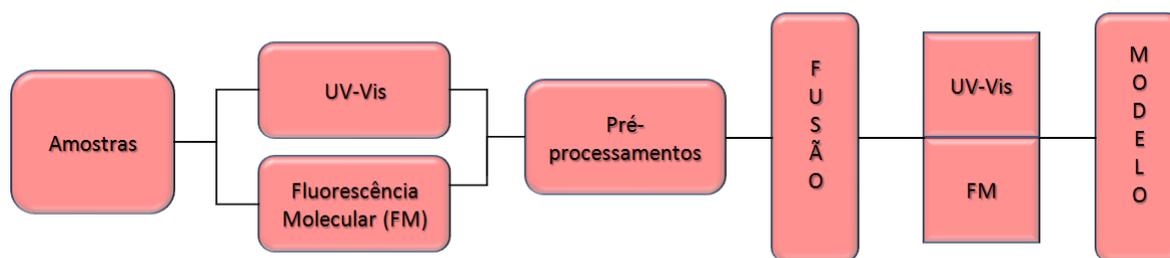


Figura 8. Fluxograma de fusão de dados de baixo nível.

A matriz de dados aumentada formada pela fusão dos espectros UV-Vis com os espectros de emissão de fluorescência nos seguintes comprimentos de onda de excitação: 250, 260, 330, 340 e 380 nm, totalizando 975 variáveis (124 x 975), foi auto-escalada para dar pesos iguais para os espectros obtidos a partir das técnicas de diferentes naturezas. A escolha dos comprimentos de onda de excitação foi baseada na análise dos coeficientes de regressão do modelo NPLS-DA. Na Figura 9, os dois conjuntos de dados espectrais foram representados graficamente antes de serem fundidos em um só. Para melhor visualização dos perfis espectrais, as bandas de emissão foram normalizadas para terem a mesma escala de intensidade dos espectros UV-Vis. O eixo y não possui unidade de medida, tendo em vista que os espectros provêm de duas diferentes técnicas analíticas.

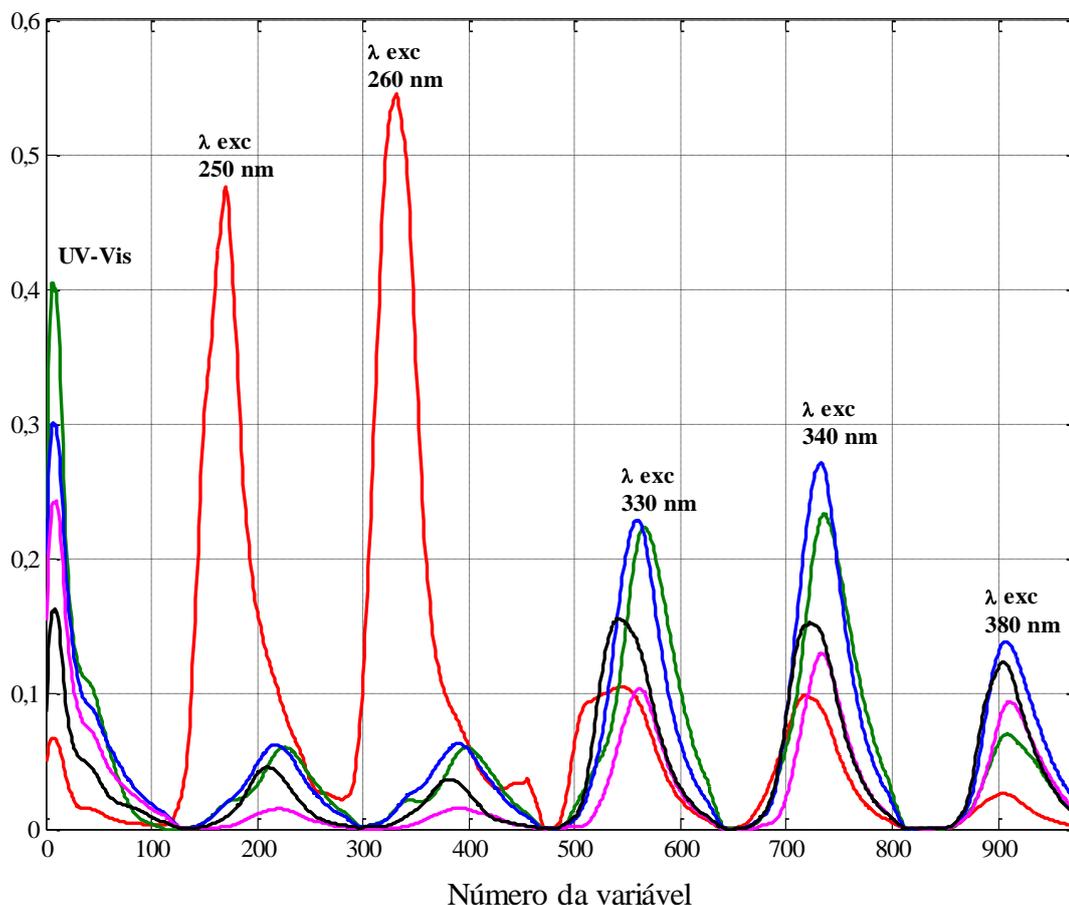


Figura 9. Matriz obtida da concatenação dos espectros UV-Vis com os espectros de emissão de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação de 250, 260, 330, 340 e 380 nm. Perfis espectrais típicos para cachaças envelhecidas em: amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—) e umburana (—).

Mais uma vez os modelos gerados foram PLS2-DA e as matrizes fundidas também foram pré-processadas: os dados foram centrados na média, alisados com o método de Savitsky-Golay e corrigidas com OSC. Os conjuntos de treinamento e de teste foram construídos com o mesmo número de amostras que os modelos anteriores, usando o algoritmo de Kennard-Stone.

O melhor modelo foi construído com quatro VL, indicadas pela validação cruzada por subconjuntos aleatórios. Estas VL explicaram 82% e 46% da variância em \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente, após a remoção de cinco amostras anômalas (duas amostras de amendoim, uma amostra de carvalho e duas amostras de umburana). Os critérios para a remoção dessas amostras foram os mesmos que os descritos para os modelos anteriores - avaliação de gráficos de resíduos versus T^2 de Hotelling.

Os coeficientes de regressão do modelo PLS-DA com os dados fundidos (UV-Vis + $\lambda_{s_{exc}}$: 250 + 260 + 330 + 340 + 360 nm) para a classificação de cachaças envelhecidas estão apresentados na Figura 10. A partir da observação destes coeficientes de regressão vê-se que, com exceção da classe de amostras envelhecidas em carvalho, todas as outras classes usaram praticamente toda a informação disponível para a classificação correta, ou seja, tanto os espectros UV-Vis como os espectros de emissão em diferentes comprimentos de onda de excitação, o que corrobora a escolha da fusão de dados.

Além da observação dos coeficientes de regressão, as taxas de confiabilidade observadas na Tabela 3 mostram que os melhores modelos foram obtidos com os dados do modelo de fusão (UV-Vis + $\lambda_{s_{exc}}$). Para todas as classes, este modelo apresentou as melhores taxas de confiabilidade para os conjuntos de treinamento e de teste, com exceção da classe das amostras envelhecidas em carvalho. Dentre as classes corretamente classificadas, a classe das amostras envelhecidas em jequitibá foi aquela que apresentou as piores taxas de confiabilidade. Isto pode ser um indicativo de que os produtores fazem mais *blends* com este tipo de madeira.

Com o objetivo de comprovar a eficácia da fusão de dados para a classificação de cachaças envelhecidas, um modelo PLS-DA foi obtido apenas com os espectros de emissão fundidos (250 + 260 + 330 + 340 + 380 nm). As taxas de confiabilidade encontradas foram significativamente mais baixas do que aquelas do modelo de fusão UV-Vis + $\lambda_{s_{exc}}$. Isto mais uma vez corrobora para a escolha da fusão de dados provenientes das duas técnicas analíticas. No entanto este modelo foi aquele que gerou as melhores taxas de confiabilidade para a classe das amostras envelhecidas em carvalho.

Além deste modelo, também foram obtidos modelos PLS-DA com os espectros de emissão para cada comprimento de onda de excitação usado na fusão de dados. Todos os modelos obtidos apresentaram taxas de confiabilidade inferiores às obtidas nos modelos com fusão de dados, assim pode-se garantir que é a fusão entre os sinais analíticos das duas técnicas que promove a melhor classificação para quatro das cinco classes analisadas.

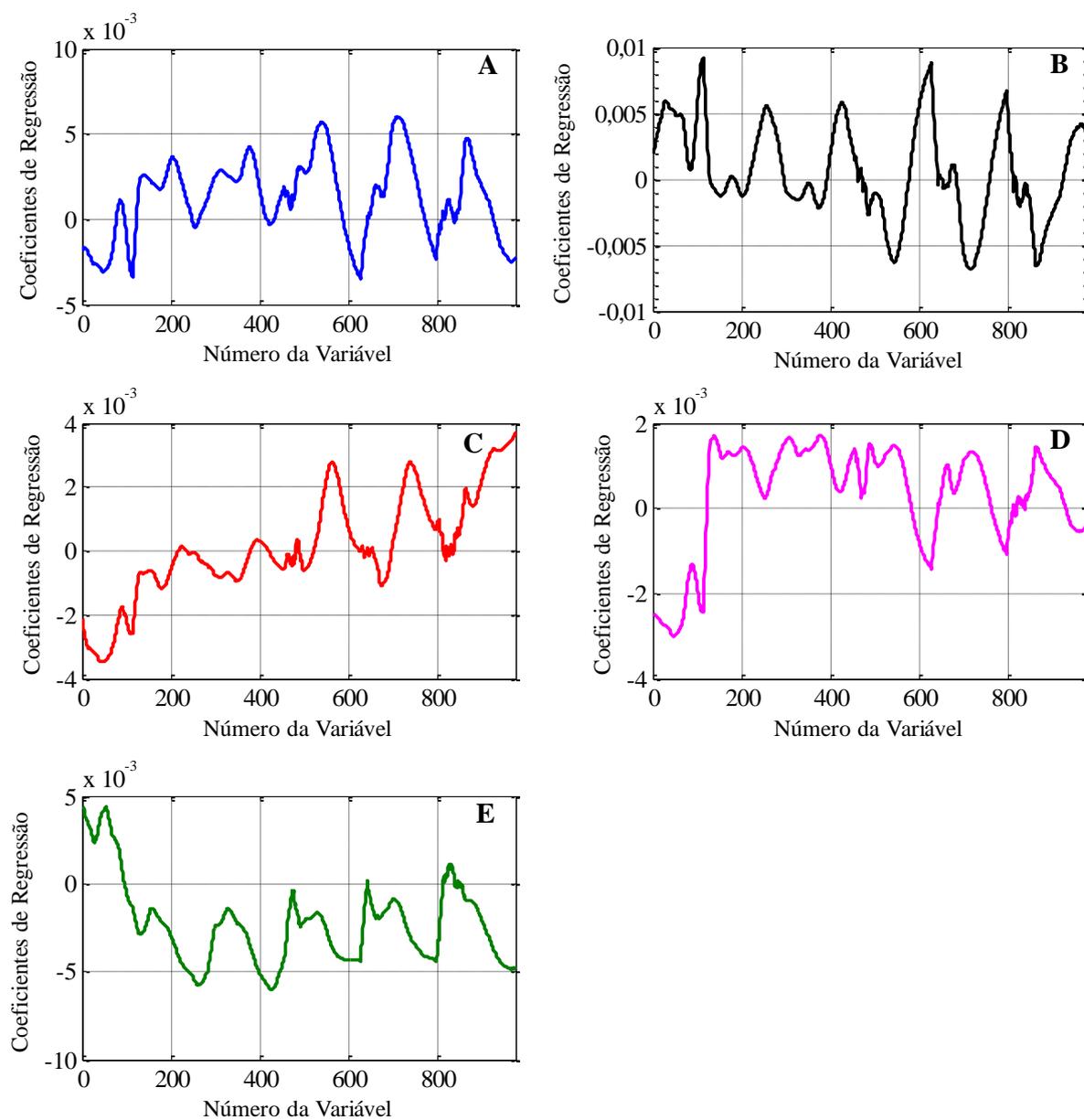


Figura 10. Coeficientes de regressão do modelo PLS-DA com a fusão de UV-Vis + λ_{exc} (250 + 260 + 330 + 340 + 380 nm): amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—) e umburana (—).

4.4. Conclusão

A fusão de espectros UV-Vis e de emissão de fluorescência em combinação com o método de classificação supervisionada PLS-DA resultou em modelos adequados para a previsão da madeira utilizada no envelhecimento de cachaças comerciais.

A principal vantagem dos métodos de fusão de dados é que eles sempre fornecem os modelos com as maiores taxas de confiabilidade. Este fato permite que estes modelos sejam utilizados para análises de rotina, facilitando o controle de qualidade da bebida e sua fiscalização pelos órgãos de inspeção no combate à fraudes.

Capítulo 5

Desenvolvimento de um modelo PLS para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas

5. Desenvolvimento de um modelo PLS para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas

5.1. Introdução

Uma série de estudos tem mostrado que os compostos fenólicos encontrados em cachaças envelhecidas, incluindo aquelas envelhecidas em madeiras brasileiras, são os mesmos encontrados em uísques envelhecidos em barris de carvalho [15-17, 60, 73]. Inicialmente, a lignina em contato com o álcool se oxida, produzindo os aldeídos fenólicos (siringaldeído, sinapaldeído, vanilina, coniferaldeído). Posteriormente, estes aldeídos fenólicos se oxidam nos seus ácidos (ácido sirínico, ácido sinápico, ácido vanílico, ácido ferúlico) [117]. Naturalmente, a concentração de cada um destes compostos em cachaças depende do tempo de envelhecimento e das condições do clima e do barril durante o processo.

De acordo com a legislação brasileira, para comprovar que a cachaça foi envelhecida os compostos fenólicos provenientes do envelhecimento devem ser detectados [1] e os métodos analíticos comumente utilizados para esta determinação são o Folin-Ciocalteu (FC) e a HPLC [18, 19, 60, 119, 120]. O primeiro é mais comum, pois é um método espectrofotométrico [121].

O método FC requer a preparação de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de um composto fenólico (mais comumente o ácido gálico) para a posterior quantificação do teor total de fenólicos nas amostras. O preparo desta curva requer tempo e consumo de reagentes, uma vez que deve ter números de níveis e replicatas adequados para a finalidade a que se destina. Além disso, o tempo de reação entre a amostra e o reagente de Folin é de 30 minutos para só depois ocorrer a análise espectrofotométrica. Já o método cromatográfico é mais adequado para a quantificação de compostos fenólicos específicos, mas exige mais tempo, um grande volume de solventes e um operador qualificado, o que torna difícil a sua utilização em análises de rotina.

Como já destacado na aplicação anterior, o consumo interno de cachaça de qualidade e sua demanda pelo mercado externo vem crescendo acentuadamente nos últimos anos, sendo necessário o desenvolvimento de métodos mais rápidos para discriminar a bebida verdadeiramente envelhecida. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método simples, rápido e limpo para a determinação direta do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas em diferentes madeiras, utilizando o espectro UV-Vis das amostras diluídas e o

método PLS. Estas amostras também foram analisadas pelo método de FC para a obtenção dos valores de referência. O método proposto foi validado pela estimativa de figuras de mérito, tais como sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade, precisão, limites de detecção e quantificação, relação de desempenho do desvio e razão de intervalo de erro.

5.2. Parte experimental

5.2.1. Instrumentação e processamento dos dados

Os espectros foram registrados em um espectrofotômetro de arranjo de diodos modelo HP 8451 A, usando uma cubeta de quartzo de 10 mm na faixa de 190 a 500 nm (incrementos de 2 nm).

Os dados foram analisados utilizando-se o software MATLAB, versão 7.9 (The Math Works, Natick, MA, EUA) e o PLS Toolbox, versão 6.5 (Eigenvector Technologies, Manson, WA, EUA) e uma rotina para a detecção de amostras anômalas também foi utilizada [81].

5.2.2. Materiais e amostras

Uma solução etanol: água (40:60% v/v) foi preparada com etanol 99% (Synth) e água deionizada. O reagente de FC foi obtido comercialmente (Imbralab). Uma solução de carbonato de sódio (Sigma-Aldrich) 20% (m/v) foi utilizada como tampão e padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich) foi usado para a determinação de compostos fenólicos totais. A solução estoque foi preparada com água deionizada no mesmo dia em que as experiências foram realizadas e foi mantida sempre sob proteção da luz.

Foram analisadas 103 amostras de cachaças envelhecidas (provenientes de seis estados diferentes): 20 amostras de barris de amendoim; 23 de bálsamo; 21 de carvalho; 23 de jequitibá, 23 de umburana e três amostras são *blends* de bálsamo, carvalho e jequitibá. O Anexo I contém um mapa com a localização geográfica de todas as amostras utilizadas nesta tese e o Anexo III contém uma tabela com informações sobre as 103 amostras utilizadas nesta aplicação.

5.2.3. Procedimentos

As amostras foram diluídas 30 vezes com água deionizada na própria cubeta e analisadas em triplicata. O branco analítico utilizado foi a solução etanol:água. Para o método FC, 1,00 mL de cada amostra foi misturado com 0,20 mL do reagente de FC num balão volumétrico de 10,00 mL e deixado em repouso durante 8 minutos. Posteriormente, foram adicionados 0,40 mL do tampão e o volume do balão foi preenchido com água deionizada. Após 30 minutos, a absorbância foi medida a 760 nm. O procedimento para a obtenção da curva analítica foi o mesmo descrito acima, mas, substituindo a amostra, concentrações conhecidas de uma solução de ácido gálico foram colocadas nos balões. Todas as análises foram realizadas em triplicata e o branco analítico foi uma solução contendo todos os reagentes, exceto o ácido gálico ou a amostra.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Método de referência

Geralmente o método FC apresenta problemas relacionados com a sua harmonização: para a mesma matriz, diferentes autores usaram procedimentos diferentes, variando as quantidades dos reagentes utilizados, o tempo de espera para realizar a análise e mesmo o comprimento de onda ótimo para a medição espectrofotométrica [18, 19, 60, 119, 120]. Devido a estas divergências, o método FC foi otimizado no nosso laboratório, obtendo-se resultados reprodutíveis e sinal analítico mais elevado, sem ocorrência de precipitação, independentemente da matriz analisada [122]. Apenas a quantidade ideal de amostra foi estudada após a otimização do método, uma vez que ela varia em função da natureza da amostra.

Devido à grande variabilidade de cachaças utilizadas no desenvolvimento do método de referência, duas curvas de calibração foram preparadas com o padrão do ácido gálico: a primeira de 0,10 a 1,00 mg L⁻¹ e a segunda de 1,00 a 9,00 mg L⁻¹. Os parâmetros de regressão das curvas foram estimados por mínimos quadrados ordinários (MQO). Os valores extremos foram formalmente diagnosticados pelo teste dos resíduos padronizados de Jackknife. Este teste foi aplicado, sucessivamente, até que novos valores extremos não fossem detectados ou para uma taxa máxima de exclusão de 22,2% [15, 16]. Testes F foram realizados para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do

desvio da linearidade. A equação para a primeira curva foi $y = (0,127 \pm 0,02) x + (0,002 \pm 0,001)$ e para a segunda foi $y = (0,119 \pm 0,02) x + (0,037 \pm 0,008)$ e o coeficiente de correlação para ambas as curvas foi de 0,998. Desta forma, foi possível quantificar amostras com o teor de fenólicos totais entre 1,00 e 90,00 mg EAG L⁻¹ (mg-equivalentes de ácido gálico por litro). Na Figura 11 vê-se os teores de fenólicos totais determinados para todas as cachaças analisadas.

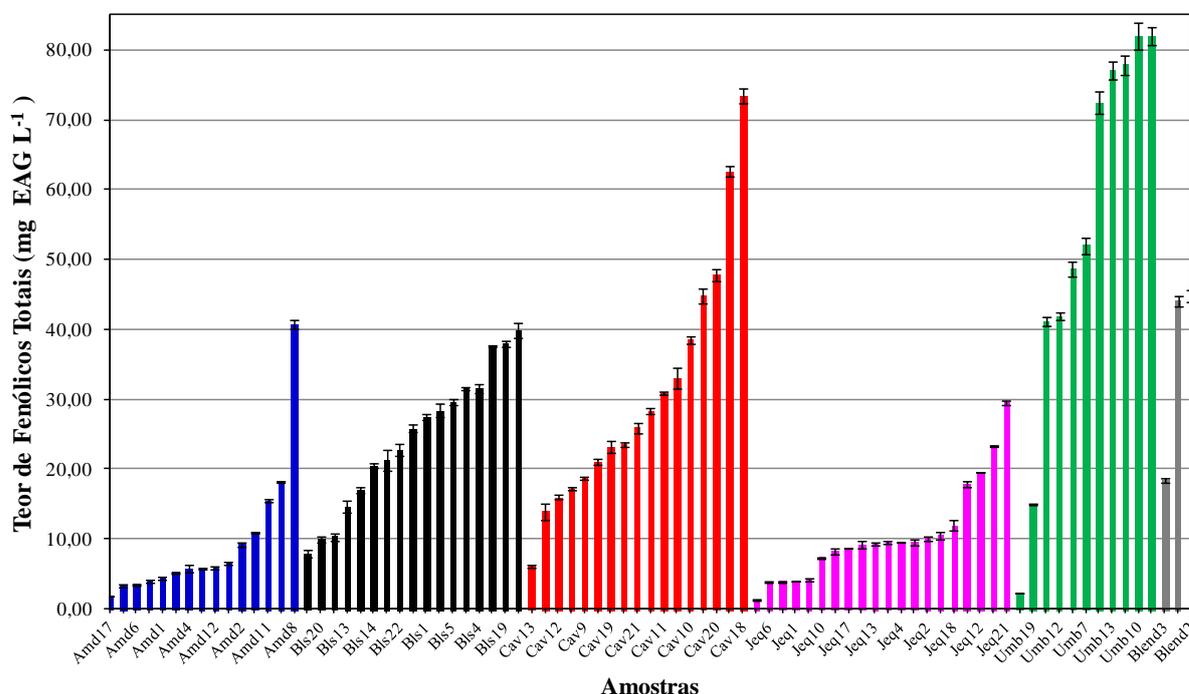


Figura 11. Teor de fenólicos totais determinados para as cachaças envelhecidas analisadas: amendoim (—), bálsamo (—), carvalho (—), jequitibá (—), umburana (—) e blend (—).

5.3.2. Desenvolvimento do modelo PLS

Os espectros UV-Vis típicos para as cachaças envelhecidas analisadas são mostrados na Figura 2 do Capítulo 4 desta tese. A maioria das amostras estudadas apresentam duas bandas de comprimentos de onda característicos, com máximos em 200 nm e entre 250 e 300 nm. Estes comprimentos de onda estão associados com a absorção do grupo benzeno, substituído por grupos hidroxila - grupo substituinte normalmente encontrado em compostos fenólicos presentes em cachaças envelhecidas.

As amostras foram divididas em 69 para o conjunto de calibração e 34 para o conjunto de validação usando o algoritmo de Kennard-Stone. Depois os dados foram centrados na média, alisados com o método Savitsky-Golay (filtro de 15 pontos e polinômio de ordem zero) e corrigidos com OSC (1 componente, 0 iteração e 99,9% de tolerância). Também foram testados modelos com os dados apenas centrados na média e alisados, mas ambos apresentaram resultados menos satisfatórios.

O número de VL em cada modelo foi escolhido com validação cruzada por blocos contínuos (com 10 divisões) e o melhor modelo foi selecionado inicialmente com duas VL. Os coeficientes de regressão do modelo PLS para determinação do teor de compostos fenólicos totais em cachaças são mostrados na Figura 12. Através da análise destes coeficientes de regressão foi possível identificar os comprimentos de onda que mais contribuíram para a previsão do teor de compostos fenólicos totais em cachaças.

Os coeficientes mais importantes foram identificados nos seguintes comprimentos de onda: 203, 210 e 273 nm. A atribuição destes comprimentos de onda específicos aos marcadores encontrados em cachaças envelhecidas é difícil, considerando-se que a técnica de espectrofotometria UV-Vis não é comumente usada para *fingerprint*, mas assim como descrito na aplicação no capítulo anterior, foram preparadas soluções alcoólicas com os padrões de alguns dos principais marcadores de envelhecimento de bebidas na tentativa de conseguir esta atribuição. Estes espectros podem ser vistos na Figura 4, do Capítulo 4. Alguns comprimentos de onda característicos do ácido gálico, ácido vanílico, vanilina e sinapaldeído coincidem com os coeficientes de regressão do modelo.

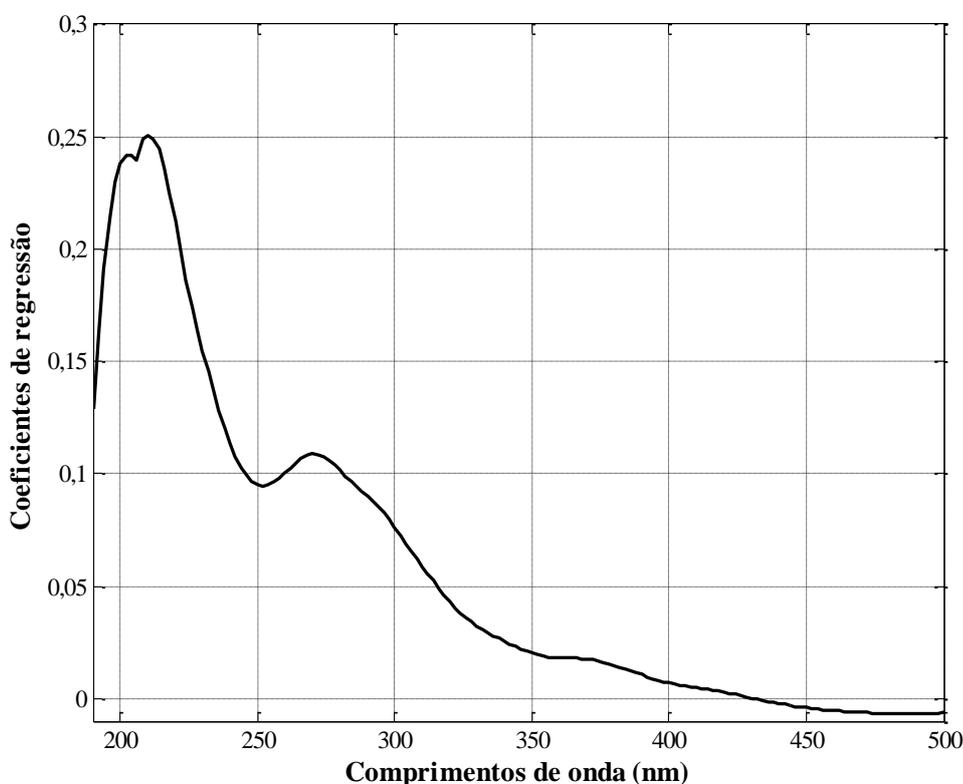


Figura 12. Coeficientes de regressão para o modelo PLS para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas.

5.3.2.1. Otimização dos modelos - detecção de outliers

Após a construção do modelo PLS, este foi otimizado usando o procedimento para a detecção de amostras anômalas, que foram detectadas ao nível de confiança de 95%, e os resultados estão resumidos na Tabela 4. A otimização do conjunto de validação foi realizada somente após a otimização do conjunto de calibração e como pode ser visto nesta tabela, 14 amostras anômalas foram detectadas no conjunto de calibração (correspondendo a 20,3% das amostras). Destas amostras anômalas detectadas *no* conjunto de calibração, quatro amostras apresentaram altos resíduos no bloco **X**, o que pode ser explicado por problemas durante a obtenção destes espectros. Oito amostras apresentaram altos resíduos no bloco **Y**, provavelmente devido ao método de referência e duas amostras apresentaram alto *leverage*, provavelmente devido à sua composição extrema.

As amostras anômalas do conjunto de validação foram formalmente diagnosticados pelo teste dos resíduos padronizados de Jackknife e seis amostras foram detectadas (correspondente a 17,6% das amostras). Portanto, o modelo PLS otimizado para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças foi construído com 55 amostras de

calibração e 28 de validação, usando duas VL, que foram responsáveis por explicar 99,05% da variância em **X** e 96,86% em **Y**.

Tabela 4. Otimização do modelo PLS através da detecção de amostras anômalas (resultados finais em *itálico*)

Modelo	1°	2°	3°
Amostras de calibração	69	61	<i>55</i>
Amostras de validação	34	34	28
Número de VL	2	3	2
RMSEC (mg EAG L ⁻¹)	8,66	5,17	<i>3,81</i>
RMSEP (mg EAG L ⁻¹)	5,34	5,32	<i>4,11</i>
Variância Explicada			
X (%)	96,58	98,90	<i>99,05</i>
Y (%)	85,15	94,78	<i>96,86</i>

5.3.2.2. Figuras de Mérito

A Tabela 5 apresenta as figuras de mérito calculadas para o modelo proposto. Nas subseções seguintes cada uma delas será discutida especificamente.

Tabela 5. Figuras de mérito estimadas para o método PLS para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas

Figura de Mérito	Parâmetro	Valor
Veracidade	RMSECV	4,79 mg EAG L ⁻¹
	RMSEC	3,81 mg EAG L ⁻¹
	RMSEP	4,11 mg EAG L ⁻¹
Precisão	Repetitividade ^a	1,5%
		4,5%
		4,0%
	Precisão Intermediária	7,0%
		9,5%
		8,0%
Faixa de trabalho		0,73 - 82,34 mg EAG L ⁻¹
Seletividade		0,52
Sensibilidade		0,85 ^b
Sensibilidade Analítica (γ)		18,82 (mg EAG L ⁻¹) ⁻¹
	γ^{-1}	0,05 mg EAG L ⁻¹
	LD	0,17 mg EAG L ⁻¹
	LQ	0,53 mg EAG L ⁻¹
	Bias	0,49 ± 2,05 mg EAG L ⁻¹
	RPD _{cal}	4,53
	RPD _{val}	3,43
	RER	17,04

^a Resultados de três amostras em 3 diferentes níveis de concentração.

^b Valor expresso como a razão entre a absorbância e mg EAG L⁻¹.

5.3.2.2.1. Veracidade, precisão e faixa de trabalho

A veracidade do método foi avaliada pelo RMSEP de 4,11 mg EAG L⁻¹ e a precisão através do desvio padrão relativo (DPR). Para o método estes valores variaram entre 1,5 e 4,5%, para o nível de repetitividade e, entre 7,0 e 9,3%, para o nível de precisão intermediária. Os resultados estão de acordo com as orientações europeias [123], que preveem um DPR máximo de 6,6% para a repetitividade e de 10% para a precisão intermediária, considerando-se o nível de concentração do analito ($1 \text{ mg kg}^{-1} \leq c < 10 \text{ mg kg}^{-1}$).

Considerando-se o estudo de precisão, o coeficiente de correlação (r) de um gráfico dos valores de referência versus os valores previstos igual a 0,9842 (Figura 13) e o teste F que demonstrou que a regressão foi altamente significativa ($p < 0,001$), a faixa de trabalho do método foi estabelecida entre 0,73 e 82,34 mg EAG L⁻¹.

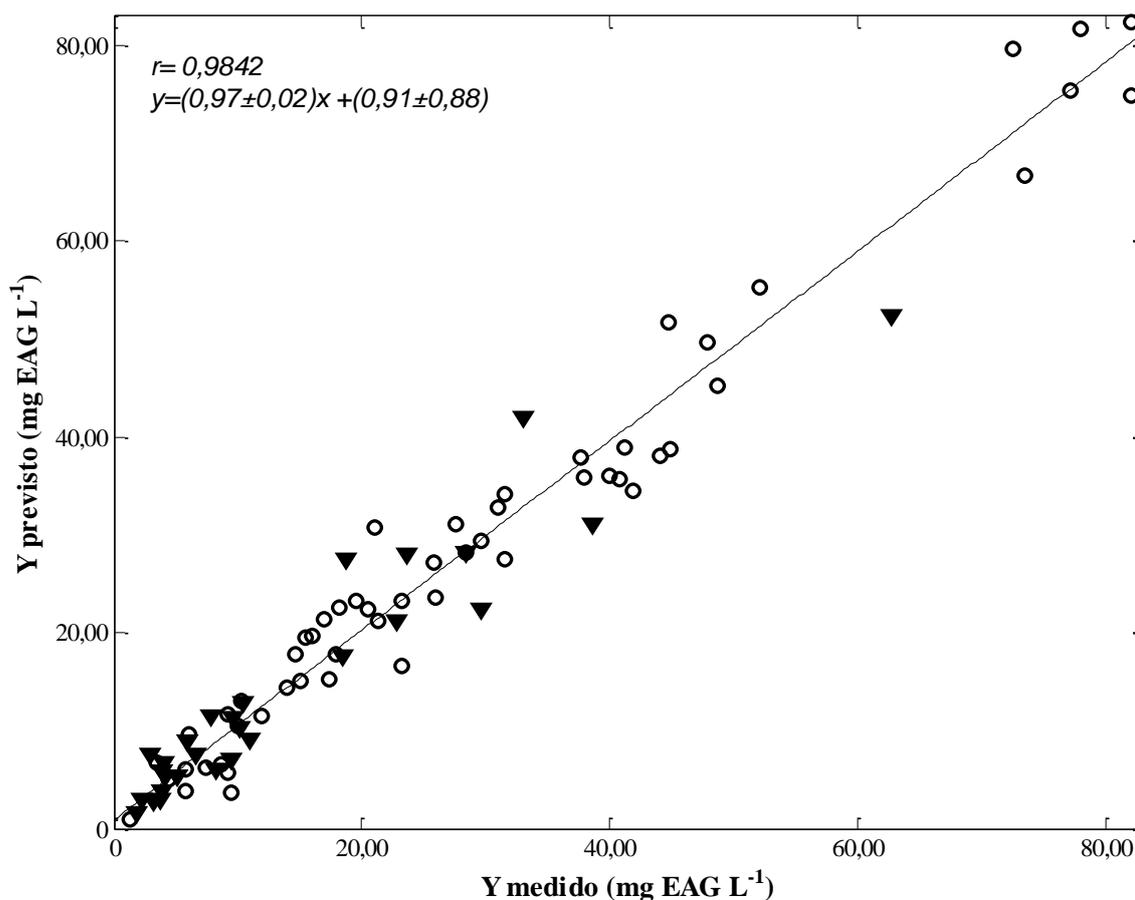


Figura 13. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas, respectivamente: amostras de calibração (○) e amostras de validação (▼).

5.3.2.2.2. Seletividade, sensibilidade, sensibilidade analítica, LD e LQ

O valor de SEL estimada mostrou que 52% do sinal analítico foi utilizado para prever o teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas. Uma vez que a SEN não é adequada para efeitos de comparação com outros métodos, a γ do método também foi calculada com base na estimativa de ε de 0,0056. O inverso da γ indicou que o método é capaz de discriminar a diferença de concentração mínima de $0,05^{-1}$ mg EAG L⁻¹ para cachaças envelhecidas, considerando o ruído instrumental aleatório como a única fonte de erros. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) também foram estimados com base em ε e seus valores foram 0,17 e 0,53 mg de EAG L⁻¹, respectivamente.

5.3.2.2.3. Bias, RPD e RER

Considerando a estimativa do viés mostrada na Tabela 5, um valor de t de 0,49 foi obtido, abaixo do t crítico (2,05), calculado com 27 graus de liberdade (número de amostras de validação) no nível de 95% de confiança. Este resultado indica a ausência de um viés estatisticamente significativo. O valor de RPD calculado para a calibração, 4,53 e para a validação, 3,43, indicam que o modelo é bom e o RER de 17,04 calculado indica que o modelo tem uma alta utilidade prática.

Considerando que a legislação brasileira estabelece que o teor de fenólicos totais deve ser determinado em cachaças envelhecidas, o modelo desenvolvido é de ampla aplicação real. Além disso, todas as figuras de mérito calculadas estão dentro da faixa aceitável, enfatizando que, de acordo com Williams [93] modelos com $R^2 > 0,90$ e $RPD \geq 3,0$ são bem sucedidos, logo, o modelo aqui proposto pode ser considerado como tal.

O teor de fenólicos totais detectados nas cachaças envelhecidas comerciais analisadas variou de: 1,66 a 76,44 mg EAG L⁻¹ para as amostras envelhecidas em amendoim; 8,10 a 60,28 mg EAG L⁻¹ para o bálsamo; 2,63 a 74,34 mg EAG L⁻¹ para o carvalho; 1,22 a 29,98 mg EAG L⁻¹ para o jequitibá; 2,20 a 85,30 mg EAG L⁻¹ para umburana e 18,08 a 45,72 mg EAG L⁻¹ para os *blends*. Estes resultados são consistentes com outros trabalhos publicados e a grande dispersão do conteúdo fenólico determinado para cada classe de madeira pode ser explicado devido à grande variabilidade das amostras: a maioria das amostras são "armazenadas" (ou seja, não há garantia da madeira utilizada no envelhecimento) e seu tempo de envelhecimento variou muito (quando informado, variou de seis meses a seis anos). Além disso, algumas amostras poderiam se tratar de *blends*.

Faria *et al.* determinaram o conteúdo de compostos fenólicos totais em cachaça envelhecida por seis meses em pequenos barris de oito diferentes madeiras brasileiras e carvalho. Neste trabalho, os barris foram submetidos ao processo de queima antes de envelhecimento e os teores encontrados variaram de 8 a 30 mg EAG L⁻¹ [60].

Alcarde *et al.* quantificaram níveis muito mais baixos de compostos fenólicos em cachaças que foram envelhecidas por três anos em barris de 245 L de capacidade confeccionados com diferentes madeiras brasileiras e carvalho. Os níveis variaram de 0,2 a 4,7 mg EAG L⁻¹. Neste trabalho, os autores também encontraram níveis mais elevados em cachaça envelhecida em umburana (4,7 mg EAG L⁻¹) [120].

Anjos *et al.* envelheceram uma cachaça de alambique durante um ano em um barril de carvalho de 200 L e alíquotas foram analisadas a cada mês. O teor de compostos fenólicos não excedeu 16 mg EAG L⁻¹ [19]. Por fim, Cardoso *et al.* e Silva *et al.* usaram serragem de várias madeiras brasileiras e carvalhos de diferentes origens (americano, inglês, francês, escocês, espanhol, polonês). Estas serragens de madeira foram deixadas em contato com uma cachaça industrial durante 26 dias em agitador, acelerando o processo de envelhecimento. Nestes estudos, o conteúdo de compostos fenólicos totais foram muito mais elevados, variando de 128 a 1085 mg EAG L⁻¹ [18, 119].

5.4. Conclusão

De acordo com a legislação brasileira, é necessário provar que a cachaça foi envelhecida em madeira, detectando a presença de compostos fenólicos. O método mais comumente utilizado para quantificar o conteúdo fenólico total é o método de FC. Este método é demorado, consome reagentes e, além disso, gera resíduos. Assim, este trabalho propôs um método direto e mais limpo para a determinação do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas através da análise de espectros UV-Vis de cachaças envelhecidas diluídas e o método de calibração multivariada PLS. O tempo gasto na análise de cada amostra é de cinco minutos no método multivariado proposto contra 40 minutos no método de FC. Resultados satisfatórios foram obtidos em uma faixa ampla de concentração de 0,73 a 82,34 mg EAG L⁻¹. O método foi validado através da estimativa de figuras de mérito multivariadas. Assim, o método proposto é adequado para a determinação rápida do teor de fenólicos totais em cachaças envelhecidas e pode ser uma alternativa para as análises de rotina.

Capítulo 6

Evolução de compostos químicos responsáveis pelo envelhecimento de cachaças armazenadas em diferentes madeiras

6. Evolução de compostos químicos responsáveis pelo envelhecimento de cachaças armazenadas em diferentes madeiras

6.1. Introdução

Os compostos responsáveis pelo sabor, aroma e *flavor* de bebidas alcoólicas envelhecidas são os ácidos fenólicos, os aldeídos fenólicos, os taninos e outros compostos classificados como compostos fenólicos de baixo peso molecular. Muitos deles são utilizados como marcadores ou indicadores do envelhecimento, uma vez que sua presença no destilado comprova que a bebida foi, de fato, envelhecida em tonéis de madeira.

As alterações que ocorrem nos componentes das bebidas destiladas durante o envelhecimento podem ser divididas em sete tipos [124]:

- 1) Extração direta dos componentes das madeiras.
- 2) Decomposição de macromoléculas que compõe a estrutura da madeira (lignina, celulose e hemicelulose) e sua incorporação na bebida.
- 3) Reações dos componentes da madeira com os componentes do destilado não envelhecido.
- 4) Reações envolvendo apenas os materiais extraídos da madeira.
- 5) Reações envolvendo apenas os componentes do destilado.
- 6) Evaporação de compostos de baixo ponto de ebulição através das paredes do barril.
- 7) Formação de clusters estáveis entre moléculas de etanol e água.

Segundo Nishimura *et al.*, a formação de ácidos e aldeídos aromáticos derivados da lignina em bebidas envelhecidas pode dar-se pelos seguintes mecanismos [124]:

- 1) Degradação da lignina pela flambagem ou queima da madeira durante a confecção dos barris.
- 2) Extração de compostos monoméricos presentes na madeira pela bebida.
- 3) Etanólise da lignina, especialmente em meio ácido.
- 4) Transformação de compostos pré-existent na bebida.

Puech propôs um modelo de degradação da lignina, que evidencia a influência do oxigênio na formação dos produtos [117]. A estrutura parcial da lignina pode ser vista na Figura 14 e o modelo proposto por Puech pode ser visto na Figura 15.

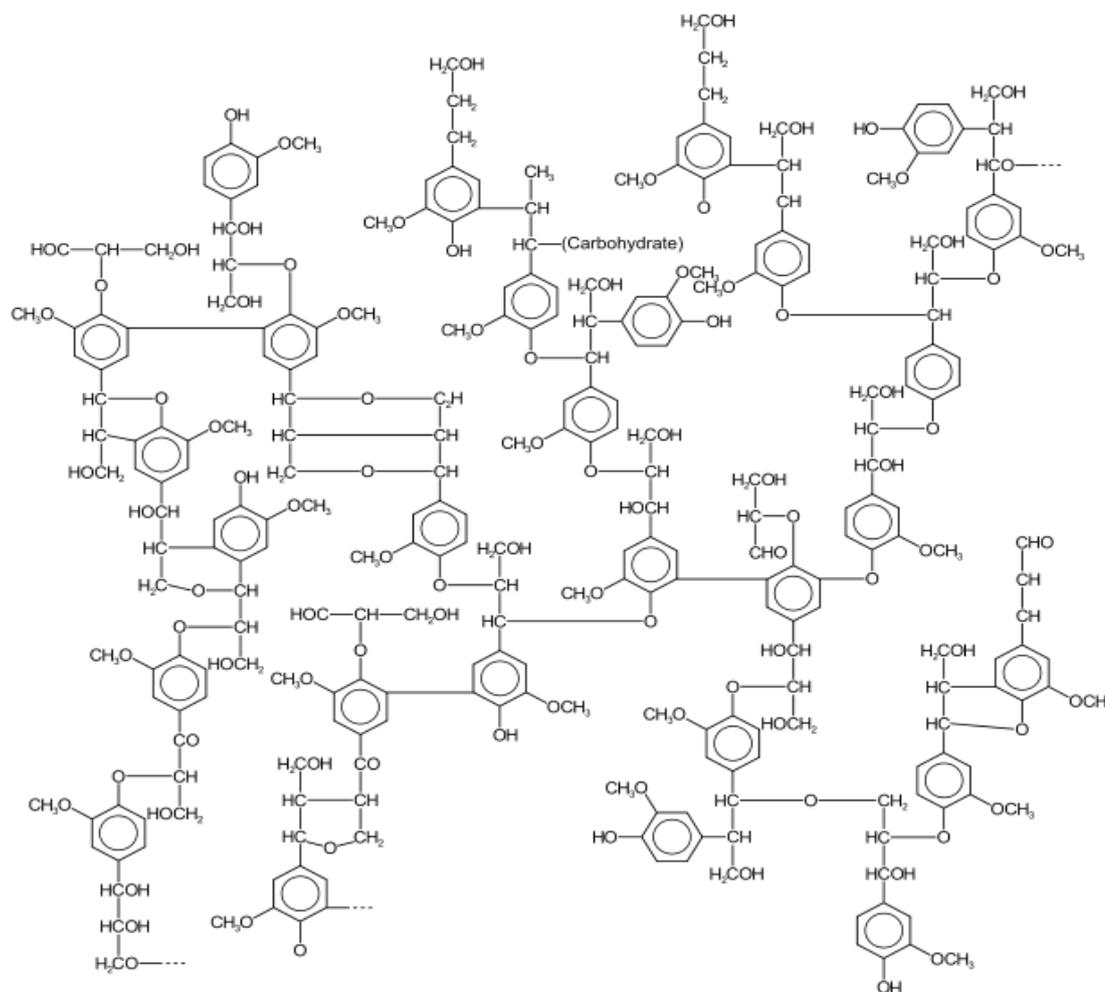


Figura 14. Estrutura parcial da lignina.

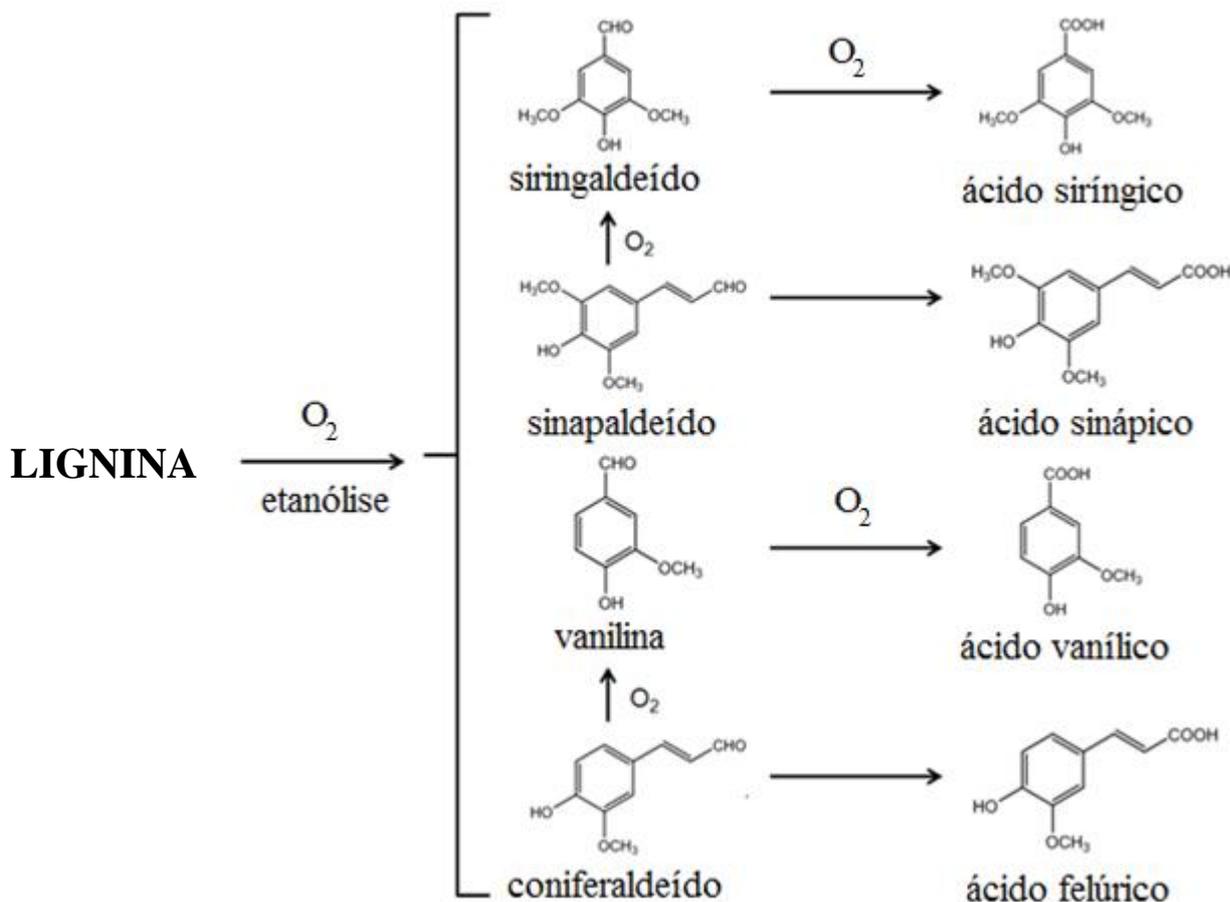


Figura 15. Extração e evolução da lignina.

Mararse e Berg ao analisarem o efeito oxidativo na lignina, observaram que o aumento na concentração de oxigênio acarretou altos teores dos aldeídos vanilina, siringaldeído, sinapaldeído e coniferaldeído e dos ácidos vanílico e siríngico. A presença de oxigênio durante a extração dos componentes da madeira não afetou a concentração dos ácidos sinápico e ferúlico [125].

Como regra geral, o siringaldeído e vanilina são os compostos predominantes em bebidas alcoólicas envelhecidas. No entanto, outros compostos como os ácidos siríngico, sinápico, vanílico e ferúlico, bem como os seus ésteres também podem ser encontrados [16].

Muitos autores têm proposto que a quantificação de marcadores do envelhecimento pode ser utilizada para prever o tempo ótimo requerido para o envelhecimento da bebida destilada [126-128]. No entanto, a extração destes compostos depende de vários fatores, como

o tipo de madeira utilizada na confecção do barril, o tamanho do barril, o tratamento previamente utilizado no barril (tendo em vista que vários barris são flambados antes de serem utilizados para o envelhecimento de bebidas) e todas estas variáveis influenciam no processo de extração destes compostos. Assim, os mecanismos de maturação não foram completamente elucidados e nenhum índice químico ou físico de confiança está disponível para indicar o avanço da maturação [124], conforme já falavam Nishimura e Matsuyama em 1989, sendo esta afirmação verdadeira até os dias atuais.

Vários autores já quantificaram estes marcadores em cachaças envelhecidas durante diferentes tempos e em diferentes madeiras nacionais e carvalho [15, 16, 18, 19, 73, 74]. No entanto, o objetivo desta aplicação foi corroborar com o estado da arte, buscando através de métodos quimiométricos, padrões de agrupamento para cachaças envelhecidas durante um ano em barris de amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana. Também pela primeira vez foi feito o estudo de envelhecimento de cachaça em barris de amendoim. Em trabalho anterior, os autores estudaram o comportamento de cachaça após extração em serragem desta madeira [18].

6.2. Parte Experimental

6.2.1. Instrumentação e processamento de dados

As massas dos barris foram obtidas com uma balança eletrônica Triunfo Max DST-30-C/T.

O teor alcoólico das amostras foi determinado com um densímetro automático Anton Paar DMA 4500.

A acidez das amostras foi determinada utilizando-se um pHmetro Nova Técnica.

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Shimadzu, modelo LC-20AT com detector UV-Vis modelo SPD 20A. A separação foi realizada em uma coluna Kinetex (octadecilsilano) de 150 mm x 4,6 mm com partículas de 2,6 μm .

Os dados foram analisados utilizando-se o software MATLAB, versão 7.9 (The Math Works, Natick, MA, EUA) e o PLS Toolbox, versão 6.5 (Eigenvector Technologies, Manson, WA, EUA).

6.2.2. Materiais e amostras

Os sessenta litros de cachaça de alambique utilizados foram comprados da Bebidas Apa Indústria e Comércio LTDA (Belo Horizonte, MG).

Os barris de amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana, de 10 litros de capacidade cada um, foram comprados da Tanoaria MB de Barros Neto (Ribeirão Preto, SP).

Os padrões de ácido gálico, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, sinapaldeído, siringaldeído, coniferaldeído e cumarina foram comprados todos da Sigma-Aldrich.

Os reagentes etanol (J.T. Baker), metanol (J.T. Baker), ácido acético (J.T. Baker), dimetilsulfóxido (Vetec) e 2-propanol (J.T. Baker) utilizados foram todos de grau cromatográfico. Hidróxido do sódio (Quimex) e biftalato de potássio (Qeel) foram utilizados para preparar as soluções para a determinação potenciométrica da acidez total das cachaças.

A água utilizada para o preparo das soluções foi deionizada por sistema de osmose reversa e ultra purificador de água Gehaka.

6.2.3. Procedimentos

Os barris foram tratados inicialmente com água fervente para a remoção de quaisquer impurezas existentes, como lascas de madeira e parafina, dentre outros. Após o escaldado, foi feita ambientação com a mesma cachaça utilizada para o envelhecimento. Após estas etapas de tratamento, os barris foram completados com a cachaça de alambique não envelhecida e guardados num local sem iluminação e protegidos de vibrações. Os barris não foram submetidos a processo de queima interna. Uma amostra da cachaça não envelhecida foi armazenada em frasco de vidro âmbar durante o período de envelhecimento e também foi analisada.

Alíquotas de cerca de 100 mL de cachaça foram retiradas de cada barril durante o envelhecimento (um mês, dois meses, quatro meses, seis meses, oito meses, 10 meses e 12 meses), totalizando 35 amostras, que foram guardadas em frascos âmbar, ao abrigo da luz, para posterior análise.

Para a determinação potenciométrica da acidez total das amostras foi preparada uma solução de hidróxido de sódio ($0,0013 \text{ mol L}^{-1}$), padronizada com solução de biftalato de potássio ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$).

As soluções estoque dos analitos que foram quantificados por HPLC foram preparadas em metanol e as triplicatas das soluções de trabalho foram preparadas em solução etanol:água

50% (v/v). Antes da análise cromatográfica as amostras e os padrões foram filtrados com filtro de membrana de nylon de 0,45 μm .

A quantificação dos marcadores de envelhecimento foi realizada utilizando-se o método de padronização externa. O comprimento de onda empregado para todos os analitos foi de 280 nm. O volume injetado das amostras e do padrão foi de 15 μL e o tempo de corrida para cada amostra foi de 36 minutos. A eluição foi realizada em sistema do tipo gradiente terciário e pode ser visto na Tabela 6. A fase A consistiu de uma solução 2 % (v/v) de ácido acético em água. A fase B consistiu de uma combinação 45:35:18:2 % (v/v) de 2-propanol, dimetilsulfóxido, água e ácido acético, respectivamente. E a fase C consistiu de uma combinação 40:40:18:2 % (v/v) de 2-propanol, dimetilsulfóxido, água e ácido acético, respectivamente.

Tabela 6. Gradiente de eluição empregado para o método cromatográfico

Tempo (min)	Fases		
	A ^a	B ^b	C ^c
0,01	95	5	0
6,00	80	20	0
6,01	80	0	20
18,01	95	5	0
36,00	95	5	0

^a Solução 2 % (v/v) de ácido acético em água.

^b Solução 45:35:18:2 % (v/v) de 2-propanol, dimetilsulfóxido, água e ácido acético.

^c Solução 40:40:18:2 % (v/v) de 2-propanol, dimetilsulfóxido, água e ácido acético.

6.3. Resultados e Discussão

Na Figura 16 vê-se os cinco barris utilizados para o envelhecimento da cachaça no local onde eles ficaram armazenados durante o período de um ano. As madeiras escolhidas para o estudo: amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana são as principais madeiras utilizadas para a confecção de barris para envelhecimento de cachaça em todo o Brasil.



Figura 16. Barris de amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana que foram utilizados para o envelhecimento da cachaça analisada.

6.3.1. Perdas por evaporação durante o envelhecimento

O envelhecimento é um processo dinâmico e como as paredes dos barris são porosas, durante este processo perde-se água e etanol por difusão e evaporação. Assim, com o objetivo de acompanhar o volume de cachaça perdido durante o envelhecimento, os barris foram pesados, e as massas registradas. Este acompanhamento foi feito durante um ano de envelhecimento e o perfil de perda por evaporação para cada barril pode ser visto na Figura 17.

Através da análise do gráfico, vê-se que carvalho e bálsamo apresentaram o mesmo perfil de perda, sendo os barris que apresentaram a menor perda de massa durante o processo de envelhecimento, seguido dos barris de amendoim e umburana; já o barril de jequitibá foi o que apresentou maior perda durante o envelhecimento.

Estas diferenças de perda durante o processo podem ser justificadas pelas diferenças de permeabilidade das madeiras. De acordo com Dias [65] o carvalho pode ser classificado como permeável a levemente permeável, o bálsamo como pouco permeável, a umburana pode

ser classificada como permeável e o jequitibá possui alta permeabilidade. Já o amendoim apresenta baixa permeabilidade [129].

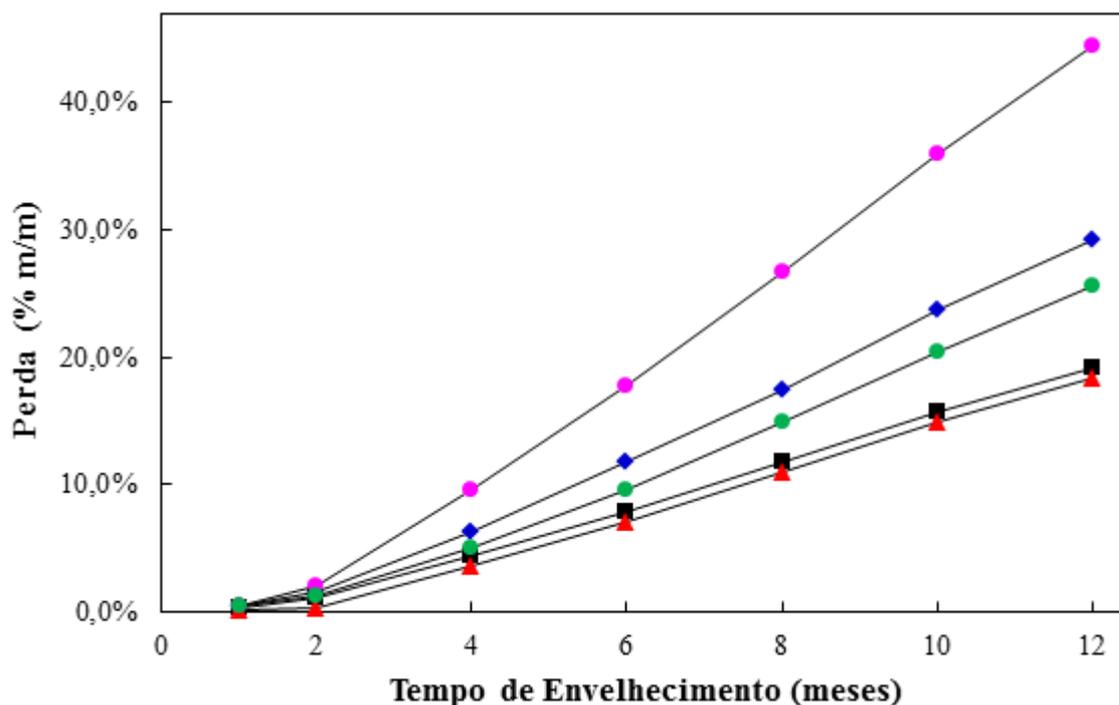


Figura 17. Variação da massa dos barris devido à perda por evaporação durante o envelhecimento da cachaça: amendoim (♦), bálsamo (■), carvalho (▲), jequitibá (●) e umburana (●).

6.3.2. Teor alcoólico das cachaças durante o envelhecimento

O teor alcoólico de todas as amostras de cachaças foi determinado diretamente com um densímetro automático e por causa da alta reprodutibilidade da análise, apenas algumas amostras foram feitas em triplicata, para controle.

Analisando os dados da Figura 18, vemos que todas as cachaças perderam etanol durante o processo de envelhecimento, diminuindo o seu teor alcoólico. A cachaça envelhecida em jequitibá novamente apresentou o comportamento mais díspar em relação às aquelas envelhecidas em outras madeiras, o que pode indicar que a maior porosidade desta madeira leva à maior perda de etanol por evaporação durante o processo de envelhecimento.

Durante o envelhecimento perde-se preferencialmente água pelos poros da madeira, mas moléculas de álcool também podem ser perdidas. O etanol, além de ser perdido por evaporação, também participa de reações de oxidação que levam à formação de acetaldeído e ácido acético.

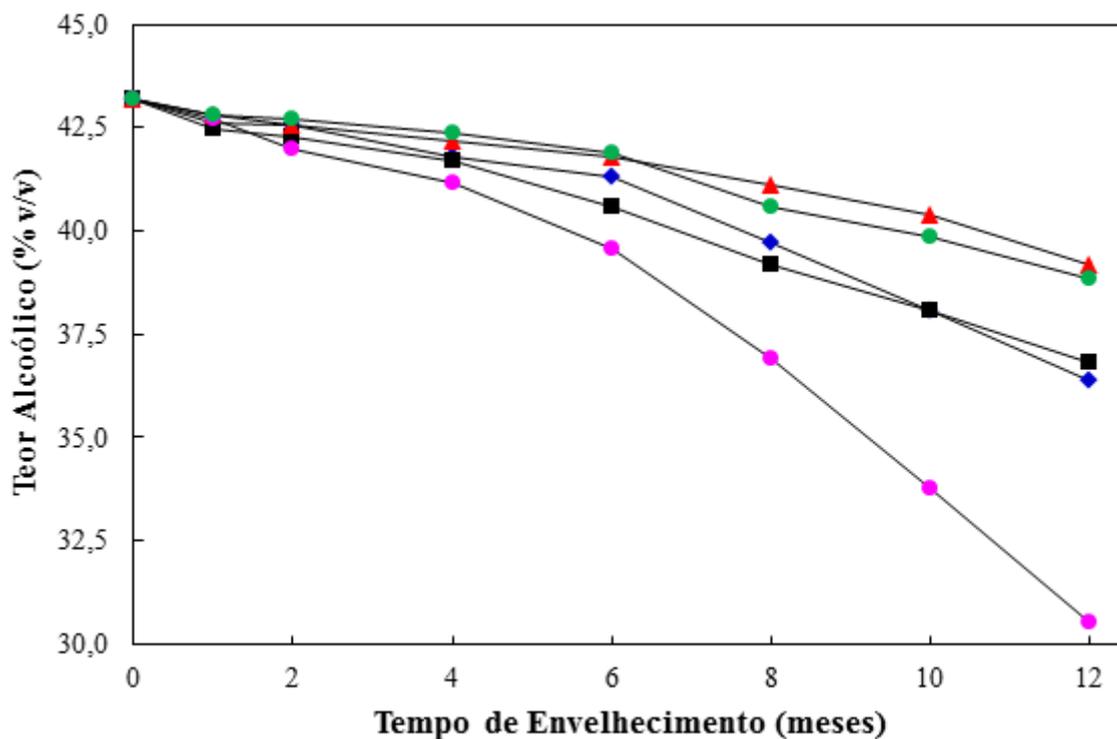
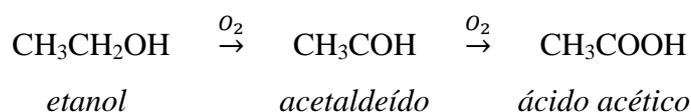


Figura 18. Variação do teor alcoólico das cachaças durante o envelhecimento: amendoim (◆), bálsamo (■), carvalho (▲), jequitibá (●) e umburana (●).

6.3.3. Acidez total das cachaças durante o envelhecimento

Durante o envelhecimento a acidez total de cada cachaça foi determinada em triplicata através de titulação potenciométrica. Após as análises, os valores de acidez total obtidos foram corrigidos, levando em conta a perda de etanol ocorrida nos barris durante o envelhecimento.

Conforme pode ser visto na Figura 19, todas as cachaças tiveram o teor de acidez aumentado durante o envelhecimento, o que se explica pela reação de oxidação do etanol levando à formação de acetaldeído e ácido acético, conforme pode ser visto a seguir na equação da reação química.



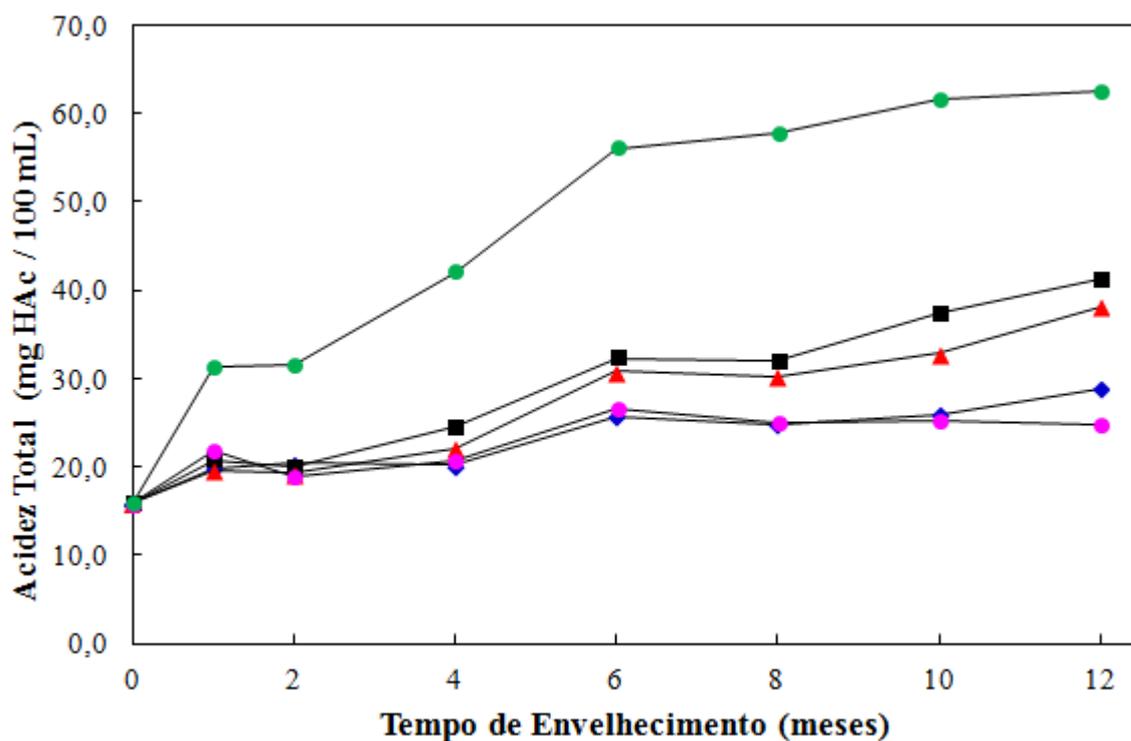


Figura 19. Variação da acidez total das cachaças durante o envelhecimento: amendoim (◆), bálsamo (■), carvalho (▲), jequitibá (●) e umburana (●).

6.3.4. Análise cromatográfica para quantificação de marcadores de envelhecimento em cachaças

6.3.4.1. Escolha do comprimento de onda

Inicialmente testou-se alguns métodos cromatográficos relatados na literatura para a determinação de compostos fenólicos em cachaças envelhecidas em barris de madeiras [15, 16, 18]. No entanto, estes métodos não forneceram bons resultados para as amostras analisadas, logo um novo método cromatográfico foi desenvolvido.

O comprimento de onda de 280 nm foi escolhido para a quantificação de todos os analitos estudados, por ser o comprimento de onda no qual todos os compostos marcadores do envelhecimento de bebidas absorvem. Apesar deste não ser o comprimento de onda de absorção máximo para todos os compostos, testes *t* indicaram que curvas construídas com as áreas obtidas em 280 nm comparadas com aquelas construídas com as áreas obtidas no comprimento de absorção máximo de cada analito não apresentaram diferença significativa, com 95% de confiança.

6.3.4.2. Identificação dos analitos

Para a identificação dos analitos nas amostras, além do tempo de retenção, algumas amostras receberam adição dos padrões para a confirmação dos compostos. Quando houve dúvida sobre a identidade de um composto, devido a variações no tempo de retenção, os espectros UV-Vis gerados foram analisados.

6.3.4.3. Condições da separação

Para a otimização do método foram realizados testes com diferentes fases móveis e gradientes de eluição. A melhor condição encontrada foi com a temperatura da coluna de 30 °C, fluxo de 0,80 mL min⁻¹, três fases móveis e gradiente de eluição terciário, conforme apresentado na Tabela 6.

6.3.4.4. Curvas de calibração e limites de detecção e quantificação

As curvas de calibração foram construídas através da regressão linear das áreas dos picos referentes a cada analito. Os seguintes níveis de concentração foram preparados a partir de um pool dos analitos: 0,50, 1,00, 2,00, 3,00, 5,00, 8,00, 10,00, 20,00 e 30,00 mg L⁻¹. A Tabela 7 apresenta os parâmetros calculados para as curvas de cada analito quantificado: os coeficientes linear (a), angular (b) e de correlação (r) e os limites de detecção e quantificação. Os limites foram determinados a partir do desvio padrão das medidas de dez amostras contendo os analitos nas menores concentrações analisadas.

Tabela 7. Parâmetros calculados para as curvas dos analitos quantificados em cachaças envelhecidas

Composto	a	b	r	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Siringaldeído	2,29 x 10 ³	3,13 x 10 ⁴	0,9988	0,05	0,15
Sinapaldeído	7,64 x 10 ²	5,77 x 10 ³	0,9989	0,08	0,28
Coniferaldeído	7,25 x 10 ²	1,47 x 10 ⁴	0,9990	0,03	0,11
Vanilina	1,24 x 10 ³	1,71 x 10 ⁴	0,9982	0,04	0,13
Ácido Vanílico	6,76 x 10 ²	1,29 x 10 ⁴	0,9983	0,04	0,14
Ácido Siríngico	1,72 x 10 ³	2,28 x 10 ⁴	0,9983	0,03	0,11
Ácido Gálico	7,81 x 10 ³	2,17 x 10 ⁴	0,9999	0,06	0,20
Cumarina	2,42 x 10 ³	3,64 x 10 ⁴	0,9988	0,05	0,17

Os cromatogramas obtidos após a otimização das condições de separação são apresentados nas Figuras 20 a 24. O método apresentou seletividade satisfatória, uma vez que nenhuma interferência na análise foi causada pela presença de outros compostos.

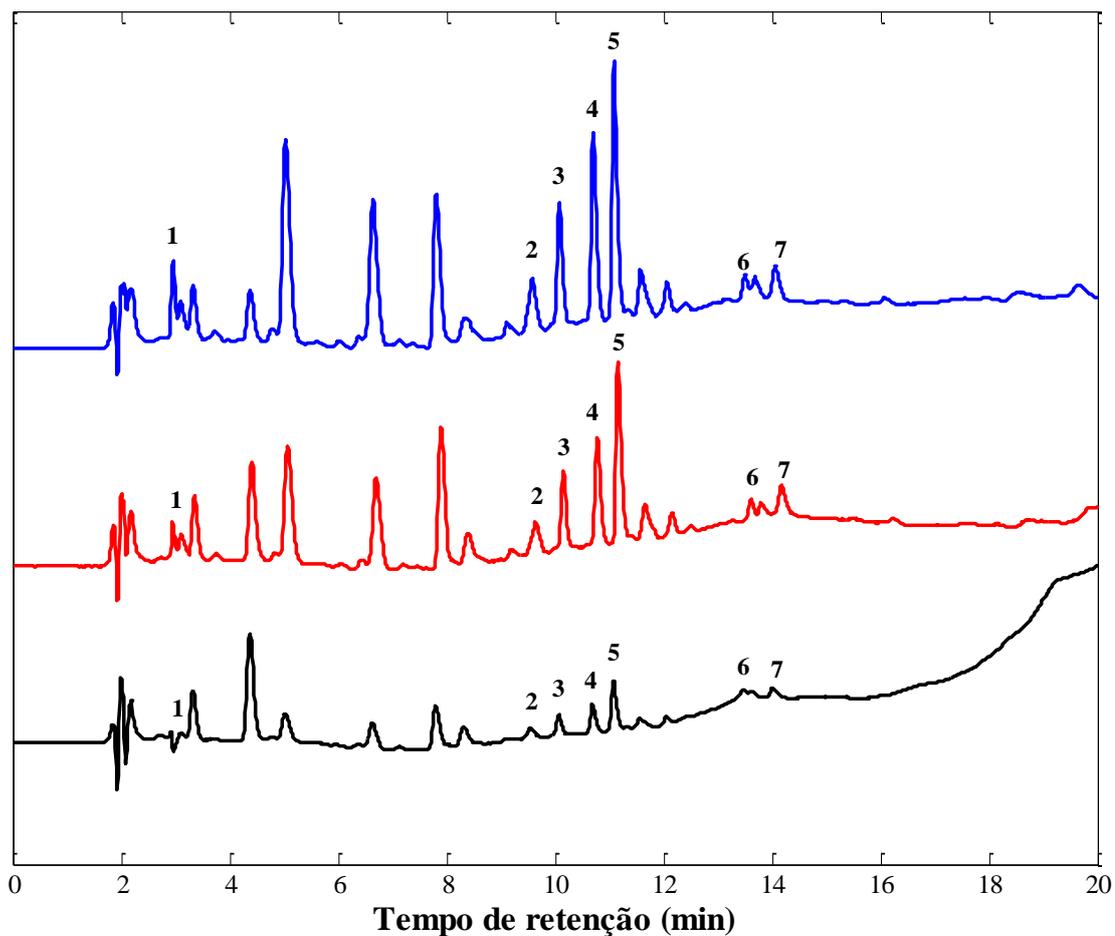


Figura 20. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de AMENDOIM nos tempos de 1 mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido siríngico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído.

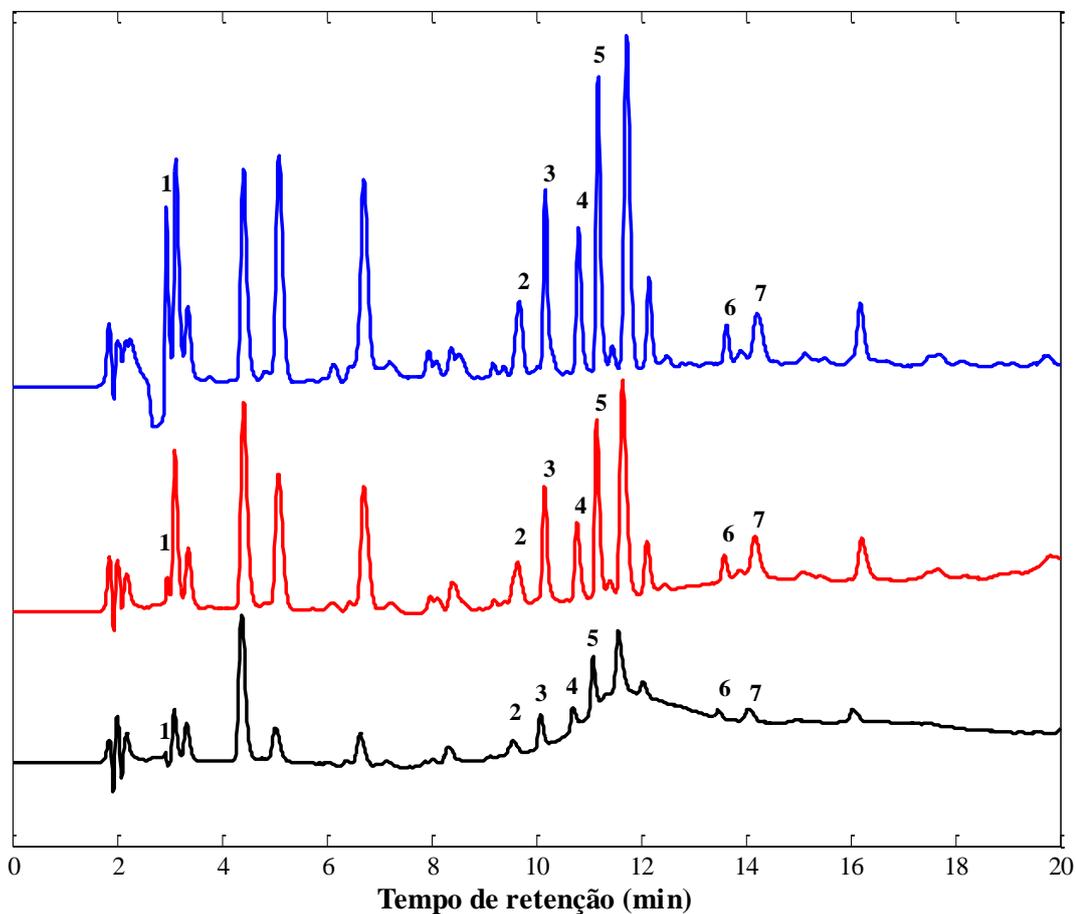


Figura 21. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de BALSAMO nos tempos de 1mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido siríngico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído.

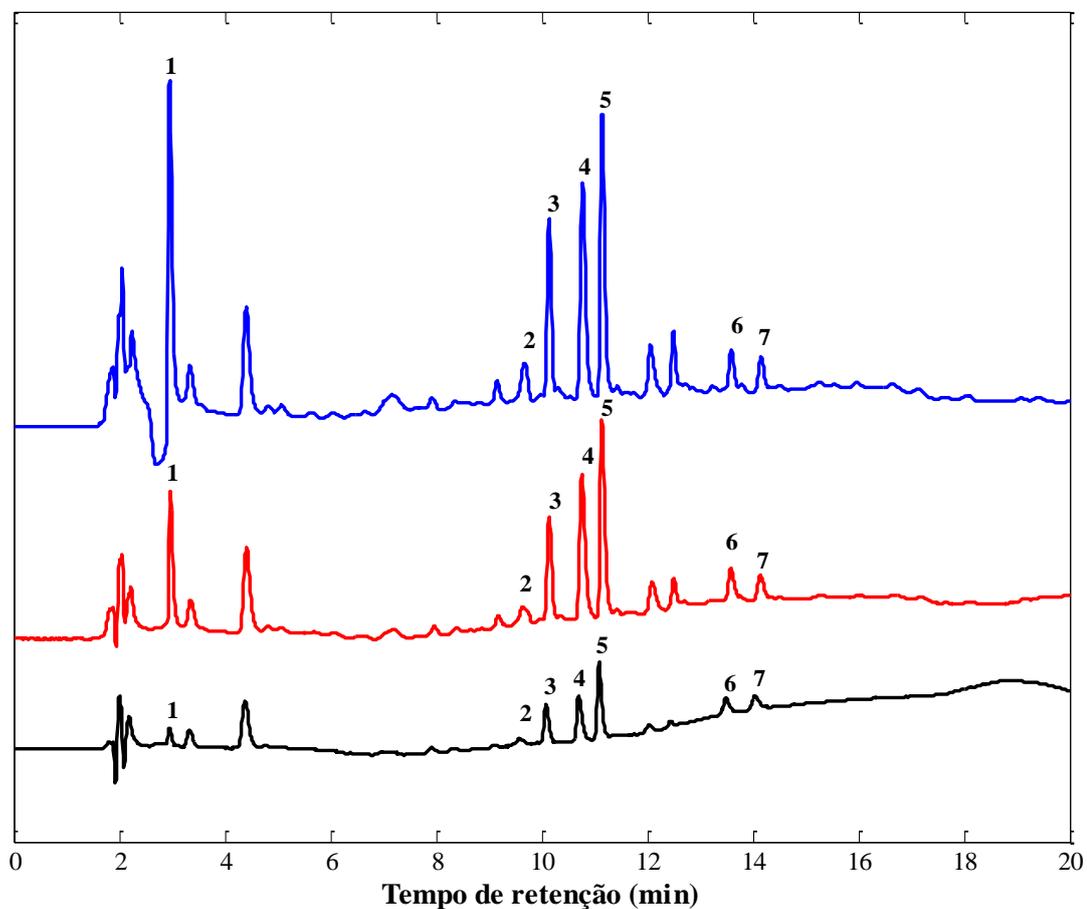


Figura 22. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de CARVALHO nos tempos de 1 mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido siringico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído.

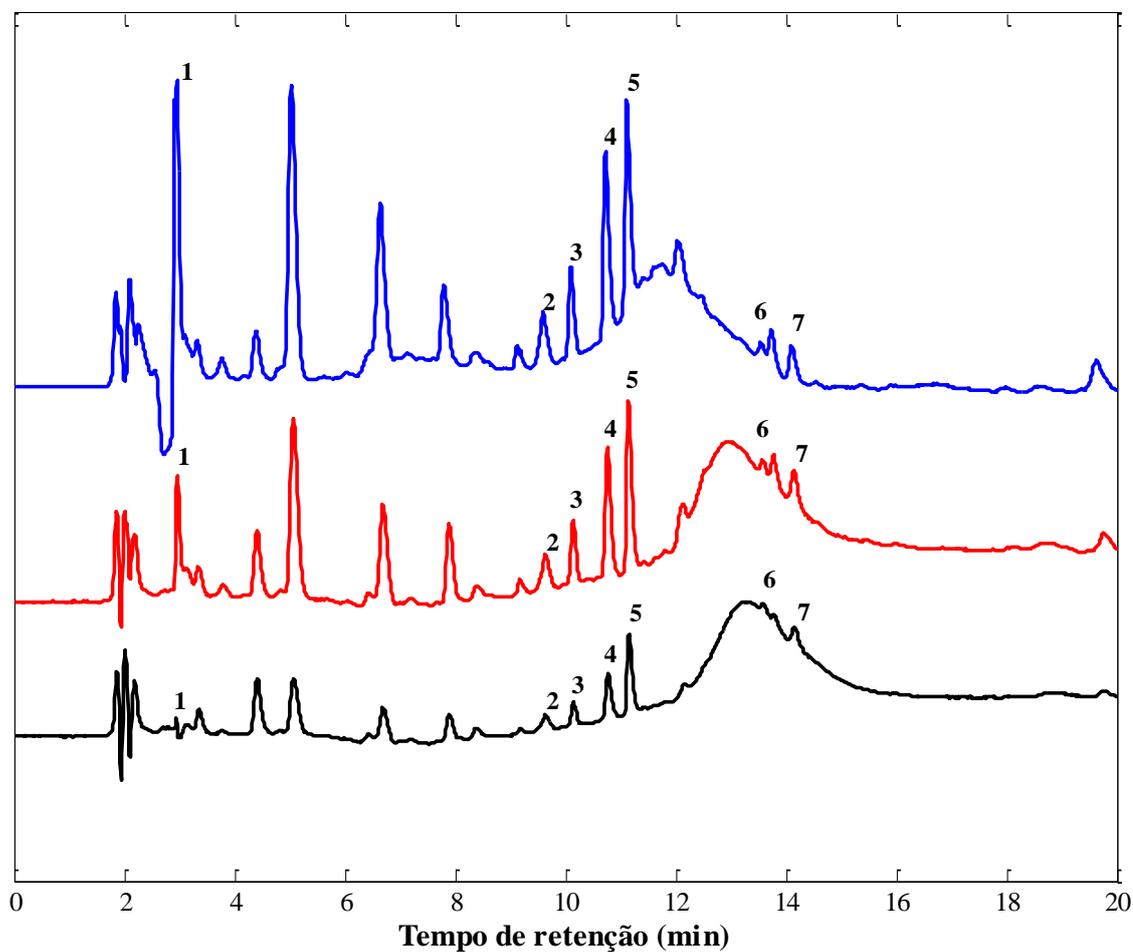


Figura 23. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de JEQUITIBÁ nos tempos de 1 mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido siringico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído.

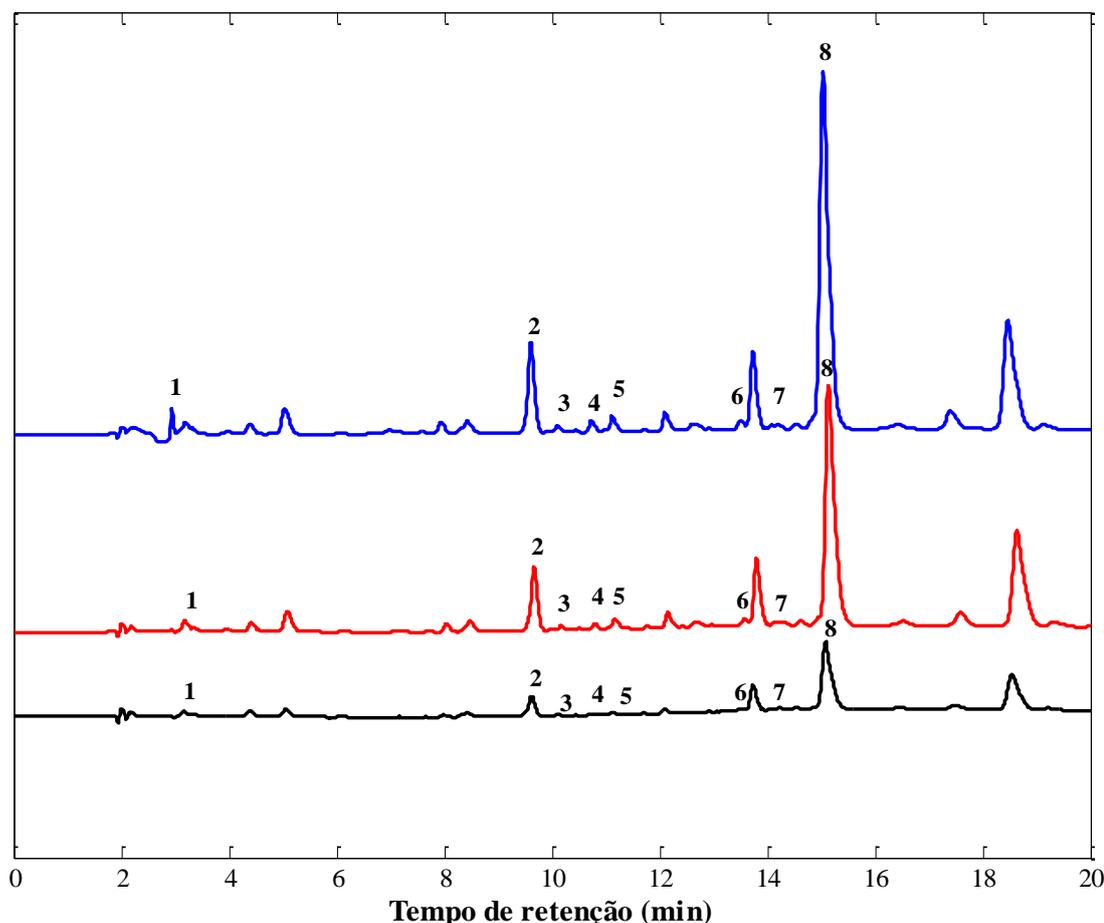


Figura 24. Cromatogramas das cachaças envelhecidas no barril de UMBURANA nos tempos de 1 mês (—), 6 meses (—) e 12 meses (—). Picos: 1) ácido gálico, 2) ácido vanílico, 3) ácido sírínico, 4) siringaldeído, 5) vanilina, 6) sinapaldeído, 7) coniferaldeído, 8) cumarina.

6.3.4.5. Quantificação dos marcadores nas cachaças envelhecidas

A cachaça de alambique não envelhecida utilizada para preencher os barris também foi analisada cromatograficamente e nenhum dos compostos fenólicos marcadores do envelhecimento foi detectado. Logo, a origem destes compostos nas cachaças analisadas deve-se unicamente ao processo de envelhecimento.

Nos gráficos a seguir (Figuras 25 a 36) podemos ver o aumento da concentração de aldeídos fenólicos e ácidos fenólicos durante o período de envelhecimento de um ano para as cinco madeiras estudadas. Estas concentrações foram corrigidas, levando em conta a perda de etanol ocorrida nos barris durante o envelhecimento.

6.3.4.5.1. Cachaça envelhecida em barris de amendoim

Nesta cachaça houve a predominância de vanilina, dentre os aldeídos fenólicos estudados (Figura 25) e dentre os ácidos fenólicos analisados, os ácido vanílico e siríngico (Figura 26).

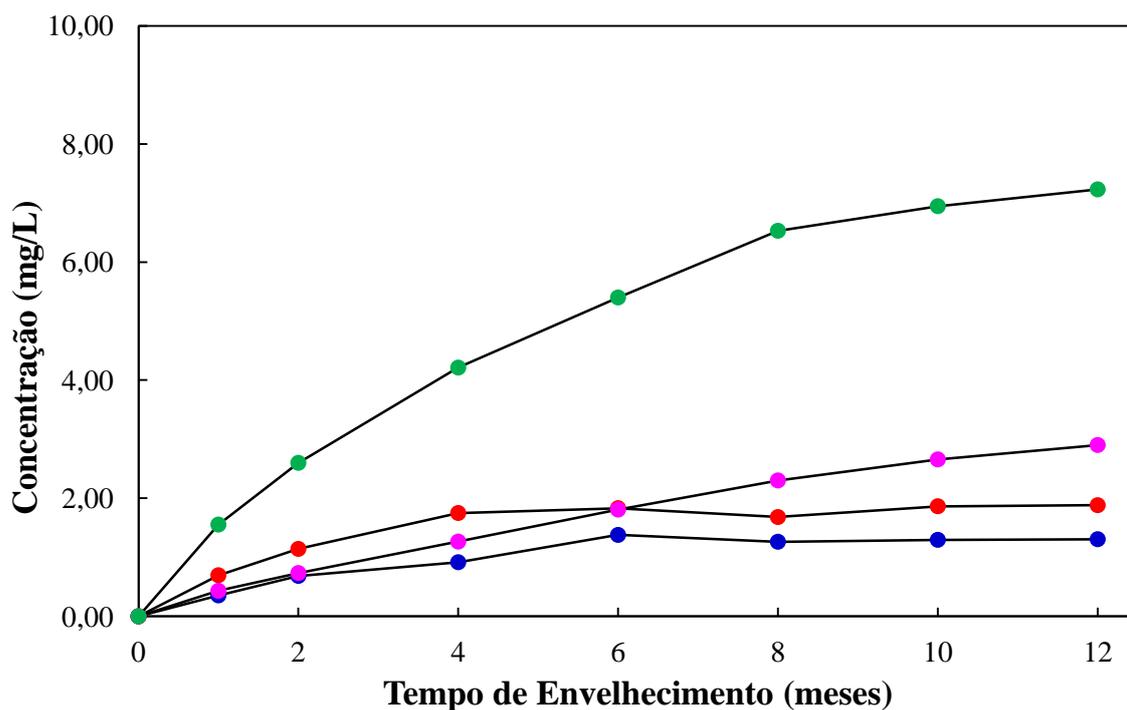


Figura 25. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de AMENDOIM: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).

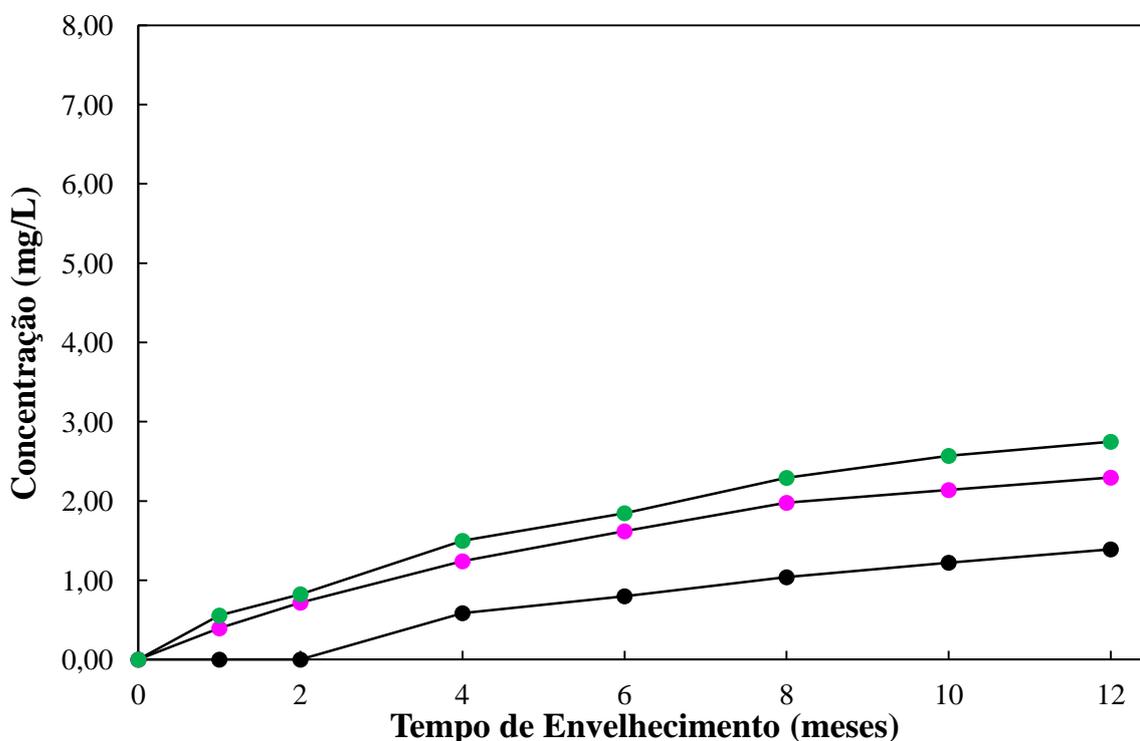


Figura 26. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de AMENDOIM: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).

6.3.4.5.2. Cachaça envelhecida em barris de bálsamo

Esta cachaça apresentou o mesmo perfil que a envelhecida em amendoim, tanto quanto aos aldeídos fenólicos, com a predominância de vanilina (Figura 27), quanto aos ácidos, com a predominância dos ácidos siríngico e vanílico (Figura 28), No entanto esta cachaça apresentou teores mais elevados destes compostos, quando comparado à cachaça envelhecida em amendoim.

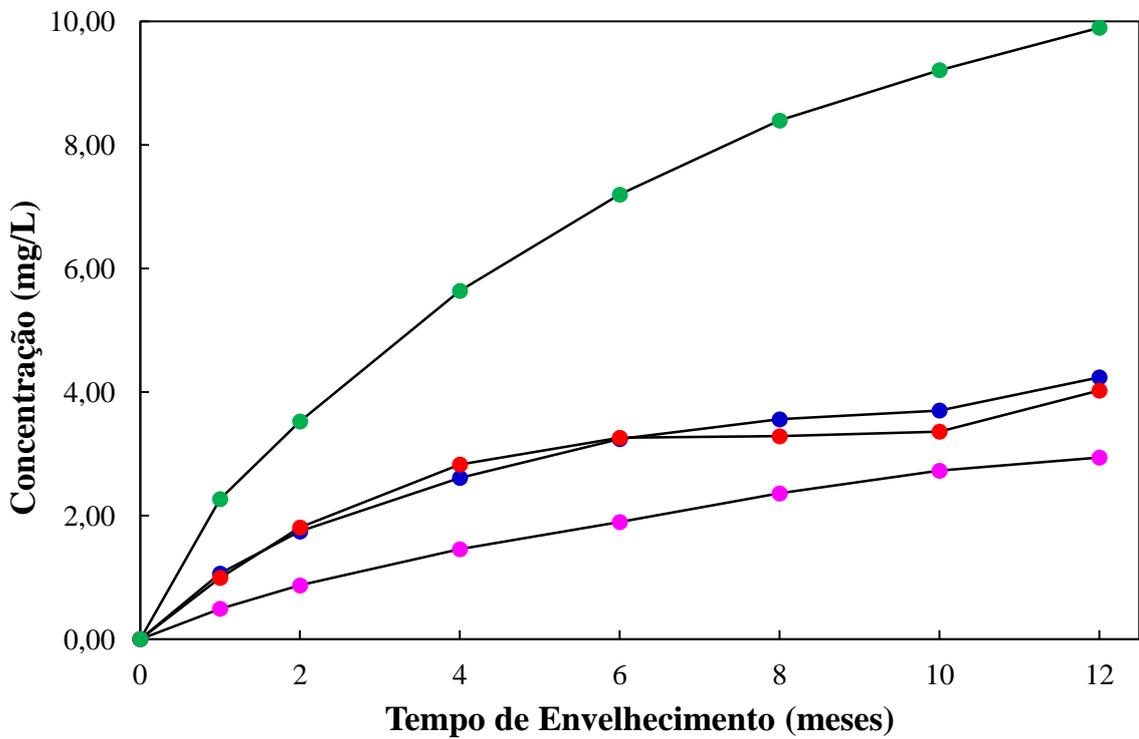


Figura 27. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de BALSAMO: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).

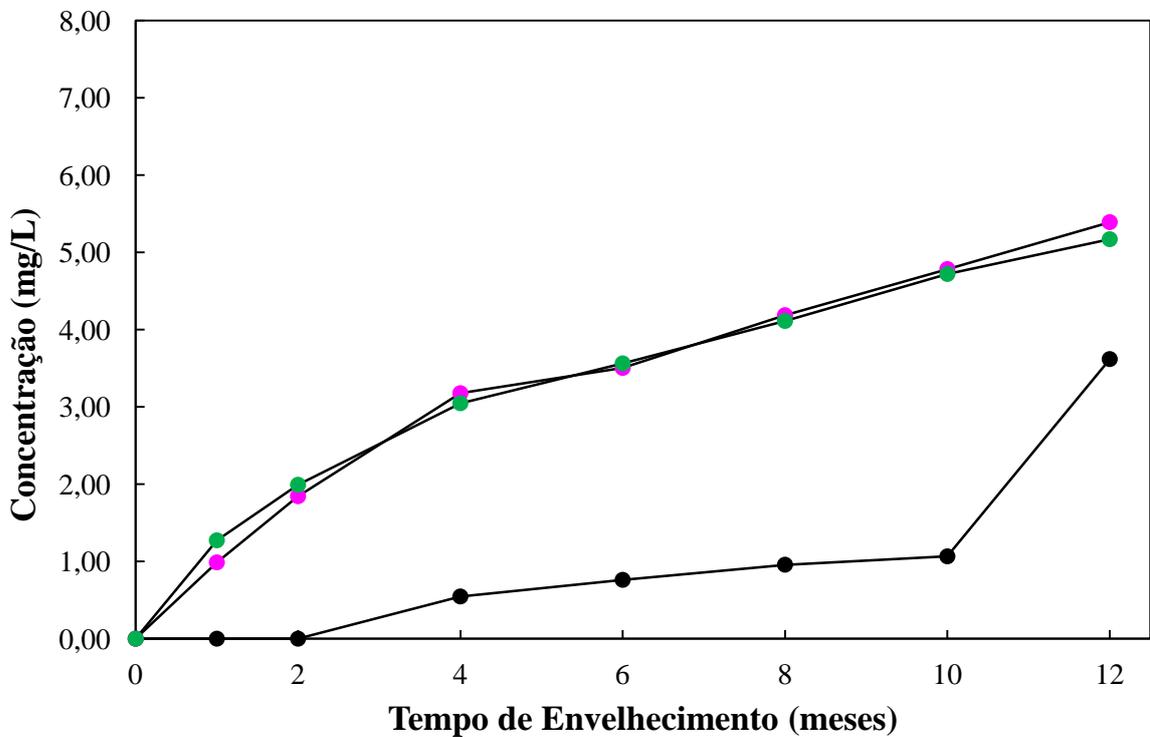


Figura 28. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de BALSAMO: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).

6.3.4.5.3. Cachaça envelhecida em barris de carvalho

Esta cachaça apresentou também teores elevados de vanilina (Figura 29), mas com relação aos ácidos, o gálico foi predominante (Figura 30).

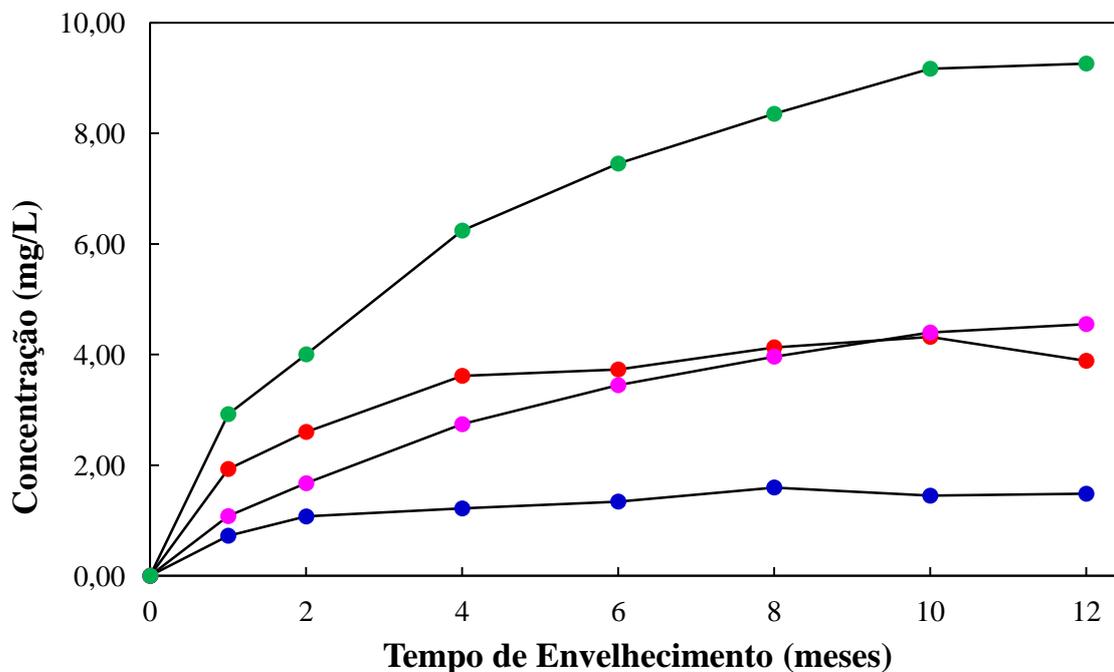


Figura 29. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de CARVALHO: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).

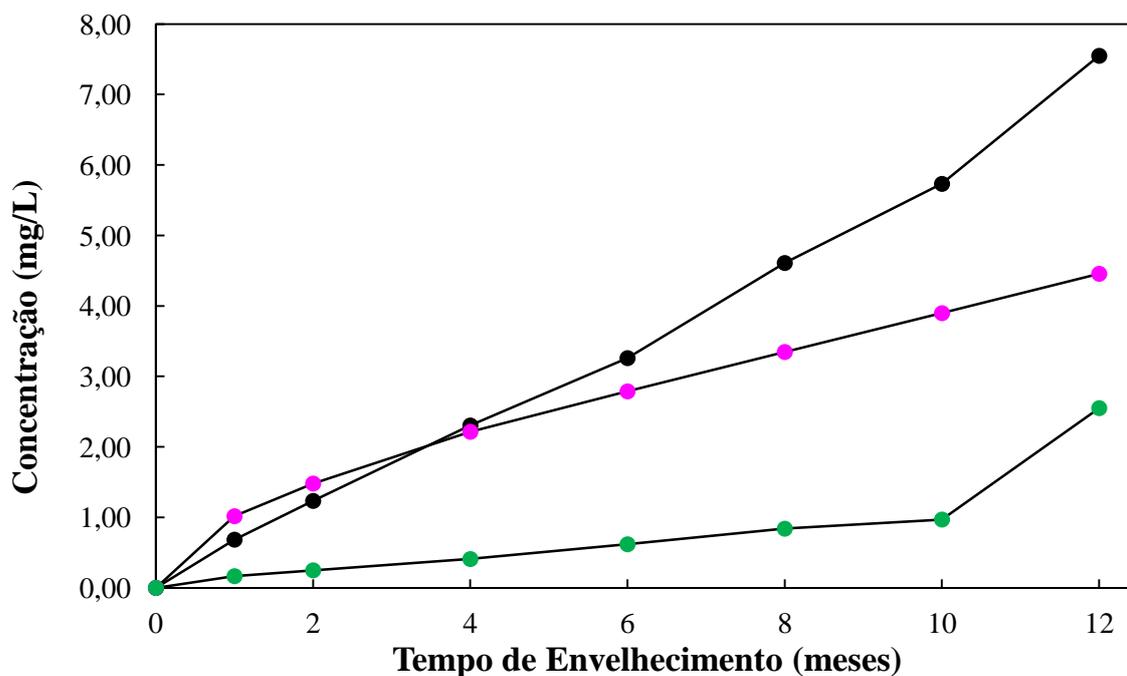


Figura 30. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de CARVALHO: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).

6.3.4.5.4. Cachaça envelhecida em barris de jequitibá

Assim como a cachaça envelhecida em carvalho, na cachaça envelhecida em jequitibá houve predominância de vanilina e ácido gálico, mas em concentrações menores que aquelas determinadas para carvalho (Figuras 31 e 32).

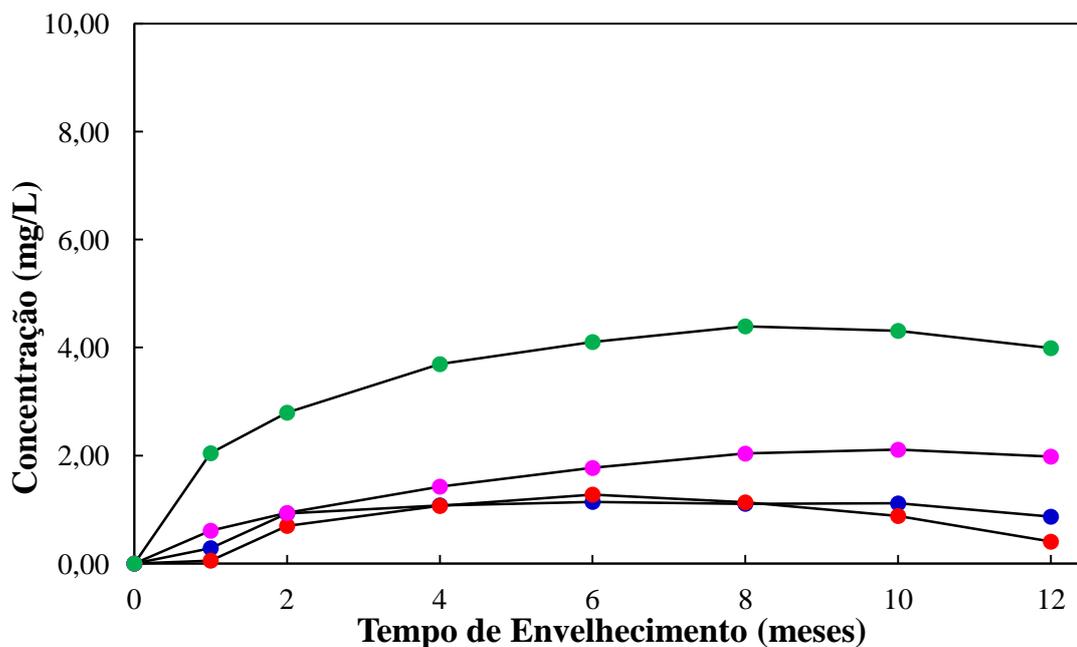


Figura 31. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de JEQUITIBÁ: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).

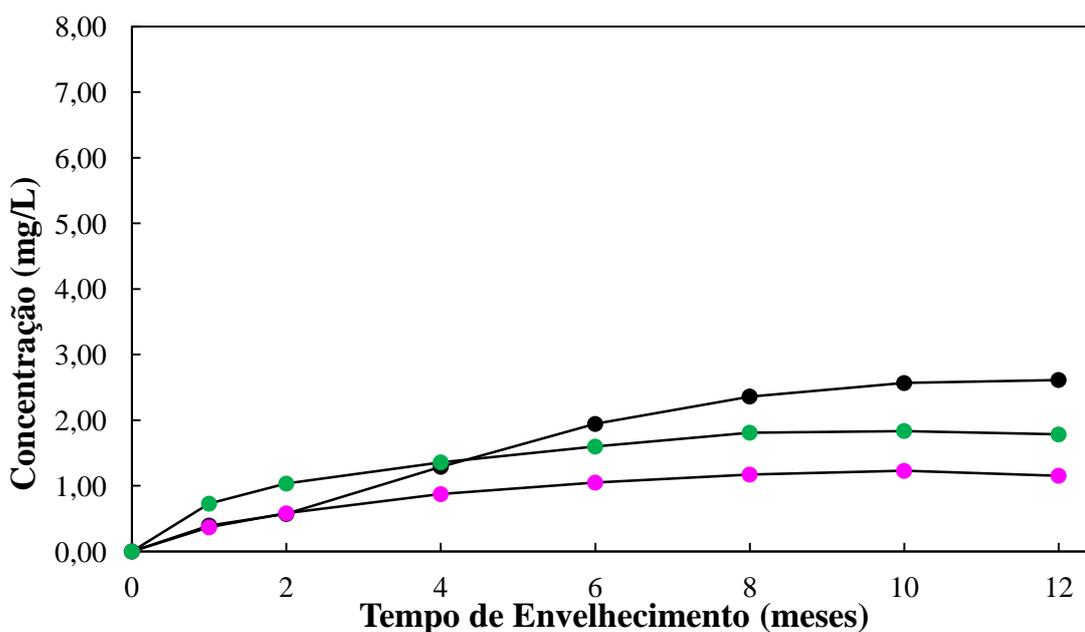


Figura 32. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de JEQUITIBÁ: ácido gálico (●), ácido sirínico (●) e ácido vanílico (●).

6.3.4.5.5. Cachaça envelhecida em barris de umburana

Esta cachaça apresentou um perfil bem diferente das demais, com predominância de cumarina e siringaldeído (Figura 33 e 34) e entre os ácidos, se destaca os altos teores de ácido vanílico (Figura 35 e 36).

Os teores de cumarina calculados para a cachaça envelhecida em umburana são muito superiores à faixa de trabalho determinada para este composto, logo não se tem confiança estatística nos teores determinados, mas pode-se inferir que eles são altos.

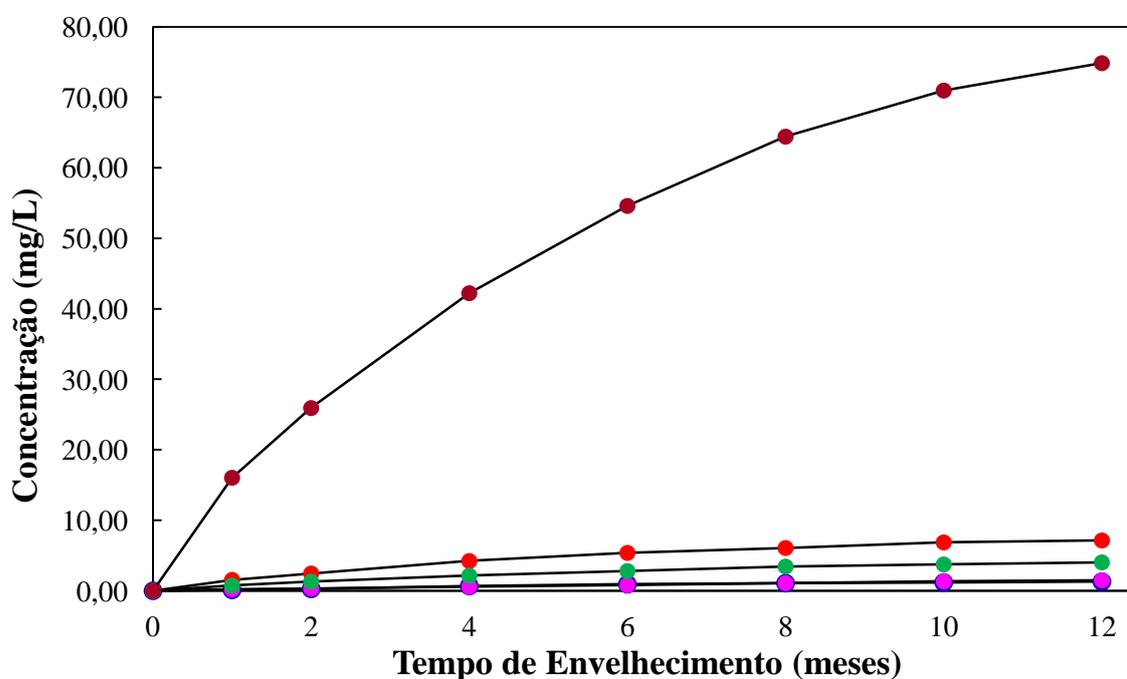


Figura 33. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de UMBURANA, destacando a predominância da cumarina: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●), vanilina (●) e cumarina (●).

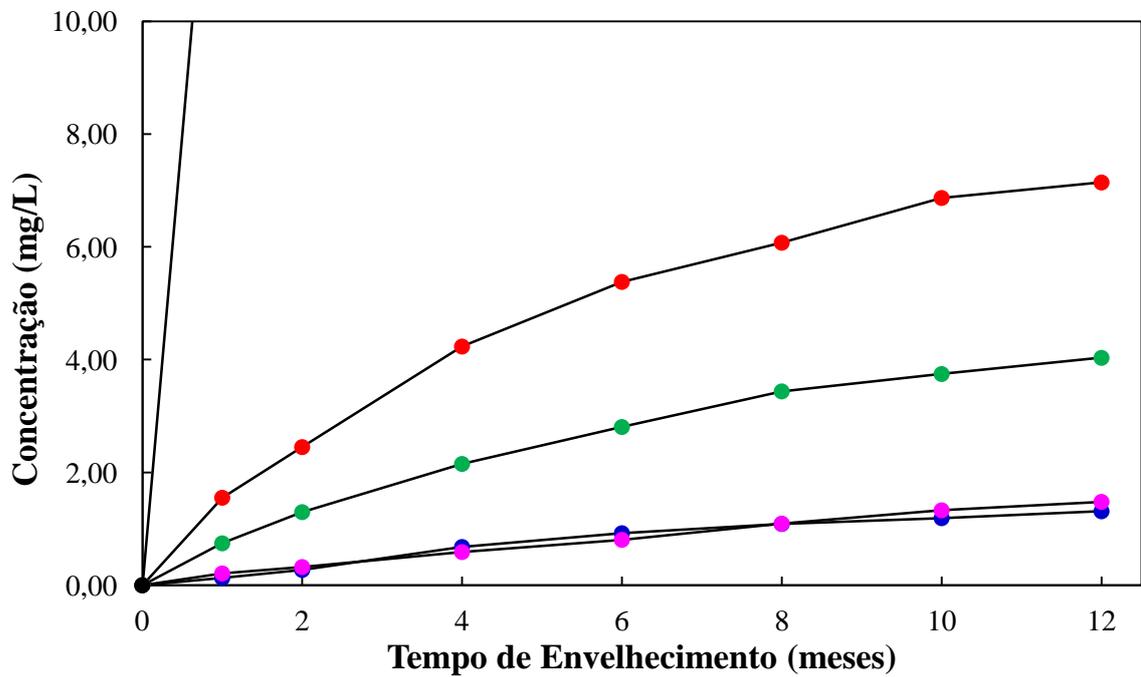


Figura 34. Aumento do teor de aldeídos fenólicos na cachaça envelhecida em barril de UMBURANA: coniferaldeído (●), sinapaldeído (●), siringaldeído (●) e vanilina (●).

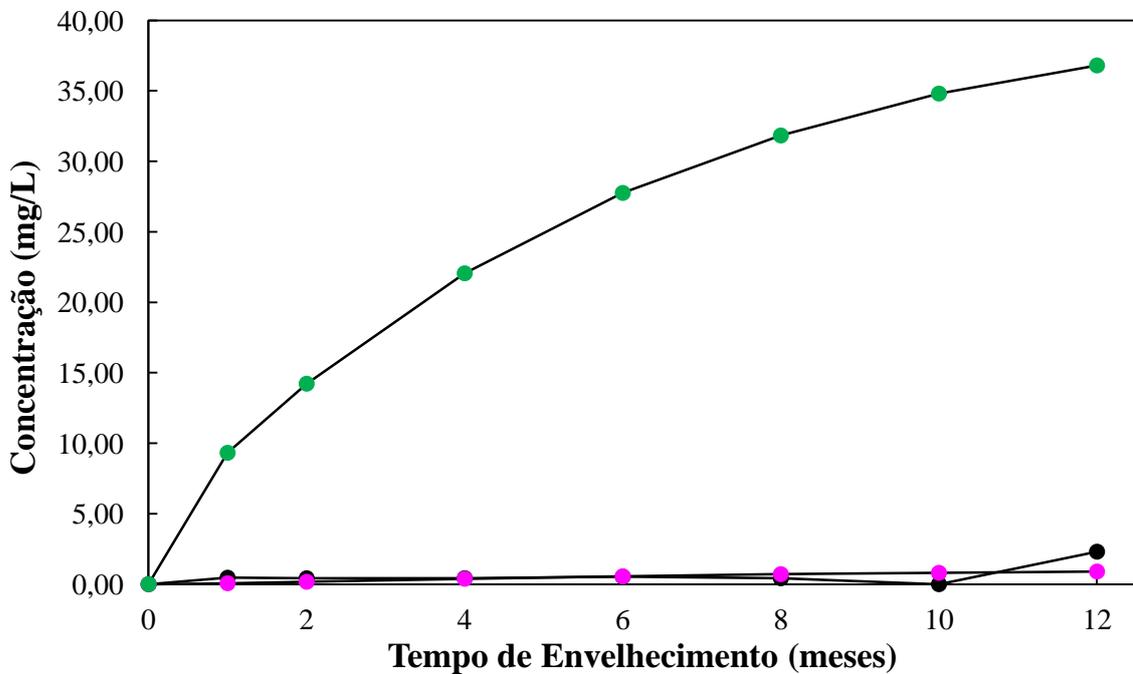


Figura 35. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de UMBURANA, destacando a predominância do ácido vanílico: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).

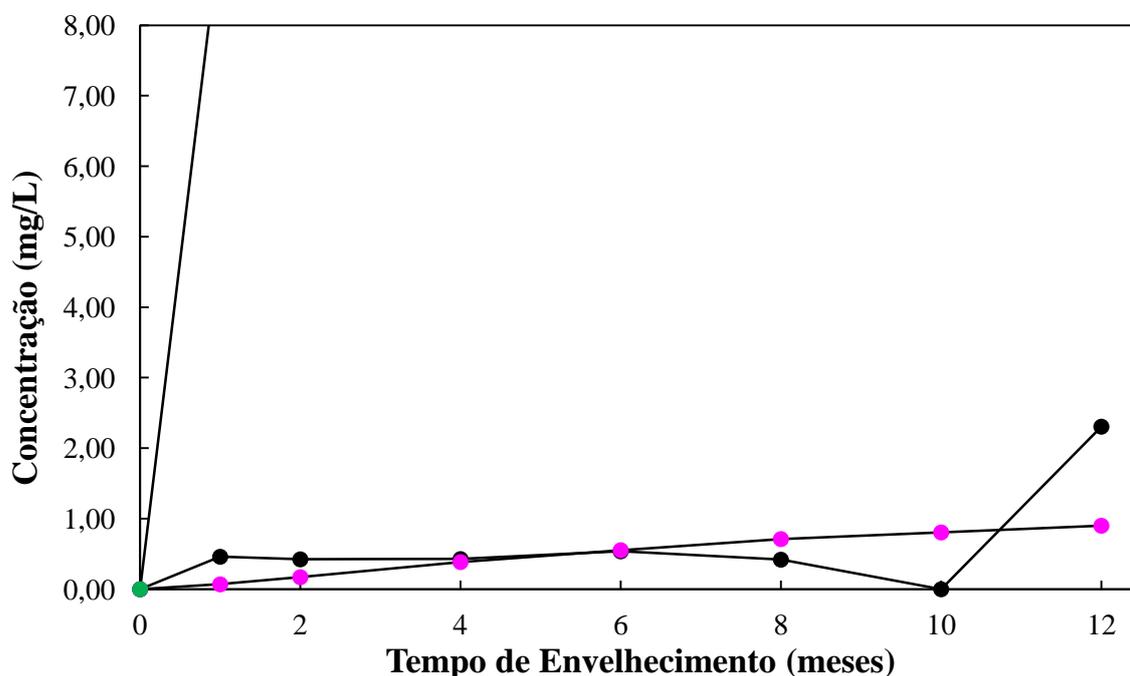


Figura 36. Aumento do teor de ácidos fenólicos para a cachaça envelhecida em barril de UMBURANA: ácido gálico (●), ácido siríngico (●) e ácido vanílico (●).

6.3.5. Análise exploratória

Foi realizado um PCA buscando encontrar padrões de agrupamento para as cachaças envelhecidas durante um ano em barris de amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana. Assim, organizou-se os seguintes dados: as concentrações dos aldeídos e ácidos fenólicos determinados, a acidez total, o teor alcoólico e a perda de massa dos barris durante o primeiro, o segundo, o quarto, o sexto, o oitavo, o décimo e o décimo segundo meses de envelhecimento para as cinco madeiras estudadas em uma matriz de dimensões 35 x 11 (amostras x variáveis estudadas). Os dados de teor alcoólico e das concentrações de aldeídos e ácidos foram corrigidos, levando em conta a perda de etanol ocorrida nos barris durante o envelhecimento.

Após autoescalar os dados, construiu-se o modelo PCA com três CP que explicaram 88% da variância total dos dados. Nas Figuras 37 e 38 podem ser vistos os gráficos biplot de CP1 versus CP2 e CP1 versus CP3, que mostram os padrões de agrupamento das amostras e a relação que cada variável estudada tem sobre o agrupamento formado.

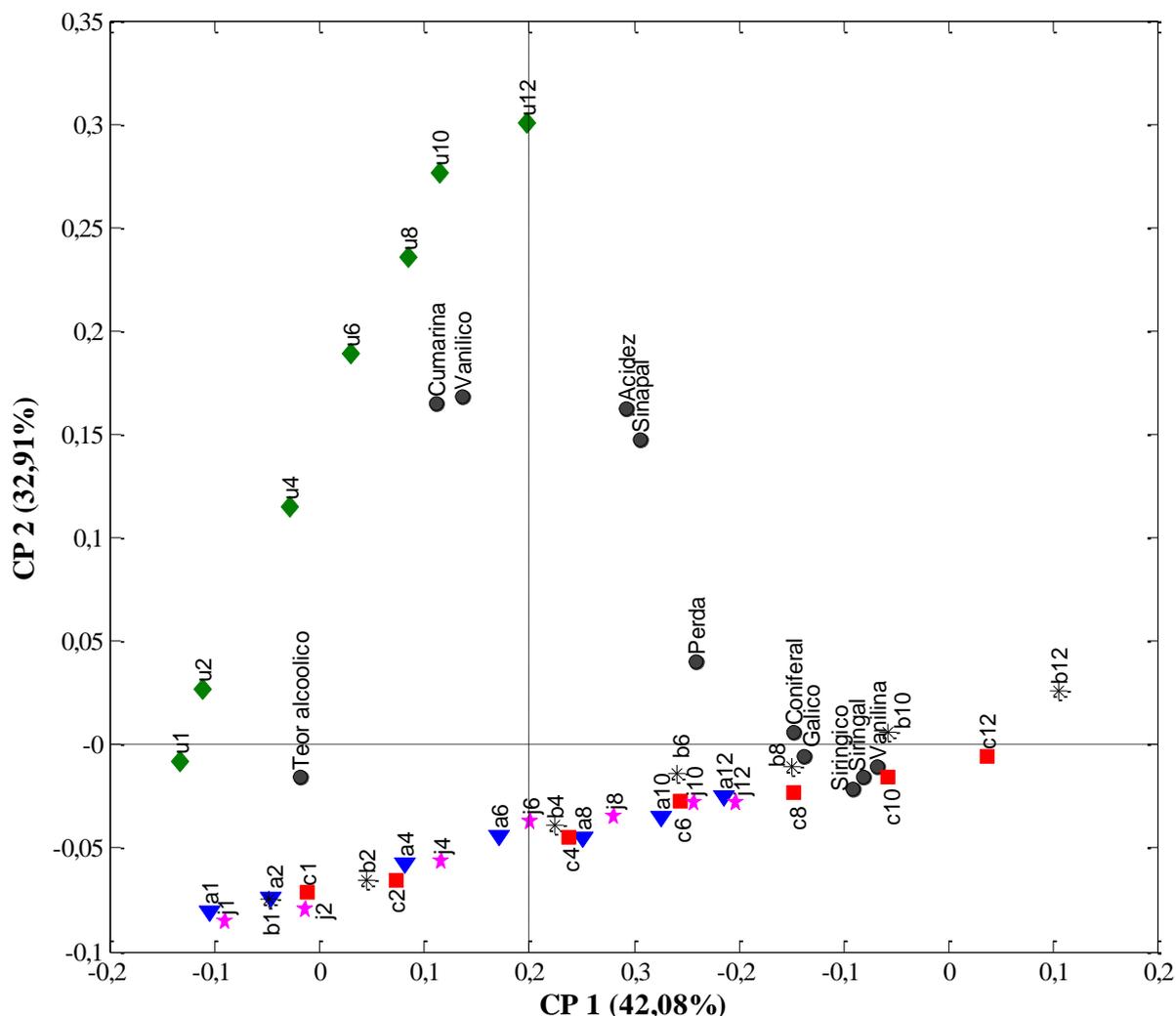


Figura 37. Gráfico biplot de CP1 versus CP2 para as amostras de cachaças envelhecidas durante um ano em barris de amendoim (▼), bálsamo (*), carvalho (■), jequitibá (★) e umburana (◆).

A partir da análise do gráfico biplot de CP1 versus CP2 (Figura 37), dois padrões de informação podem ser vistos: CP1 explica as amostras envelhecidas em amendoim, bálsamo, carvalho e jequitibá e CP1 versus CP2 explicam as amostras envelhecidas em umburana.

Analisando o gráfico da Figura 37 verifica-se que CP1, que corresponde a 42% da variância total dos dados, é responsável pela separação das amostras em função do tempo de envelhecimento. As amostras com menor tempo de envelhecimento tendem a ocupar a parte negativa de CP1, enquanto as amostras com maior tempo de envelhecimento tendem a ocupar a parte positiva de CP1. As variáveis responsáveis por esta separação são: o coniferaldeído, o siringaldeído, a vanilina, os ácidos gálico e siríngico e a perda por evaporação, na parte positiva de CP1, em contraponto ao teor alcoólico, na parte negativa de CP1. A partir desta

análise, infere-se que o teor dos compostos fenólicos só passa a ser significativo para a distinção das amostras envelhecidas, a partir de: quatro meses para bálsamo e carvalho e oito meses para amendoim e jequitibá. O teor alcoólico é responsável pela separação das amostras com menor tempo de envelhecimento.

Analisando o gráfico de CP1 versus CP2, na Figura 37, vemos que CP2, que corresponde a 33% da variância total dos dados, é responsável pelo agrupamento das amostras envelhecidas em umburana. Sendo que mesmo dentro do grupo destas amostras, existe a separação entre as amostras pelo tempo de envelhecimento. Sendo que as amostras envelhecidas por maior tempo se caracterizam pelos maiores teores de cumarina, ácido vanílico, sinapaldeído e acidez. Enquanto as amostras envelhecidas por menor tempo se caracterizam pela variável teor alcoólico.

Outro padrão percebido é que CP1 coloca as variáveis teor alcoólico e perda em quadrantes opostas, pois quanto maior a perda por evaporação, menor o teor alcoólico do destilado, uma vez que neste processo de envelhecimento perdeu-se etanol, em detrimento da água.

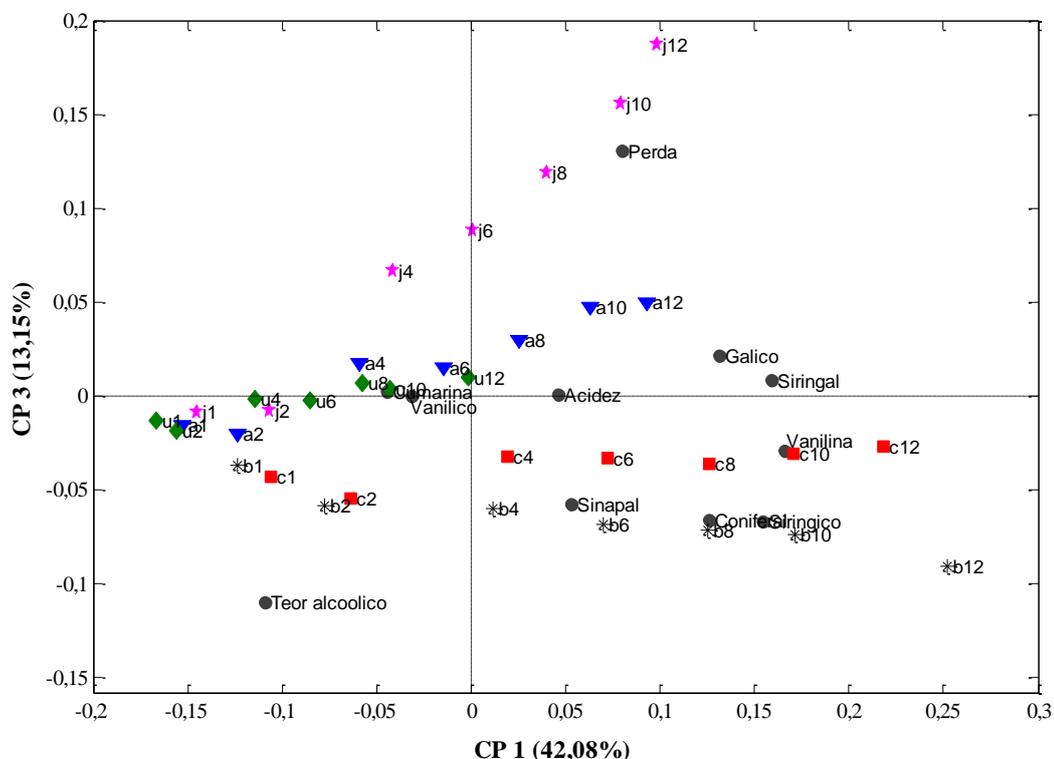


Figura 38. Gráfico biplot de CP1 versus CP3 para as amostras de cachaças envelhecidas durante um ano em barris de amendoim (▼), bálsamo (*), carvalho (■), jequitibá (★) e umburana (◆).

O gráfico biplot de CP1 versus CP3 (Figura 38) mostra a separação das amostras envelhecidas em jequitibá (a partir do quarto mês) que se caracterizaram pela perda de massa por evaporação, que, conforme já discutido, foi maior para esta madeira devido à sua maior permeabilidade. A CP3 foi a responsável por este padrão de informação, com 13% da variância total dos dados.

Dias *et al.* num trabalho publicado em 1998 [15] analisaram cachaças envelhecidas por 6 meses em barris de carvalho, umburana, bálsamo, jequitibá, jatobá e ipê. Os autores sugeriram marcadores de envelhecimento para cada uma das madeiras. Como marcadores para a umburana eles indicaram o ácido vanílico e o sinapaldeído. Tal resultado é condizente com os apontados pela presente aplicação que, além destes dois compostos, também indicou a cumarina, que não foi estudada por Dias *et al.*, como marcador para esta madeira,

Campos *et al.* em trabalho publicado em 2004 [73], analisaram uma cachaça extraída durante 48 horas em cubos tostados de umburana, bálsamo e carvalho. Os autores concluíram que a concentração de compostos fenólicos extraídos na cachaça que ficou em contato com a umburana foi maior que aquela em contato com as outras madeiras. Este resultado também é condizente com o encontrado na presente aplicação, na qual a soma de todos os compostos analisados para a cachaça envelhecida em umburana foi a maior, 128,84 mg L⁻¹. Para as demais madeiras a soma foi de 19,75 mg L⁻¹ para amendoim, 35,27 mg L⁻¹ para bálsamo, 33,74 mg L⁻¹ para o carvalho e 12,80 mg L⁻¹ para o jequitibá.

Num trabalho publicado em 2009 [18], Silva *et al.* analisaram cachaças que foram extraídas em serragens de madeiras nacionais (jatobá, cabreúva-parda, amendoim, canela-sassafrás e pequi) e carvalho por 26 dias em mesa agitadora. Concluíram que a cachaça extraída em carvalho tem maior teor dos compostos siringaldeído e coniferaldeído, enquanto a cachaça extraída nas madeiras brasileiras têm maiores teores de cumarina e catequinas. Na presente aplicação, nenhuma catequina foi estudada, no entanto a cumarina foi o composto com maior teor dentre os pesquisados, mas foi detectado apenas na cachaça envelhecida em umburana.

Em 2011, Anjos *et al.* [19] estudaram a concentração de compostos fenólicos em 100 L de cachaça envelhecida durante um ano em barril de carvalho de 200 L. Os autores concluíram que os compostos majoritários foram o siringaldeído e o ácido gálico. Além disso, encontraram correlação positiva entre as concentrações de vanilina e ácido vanílico, siringaldeído e ácido siríngico e entre o teor de fenólicos totais e a cor. E correlação negativa

entre o teor de cumarina e ácido o-cumárico. Nesta aplicação também podem ser vistas correlações positivas entre vanilina - ácido vanílico e siringaldeído - ácido siríngico, mas para todas as madeiras estudadas e não apenas para o carvalho. Tal comportamento pode ser explicado de acordo com a proposta de Puech [117] para o envelhecimento de bebidas, segundo a qual os ácidos siríngico e vanílico são produzidos a partir da oxidação de seus aldeídos fenólicos, o siringaldeído e a vanilina, respectivamente.

6.4. Conclusão

O envelhecimento de bebidas destiladas é importante porque além de melhorar suas propriedades organolépticas, agrega valor ao produto final. Sendo assim, o envelhecimento é uma etapa importante também na produção de cachaças. Além do carvalho, outras madeiras nativas são amplamente utilizadas nesta etapa, o que torna a cachaça uma bebida ainda mais peculiar. Neste trabalho, os compostos fenólicos de baixo peso molecular, sabidamente marcadores de envelhecimento, foram quantificados em cachaças envelhecidas durante um ano em barris de carvalho e de quatro madeiras nativas: amendoim, bálsamo, jequitibá e umburana. Além dos marcadores de envelhecimento, também foram determinadas a acidez total, o teor alcoólico e a perda de massa dos barris durante este tempo. Estas variáveis foram organizadas e realizou-se uma análise por PCA. Esta análise mostrou que, em quatro dos cinco tipos de madeira estudados, o período de um ano é insuficiente para diferenciar as cachaças envelhecidas. Apenas a cachaça envelhecida em umburana foi diferenciada das demais, sendo que as variáveis responsáveis por esta separação foram os maiores teores de cumarina, ácido vanílico, sinpaldeído e acidez total.

Assim, conclui-se que novos estudos devem ser feitos, com tempos maiores de envelhecimento, a fim de que se obtenha maior conhecimento acerca deste processo para as outras madeiras, possibilitando o estabelecimento de perfis característicos com base nos teores dos compostos fenólicos predominantes.

Capítulo 7

*Modificação do método de Hewitt para a determinação de
furfural em cachaças*

7. Modificação do método de Hewitt para a determinação de furfural em cachaças

7.1 Introdução

O furfural, aldeído resultante da decomposição química de carboidratos presentes no mosto, é um contaminante que tem sua concentração regulamentada pelo MAPA. Segundo a legislação brasileira, o limite máximo aceito das somas de furfural e hidroximetilfurfural é de 5 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro [1].

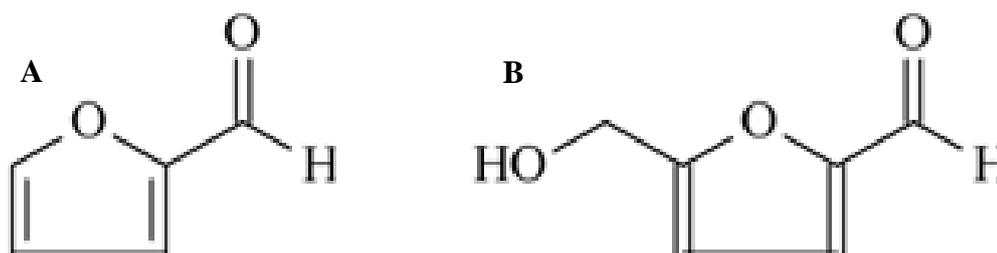


Figura 39. Estruturas do furfural (A) e 5-hidroximetilfurfural (B).

De acordo com testes realizados em laboratórios com animais (não havendo estudo conclusivo sobre este aldeído em seres humanos), o contato prolongado ou repetitivo com o furfural pode causar dermatites, irritação da mucosa e do trato respiratório, além de afetar o sistema nervoso central [130]. Os mecanismos de toxicidade deste aldeído em seres humanos ainda não foi elucidado. Segundo o *Immediately Dangerous to Life OR Health Air Concentration* (IDLH) a toxicidade do furfural é de 100 mg L⁻¹, sendo esta a concentração considerada imediatamente perigosa para a vida ou saúde [131].

Este composto pode ser formado em diferentes etapas do processo de produção da cachaça, tais como pela pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques ou mesmo durante o envelhecimento da bebida por meio da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros (hemiceluloses), que podem estar presentes nos recipientes de madeira utilizados no armazenamento da bebida [132].

O método oficial para a quantificação de furfural em bebidas destiladas é o método de Hewitt, que se baseia na reação do analito com anilina em meio ácido, após correção do volume de álcool para 50% v/v, e posterior análise do composto formado em espectrofotômetro, a 520 nm [54]. Além do método espectrofotométrico [25, 133, 134], muito autores têm utilizado HPLC [133, 135], e cromatografia gasosa [132] para a

quantificação de furfural em cachaças. Os teores relatados deste contaminante variaram de 0,006 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro [132] a 39,78 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro [25].

O método oficial tem faixa de trabalho entre 0,5 e 5,0 mg L⁻¹ de furfural [133]. Tal faixa é restrita, pois a concentração de furfural presente nas amostras é geralmente menor que o seu limite inferior, por isso este trabalho propõe uma modificação do método oficial, na qual as leituras das amostras são feitas utilizando-se uma técnica analítica mais sensível, a espectrofluorimetria.

Apesar da faixa de trabalho do método oficial satisfazer a exigência da legislação vigente, acredita-se que com o avanço das técnicas analíticas e com o aumento da demanda pela exportação de cachaça, os limites de contaminantes permitidos por lei tendam a ser cada vez menores.

Assim, o método aqui proposto se apresenta como uma alternativa aos métodos cromatográficos, que apesar de serem mais sensíveis que o método oficial, são mais dispendiosos.

7.2. Parte Experimental

7.2.1. Instrumentação

O teor alcoólico das amostras foi determinado com um densímetro automático Anton Paar DMA 4500.

As leituras das amostras foram registradas em um espectrofotômetro de arranjo de diodos modelo HP 8451 A, usando uma cubeta de quartzo de 10 mm.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Fluoromax SPEX, usando uma cubeta de quartzo de 10 mm. O comprimento de onda de excitação foi de 500 nm e os espectros de emissão foram obtidos no intervalo de 510 a 700 nm (incrementos de 1 nm). A largura das fendas dos monocromadores de excitação e de emissão foram ambas 2 nm. O tempo de integração foi de 0,1 s e o modo de aquisição dos espectros foi s/r (razão sinal-ruído).

As amostras foram homogeneizadas com o agitador de tubos Labnet. O banho termostático Nova Técnica modelo 281 foi utilizado para manter as amostras a 15 °C durante a reação.

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-20AT com detector UV-Vis modelo SPD 20A. A separação foi realizada em uma coluna Shim-Pack (octadecilsilano) de 4,6 mm x 25 cm com partículas de 5,0 µm.

7.2.2. Materiais e amostras

Foram utilizados padrões de 5-hidroximetilfurfural, furfural, anilina, cloreto estanoso e cloreto estânico (Sigma-Aldrich), etanol 99% (Synth), acetonitrila grau cromatográfico (CRQ), além de ácido acético glacial e o acetato de amônio (Quimex).

As 33 amostras de cachaças analisadas foram adquiridas no comércio local. O Anexo I contém um mapa com a localização geográfica de todas as amostras utilizadas nesta tese e o Anexo IV contém uma tabela com informações sobre as amostras utilizadas nesta aplicação.

7.2.3. Procedimentos

Foram preparadas soluções etanol: água (50% v/v) e (90% v/v).

Todas as amostras analisadas tiveram o teor alcoólico corrigido para 50% (v/v) através da adição de volumes de solução etanol: água (90% v/v).

A solução-estoque de furfural foi preparada em solução etanol:água (50% v/v) e mantida sempre sob proteção da luz. Esta solução foi avaliada e se manteve estável por nove meses, durante o período de execução dos experimentos.

Para a construção da curva de calibração para o método oficial de Hewitt, volumes adequados da solução-estoque de furfural foram transferidos para um balão volumétrico de 10,00 mL. Em seguida foram adicionadas quatro gotas de anilina, com o auxílio de pipeta Pasteur e 1,00 mL de ácido acético glacial, com o auxílio de uma micropipeta. O volume do balão foi completado, com solução etanol: água (50% v/v). Após a homogeneização, o balão foi deixado em banho termostático, a 15 °C por 15 minutos e as leituras foram realizadas no espectrofotômetro (520 nm). No preparo das amostras o procedimento foi o mesmo, porém cada balão recebeu 1,00 mL da amostra de cachaça com teor alcoólico corrigido para 90% v/v. Todas as soluções e amostras foram preparadas em triplicata.

No método de Hewitt modificado, os volumes de anilina e ácido acético glacial foram ajustados. Trabalhou-se com balões volumétricos de 5,00 mL e diluição duas

vezes da amostra, ou seja, pipetou-se 2,50 mL de amostra com teor alcoólico corrigido no balão de 5,00 mL e adicionou-se, além da quantidade da solução-estoque de furfural necessária para a adição-padrão, 55 μL de anilina e 500 μL de ácido acético glacial. Foram mantidos os procedimentos de homogeneização e resfriamento e, após os 15 minutos, as leituras foram realizadas no espectrofluorímetro utilizando um comprimento de excitação de 560 nm. Todas as soluções e amostras foram preparadas em triplicata.

As soluções de furfural para o preparo da curva para quantificação por HPLC foram preparadas em acetonitrila: água (20% v/v), em triplicata. Antes da análise cromatográfica as amostras, preparadas em triplicata, foram filtradas com filtro de membrana de nylon de 0,45 μm .

A quantificação do furfural foi realizada utilizando-se o método de padronização externa. O comprimento de onda empregado foi de 285 nm. O volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 μL e o tempo de corrida para cada amostra foi de 60 minutos. A eluição foi realizada em sistema isocrático, com fase constituída de solução acetonitrila: água (20:80 % v/v) e fluxo de 1,0 mL min^{-1} .

7.3. Resultados e Discussão

O método de Hewitt para a quantificação de furfural em cachaças baseia-se na produção de uma imina, que é o produto da condensação de uma amina primária com um aldeído, mediante catálise ácida. O produto desta reação é fortemente colorido (rosa). A equação da reação química pode ser vista na Figura 40 [136].

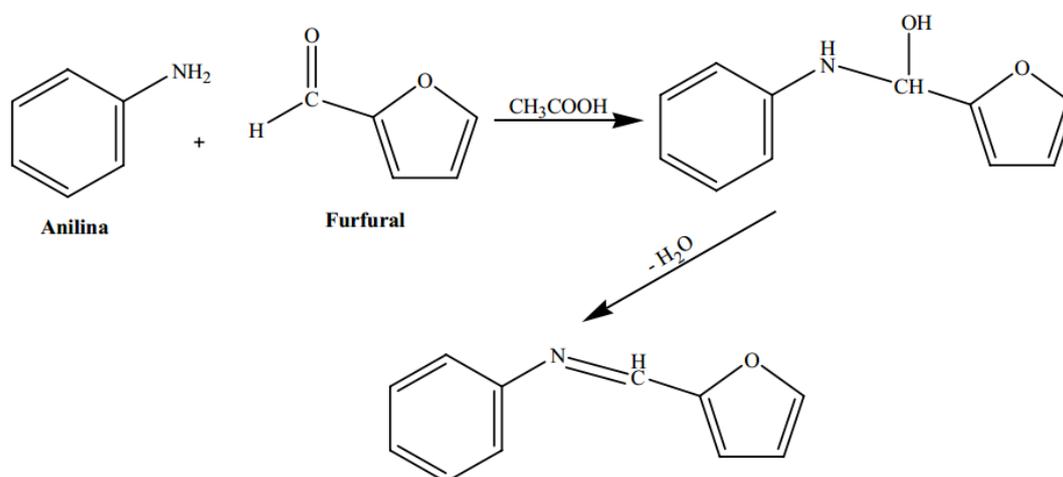


Figura 40. Representação da reação química entre anilina e furfural.

7.3.1. Método de Hewitt oficial

Inicialmente, foi construída uma curva de calibração de furfural em meio alcoólico utilizando o método de Hewitt oficial. A faixa de trabalho para este método foi de 0,50 a 5,00 mg L⁻¹ de furfural. Posteriormente, as amostras foram analisadas e a maioria delas apresentou absorvância muito menor do que aquela obtida para o menor nível de concentração quantificável pelo método. Num segundo momento, foi testado o aumento do caminho óptico, utilizando-se uma cubeta de 50 mm na intenção de aumentar a sensibilidade do método, mas não houve melhora significativa nos resultados obtidos.

7.3.2. Método de Hewitt modificado

Na tentativa de aumentar a sensibilidade do método, foram feitos testes para avaliar a fluorescência do produto formado no método de Hewitt. Estes testes indicaram que a imina formada apresentava fluorescência, o que viabilizaria a utilização da espectrofluorimetria na análise de furfural, em lugar da espectrofotometria. O interesse nesta modificação reside no fato de a técnica espectrofluorimétrica ser uma técnica analítica consideravelmente mais sensível que a técnica espectrofotométrica, além de apresentar faixas lineares mais amplas [63].

Após testes, o comprimento de onda de excitação de 500 nm mostrou ser o adequado para a obtenção do máximo de emissão desta imina, que se dá em torno de 560 nm.

A imina formada tem baixa estabilidade, então foram feitos testes para avaliar qual seria o intervalo de tempo no qual as leituras poderiam ser feitas, sem perda de sensibilidade para a quantificação. Segundo estes testes, a emissão começa a decrescer sensivelmente 20 minutos após as amostras serem removidas do banho termostático (Figura 41). Assim, estabeleceu-se que as leituras não deveriam ultrapassar este tempo. Isto reduziu a quantidade de amostras a serem preparadas por batelada, mas garantiu a maior reprodutibilidade do método.

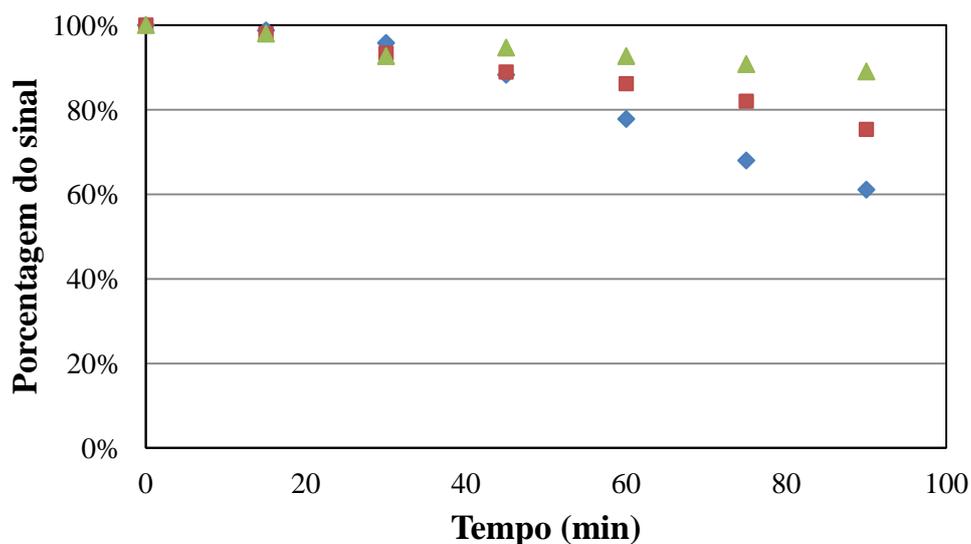


Figura 41. Estudo da estabilidade do composto formado no método de Hewitt modificado nas seguintes concentrações: 0,5 mg L⁻¹ (◆); 1,0 mg L⁻¹ (■); 3,0 mg L⁻¹ (▲).

Com o objetivo de aumentar a estabilidade das leituras, também foram feitos testes seguindo a estratégia de Cerning *et al.* [137] que propuseram que a reação deveria se processar em meio tamponado com acetato de amônio/ácido acético glacial além da presença de sais hidratados de estanho (SnCl₂ e SnCl₄). Os resultados não foram satisfatórios, porque além desta etapa tornar o método mais dispendioso, a curva obtida apresentou perda de sensibilidade frente à curva com solvente (alcoólica) e não houve ganhos na estabilidade, conforme os resultados apresentados na Figura 42.

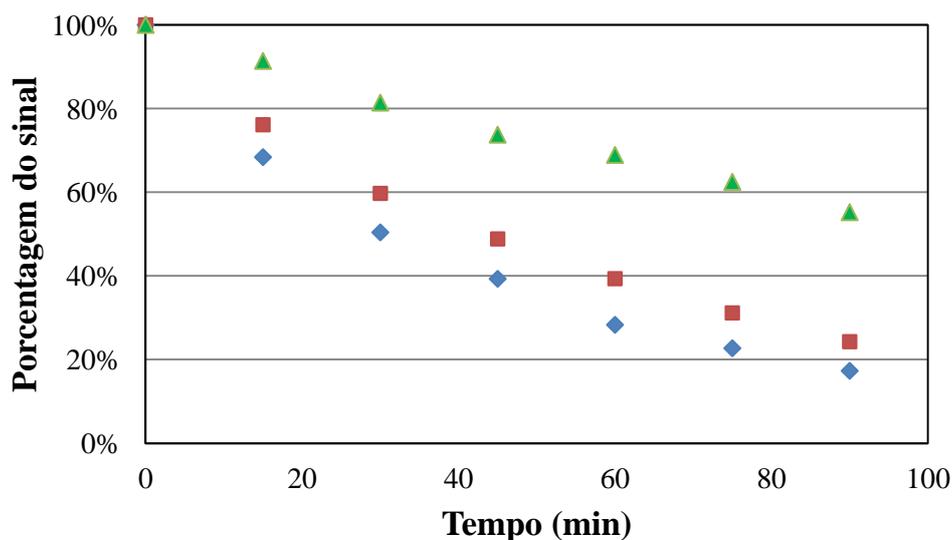


Figura 42. Estudo da estabilidade do composto formado no método de Hewitt modificado nas seguintes concentrações: 0,5 mg L⁻¹ (◆); 1,0 mg L⁻¹ (■); 3,0 mg L⁻¹ (▲), após a adição de tampão e sais de estanho ao meio reacional.

Após os testes para a otimização do tempo de leitura das amostras, foi construída uma curva de calibração de furfural em meio alcoólico, com a leitura espectrofluorimétrica. A faixa de trabalho para este método foi de 0,03 a 1,00 mg L⁻¹ de furfural. Posteriormente, as amostras foram quantificadas. Com o objetivo de comprovar a eficácia do método desenvolvido, as amostras também tiveram o teor de furfural determinado utilizando um método de referência cromatográfico (item 7.3.3.). Comparando-se os dois resultados, observou-se que o método desenvolvido apresentou teores sempre inferiores àqueles determinados cromatograficamente, o que pode ser considerado como um indício da ineficácia do mesmo para a análise de cachaça.

Devido à espectrofluorimetria ser uma técnica analítica muito sensível, ela está também mais sujeita a efeitos de matriz, o que poderia estar acontecendo com a matriz estudada. A compreensão das causas do efeito de matriz em espectrofluorimetria é tarefa complicada, especialmente no caso desta aplicação, que envolve uma reação química para a produção do fluoróforo estudado. No entanto, pode-se inferir que a presença de íons cloreto na cachaça poderia ser a causa da supressão de fluorescência, que prejudicou o desempenho do método proposto, utilizando uma curva de calibração externa. Assim, preparou-se curvas de adição-padrão, obtendo-se resultados satisfatórios, quando comparados àqueles obtidos cromatograficamente (item 7.3.4).

Convém destacar que para todas as curvas preparadas no método modificado proposto, tanto as curvas em solvente quanto a curva de adição-padrão, sempre foi preparado o branco conveniente e o sinal referente a ele foi devidamente descontado.

Outro cuidado tomado durante a otimização do método proposto foi garantir que a possível presença do 5-hidroximetilfurfural nas amostras não interferisse na quantificação do furfural. Assim, foram feitos testes substituindo o furfural pelo 5-hidroximetilfurfural e tais soluções não apresentaram bandas de emissão na região estudada (510 a 700 nm).

Na Figura 43 vê-se um espectro de emissão de fluorescência típico para uma amostra quantificada pelo método proposto. A imina formada na reação apresenta banda máxima de emissão por volta de 560 nm.

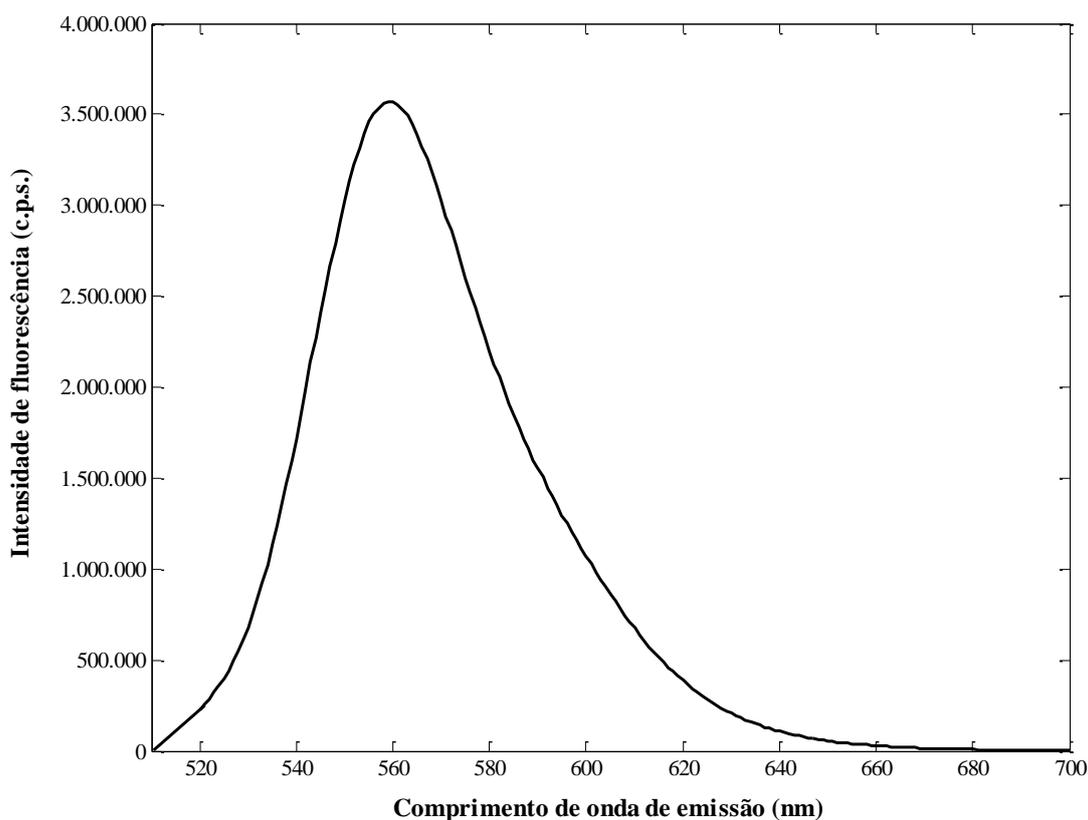


Figura 43. Espectro de emissão de fluorescência típico para uma amostra quantificada pelo método de Hewitt modificado ($\lambda_{\text{excitação}} = 500 \text{ nm}$).

7.3.3. Método cromatográfico para determinação de furfural em cachaça

O método cromatográfico utilizado para a quantificação de furfural em cachaças baseou-se em um método publicado para a quantificação de furfural e 5-hidroximetilfurfural em refrigerantes de caju (cajuína) termicamente tratados [138].

Foram preparados níveis de concentração de furfural entre 0,005 e 13,00 mg L⁻¹ para a construção da curva de calibração através da regressão linear dos dados obtidos da área do pico referente ao analito. A faixa de trabalho para a quantificação do furfural em cachaças foi de 0,10 a 3,00 mg L⁻¹. Na Tabela 8 podem ser vistos os parâmetros calculados para esta curva.

Tabela 8. Parâmetros da curva para a quantificação de furfural em cachaças comerciais por cromatografia líquida.

Composto	a	b	r	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Furfural	$4,31 \times 10^3$	$1,48 \times 10^5$	0,9995	0,015	0,030

Na Figura 44 vê-se os teores de furfural determinados cromatograficamente em 33 amostras de cachaças comerciais. A faixa de concentração do analito nestas amostras variou entre 0,015 e 0,574 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro, ou seja, todas estão dentro do limite permitido pela legislação brasileira, para este contaminante.

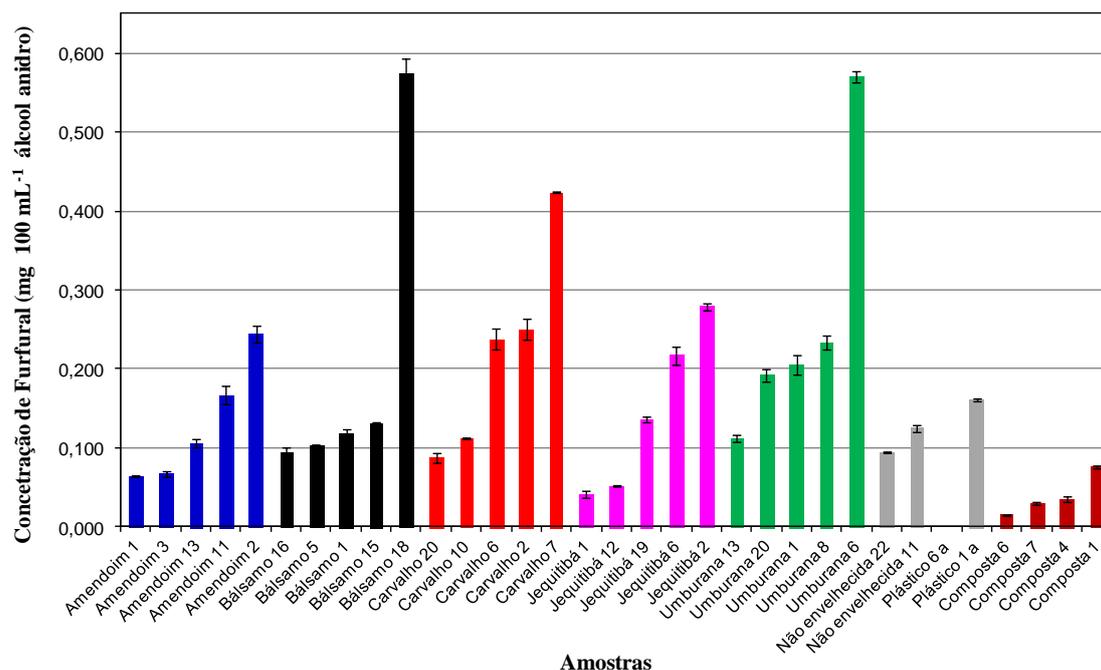


Figura 44. Teores de furfural determinados cromatograficamente para cachaças comerciais: amendoim (—), bálamo (—), carvalho (—), jequitibá (—), umbrurana (—), não envelhecida (—), plástico (—) e composta (—).

Na Figura 45 podem ser vistos os cromatogramas obtidos para sete das 33 amostras de cachaças analisadas. A amostra nomeada como pura 11 é uma amostra não envelhecida e a amostra nomeada como plástico 1 trata-se também de uma amostra não envelhecida, mas vendida em embalagem de plástico e muito consumida pelo seu baixo preço.

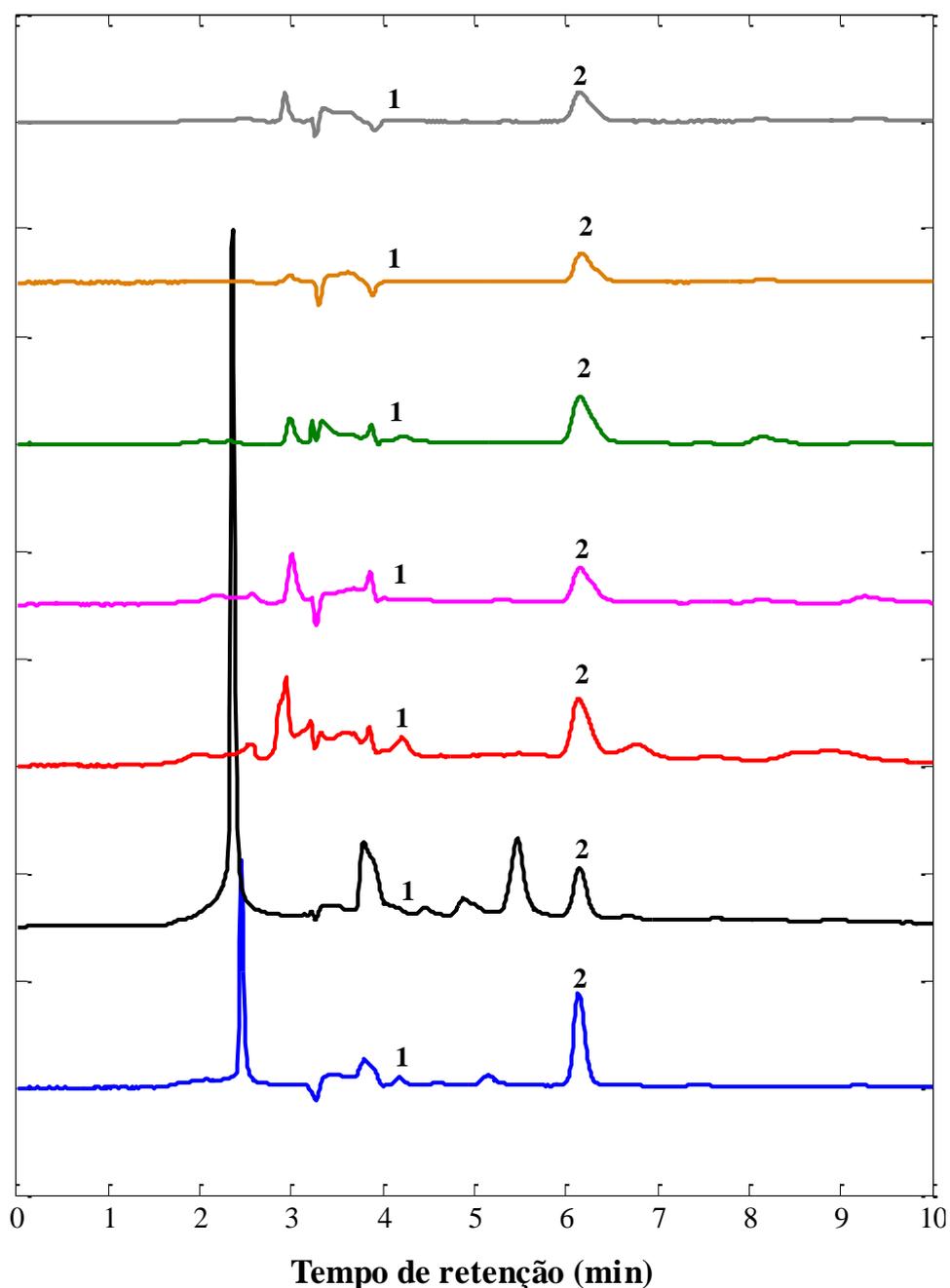


Figura 45. Cromatogramas das cachaças analisadas para a quantificação de furfural. Amendoim 2 (—), bálsamo 15 (—), carvalho 6 (—), jequitibá 19 (—), umburana 20 (—), pura 11 (—), plástico 1(—). Picos: 1) 5-hidroximetilfurfural. 2) furfural.

7.3.4. Comparação entre os métodos

Na Tabela 9 estão apresentados os teores de furfural determinados para sete diferentes amostras de cachaças comerciais obtidos por três métodos discutidos nesta aplicação: o método de Hewitt modificado, o método de Hewitt modificado com adição-padrão e o método de referência, cromatográfico.

Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos para os três diferentes métodos para quantificação de furfural em cachaças comerciais.

Amostra	Método de Hewitt modificado com calibração externa ^a	Método de Hewitt modificado com adição-padrão ^a	Método cromatográfico ^a
Amendoim 2	0,071 ± 0,002	0,289 ± 0,012	0,244 ± 0,010
Bálsamo 15	0,051 ± 0,001	0,103 ± 0,029	0,131 ± 0,002
Carvalho 6	0,064 ± 0,002	0,229 ± 0,031	0,238 ± 0,014
Jequitibá 19	0,035 ± 0,007	0,153 ± 0,022	0,136 ± 0,003
Umburana 20	0,061 ± 0,003	0,214 ± 0,021	0,192 ± 0,008
Plástico 1	0,173 ± 0,010	0,170 ± 0,043	0,161 ± 0,002
Não envelhecida 30	0,093 ± 0,004	0,198 ± 0,015	0,155 ± 0,015

^a Concentrações médias expressas em mg furfural 100 mL⁻¹ álcool anidro.

A fim de comparar os três métodos, foram realizados testes *t* pareado entre os valores determinados pelo método de Hewitt modificado usando curva de solvente e o método cromatográfico e entre o método de Hewitt modificado com adição-padrão e o método cromatográfico. No primeiro caso o teste indicou que há diferença significativa entre os dois métodos, com 95% de confiança ($t_{\text{calculado}} = 4,060 > t_{\text{crítico}} = 2,447$). Já no segundo caso o teste indicou que não existe diferença significativa entre os dois métodos, com 95% de confiança ($t_{\text{calculado}} = 1,415 < t_{\text{crítico}} = 2,447$). Logo, o método de Hewitt modificado com adição-padrão pode ser utilizado para a quantificação de furfural em cachaças, em alternativa à cromatografia.

O método proposto, apesar de utilizar adição-padrão, apresenta vantagens em relação ao método cromatográfico. A espectrofluorimetria é uma técnica muito mais simples, no que concerne à operação instrumental, além disso cada amostra requer 60 minutos de análise no método cromatográfico enquanto que com este mesmo tempo é possível o preparo e a leitura das 5 amostras que compõe a curva de adição-padrão: análise da amostra em cinco níveis de concentração (amostra sem adição, mais os 4 níveis de adição). Para o preparo da curva em triplicata são necessárias três horas, tempo suficiente para a análise de apenas três amostras no método cromatográfico.

Uma desvantagem do método espectrofluorimétrico proposto frente ao cromatográfico é a impossibilidade de quantificação do 5-hidroximetilfurfural. Além disso o método proposto faz uso da anilina, um reagente cancerígeno. Mas, com relação

à toxicidade dos reagentes utilizados, o método cromatográfico faz uso da acetonitrila, não cancerígena, mas tóxica.

7.4. Conclusão

A legislação brasileira exige a quantificação de furfural nas cachaças e estabelece o limite de 5 mg 100 mL⁻¹ de álcool anidro para este contaminante. O método analítico mais utilizado para este fim é o método de Hewitt, no qual o produto da reação entre o analito presente na amostra e a anilina é lido em espectrofotômetro, em 520 nm. Este método é pouco sensível, não detectando concentrações menores que 0,5 mg L⁻¹ de furfural na bebida. Assim, foi proposta uma modificação ao método de Hewitt, na qual o produto da reação é analisado espectrofluorimetricamente. Esta modificação somada à adição-padrão resultou em um método que não diferiu estatisticamente do método cromatográfico, utilizado como referência para a determinação do analito de interesse.

Tal método se apresenta como uma alternativa ao método cromatográfico, mais dispendioso, uma vez que se acredita que, com o aumento da demanda por exportação da cachaça, haverá também o interesse em diminuir o nível de contaminantes aceitos na bebida, o que abrirá espaço para métodos mais sensíveis e mais acessíveis para estas análises.

Capítulo 8

Conclusões Gerais e Perspectivas

8. Conclusões Gerais e Perspectivas

As aplicações presentes nesta tese tiveram como objetivo principal colaborar com os estudos sobre a cachaça, bebida tão importante para a economia e a cultura brasileira. Três destas aplicações contaram com métodos quimiométricos, que possibilitam a análise de dados multivariados, como os obtidos nesta tese.

A busca por métodos simples que facilitam a fiscalização do tipo de madeira utilizada no envelhecimento da cachaça; a presença dos compostos fenólicos oriundos do envelhecimento em madeira e a quantificação do contaminante furfural foram desenvolvidos, com êxito.

Também foi feito um estudo no qual cachaças foram envelhecidas durante um ano em barris das madeiras mais utilizadas no envelhecimento da bebida: amendoim, bálsamo, carvalho, jequitibá e umburana e durante este tempo foram analisados os perfis de compostos fenólicos, acidez total, teor alcoólico e perdas por difusão-evaporação. Ao final do estudo, verificou-se que este período foi insuficiente para diferenciar quatro, das cinco madeiras estudadas, sendo que apenas a umburana pode ser caracterizada, especialmente pelos altos teores de cumarina, ácido vanílico, sinapaldeído e pelo aumento da acidez total.

Como perspectivas, devem ser feitos estudos com tempos de envelhecimento mais longos, preferencialmente em parceria com produtores, para se conseguir um perfil completo do envelhecimento em ambiente realístico, o que facilitaria o desenvolvimento de modelos para a determinação do tempo de envelhecimento das cachaças, além da busca de marcadores químicos para cada madeira.

Pela análise dos cromatogramas das cachaças envelhecidas obtidos nesta tese, percebe-se a existência de um grande número de compostos. Provavelmente um estudo que contemple a identificação e quantificação da maioria destes compostos fornecerá um espectro mais amplo acerca do envelhecimento da bebida.

Também devem ser feitos estudos para a melhoria do método de Hewitt com o intuito de inibir o efeito de matriz observado. Isto simplificaria o método, possibilitando a quantificação do contaminante furfural em cachaças através de curva de calibração externa.

Finalmente, o uso de métodos quimiométricos na análise de espectros obtidos com técnicas analíticas sensíveis, pode ser utilizado para a quantificação de outros congêneres e contaminantes presentes nas cachaças. É importante destacar que sempre se deve fazer o uso de técnicas analíticas sensíveis, uma vez que as concentrações destes compostos encontrados na bebida são pequenas.

Capítulo 9

Referências Bibliográficas

9. Referências Bibliográficas

- [1] Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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: www.agricultura.gov.br. Acesso em 08 de setembro de 2014.
- [2] Instituto Brasileiro da Cachaça. Disponível em: www.ibraccachacas.org. Acesso em 08 de setembro de 2014.
- [3] Sebrae. "Cachaça Artesanal". Brasília: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas; 2013. Série Estudos Mercadológicos.
- [4] Silva, L.H.A; Lima, I.B. "Cachaça de Minas e desenvolvimento rural: uma análise do cooperativismo como impulso para o agronegócio". *Revista Vertentes* **2006**, 99-114.
- [5] Associação Mineira dos Produtores de Cachaça de Qualidade (AMPAQ). Disponível em: www.ampaq.com.br. Acesso em 08 de setembro de 2014.
- [6] MINAS GERAIS, Lei nº 13.949, de 11/07/2001. Estabelece o padrão de identidade e as características do processo de elaboração da "Cachaça de Minas" e dá outras providências. Disponível em: www.almg.gov.br. Acesso em 08 de setembro de 2014.
- [7] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 56, de 30 de outubro de 2002. Aprova normas relativas aos requisitos e procedimentos para registro de estabelecimentos produtores de cachaça. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em 08 de setembro de 2014.
- [8] Guerra, J.B.; Araujo, R.A.C.; Pataro, C.; Franco, G.R.; Moreira, E.S.A.; Mendonça-Hagler, L.C.; Rosa, C.A. "Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaca". *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, 33, 106-111.
- [9] Dato, M.C.F.; Pizauro, J.M.; Mutton, M.J.R. "Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of "cachaca"". *Braz. J. Microbiol.* **2005**, 36, 70-74.
- [10] Oliveira, E.S.; Cardello, H.M.A.B.; Jeronimo, E.M.; Souza, E.L.R.; Serra, G.E. "The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaca". *World J. Microb. Biot.* **2005**, 21, 707-715.
- [11] Oliveira, V.A.; Vicente, M.A.; Fietto, L.G.; Castro, I.D.; Coutrim, M.X.; Schuller, D.; Alves, H.; Casal, M.; Santos, J.D.; Araujo, L.D.; da Silva, P.H.A.; Brandão, R.L. "Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaca production". *Appl. Environ. Microb.* **2008**, 74, 693-701.

-
- [12] Duarte, W.F.; de Souza, M.V.F.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. "Effect of co-inoculation of *saccharomyces cerevisiae* and *lactobacillus fermentum* on the quality of the distilled sugar cane beverage cachaça". *J. Food Sci.* **2011**, 76, c1307-c1318.
- [13] Borges, G.B.V.; Gomes, F.D.O.; Badotti, F.; Silva, A.L.D.; Machado, A.M.D. "Selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains and accurate separation of distillate fractions reduce the ethyl carbamate levels in alembic cachaças". *Food Control* **2014**, 37, 380-384.
- [14] Badotti, F.; Gomes, F.C.O.; Teodoro, M.M.G.; Silva, A.L.D.; Rosa, C.A.; Machado, A. M. D. "Electrospray Ionization Mass Spectrometry Characterization of Musts and Alembic Brazilian Cachaças Using Selected Yeast Strains". *J. Food Sci.* **2014**, 79, C476-C483.
- [15] Dias, S.; Maia, A.; Nelson, D. "Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1998**, 18, 331-334.
- [16] Aquino, F.W.B.; Rodrigues, S.; Nascimento, R.F.; Casimiro, A.R.S. "Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits". *Food Chem.* **2006**, 98, 569-574.
- [17] 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.* **2007**, 55, 2094-2102.
- [18] Silva, A.A.; Nascimento, E.S.P.; Cardoso, D.R.; Franco, D.W. "Coumarins and phenolic fingerprint of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit". *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 3681-3691.
- [19] 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. "Evaluation of the concentration of phenolic compounds in cachaça during aging in an oak (*Quercus* sp.) barrel". *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 1307-1314.
- [20] Silva, A.A.; De Keukeleire, D.; Cardoso, D.R.; Franco, D.W. "Multivariate analyses of UV-Vis absorption spectral data from cachaça wood extracts: a model to classify aged Brazilian cachaças according to the wood species used". *Anal. Methods* **2012**, 4, 642-646.
- [21] Bernardes, C.D.; de Figueiredo, M.C.P.; Barbeira, P.J.S. "Developing a PLS model for determination of total phenolic content in aged cachaças". *Microchem. J.* **2014**, 116, 173-177.
- [22] Fernandes, W.J.; Cardoso, M.G.; Vilela, F.J.; Morais, A.R.; Silva, V.F.; Nelson, D.L. "Physicochemical quality of a blend of domestic cachaças from the south of Minas Gerais". *J. Food Comp. Anal.* **2007**, 20, 257-261.
- [23] Miranda, M.B.; Martins, N.G.S.; Belluco, A.E.S.; Horii, J.; Alcarde, A.R. "Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, 27, 897-901.

- [24] Nascimento, E.C.L.; Araújo, M.C.U.; Galvão, R.K.H. "A flow-batch analyser for UV-Vis spectrophotometric detection of adulteration in distilled spirits". *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 1061-1067.
- [25] Zacaroni, L.M.; Cardoso, M.G.; Saczk, A.A.; Santiago, W.D.; Anjos, J.P.; Masson, J.; Duarte, F.C.; Nelson, D.L. "Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana". *Quim. Nova* **2011**, 34, 320-324.
- [26] Souza, P.P.; Resende, A.M.M.; Augusti, D.V.; Badotti, F.; Gomes, F.C.O.; Catharino, R.R.; Eberlin, M.N.; Augusti, R. "Artificially-aged cachaça samples characterised by direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry". *Food Chem.* **2014**, 143, 77-81.
- [27] Granato, D.; Oliveira, C.C.; Caruso, M.S.F.; Nagato, L.A.F.; Alaburda, J. "Feasibility of different chemometric techniques to differentiate commercial Brazilian sugarcane spirits based on chemical markers". *Food Res. Int.* **2014**, 60, 212-217.
- [28] Galinaro, C.A.; Franco, D.W. "Formação de carbamato de etila em aguardentes recém-destiladas; proposta para seu controle". *Quim. Nova* **2011**, 34, 996-1000.
- [29] 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* **2002**, 25, 1074-1077.
- [30] Andrade-Sobrinho, L.G.; Cappelini, L.T.D.; Silva, A.A.; Galinaro, C.A.; Buchviser, S.F.; Cardoso, D.R.; Franco, D.W. "Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II". *Quim. Nova* **2009**, 32, 116-119.
- [31] Nóbrega, I.C.C.; Pereira, J.A.P.; Paiva, J.E.; Lachenmeier, D.W. "Ethyl carbamate in cachaça (Brazilian sugarcane spirit): Extended survey confirms simple mitigation approaches in pot still distillation". *Food Chem.* **2011**, 127, 1243-1247.
- [32] Baffa Júnior, J.C.; Mendonça, R.C.S.; Pereira, J.M.A.T.K.; Pereira, J.A.M.; Soares, N.F.F. "Ethyl-carbamate determination by gas chromatography-mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit". *Food Chem.* **2011**, 129, 1383-1387.
- [33] Anjos, J.P.A.; Cardoso, M.G.; Saczk, A.A.; Zacaroni, L.M.; Santiago, W.D.; Dórea, H.S.; 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* **2011**, 34, 874-878.
- [34] Galinaro, C.A.; Franco, D.W. "Formação de carbamato de etila em aguardentes recém-destiladas; proposta para seu controle". *Quim. Nova* **2011**, 34, 996-1000.
- [35] Riachi, L.G.; Santos, A.; Moreira, R.F.A.; de Maria, C.A.B. "A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits", *Food Chem.* **2014**, 149, 159-169.
- [36] Machado, A.M.D.; Cardoso, M.G.; Saczk, A.A.; dos Anjos, J.P.; Zacaroni, L.M.; Dorea, H.S.; Nelson, D.L. "Determination of ethyl carbamate in cachaça produced from copper stills by HPLC". *Food Chem.* **2014**, 138, 1233-1238.

-
- [37] Nascimento, E.S.P.; Cardoso, D.R.; Franco, D.W. "Quantitative ester analysis in cachaça and distilled spirits by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)". *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 5488-5493.
- [38] 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.* **2009**, 112, 747-755.
- [39] Souza, P.P.; Cardeal, Z.L.; Augusti, R.; Morrison, P.; Marriott, P.J. "Determination of volatile compounds in Brazilian distilled cachaça by using comprehensive two-dimensional gas chromatography and effects of production pathways". *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 2881-2890.
- [40] Capobiango, M.; Oliveira, E.S.; Cardeal, Z.L. "Evaluation of methods used for the analysis of volatile organic compounds of sugarcane (cachaça) and fruit spirits". *Food Anal. Method.* **2013**, 6, 978-988.
- [41] Bettin, S.M.; Franco, D.W. "Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2005**, 25, 234-238.
- [42] Tfouni, S.A.V.; Machado, R.M.D.; Camargo, M.C.R.; Vitorino, S.H.P.; Vicente, E.; Toledo, M.C.F. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection". *Food Chem.* **2007**, 101, 334-338.
- [43] Caruso, M.S.F.; Alaburda, J. "Optimization of the benzo(A)pyrene determination procedure in cachaça". *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 502-508.
- [44] Machado, A.M.D.; Cardoso, M.G.; Dorea, H.S.; Emidio, E.S.; Silva, M.M.S.; dos Anjos, J.P.; Saczk, A.A.; Nelson, D.L. "Contamination of cachaça by PHAs from storage containers". *Food Chem.* **2014**, 146, 65-70.
- [45] Bettin, S.M.; Isique, W.D.; Franco, D.W.; Andersen, M.L.; Knudsen, S.; Skibsted, L.H. "Phenols and metals in sugar-cane spirits. Quantitative analysis and effect on radical formation and scavenging". *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 215, 169-175.
- [46] Labanca, R.A.; Glória, M.B.A.; Gouveia, V.J.P.; Afonso, R.J.C.F. "Determinação dos teores de cobre e grau alcoólico em aguardentes de cana produzidas no estado de Minas Gerais". *Quim. Nova* **2006**, 29, 1110-1113.
- [47] Rocha, S.A.N.; Dantas, A.F.; Jaeger, H.V.; Costa, A.C.S.; Leão, E.S.; Gonçalves, M.R. "Spectrofotometric determination of copper in sugar cane spirit using biquinoline in the presence of ethanol and triton X-100". *Spectrochim. Acta A* **2008**, 71, 1414-1418.
- [48] Fernandes, A.P.; Santos, M.C.; Lemos, S.G.; Ferreira, M.M.C.; Nogueira, A.R.A.; Nóbrega, J.A. "Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffees and sugar-cane spirits". *Spectrochim. Acta B* **2005**, 60, 717-724.
- [49] Cardoso, D.R.; Andrade-Sobrinho, L.G.; Leite-Neto, A.F.; 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.* **2004**, 52, 3429-3433.

- [50] Souza, M.D.C.A.; Vasquez, P.; Del Mastro, N.L.; Acree, T.E.; Lavin, E.H. "Characterization of cachaça and rum aroma". *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 485-488.
- [51] 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.* **2007**, 42, 1294-1299.
- [52] Reche, R.V.; Franco, D.W. "Distinção entre cachaças destiladas em alambiques e em colunas usando quimiometria". *Quim. Nova* **2009**, 32, 332-336.
- [53] Souza, P.P.; Oliveira, L.C.A.; Catharino, R.R.; Eberlin, M.N.; Augusti, D.V.; Siebald, H.G.L.; Augusti, R. "Brazilian cachaça: "Single shot" typification of fresh alembic and industrial samples via eletrospray ionization mass spectrometry fingerprinting". *Food Chem.* **2009**, 115, 1064-1068.
- [54] Zenebon, O.; Pascuet, N.S.; Tiglea, P. (Coord.) Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4ed. 1ed digital, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2008, p. 411-445.
- [55] Hage, D.S.; Carr, J.D. "Química Analítica e Análise Quantitativa", Pearson Prentice Hall, São Paulo, 2012, p. 436.
- [56] Rocha, F.R.P.; Teixeira, L.S.G. "Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis". *Quim. Nova* **2004**, 27, 807-812.
- [57] Boscolo, M.; Andrade-Sobrinho, L.G.; Lima-Neto, B.S.; Franco, D.W. "Spectrophotometric determination of caramel content in spirits aged in oak casks". *J AOAC Int.* **2002**, 85, 744-750.
- [58] Barbosa-García, O.; Ramos-Ortíz, G.; Moldonado, J.L.; Pichardo-Molina, J.L.; Meneses-Nava, M.A.; Landgrave, J.E.A.; Cervantes-Martínez, J. "UV-Vis absorption spectroscopy and multivariate analysis as a method to discriminate tequila". *Spectrochim Acta A* **2007**, 66, 129-134.
- [59] Muñoz-Muñoz, A.C.; Pichardo-Molina, J.L.; Ramos-Ortíz, G.; Barbosa-García, O.; Maldonado, J.L.; Meneses-Nava, M.A.; Ornelas-Soto, N.E.; Escobedo, A.; López-de-Alba, P.L. "Identification and quantification of furanic compounds in tequila and mezcal using spectroscopy and chemometric methods". *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21, 1077-1087.
- [60] 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.* **2003**, 218, 83-87.
- [61] Silva, A.A.; Nascimento, E.S.P.; Cardoso, D.R.; Franco, D.W. "Identificação de extratos etanólicos de madeiras utilizando seu espectro eletrônico de absorção e análise multivariada". *Quim. Nova* **2012**, 35, 563-566.
- [62] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. "Princípios de Análise Instrumental", 5ª ed., Bookman, Porto Alegre, 2002, p. 322-341.

-
- [63] Sotomayor, M.D.P.T.; Dias, I.L.T.; Lanza, M.R.V.; Moreira, A.B.; Kubota, L.T. "Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas". *Quim. Nova* **2008**, 31, 1755-1774.
- [64] Mosedale, J.R.; Puech, J-L. "Wood maturation of distilled beverages". *Trends Food Sci Technol.* **1998**, 9, 95-101.
- [65] Dias, S.M.B.C. "Efeito de diferentes tipos de madeira sobre a composição química da aguardente de cana", dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.
- [66] Sikorska, E.; Górecki, T.; Khmelinskii, I.V.; Sikorski, M.; De Keukeleire, D. "Monitoring beer during storage by fluorescence spectroscopy". *Food Chem.* **2006**, 96, 632-639.
- [67] Sádecká, J.; Tóthová, J. "Determination of caramel in non-aged mixed wine spiris by synchronous fluorescence spectroscopy". *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, 230, 797-802.
- [68] Airado-Rodríguez, D.; Galeano-Díaz, T.; Durán-Merás, I.; Wold, J.P. "Usefulness of fluorescence excitation-emission matrices in combination with PARAFAC, as fingerprints of red wines". *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 1711-1720.
- [69] Dufour, E.; Letort, A.; Laguet, A.; Lebecque, A.; Serra, J.N. "Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy". *Anal. Chim. Acta* **2006**, 563, 292-299.
- [70] Sádecká, J.; Tóthová, J.; Májek, P. "Classification of brandies and wine distillates using front face fluorescence spectroscopy". *Food Chem.* **2009**, 117, 491-498.
- [71] Airado-Rodríguez, D.; Durán-Merás, I.; Galeano-Díaz, T.; Wold, J.P. "Front-face fluorescence spectroscopy: a new tool for control in the wine industry". *J. Food Comp. Anal.* **2011**, 24, 257-264.
- [72] Collins, C.H.; Braga, G.L., Bonato, P.S. (Orgs.). "Fundamentos de Cromatografia", Editora da UNICAMP, Campinas:, 2006. p. 18, 273.
- [73] Campos, J.O.S.; Aquino, F.W.B.; Nascimento, R.F.; Costa, J.G.M.; De Keukeleire, D.; Casimiro, A.R.S. "Influence and effect of thermal treatment in elaboration of regional woods extracts for cachaça". *J. Food Comp. Anal.* **2004**, 17, 179-185.
- [74] Aquino, F.W.B.; Rodrigues, S.; Nascimento, R.F.; Casimiro, A.R.S. "Phenolic compounds in Imburana (*Amburana cearensis*) powder extracts". *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, 221, 739-745.
- [75] Aquino, F.W.B.; Nascimento, R.F.; Rodrigues, S.; Casimiro, A.R.S. "Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, 26, 145-149.
- [76] Muniz Filho, R.C.D. "Aplicação de métodos de resolução de curvas multivariada a dados experimentais gerados por diferentes técnicas analíticas: uma visão exploratória da biossíntese da violaceína", tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2011.

-
- [77] Kennard, R.W.; Stone, L.A. "Computer aided design of experiments". *Technometrics* **1969**, 11, 137-148.
- [78] Ferreira, M.M.C.; Antunes, A.M.; Melgo, M.S.; Volpe, P.L.O. "Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial". *Quim. Nova* **1999**, 22, 724-731.
- [79] Wold, S.; Antti, H.; Lindgren, F.; Öhman, J. "Orthogonal signal correction of near infrared spectra". *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **1998**, 44, 175-185.
- [80] Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J. "Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada". *Quim. Nova* **2009**, 32, 1278-1287.
- [81] Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J. "Variable selection, outlier detection and figures of merit estimation in a partial least-squares regression multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in the alcohol industry by near-infrared spectroscopy". *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 8331-8338.
- [82] Ferreira, M.H.; Braga, J.W.B.; Sena, M.M. "Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy". *Microchem. J.* **2013**, 109, 158-164.
- [83] Botelho, B.G.; Mendes, B.A.P.; Sena, M.M. "Implementação de um método robusto para o controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. Abordagem metrológica multivariada". *Quim. Nova* **2013**, 36, 1416-1422.
- [84] Souza, S.V.C.; Junqueira, R.G. "A procedure to assess linearity by ordinary least squares method". *Anal. Chim. Acta* **2005**, 552, 25-35.
- [85] Horwitz, W. "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies". *Pure Appl. Chem.* **1995**, 67, 331-343.
- [86] Lorber, A. "Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations". *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1167.
- [87] Lorber, A.; Faber, K.; Kowalski, B.R. "Net analyte signal calculation in multivariate calibration". *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1620-1626.
- [88] Olivieri, A.C.; Faber, N.M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J.H.; Mark, H. "Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration". *Pure Appl. Chem.* **2006**, 78, 633-661.
- [89] Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R. "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis". *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835-855.
- [90] Botelho, B.G.; Mendes, B.A.P.; Sena, M.M. "Development and analytical validation of robust near-infrared multivariate calibration models for the quality inspection control of mozzarella cheese". *Food Anal. Method.* **2013**, 6, 881-891.
- [91] American Society for Testing and Materials (ASTM). *Annual Book of ASTM Standards; Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis - E1655-05*, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania, USA, 2012.

-
- [92] Williams, P.C. Implementation of near-infrared technology, em: Williams, P.C.; Norris, K. (Eds.). *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2nd ed., American Association of Cereal Chemists Inc, St. Paul, Minnesota, 2001.
- [93] Williams, P.C.; Sobering, D.C. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near-infrared calibrations?, em: Davies, A.M.C.; Williams, P.C. (Eds). *Near-Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, NIR Publications, Chichester, 1996, pp: 185-188.
- [94] 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.
- [95] Alves, J.O.; Botelho, B.G.; Sena, M.M.; Augusti, R. "Electrospray ionization mass spectrometry and partial least squares discriminant analysis applied to the quality control of olive oil". *J. Mass Spectrom.* **2013**, 48, 1109–1115.
- [96] Kuligowski, J.; Quintás, G.; Herwing, C.; Lendl, B. "A rapid method for the differentiation of yeast cells grown under carbon and nitrogen-limited conditions by means of partial least squares discriminant analysis employing infrared micro-spectroscopic data of entire yeast cells". *Talanta* **2012**, 99, 566-573.
- [97] Gondim, C.S.; Junqueira, R.G.; Souza, S.V.C. "Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos". *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2011**, 70, 433-447.
- [98] Trullols, E.; Ruisánchez, I.; Rius, X. "Validation of qualitative analytical methods". *Trend. Anal. Chem.* **2004**, 23, 137-145.
- [99] Bro, R. "Multiway calibration. Multilinear PLS". *J. Chemom.* **1996**, 10,47-61.
- [100] Hall, G.J.; Clow, K.E.; Kenny, J.E. "Estuarial fingerprinting through multidimensional fluorescence and multivariate analysis". *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 7560-7567.
- [101] Sena, M.M. "Aplicação de Métodos Quimiométricos de Primeira e Segunda Ordem na Determinação Direta de Fármacos por Espectroscopia Molecular", tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- [102] Wise, B.M.; Gallagher, N.B.; Bro, R.; Shaver, J.M.; Windig, W.; Koch, R.S. "PLS_Toolbox 5.0 for use with MATLABTM". Eigenvector Research Inc.: Wenatchee, 2008.
- [103] Godinho, M.S.; Blanco, M.R.; Neto, F.F.G.; Lião, L.M.; Sena, M.M.; Tauler, R.; Oliveira, A.E. "Evaluation of transformer insulating oil quality using NIR, fluorescence, and NMR spectroscopic data fusion". *Talanta* **2014**, 129, 143-149.
- [104] Vera, L.; Aceña, L.; Guasch, J.; Boqué, R.; Mestres, M.; Busto, O. "Discrimination and sensory description of beers through data fusion". *Talanta* **2011**, 87, 136-142.
- [105] Godinho, M.S. " Avaliação da Degradação de Óleos Isolantes usando Análise de Imagens e Técnicas Espectroscópicas Combinadas com Métodos de Calibração

Multivariada e Resolução de Curvas", tese de doutorado, Universidade Federal de Goiás, 2014.

[106] Brady, M. "Special Issue on Sensor Data Fusion - Foreword". *Int. J. Robot. Res.* **1988**, 2-4.

[107] Casale, M.; Casolino, C.; Oliveri, P.; Forina, M. "The potential of coupling information using three analytical techniques for identifying the geographical origin of Liguria extra virgin olive oil". *Food Chem.* **2010**, 118, 163-170.

[108] Casale, M.; Oliveri, P.; Casolino, C.; Sinelli, N.; Zunin, P.; Armanino, C.; Forina, M.; Lanteri, S. "Characterisation of PDO olive oil *Chianti Classico* by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques". *Anal. Chim. Acta* **2012**, 712, 56-63.

[109] Pizarro, C.; Rodríguez-Tecedor, S.; Pérez-del-Notario, N.; Esteban-Díez, I.; González-Sáiz, J. "Classification of Spanish extra virgin olive oils by data fusion of visible spectroscopic fingerprints and chemical descriptors". *Food Chem.* **2013**, 138, 915-922.

[110] Biancolillo, A.; Bucci, R.; Magrì, A. L.; Magrì, A. D.; Marini, F. "Data-fusion for multiplatform characterization of an italian craft beer aimed at its authentication". *Anal. Chim. Acta* **2014**, 820, 23-31.

[111] Di Anibal, C. V.; Callao, M. P.; Ruisánchez, I. "¹H NMR and UV-visible data fusion for determining Sudan dyes in culinary spices". *Talanta* **2011**, 84, 829-833.

[112] Alamprese, C.; Casale, M.; Sinelli, N.; Lanteri, S.; Casiraghi, E. "Detection of minced beef adulteration with turkey meat by UV-vis, NIR and MIR spectroscopy". *LWT-Food Sci. Technol.* **2013**, 53, 225-232.

[113] Ramos, P.M.; Ruisánchez, I.; Andrikopoulos, K.S. "Micro-Raman and X-ray fluorescence spectroscopy data fusion for the classification of ochre pigments". *Talanta* **2008**, 75, 926-936.

[114] Solano, M.A.; Ekworo-Osire, S.; Tanik, M.M. "High-level fusion for intelligence applications using recombinant cognition synthesis". *Inf. Fusion* **2012**, 13, 79-98.

[115] Doeswijk, T.G.; Smilde, A.K.; Hageman, J.A.; Westerhuis, J.A.; van Eeuwijk, F.A. "On the increase of predictive performance with high-level data fusion". *Anal. Chim. Acta* **2011**, 705, 41-47.

[116] de 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.* **2007**, 55, 2094-2102.

[117] Puech, J-L. "Extraction and evolution of lignin products in armagnac matured in oak". *Am. J. Enol. Vitic.* **1981**, 32, 111-114.

[118] Bahram, M.; Bro, R.; Stedmon, C.; Afkhami, A. "Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation. *J. Chemom.* **2006**, 20, 99-105.

-
- [119] Cardoso, D.R.; Frederiksen, A.M.; Silva, A.A.; Franco, D.W.; Skibsted, L.H. "Sugarcane spirit extracts of oak and Brazilian woods: antioxidant capacity and activity". *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 1109-1116.
- [120] 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". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2010**, 30, 226-232.
- [121] Singleton, V.L.; Rossi Jr., J.A. "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagentes". *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, 16, 144-158.
- [122] Paganotti, R.S.N. "Desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de própolis utilizando técnicas espectrométricas e análise multivariada", tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- [123] European Commission (EC). Directive 657. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal, L221, 8-36, Bruxelas, Bélgica, 2002.
- [124] Nishimura, K.; Matsuyama, R. Maturation and maturation chemistry. Em: Piggott, J.R.; Sharp, R.; Duncan, R.E.B. (Eds). *The Science and Technology of whiskies*, Longman, New York, 1989, pp: 235-263.
- [125] Maarse, H.; Berg, F.V.D. Current issues in flavour research. Em Piggott, J.R.; Paaterson, A. (Eds). *Distilled beverage flavour: origin and development*, Chichester, Ellis Horwood, 1989, pp: 1-17.
- [126] Jaganathan, J.; Dugar, S.M.J. "Authentication of straight whiskey by determination of the ratio of furfural to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde". *J. AOAC Int.* **1999**, 82, 997-1001.
- [127] Delgado, T.; Gomez-Cordoves, C. "Relationships between phenolic compounds of low molecular weight as indicators of the aging conditions and quality of brandies". *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41, 342-345.
- [128] Canas, S.; Quaresma, H.; Belchior, A.P.; Spranger, M.I.; Bruno-de-Sousa, R. "Evaluation of wine brandies authenticity by the relationships between benzoic and cinnamic aldehydes and between furanic aldehydes". *Ciência Téc. Vitiv.* **2004**, 19, 13-27.
- [129] MMC Parquet Hardwood Flooring. Disponível em: www.mmcparket.com. Acesso em 05 de dezembro de 2014.
- [130] Mishra, A. "Furfural: a toxic chemical". *Agric. Biol. Res.* **1992**, 8, 93-104.
- [131] National Institute of Occupation Safety and Health (NIOSH). Disponível em: www.cdc.gov/niosh/idlh/98011.html. Acesso em 06 de fevereiro de 2015.
- [132] Masson, J.; Cardoso, M.G.; Vilela, F.J.; Pimentel, F.A.; Morais, A.R.; Anjos, J.P. "Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada". *Ciênc. Agrotec.* **2007**, 31, 1805-1810.

-
- [133] Nascimento, R.F.; Cerroni, J.L.; Cardoso, D.R.; Lima Neto, B.S.; Franco, D.W. "Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para a determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1998**, 18, 350-356.
- [134] Silva, M.V.; Dias, F.M.; Alexandrino, D.M.; Oliveira, J.B.; Botêlho, P.S. "Caracterização físico-química de aguardentes artesanais de cana-de-açúcar produzidas na região sudoeste da Bahia". *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* **2012**, 14, 197-202.
- [135] Nascimento, R.F.; Marques, J.C.; Lima Neto, B.S.; Keukeleire, D.D.; Franco, D.W. "Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages". *J. Chromatogr. A* **1997**, 782, 13-23.
- [136] Lima, L.M.Z. "Influência da luz na composição fenólica, atividade antioxidante e concentração de carbamato de etila em aguardentes de cana/cachaças envelhecidas em diferentes madeiras", tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras, 2012.
- [137] Cerning, J.; Guilbot, A. "A specific method for the determination of pentosans in cereals and cereal products". *Cereal Chem.* **1973**, 50, 176-184.
- [138] Nascimento, R.F.; Aquino, F.W.B.; Amorim, A.G.N.; Prata, L.F. "Avaliação do tratamento térmico na composição química e na qualidade da cajuína". *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2003**, 23, 217-221.

Anexos

Anexos**Anexo I. Localização geográfica dos produtores de todas as
cachaças analisadas nesta tese**

Figura AI. Localização geográfica dos produtores de todas as
cachaças analisadas nesta tese.

Anexo II. Tabela contendo todas as amostras utilizadas nos modelos de classificação (Capítulo 4)

Tabela AI. Amostras utilizadas nos modelos de classificação (Capítulo 4)

Amostra	Procedência (Cidade, Estado)	Madeira	Tempo de Envelhecimento
Amendoim 1	Guaranésia, MG	Amendoim	ND
Amendoim 2	Pirapora, MG	Amendoim	ND
Amendoim 3	Bueno Brandão, MG	Amendoim	8 meses
Amendoim 4	Arceburgo, MG	Amendoim	ND
Amendoim 5	Careaçu, MG	Amendoim	ND
Amendoim 6	Pirapora, MG	Amendoim	ND
Amendoim 7	Capivari, SP	Amendoim	ND
Amendoim 8	Itatiaiuçu, MG	Amendoim	ND
Amendoim 9	Bueno Brandão, MG	Amendoim	ND
Amendoim 10	Rio Claro, SP	Amendoim	ND
Amendoim 11	Patrocínio Paulista, SP	Amendoim	ND
Amendoim 12	São Luiz do Paraitinga, SP	Amendoim	ND
Amendoim 13	Itajubá, MG	Amendoim	ND
Amendoim 14	Jarinu, SP	Amendoim	ND
Amendoim 15	Bueno Brandão, MG	Amendoim	ND
Amendoim 16	Lençóis Paulista, SP	Amendoim	6 meses
Amendoim 17	São Gonçalo do Pará, MG	Amendoim	6 meses
Amendoim 18	Canela, RS	Amendoim	1 ano
Amendoim 19	Salinas, MG	Amendoim	1 ano
Bálsamo 1	Salinas, MG	Bálsamo	3 anos
Bálsamo 2	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 3	Salinas, MG	Bálsamo	2 anos
Bálsamo 4	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 5	Novorizonte, MG	Bálsamo	5 anos
Bálsamo 6	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 7	Fortaleza, CE	Bálsamo	1 ano
Bálsamo 8	Fortaleza, CE	Bálsamo	1 ano
Bálsamo 9	Aquiraz, CE	Bálsamo	3 anos

Bálsamo 10	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 11	Sabinópolis, MG	Bálsamo	3 anos
Bálsamo 12	Aquiraz, CE	Bálsamo	2 anos
Bálsamo 13	Fortaleza, CE	Bálsamo	3 anos
Bálsamo 14	Novorizonte, MG	Bálsamo	2,5 anos
Bálsamo 15	Salinas, MG	Bálsamo	2 anos
Bálsamo 16	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 17	Rio Pardo de Minas, MG	Bálsamo	
Bálsamo 18	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 19	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 20	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 21	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 22	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 23	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Carvalho 1	Belo Vale, MG	Carvalho	3 anos
Carvalho 2	Ribeirão Preto, SP	Carvalho	6 anos
Carvalho 3	Bueno Brandão, MG	Carvalho	2 anos
Carvalho 4	Berizal, MG	Carvalho	ND
Carvalho 5	Resende, RJ	Carvalho	ND
Carvalho 6	Dores de Guanhães, MG	Carvalho	ND
Carvalho 7	Serrania, MG	Carvalho	ND
Carvalho 8	Jequitibá, MG	Carvalho	3 anos
Carvalho 9	Cláudio, MG	Carvalho	4 anos
Carvalho 10	Carandaí, MG	Carvalho	3 anos
Carvalho 11	Betim, MG	Carvalho	3 anos
Carvalho 12	Luis Alves, SC	Carvalho	ND
Carvalho 13	Ibiracatú, MG	Carvalho	ND
Carvalho 14	Coronel Xavier Chaves, MG	Carvalho	2 anos
Carvalho 15	Perdões, MG	Carvalho	ND
Carvalho 16	Garuva, SC	Carvalho	4 anos
Carvalho 17	Perdões, MG	Carvalho	4 anos
Carvalho 18	Barra de Guaratiba, RJ	Carvalho	2 anos
Carvalho 19	Cândido Mota, SP	Carvalho	ND
Carvalho 20	Serro, MG	Carvalho	ND

Carvalho 21	Paineiras, MG	Carvalho	ND
Jequitibá 1	Belo Vale, MG	Jequitibá	1,5 ano
Jequitibá 2	Divinópolis, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 3	Salinas, MG	Jequitibá	2 anos
Jequitibá 4	Dores do Turvo, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 5	Guaraciaba, MG	Jequitibá	1 ano
Jequitibá 6	Salinas, MG	Jequitibá	1 ano
Jequitibá 7	Rio Claro, SP	Jequitibá	ND
Jequitibá 8	Betim, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 9	Muzambinho, MG	Jequitibá	2 anos
Jequitibá 10	Prata, MG	Jequitibá	6 meses
Jequitibá 11	ND	Jequitibá	ND
Jequitibá 12	Novorizonte	Jequitibá	10 anos
Jequitibá 13	Rio Claro, SP	Jequitibá	ND
Jequitibá 14	Carandaí, MG	Jequitibá	6 meses
Jequitibá 15	Ouro Fino, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 16	Salinas, MG	Jequitibá	2 anos
Jequitibá 17	Abaeté	Jequitibá	ND
Jequitibá 18	Paraopeba, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 19	Ladainha, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 20	Bocaiúva, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 21	Salinas, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 22	Salinas, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 23	Senador Firmino, MG	Jequitibá	ND
Umburana 1	Januária, MG	Umburana	2 anos
Umburana 2	Januária, MG	Umburana	ND
Umburana 3	Dores do Turvo, MG	Umburana	2 anos
Umburana 4	Miravânia, MG	Umburana	ND
Umburana 5	Januária, MG	Umburana	1,5 ano
Umburana 6	Salinas, MG	Umburana	2 anos
Umburana 7	Salinas, MG	Umburana	2 anos
Umburana 8	Salinas, MG	Umburana	2 anos
Umburana 9	Nova União, MG	Umburana	2 anos
Umburana 10	Buenópolis, MG	Umburana	ND

Umburana 11	ND, MG	Umburana	Padronizada
Umburana 12	Ribeirão das Neves	Umburana	padronizada
Umburana 13	Novorizonte	Umburana	2,5 anos
Umburana 14	Salinas, MG	Umburana	2 anos
Umburana 15	Serro, MG	Umburana	ND
Umburana 16	Coração de Jesus, MG	Umburana	ND
Umburana 17	Bocaiúva, MG	Umburana	ND
Umburana 18	Santo Antônio do Itambé, MG	Umburana	ND
Umburana 19	Belo Horizonte, MG	Umburana	ND
Umburana 20	Januária, MG	Umburana	ND
Umburana 21	Salinas, MG	Umburana	ND
Umburana 22	Salinas, MG	Umburana	ND
Umburana 23	Salinas, MG	Umburana	ND

ND: Informação sobre o envelhecimento não disponível.

Anexo III. Tabela contendo todas as amostras utilizadas no modelo PLS (Capítulo 5)

Tabela AII. Amostras utilizadas no modelo PLS (Capítulo 5)

Amostra	Procedência (Cidade, Estado)	Madeira	Tempo de Envelhecimento
Amendoim 1	Guaranésia, MG	Amendoim	ND
Amendoim 2	Pirapora, MG	Amendoim	ND
Amendoim 3	Bueno Brandão, MG	Amendoim	8 meses
Amendoim 4	Arceburgo, MG	Amendoim	ND
Amendoim 5	Careaçu, MG	Amendoim	ND
Amendoim 6	Pirapora, MG	Amendoim	ND
Amendoim 7	Capivari, SP	Amendoim	ND
Amendoim 8	Itatiaiuçu, MG	Amendoim	ND
Amendoim 9	Bueno Brandão, MG	Amendoim	ND
Amendoim 10	Rio Claro, SP	Amendoim	ND
Amendoim 11	Patrocínio Paulista, SP	Amendoim	ND
Amendoim 12	São Luiz do Paraitinga, SP	Amendoim	ND
Amendoim 13	Itajubá, MG	Amendoim	ND
Amendoim 14	Jarinu, SP	Amendoim	ND
Amendoim 15	Bueno Brandão, MG	Amendoim	ND
Amendoim 16	Lençóis Paulista, SP	Amendoim	6 meses
Amendoim 17	São Gonçalo do Pará, MG	Amendoim	6 meses
Amendoim 18	Martinho Campos, MG	Amendoim	6 meses
Amendoim 19	Canela, RS	Amendoim	1 ano
Amendoim 20	Salinas, MG	Amendoim	1 ano
Bálsamo 1	Salinas, MG	Bálsamo	3 anos
Bálsamo 2	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 3	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 4	Novorizonte, MG	Bálsamo	5 anos
Bálsamo 5	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 6	Fortaleza, CE	Bálsamo	1 ano
Bálsamo 7	Fortaleza, CE	Bálsamo	1 ano
Bálsamo 8	Aquiraz, CE	Bálsamo	3 anos

Bálsamo 9	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 10	Sabinópolis, MG	Bálsamo	3 anos
Bálsamo 11	Aquiraz, CE	Bálsamo	2 anos
Bálsamo 12	Fortaleza, CE	Bálsamo	3 anos
Bálsamo 13	Novorizonte, MG	Bálsamo	2,5 anos
Bálsamo 14	Salinas, MG	Bálsamo	2 anos
Bálsamo 15	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 16	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 17	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 18	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 19	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 20	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 21	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Carvalho 1	Belo Vale, MG	Carvalho	3 anos
Carvalho 2	Ribeirão Preto, SP	Carvalho	6 anos
Carvalho 3	Bueno Brandão, MG	Carvalho	2 anos
Carvalho 4	Berizal, MG	Carvalho	ND
Carvalho 5	Resende, RJ	Carvalho	ND
Carvalho 6	Dores de Guanhães, MG	Carvalho	ND
Carvalho 7	Serrania, MG	Carvalho	ND
Carvalho 8	Jequitibá, MG	Carvalho	3 anos
Carvalho 9	Cláudio, MG	Carvalho	4 anos
Carvalho 10	Carandaí, MG	Carvalho	3 anos
Carvalho 11	Betim, MG	Carvalho	3 anos
Carvalho 12	Luis Alves, SC	Carvalho	ND
Carvalho 13	Ibiracatú, MG	Carvalho	ND
Carvalho 14	Coronel Xavier Chaves, MG	Carvalho	2 anos
Carvalho 15	Perdões, MG	Carvalho	ND
Carvalho 16	Garuva, SC	Carvalho	4 anos
Carvalho 17	Perdões, MG	Carvalho	4 anos
Carvalho 18	Barra de Guaratiba, RJ	Carvalho	2 anos
Carvalho 19	Cândido Mota, SP	Carvalho	ND
Carvalho 20	Serro, MG	Carvalho	ND
Carvalho 21	Paineiras, MG	Carvalho	ND

Jequitibá 1	Belo Vale, MG	Jequitibá	1,5 ano
Jequitibá 2	Divinópolis, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 3	Salinas, MG	Jequitibá	2 anos
Jequitibá 4	Dores do Turvo, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 5	Guaraciaba, MG	Jequitibá	1 ano
Jequitibá 6	Salinas, MG	Jequitibá	1 ano
Jequitibá 7	Rio Claro, SP	Jequitibá	ND
Jequitibá 8	Betim, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 9	Muzambinho, MG	Jequitibá	2 anos
Jequitibá 10	Prata, MG	Jequitibá	6 meses
Jequitibá 11	ND	Jequitibá	ND
Jequitibá 12	Novorizonte	Jequitibá	10 anos
Jequitibá 13	Rio Claro, SP	Jequitibá	ND
Jequitibá 14	Carandaí, MG	Jequitibá	6 meses
Jequitibá 15	Ouro Fino, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 16	Salinas, MG	Jequitibá	2 anos
Jequitibá 17	Abaeté	Jequitibá	ND
Jequitibá 18	Paraopeba, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 19	Ladainha, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 20	Bocaiúva, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 21	Salinas, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 22	Salinas, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 23	Senador Firmino, MG	Jequitibá	ND
Umburana 1	Januária, MG	Umburana	ND
Umburana 2	Miravânia, MG	Umburana	ND
Umburana 3	Januária, MG	Umburana	1,5 ano
Umburana 4	Salinas, MG	Umburana	2 anos
Umburana 5	Salinas, MG	Umburana	2 anos
Umburana 6	Buenópolis, MG	Umburana	ND
Umburana 7	ND, MG	Umburana	Padronizada
Umburana 8	Ribeirão das Neves	Umburana	padronizada
Umburana 9	Novorizonte	Umburana	2,5 anos
Umburana 10	Salinas, MG	Umburana	2 anos

Umburana 11	Serro, MG	Umburana	ND
Umburana 12	Santo Antônio do Itambé, MG	Umburana	ND
Umburana 13	Belo Horizonte, MG	Umburana	ND
Umburana 14	Januária, MG	Umburana	ND
Umburana 15	Salinas, MG	Umburana	ND
Blend 1	Salinas, MG	Bálsamo e Jequitibá	5 anos e 2 anos
Blend 2	Boa Esperança, MG	Carvalho e Jequitibá	2,5 anos e 6 meses
Blend 3	Salinas, MG	Bálsamo e Jequitibá	ND

ND: Informação sobre o envelhecimento não disponível.

Anexo IV. Tabela contendo todas as amostras utilizadas para quantificação de furfural (Capítulo 7)

Tabela AIII. Amostras utilizadas para a quantificação de furfural (Capítulo 7)

Amostra	Procedência (Cidade, Estado)	Madeira	Tempo de Envelhecimento
Amendoim 1	Guaranésia, MG	Amendoim	ND
Amendoim 2	Pirapora, MG	Amendoim	ND
Amendoim 3	Bueno Brandão, MG	Amendoim	8 meses
Amendoim 11	Patrocínio Paulista, SP	Amendoim	ND
Amendoim 13	Itajubá, MG	Amendoim	ND
Bálsamo 1	Salinas, MG	Bálsamo	3 anos
Bálsamo 5	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 15	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 16	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Bálsamo 18	Salinas, MG	Bálsamo	ND
Carvalho 2	Ribeirão Preto, SP	Carvalho	6 anos
Carvalho 6	Dores de Guanhões, MG	Carvalho	ND
Carvalho 7	Serrania, MG	Carvalho	ND
Carvalho 10	Carandaí, MG	Carvalho	3 anos
Carvalho 20	Serro, MG	Carvalho	ND
Jequitibá 1	Belo Vale, MG	Jequitibá	1,5 ano
Jequitibá 2	Divinópolis, MG	Jequitibá	ND
Jequitibá 6	Salinas, MG	Jequitibá	1 ano
Jequitibá 12	Novorizonte	Jequitibá	10 anos
Jequitibá 19	Ladainha, MG	Jequitibá	ND
Umburana 1	Januária, MG	Umburana	ND
Umburana 6	Buenópolis, MG	Umburana	ND
Umburana 8	Ribeirão das Neves	Umburana	padronizada
Umburana 13	Belo Horizonte, MG	Umburana	ND
Umburana 20	Januária, MG	Umburana	ND

Pura 11	Salinas, MG	Não se aplica	Não se aplica
Pura 22	Cláudio, MG	Não se aplica	Não se aplica
Plástico 1*	Juruaia, MG	Não se aplica	Não se aplica
Plástico 6*	Salinas, MG	ND	ND
Composta 1	Jundiaí, SP	Carvalho	Não se aplica
Composta 4	Jandaia do Sul, PR	Carvalho	Não se aplica
Composta 6	Itapeva, MG	Carvalho	Não se aplica
Composta 7	Pirassununga, SP	Carvalho	Não se aplica

ND: Informação sobre o envelhecimento não disponível.

* Cachaças vendidas em embalagens plásticas.