



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**APLICAÇÕES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR (RMN) E QUIMIOMETRIA NA
DETERMINAÇÃO DA AUTENTICIDADE DE UÍSQUES**

CAINNE ALVES GUIMARÃES

**GOIÂNIA
2019**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Caine Alves Guimarães

Título do trabalho: Aplicações de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e quimiometria na determinação da autenticidade de uísques

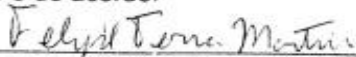
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Prof. Dr. Felipe Terno Martins
Coordenador do PRPG - UFG
S. 2E 1823600

Data: 13/06/2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Aplicações de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e
Quimiometria na determinação da autenticidade de uísques

Cainne Alves Guimarães

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal de Goiás
como exigência parcial, para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Moraes Lião

Goiânia
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Guimarães, Caine

APLICAÇÕES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E
QUIMIOMETRIA NA DETERMINAÇÃO DA AUTENTICIDADE DE
UÍQUES [manuscrito] / Caine Guimarães. - 2019.
vii, 81 f.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Lião.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2019.
Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. . I. Lião, Luciano, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado de
Cainne Alves Guimarães, aluna regularmente
matriculada no Programa de Pós-Graduação em
Química do Instituto de Química da Universidade
Federal de Goiás, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Aos dias 30 (trinta) de abril do ano de 2019 (dois mil e dezenove), com início às 14:00 hrs no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Aparecido Ribeiro de Souza (UFG), Vanessa Gisele Pasqualotto Severino (UFG) e Antônio Carlos Severo Menezes (UEG), sob a presidência do primeiro, para julgar a dissertação de Cainne Alves Guimarães intitulada: "Aplicações de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e quimiometria na determinação da autenticidade de uísques". O presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

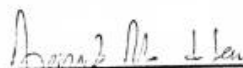
Prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Souza: APROVADA

Prof. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino: APROVADA

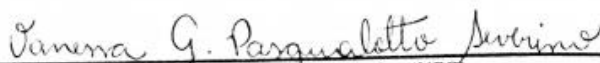
Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes: APROVADO

A seguir, na presença do público e da candidata, o presidente da Banca Examinadora declarou que Cainne Alves Guimarães, candidata ao título de Mestre em Química foi: Aprovada (☒); Reprovada (☐).

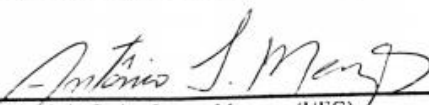
Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o senhor presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Themerson Blenner Cavalcante Souza, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 30 de abril de 2019.



Prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Oliveira (UFG)



Prof. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino (UFG)



Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes (UEG)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu marido
Roberto, pessoa de maior influência
nesta conquista, meu melhor amigo,
quem mais me apóia e incentiva.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todos os dias me abençoar, ampliar meus horizontes e iluminar minha vida.

Aos meus pais, Marilene e Zito por toda dedicação depositada em mim por todos esses anos.

Ao meu esposo Roberto, por toda paciência e compreensão da minha ausência em alguns momentos.

À minha amiga Bruna Bernardes, que mesmo distante se fez presente em muitos momentos.

Aos amigos do Laboratório de RMN: Karol, Gislane, Gerlon, Higor, Letícia, Andressa.

A Maria Carolina e Vinicius que dedicaram seu tempo corrido para me auxiliar nas análises.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Lião pela confiança.

A todos os professores e funcionários da UFG que de alguma forma colaboraram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACTS	vii
1.0 INTRODUÇÃO	16
1.1 História do uísque	17
1.2 Tipos de uísques	18
1.2-1 Classificação de uísque no Brasil	26
1.3 Fabricação do uísque	27
1.3-1 Matéria-prima	28
1.3-2 Maltagem	29
1.3-3 Maceração e cozimento	31
1.3-4 Fermentação	32
1.3-5 Destilação	32
1.3-6 Maturação	34
1.3-7 Engarrafamento	35
1.4 Composição química do uísque	36
1.5 O problema das falsificações	39
1.6 Ressonância magnética nuclear	40
1.7 Quimiometria aplicada a RMN	49
2.0 OBJETIVOS	51
2.1 Objetivos gerais	51
2.2 Objetivos específicos	51
3.0 PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1 Seleção das amostras	52
3.2 As análises de RMN de ^1H	52
3.2-1 Equipamento e acessórios	52
3.2-2 Procedimento de análise	53
3.3 Calibração de ERETIC2	54

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Supressão dos sinais	55
4.2 Efeito do tempo de relaxação	56
4.3 Identificação e atribuição dos espectros de RMN de ^1H	58
4.3-1 Álcoois	59
4.3-2 Carbamato de etila	60
4.3-3 Ácido acético	62
4.4 Análise de componentes principais	63
4.4-1 Amostras de Natu Nobillis e UF apreendidas	63
4.4-2 Amostras de Red Label e UF apreendidas	69
5.0 CONCLUSÃO	72

LISTA DE FIGURAS

1. As cinco categorias que o <i>Scotch Whisky</i> é dividido.	19
2. Algumas marcas de uísques <i>Single Malt</i> .	19
3. Algumas marcas de uísque <i>Single Grain</i> .	20
4. Algumas marcas de uísque <i>Blend Malt</i> .	20
5. Algumas marcas de uísque <i>Blend Grain</i> .	21
6. Algumas marcas de uísque <i>Blend</i> .	21
7. Tipos de matéria-prima utilizadas no uísque americano.	22
8. Uma marca de uísque <i>Bourbon</i> .	23
9. Uma marca típica do uísque <i>Tennessee</i> .	23
10. Algumas das marcas de uísque <i>Irish Single Malt</i> .	24
11. Uma marca do uísque <i>Pure Pot Still</i> .	25
12. Uma marca do uísque <i>Irish Single Grain</i> .	25
13. Marcas de uísques do tipo <i>Irish Blended</i> .	26
14. Fluxograma com as etapas do processo de fabricação do uísque.	28
15. Tipos de matérias-primas utilizadas na produção do uísque	29
16. Cevada antes da fase de germinação.	30
17. Cevada germinada.	30
18. Destiladores que produzem destilados leves(a) e pesados(b).	33
19. Exemplo de alguns tipos de barris e regiões de origem que são utilizados para etapa de maturação de destilados.	35
20. Estruturas de alguns compostos formados a partir da degradação da lignina da madeira durante a carbonização e maturação do barril.	36
21. Compostos formados em algumas etapas da fabricação do uísque.	37

22. Representação da reação de esterificação.	38
23. Representação das estruturas químicas que tem origem da degradação térmica dos derivados do ácido benzóico a partir do malte e da fumaça da turfa.	38
24. Representação do núcleo de hidrogênio, que pode apresentar um <i>spin</i> no sentido horário ($+\frac{1}{2}$) ou anti-horário ($-\frac{1}{2}$)	42
25. Representação dos <i>spins</i> em ausência e presença do campo magnético.	43
26. Precessão de um núcleo girando, resultado da presença de um campo magnético aplicado.	44
27. Sinal gerado no domínio do tempo FID, seguido da representação do espectro de uísque original após a transformada de Fourier. espectro de uísque original após a transformada de Fourier.	46
28. Representação da região dos sinais da sacarose utilizados para a calibração eletrônica (ERETIC2).	54
29. O efeito da supressão utilizando a sequência <i>lc1pngpps</i> (com supressão) frente à sequência <i>zg</i> (sem supressão).	56
30. Espectros com sequência de pulsos inversão recuperação <i>t1ir1d</i> , em que, foi variado o tempo de inversão e recuperação (D7).	57
31. Regiões características de compostos presentes no uísque.	58
32. Região expandida de álcoois superiores do espectro de RMN de ^1H de um uísque original Natu Nobillis.	59
33. Comparação da região dos sinais de alcoóis superiores em um espectro de ^1H RMN das amostras de uísque.	60
34. Região expandida de um dos sinais do carbamato de etila em um espectro de RMN de ^1H na amostra de uísque Natu Nobillis.	61
35. Região expandida do sinal da metila do ácido acético em um espectro de RMN de ^1H de uma amostra de uísque original Natu Nobillis.	62
37. Comparação da região do sinal da metila do ácido acético em um espectro de RMN de ^1H das amostras analisadas.	64
38. Comparação dos espectros de uísques de marca Natu	65

Nobillis apreendidos e original.

39. Variáveis discriminatórias da PCA.	66
40. Comparativo entre as intensidades do composto discriminatório de amostras NT originais e UF apreendidas.	66
41. Comparação da região dos sinais de açúcares em um espectro de RMN de ^1H das amostras de uísque.	68
42. Gráfico de escores da PC_1 x PC_2 para as amostras RL.	69
43. Gráfico de loadings de PC_1 .	70
44. Comparação da região dos sinais de açúcares em um espectro de RMN de ^1H das amostras de uísque.	71

LISTA DE TABELAS

1. Descrição dos códigos das amostras de uísque analisadas.	52
2. Parâmetros de aquisição e processamento dos experimentos de RMN de ^1H .	53
3. Teores de etanol das amostras pelo método ERETIC2.	67
4. Teores de etanol das amostras pelo método ERETIC2.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aq – Tempo de aquisição
B₀ – Campo magnético principal
d₁ – Tempo de espera entre cada aquisição
D₂O – Água deuterada
d₇ - Valores do *delay*
DPF – Departamento da Polícia Federal
DSS – 5-Sulfonato-2,2-dimetil-2-silapentano
ERETIC – Electronic REference To access In vivo Concentrations
FID - *Free Induction Decay*
GME – Grupo Microfluídica e Eletroforese
Hz – Hertz
INC – Instituto Nacional de Criminalística
J – Constante de acoplamento
Lb – Fator de multiplicação exponencial aplicado ao FID para aumento da
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHz – Mega Hertz
NT – Natu Nobillis
ACP – Análise dos Componentes Principais
ppm – Parte por milhão
relação sinal / ruído (Line Broadening)
RF – Radiofrequência
RL – Red Label
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
T₁ - Tempo de relaxação longitudinal (spin – rede)
TMSP-d₄ – 2,2,3,3 – trimetilsililpropionato de sódio
UV-Vis - Espectroscopia no ultravioleta visível
XBB – Canal do x-núcleo
BBI - *Broad Band Inverse Detection*
 α – Estado menor de energia
 β – Estado maior de energia
 δ – Deslocamento químico

RESUMO

Produtos mais sofisticados vêm ganhando o mercado com o aumento do poder aquisitivo da população, e isso consequentemente resultou no disparo das vendas e consumo de bebidas de maiores valores agregados, dentre essas, o uísque mostrou maior aumento no mercado nacional, o que lhe confere a alta importância econômica. Na tentativa de concorrer e lucrar no mercado, muitas quadrilhas tem sido descobertas pela Polícia Federal e Civil na falsificação desses produtos. No entanto, várias técnicas têm sido aplicadas na investigação de fraudes em bebidas, porém em sua maioria são necessários pré-tratamentos das amostras para posterior análise. Nesse contexto, a RMN surge como uma técnica que há possibilidade de obtenção de informações de cunho qualitativo e quantitativo de forma simultânea e ainda por ser um método não invasivo, não ocasionar perturbação do equilíbrio e não ser destrutivo, preservando a integridade da amostra. Este trabalho reporta a aplicação da RMN aliada a quimiometria na caracterização e distinção de amostras de uísques apreendidas pela Polícia Federal de Brasília e amostras comerciais autênticas. Compostos minoritários observados em espectros realizados com a supressão da água e do etanol permitiram a discriminação das amostras falsificadas. Ao realizar uma análise de PCA e ERETIC2 por marcas, foi possível identificar as amostras adulteradas por diluição e as que foram coloridas com corante caramelo. Em conclusão a RMN se mostrou útil na avaliação da autenticidade de uísques, de modo a indicar as alterações nas composições de bebidas falsificadas.

Palavras-chave: ^1H NMR; uísque; adulteração; quimiometria.

ABSTRACT

More sophisticated products have been gaining the market with the increasing purchasing power of the population, and this consequently resulted in the triggering of sales and consumption of higher value-added beverages, among these, the whiskey showed greater increase in the national market, which gives it its high economic importance. In an attempt to compete and profit from the market, many gangs falsifying these products have been discovered by the Federal and Civil Police. However, several techniques have been applied in the investigation of fraud in beverages, but the pre-treatments of most of the samples are necessary for further analysis. In this context, NMR appears as a technique that can obtain information of a qualitative and quantitative nature simultaneously and for being a non-invasive method, not cause disturbance of balance and not be destructive, preserving the integrity of the sample. This work reports the application of NMR combined with chemometrics in the characterization and distinction of whiskey samples seized by the Federal Police of Brasilia and authentic commercial samples. Minority compounds observed in spectra performed with the suppression of water and ethanol allowed discrimination of the counterfeit samples. When performing an analysis of PCA and ERETIC2 per brand, it was possible to identify adulterated samples by dilution and those that were colored with caramel coloring. In conclusion NMR was useful in assessing the authenticity of whiskeys, in order to indicate changes in counterfeit beverage compositions.

Keywords: ^1H NMR; whisky; adulteration; chemometrics.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DO UÍSQUE

Na tentativa de discriminar a autenticidade do uísque, muitas técnicas têm sido utilizadas, mas a RMN aliada a quimiometria surge com um novo propósito de não somente discriminar o perfil químico dessas bebidas, assim como quantificar o teor de etanol. Sem qualquer tratamento prévio de preparo de amostra, sendo um procedimento fácil, rápido e não degradativo.

Muitos mistérios estão envolvidos na história do uísque. Há relatos de que em 1000-1200 dC, sem as uvas para produzirem seus vinhos, os monges viajantes levaram o processo de destilação da Europa continental para a Escócia e para Irlanda, e usavam grãos de cereais ao invés de uvas para esse processo, resultando assim, nas primeiras destilações do uísque moderno. Há um primeiro registro sobre uísque no Tesouro Público da Escócia, que se refere a uma compra realizada pelo frei John Cor para fazer a *aquavita*, mas existem poucos documentos históricos e muitas controvérsias quando se trata de informações referentes a quem realmente inventou o uísque.³

A maioria das bebidas alcoólicas destiladas tem raízes com a sua matéria-prima básica, seja ela uva, grão ou açúcar. O nome genérico latino dado a estes produtos destilados foi “*aqua vitae*” (A água da vida)¹, esta expressão corresponde em gaélico a *uisge beatha*, que com passar dos anos, teve sua pronuncia abreviada para o *usky* e finalmente a *whisky*.²

Em 1570 na Escócia, já haviam muitas destilarias de pequeno porte que fabricavam uísque, que em 1644 foram obrigadas a pagar taxas de tributos referentes a essas bebidas que eram produzidas para venda. Para não efetuar o pagamento dessas taxas, os produtores começaram a procurar alternativas, e assim acabaram fazendo com que a comercialização ocorresse em áreas mais distantes. Em 1823 houve a aprovação de uma lei que regulamentou a fabricação da bebida e em 1825 já haviam 263 destilarias licenciadas, muitas dessas ainda estão em operação.³

O número de destilarias de uísque na Europa é grande e se torna a cada dia mais crescente. Na Alemanha a fabricação de uísque começou por volta de 1960 e desenvolvendo-se a partir de 1984. As receitas escocesas inspiraram muitos países na produção de uísque, um deles foi a França. Dentre outros países europeus produtores da bebida estão a Inglaterra, a Áustria, a Bélgica, a Espanha, a Finlândia, a Holanda, a Letônia, a República Checa, a Suécia e a Suíça.³

1.2 TIPOS DE UÍSQUES

Em meados do século XVI o uísque era produzido apenas a partir da maltagem dos grãos de cevada em alambiques com uso de turfa para conferir aromas defumados à bebida. Devido ao aumento do consumo, a bebida passou a ser produzida também a partir de outros cereais, como trigo, centeio e milho.^{1,2} Embora todos os uísques tenham características organolépticas semelhantes, com variações da matéria-prima em sua produção e do tempo de envelhecimento, o uísque passou a obter diferentes classificações. Existem três principais grupos de uísques: (1) *Scotch Whisky*; (2). *American Whiskey* e (3). *Irish Whiskey*.

1.Scotch Whisky: Para entrar nessa categoria o uísque deve ser produzido na Escócia, a partir de água e cevada maltada, ou outros grãos inteiros de cereais, e fermentado somente pela adição de fermento. Além disso, a bebida sai dos destiladores com no máximo 94,8% de álcool por volume, porém é engarrafada com pelo menos 40% de álcool por volume. Seu envelhecimento é de no mínimo 3 anos em barris de carvalho com capacidade máxima de 700 litros. Esse grupo de uísque é dividido em cinco categorias, como são apresentadas na Figura 1:

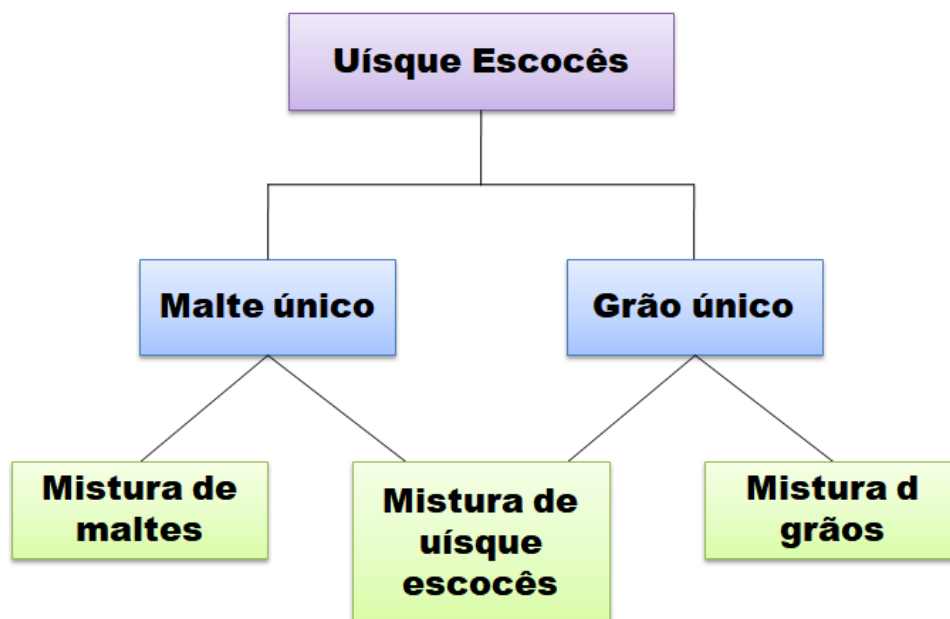


Figura 1: As 5 categorias de divisão do *Scotch Whisky*. Fonte: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

Single Malt



Figura 2: Algumas marcas de uísques *Single Malt*. Fonte: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

A Figura 2 apresenta algumas marcas do uísque *Single Malt*. Essa categoria de uísque envolve bebidas que são completamente destiladas de cevada e são elaboradas de uísque de malte de uma única destilaria. Esse tipo de bebida é considerado o mais caro e raro.

Single Grain



Figura 3: Algumas marcas de uísque *Single Grain*. Fonte:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

São bebidas produzidas de diversos grãos, porém produtos de uma única destilaria, podendo conter ou não cevada maltada em sua composição. O grande diferencial do *Single Grain* é o processo de destilação, já que se realiza com destiladores contínuos. Não é fácil encontrá-lo, já que a maior parte da produção é usada na fabricação dos *Blended Whiskies*.

Blend Malt



Figura 4: Algumas marcas de uísque *Blend Malt*. Fonte:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

Neste tipo de uísque existe a combinação de maltes de diferentes destilarias. Antigamente eles eram chamados de *Vatted Malt Whisky*, ou *Pure Malt*. Aqui no Brasil tem, por exemplo, o *Johnnie Walker Green Label* (Figura 4), um 15 anos da *Diageo*, resultante da mistura de quatro *Single Malt*: *Talisker*, *Linkwood*, *Cragganmore* e *Caol Ila*.

Blend Grain



Figura 5: Algumas marcas de uísque *Blend Grain*. Fonte:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

São bebidas que são constituídas de dois ou mais *Single Grain*, produzidos em destilarias diferentes.

Scotch Whisky Blend



Figura 6: Algumas marcas de uísque *Blend*. Fonte:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

Nesta categoria estão os uísques que podem ser feitos a partir de uma mistura de destilações diversas de uísques de malte e grãos e em várias destilarias diferentes. Sua composição é de 40% *Single Malt* e 60% *Single Grain*.

2. American Whiskys

A produção e rotulagem do uísque americano são regidas pelo Título 27 do Código de Regulamentos Federais dos EUA. Para que o uísque seja rotulado nessa categoria, ele deve ser destilado para não mais que 80% de álcool por volume, para que possa haver uma garantia do sabor do mosto original. É extremamente proibida a adição de corante, caramelo e qualquer outro tipo de aditivo aromatizante. Assim eles são rotulados como *Straight whiskey*. Exceto o uísque de milho, todos devem ser envelhecidos em recipientes novos de carvalho carbonizados.

De acordo com o tipo de matéria-prima utilizada o uísque americano pode ser classificado de seis tipos, como é apresentado na Figura 7.

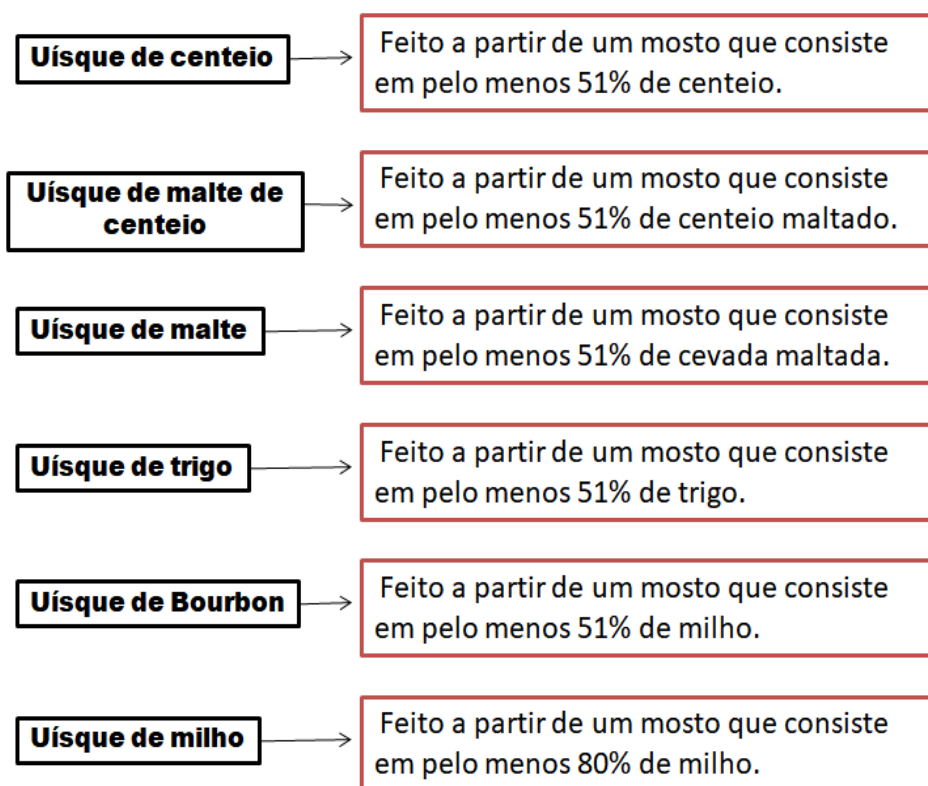


Figura 7: Tipos de matéria-prima utilizadas no uísque americano. Adaptado de: "Standards of Identity for Distilled Spirits, Title 27 Code of Federal Regulations,

Pt. 5.22". [<https://www.govinfo.gov/content/pkg/CFR-2008-title27-vol1/pdf/CFR-2008-title27-vol1-sec5-22.pdf>]

Duas classes importantíssimas nos Estados Unidos mais consumidas são:

Whisky- Bourbon



Figura 8: Uma marca de uísque *Bourbon*. Fonte: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

Um uísque que como foi citado anteriormente é produzido com 51% de milho, sai dos destiladores com no máximo 80% de álcool por volume. Seu destilado segue para envelhecimento em barris tostados e virgens de carvalho com o máximo de 62% de álcool por volume e é engarrafado com 40%. A Figura 8 apresenta uma marca desse tipo de uísque.

Whisky Tennessee



Figura 9: Uma marca típica do uísque *Tennessee*. Fonte: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

Esse tipo de uísque é produzido apenas no estado do Tennessee. Sua produção é semelhante a do *Bourbon*, a diferença encontra-se na filtragem do destilado em uma coluna de carvão antes de colocar no barril de carvalho para etapa de envelhecimento. A Figura 9 apresenta uma marca típica desse uísque.

3. Irish whisky

São uísques produzidos na Ilha da Irlanda. As regras estabelecidas pela Legislação irlandesa de 1980 expõe duas leis básicas:

- ✓ Deve ser produzido e envelhecido em barris de carvalho por pelo menos 3 anos, na Irlanda ou na Irlanda do Norte.
- ✓ Ao sair dos destiladores necessita obedecer à graduação alcoólica de no máximo 94%, de modo que o destilado apresente um aroma e um sabor provenientes dos materiais utilizados e devem apresentar um teor alcoólico final em volume de 40%.

As bebidas provenientes dessa região dividem-se em 4 categorias: *Irish Single Malt*, *Pure Pot Still*, *Irish Single Grain* e *Irish Blended*.

Irish Single Malt



Figura 10: Algumas das marcas de uísque *Irish Single Malt*. Fonte:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

São produzidos totalmente por cevada maltada em alambiques de cobre em uma única destilaria. A figura 10 mostra algumas marcas desse tipo de uísque.

Pure Pot Still



Figura 11: Uma marca do uísque Pure Pot Still. Fonte: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

Um estilo de uísque produzido por uma única destilaria a partir de uma mistura de cevada maltada e não maltada. São produzidos em alambiques de cobre. Na Figura 11 está apresentada uma marca desse tipo de uísque.

Irish Single Grain



Figura 12: Uma marca do uísque Irish Single Grain. Fonte: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

São uísques produzidos do milho e sua destilação é feita em destiladores de coluna em uma única destilaria. A Figura 12 apresenta uma marca desse tipo de uísque.

Irish Blended



Figura 13: Marcas de uísques do tipo *Irish Blended*.

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf

Essa classe de uísque é uma mistura de *Single Grain* e *Single Malt* ou ainda de *Single Grain*, *Single Malt* e *Pure Pot Still*. A Figura 13 apresenta algumas marcas desse tipo de uísque.

1.2-1 Classificação de uísque no Brasil

No Brasil, de acordo com o Decreto nº 6871 de 04 de junho de 2009 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) o uísque pode ser classificado como:

“I - Uísque malte puro ou uísque puro malte, quando a bebida for elaborada exclusivamente com destilado alcoólico simples de malte envelhecido ou malte uísque, com o coeficiente de congêneres (voláteis não-álcool) não inferior a trezentos e cinquenta miligramas por cem mililitros em álcool anidro;

II - Uísque cortado ou *blended* uísque, quando a bebida for obtida pela mistura de, no mínimo, trinta por cento de destilado alcoólico simples de malte envelhecido ou malte uísque, com destilados alcoólicos simples de cereais, álcool etílico potável de origem agrícola ou ambos, envelhecidos ou não, com o coeficiente de congêneres não inferior a cem miligramas por cem mililitros, em álcool anidro;

III - Uísque de cereais ou *grain* uísque, quando a bebida for obtida a partir de cereais reconhecidos internacionalmente na produção de uísque, sacarificados, total ou parcialmente, por diástases (enzimas que atuam sobre o amido) da cevada maltada, adicionada ou não de outras enzimas Naturais e destilada em alambique ou

coluna, envelhecido por período mínimo de dois anos, com o coeficiente de congêneres não inferior a cem miligramas por cem mililitros, em álcool anidro;

IV - *bourbon* uísque, *bourbon* whiskey, *tennessee* uísque ou *tennessee* whiskey, quando o uísque for produzido nos Estados Unidos da América de acordo com a sua legislação.³

Como foi citado acima, existem vários tipos de uísque. O sabor e as propriedades organolépticas dessa bebida vão depender especificamente do tipo de matéria-prima utilizada e ainda do processo de fabricação a qual ela é empregada.

1.3 FABRICAÇÃO DO UÍSQUE

A fabricação do uísque é uma prática antiga que tem sido desenvolvida e aperfeiçoada com o passar do tempo, evoluindo da produção caseira para o processo de precisão. Muitos fatores influenciam no sabor e caráter de um uísque: os tipos de grãos e leveduras usadas, o local de repouso, até mesmo o barril e o tempo de maturação dentro dele. Para chegar ao consumidor, as etapas de fabricação são minuciosas. O fluxograma abaixo (Figura 14) mostra as etapas de um processo de fabricação de uísque:



Figura 14: Fluxograma com as etapas do processo de fabricação do uísque.

1.3-1 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima é de grande importância no processo de fabricação do uísque, já que ela pode definir o tipo de uísque que será produzido. Sendo assim, na Figura 15 são definidas os tipos de matérias-primas que podem ser usadas neste processo.

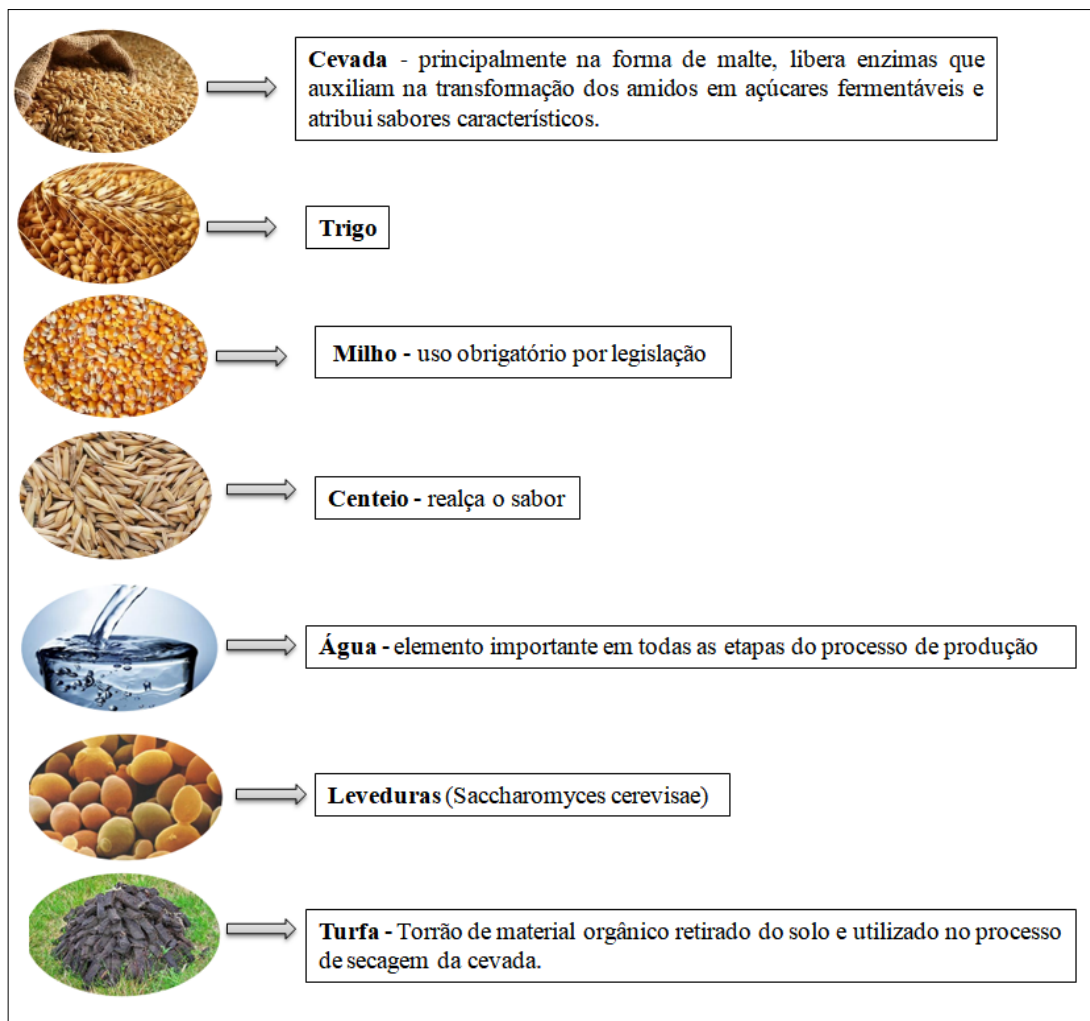


Figura 15: Tipos de matérias-primas utilizadas na produção do uísque. Adaptado de:

<http://www.singlemaltbrasil.com.br/whisky/producao-%E2%80%9494-maltagem-malting/>

1.3-2 MALTAGEM

A cevada é artificialmente germinada, ocorre em um período de aproximadamente sete dias. Com a água simula-se o processo de germinação natural que só ocorreria no período de primavera. Para isso, esse processo passa por três etapas:

- ✓ **Infusão:** Por cerca de dois dias a cevada é encharcada de água, com intuito de catalisar o processo de germinação dos grãos. Essa água é responsável por ativar as enzimas no embrião para que haja a quebra das paredes de acesso às reservas de amido que estão no processo de endosperma do grão da cevada. Ao final desse

processo, a cevada encontra-se com 46% de água.⁶ No início dessa fase a cevada encontra-se da seguinte forma (Figura 16):



Figura 16: A cevada antes da fase de germinação. Adaptado de:
<http://www.singlemaltbrasil.com.br/whisky/producao-%E2%80%9494-maltagem-malting/>

✓ **Germinação:** Esses grãos são espalhados em um local de concreto e germinam, aumentando de tamanho. Quando o processo de crescimento desses brotos é iniciado, como pode ser visto na Figura 17, significa que as células do amido então sendo quebradas em células menores que resultarão em amido solúvel, a germinação é interrompida seguir para o processo final.⁶



Figura 17: Cevada germinada. Adaptado de:
<http://www.singlemaltbrasil.com.br/whisky/producao-%E2%80%9494-maltagem-malting/>

✓ **Secagem:** Nesta fase, um forno especial que é aquecido pela turfa seca o broto do malte, produzindo pouca chama, porém muita fumaça, que impregna-se no malte, dando-lhe um aroma específico. Como a turfa é um material rico em matéria orgânica, ele literalmente repassa as características da região para o malte.⁶

Vale ressaltar que somente a cevada possui a capacidade de transformar amido em açúcares, no caso de uísque feito com outros grãos, no caso do milho e outros, eles serão cozidos sob pressão, para que possa haver a liberação das enzimas que quebrarão o amido em açúcares fermentáveis.

1.3-3 MACERAÇÃO E COZIMENTO

Nessa etapa, o malte seco é moído em um tonel de madeira ou aço, tornando-se uma espécie de farinha, para que os amidos que se transformarão em açúcares fermentáveis possam ser extraídos. Esta farinha é misturada com água quente em três etapas:

✓ Primeira etapa: Nesse tonel de madeira ou aço é adicionada água a 64°C, e o líquido resultante dessa mistura é chamado de mosto. Após cozinhar por cerca de 30 minutos o mosto é transferido para um tonel coletador temporário. É importante ressaltar, que o controle de temperatura é um fator que deve ser levado à risca, pois uma temperatura muito elevada pode vim a inutilizar as enzimas do malte moído.⁶

✓ Segunda etapa: Água é adicionada ao tonel de madeira ou aço com temperatura de 70°C a 85°C, para que os açúcares remanescentes do malte sejam extraídos. Esse processo, assim como o anterior leva cerca de 30 minutos. Isso garante que 90% do amido do malte foi convertido em açúcares. E esse líquido é adicionado no mesmo tonel coletor temporário em que foi adicionado o líquido após a primeira água.⁶

✓ Terceira etapa: A terceira e ultima água com temperatura de 80°C a 95°C é novamente é adicionada ao tonel de madeira ou aço, com mesmo fim de quando a segunda água foi adicionada. Esse último mosto possui aproximadamente 1% de

açúcares, que não serve para ser adicionado junto com os dois primeiros coletados, mas sim com a primeira água do novo processo de cozimento.⁶

1.3-4 FERMENTAÇÃO

O mosto que foi produzido na fase anterior é resfriado à 20°C. Em seguida é colocado em grandes tonéis de madeira ou aço, onde as leveduras são adicionadas e começam a atuar para que se dê início ao processo de fermentação. E novamente o controle de temperatura é primordial, pois se o mosto estiver a uma temperatura muito alta as leveduras podem morrer.

As leveduras se alimentam dos açúcares do mosto, da maltose e da glicose, gerando como subprodutos gás carbônico, álcool e congêneres. Todos os açúcares são consumidos pelas leveduras em 48h, dessa forma a quantidade de álcool torna o ambiente nocivo a essas leveduras que se precipitam no fundo do tonel. Uma nova fermentação malolática é iniciada, quando bactérias que produzem ácido láctico se proliferam, diminuindo do pH do mosto e marcando o aparecimento de novos congêneres como ácidos e ésteres. O processo de fermentação dura cerca de 48 a 120 horas e o mosto fermentado possui cerca de 5% a 8%.⁶

1.3-5 DESTILAÇÃO

Nesse processo haverá a separação do álcool da água, essa separação ocorre por meio das diferenças do ponto de ebulição das duas substâncias, 100°C da água e 78°C do álcool. O mosto que foi produzido na etapa de fermentação, com cerca de 5% a 8% é transferido para destiladores de cobre, pois o cobre é um metal que dentre os outros, apresenta um bom resultado quando sua superfície entra em contato com álcool, diminuindo o aparecimento de impurezas e componentes indesejáveis no destilado.⁶

Esses destiladores possuem um formato de cebola na base e um formato de pescoço de cisne na parte de cima, quanto mais alto esse pescoço mais leve será o destilado, já que o refluxo previne que os alcoóis mais pesados escalem suas paredes. Porém, vale ressaltar que um destilado mais leve não significa ter uma melhor

qualidade, pois muitas destilarias produzem destilados com caráter mais pesado, mas de excelente qualidade. A Figura 18 apresenta destiladores que produzem destilados mais leves e pesados.⁶



Figura 18: Destiladores que produzem destilados leves(a) e pesados(b). Fonte: <http://www.singlemaltbrasil.com.br/whisky/producao-%E2%80%94destilacao/>

Após colocar o mosto fermentado nos destiladores, eles são aquecidos e atingem cerca de 80°C. Como o ponto de ebulição do álcool é à temperatura de 78°C, ele começa a ebulir e subir pelas paredes dos destiladores até chegar aos condensadores. Como resultado dessa primeira destilação, tem-se líquidos com graduação alcoólica em torno de 20%. Antes de seguir para o segundo destilador, o destilado é misturado com o líquido que não foi utilizado da segunda destilação anterior, o que já o faz aumentar um pouco a graduação alcoólica de 20% para 28%, esse aumento é importante para garantir que o líquido que vai para segunda destilação apresente um grau alcoólico alto e suficiente para que o destilado final atinja uma graduação próxima de 70%.⁶

Os vapores de álcool que vai subindo as paredes dos destiladores possuem três graduações alcoólicas diferentes, conhecida como:

- ✓ CABEÇA, escoamento inicial: Este primeiro escoamento dura cerca de 15 a 30 minutos, tem uma graduação alcoólica de 75% a 80% , porém é cheio de impurezas. Por isso ele não é aproveitado e volta para a primeira destilação.

- ✓ CORAÇÃO, escoamento médio: Este segundo escoamento contém vários tipos de ésteres, que darão ao destilado suas particularidades. Dessa forma, é essa parte que será aproveitada para a etapa de maturação em barris de carvalho.
- ✓ CAUDA, escoamento final: Assim como o primeiro escoamento, volta para fazer parte da primeira destilação.⁶

1.3-6 MATURAÇÃO

O produto final da destilação, antes de ser encaminhado para os barris de envelhecimento é diluído até 63,5%, que é uma graduação alcoólica considerada ótima para maturação. Porém, essa porcentagem aumenta quando o destilado ficar por muito tempo no envelhecimento, 30 anos por exemplo, precisa ser igual ou superior a 70%. Isso devido a evaporação do álcool no barril, podendo acarretar problemas no engarrafamento, não obtendo um uísque com graduação alcoólica de 40%.

Durante o processo de maturação o destilado é incorporado com compostos presentes no barril, fornecendo taninos, sabores e aromas, que dependerá do tipo de carvalho utilizado. Esses barris são tostados antes de servir de recipiente de envelhecimento, e assim eles agem como uma espécie de filtro que filtra as impurezas. A utilização de carvalhos de diferentes regiões influenciará nas características da bebida final. Alguns tipos de barris utilizados na indústria são mostrados na Figura 19.⁶



Figura 19: Exemplo de alguns tipos de barris e regiões de origem que são utilizados para etapa de maturação de destilados. Adaptado de:

Em relação à importância do tamanho, quanto menor o barril mais rápido será o processo de maturação, devido ao fato de haver um maior contato da bebida com a madeira. O clima da região também influencia, por exemplo, em um ambiente mais quente e com uma grande amplitude térmica, o processo de maturação ocorrerá mais rápido, já que o destilado dentro do barril se expandirá e haverá contrações com maiores frequências.

1.3-7 ENGARRAFAMENTO

Como foi falado anteriormente, a maioria dos uísque são compostos de misturas, até no caso das *Single malt* que são mistura de vários barris de uma mesma destilaria. Essa mistura é importante para que haja uma homogeneização das características do produto final. Pois os barris mesmo advindos da mesma região, e possuam o mesmo tamanho, não tem características idênticas, que impactará de maneira distinta a maturação. Após essa mistura ocorre a diluição do produto final para a graduação alcoólica desejada. E ficará cerca de umas 12 semanas repousando para incorporar. As partículas em suspensão que são formadas durante todo o

processo, serão eliminadas por uma filtração a frio. E assim, o uísque está pronto para ser engarrafado.⁶

Após os processos de fabricação, o uísque assume um perfil químico composto de particulares, se tornando assim, uma bebida bastante complexa em termos de composição química.

1.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO UÍSQE

Os processos envolvidos na fabricação do uísque, como a fermentação, a destilação e a maturação possuem impacto direto na formação do perfil químico da bebida final. Com o avanço de estudos acerca da composição do uísque, o número de compostos conhecidos aumentou significativamente.⁷ Principalmente os que são formados na etapa de maturação, pela absorção de componentes da madeira do barril, como o coniferaldeído, a vanilina e o siringaldeído, que estão apresentados na Figura 20. A madeira mais utilizada é o carvalho, que consiste de aproximadamente 10% (m/v) de óleos voláteis, ácidos voláteis e não voláteis, açúcares, taninos, pigmentos e compostos inorgânicos. Porém a composição do extrato depende de alguns fatores, tais a reutilização ou não da madeira, o tempo de envelhecimento, sua espécie, etc.⁸ Durante esse processo de maturação, a concentração de aldeídos voláteis e ésteres aumenta gradativamente, enquanto a acidez total sobe apenas nos primeiros anos.⁹

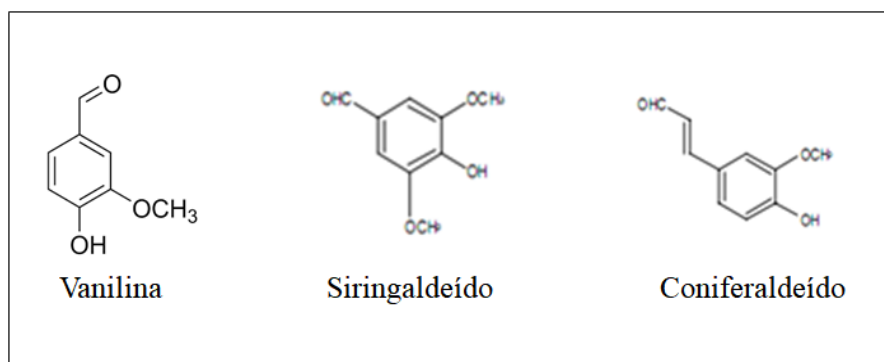


Figura 20: Estruturas de alguns compostos formados a partir da degradação da lignina da madeira durante a carbonização e maturação do barril.

O aldeído mais abundante, encontrado em bebidas destiladas, é o acetaldeído (Figura 21), que é formado principalmente durante a etapa de fermentação. Já entre os ácidos carboxílicos o que aparece em maior quantidade é o ácido acético (Figura 21) devido à oxidação do acetaldeído. Também durante a fermentação a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, produz uma série de alcoóis alifáticos, ácidos e ésteres. São encontradas cadeias saturadas e insaturadas com variações de 1 a 16 átomos de carbono. Os álcoois mais abundantes são aqueles de cadeia curta como, propanóis, butanóis e pentanóis (Figura 21), em que suas concentrações são influenciadas pela destilação, pela espécie e linhagem da levedura, temperatura, composição do meio, etc.^{11,12,13} Já no caso dos álcoois não-alifáticos, são incluídos o 2-feniletanol e o 2,3-butanodiol (Figura 21). O ácido butanóico e o pentanóico possuem um grande impacto sensorial.

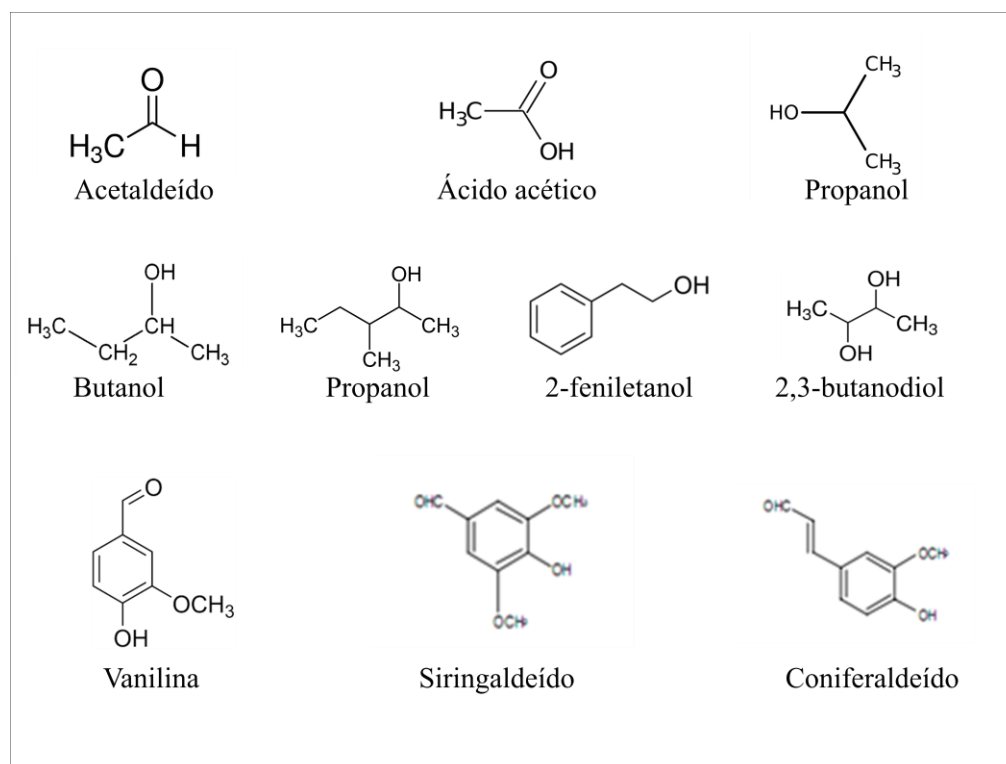


Figura 21: Compostos formados em algumas etapas da fabricação do uísque.

Os ésteres mais abundantes são os ésteres etílicos. Os ésteres são caracterizados por um aroma intenso. Dependendo da concentração deste composto, há efeitos positivos, mas também negativos, por exemplo, no caso do acetato de etila em concentrações muito altas pode vir a agregar um gosto de vinagre^{11,12,13,14}, pois ocorre uma reação de esterificação que é apresentada na Figura 22, em que um ácido

carboxílico, neste caso o ácido acético produzido na etapa de fermentação reage com álcool formando um éster, o acetato de etila e água. Já a reação inversa, que seria a hidrólise, formará álcool e ácido acético, gerando sabor característico de vinagre na bebida.

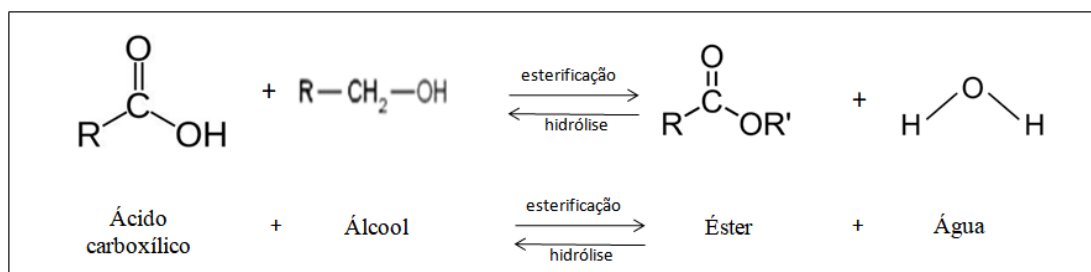


Figura 22: Representação da reação de esterificação.

Uma grande quantidade de compostos fenólicos também são formados no uísque, que tem origem da degradação térmica dos derivados do ácido benzóico a partir do malte e da fumaça da turfa. Esses compostos são: fenóis simples, como o fenol, os cresóis isoméricos, os xilenóis, os etilfenóis e os guaiacóis (Figura 23). E alguns polifenóis extraídos da madeira incluem lignina solúvel em etanol e taninos derivados de ácidos gálico e elágico.¹⁴ As origens do barril também propicia a formação de alguns compostos. O carvalho americano (*Quercus alba*) produz maiores concentrações de vanilina e lactona de carvalho cis, enquanto o carvalho espanhol (*Quercus robur*) fornece maiores concentrações de taninos.¹⁴

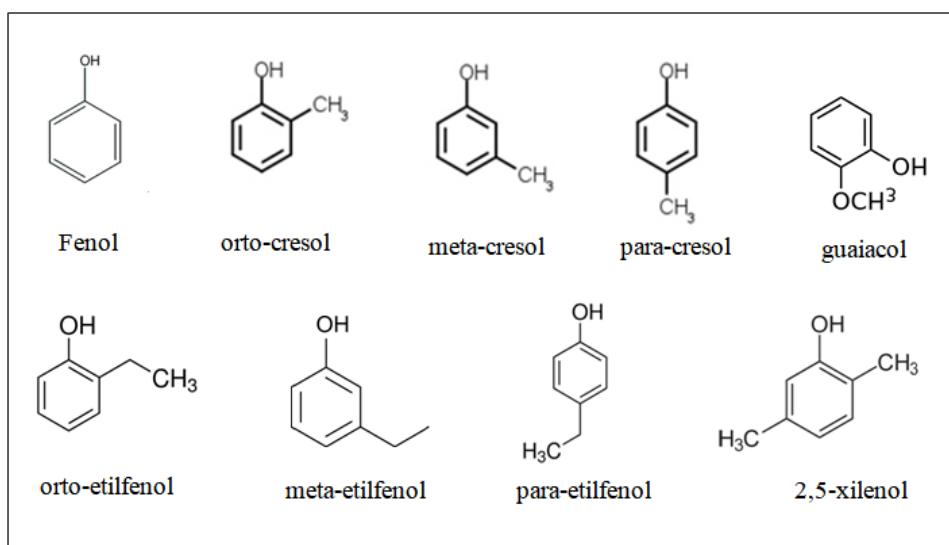


Figura 23: Representação das estruturas químicas que tem origem da degradação térmica dos derivados do ácido benzóico a partir do malte e da fumaça da turfa.

O carbamato de etila pode ocorrer como contaminante, sendo este, um composto possivelmente cancerígeno para os seres humanos. A sua formação em uísques é proveniente dos precursores voláteis, como o cianeto, cianato, cianoidrina, tiocianato e o complexo de cianeto de cobre.^{15,16} Por exemplo, no caso do uísque escocês sua presença está ligada a matéria-prima empregada, pois na cevada é encontrado o glicosídeo cianogênio, epioterodendrina, que por hidrólise enzimática libera o ácido cianídrico e o isobutiraldeído. A identificação desses precursores se deve ao fato que à medida que ocorre a diminuição dos mesmos, observa-se a o aumento da concentração de carbamato de etila.¹⁷

Todo esse processo de composição dos componentes químicos necessários para dar características a cada tipo de bebida acaba sendo demorado e de alto custo. Sendo assim, o mercado das falsificações aumenta a cada segundo e o uísque acaba sendo alvo devido ao seu alto valor comercial.

1.5 O PROBLEMA DAS FALSIFICAÇÕES

Produtos mais sofisticados vêm ganhando o mercado com o aumento do poder aquisitivo da população, e isso consequentemente resultou no disparo das vendas e consumo de bebidas de maiores valores agregados. Dentre essas, o uísque mostrou maior aumento no mercado nacional, o que lhe confere a alta importância econômica. Na tentativa de concorrer e lucrar no mercado, muitas quadrilhas tem sido descobertas pela Polícia Federal e Civil na falsificação desses produtos. Além do Governo Federal brasileiro perder milhares de reais em arrecadação de impostos com a venda desses produtos, a maior preocupação é a ingestão pelos consumidores, pois prejudica a saúde devido ao fato da má qualidade das matérias-primas, principalmente alcoóis de baixo valor comercial que possuem até metanol e das instalações utilizadas na fabricação dos mesmos.¹⁸ A falsificação geralmente é realizada através da mistura de álcool de má qualidade, água, aroma e corante caramelo a bebidas de baixo custo ou ainda por uma diluição de bebidas autênticas com álcool e água¹⁹, que na maioria das vezes as deixam com padrão diferente do que é definido pela legislação brasileira quanto ao teor alcoólico, que deveria ser 38 a 54% em volume de etanol.

Vários estudos tem sido reportados a cerca do monitoramento das falsificações e adulterações em bebidas, por exemplo, o uso de dispositivos de eletroforese de microchip integrados com detecção de condutividade sem contato, acoplada capacitivamente (C^4D) para investigar a autenticidade de amostras de uísque apreendidas, que provavelmente foram adulteradas por simples diluição com água da torneira. A plataforma microfluídica proposta foi explorada para o monitoramento de espécies aniônicas (Cl^- e F^-) em amostras originais e adulteradas. As melhores separações foram obtidas dentro de 70 s usando um tampão de corrida composto de ácido láctico e histidina ($pH = 5,9$). Dispositivos ME- C^4D foram usados para analisar amostras de três marcas diferentes (cinco amostras cada). Baseado na presença de ânions inorgânicos como Cl^- , F^- , SO_4^{2-} e NO_2^- em quantidades diferentes, a autenticidade dos uísques apreendidos foi comparada às amostras originais. De acordo com os dados relatados, a plataforma microfluídica proposta pode ser útil para ajudar as autoridades reguladoras na investigação e monitoramento da autenticidade de bebidas whisky comercializadas.²⁰

Em outro estudo foi feita a discriminação das marcas de uísque e identificando a falsificação por espectroscopia UV-Vis combinada com mínimos quadrados parciais para análise discriminante. Os modelos de discriminação foram construídos com o emprego de sete marcas de uísque: Red Label, Black Label, Cavalo Branco, Chivas Regal (12 anos), Ballantine's Finest, Old Parr e Natu Nobilis. O método foi validado com um conjunto de testes independentes de amostras autênticas pertencentes às sete marcas selecionadas e outras onze marcas não incluídas nas amostras de treinamento. Além disso, setenta e três amostras falsificadas também foram usadas para validar o método. Os resultados mostraram taxas de classificação corretas para amostras genuínas e falsas acima de 98,6% e 93,1%, respectivamente, indicando que o método pode ser útil para a análise forense de amostras de uísque.²¹

1.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A RMN é uma técnica muito usada na identificação, elucidação e quantificação dos compostos presente em diferentes materiais, seja, nos campos da

química orgânica, inorgânica, química de materiais ou biomoléculas. E vem sendo cada dia mais utilizada em diversos estudos, que vão além da química, sendo assim aplicada em diferentes áreas do conhecimento.

Um dos primeiros experimentos que envolveram RMN foi no ano de 1937, quando experimentalmente Rabi observou o momento magnético do Lítio, recebendo o Premio Nobel em 1944. No ano seguinte, Purcell, Pound e Torrey, conseguiram observar próton (^1H) em experimento de RMN em parafina. O mesmo fenômeno foi observado por Bloch, Packard e Hansen, porém em água líquida. Essas descobertas proporcionaram a Bloch e Purcell o Prêmio Nobel de forma conjunta em 1952.²²

O avanço do número de publicações sobre aplicações de RMN na ciência de alimentos nos últimos anos confirma que esta técnica, que no passado foi aplicada em pesquisa básica de química orgânica e biomolecular, atingiu agora um nível de avanço que torna possível a aplicação na área de controle de qualidade e análise de alimentos e bebidas.

Kuballa *et al.* (2018) fizeram análise de amostras suspeitas de uísque, vodka e rum da Rússia e do Quênia usando espectroscopia de RMN. Através da análise de regressão linear de valores integrais espectrais, foi possível identificar quatro amostras falsificadas da Rússia e duas do Quênia. As amostras autênticas e falsificadas passaram por análises sensoriais e indicou diferenças significativas de sabor, porém, os degustadores não conseguiram identificar o produto falsificado na maioria dos casos.²³ Argentina *et al.* (2019) utilizaram a técnica de espectroscopia de RMN de ^1H combinada com quimiometria para discriminar amostras de cerveja lager, de acordo com seu estilo e informações fornecidas no rótulo. Os resultados mostraram que foi possível discriminar entre cervejas do mesmo tipo, mas de estilo diferente, utilizando uma abordagem simples, sem necessidade de pré-processamento de algoritmos, focando apenas a atenção na região de carboidratos no espectro de RMN de ^1H .²⁴ Cassino *et al.* (2019) estudaram alterações do metabólito após o envelhecimento de amostras de vinhos tintos e brancos engarrafados durante o período de 24 a 48 meses. Para isso utilizaram a espectroscopia de RMN de ^1H , aliada a análise estatística dos dados e conseguiram identificar e diferenciar as amostras de vinho dos dois estágios de envelhecimento.²⁵

Como foi mostrado acima a RMN é uma técnica líder na elucidação estrutural de moléculas, que possibilita a identificação de compostos a partir de dados experimentais como constantes de acoplamento, desvios químicos e sinais gerados pelo efeito nuclear de Overhauser.²⁶

Todos esses estudos são possíveis devido ao fato que o fenômeno da RMN é baseado nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos, ou seja, quando núcleos alinhados com um campo magnético B_0 aplicado são induzidos a absorver energia e a mudar a orientação de *spin* em relação ao campo aplicado. Qualquer núcleo atômico que tenha massa ímpar ou número ímpar, ou ambos, tem um momento angular de *spin* e um momento magnético μ . Estados de *spin* não possuem a mesma energia em um campo magnético aplicado, devido ao fato de o núcleo ser uma partícula carregada, e qualquer carga que se desloca vai gerar um campo magnético B_0 próprio. Dessa forma o núcleo tem um momento magnético μ gerado por sua carga e por *spin*. Um núcleo de hidrogênio, por exemplo, pode apresentar um *spin* no sentido horário ($+\frac{1}{2}$) ou anti-horário ($-\frac{1}{2}$) e os momentos nucleares μ nos dois casos apontam em direções opostas (Figura 24).²²

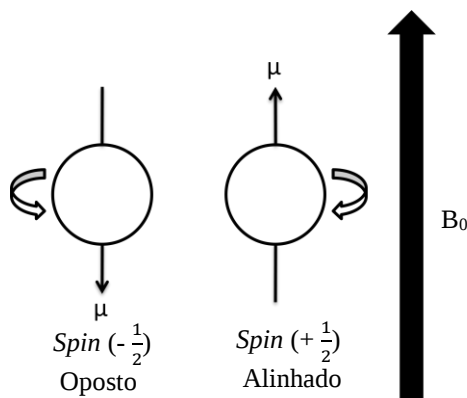


Figura 24: Representação do núcleo de hidrogênio, que pode apresentar um *spin* no sentido horário ($+\frac{1}{2}$) ou anti-horário ($-\frac{1}{2}$) e os momentos nucleares μ nos dois casos apontam em direções opostas. Adaptado de: PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introdução a Espectroscopia. Tradução da 4ª Ed. Norte-Americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

O número de estados de *spin* permitidos que podem ser adotados é quantizado e determinado por seu número quântico de *spin* nuclear I . Na ausência de B_0 , esses núcleos se encontram em estados degenerados de energia, apresentando uma distribuição aleatória dos *spins*. Na presença do B_0 , a degenerescência dos estados é quebrada em níveis quantizados de energia e direção e podem adotar um número limitado de orientações de diferentes energias de acordo com a regra de seleção ($2I + 1$) com diferenças inteiras que vão de $+I$ a $-I$ (Figura 25). O fenômeno da RMN será percebido apenas por núcleos ativos magneticamente, ou seja, aqueles que apresentam momento de *spin* não nulo (*spin* $I \neq 0$), ao serem submetidos a um campo magnético B_0 .^{22,27}

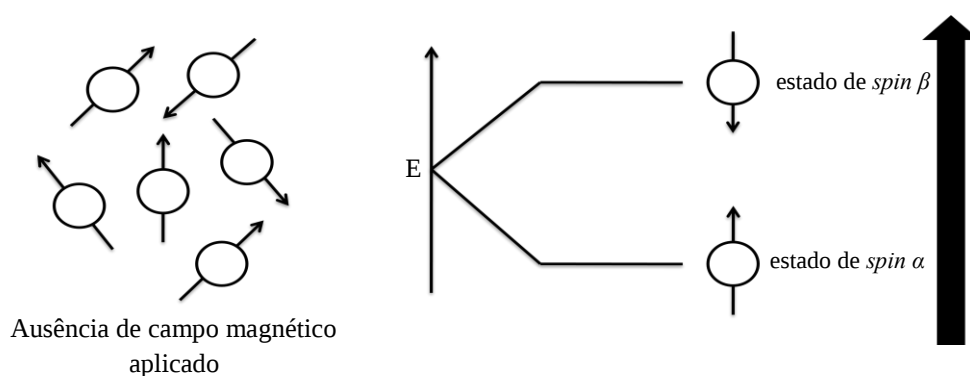


Figura 25: Representação dos *spins* em ausência e presença do campo magnético. Adaptado de: PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M. KRIZ, G.S. & ENGEL, R.G. Química Orgânica Experimental – Técnicas de Escala Pequena. 2ª Edição. Editora Bookmann.

Prótons que se alinham paralelamente (a favor do campo), dizemos que estão no estado de *spin* α , de menor energia, prótons que se alinham anti-paralelamente (contra o campo), estão em estados de *spin* β , de maior energia, pois mais energia é necessária para um próton alinhar-se contra o campo do que a favor dele. Por isso, um maior número de núcleos encontra-se no estado de *spin* α do que no estado de *spin* β .²⁸

A distribuição nos dois níveis de energia é definida pela distribuição de Boltzmann (Equação 1):

$$\frac{N_p}{N_{ap}} = e^{-\frac{E}{KT}} \quad (1)$$

Onde N_p é o número de *spins* alinhados paralelamente, N_{ap} é o número de *spins* alinhados antiparalelamente, K é a constante de Boltzmann ($k=1,3805 \times 10^{-23}$ joules/kelvin) e T é a temperatura em graus Kelvin.²²

A partir da equação 1, é possível calcular o excesso populacional, ou seja, a quantidade de núcleos a mais no estado de energia mais baixo, que são aqueles que permitem gerar um sinal de ressonância.

Com a intenção de se alinhar com o campo magnético, e por possuir o *spin*, surge o fenômeno da precessão. Que nada mais é, do que a mudança de direção do núcleo em torno do seu próprio eixo de rotação, na presença de um campo magnético (Figura 26).²² Essa frequência ω angular é chamada de *frequência de Larmor*.

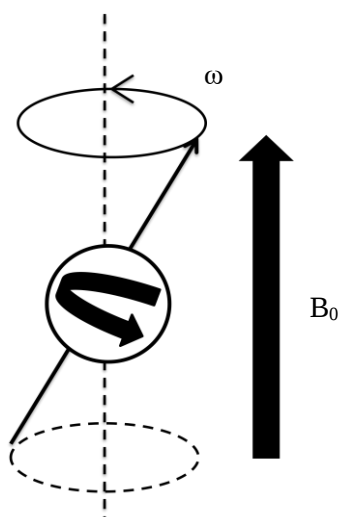


Figura 26: Precessão de um núcleo girando, resultado da presença de um campo magnético aplicado. Adaptado de: PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M. KRIZ, G.S. & ENGEL, R.G. Química Orgânica Experimental – Técnicas de Escala Pequena. 2ª Edição. Editora Bookmann.

Essa frequência ω é determinada pela equação de Larmor (Equação 2):

$$\omega = \gamma B_0 \quad (2)$$

Em que γ é a razão giromagnética, B_0 é o valor do campo magnético externo aplicado. É importante ressaltar que qualquer alteração no valor do campo magnético implicará na alteração da frequência de precessão.

Quando há a interrupção do pulso de excitação, os núcleos excitados começam a perder sua energia de excitação e voltam ao seu estado de *spin* original, ou seja, eles relaxam. Esse processo chamado decaimento de indução livre (FID), que não é ainda o espectro real, é uma combinação sobreposta de todas as frequências emitidas. Assim, é necessário a utilização de um método matemático chamado de análise transformada de Fourier (FT), em que são extraídas as frequências individuais, obtendo o sinal de RMN. A Figura 27 apresenta esse processo.

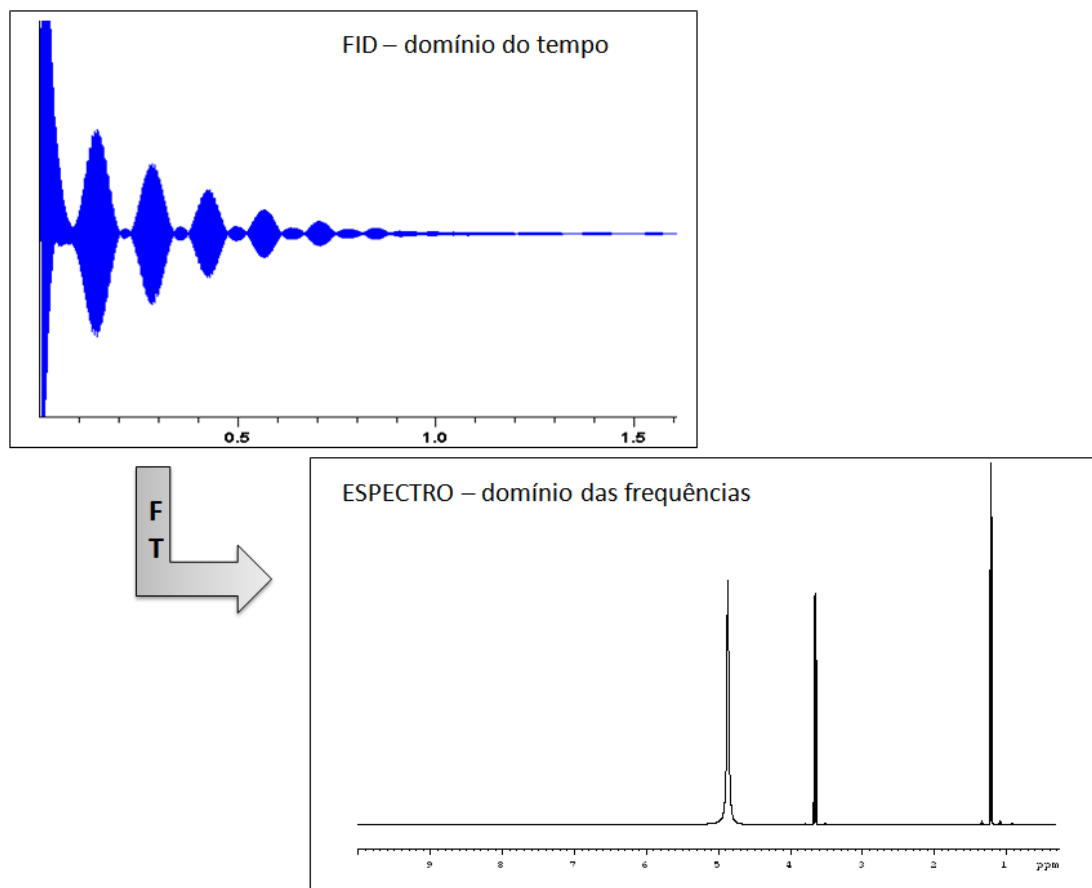


Figura 27: Sinal gerado no domínio do tempo FID, seguido da representação do espectro de uísque original após a transformada de Fourier.

A espectroscopia de RMN de ^1H tem sido usada para análise quantitativa desde 1963, Hollis, que analisou frações de aspirina, fenacetina e cafeína e Jungnickel e Forbes que estudaram as proporções entre prótons intramoleculares de 26 substâncias orgânicas puras.²⁹

A principal vantagem da RMN de ^1H quantitativa em comparação com outros métodos analíticos é a medição da razão primária, uma vez que a área do sinal de resposta (A_x) é proporcional ao número de núcleos que absorvem energia na radiofrequência referente a essa linha de ressonância (N_x). Além disso, não é necessário a construção de uma curva de calibração, bem como o emprego de padrões de referência idênticos ao analito, pois a aquisição desses compostos

padronizados muitas vezes é um processo demorado e nem sempre os mesmos estão disponíveis no mercado mundial.

Com RMN quantitativa, a quantificação dos compostos presentes em uma amostra complexa pode ser realizada em uma única medição rápida, não destrutiva. A preparação da amostra é simples e a incerteza na quantificação é mínima. Além de possuir vantagens adicionais, como a capacidade de determinar estruturas moleculares a partir da matriz da amostra complexa, assim como o uísque e também a análise quantitativa de múltiplos metabólitos simultaneamente a partir de uma mistura.

Para realizar um experimento quantitativo é preciso levar em consideração um conjunto de parâmetros:

- ✓ Sintonia da Sonda: É preciso sintonizar muito bem a sonda. A sintonia é feita para o solvente e para a sonda. Pois irá sintonizar o solvente da amostra de acordo com a bulbina que será responsável pela emissão de radiofrequência que vai excitar os núcleos.
- ✓ Homogeneidade do Campo Magnético: É um ajuste de homogeneidade do campo (largura do sinal do TMS deve ser menor que 1 Hz. Se executado com êxito garante sinais finos e de boa resolução, evitando assim sobreposições.
- ✓ Tempo de aquisição (aq): O tempo de aquisição deve ser grande o suficiente para evitar o truncamento do FID e pequeno o suficiente para não comprometer a relação sinal / ruído (S/N) - um aq longo pode levar a aquisição de ruído, reduzindo a relação (S/N).
- ✓ Pulso de 90°: O pulso de 90° deve ser bem calibrado para garantir a excitação de toda a janela espectral, com o intuito de se obter a intensidade máxima dos sinais.
- ✓ Número de pontos (td): O td deve ser suficiente para a escrita precisa do sinal. De forma ideal 10 pontos acima da meia altura do sinal.
- ✓ Número de scans (ns): Para se obter uma boa relação sinal/ruído é necessário obter um número suficiente de ns, obedecendo um mínimo de 1000:1 para a quantificação.
- ✓ Tempo de relaxação (T1): T1 é o tempo de relaxação spin rede e é fundamental para a quantificação, pois esse parâmetro tem valores diferentes para

grupo químico, podendo assim variar de acordo com as características da amostra, como o pH. O valor mínimo necessário é de uma relação de 5T1, para que possa garantir 99,3% da intensidade do sinal. Um valor de 7T1 levaria teoricamente a 99,9%.

- ✓ Ganho do receptor (rg): É o ganho do receptor, e para cada amostra ele deverá ser ajustado para evitar a clipagem do FID. Em análises quantitativas para métodos quimiométricos deve-se assegurar o mesmo rg para todos os experimentos, para que as amostras não sejam discriminadas por diferença do ganho.
- ✓ Correção de fase: Esse parâmetro pode ocorrer de forma manual ou automática na parte de processamento, porém para o fim de quantificação a correção automática pode não ser suficiente. Deve-se tomar bastante cuidado pois é uma procedimento fundamental para precisão na hora de integrar os sinais.
- ✓ Correção da linha de base: A correção da linha de base permite avaliar os sinais nas proximidades de sinais muito largos. Basicamente, essa correção consiste na aplicação de uma série de funções matemáticas.
- ✓ Integração dos sinais: Para a integração precisa dos sinais não pode haver interferência, como por exemplo, a sobreposição, principalmente com ou sem a inclusão dos satélites de ^{12}C nos espectros de RMN de ^1H .

Uma das técnicas de quantificação utilizadas no RMN é o ERETIC2 (*Electronic REference To access In vivo Concentrations*), criado em 1999 por Akoka et al.³⁰ Nesse tipo de análise, o FID é originado por um mecanismo eletrônico enviado à sonda durante ao processo de aquisição do sinal de RMN. Esse sinal eletrônico criado após a Transformada de Fourier apresenta a mesma forma e frequência que o FID e deve ser calibrado anteriormente utilizando uma amostra de concentração conhecida e características eletro-analíticas semelhantes à da amostra que será quantificada. Como as características do sinal eletrônico se assemelham às do sinal real de RMN, essas sofrem reflexo pelo ganho do receptor a quantidade de aquisições, com o objetivo de ter uma relação sinal ruído que não prejudique a amostra. O indicado para esse tipo de estudo quantitativo por sinais eletrônicos, que usam análises prévias de calibração e posterior análise de amostras com concentrações desconhecidas é uma relação sinal ruído superior a 100.^{31,32}

O método ERETIC correlaciona intensidades absolutas de dois diferentes espectros e usando o princípio da reciprocidade, que indica que os comprimentos dos pulsos são inversamente proporcionais à intensidade do sinal de RMN, é determinada a concentração do analito.^{33,34}

Em um espectro de RMN há uma grande quantidade de informações obtidas que podem dificultar a interpretação dos dados quando um número elevado de amostras com semelhança espectral são analisadas. Frente a isso, os métodos quimiométricos tem sido de grande importância para reduzir a complexidade (quando ocorre) desses dados espectrais, evidenciando as informações mais relevantes.^{35,36}

1.7 QUIMIOMETRIA APLICADA A RMN

A quimiometria tem se mostrado de grande importância na interpretação e análise de dados obtidos pelos diversos métodos instrumentais. Pode ser definida como sendo o desenvolvimento e a aplicação de métodos estatísticos e matemáticos no planejamento, otimização de procedimentos ou na obtenção de informações químicas através da análise de dados.²⁶ A extração de informações dos dados normalmente envolve a análise de um considerável número de experimentos. E frequentemente apenas um pequeno número dessas variáveis apresentam importância para o objetivo do experimento. Neste trabalho, o emprego foi restrito à análise multivariada. É conhecida a vantagem de se analisar múltiplas variáveis simultaneamente em comparação com a análise univariada, uma vez que se obtém mais informações na análise multivariada devido às correlações entre as variáveis.³⁷ Uma das técnicas de análise multivariadas utilizada na quimiometria é discutida a seguir.

A análise de componentes principais (PCA, do inglês Principal Component Analysis) foi inicialmente descrita por *Pearson* em 1901 e desenvolvida posteriormente por *Hotelling* em 1933 e, ao longo dos anos e com avanços computacionais, a técnica tornou-se conhecida amplamente utilizada em diversos estudos de diferentes áreas. A análise tem como objetivo principal reduzir o número de variáveis observadas, $X_1, \dots, X_p$, produzindo assim variáveis não correlacionadas,

$Y_1, \dots, Y_p$ que são combinações lineares das variáveis observadas e que representam o máximo possível da variabilidade de $X_1, \dots, X_p$. Neste caso, as variáveis Y 's são chamadas de componentes principais. Cada componente principal (PC) explica parte da variância dos dados, essas novas variáveis são ordenadas em função do quanto elas explicam da variância dos dados.³⁸ Dessa forma, a PCA promove uma transformação de um conjunto de variáveis eventualmente dependentes em um conjunto reduzido de variáveis independentes. A análise desse novo conjunto de dados reduzidos é chamada de análise exploratória e é recomendada antes de qualquer outro tipo de análise, pois ela possibilita a visualização e detecção de agrupamentos, tendências e possíveis amostras anômalas.^{39,40}

Diferentemente das variáveis originais, essas novas variáveis não são correlacionadas entre si. Quando projetadas em um gráfico, as componentes principais são ortogonais entre si. A PCA é equivalente a uma rotação do eixo original de forma que a PC1 está na direção de maior variância dos dados, enquanto que PC2 está na direção da segunda maior variância, e assim por diante. A covariância é uma medida do quanto duas variáveis estão relacionadas entre si, ou seja, se as variáveis são independentes a covariância será próxima de zero. As PC's são obtidas a partir da matriz de covariância, em que cada PC é um autovetor desta matriz que tem relacionada a si um autovalor, que corresponde a quantidade de variância no conjunto de dados que é explicado pela PC.⁴¹

A PCA resulta em uma transformação da matriz de dados originais em uma nova matriz de dados de forma $\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P} + \mathbf{E}$, onde T são os escores, e tem tantas linhas quanto a matriz de dados originais, P são os loadings (pesos), e tem tantas colunas como a matriz de dados originais. O número de colunas na matriz T é igual ao número de linhas na matriz P. Cada matriz de escores consiste de uma série de vetores coluna, e cada matriz de loadings de uma série de vetores linha. A matriz de escores T e P são compostas por vários destes vetores, um para cada PC. Os autovetores da primeira PC são o primeiro vetor de escores e o primeiro vetor de loadings, e assim sucessivamente.⁴² Vários trabalhos tem utilizado tal técnica para diminuir o grande numero de variáveis.

Borges *et al.*, 2016, utilizaram o modelo PCA associado ao método de classificação Soft Independent Modeling by Class Analogy (SIMCA) para

investigaram a autenticidade de amostras de suco de uva orgânico usando espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Os resultados mostraram que as concentrações de certos elementos (Ba, Ce, La, Mg, P, Pb, Rb, Sn e Ti) foram maiores nas amostras orgânicas do que nas comuns, enquanto algumas (Na e Va) foram maiores nas comuns comparadas às orgânicas.⁴³ Monahhova *et al.*, 2015, utilizaram PCA para discriminar espécies de café Arábica e Robusta. A espectroscopia de RMN foi usada para verificar a presença dessas espécies. Extratos lipofílicos de cafés torrados e verdes autênticos mostraram a presença de marcadores estabelecidos para Robusta (16-O-metilcafestol (16-OMC)) e para Arábica (kahweol). A integração do sinal 16-OMC (δ 3,156 ppm) foi utilizada para estimar a quantidade de Robusta em misturas de café com um limite aproximado de detecção de 1-3%.⁴⁴

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Utilizar a técnica de RMN associada à quimiometria como ferramentas na análise qualitativa e quantitativa de matrizes complexas como o uísque.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar e comparar o perfil químico de amostras de uísques apreendidos e comerciais, com foco em analisar as possíveis diferenças.
- ✓ Quantificar em nível individual o etanol presente em amostras de uísques comerciais e apreendidos, por RMN de ^1H através do método ERETIC2 e com uso da quimiometria, para avaliar se permanecem dentro dos padrões de legislação.
- ✓ Utilizar a quimiometria associada à RMN no estudo da composição de uísques.

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Obtenção das amostras

As amostras apreendidas foram cedidas pelo Instituto Nacional de Criminalística – INC - DPF, unidade de Brasília. Ressalta-se que não se teve acesso aos relatórios de apreensões, portanto essas amostras podem ter sido apreendidas tanto por adulterações, quanto por fraudes fiscais.

As amostras comerciais autênticas foram oferecidas pelo Grupo de Microfluídica e Eletroforese (GME), que é coordenado pelo Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro, as quais foram compradas pelos Grupo de Microfluídica em casa de procedência confiável. Foram analisados uísques das marcas: Red Label (RL) e Natu Nobillis (NT).

Tabela 1. Descrição dos códigos das amostras de uísque analisadas.

Código	Tipo de uísque
RL original	Red Label autêntico comercial
NT original	Natu Nobillis autêntico comercial
UF-6 RL, UF-16 RL, UF-20 RL, UF-7 RL, UF-1 RL, UF-13 RL, UF-2 RL	Red Label apreendido
UF-63 NT, UF-160 NT, UF-65 NT, UF-62 NT, UF-67 NT, UF-6 NT, UF-59 NT	Natu Nobillis apreendido

3.2 As análises de RMN de ^1H

3.2.1. Equipamentos e acessórios

As análises de RMN de ^1H foram realizadas em replicatas, coletando-se duas frações da amostra. Os experimentos de RMN foram obtidos nas instalações do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (IQ/UFG), em um espectrômetro BRUKER AVANCE III 500 (11,75 T), operando na frequência de 500,13 MHz, para o núcleo

de Hidrogênio, equipado com sonda de detecção inversa de três canais ^1H , ^{13}C e XBB, *Broad Band Inverse Detection* (BBI) para análises de amostras líquidas em tubos de 5 mm de diâmetro. O *software Topspin 3.5* (Bruker BioSpin) foi usado na operação e processamento dos experimentos. Para as análises quimiométricas foi utilizado o *software Amix-Viewer*, versão 3.9.15. As regiões de supressão (água e etanol) foram excluídas.

3.2.2. Procedimento de análise

Em um tubo de RMN de 5 mm foram adicionados 100 μL de amostra de uísque e 500 μL de D_2O e TMSP- d_4 (trimetilsilil-2,2,3,3- d_4 propionato de sódio) 0,1% (m/v), com micropipetas de 100,0 e 1000,0 μL , aferida e calibrada.

Para o trabalho foram realizados experimentos unidimensionais de RMN de ^1H sem supressão do sinal do solvente e com supressão do sinal do solvente e do etanol replicatas coletando duas frações da amostra. Os parâmetros de aquisição e processamento para os experimentos de RMN de ^1H são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de aquisição e processamento dos experimentos de RMN de ^1H

Parâmetro (Bruker)	Descrição	Descrição	Descrição
Sequência de pulsos	<i>zg</i>	<i>noesygppr1d_1d_split</i>	<i>lc1pngpps</i>
Temperatura	20°C	20°C	20°C
Relaxação longitudinal (T1)	5,48s	5,48s	5,48s
N.º de pontos digitalizados (TD)	65.536	65.536	65.536
Janela espectral (SW)	20,0 ppm	20,0 ppm	20,0 ppm
Tempo de aquisição (AQ)	3,27 s	3,27 s	3,27 s
N.º de varreduras (NS)	8	8	512
N.º de pontos	64K	64K	64K
<i>Receiver gain</i> (RG)	1	5	128
Pulso de 90° (p1)	7.96 μs	8,0 μs	7.96 μs
<i>Transmitter frequency</i> (O1)	4.69 ppm	4,69 ppm	4.69 ppm
Atraso da relaxação (d1)	25,0 s	5,0 s	2,40 s
<i>Line broadening</i> (LB)	0,30Hz	0,30Hz	1Hz

3.3 Calibração do ERETIC

A calibração do sinal eletrônico foi feita utilizando amostra padrão Bruker certificada e selada num tubo contendo 2,0 mmol/L de sacarose, 0,5 mmol/L de DSS (5-Sulfonato-2,2-dimetil-2-silapentano), NaN_3 2,0 mmol/L, D_2O a 10 % e 90 % de H_2O . A calibração do dispositivo eletrônico foi feita integrando 06 (seis) regiões de sinais do espectro referentes aos sinais da sacarose, em seguida foi atribuído o número de núcleos que compõe cada região, juntamente com a atribuição da concentração da sacarose na solução, conforme demonstrado na Figura 28.

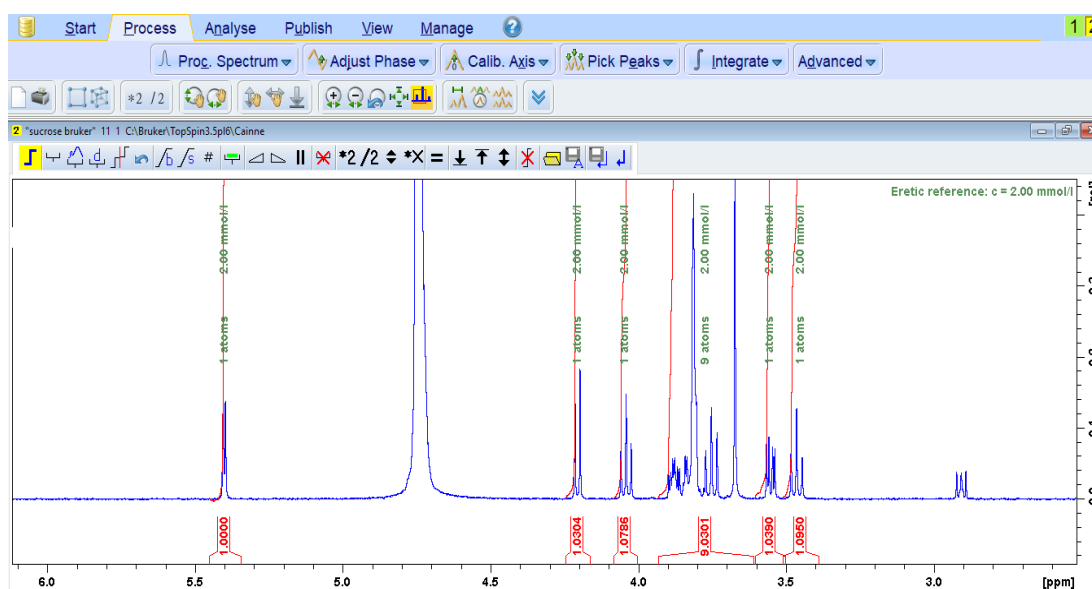


Figura 28: Representação da região dos sinais da sacarose utilizados para a calibração eletrônica (ERETIC2).

O anexo I inclui o protocolo de calibração do dispositivo eletrônico do ERETIC.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SUPRESSÃO DOS SINAIS

A água e o etanol são os principais componentes do uísque e constitui um problema para a obtenção de espectros de RMN de ^1H de qualidade, pois, o ganho do receptor é calculado sobre o sinal de maior intensidade, que no caso são esses três sinais, um hidrogênio da água e os hidrogênios da metila e metileno do etanol. Desse modo, é obtido um valor de ganho muito baixo, pois, as intensidades dos sinais da água e do etanol são muito altas, tornando os sinais da amostra imperceptíveis. Para tornar os sinais da amostra perceptíveis, se faz necessário reduzir suas intensidades ou eliminá-los através da supressão. Dessa forma, o ganho do receptor é calculado sobre os sinais da amostra.

Para isso, fez-se necessária a utilização de uma sequência de pulsos *lc1pngpps*, que faz a múltipla supressão, ou seja, dos sinais dos hidrogênios da água (δ 4,77, singleto largo), da metila (δ 1,18, tripleto, $J = 7,08$ Hz, correspondente a três hidrogênios) e do metileno (δ 3,65, quadrupletto, $J = 7,08$ Hz, dois hidrogênios) do etanol.

Na Figura 29, são apresentados os espectros de RMN de ^1H sem e com supressão dos sinais da água, da metila e do metileno do etanol. No espectro com supressão, é possível notar muitos outros sinais que antes não eram possíveis de ser observados.

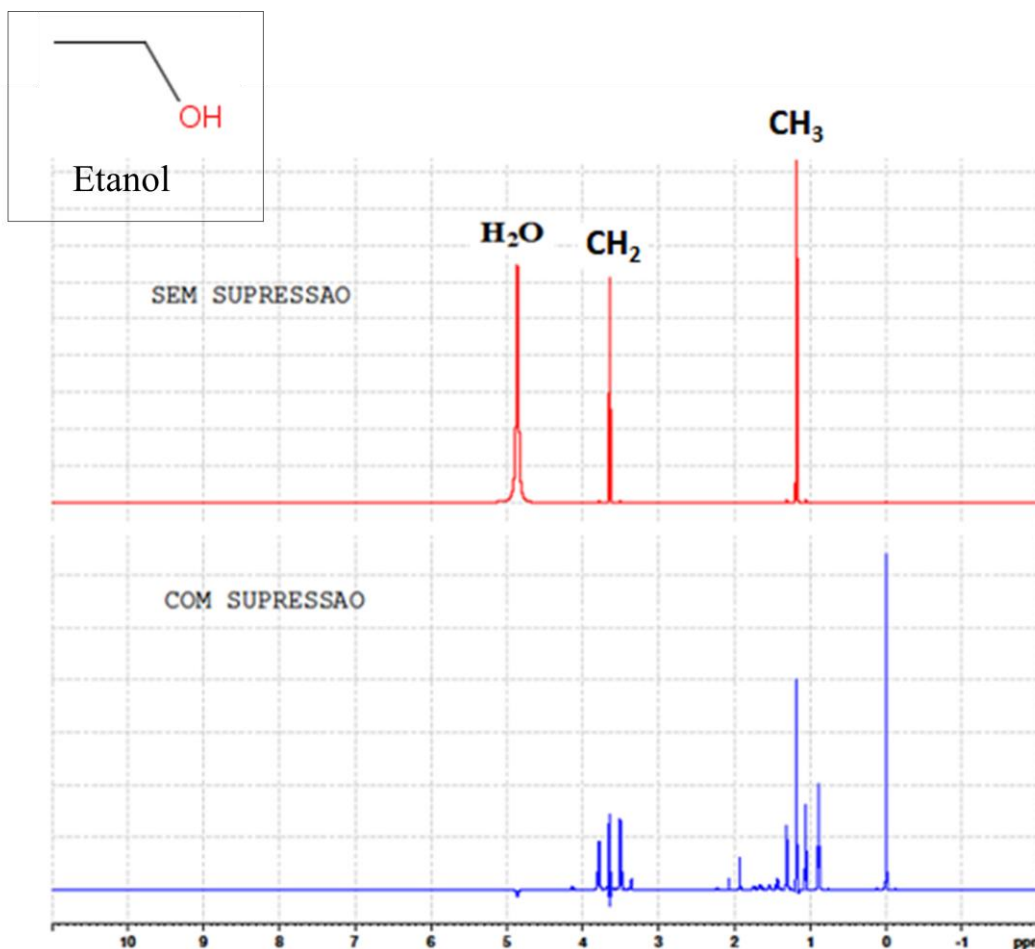


Figura 29 O efeito da supressão utilizando a sequência *lc1pngpps* (com supressão) frente à sequência *zg* (sem supressão).

4.2 O Efeito do tempo de relaxação (T₁)

O processo de relaxação longitudinal, também é chamado de relaxação spin-rede, e é basicamente o restabelecimento da distribuição das populações dos níveis de energia Zeeman. O excesso de energia potencial magnética é transferido do estado excitado para a vizinhança ou para a rede, na forma de energia cinética molecular.

Esse fenômeno de emissão não é espontâneo, mas sim o resultado da interação dos momentos magnéticos nucleares com os campos magnéticos dos núcleos que compõem a rede e que oscilam em torno da frequência de Larmor, sendo capaz de absorver esta energia.

O T₁ é fundamental para a manutenção do bulk de magnetização correto para uma temperatura definida e estável. As condições quantitativas para evitar a

saturação do sinal e garantir um retorno de 99,3% da magnetização ao estado de equilíbrio térmico, deverá requerer um tempo mínimo de $5T_1$ para que esse retorno aconteça. Dessa forma, a estimativa do tempo de relaxação para os sinais da amostra é fundamental.

Os experimentos de estimativa de T_1 foram realizados através da sequência de pulsos inversão recuperação *t1ir1d*, em que foi variado o tempo de inversão e recuperação (D7). O valor de D7 adequado foi escolhido quando os sinais tornam-se positivos, que foi o valor de 3,8s. A Figura 30, apresenta os espectros com valores de $D7=1$ e $D7=3,8$.

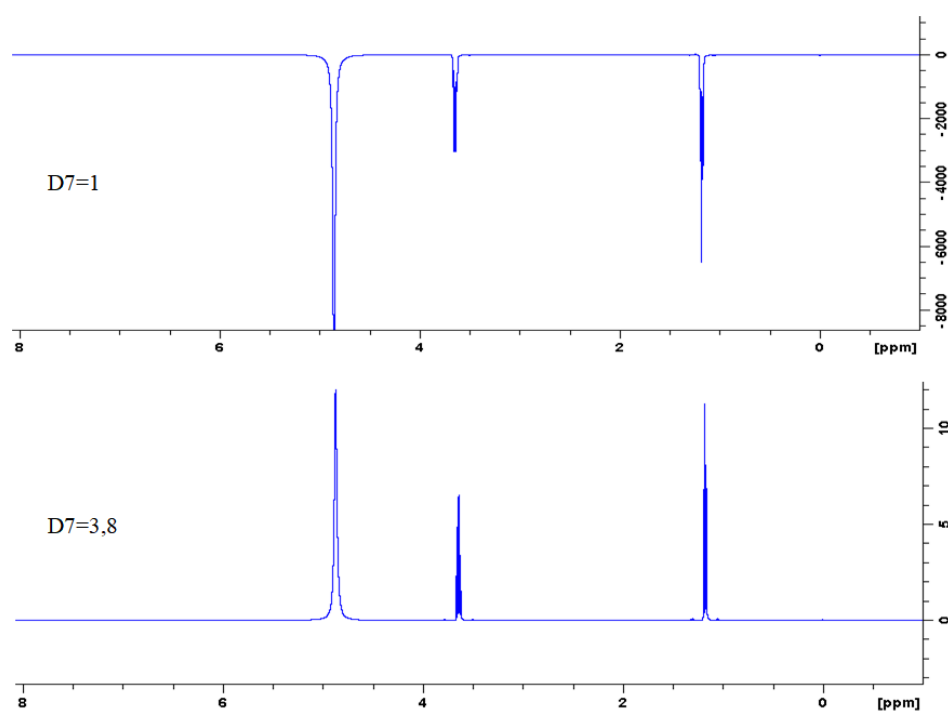


Figura 30: Espectros com sequência de pulsos inversão recuperação *t1ir1d*, em que, foi variado o tempo de inversão e recuperação (D7).

O cálculo do valor de $5T_1$ foi realizado de acordo com a equação (1):

$$5T_1 = d_7 \cdot \frac{1}{\ln(2)} \cdot 0.5 \quad (1)$$

4.3 Identificação e atribuição dos sinais de RMN de ^1H

O uísque é uma bebida que possui um perfil químico influenciado pelos processos de fermentação, destilação e armazenamento. Uma vasta gama de compostos determina a qualidade individual de vários tipos de uísques. O espectro de um uísque original pode ser dividido em 4 faixas de A - D (Figura 31) que apresentam sinais de hidrogênios característicos das diferentes classes de compostos.

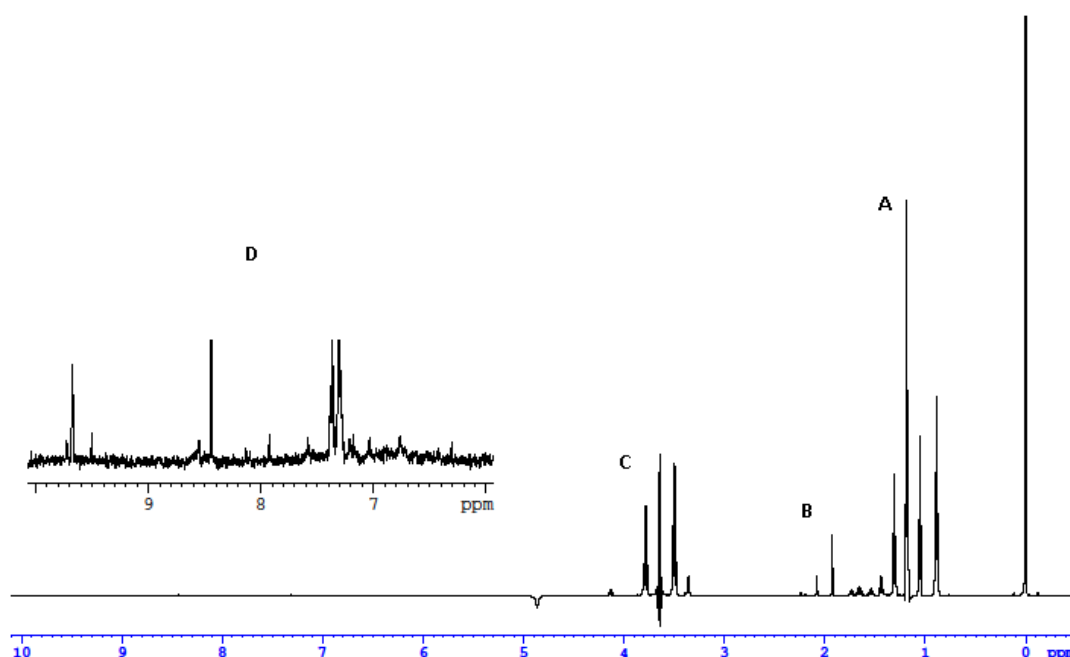


Figura 31: Regiões características de compostos presentes no uísque. **A:** álcoois superiores: propanol, butanol, isobutanol e pentanol; **B:** ácidos e ésteres; **C:** sinais característicos dos hidrogênios de grupos $-\text{CH}_2$ dos álcoois citados na região A e **D:** compostos aromáticos.

A região **A** apresenta os sinais referentes aos hidrogênios dos grupos metilas ($-\text{CH}_3$) de álcoois típicos do processo de produção do uísque como etanol (suprimido), propanol, butanol, isobutanol e pentanol. Essa região pode ser descrita como etanol + alcoóis superiores. A região **B** apresentam sinais de metilas de ácidos orgânicos e ésteres como o ácido acético, acetato de etila respectivamente, formados durante o processo de fermentação. Vale ressaltar que o acetato de etila é de suma importância para a bebida, pois em altas concentrações dá uma nota semelhante à solvente ou vinagre ao produto final, enquanto em baixas concentrações suaviza o aroma acentuado dessas bebidas.⁴⁵ A região **C** apresenta os sinais característicos dos

hidrogênios de grupos $-\text{CH}_2$ dos álcoois citados na região A. Na região **D** apresenta os sinais referentes aos prótons de compostos aromáticos, que não foram caracterizados.

4.3-1 Alcoóis

Na Figura 32 está apresentada a região dos álcoois superiores, possivelmente o propanol, butanol, isobutanol e pentanol. Porém, apenas com o espectro de ^1H não foi possível atribuir no espectro às multiplicidades e deslocamentos químicos específicos de cada um, pois quando se mudam as concentrações também mudam os deslocamentos químicos, além de os picos se sobreporem uns aos outros. Essa classe de compostos é uma das mais importantes quando a finalidade é a autenticação de uísques, pois são considerados um dos congêneres mais abundantes para caracterizar o aroma e o sabor da bebida. Apenas por essa região foi possível identificar algumas adulterações grosseiras das amostras apreendidas.

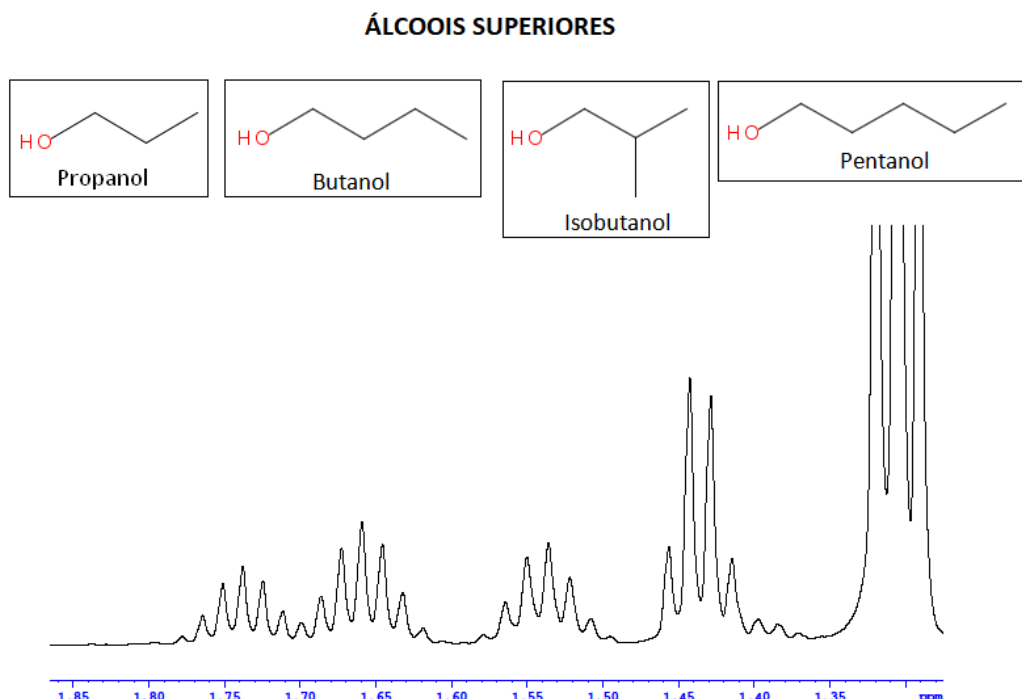


Figura 32: Região expandida de álcoois superiores (prováveis estruturas: propanol, butanol, isobutanol e pentanol) do espectro de RMN de ^1H de um uísque original Natu Nobillis.

Na Figura 33 foi realizada uma comparação dos sinais na região de álcoois superiores das marcas Natu Nobillis e Red Label. E ao se observar a tendência nos uísques dessas marcas foi possível concluir que as amostras apreendidas UF-65 NT, UF-62 NT e UF-59 NT, UF-2 RL, UF-7 RL não apresentaram sinais nessa região, o que sugere a adulteração das mesmas. Nas amostras UF-6 NT e UF-63 NT, UF-6 RL, UF-1 RL e UF-20 RL observou-se que as intensidades desses sinais eram bem inferiores quando comparadas as intensidades das originais, o contrario do que aconteceram com as amostras UF-160 NT e UF-67 NT, UF-13 RL e UF-16 RL que obtiveram intensidades aproximadas às originais.

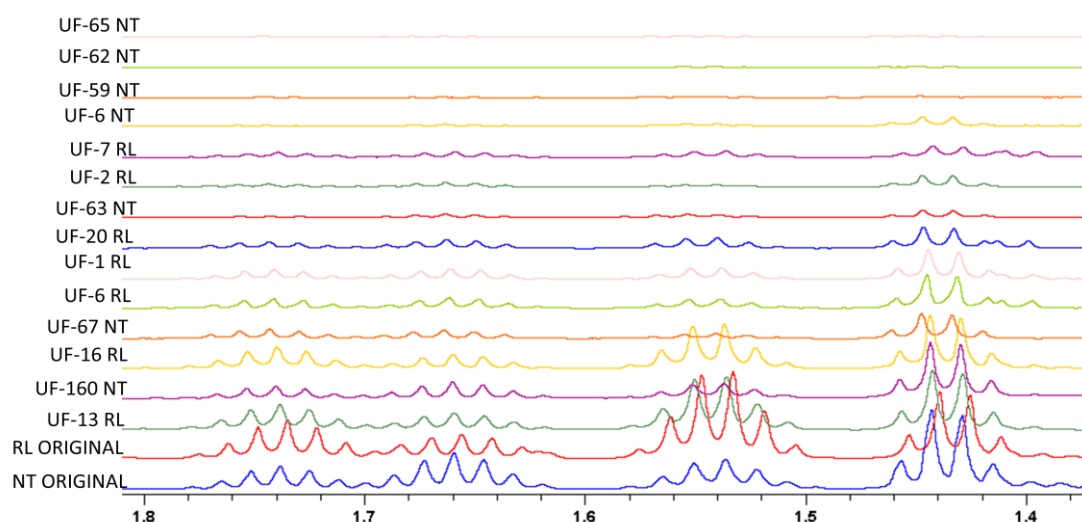


Figura 33: Comparação da região dos sinais de alcoóis superiores em um espectro de RMN de ^1H das amostras de uísque.

4.3-2 Carbamato de etila

Carbamato de etila, conhecida também como uretana, é um composto cancerígeno e formado naturalmente em alimentos fermentados, como o uísque. Pode ser formado durante todas as etapas de produção das bebidas, pela reação do etanol com alguns compostos nitrogenados, como ureia, carbamil fosfatos, n-carbamil aminoácidos, cianetos, entre outros, podendo ser formado durante todo o processo produtivo, ou seja, desde o plantio até a destilação. Esta formação é

dependente da concentração dos reagentes, temperatura, pH, luz e tempo de armazenamento.⁴⁶

Dessa forma, ele é considerado como um contaminante na bebida. A figura 34 mostra um dos sinais referentes ao carbamato de etila em uma amostra de uísque original.

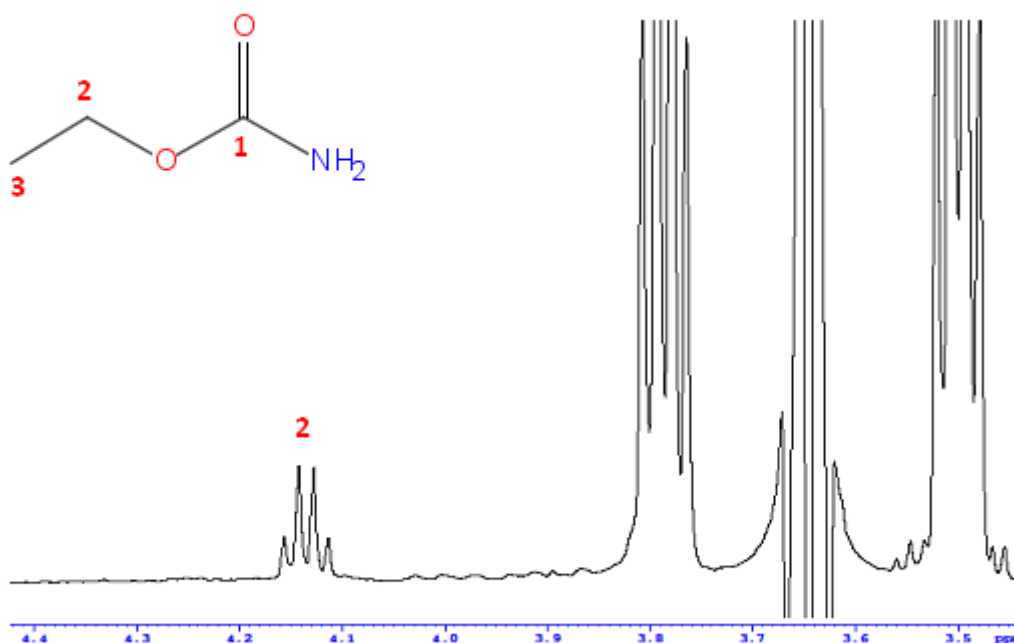


Figura 34: Região expandida de um dos sinais do carbamato de etila (estrutura química acima na figura) em um espectro de RMN de ^1H na amostra de uísque Natu Nobillis.

No espectro de RMN de ^1H de uísques, apenas o sinal do grupo metileno do carbamato de etila pode ser observado na região δ 4,00-4,20 (quarteto), $J = 7,05$ Hz (Figura 34). Sinais correspondentes à presença do grupo amino δ 7,70-7,60 não podem ser vistos sob as condições experimentais estabelecidas, devido à rápida troca de prótons. O sinal do grupo metila δ 1,30-1,20 não pode ser observado devido à supressão dos sinais de etanol. Sendo assim, apenas as amostras de uísque NT Original, UF-16 RL e UF-67 NT apresentaram sinais característicos do carbamato de etila. As amostras originais da marca Red Label não apresentaram sinais na região

característica de carbamato de etila, isso se deve ao fato de que esse composto é um contaminante e pode não ter sido removido.

4.3-3 Ácido Acético

O ácido acético é um composto produzido por leveduras durante a fermentação alcoólica.²⁸ Na Figura 35 é apresentado o sinal referente ao ácido acético em uma amostra de uísque original de Natu Nobillis.

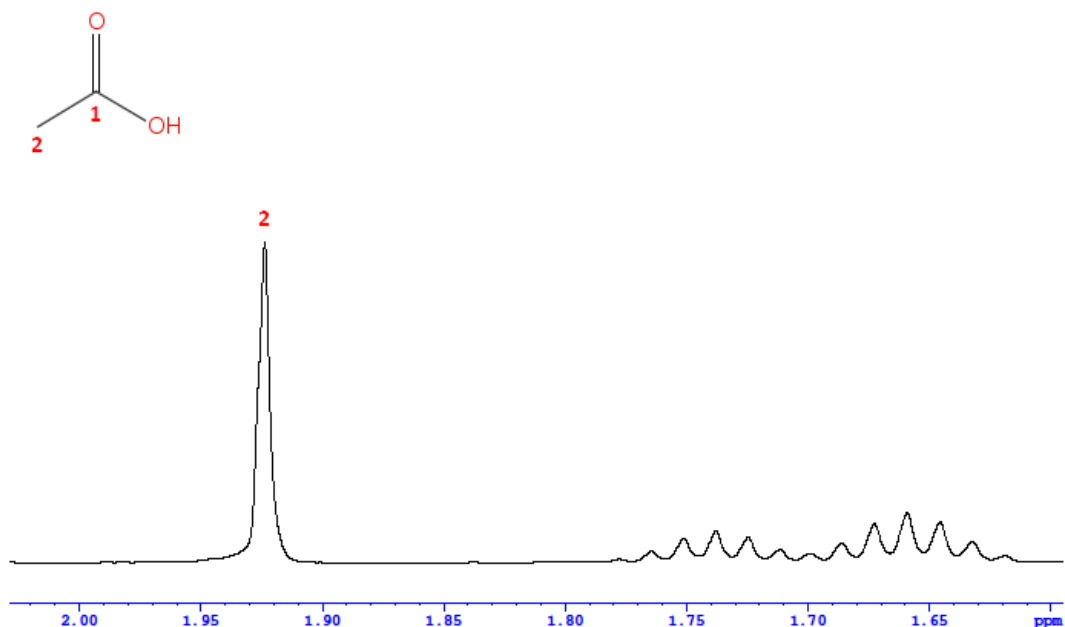


Figura 35: Região expandida do sinal da metila do ácido acético em um espectro de RMN de ¹H de uma amostra de uísque original Natu Nobillis.

Ao fazer uma comparação dos espectros da marca Natu Nobillis e Red label na região do sinal citado acima (Figura 36), foi possível observar que a amostra UF-160 NT e UF-13 RL apresentaram intensidades de sinais de ácido acético muito maior do que as outras amostras apreendidas, que as deixam com perfil mais próximo de um uísque original, pois, nesse tipo de bebida entre os ácidos carboxílicos presentes o que se apresenta em maior quantidade é o ácido acético, devido às oxidações do etanol e do acetaldeído.⁴⁷

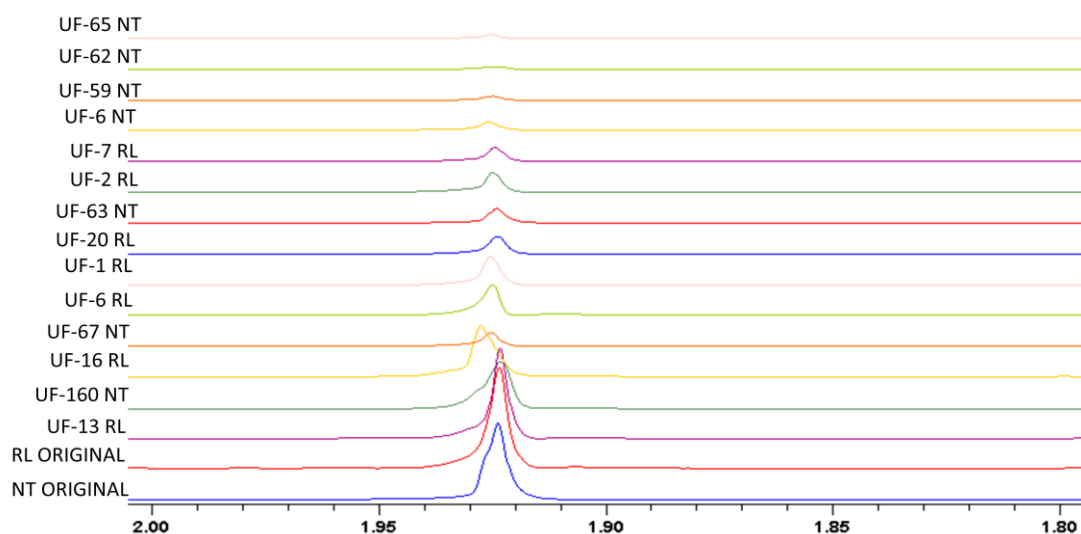


Figura 36: Comparação da região do sinal da metila do ácido acético em um espectro de RMN de ^1H das amostras analisadas. A amostra UF-13 RL e UF-160 NT apresentaram intensidades do sinal referente à metila do ácido acético δ 1,91 bem próximas das amostras originais, deixando-as com perfis químicos parecidos.

4.4 Análise de Componentes Principais por Marca

4.4.1 Amostras de Natu Nobillis originais e apreendidas

As amostras da marca NT (originais e apreendidas) foram usadas para compor a matriz de dados da PCA. A análise foi feita com exclusões das regiões do etanol e água para ressaltar os perfis químicos. O gráfico de escores de $\text{PC}_1 \times \text{PC}_2$ com variância acumulada de 98,71% (Figura 37).

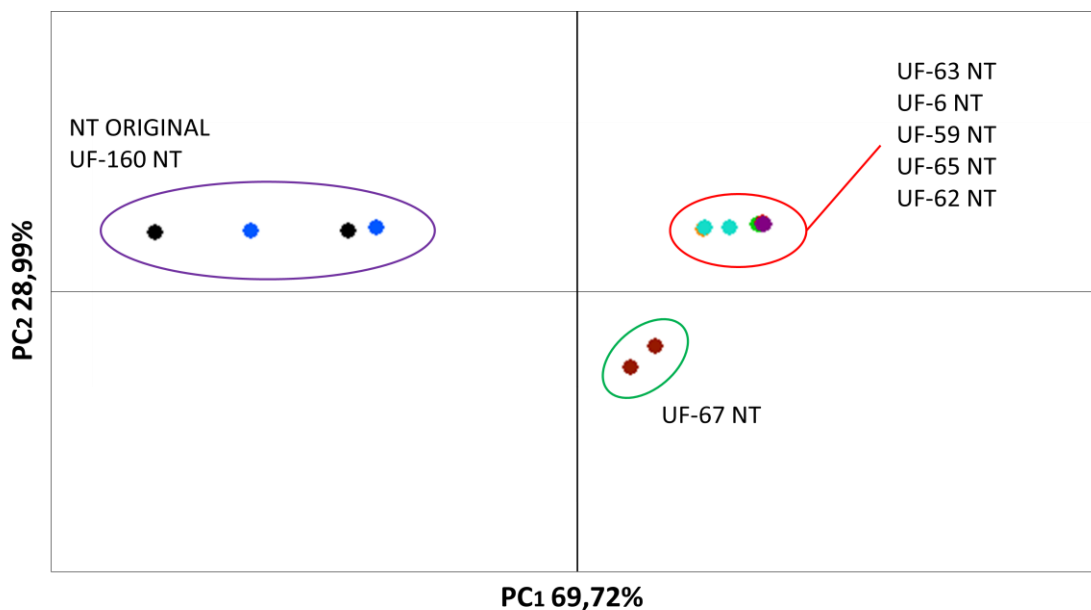


Figura 37: Gráfico de escores de PC1xPC2 das amostras Natu Nobillis original e UF apreendidas.

Os grupos de amostras NT originais e UF-160 NT foram discriminados em escores negativos de PC₁ e positivos de PC₂, o que evidencia uma grande semelhança entre seus perfis químicos. Já as amostras UF-63 NT, UF-6 NT, UF-59 NT, UF-65 NT e UF-62 NT foram discriminadas em escores positivos de PC₁ e PC₂. A amostra UF-67 NT (representada pelo espectro em azul na Figura 38) apresentou padrão oposto as amostras citadas e em seu espectro foi observado sinais intensos referentes à sacarose (Figura 38). Dessa forma envolve a utilização de corante caramelo para mascarar a cor após uma possível diluição.

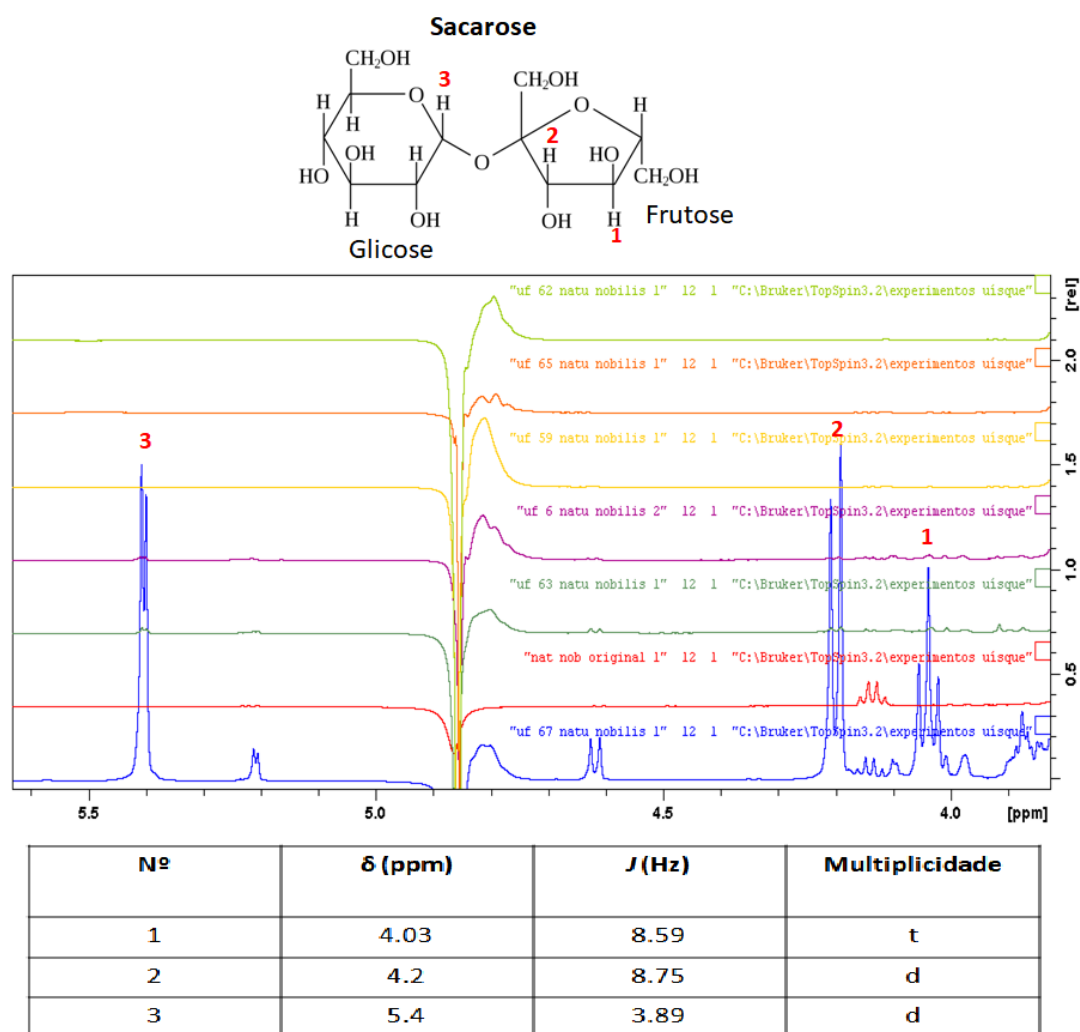


Figura 38: Comparação dos espectros de uísques de marca Natu Nobillis apreendidos e original.

O gráfico de pesos (Figura 39) indica que a variável de maior influência para a tendência observada no gráfico de escores é o sinal δ 0,89, referente à metila do propanol, pois a multiplicidade e a região são características de hidrogênios em grupos metilas terminais de cadeias alifáticas. Vale ressaltar que o propanol é um álcool utilizado na autenticação de uísques. O comparativo da região de interesse (0,95-0,85 ppm) no espectro de RMN de ^1H (Figura 40) confirma a tendência identificada na PCA.

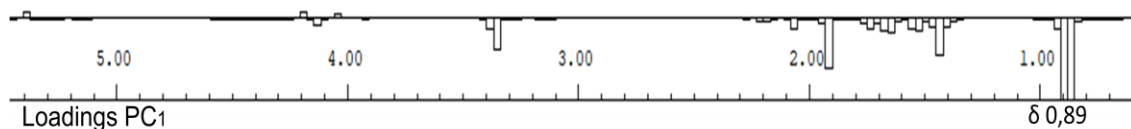


Figura 39: Variáveis discriminatórias da PCA.

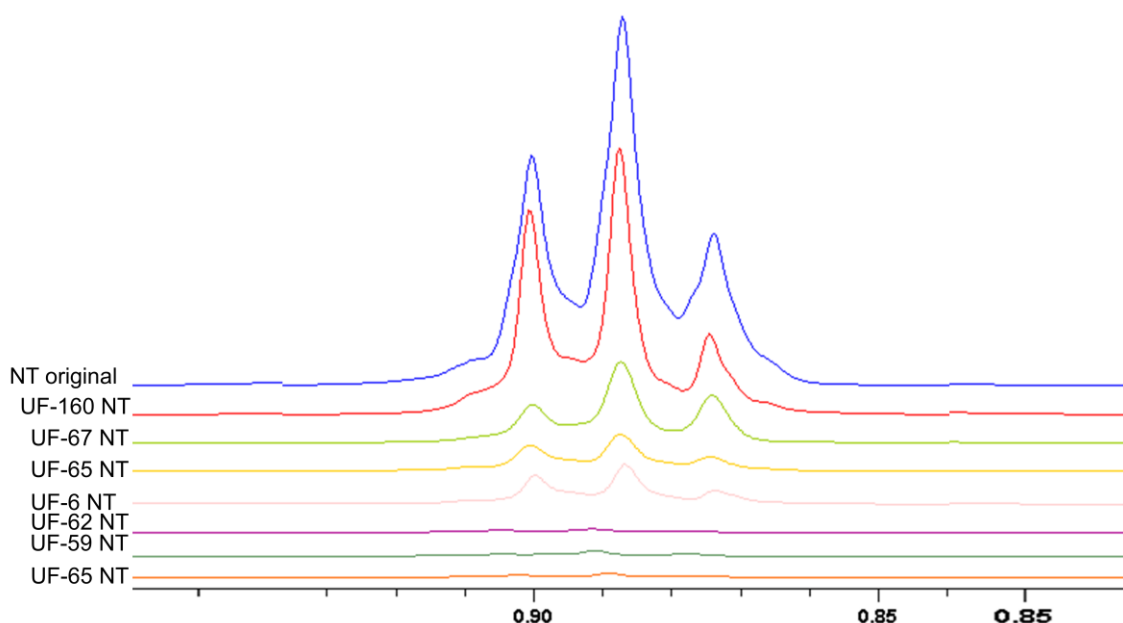


Figura 40: Comparativo entre as intensidades do composto discriminatório (propanol) de amostras NT originais e UF apreendidas.

Com exceção da amostra UF-160 NT, a amostra NT original apresenta o tripleto com intensidade superior a intensidade do mesmo sinal nas amostras apreendidas e possivelmente adulteradas. Como a intensidade do sinal de RMN apresenta linearidade com a concentração, há uma maior concentração do propanol nas amostras originais.

Uma das formas de se adulterar uísque, é com a adição de água.⁴⁸ Com tal prática, ocorre a diluição dos seus componentes, fato que pode explicar as diferentes intensidades nos sinais de RMN do propanol observadas na figura 39.

Ao determinar o teor de etanol nas amostras NT originais e UF (Tabela 3) encontrou-se um resultado similar. A média dos teores de etanol nas amostras originais é superior quando comparada à média da concentração de etanol das amostras apreendidas. Esse fato corrobora a hipótese do uso da diluição para a adulteração de tal marca. Porém, as amostras UF-67 NT (Figura 38), UF-63 NT e UF-6 NT encontram-se com valores de teor de etanol dentro dos padrões de legislação, que seria de 38 a 54%, mas apresentam em seus espectros sinais na região de açúcares (Figura 41), composto esse que não é observado em uísques originais, devido ao fato de que os açúcares produzidos na etapa de fermentação, são consumidos pela levedura para produzir álcoois. Esses sinais intensos nessa região podem ser explicados pelo fato de que os uísques apreendidos pela Polícia Federal no Brasil são frequentemente formulados a partir de bebidas alcoólicas alternativas, que em sua maioria são incolores, necessitando da adição de grandes quantidades de corante caramelo para gerar a característica cor do uísque.^{49,45} Embora a cor do caramelo possa ser classificada em diferentes tipos com base na fabricação, a sacarose e a glicose são sempre usadas como matéria-prima, sendo a sacarose o principal ingrediente.

Tabela 3: Teores de etanol das amostras pelo método ERETIC2.

Amostra	Média da % Etanol	Desvio padrão da média % Etanol
NT original	45,25	2,04
UF-67 NT	42,98	1,41
UF-63 NT	41,68	0,80
UF-6 NT	38,00	8,14
UF-160 NT	37,00	0,24
UF-59 NT	36,46	0,76
UF-65 NT	33,85	0,65
UF-62 NT	32,51	0,04

Legenda: As amostras UF-67, UF-63 e UF-6 apresentam teores de alcoóis com valores aceitáveis de acordo com a legislação (38 à 54%).

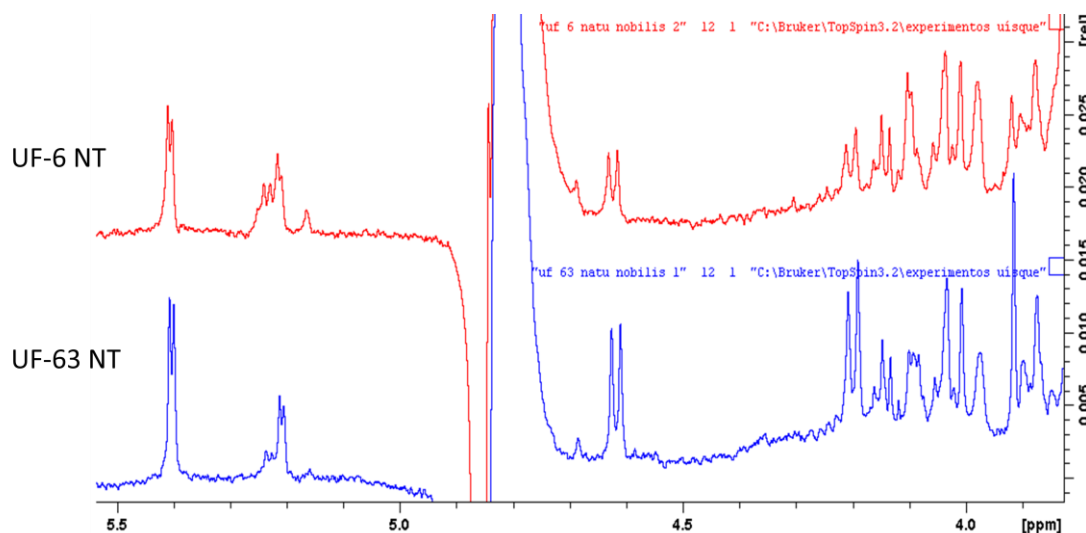


Figura 41: Comparação da região dos sinais de açúcares em um espectro de RMN de ^1H das amostras de uísque. As amostras UF-6 NT, UF-63 e UF-67 apresentaram sinais característicos de hidrogênios anôméricos da sacarose na região $\delta = 4,2$ e $\delta = 5,4$, evidenciando o uso de corante camelo nessas amostras apreendidas para correção da cor.

Vale ressaltar que a amostra UF-160 NT não apresentou distinção de perfil químico quando comparada à amostra original e sua porcentagem de álcool ficou bem próxima do permitido pela legislação. Sendo assim, a sua apreensão pode ter sido ocasionada por fraude fiscal e não por adulteração.

4.4.2 Amostras de Red Label originais e apreendidas

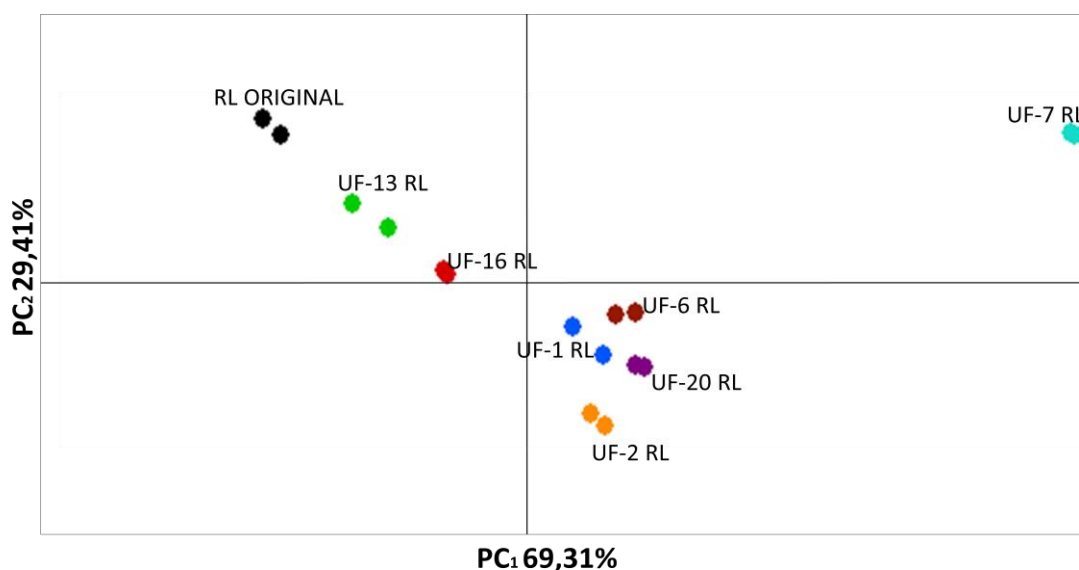


Figura 42: Gráfico de escores da PC₁ x PC₂ para as amostras RL.

Como está apresentado no gráfico da Figura 42, as amostras RL original, UF-13 RL e UF-16 RL foram discriminadas em escores negativos de PC₁ e positivos de PC₂, evidenciando uma proximidade entre seus perfis químicos. As amostras UF-1 RL, UF-2 RL, UF-6 RL e UF-20 apresentam padrões opostos. Já o UF-7 foi discriminado em escores positivos de PC₁ e PC₂. Esse fato revela grande diferença no perfil químico quando comparado aos demais grupos. Essa amostra apresentou um menor teor de etanol 35,66% (Tabela 4), que é considerado bem abaixo dos padrões permitidos, caracterizando assim, essa amostra como sendo adulterada.

A variável de maior peso para a discriminação das amostras em escores positivos de PC₁ foi δ 5,38, cujos sinais são característicos da região de açúcares. O grupo RL-UF-6 apresenta sinais intensos nessa região, caracterizando a discriminação acompanhada nos escores e loadings da PCA (Figura 42 e 43) Esses sinais intensos nessa região podem ser explicados pelo fato que foi citado acima, ou seja, a adição de grandes quantidades de corante caramelo para gerar a característica cor do uísque.⁴⁵ Os principais sinais apontados pelo gráfico de loadings em PC₁ negativo (Figura 38) foram δ 0,89; δ 1,4 – 1,8; δ 1,91, os quais representam a região dos alcoóis superiores, como propanol, o butanol, o isobutanol e o pentanol. E

quando foi feita uma comparação dessa região na sessão acima (Figura 33), realmente observou-se uma diminuição de intensidade desses sinais nas amostras.

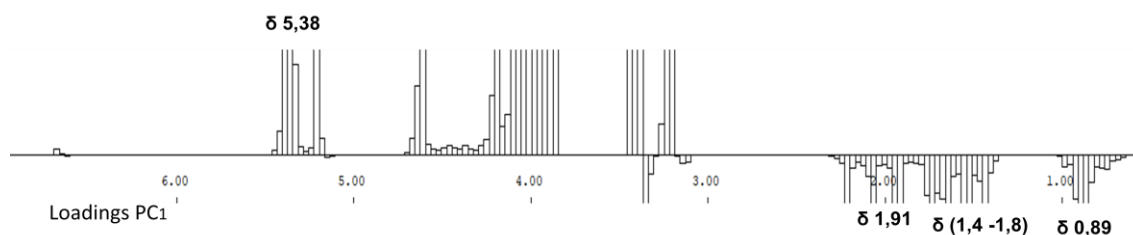


Figura 43: Gráfico de loadings de PC1

Quando foi determinado o teor de etanol nas amostras RL originais e UF (tabela 4) foi encontrado um resultado similar. A média das concentrações de etanol nas amostras originais é superior quando comparada à média da concentração de etanol das amostras UF. O interessante foi que no caso dessas amostras apenas as amostras UF-2, UF-20 e UF-7 não obtiveram porcentagens de etanol dentro dos padrões da legislação, mas todas elas apresentaram sinais com altas intensidades na região de açúcares, como pode ser observado na (Figura 44), evidenciando uma adulteração, como foi citado anteriormente nas amostras de Natu Nobillis.

Tabela 4: Teores de etanol das amostras pelo método ERETIC2.

Amostra	Média da % Etanol	Desvio padrão da média % Etanol
RL original	45,19	0,22
UF-13 RL	44,47	1,17
UF-6 RL	40,95	0,45
UF-16 RL	40,89	0,34
UF-1 RL	40,62	1,07
UF-2 RL	37,24	1,42
UF-20 RL	37,11	1,15
UF-7 RL	35,66	0,58

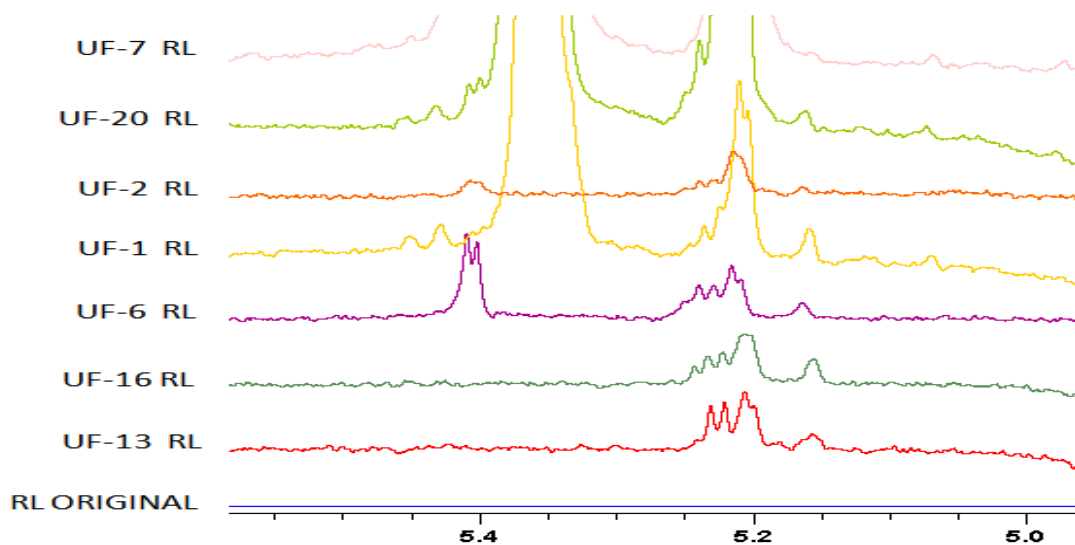


Figura 44: Comparação da região dos sinais de açúcares em um espectro de ^1H RMN das amostras de uísque. As amostras UF-6 NT, UF-63 e UF-67 apresentaram sinais característicos de sacarose na região (δ 5.1 – 5.6), evidenciando o uso de corante camelo nessas amostras apreendidas para correção da cor.

5. CONCLUSÃO

A RMN mostrou-se como uma ferramenta eficiente para ser usada na análise de uísques. As análises dispensam etapas de extração e purificação da amostra, evitando alterações na sua composição química. Compostos minoritários observados em espectros realizados com a supressão da água e do etanol permitiram a discriminação das amostras falsificadas.

Ao realizar uma análise de PCA e ERETIC2 por marcas, foi possível identificar as amostras adulteradas por diluição e as que foram coloridas com corante caramelo e ainda identificar que a amostra apreendida UF-160 NT não apresentou evidências de adulterações. Ficou demonstrado que os uísques falsificados representam um risco ao consumidor que muitas vezes pode estar adquirindo amostras adulteradas, colocando em risco a saúde. A RMN se mostrou útil na avaliação da autenticidade de uísques, de modo a indicar as alterações nas composições de bebidas falsificadas.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Ao Instituto Nacional de Criminalística – INC - DPF, unidade de Brasília.

Ao Grupo de Microfluídica e Eletroforese (GME) e ao Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HOFFMAN, M. A. Whiskey: a fascinating journey through the most famous whiskey and distilleries worldwide; Parragon: Bath, UK, 2008.
- [2] DOLAN, C. S. In Whisky: Technology, Production and Marketing; Russell, I., Ed.; Academic press: London, 2003. cap. 2.
- [3] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A.-B. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009.: Diário Oficial da União. Seção I: p. 20 p. 2009.
- [4]https://edisdisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4311997/mod_resource/content/1/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2015-5.pdf Acesso: 02 de abril 2019.
- [5]<https://www.govinfo.gov/content/pkg/CFR-2008-title27-vol1/pdf/CFR-2008-title27-vol1-sec5-22.pdf> Acesso: 02 de abril 2019.
- [6]<http://www.singlemaltbrasil.com.br/whisky/producao-%E2%80%94maltagem-malting/> Acesso: 02 de abril 2019.
- [7] DRAGONE, G.; FLÓREZ, M. D. G.; GARCÍA, M. A. V.; ALMEIDA E SILVA, J. B. In Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia; Venturini Filho, V. G., Ed.; Edgard Blucher: São Paulo, 2010. cap. 20.
- [8] PIGGOTT, J. R.; CONNER, J. M. IN FERMENTED BEVERAGE PRODUCTION; LEA, A. G. H. PIGGOT, J. R., Ed.; Springer Science + Business Media: New York, USA, 2003; cap. 11.
- [9] BALDWIN, S.; BLACK, R. A.; ANDREASEN, A. A.; ADAMS, S. L. Aromatic Congener Formation in Maturation of Alcoholic Distillates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 15, p. 381-385, 1967.
- [10] REAZIN, G. H. Chemical mechanisms of whiskey maturation. American Journal of Enology and Viticulture, v. 32, p.283-289, 1981.
- [11]RANKINE, B.C. Formation of higher alcohols by wine yeasts relationship to taste thresholds. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, v.18, p.583-589, 1967.
- [12]FAHRASMANE, C.; JOURET, C.; PARFAIT, A.; GALZY, D. Production of higher alcohols and shortchain fatty acids by different yeasts used in rum fermentations. Journal of Food Science, Chicago, v.50, n.5, p.1427-1430, sept./oct. 1985.
- [13]HOUGH, J.S.; STEVENS, R. Beer flavour. IV. factors affecting the production of fusel oil. Journal of the Institute of Brewing, London, v.67, p.488-494, 1961.

- [14] TARKO T , Componentes aromáticos de bebidas alcoólicas . Laboratório 11 : 39 - 42 (2006).]
- [15] ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J.; ETHYL CARBAMATE: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment; Mutat. Res. 1991, 259, 325.
- [16]ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W.; J.; Copper(II) Catalysis in Cyanide Conversion into Ethyl Carbamate in Spirits and Relevant Reactions; Agric. Food Chem. 2001, 49, 2819.
- [17] SWANSTON, J. S.; J; Quantifying cyanogenic glycoside production in the acrospires of germinating barley grains. Sci. Food Agric. **1999**, 79, 745.
- [18] COSTA, R. S.; SANTOS, S. R. B.; ALMEIDA, L. F.; NASCIMENTO, E. C. L.; PONTES, M. J. C.; LIMA, R. A. C.; SIMÕES, S. S.; ARAÚJO, M. C. U. A novel strategy to verification of adulteration inalcoholic beverages based on Schlieren effect measurements and chemometric techniques. Microchemical Journal, v. 78, p. 27-34, 2004.
- [19] BADOLATO, E. S. G.;AUED-PIMENTEL, S.; DURAN, M. C.;NAGATO, L. A. F. Falsificação de uísques no Estado de São Paulo. Bol. IAL, v. 3, n. 1, 1993.
- [20]REZENDE, K. C. A.; MOREIRA, C. M.; LOGRADO, L. P. L.; TALHAVINI, M.; COLTRO, W. K. T. Authenticity screening of seized whiskey samples using electrophoresis microchips coupled with contactless conductivity detection. Electrophoresis. v. 37. p. 2891–2895,2016.
- [21]MARTINS, ANGÉLICA ROCHA ; TALHAVINI, MÁRCIO ; VIEIRA, MAURÍCIO LEITE ; ZACCA, JORGE JARDIM ; Braga, Jez Willian Batista. Discrimination of whisky brands and counterfeit identification by UV-Vis spectroscopy and multivariate data analysis. FOOD CHEMISTRY, v. 229, p. 142-151, 2017.
- [22] PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introdução a Espectroscopia. Tradução da 4º Ed. Norte-Americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- [23] T.KUBALLA, T.HAUSLER, A.O.OKARU, M.NEUFELD, K.O.ABUGA, I.O.KIBWAGE, D.W.LACHENMEIER; Detection of counterfeit brand spirits using

^1H NMR fingerprints in comparison to sensory analysis. Food Chemistry, 245 (2018), pp. 112-118.

[24] ARGENTINA, LUIS; MARIATA, AUGUSTO; FLUMIGNAN, DANILO; TININIS, ARISTEU; PEZZA, HELENA; PEZZA, LEONARDO. Discrimination of Brazilian lager beer by ^1H NMR spectroscopy combined with chemometrics. Food Chemistry, volume 272, 2019, p. 488-493.

[25] CASSINO, CLAUDIA; TSOLAKIS, CHRISTOS; BONELLO, FEDERICA; GIANOTTI, VALENTINA; OSELLA, DOMENICO. Wine evolution during bottle aging, studied by ^1H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. Food Research International. Volume 116 , 2019 , p. 566-577

[26] R.C.BRETON, W.F.REYNOLDS. USING NMR TO IDENTIFY AND CHARACTERIZE NATURAL PRODUCTS. Nat. Prod. Rep. , 30 (4) (2013) , pp. 501 – 524.

[27] GIL, V.M.S. and C.F.G.C. GERALDES, Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações. 1987. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1012.

[28] BRUICE, Paula Yurkanis. QUÍMICA ORGÂNICA. 4ª Ed., São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. V1.

[29] HOLLIS, D. P. Quantitative analysis of aspirin, phenacetin, and caffeine mixtures by nuclear magnetic resonance spectrometry, Analytical Chemistry 35 1682–1684, 1963] [JUNGNICKEL, J.L. FORBES, J.W. Anal. Chem. 35 938–942. 1963.

[30] AKOKA, S., BARANTIN, L. and TRIERWEILER, M. Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. Analytical Chemistry, Vol. 71, No. 13, 2554-2557 July 1, 1999

[31]T. BEYER, C. SCHOLLMAYER, U. HOLZGRABE; The role of solvents in the signal separation for quantitative ^1H NMR spectroscopy, J Pharm Biomed Anal. 52 (2010) 51–58. doi:10.1016/j.jpba.2009.12.007.

[32]V. SILVESTRE, S. GOUPRY, M. TRIERWEILER, R. ROBINS, S. AKOKA, Determination of Substrate and Product Concentrations in Lactic Acid Bacterial Fermentations by Proton NMR Using the ERETIC Method, Anal Chem. 73 (2001) 1862–1868. doi:10.1021/ac0013204.

- [33] BURTON, I. W.; QUILLIAM, M. A.; WALTER, J. A. Quantitative ^1H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products *Anal. Chem.* 2005, 77, 3123– 3131.
- [34] BURTON, I. W.; QUILLIAM, M. A.; WALTER, J. A. Quantitative ^1H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products *Anal. Chem.* 2005, 77, 3123– 3131.
- [35] DEFERNEZ, M.; COLQUHOUN, I. J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H NMR spectra. *Phytochemistry*, 62: 1009 – 1017, 2013.
- [36] GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; DELGADILLO, I.; COLQUHOUN, I. J.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. Study of the compositional changes of mango during ripening by use nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1524 – 1536, 2000.
- [37] GEMPERLINE, P. *Practical Guide to Chemometrics*, 2^a Ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- [38] WEBB, A. R. *Statistical Pattern Recognition*, 2^a Ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.
- [39] ALONSO-SALCES, R. M.; HÉBERGER, K.; HOLLAND, M. V.; MORENO-ROJAS, J. M.; MARIANI, C.; BELLAN, G.; RENIERO, F.; GUILLOU, C.; Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes.; *Food Chemistry*, 2010, 118, 4, 956-965.
- [40] DAIS, P.; HATZAKIS, E.; Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: a critical review.; *Analytica Chimica Acta*, 2013, 765, 1-27.
- [41] MILLER, J. M.; MILLER, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6^a Ed. New York: Prentice Hall, 2010.
- [42] BRERETON, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, Chichester: Wiley, 2003.
- [43] E.M. BORGES, D.A. VOLMER, E. BRANDELERO, J.M.L.N. GELINSKI, M. GALLIMBERTI, F. BARBOSA. Monitoring the authenticity of organic grape juice

via chemometric analysis of elemental data Food Analytical Methods, v. 9 (2) (2016), pp. 362-369

[44] Y.B. MONAKHOVA, W. RUGE, T. KUBALLA, M. ILSE, O. WINKELMANN, B. DIEHL.; D.W. Lachenmeier Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using ^1H NMR spectroscopy Food Chemistry, 182 (2015), pp. 178-184.

[45] TARKO T; Componentes aromáticos de bebidas alcoólicas . Laboratório 11 : 39 – 42, 2006

[46] NAGATO, L. A. F.; NOVAES, F. V.; PENTEADO, M. de V. C. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas. Bol. SBCTA, Campinas, 37(1): 40-47, jan.-jun. 2003.

[47] REAZIN, G. H. Chemical mechanisms of whiskey maturation. American Journal of Enology and Viticulture, v. 32, p.283-289, 1981.

[48] ALAM, T. M & ALAM, M. K. “Chemometric Analysis of NMR spectroscopy data: a review” Annu. Rep. NMR Spectrosc., 54: 41-80, 2005.

[49] CARDOSO, THIAGO M. G. ; CHANNON, ROBERT B. ; ADKINS, JACLYN A. ; TALHAVINI, MÁRCIO ; COLTRO, WENDELL K. T. ; HENRY, CHARLES S. . A paper-basedcolorimetric spot test for the identification of adulteratedwhiskeys. CHEMICAL COMMUNICATIONS, v. 53, p. 7957-7960, 2017.

Anexos

Anexo I

Protocolo de calibração do ERETIC

A.OBJETIVO:

Fornecer instruções adequadas à correta execução da calibração eletrônica (ERETIC) para RMNq de ^1H , para amostras de líquido e HRMAS.

B. ALCANCE:

Todos os estagiários, bolsistas e funcionários do laboratório.

C. RESPONSABILIDADE:

Todos os usuários.

D. EQUIPAMENTO UTILIZADO:

D1. Aparelho:

Bruker Avance III 500 (campo de 11,75 Tesla: 500,13 MHz na frequência do hidrogênio e 125,76 MHz para o carbono)

D2. Sonda:

- TBI (Triple Resonance Broadband Inverse- detecção inversa)
- BBO (Broadband Observe – detecção direta)

E. CONCEITO/FINALIDADE:

Experimento realizado para a detecção do núcleo de hidrogênio visando à calibração eletrônica (ERETIC) para obtenção de medidas quantitativas por meio eletrônico (ERETIC).

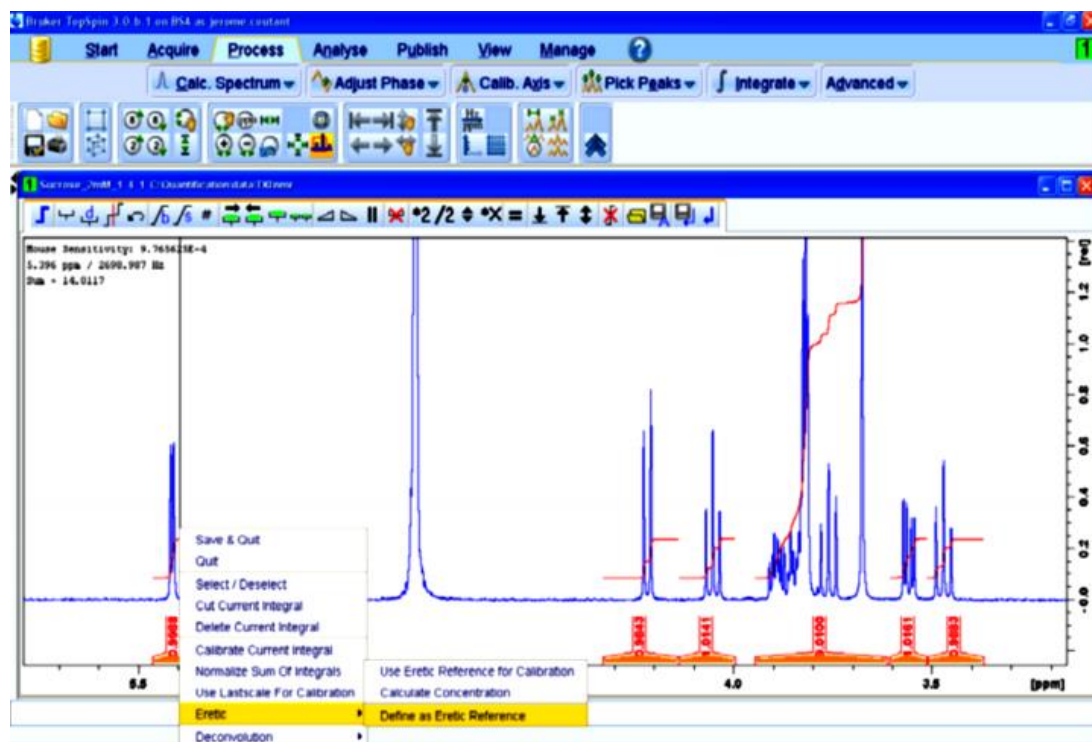
F. PROCEDIMENTO:

E1. Sequência de Pulso:

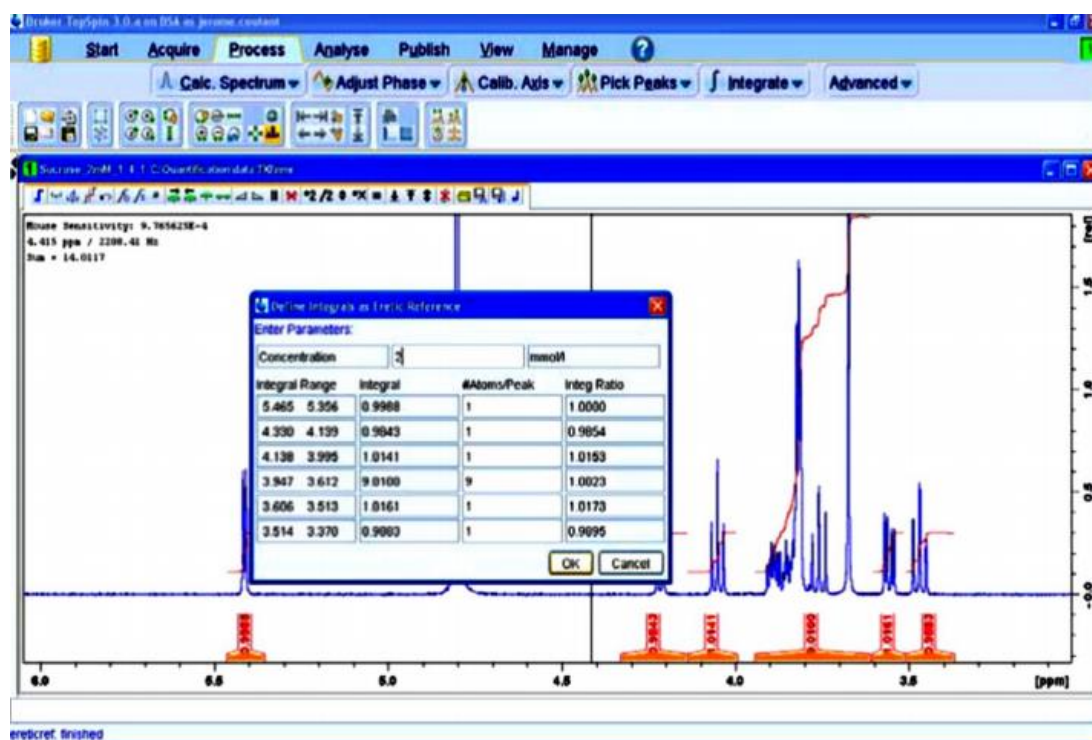
- ZG 90, ZG 30, NOESYGPPR1D

G. PROCEDIMENTO OPERACIONAL:

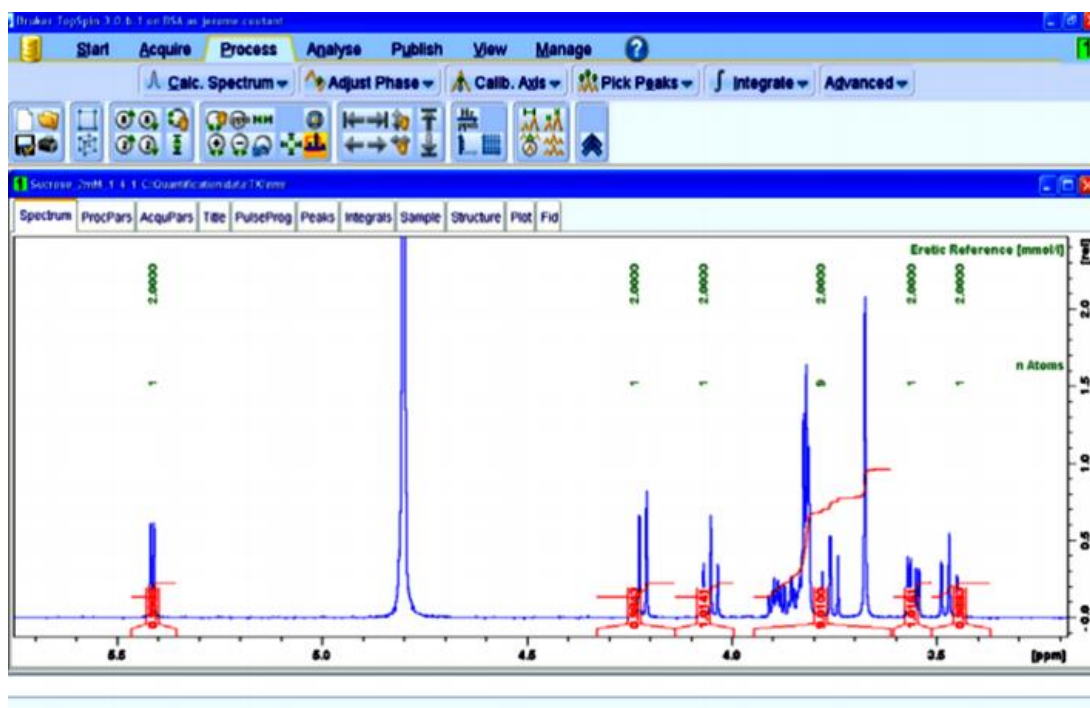
- Trocar a sonda;
- Na aba BSMS, ativar o Lift N (ou digitar ej na barra de comandos);
- Inserir amostra e desativar o Lift (ou digitar ij na barra de comandos);
- Criar um novo experimento: abrir um experimento com a sequência de pulso ZG e digitar o comando edc, a partir da pasta Modelos;
- Para carregar o shimming: digitar o comando rsh e localizar o shimming padrão para aquele solvente e sonda;
- Para sintonia: digitar wobb (ou wobb ^1H – para H);
- Não girar a amostra;
- Para travar o campo: digitar o comando lock + o nome do solvente (ou apenas lock);
- Ajustar a fase do lock;
- No início dos experimentos diários, executar topshim 3d com amostra padrão (90% H_2O /10% D_2O).
- Salvar o shimming como topshim3d;
- Executar topshim;
- Para ajuste fino do shimming, otimizar os eixos Z, Z2 , X, XZ, Y, YZ até obter a maior altura na linha do lock (esse procedimento é feito apenas no começo de uma análise diária);
- Obter um espectro em condições quantitativas, com NS suficiente para que a relação sinal-ruído seja ≥ 100 ;
- Integrar os sinais referentes à sacarose da amostra padrão 90% H_2O /10% D_2O de concentração $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$
- Selecionar todos os sinais integrados



- Em seguida deve-se inserir o valor da concentração da amostra padrão e os valores referentes ao numero de núcleos que da origem a cada sinal como na figura abaixo.



- Ao clicar em OK a calibração estará completa como na figura abaixo.



H. Referência Manual do usuário ERETIC2 – Bruker Biospin, 2016.