



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**

**ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DAS RELAÇÕES ISOTÓPICAS DE ÁLCOOIS DE  
DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS E SUA ADIÇÃO EM VINHOS**

**SUSIANE LEONARDELLI**

**CAXIAS DO SUL**

**2020**

**SUSIANE LEONARDELLI**

**CARACTERIZAÇÃO DAS RELAÇÕES ISOTÓPICAS DE ÁLCOOIS DE  
DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS E SUA ADIÇÃO EM VINHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Regina Vanderlinde

**CAXIAS DO SUL**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

L581c Leonardelli, Susiane

Caracterização das relações isotópicas de álcoois de diferentes matérias-primas e sua adição em vinhos [recurso eletrônico] / Susiane Leonardelli. – 2020.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Orientação: Regina Vanderlinde.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Vinho. 2. Alcool. 3. Isótopos. 4. Biotecnologia. I. Vanderlinde, Regina, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 663.2

**SUSIANE LEONARDELLI**

**CARACTERIZAÇÃO DAS RELAÇÕES ISOTÓPICAS DE ÁLCOOIS DE  
DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS E SUA ADIÇÃO EM VINHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Regina Vanderlinde

TESE APROVADA EM 07 DE DEZEMBRO DE 2020.

---

Orientador: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

---

Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini

---

Prof. Dr. Waldermar Gastoni Venturini Filho

---

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

*“A mente que se abre para uma nova ideia jamais voltará ao  
seu tamanho original.”*

*(Albert Einstein)*

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,  
meus pais Iracema e Mário, minhas irmãs Cristiane e Letícia e  
ao meu amor Eduardo Marcon.

Obrigada por tudo.

## AGRADECIMENTOS

Todas escolhas que fazemos assumimos um compromisso, esses anos de pesquisa foram marcados por grandes desafios. O físico Albert Einstein afirmou que “em meio a dificuldade encontra-se a oportunidade” e de fato, essa tese é fruto não apenas de um esforço pessoal, mas sim do apoio de diversas pessoas.

✓Agradeço a Deus e ao meu anjo da guarda por me iluminar, guiar, proteger e me dar tranquilidade e saúde para seguir em frente com os meus objetivos;

✓Aos meus pais, Iracema e Mário e às minhas irmãs Cristiane e Letícia, por me motivarem, pela estrutura familiar, carinho e incentivo;

✓Ao meu esposo, Eduardo Marcon, por todo amor, carinho, compreensão suporte, incentivo e companheirismo;

✓À minha orientadora, Profa. Dra. Regina Vanderlinde, que desde o estágio da graduação em Engenharia de Alimentos me acompanha e incentiva. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança e pelas oportunidades;

✓Agradeço aos professores da banca de acompanhamento, Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva e Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna e da banca examinadora Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini e Prof. Dr. Waldemar Gastoni Venturini Filho, por disponibilizarem tempo e conhecimento para o aprimoramento do trabalho. Também a Profa Dra. Scheila de Avila e Silva pelas dicas de estatística e dos gráficos;

✓ À Universidade de Caxias do Sul e aos demais professores do PPGBIO, assim como aos funcionários, especialmente a Lucimara Serafini Rech, sempre muito amiga, compreensiva, atenciosa, organizada e cordial;

✓Ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP), financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro;

✓Ao Instituto Nacional de Vitivinicultura do Uruguai (INAVI) em nome do seu presidente em exercício no ano de 2018, o Sr. José Lez que permitiu a realização das destilações, em especial à Graciela Gil e Margarita Cedres pelo acolhimento, atenção, auxílio e discussões. E a todos os amigos do instituto que levo para a vida;

✓A todos os amigos, ex. e atuais colegas do Laboratório de Referência Enológica (LAREN) e da

Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR), que, de forma direta ou indireta, auxiliaram no desenvolvimento deste estudo;

✓Aos meus colegas e amigos Fernanda Spinelli e Gilberto João Cargnel, pela conversa, amizade, carinho e diversos momentos, de estudo, de trabalho, de descontração e muitos vinhos. Fer, que caminhada a nossa hein, fomos o apoio uma da outra em todas as fases do nosso doutorado, obrigada por sempre me mostrar que era possível, pela revisão do inglês nos artigos e toda a conversa de apoio. Gilberto, obrigada por revisar os artigos, conduzir as fermentações, e pelas sugestões críticas e valiosas e por acreditar no meu trabalho;

✓ Aos amigos da SENS, em especial ao George Jacuviske, Antonio Celso Jardim e Leandro Rufino pela compreensão, troca de experiência e conhecimento;

✓ Ao meu grande amigo Adriaan Oelofse pelas dicas, conversas e ajuda com a correção das traduções dos artigos;

✓Agradeço a Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande Sul (SEAPDR) e ao Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN), pela disponibilidade dos equipamentos, materiais e instalações;

✓A todos os amigos e colegas que de uma forma direta ou indireta, contribuíram e auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela atenção, paciência e força que prestaram em alguns momentos de turbulência;

Enfim, pequenos gestos de carinho que para mim foram valiosos. Agradeço a todos que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, por possibilitarem essa experiência enriquecedora e gratificante.

A todos, o meu sincero e profundo, Muito Obrigada!

## ÍNDICE

|       |                                                                                  |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | INTRODUÇÃO                                                                       | 12 |
| 2.1   | OBJETIVO GERAL                                                                   | 14 |
| 2.2   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                            | 14 |
| 3     | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                                                            | 15 |
| 3.1   | O VINHO                                                                          | 16 |
| 3.1.1 | Legislação do vinho                                                              | 16 |
| 3.1.2 | Autenticidade do vinho                                                           | 19 |
| 3.1.3 | Álcoois em vinho                                                                 | 20 |
| 3.2   | PRINCIPAIS MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL                               | 22 |
| 3.2.1 | Laranja                                                                          | 22 |
| 3.2.2 | Maçã                                                                             | 23 |
| 3.2.3 | Melancia                                                                         | 24 |
| 3.2.4 | Mandioca                                                                         | 25 |
| 3.2.5 | Arroz                                                                            | 27 |
| 3.3   | MATÉRIAS-PRIMAS ALTERNATIVAS PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL                             | 30 |
| 3.3.1 | Mirtilo                                                                          | 30 |
| 3.3.2 | Caqui                                                                            | 31 |
| 3.3.3 | Jabuticaba                                                                       | 31 |
| 3.4   | ISÓTOPOS ESTÁVEIS                                                                | 32 |
| 3.4.1 | Valores Isotópicos de Carbono ( $^{13}\text{C}$ )                                | 33 |
| 3.4.2 | Valores Isotópicos de Hidrogênio ( $^2\text{H}$ ) e Oxigênio ( $^{18}\text{O}$ ) | 37 |
| 3.5   | ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE RAZÃO ISOTÓPICA                                      | 39 |
| 4.    | RESULTADOS E DISCUSSÃO                                                           | 41 |
| 4.1   | CAPÍTULO I                                                                       | 42 |

|                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2 CAPÍTULO II                                                              | 66  |
| 4.3 CAPÍTULO III                                                             | 92  |
| 5. DISCUSSÃO GERAL                                                           | 118 |
| 6. CONCLUSÕES FINAIS                                                         | 122 |
| 7. PERSPECTIVAS                                                              | 123 |
| 8. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR                                                 | 124 |
| 9. ANEXOS                                                                    | 131 |
| 9.1 ANEXO A – Validação do método de determinação do hidrogênio              | 131 |
| 9.2 ANEXO B – Validação do método de determinação do oxigênio por pirólise   | 133 |
| 9.3 ANEXO C – Validação do método de determinação do oxigênio por equilíbrio | 135 |
| 9.4 ANEXO D – Validação do método de determinação do carbono                 | 137 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Rendimento de diferentes culturas para produção de etanol.....                       | 21 |
| Tabela 2: Resíduo (Ton.) do processamento da mandioca de quatro agroindústrias diferentes..... | 26 |

## LSITA DE FIGURAS

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Principais fatos da cronologia da legislação do vinho no Brasil e no mundo. ....                      | 17 |
| Figura 2: Produtos e Subprodutos derivados do arroz .....                                                       | 29 |
| Figura 3: Variação da composição isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ (‰) no ambiente e na biosfera. ....         | 36 |
| Figura 4: Variação do $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ dos processos hidrológicos. ....               | 38 |
| Figura 5: Estrutura do espectrômetro de massas, com fonte de íons, campo magnético e coletores de Faraday. .... | 39 |

## LISTA DE ABREVISATURAS E SIGLAS

A.C. – Antes de Cristo

AOAC - Associação de Analistas Químicos Oficiais, do inglês Association of Official Analytical Chemists

Ca(OH)<sub>2</sub> – Hidróxido de Cálcio

CADIOT - tipo de coluna para destilação

CaO – Óxido de Cálcio

CO – Monóxido de Carbono

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

COMEX - Comitê Executivo, do inglês Executive Committee

CONFLO – Interface de transferência da amostra para o espectrômetro de massas

D.C. – Depois de Cristo

Delta (δ)– notação delta

DOC - Denominação de Origem Controlada

EA – Analisador Elementar, do inglês Elemental Analyzer

EEC - Comunidade Econômica Europeia, do inglês European Economic Community

EIM – Determinação do Isótopo do Etanol, do inglês Ethanol Isotope Measurement – Isotopic Ratio Mass Spectrometry

EU – União Europeia, do inglês European Union

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês Food and Agriculture Organization

GC - cromatógrafo gasoso, do inglês gas chromatography

GISP – Padrão do manto de gelo da Groenlândia, do inglês Greenland Ice Sheet Precipitation

H<sub>2</sub> - Hidrogênio

IRMS – Espectrometria de Massas de Razão Isotópica, do inglês Isotopic Ratio Mass Spectrometry

$m/z$  - massa/carga

N<sub>2</sub> - Nitrogênio

NIST - Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês National Institute of Standards and Technology

NMR – Ressonância Magnética Nuclear, do inglês - Nuclear Magnetic Resonance

OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho, do inglês International Organisation of Vine and Wine

PEP - enzima carboxilase fosfoenolpiruvato, do inglês phosphoenolpyruvate carboxylase ou PEP carboxylase

PER MIL (‰) – unidade padronizada para resultados de razão isotópica

PORAPAK Q – coluna cromatográfica para analisador elementar

SLAP – Padrão de água de precipitação da Antártica, do inglês Standard Light Antarctic Precipitation

SNIF – Fracionamento Isotópico Natural Específico, do inglês Site-Specific Natural Isotope Fractionation

SO<sub>2</sub> – Dióxido de Enxofre

TC/EA – Analisador Elementar com Conversor Térmico

Ton. = tonelada

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês United States Department of Agriculture

V-PDB - Vienna Pee Dee Belemnite, Padrão internacional para isótopo de carbono

VSMOW – Padrão de Água do Oceano de Viena, do inglês Vienna Standard Mean Ocean Water

## RESUMO

O álcool do vinho é proveniente da fermentação da uva, não sendo permitido a adição de álcool de qualquer outra fonte. Entretanto, adulterações no vinho podem ocorrer, pois há uma grande viabilidade econômica na produção de álcoois de matérias-primas mais baratas quando comparadas à uva, ou até mesmo produzido de resíduos ou subprodutos de outras culturas. Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho, apresentado em forma de artigos científicos, foi determinar os isótopos de hidrogênio, oxigênio e carbono de álcoois de frutas, raízes e cereais para verificar a adição destes álcoois em vinhos, através da espectrometria de massas de razão isotópica. Para isso foram determinados os isótopos de  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  de vinhos experimentais e fermentados de laranja, maçã, melancia, jabuticaba, mirtilo, caqui, mandioca, batata doce e arroz, assim como, foram avaliados álcoois comerciais de laranja e arroz. Além disso, foi avaliada a resposta dos isótopos de hidrogênio e oxigênio em vinhos quando adicionados de álcoois exógenos de laranja, arroz, melancia e batata doce. No capítulo I intitulado “*Characterization of isotope ratio to identify alcohol from different fruits by isotope ratio mass spectrometry*”, foi observado, como resultado, que o isótopo de hidrogênio é o mais eficiente para identificar a fonte de álcool, seguido pelo oxigênio. O carbono apresenta variações muito pequenas e menos efetivas quando avaliado independentemente. Este estudo também demonstrou que, quando os álcoois de laranja e melancia foram adicionados ao vinho, tanto os valores de  $\delta^2\text{H}$  como os de  $\delta^{18}\text{O}$  apresentam uma resposta diretamente proporcional à concentração do álcool adicionada ao vinho, possibilitando quantificar o álcool adicionado quando conhecidos os valores isotópicos do material precursor. No capítulo II, intitulado “*Characterization of isotopic ratio to identify alcohol from rice, cassava and sweet potato in relation to wine for authenticity control*”, foram avaliados o arroz, a mandioca e a batata doce, os quais são considerados potenciais adulterantes para o vinho como fontes de álcoois. No capítulo II, de forma similar ao capítulo I, o isótopo de hidrogênio foi o mais eficiente para identificar a fonte de álcool, seguido pelo oxigênio. Também demonstrou que, quando os álcoois de arroz e batata doce foram adicionados ao

vinho, tanto os valores de  $\delta^2\text{H}$  como os de  $\delta^{18}\text{O}$  apresentaram uma resposta diretamente proporcional à concentração do álcool adicionada ao vinho, possibilitando quantificar o álcool adicionado quando conhecidos os valores isotópicos do material precursor. Além disso, para viabilizar e otimizar o método de extração do álcool para posterior determinação dos isótopos, no capítulo III intitulado “*A direct and fast ethanol cryogenic extraction for isotopic determinations*”, foi avaliado o sistema de destilação criogênico em comparação com o método oficial que utiliza colunas de banda rotativas. O sistema de extração criogênica é direto, mais rápido e utiliza um volume 200 vezes menor em relação ao método de colunas rotativas, otimizando o processo de preparo de amostras para determinação de carbono. Em resumo, este estudo mostrou que é possível identificar a matéria-prima do álcool exógeno utilizando os isótopos de  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  da molécula de etanol das bebidas. Ademais, tanto os valores de  $\delta^2\text{H}$  como os de  $\delta^{18}\text{O}$  respondem diretamente, quando adicionados de diferentes concentrações de álcoois de outras matrizes quando misturadas ao vinho, sendo possível quantificar a concentração do álcool.

**Palavras-chave:** álcool de frutas, vinho, arroz, mandioca, batata doce.

## ABSTRACT

The wine alcohol comes from the grape fermentation, non-grape alcohol is not allowed in the wine. However, adulterations in the wine can happen because there is a great economic viability in the alcohol production from raw materials cheaper than grapes, or even alcohol produced from waste and by-products from other crops. Therefore, the general objective of this work, presented in the form of scientific articles, was to determine the isotopes of hydrogen, oxygen and carbon of the alcohol from fruits, roots and cereals to identify the addition of these alcohols in wines by isotope ratio mass spectrometry. For this, it was determined the values of  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  of the experimental wines and fermented beverages produced from orange, apple, watermelon, jabuticaba, blueberry, persimmon, manioc, sweet potato and rice. It was also evaluated commercial alcohols from orange and rice. In addition, the hydrogen and oxygen were evaluated of the wines spiked with exogenous alcohols from orange, rice, watermelon and sweet potato in different concentrations. In chapter I entitled “Characterization of isotope ratio to identify alcohol from different fruits by isotope ratio mass spectrometry” it was verified as a result, that hydrogen is the most efficient isotope to identify the alcohol source, followed by the oxygen. Carbon showed smaller variations and less effective separation when evaluated independent. This study also showed that, when alcohol from orange and watermelon were added into wine, even  $\delta^2\text{H}$  as  $\delta^{18}\text{O}$  had values proportional to the alcohol added. Considering this, it was possible to quantify the concentrations of the different alcohols added to wine. Always when the isotope content in the precursor sites of the starting materials are known. In chapter II, entitled “Characterization of isotopic ratio to identify alcohol from rice, cassava and sweet potato in relation to wine for authenticity control”, rice, cassava and sweet potato were evaluated, these cultures are considered potential adulterants for wines as an alcohol source. In chapter II similarly to I, the hydrogen isotope was the most efficient to identify the alcohol source, followed by the oxygen. This study also showed that when the alcohol from rice and sweet potato were added into wine even  $\delta^2\text{H}$  such as  $\delta^{18}\text{O}$  had values proportional to the alcohol added. Furthermore, in order to

enable and optimize the alcohol extraction methodology for further determining the isotopes, in chapter III entitled “A direct and fast ethanol cryogenic extraction for isotopic determinations”, it was evaluated the cryogenic distillation system in relation to the official method in which it uses the spinning band column. The cryogenic extraction system is direct, fast and it needs 200 times less volume in relation to the spinning band method. In short, this study showed that it is possible to identify the source of alcohol using the isotopes  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  from ethanol molecule of the beverages. Additionally, even the  $\delta^2\text{H}$  as  $\delta^{18}\text{O}$  showed effective values in wine spiked with alcohol from other crops, reflecting the concentration of alcohol added into wine. Considering this, it is possible to quantify the concentration of the exogenous alcohol added into wine.

**Keywords:** fruit alcohols, wine, rice, cassava, sweet potato.

## 1 INTRODUÇÃO

Os vinhos atuais apresentam uma grande evolução quando comparados aos primeiros vinhos, tanto em qualidade, como em relação à tecnologia empregada na sua elaboração. Ao longo da história, diversas leis foram implementadas para preservar os atributos da bebida, como forma de assegurar a sua qualidade e autenticidade. Em relação à autenticidade, alguns fatores têm influenciado, há muitos anos, adulterações em vinhos, tal como a viabilidade econômica de outras matérias-primas, o excesso de produção de outras culturas, ou ainda a baixa concentração de açúcares fermentáveis da própria uva em uma determinada safra, produzindo vinhos de baixo teor alcoólico.

Os fatores citados podem incentivar o uso de matérias-primas mais baratas em relação à uva para produzir álcool, ou ainda a utilização de resíduos ou subprodutos oriundos destas matérias-primas também para produção de etanol. Matrizes como laranja, maçã, melancia, jabuticaba, mirtilo, mandioca, batata doce e arroz são fontes promissoras na produção de álcool, as quais apresentam um alto rendimento de conversão dos açúcares em etanol quando comparada à uva. Contudo, a adição de álcool em vinhos não é permitida.

As técnicas que utilizam como princípio os isótopos estáveis são ferramentas aplicadas para controle de qualidade e autenticidade do vinho. Diversos métodos já foram desenvolvidos utilizando os isótopos estáveis, entretanto, para controle do uso de álcool de diferentes matérias-primas não há um método eficiente que identifique todos os álcoois, principalmente quando os álcoois são provenientes de plantas com o mesmo ciclo de fotossíntese, como por exemplo plantas que seguem o ciclo de fotossíntese  $C_3$ , também chamado de ciclo de Calvin Benson.

No grupo de plantas de ciclo  $C_3$ , o isótopo de carbono apresenta variações muito pequenas. Nesse sentido, buscando diferenciar plantas de mesmo ciclo de fotossíntese, outros elementos podem ser estudados, como por exemplo, o oxigênio ou hidrogênio, que sofrem variações ocasionadas pelo fracionamento isotópico que ocorre durante os processos físicos e químicos dos ciclos naturais da

planta.

Os isótopos de hidrogênio e oxigênio são influenciados pelo ciclo da água na natureza, durante os processos de evaporação e condensação. A extensão deste fracionamento é dependente de diversos fatores, como os microclimas, tipo de solo, irrigação, umidade relativa, assim como a fisiologia da planta durante a evapotranspiração. O fracionamento ocorrido reflete nos isótopos de hidrogênio e oxigênio assimilados pela planta, e consequentemente, a molécula de etanol apresenta a mesma composição isotópica da planta de origem.

Considerando o grupo de plantas  $C_3$ , os métodos analíticos estudados nos últimos anos focam em separar o açúcar de beterraba do açúcar da uva, os quais podem ser adicionados, no limite estabelecido pela lei, durante a fermentação do mosto para aumentar o álcool do vinho.

O álcool produzido pelo açúcar de beterraba, quando adicionado ao vinho, pode ser detectado por ressonância magnética nuclear utilizando o isótopo de hidrogênio, esta técnica, porém, não é eficiente para outras matérias-primas, tornando necessário o desenvolvimento de um método mais eficiente para identificar outras fontes de álcool, uma vez que, o álcool pode ser produzido de diversas fontes.

Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo determinar os isótopos de hidrogênio, oxigênio e carbono de álcoois de frutas, raízes e cereais para verificar a adição desses álcoois, chamados de álcoois exógenos, em vinhos, através da espectrometria de massas de razão isotópica, com a finalidade de controlar adulterações em vinhos. Os álcoois estudados nessa pesquisa não foram identificados na literatura até o momento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os isótopos de hidrogênio, oxigênio e carbono de álcoois de frutas, raízes e cereais para verificar a ocorrência da adição desses álcoois em vinhos, através da espectrometria de massas de razão isotópica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os valores de  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  do etanol extraído dos vinhos experimentais e dos fermentados de laranja, maçã, melancia, jabuticaba, caqui, mirtilo, mandioca, batata doce e arroz;
- Investigar uma relação entre o  $\delta^{13}\text{C}$ , o  $\delta^{18}\text{O}$  e o  $\delta^2\text{H}$  do etanol bem como o  $\delta^{18}\text{O}$  da água do vinho e dos fermentados de diferentes matérias-primas;
- Avaliar o  $\delta^{18}\text{O}$  e o  $\delta^2\text{H}$  do vinho quando da adição de álcoois exógenos em diferentes concentrações;
- Comparar o sistema criogênico para extração de álcool das matrizes com o método oficial, que utiliza colunas de banda rotativa.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As bebidas alcoólicas fermentadas são complexas soluções de compostos químicos, provenientes do processo de fermentação das leveduras e outros metabolismos microbianos, que ocorrem durante a fermentação e pós-fermentação (Dias *et al.* 2017). Nos compostos formados, durante a elaboração, incluem-se os compostos secundários relativos ao aroma e ao sabor, como por exemplo, os álcoois superiores, aldeídos, ácidos orgânicos, carboidratos, ésteres, taninos, antocianinas, flavonoides, catequinas entre outros (Rudolph *et al.* 1993).

As bebidas alcoólicas fermentadas têm sido apreciadas e consumidas pela humanidade desde o período Neolítico e basicamente consistem de vinhos, cervejas, destilados, fermentados entre outros produtos. Anualmente, são produzidos aproximadamente  $2.10^{11}$  litros de bebidas alcoólicas globalmente (Day & McSweeney, 2016). Uma grande variedade de frutas são usadas para a produção de bebidas fermentadas, tal como uva, maçã, laranja, abacaxi, entre outras frutas tropicais e subtropicais (Dias *et al.* 2017).

O vinho está entre as bebidas alcoólicas mais antigas conhecidas quando comparado a cervejas e destilados (Day & McSweeney, 2016). A Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) define o vinho como a bebida resultante exclusivamente da fermentação alcoólica, completa ou parcial, de uvas frescas, sendo que o conteúdo de álcool não deve ser inferior 8.5% (OIV, 2020). Da mesma forma, o vinho é definido pela lei brasileira nº 7678 de 08 de novembro de 1988, a qual determina que a denominação de vinho é exclusiva de produtos oriundos da fermentação alcoólica do mosto da uva sã, fresca e madura. Segundo a definição na íntegra de vinho, não é permitido a adição de álcoois, independente da fonte desse álcool.

Álcoois de diversas origens agrícolas, como álcoois de frutas, e cereais e o próprio bagaço da uva podem ser utilizados para produção de bebidas alcoólicas (Day & McSweeney, 2016). Entretanto, devem ser classificados de acordo com a legislação vigente (Brasil, 1988).

### 3.1 O VINHO

A fermentação da uva foi descoberta acidentalmente no período Neolítico, e tornou-se muito importante para a vida das pessoas, principalmente em função do seu efeito antisséptico. Além disso, a própria película da uva contém leveduras capazes de fermentar espontaneamente (Estreicher, 2006).

As primeiras evidências do cultivo da videira foram encontradas no Cáucaso, Turquia, Rússia e Irã, cerca de 7000 a.C., espalhando-se em seguida para a Pérsia, Índia e China. Com a expansão do império Romano, a cultura da videira foi disseminada, primeiramente em áreas próximas ao Mediterrâneo (Awri, 2015). No século XV, a produção de uvas estabeleceu-se nas ilhas Canárias e Madeira, posteriormente América, África do Sul e Austrália. No Brasil, iniciou em 1532, porém teve um grande impulso com a chegada dos imigrantes italianos em 1875 (Leão, 2010).

Atualmente, a área mundial de vinhedos é estimada em 7,4 milhões de hectares, a produção de vinhos em 2019 foi de 260 milhões de hectolitros (1 hectolitro = 100 L) e o consumo estimado no mesmo período foi de 244 milhões de hectolitros. Na União Europeia, houve uma diminuição de produção na safra 2019 em relação à 2018, isto ocorreu em função da influência das condições climáticas, com geadas na primavera, granizo e excesso de calor (OIV, 2020). O Brasil, também apresentou uma redução de 14 milhões de litros na safra de 2019 quando comparada à safra de 2018. Apresentando produção de 403,61 milhões de litros de vinho na safra 2019 (IBRAVIN, 2019).

#### 3.1.1 Legislação do vinho

Considerando o aumento de produção, o valor agregado e a evolução do mercado do vinho, surgiram também as preocupações relacionadas à preservação da identidade desse produto. Algumas pesquisas sugerem que as primeiras versões de regulamentação e legislação para o vinho ocorreram no império romano, de 81 d.C. a 96 d.C. (Lindsey, 2011). Na figura 1, a cronologia da legislação do

vinho pode ser observada com fatos de destaque pontuados na história do vinho.

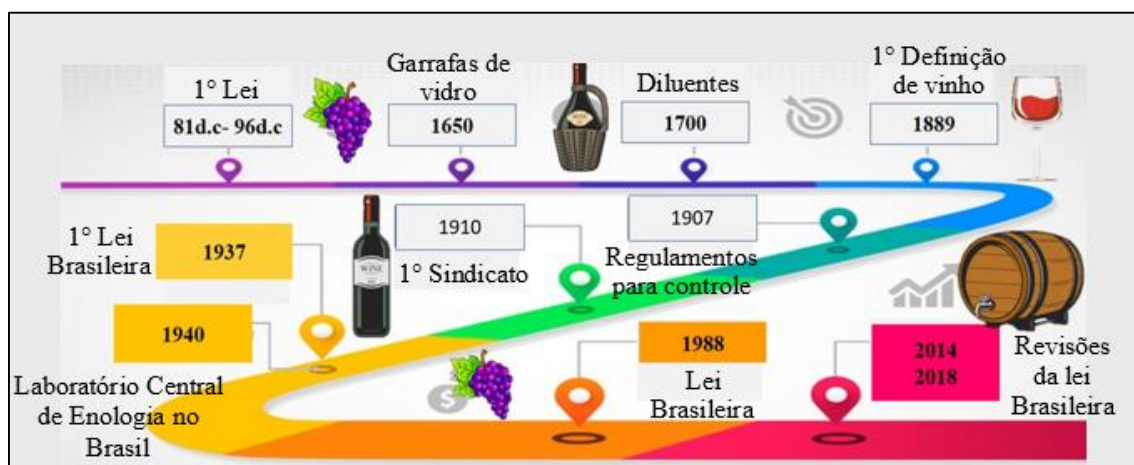


Figura 1: Principais fatos da cronologia da legislação do vinho no Brasil e no mundo. Fonte: o autor.

Em 1650, com o surgimento da garrafa de vidro e o processo de fechamento com rolha surgiram as primeiras propriedades individuais e a preocupação com a qualidade do vinho, principalmente, em relação às demarcações geográficas e a origem do produto. A crescente demanda nos anos de 1700, provocou uma fase de corrupção e falsificação, tendo em vista que o baixo custo do produto incentivou os produtores a aumentar o volume com aditivos e diluentes baratos (Munsie, 2002). Muitas destas influências ainda são enfrentadas atualmente, e se verifica que as adulterações e a superprodução também estão incluídas nas regulamentações modernas (Lindsey, 2011).

Em 1889 foi emitida a primeira definição legal de vinho. A necessidade desta definição foi impulsionada porque o mundo do vinho foi devastado pela filoxera em 1863, praga que destrói as raízes da videira. Nesse período, houve uma grande demanda por vinhos na França, provocando a replantação precipitada e desorganizada das videiras, a qual não evitou a alta dos preços (Bonney, 2020). O oportunismo de preços altos e pouca oferta levou ao uso de substitutos artificiais e todos esses fatores obrigaram o governo a promulgar a primeira definição legal de vinho. Esta definição foi seguida de vários decretos, os quais tentavam reprimir a fraude. Em 1907, o governo francês implantou fortes regulamentos para combater a fraude e a superprodução. Esses regulamentos exigiam relatórios de colheita de uvas e definiam o vinho como um produto elaborado exclusivamente da fermentação de uvas fresca ou do suco de uvas frescas (Phillips, 2016). Em 1910, uma organização

de viticultores locais reconhecida oficialmente constituiu o primeiro sindicato para rastrear e processar quem comprasse ou vendesse vinho adulterado (Munsie, 2002; Colman, 2008).

A grande mudança na Europa para o mercado do vinho foi a assinatura do Tratado de Roma e a criação do EEC (*European Economic Community*) em 1957. Os primeiros membros da EEC foram Bélgica, França, Alemanha, Itália, Luxemburgo e Holanda. A EEC, em 1959, iniciou um processo para unificar a indústria de vinho, com o objetivo de reduzir a competitividade, padronizando o tipo de vinho e o conteúdo de álcool e açúcares (Munsie, 2002).

Em 3 de abril de 2001, em substituição ao Escritório Internacional da Vinha e do Vinho (*“Office International de la vigne et du Vin”*) existente desde 1924, foi estabelecido o acordo do surgimento da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), uma organização intergovernamental com carácter técnico e científico relacionado às videiras, ao vinho, às bebidas à base de vinho, às uvas de mesa e passas e a outros produtos da videira. A OIV é composta por 47 membros e define vinho como a bebida resultante, exclusivamente, da fermentação alcoólica completa ou parcial de uvas frescas ou mosto de uva, com grau alcoólico mínimo de 8,5%. Na definição, deve ser considerado também o clima, o solo, a variedade de uva, fatores qualitativos tradicionais ou específicos de um determinado vinhedo, podendo o grau alcoólico ser reduzido para 7% conforme a legislação local (OIV, 2020).

A primeira lei brasileira para o vinho é de 1937, a lei federal 549 de 20 de outubro. Essa lei unificou a legislação brasileira de vinhos, que anteriormente era determinada por cada estado. Em 1940, surgiu o Laboratório Central de Enologia para aplicar a lei. Ainda assim, até a década de 50 a vitivinicultura brasileira era muito pobre em tecnologia e faltava domínio das técnicas para o cultivo das videiras. Além disso, era permitido a adição de vinhos de mesa na elaboração dos vinhos finos. A partir da década de 70, iniciou-se uma sensível melhora da qualidade do vinho (ABE, 2017). Em 1988, surge a lei que é a principal diretriz atual para o vinho brasileiro, a qual define o vinho como a bebida obtida somente da fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura (Brasil,

1988).

### 3.1.2 Autenticidade do vinho

Estabelecidas as leis e diretrizes do vinho, surge uma preocupação relativa à sua autenticidade, a qual não está somente ligada ao cumprimento das diretrizes legais e à proteção do consumidor. Na verdade, falar em autenticidade vai muito além destes parâmetros, engloba também o interesse dos produtores em oferecer produtos de alta qualidade e confiáveis ao mercado consumidor. Além disso, há um grande interesse econômico e político dos países produtores, para que cada vinho produzido em seu país apresente uma boa reputação internacional (Christoph *et al.* 2015).

O mercado do vinho é um importante setor da economia mundial e o preço da matéria-prima tem instigado há muitos anos as adulterações no campo enológico (Perini & Camin, 2013). Além disso, a produção da uva está na grande maioria das vezes ligada ao sucesso da safra, seja em qualidade ou em quantidade, sendo extremamente dependente do comportamento da natureza (Brasil, 2018).

Alguns países, como forma de proteger sua produção de uva e vinho, já controlam e fiscalizam misturas de variedades, de safras e de diferentes áreas geográficas, como por exemplo, o controle das DOC (Denominação de Origem Controlada) (Christoph *et al.* 2015).

No Brasil, também são adotados diversos controles analíticos baseados nos parâmetros estabelecidos na sua legislação, como por exemplo, controle da adição de água exógena, controle do excesso de açúcar de cana para correção do álcool, grau alcoólico, açúcares totais, acidez total e volátil, entre outros (Brasil, 2018). Além disso, como forma de proteger o produtor é estabelecido o preço mínimo da uva comercializada para cada safra, de acordo com os parâmetros previstos na lei. Este valor mínimo da uva é definido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual é aprovado pelo Conselho Monetário Nacional e oficializado através de uma portaria

publicada no Diário Oficial da União (DOU), pautado pelo Decreto-Lei número no 79 de 19 de dezembro de 1966 e alterado pela Lei no 11.775 de 17 de setembro de 2008 (Brasil, 2018).

Independentemente do resultado final da safra, do comportamento da natureza ou do valor mínimo estabelecido para a comercialização da uva, a legislação determina que a correção do álcool pode ser realizada somente com álcool vínico, ou com açúcar de cana, durante a fermentação do mosto, de acordo com a definição da lei. Além disso, a denominação vinho é exclusiva do produto oriundo da uva sã, fresca e madura, sendo vedada a utilização de produtos obtidos de qualquer outra matéria-prima (Brasil, 1988; Brasil, 2014) .

### 3.1.3 Álcoois em vinho

O emprego de tecnologia ou material que não está autorizado na legislação de produção do vinho é considerado adulteração. Entretanto, é inegável que o mercado de fraudes e adulterações é movido pela viabilidade econômica, seja para aumento de volume, para ter um produto mais agradável ao paladar ou ainda para obter um produto mais competitivo em relação a outros países, os quais produzem vinhos com um nível de álcool mais elevado (Csapó & Albert, 2018).

Quimicamente não são observadas diferenças no álcool proveniente de diferentes matérias-primas. As diferenças estão mais restritas ao rendimento alcançado com cada matéria-prima, à viabilidade econômica da produção e ao grau de purificação pelo qual a matéria-prima foi submetida antes do processamento, para produção do álcool (Bringhenti, 2004).

O grande volume de produção de algumas matérias-primas é um fator importante para a viabilidade econômica da sua utilização. O Brasil, por sua vez, destaca-se por ser um importante produtor de frutas, porém a comercialização da fruta *in natura* gera altos índices de desperdício, sendo descartadas grandes quantidades diariamente, simplesmente por não apresentar a qualidade aceitável para o consumo. Desta forma, várias técnicas de industrialização têm sido desenvolvidas para o

aproveitamento integral destas frutas e uma delas é a fermentação. A elaboração de bebidas fermentadas a partir de frutas é uma técnica eficiente e de baixo custo (Fagundes *et al.* 2015).

Além das frutas, existem outras fontes de carboidratos para produção de etanol, com uma grande viabilidade econômica, como as tuberosas amiláceas, por exemplo a mandioca. Na tabela 1 pode ser observada a eficiência do rendimento da produção de álcool de algumas culturas (Cabello, 2007).

Tabela 1: Rendimento de diferentes culturas para produção de etanol.

| Cultura        | Rendimento<br>(Ton/ha) | Eficiência na<br>conversão (L/Ton) | Rendimento do<br>etanol (L/ha) |
|----------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Beterraba      | 46                     | 110                                | 5060                           |
| Cana-de-açúcar | 65                     | 70                                 | 4550                           |
| Mandioca       | 12                     | 180                                | 2070                           |
| Milho          | 4,9                    | 400                                | 1960                           |
| Arroz          | 4,2                    | 430                                | 1806                           |
| Trigo          | 2,8                    | 340                                | 952                            |
| Sorgo          | 1,3                    | 380                                | 494                            |

Fonte: adaptado de (Cabello, 2007).

Considerando o rendimento de produção necessitamos avaliar as diferenças que estes álcoois podem apresentar, para uma possível identificação de matérias-primas de diferentes origens. Um fator importante a ser considerado, é a composição isotópica destas culturas, com o objetivo de elucidar fraudes em bebidas, como o vinho (Bringhenti, 2004).

## 3.2 PRINCIPAIS MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL

### 3.2.1 Laranja

A laranja é originária da Ásia, tendo sido levada para o norte da África e chegando ao sul da Europa na Idade Média. Em meados de 1500, no período do descobrimento, foi trazida para a América. Os pomares mais produtivos no mundo, atualmente, situam-se nas regiões de clima tropical e subtropical, destacando-se Estados Unidos, Brasil, Espanha, países próximos ao Mediterrâneo, México, China e África do Sul. A América detém a maior região mundial produtora de laranjas, estando estas regiões situadas em São Paulo no Brasil e Flórida nos Estados Unidos. Na década de 80, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial, com mais de 1 milhão de hectares de plantas cítricas em seu território (Matos, 2007). A produção mundial de laranjas para a safra de 2014 foi de aproximadamente 80 milhões de toneladas (FAO/WHO, 2017).

Atualmente, o Brasil apresenta mais de 800 mil hectares plantados de laranja, sendo cultivada em praticamente todos os estados. Comparando com outras culturas observamos que as plantações de laranja ocupam uma área 20 vezes maior quando relacionada à maçã, 10 vezes quando comparada à manga e à uva e o dobro relativamente à plantação de banana. São Paulo detém 70% da área plantada (Neves, 2012).

O cultivo da laranja no Brasil divide-se em dois períodos distintos, de 1990 a 1999 caracterizado por um grande aumento da produção e outro período a partir de 1999, onde se buscou a consolidação da capacidade e desempenho produtivo. Atualmente, a produção brasileira representa 30 % da produção mundial. Projeções do Ministério da Agricultura estimam crescimento de 0,89 % na taxa anual de produção de laranja, o equivalente a 20,5 milhões de toneladas da fruta para a safra 2018/2019. A safra 2016 apresentou uma produção de aproximadamente 16 milhões de toneladas (MAPA, 2016; IBGE, 2016).

### 3.2.2 Maçã

A maçã é uma das principais culturas frutíferas do mundo, alguns historiadores afirmam que a macieira seria a árvore mais antiga cultivada no mundo. Estima-se que a sua origem tenha iniciado há 2.000 anos, no Império Romano. Contudo, o centro da sua origem está na Ásia Central (Petri & Leite, 2008).

A produção mundial de maçãs, está estimada em mais de 70 milhões de toneladas. Atualmente, a China é o país com maior produção, detendo 44,4 % do volume total produzido. Entretanto, sua produtividade é muito baixa, em média 14,9 toneladas por hectare, porém possui uma expressiva área de cultivo com 41,6 % do total da área plantada do mundo. É seguida pelos Estados Unidos, que se encontram na segunda posição, vindo logo depois Turquia, Polônia, Irã e Itália. O grupo formado por Brasil, Chile, Alemanha e Argentina representa entre 1,4 % e 1,7 % da produção mundial (Instituto CEPA/SC, 2011).

No Brasil, os primeiros registros de macieiras é de 1903, com relatos da cultivar Bismark na região de Santa Catarina. Porém, na década de 70, o desenvolvimento desta cultura foi fortemente impulsionado. Atualmente, o Brasil encontra-se na décima posição mundial, com 1,28 milhões de toneladas produzidas, com uma área de 38,6 mil hectares e rendimento médio de 32,1 toneladas por hectare.

As maçãs são utilizadas em uma ampla gama de produtos incluindo consumo *in natura*, desidratada, molhos, sucos, sidras, entre outros. Uma grande quantidade de maçãs é processada anualmente, gerando também uma elevada quantidade de resíduos da casca, polpa e sementes (Villas-Bôas *et al.* 2003; Grigoras *et al.* 2013). Estes resíduos, muitas vezes, não podem ser utilizados para alimentação animal, em função do baixo valor nutritivo (Vendruscolo *et al.* 2008). Contudo, podem ser destinados para a produção de álcool, fenólicos, ácidos lácticos ou extração da pectina. Podendo o álcool produzido da maçã ser utilizado como antisséptico, solvente industrial e em bebidas (Naik *et al.* 2010).

Quimicamente, como principais compostos da maçã podem ser citados os açúcares, pectina e lignina. A maçã é rica em açúcares fermentáveis como a frutose e a sacarose. Após 72 horas de fermentação toda a glicose, frutose e sacarose são consumidas e convertidas em etanol gerando um rendimento de 134 g de etanol a cada 1000 g do resíduo de maçã (Magyar *et al.* 2016).

### 3.2.3 Melancia

A melancia é uma cucurbitácea cultivada nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. Acredita-se que se originou há aproximadamente 4.000 anos, sendo cultivada no vale do Nilo. Os povos indígenas propagaram a cultura da melancia pelo nordeste da África e áreas do Mediterrâneo, estes povos demonstravam grande interesse em alimentos que continham água, e foram selecionando variedades com baixo teor de glicosídeos. Posteriormente, a cultura da melancia foi desenvolvida no Egito antigo. Atualmente, 80% da produção mundial está concentrada na China, Turquia, Rússia, Irã e Brasil (Dias & Rezende, 2010). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, a produção mundial de melancia para a safra de 2014 foi de aproximadamente 186 milhões de toneladas (FAO/WHO, 2017).

No Brasil, o cultivo iniciou em São Paulo, porém as regiões Sul e Nordeste são as principais produtoras. Atualmente, o estado do Rio Grande do Sul, é o maior produtor, seguido da Bahia, Goiás, São Paulo, Paraná e Pernambuco (Furlaneto & Bertani, 2015). A melancia em termos socioeconômicos representa uma cultura de grande importância, pois tem baixo custo de produção e manejo fácil. O cultivo da melancia tornou-se uma cultura popular, pois adapta-se bem a climas quentes e com verão longo (Rocha, 2010).

A melancia aparece com uma matéria-prima interessante para produção de álcool em função de alguns fatores econômicos. Primeiramente, aproximadamente 20 % da produção é deixada no campo devido a deformidades e manchas superficiais, gerando prejuízos para o produtor. Outro fator

importante a ser considerado, deve-se ao fato do valor nutracêutico do licopeno e L-citrulina obtido da melancia, a obtenção desses compostos gera uma taxa de resíduos de 500 L/Ton (Fish *et al.* 2009).

A composição da melancia é basicamente 60 % de polpa e desta polpa 90 % de suco. O suco, contém entre 7 a 10 % (p/v) de açúcares diretamente fermentáveis. Fish et al. (2009) calcularam o rendimento de álcool proveniente de melancia de descarte do campo, no estudo para uma produção de 42 Ton/ha restaria 8,4 Ton/ha de descarte no campo (20 %), com um rendimento de 520 L de suco por tonelada seria produzido em um ano 4370 L de suco contendo 435 Kg de açúcares fermentáveis por hectare. Considerando uma proporção de 0,4 g de álcool/g de açúcar, o rendimento seria de 174 Kg/ha ou 220 L/ha de álcool produzidos a partir do descarte de melancia que ficaria ainda no campo. Justificando a utilização da melancia para produção de etanol, até mesmo como biocombustível.

### **3.2.4 Mandioca**

A mandioca é originária da América do Sul e encontra condições favoráveis para o seu desenvolvimento em regiões tropicais e subtropicais (Mattos *et al.* 2006). É cultivada em diversas partes do mundo em função da sua fácil adaptação aos ecossistemas (Souza & Otsu, 2002; Gomes, 2016). Atualmente, é produzida em aproximadamente cem países. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) a produção mundial de mandioca está em ritmo acelerado de crescimento em relação a outras culturas agrícolas (Groxko, 2016).

A produção mundial em 2016 foi de 288,4 milhões de toneladas (FAO, 2016). O Brasil produz aproximadamente 10 % da produção mundial, sendo o segundo maior produtor mundial. Apresenta uma área plantada de aproximadamente 2 milhões de hectares, com uma produção na safra 2016 de 23 milhões de toneladas de produto (Mattos *et al.* 2006; IBGE, 2016).

A mandioca é uma raiz com valor energético significativo, apresenta alta concentração de carboidratos, especificamente o amido, mas também destaca-se como fonte vitaminas e minerais

(Ferreira Filho, 1997; Gomes, 2016). Dentre os seus diversos usos, podem ser citados a produção de farinha, ração animal e consumo *in natura*. Além disso, pode ser processada pela indústria como o amido (fécula), amido fermentado e produção de álcool para combustível, desinfetante, bebidas e perfumaria (Chicherchio, 2013). O amido proveniente da mandioca quando comparado a outros produtos como milho, batata e arroz é o que apresenta o menor custo, e em função disso, há uma grande perspectiva de crescimento da demanda pelo amido da mandioca no mercado (Oliveira, 2015).

A produção de álcool também pode ser realizada a partir dos resíduos da indústria da mandioca, o que tornaria a matéria-prima viável economicamente para a produção de etanol em relação às outras matérias-primas, visto que, a alternativa de transformar o resíduo amiláceo em coproduto geraria para indústria todos os benefícios de receita e mercadológicos de uma indústria limpa. Na tabela 2, pode ser observada quantidade de resíduos gerada pela mandioca, de quatro indústrias diferentes do estado de São Paulo.

Tabela 2: Resíduo (Ton.) do processamento da mandioca de quatro agroindústrias diferentes.

| Componente                               | 1   | 2   | 3   | 4  | Total |
|------------------------------------------|-----|-----|-----|----|-------|
| Matéria-prima processada                 | 400 | 480 | 400 | 80 | 1280  |
| Resíduos de raízes                       | 8   | 4   | 4   | 8  | 24    |
| Resíduos de cascas                       | 20  | 16  | 16  | 16 | 68    |
| Resíduo líquido                          | 188 | 226 | 188 | 36 | 638   |
| Resíduo do amido decantado               | 14  | 14  | 12  | -  | 40    |
| Resíduo do amido fermentado              | 4   | 4   | -   | -  | 8     |
| Água oriunda da desidratação do processo | 58  | 86  | 78  | 2  | 224   |
| Produto Final                            | 166 | 130 | 108 | 16 | 420   |

\*Ton = tonelada. Fonte: adaptado de (Bringhenti, 2004).

A viabilidade do álcool de mandioca já foi explorada no Brasil no período de 1932 a 1945

como biocombustível, quando a disponibilidade energética da época da guerra era bastante limitada, chegando a produzir 60 milhões de litros anuais de álcool superando a produção de álcool para bebidas (Camacho, 2009).

### 3.2.5 Arroz

Algumas teorias indicam que a origem do arroz iniciou nas encostas das montanhas do Himalaia, outros pesquisadores acreditam que as plantas de arroz surgiram no sudeste da Índia, e posteriormente, teriam chegado na China, onde a cultura teria sido domesticada. Segundo Oka (1988), a domesticação teria ocorrido aproximadamente há 10 mil anos A.C., porém seria difícil traçar a trajetória do arroz através dos seus progenitores selvagens.

O maior produtor de arroz é a Ásia e atualmente detém 90 % da produção mundial, seguida da América do Sul, América Central e África (Tinker *et al.* 1998). A produção mundial de arroz para a colheita 2016/2017 segundo a *United States Department of Agriculture* (USDA) foi de 474,42 milhões de toneladas (USDA, 2017). O Brasil apresenta produção de 10,6 milhões de toneladas, sendo o Rio Grande do Sul o principal estado produtor com 72,3 % da produção nacional, seguido por Santa Catarina com 9,7 % e Mato Grosso com 5,0 % (IBGE, 2017).

O rendimento do grão de arroz é expresso como a porcentagem de grãos inteiros em relação ao grão com casca. O valor comercial dos fragmentos do grão é geralmente 1/5 do valor dos grãos inteiros. A quebra do grão de arroz ocorre em função de vários fatores, como o manejo dos equipamentos e manuseio do produto, ou muitas vezes, o grão já sai do campo com fissuras e se parte no descascamento ou polimento, esta quebra ou fragmento gerado do processamento determina a sua classificação (Castro *et al.* 1999).

A classificação do arroz é definida pelos padrões de identidade e qualidade determinados em lei, conforme a Instrução Normativa número 06 de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento, onde os requisitos de identidade são determinados pela espécie e os requisitos da qualidade em função do beneficiamento. O arroz é classificado em grupos, subgrupos, classes e tipo. A amostra original de arroz que apresentar mais de 50 % de fragmentos é classificada como quebrado ou quirera (Brasil, 2009). Os produtos enquadrados fora de Tipo, conforme a legislação brasileira, podem ser comercializados desde que identificados ou rebeneficiados. Existem várias possibilidades de sua utilização que ainda não são exploradas, visto que, o arroz apresenta um vasto potencial de utilização como matéria-prima, podemos observar na figura 2 as alternativas dos produtos e subprodutos da industrialização do grão de arroz (Noleto *et al.* 2004).

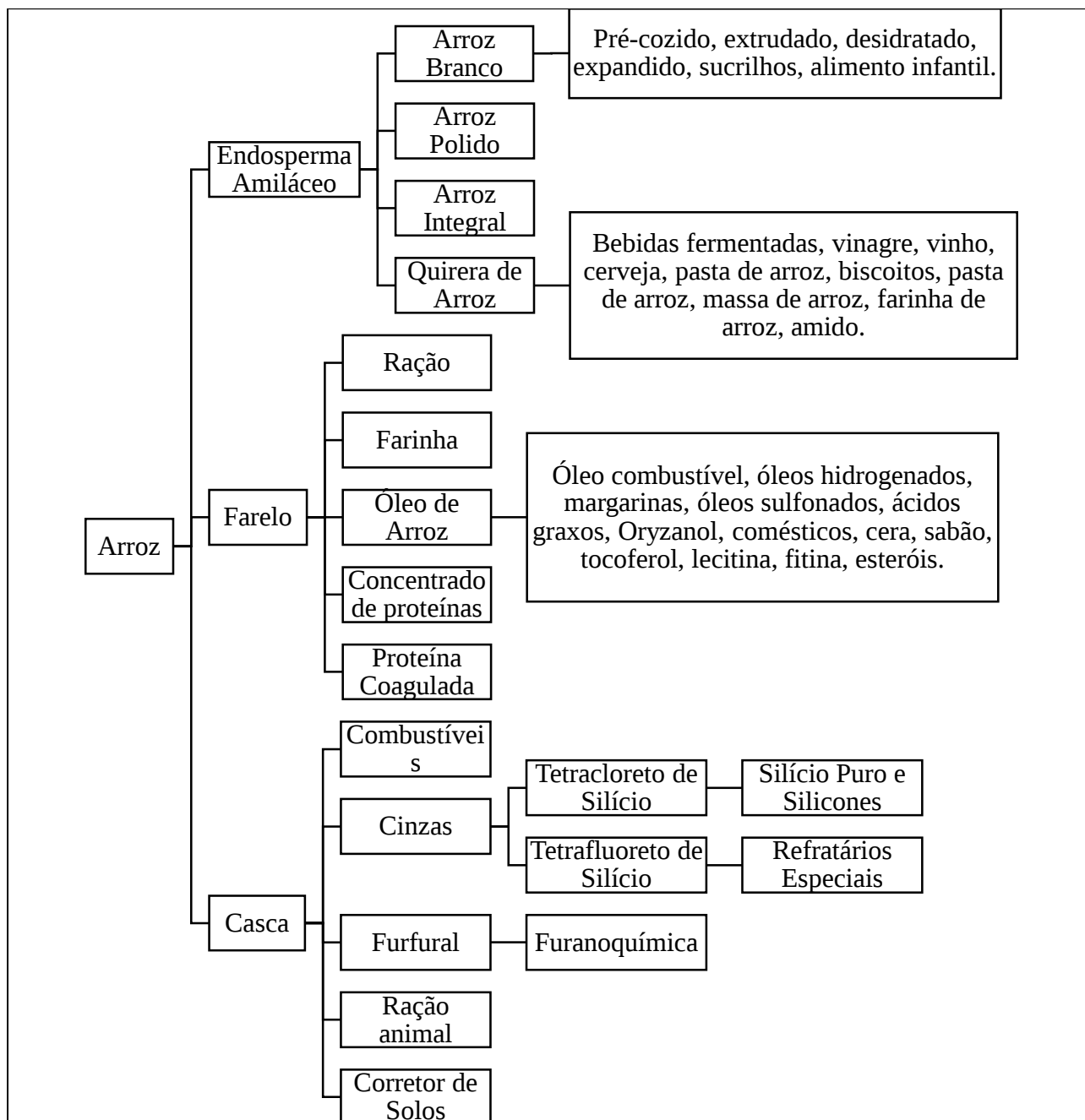


Figura 2: Produtos e Subprodutos derivados do arroz. Fonte: adaptado de Noleto et al. (2004).

A disponibilidade do grão fragmentado e a consequente redução do seu valor comercial são determinantes para a utilização do arroz como matéria-prima, para outros produtos e subprodutos, derivados do arroz. Além disso, o grão de arroz é constituído de amido, o substrato usado pelos microrganismos durante o processo fermentativo, o qual é hidrolisado e convertido em estruturas mais simples para ser utilizado pelas leveduras e produzir álcool (Costa, 2015). Além da utilização do grão fragmentado, a Embrapa Clima Temperado desenvolveu uma cultivar específica para

produção de etanol a AB11047, também chamada de “arroz gigante”, esta variedade apresenta o dobro do tamanho do grão tradicional, é resistente a doenças, tem elevado teor de amido e alto potencial produtivo (Sobczak, 2014).

### 3.3 MATÉRIAS-PRIMAS ALTERNATIVAS PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL

Toda matéria-prima que contenha açúcares ou carboidratos pode ser utilizada para produção de álcool. Neste caso, a viabilidade econômica da cultura agrícola deve ser considerada como o volume de produção, rendimento e custo de produção (Santos *et al.* 2020).

Muitas frutas como mirtilo, caqui e jabuticaba não apresenta viabilidade econômica para produção de fermentados alcoólicos ou de álcool. Contudo, o período de pós-colheita de algumas frutas gera perdas e prejuízos, o direcionamento dessas perdas para outras utilizações é importante como forma de reduzir o detrimento da cultura e aumentar a renda do produtor (Neto *et al.* 2010).

Frutas, que são impróprias para o consumo *in natura* e para elaboração de sucos ou ainda excedentes de safras, podem ser utilizadas para produção de bebidas fermentadas ou de álcool (Batista, 2016). Além disso, a biomassa das frutas também é considerada uma fonte de matéria-prima para a produção de etanol (Santos *et al.* 2020).

#### 3.3.1 Mirtilo

O mirtilo é uma planta nativa da América do Norte, a espécie mais cultivada é a do gênero *Vaccinium* da família *Ericaceae* (Rodriguez-Saona *et al.* 2019). É um fruto silvestre com baga azul escuro de 1 a 2,5 cm, apresentando coroa e formato achatado. O sabor do fruto varia do doce, doce-ácido a ácido, dependendo da variedade (Jesus, 2013).

O mirtilo, embora ainda tenha um alto custo de produção em relação a outras culturas, muitas

vezes tem sido utilizado na produção de bebidas alcoólicas fermentadas devido a sua similaridade com o vinho. Características tanto sensoriais como físico-químicas, como a acidez da fruta e a cor. A casca da fruta também pode ser utilizada como forma de aproveitamento industrial (Coutinho *et al.* 2017).

### 3.3.2 Caqui

O caquizeiro (*Diospyros kaki L.*) é originário da Ásia, mais precisamente da China (Edagi & Kluge, 2009). A planta do caqui (caquizeiro) é de porte arbóreo, apresenta folhas que caem no inverno e desenvolvimento inicial lento (Lopes *et al.* 2014).

A utilização do caqui para produção de bebida alcoólica justifica-se pelo fato de aproveitar as frutas que seriam descartadas ou comercializadas por valores abaixo do praticado no mercado, muitas vezes, por não apresentar o padrão de qualidade ou estético estabelecido pelo mercado consumidor (Carvalho *et al.* 2020)

### 3.3.3 Jabuticaba

A jabuticaba (*M. cauliflora*) é o fruto da jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*, Berg), é originária do centro-sul do Brasil (Asquieri *et al.* 2009). É uma árvore de tamanho médio, com folhas lanceoladas, flores brancas e frutos globosos. Os frutos apresentam casca negra, polpa esbranquiçada e mucilaginoso (Fernandes & Silva, 2018).

A jabuticaba é uma fruta de consumo imediato ou utilizada para elaboração de sucos. A utilização da fruta para elaboração de álcool ou de bebidas alcoólicas é uma forma de aproveitamento das frutas que não tem qualidade para consumo *in natura* para a elaboração de sucos (Asquieri *et al.* 2009).

### 3.4 ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Isótopos são átomos em que o núcleo contém o mesmo número de prótons, mas diferente número de nêutrons. Podem ser divididos em dois tipos, estáveis e não estáveis ou radioativos, havendo aproximadamente 300 estáveis e 1200 radioativos descobertos até o momento (Hoefs, 2018). Diferenças nas propriedades químicas e físicas aumentam de acordo com a variação da massa atômica do elemento. Sabe-se que a estrutura eletrônica de um elemento determina o seu comportamento químico, enquanto que, o núcleo é responsável pelas diferenças nas propriedades físicas (Hoefs, 2018).

As variações nas propriedades físicas e químicas aumentam em função de pequenas variações entre eles. Os valores das propriedades como densidade, ponto de fusão e ebulição e viscosidade, dos compostos com isótopos mais pesados são mais altos quando comparados aos isótopos mais leves. As diferenças são mais significativas para compostos com massa atômica inferior a 50, como por exemplo, o carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N). Além disso, compostos com isótopos leves apresentam maior movimento vibracional e necessitam de menos energia para quebrar as ligações químicas (Tiwari *et al.* 2015).

Nos últimos anos, as determinações de isótopos estáveis têm se tornado uma ferramenta no combate à fraude e controle de autenticidade de alimentos, ingredientes alimentícios e bebidas, especialmente sucos de frutas e vinhos (Magdas *et al.* 2014). Desde 1986, a União Europeia e a OIV reconhecem e tornam oficiais os métodos de razão isotópica para controle de autenticidade. Podem ser citados, como exemplos, o método para detecção de açúcares e de água em vinhos (Perini & Camin, 2013). Além disso, os métodos isotópicos são um importante marcador de origem geográfica, visto que, os isótopos, principalmente o oxigênio e o hidrogênio são influenciados pelas condições climáticas e aspectos como altitude, latitude, temperatura, umidade, evaporação e absorção da água pelas plantas, entre outros (Caxito & Silva, 2015).

As determinações dos isótopos estáveis são realizadas utilizando um espectrômetro de massas de razão isotópica, e as medidas são expressas como a razão entre o isótopo mais pesado em relação ao isótopo mais leve, como é o caso do carbono que é determinado em  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , do oxigênio em  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  e do hidrogênio  $^2\text{H}/^1\text{H}$  (Ferreira, 2008). O valor é calculado de acordo com a equação 1, onde R é a razão isotópica de dois isótopos nas substâncias B e D. O resultado final é multiplicado por mil e a unidade expressa como delta (em função da variação calculada) e per mil (‰). Normalmente, os valores de delta são medidos relativos a um padrão internacional de referência, que substitui a substância D (Coplen, 2011).

$$\frac{(R_B - R_D)}{R_D} \quad \text{Equação 1}$$

### 3.4.1 Valores Isotópicos de Carbono ( $^{13}\text{C}$ )

As plantas podem ser classificadas de acordo com a rota de fixação do carbono. Até o momento, foram identificados e caracterizados três ciclos fotossintéticos principais com base nos diferentes modos de assimilação do  $\text{CO}_2$ , o ciclo de Calvin Benson, o ciclo de Hatch-Slack e o ciclo do metabolismo ácido das crassuláceas, CAM (*crassulacean acid metabolism*), que por sua vez designam os diferentes tipos de plantas, como  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  e CAM. Plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  possuem sua composição radicular muito diferente, pois as plantas  $\text{C}_4$  apresentam alta concentração de aminoácidos e ácidos orgânicos, enquanto, plantas  $\text{C}_3$  possuem alta concentração de carboidratos (Sivaran *et al.* 2018). Cada rota fotossintética assimila de forma diferente o  $\text{CO}_2$  atmosférico, refletindo esta diferença no isótopo mais pesado como o carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ), tornando os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  distintos entre as plantas de fotossíntese  $\text{C}_3$ , quando comparada com plantas de ciclo  $\text{C}_4$  (Brooks, *et al.*, 2002).

O fracionamento enzimático do isótopo do carbono, que ocorre durante o ciclo de fotossíntese

C<sub>3</sub> resulta em constituintes que são relativamente pobres em <sup>13</sup>C. A uva, cevada, trigo, entre outras são exemplos de plantas que seguem a rota metabólica de ciclo C<sub>3</sub>. Nestes casos, os valores isotópicos de <sup>13</sup>C variam de -24 a -32 ‰ (Parker *et al.* 1998; Costinel *et al.* 2011). O fator que determina o <sup>13</sup>C de plantas C<sub>3</sub> pode ser descrito pela equação 1:

$$\delta^{13}C_{C_3planta} = \delta^{13}C_{ar} - \left( a + (b - a) \left( \frac{c_i}{c_a} \right) \right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$\delta^{13}C_{ar}$ : reflete a fonte de CO<sub>2</sub> no ar;

a: constante representando a discriminação em relação ao <sup>13</sup>C devido a difusão do CO<sub>2</sub> dentro da folha, sendo a = 4,4‰;

b: constante representando a discriminação devido a carboxilação, sendo b=27‰;

C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>: é a razão da concentração de CO<sub>2</sub> dentro e fora da folha (Brooks, et al., 2002).

O ciclo de fotossíntese C<sub>4</sub> é uma evolução do ciclo C<sub>3</sub>, o qual envolve a modificação da anatomia e fisiologia das folhas acompanhado da mudança nos genes da planta. Esse ciclo tornou-se mais eficiente que o ciclo C<sub>3</sub>, visto que, aumenta a concentração de CO<sub>2</sub> em torno da enzima Rubisco, que é a mais abundante nas plantas. Além disso, é caracterizado por altas taxas de fotossíntese e eficiente uso das fontes de água e nitrogênio. Devido ao seu próprio mecanismo de concentração do CO<sub>2</sub>, pode reduzir a condutância dos estômatos e economizar água. Basicamente, a fixação inicial do CO<sub>2</sub> ocorre na forma de bicarbonato pela enzima carboxilase fosfoenolpiruvato (PEP) (*phosphoenolpyruvate carboxylase* ou *PEP carboxylase*), resultando no oxaloacetato com 4 carbonos que é convertido nos metabólitos malato e aspartato (Bräutigam & Gowik, 2016).

Plantas que utilizam a rota fotossintética C<sub>4</sub>, como a cana de açúcar, o milho e o sorgo, em função de sua alta eficiência de conversão em etanol, produzem açúcares mais baratos, quando comparados com açúcares provenientes de planta C<sub>3</sub>. E os valores isotópicos de <sup>13</sup>C de açúcares de

planta C<sub>4</sub> variam de -15 a -11 ‰ (Magdas *et al.* 2014; Costinel *et al.* 2011). A diferença nos valores ocorre basicamente em função das estruturas anatômicas internas, que utilizam uma enzima adicional durante o processo de fotossíntese, permitindo concentrar o CO<sub>2</sub> dentro das células. A estrutura anatômica juntamente com a enzima influencia na discriminação em relação ao isótopo mais pesado (<sup>13</sup>C), durante a fotossíntese. A equação 2 reflete o δ<sup>13</sup>C de plantas C<sub>4</sub> e está descrita abaixo:

$$\delta^{13}C_{C_4planta} = \delta^{13}C_{ar} - \left( a + (b_4 + b_3\phi - a) \left( \frac{c_i}{c_a} \right) \right) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

δ<sup>13</sup>C<sub>ar</sub>: reflete a fonte de CO<sub>2</sub> no ar;

a: constante representando a discriminação em relação ao <sup>13</sup>C devido a difusão do CO<sub>2</sub> dentro das folhas, sendo a = 4,4‰;

b<sub>4</sub>: discriminação da PEP carboxilase em relação ao bicarbonato, b<sub>4</sub> = -5,7‰;

b<sub>3</sub>: discriminação pela ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) carboxilase, b<sub>3</sub> = 29‰;

φ: é a taxa de perda do CO<sub>2</sub> da folha;

C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>: é a razão da concentração de CO<sub>2</sub> dentro e fora da folha (Brooks, et al., 2002).

As diferenças observadas na fixação do CO<sub>2</sub> da planta, quando segue o ciclo de fotossíntese C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub> refletem nos valores de δ<sup>13</sup>C, permitindo criar distinções entre estas plantas, conforme pode ser observado na figura 3.

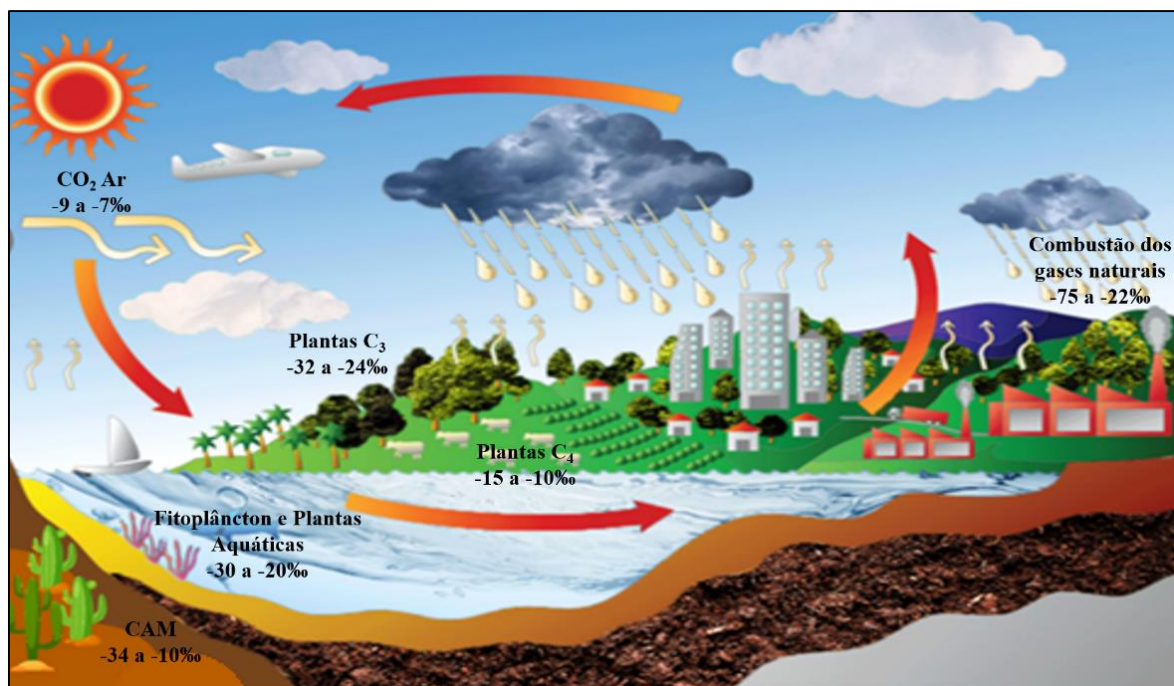


Figura 3: Variação da composição isotópica do  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) no ambiente e na biosfera. Fonte: adaptado de Leonardelli (2015).

Além disso, a diferença encontrada pode ser utilizada para rastrear a contribuição de fonte de carbono C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> nas misturas de carbonos orgânicos, como por exemplo, nas bebidas alcoólicas (Boutton, 1996; Buchmann & Ehleringer, 1998).

Nas bebidas alcoólicas, o etanol representa a molécula, na qual a composição isotópica está presente e pode ser usada como um indicador de autenticidade. Como por exemplo, avaliar a autenticidade do vinho, utilizando como referência os valores isotópicos da uva. Isso porque a molécula de etanol do vinho apresenta a composição isotópica intramolecular do carboidrato da uva. Além disso, a composição isotópica do etanol do vinho tem sido usada para avaliar a influência das condições climáticas (Gilbert *et al.* 2013).

Açúcares de fonte C<sub>4</sub>, como o açúcar de cana, são adicionados ao vinho com o objetivo de corrigir a deficiência dos açúcares da uva como sacarose (prática prevista em lei - Decreto 8198 de 2014). Esse açúcar é facilmente detectado através da técnica de espectrometria de massas de razão isotópica (IRMS, *isotope ratio mass spectrometry*). Por outro lado, quando ocorre adição de açúcares ou etanol provenientes de plantas com a mesma rota fotossintética, tal como as plantas C<sub>3</sub>, como a

beterraba ou a maçã, torna-se mais difícil a detecção deste tipo de adulteração. Nesse caso, é necessário utilizar outras técnicas como é o caso do RMN ou outros isótopos como o hidrogênio ( $^2\text{H}$ ), também chamado deutério, e oxigênio ( $^{18}\text{O}$ ) (Guillou & Reniero, 2001).

O controle de adulteração com adição de açúcares ou álcoois em vinhos é importante para controlar a qualidade do produto, visto que, no Brasil há limites estabelecidos, no decreto 8.198, de 20 de fevereiro de 2014, para a correção do mosto com adição de açúcar de cana durante a fermentação, com o objetivo de aumentar o percentual de álcool no vinho (Brasil, 2014). O limite estabelecido no decreto para correção do mosto é de uma elevação máxima de 3 % do grau alcoólico do vinho (v/v) (Brasil, 2018). Sendo vedada a correção do mosto em vinhos viníferas com graduação alcoólica superior a 13 % e inferior a 10 %, assim como, em vinhos de mesa com grau alcoólico superior a 13 % e inferior a 9 % (Brasil, 2014).

### 3.4.2 Valores Isotópicos de Hidrogênio ( $^2\text{H}$ ) e Oxigênio ( $^{18}\text{O}$ )

A maioria dos resultados analíticos conectam a composição isotópica do hidrogênio e oxigênio da água da chuva que, em seu ciclo, evapora e em parte, é absorvida pelas plantas e escoar como água superficial infiltrando-se como água subterrânea. Essa água carrega informações sobre o clima local, as condições geográficas, a temperatura, volume de precipitação, umidade, altitude ou latitude (Costinel *et al.* 2011). Craig (1961), observou que os valores de  $\delta^2\text{H}$  (ou  $\delta\text{D}$ ) e o  $\delta^{18}\text{O}$  da precipitação apresentavam uma relação linear entre si, conforme a equação 3.

$$\delta^2\text{H} = 8 \times \delta^{18}\text{O} + 10 \quad \text{Equação 4}$$

O fracionamento dos isótopos de hidrogênio e oxigênio ocorrem durante os processos de evaporação e condensação do ciclo da água (figura 4). A água ao passar do seu estado líquido no

oceano, para o estado de vapor na atmosfera, sofre um forte fracionamento isotópico, resultando em uma diminuição do isótopo mais pesado, no caso o  $\delta^2\text{H}$  e o  $\delta^{18}\text{O}$  (Calderone & Guillou, 2008). Além das condições climáticas de um local influenciar na composição isotópica da água, a precipitação pluviométrica e a evapotranspiração também modificam a transpiração das folhas e frutas, os quais podem provocar um enriquecimento do isótopo mais pesado na planta (Rossmann *et al.* 1999).

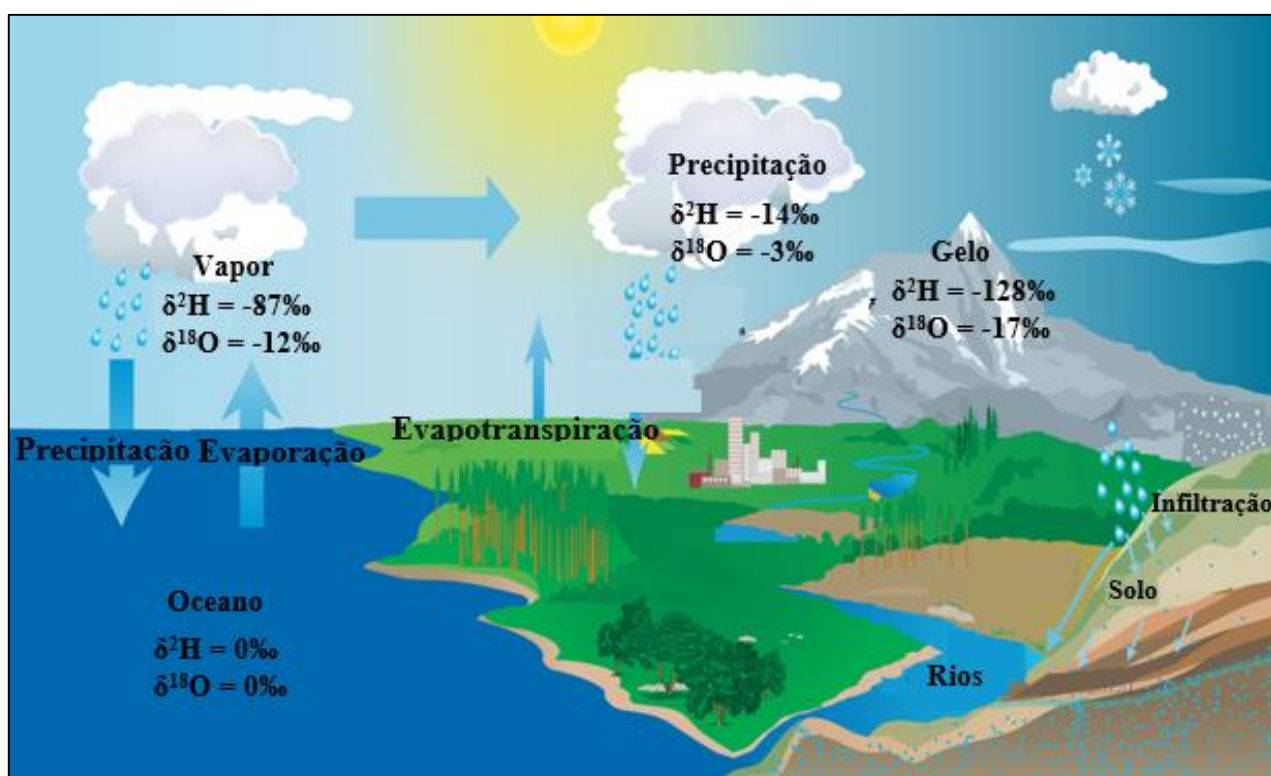


Figura 4: Variação do  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  dos processos hidrológicos. Fonte: adaptado de Xi (2014).

A única fonte de hidrogênio na planta é a água, já o oxigênio é aproveitado pela planta de diversas formas como através do oxigênio da atmosfera, do dióxido de carbono, e principalmente da água do solo. Consequentemente, a fonte de oxigênio e hidrogênio da água do vinho reflete o local de origem deste vinho (Calderone & Guillou, 2008).

A fisiologia da planta é outro fator importante que contribui no fracionamento isotópico, visto que, a planta regula a abertura e o fechamento dos estômatos de acordo com a disponibilidade de água do ambiente, seja no solo ou na atmosfera. Da mesma forma, há uma contribuição da

evapotranspiração da planta durante o período de maturação, pois este processo também provoca um enriquecimento no isótopo mais pesado (Calderone & Guillou, 2008).

As diferenças na composição isotópica da água das videiras ocorrem, principalmente, influenciadas pela alta evaporação em áreas quentes e secas comparadas com áreas úmidas e frias. A água da uva que está contida no vinho apresenta valores de  $\delta^{18}\text{O}$  podendo variar entre + 4 e - 4 ‰ conforme estudo realizado por Christoph et al. (2015), os valores são mais altos quando comparados aos valores de  $\delta^{18}\text{O}$  da água da chuva e dos rios, os quais variam entre -14 e -3 ‰. Valores negativos de  $\delta^{18}\text{O}$  encontrados em vinhos indicam a adição de água exógena ou o resultado de uma safra com altos níveis de precipitação pluviométrica (Rossmann *et al.* 1999).

### 3.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE RAZÃO ISOTÓPICA

As razões isotópicas são obtidas através de um espectrômetro de massas de razão isotópica. Esse equipamento consiste em uma fonte de íons de impacto de elétrons, um campo magnético e coletores de Faraday, o sistema pode ser observado na figura 5 (Johnson et al., 2018).

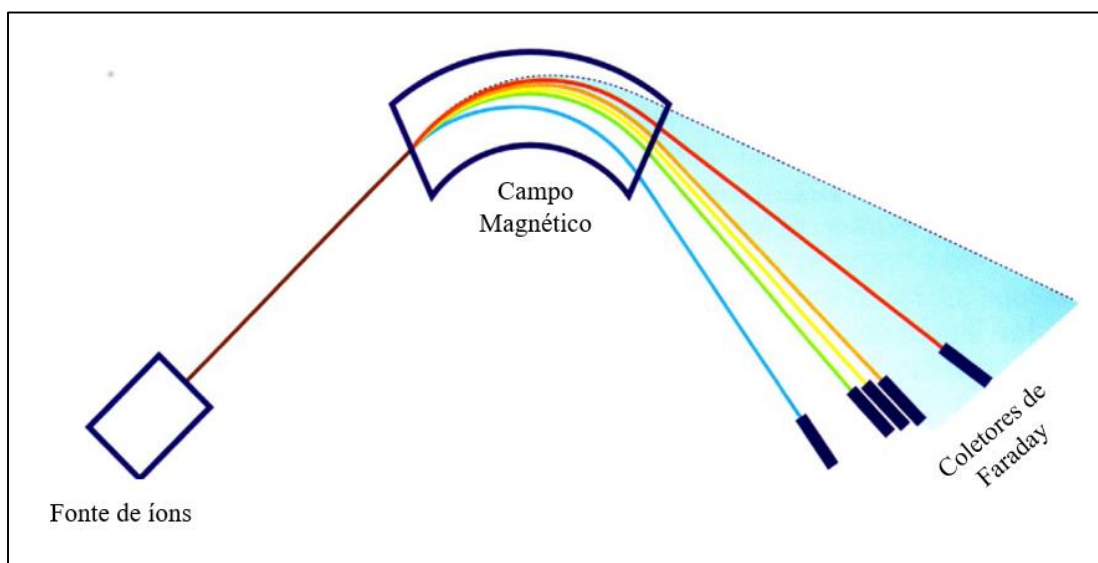


Figura 5: Estrutura do espectrômetro de massas, com fonte de íons, campo magnético e coletores de Faraday. Fonte: adaptado de Kelly et al. (2018).

Os elétrons, produzidos pelo filamento aquecido, são acelerados através de uma câmara e sofrem colisões inelásticas com as moléculas do gás a serem analisadas. Nas colisões inelásticas a energia cinética total não é conservada. A ionização eletrônica ocorre na fonte, onde a colisão entre os elétrons e as moléculas da amostra originam íons positivos e negativos, os íons positivos formados são utilizados na determinação pelo espectrômetro de massas de razão isotópica (Ferreira, 2008).

As moléculas resultantes dessa ionização são injetadas no analisador de massas por uma série de placas eletricamente carregadas (Mounier, 2020). O sistema trabalha com vácuo de  $1 \times 10^{-6}$  a  $7 \times 10^{-8}$  mbar. As amostras são convertidas em gases, como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2$  ou  $\text{N}_2$ , antes de ser transferida para o espectrômetro de massas (Kelly et al. 2018).

A amostra ionizada na fonte de íons, onde os cátions originados (íons positivos) são acelerados por diferença de potencial, gera um campo magnético que deflete a trajetória desses íons em função da massa/carga ( $m/z$ ). A deflexão provocada em função da massa/carga direciona os íons aos coletores de Faraday, os quais ao atingirem o coletor geram uma corrente elétrica. Quanto maior o número de partículas, maior também a corrente gerada. As correntes são finalmente amplificadas e a voltagem é convertida em frequência e utilizada no cálculo da razão isotópica (Caxito & Silva, 2015).

A variedade de aplicações do espectrômetro de massas nos segmentos da arqueologia, medicina, geologia, biologia, autenticidade de alimentos e ciências forenses originou diferentes estratégias, para converter a matéria orgânica e inorgânica em gases, para a determinação dos isótopos (Muccio & Jackson, 2009). As primeiras interfaces desenvolvidas, para acoplar ao espectrômetro de massas de razão isotópica para um sistema de fluxo contínuo, foram o analisador elementar (EA) e o cromatógrafo gasoso (GC). Posteriormente, foi empregado também o cromatógrafo líquido (Kelly et al. 2018).

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados deste trabalho estão divididos em três capítulos e, neste item, estão descritos os títulos dos artigos. As informações mais específicas referentes aos mesmos estão detalhadas em seus respectivos artigos.

CAPÍTULO I - Characterization of isotope ratio to identify alcohol from different fruits by isotope ratio mass spectrometry.

CAPÍTULO II - Characterization of isotopic ratio to identify alcohol from rice, cassava and sweet potato in relation to wine for authenticity control.

CAPÍTULO III - A direct and fast ethanol cryogenic extraction for isotopic determinations.

.

#### 4.1 CAPÍTULO I

**Characterization of isotope ratio to identify alcohol from different fruits by isotope ratio mass spectrometry.**

Enviado para publicação

**Characterization of isotope ratio to identify alcohol from different fruits by isotope ratio mass spectrometry.**

Susiane Leonardelli<sup>1,2\*</sup>, Gilberto J. Cargnel<sup>2</sup>, Gustavo Henz<sup>1,2</sup> and Regina Vanderlinde<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Caxias do Sul (UCS), Institute of Biotechnology, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

<sup>2</sup> Oenological Reference Laboratory Evanir da Silva – LAREN (SEAPDR), Av. da Vindima, 1855, 95084-470, Caxias do Sul, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Susiane Leonardelli

E-mail: susileonardelli@gmail.com, sleonardelli@ucs.br

## ABSTRACT

**Rationale:** Hydrogen ( $\delta^2\text{H}$ ), oxygen ( $\delta^{18}\text{O}$ ) and carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) are not well described in alcohols from fruits. We measured  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  at alcohols from various fruits in order to identify ethanol originating from these fruits and to compare them to the wine isotopic values, as a way to control the authenticity and to quantify non-grape alcohols added in wine.

**Methods:** The  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in alcohols from orange, apple, watermelon, persimmon, blueberry and a Brazilian fruit called jabuticaba were characterized. The determinations were realized by isotope ratio mass spectrometry (IRMS) combined with high temperature conversion elemental analyser (TC/EA-IRMS) for  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ , and for  $\delta^{13}\text{C}$  by IRMS combined with an elemental analyser (EA-IRMS).

**Results:**  $\delta^2\text{H}$  values ranged from -242.9 ‰ to -222.4 ‰ in wine (years 2018 to 2019) and -267.30 ‰ to -240.69 ‰ in ethanol from fruits.  $\delta^{18}\text{O}$  values ranged from 11.14 to 14.38 ‰ in wine and 7.45 ‰ to 13.83 ‰ in ethanol from fruits. The  $\delta^{13}\text{C}$  values ranged from -29.24 ‰ to -27.01 ‰ in wine and -28.74 ‰ to -23.21 ‰ in ethanol from fruits.

**Conclusions:** Hydrogen showed to be the most efficient isotope to identify alcohol sources, followed by oxygen. with the isotopic values described for fruits in this study the method can be applied to quantify non-grape alcohols when they are mixing into the wine, allowing to control the wine authenticity.

Key words: ethanol; stable isotopes; authenticity; wine; fruits.

## 1 INTRODUCTION

Many forms of beverage adulteration emerged in the last century and particularly wine has been one of the most adulterated drinks for years. It is believed that the history of wine adulteration practically began together with its production. In situations where the grape production is of poor quality, or years when the production was lost by plant diseases and especially where the consumption is greater than the production, adulteration in the oenological field can be encouraged<sup>1</sup>. Other reasons such as financial or fraudulent actions can also be a driver. Price increases and difficulty to access raw materials can cause significant competition for honest winemakers while also making it possible for the quick enrichment of the dishonest<sup>2</sup>.

The cruder forms of adulteration in wine, such as diethylene glycol to increase sweetness, cheaper sources of sugar, watering-down to increase the volume, salts for brightening the color etc., could easily be detected by analytical chemistry. Nowadays, the techniques for adulteration in winemaking have become more refined and require new methods for accurate detection<sup>3</sup>. For this purpose, the measurement of stable isotopes has become a major tool in the fight against adulteration in food and beverage products<sup>4</sup>.

In nature, isotopes can vary although the most organic elements, such as carbon (C), hydrogen (H) and oxygen (O) are combinations of their stable isotopic forms. A molecular species is composed of a large number of isotopomers containing one or several isotopes. For a given atom, the isotopic abundance  $A$  is the ratio of the number of heavy isotopes  $H$  relative to the number of heavy  $H$  and light  $L$  combined as shown in the Equation 1<sup>5</sup>.

$$A = \frac{H}{(H+L)} \quad \text{Equation 1}$$

Isotopic fractionation may occur in different steps of the elaboration of a product because of thermodynamic and kinetic isotopic effects<sup>5</sup>. Each molecule can vary depending on its origin. Processes like physical reactions, chemical reactions and biochemical pathways can influence the

abundance of stable isotopes between substrates and products. Isotopic ratios in products have great relevance in wine production from a traceability perspective as it provides information about its origin, the raw materials used and production process modifications<sup>6</sup>.

The European Union and the International Organisation of Vine and Wine (OIV) have established official methods to detect adulteration using isotopes, such as the illegal addition of sugar, water and geographical traceability<sup>7</sup>. However, there is a great interest to find an effective method to detect alcohol from sources other than grapes as it is not allowed in wine<sup>2</sup>.

The first method adopted to detect beet sugar addition was by the determination of the deuterium/hydrogen isotopic ratio in the site-specific fractionation by deuterium nuclear magnetic resonance (NMR)<sup>8</sup>. This methodology is precise and based on the deuterium from exogenous sugar and water in grape must. The exogenous sugar (chaptalization) added before must fermentation will influence the distribution of the deuterium and it would be redistributed after fermentation to other molecules<sup>7</sup>.

The methodology of NMR is combined to the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio to determine whether the ethanol is derived from grapes, cane, beet sugar or chemical synthesis. On the other hand, in other fruits or cereals the values in the isotopes cited are similar to the grape values, making the ethanol identification not possible for these methods. In these cases, it is therefore important to find alternative isotope relations to determine the origin of ethanol<sup>2</sup>.

Some authors have tried to differentiate sugars from plants that have the same metabolic pathway with different techniques and equipment. Successful cases include, determining the addition of sugar cane in wine by IRMS method OIV-MA-AS312-06<sup>7</sup>, the OIV-MA-BS-23 method using deuterium to determine the addition of beet sugar in wine by nuclear magnetic resonance<sup>7</sup> and the method by EIM-IRMS<sup>6</sup>.

The methods that have been studied in recent years focus on identifying the sources of sugar, with the purpose of separating beet sugar from grape sugar, used to increase the alcohol of wine

during the fermentation process. However, the adulteration of wine can happen in many ways, such as the direct addition of non-grape ethanol into the wine<sup>4</sup>. It is important to consider that alcohol can be produced from many sources (fruits, roots and cereals), some of them with a higher conversion efficiency to ethanol<sup>9</sup> and these cheaper alcohols can be used for adulteration of beverages, such as wines or rice spirits.

Important information regarding the isotope ratios of oxygen, hydrogen and carbon in beverages lies within the ethanol molecule. With this information it is possible to determine the relationship between these three isotope ratios which allows the differentiation of ethanol originating from different fruits. The alcohol sources studied in this research have not been investigated in the literature to date in such a comparative way. The aim of this study is to identify ethanol originating from different fruits using  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  by isotopic ratio mass spectrometry. In order to verify the ability to be applied the isotopes to control the authenticity of beverages, such as wine, to prevent adulteration.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Reference materials

Primary reference materials were obtained from International Atomic Energy Agency (IAEA, Vienna, Austria). The standards for hydrogen and oxygen used for calibration were Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW2,  $\delta^2\text{H} = 0 \text{ ‰}$  and  $\delta^{18}\text{O} = 0 \text{ ‰}$ )<sup>10</sup>, Greenland Ice Sheet Precipitation (GISP,  $\delta^2\text{H} = -189.50 \text{ ‰}$  and  $\delta^{18}\text{O} = -24.78 \text{ ‰}$ )<sup>10</sup> and Standard Light Antarctic Precipitation SLAP (SLAP,  $\delta^2\text{H} = -428.0 \text{ ‰}$  and  $\delta^{18}\text{O} = -55.5 \text{ ‰}$ )<sup>11</sup> and for stable carbon Sucrose ( $\delta^{13}\text{C} = -10.45 \text{ ‰}$ )<sup>12</sup>.

High purity gases were used as reference gases, carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ , purity 99.998 %), hydrogen ( $\text{H}_2$ , purity 99.999 %) and carbon monoxide ( $\text{CO}$ , purity 99.997 %). Helium ( $\text{He}$ , purity 99.9999 %) was used as a carrier gas during the analytical process in the whole system. All high

purity gases were supplied by Air Liquide S.A. (São Paulo, Brazil).

## 2.2 Samples

A total of 47 samples from South Brazil were used in this research (Table 1). These included 12 red wines and 9 white wines from 2018 and 2019 harvests, and it was also produced in the laboratory 18 fermented beverages (authentic spirits) from fruits, such as orange, apple, watermelon, persimmon, blueberry and a Brazilian fruit called jabuticaba, all of them from 2018 harvest. In addition, 2 commercial alcohol from orange bought in the local market were tested and one suspected adulterated wine.

The wine grapes varieties chosen for microvinification, “*Vitis labrusca*” and “*Vitis vinífera*”, represent the largest production in Brazil.

Furthermore, a wine sample of Ives variety was spiked with different alcohol concentrations from orange and watermelon alcohols to concentrations at 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 and 50 % to verify the isotopic influence when different alcohols are mixed into the wine to detect adulteration.

## 2.3 Sample Fermentations

The grapes (10 kg of each) were destemmed and crushed manually, and the vinification was conducted in 15 L stainless steel tanks. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* (Maurivin, PDM) was pre-activated to 0.4 g.L<sup>-1</sup> in 35 °C water for 30 min and added in the must to undergo alcoholic fermentation (the same yeast was used for all fermentations). The wines were decanted after malolactic fermentation and sulfur dioxide was added at concentration of 40 mg.L<sup>-1</sup> as a preservative. The wines were kept for twenty days at 0 °C, after which they were transferred to 0.75 L glass bottles in triplicate.

The watermelons, apples, oranges, persimmons, blueberries and jabuticabas were washed and immersed in 2 % sodium hypochlorite for 20 min for fruit cleansing. The juice was extracted from

all these fruits, the skins and seeds were removed, potassium metabisulfite ( $0.1 \text{ g.L}^{-1}$ ) was added to protect the juice from oxidation and contamination. The fruits fermentation followed the same procedure of grapes.

## 2.4 Ethanol extraction

All samples were submitted to ethanol extraction and water was removed to concentrate the amount of alcohol. This step was conducted carefully as the distillation is a source of isotopic fractionation. The distillation procedure followed according to the official EU regulations for wine analyses (Regulation (EEC) No 2676/ 90)<sup>13</sup>. The ethanol was extracted from the samples by using a Cadiot spinning band column (Eurofins, France).

Homogeneous samples were introduced into the flask in the distillation apparatus with a constant reflux ratio of 0.9. A conical flask beforehand calibrated (125 mL) was placed to collect the ethanol. The boiling liquid was collected between 78 and 78.2 °C, the collection was stopped when the temperature exceeded 78.5 °C and restarted to collect when the temperature returns to 78 °C. The complete distillation took approximately four hours. This method is suitable as it guarantees a higher concentration of ethanol (more than 95 %) with a distillation temperature set up at 78 °C.

For samples with ethanol content higher than 10 % v/v, 0.25 L were used for each extraction and resulted in 0.012 L of concentrated ethanol (above 95 % v/v). Whereas, for samples with ethanol content less than 10 % v/v it was used 0.3 L to get approximately 0.012 L of concentrated ethanol (above 95 % v/v).

## 2.5 Determination of $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of ethanol by pyrolysis (TC/EA-IRMS)

The isotopic ratio of hydrogen ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) and of oxygen ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) were determined with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS) Delta V Advantage coupled to a thermal conversion/elemental analyzer - TC/EA and a CONFLO IV (all of them from Thermo Fisher

Scientific, Bremen, Germany). The reaction tube for hydrogen and oxygen analysis was set up at 1450 °C and a chromatograph column Porabond Q fused silica (CP 7351, 25 m x 0.32 mm, Varian, Palo Alto, United States) at 90 °C. Helium was used as carrier gas at 1.5 bar. The instrument used an autosampler (AS3000, Thermo Fisher Scientific) from which samples 0.2 µL were injected directly into the pyrolysis furnace with a micro syringe. The hydrogen atom of ethanol was converted to hydrogen (H<sub>2</sub>) inside the pyrolysis reactor. For the determination of  $\delta^2\text{H}$  the ions were collected by two Faraday cups at  $m/z$  2 and 3.

The measurement of hydrogen in the presence of helium as a carrier gas can show some difficulties. The collisions in the ion source of the IRMS along the flight tube lead to an energy loss with a tailing of  $^4\text{He}^+$  and a portion of this tail could be collected in the  $m/z$  3 cup. To overcome this effect, the  $m/z$  3 cup has an electrostatic energy filter with three elements for decelerating the ion arrangement, which is integrated in the ion collector between the slit and Faraday cup. The internal analytical error was less than 0.05 ‰, and the samples were analyzed in triplicate. The  $^2\text{H}/^1\text{H}$  was reported as  $\delta^2\text{H}$  as an interpolation of the results relative to the standards of VSMOW2<sup>12</sup>, GISP<sup>12</sup> and SLAP<sup>13</sup>.

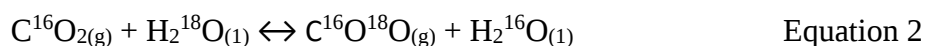
The samples of concentrated ethanol for  $^2\text{H}/^1\text{H}$  determinations were injected 10 times of which the first three results were discarded to ensure that there is no contamination from previous samples. This resulted in an analytical error less than 2 ‰. The samples were injected directly into the pyrolysis furnace in the graphite crucible, which is exactly positioned in the hottest zone of the glassy carbon reactor. Hydrogen and organic oxygen were converted in the measurement gases H<sub>2</sub> and CO for the determination of  $^2\text{H}/^1\text{H}$  and  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .

The samples for  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  determinations were analyzed five times of which the first two results were discarded to ensure that there is no contamination from the previous samples. The  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  required less analysis than the hydrogen as there is less influence inside the ion source. The analytical error was less than 0.4 ‰. The  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  was reported as  $\delta^{18}\text{O}$  and related to the VSMOW2. The ions

were collected by two Faraday cups at  $m/z$  values 28 and 30.

## 2.6 Determination of $\delta^{18}\text{O}$ of water by equilibration (GasBench-IRMS)

Sample preparation was based on the  $\text{CO}_2$  equilibrium obtained through the isotopic exchange reaction between  $\text{CO}_2(\text{g})$  and water in the sample (l), under controlled temperature of 25 °C over 24h<sup>7</sup>, according to equation 2.



Samples (500  $\mu\text{L}$ ) were transferred into the vial using a pipette, and then the vial was flushed with a mixture of 0.3 %  $\text{CO}_2$  in helium at flow of 100  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  for 5 min. The complete exchange between the  $\text{CO}_2$  from the sample and the helium- $\text{CO}_2$  gas was reached after 24h of equilibration at 25 °C. The headspace formed was injected into the peripheral device (Gasbench II, Thermo Fisher Scientific). The helium flow gently moves the headspace of the vial into the fused silica capillary through the diffusion traps (Nafion) to remove the water and then to a valco loop for injection into the gas chromatograph.

The loop injection set up 100  $\mu\text{L}$  aliquots of the sample gas into the gas chromatography column at 70 °C, with a helium flow of 20  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  at 10-12 psi. Hereafter the isotope species with mass 44, 45 and 46 were measured by the spectrometer. The analytical error was lower than 0.2 ‰, and the samples were analyzed in triplicate.

## 2.7 Determination of $\delta^{13}\text{C}$ of ethanol by elemental analyzer (EA-IRMS)

The sample (0.2  $\mu\text{L}$ ) was combusted inside the elemental analyzer (EA 1112 Series, Thermo Fisher Scientific) in a vertical quartz tube at 900 °C, containing copper oxide and silvered cobaltous-cobaltic oxide under a continuous flow of ultra-pure helium at 90  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The gases were passed through a reduction column at 680 °C containing reduced copper whilst the water was trapped with magnesium perchlorate to allow for the separation of the gases on a chromatographic column

Poraplot Q fused silica (CP 7551, 25 m x 0.32 mm, Varian, Palo Alto, United States) at 45 °C. The gases were then transferred to the Delta plus XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific), containing a triple ion collector for the simultaneous measurement of the  $m/z$  44, 45 and 46 CO<sub>2</sub> signals formed in the combustion. All samples were analyzed in triplicate.

## 2.8 Statistical analysis

To evaluate the normality and equality of covariance the Kolmogorov Smirnov test was applied. Assuming the data normality Tukey test was used to analyze the principal component scores for significant group differences ( $p < 0.05$ )<sup>14</sup>. All statistical tests were performed using SPSS 26.0 (IBM Corp.).

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

The ability to provide relevant information about the ethanol source by using the ratios of oxygen, hydrogen and carbon is based on the composition of water and ethanol, considering that the oxygen of water and carbohydrates from fruits change according to the kinetic effects<sup>15</sup>. The values of  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  were evaluated for each compound as shown in Table 2.

The wine showed different values from other spirit drinks, which indicates that through the  $\delta^2\text{H}$  values it is possible to distinguish the alcohol source of grapes from other fruits like jabuticaba, apple, blueberry, persimmon and watermelon. On the other hand, it was not possible to differentiate grapes from alcohol originating from oranges.

The  $\delta^2\text{H}$  values for wines ranged from -242.99 to -222.35 ‰, the results found were more negative than  $\delta^2\text{H}$  reported by Smajlović et al.<sup>6</sup>, where the researchers found results between -215 and -205 ‰, in wines from Europe and Chile. The difference in wine probably occurred because we evaluated wines in seven different grape varieties. In the same variety the standard deviation was threefold lower by 1.95 ‰. Isotopic differences were showed due to the grape varieties because there

is an indirect influence caused by the date of harvest, and the impact of the climate during the ripening and harvesting of grapes. Similar to the grape variety, there is some influence by the irrigation and non-irrigation system<sup>16</sup>.

The great separation found in the hydrogen values occurs because during alcoholic fermentation the hydrogen and deuterium atoms bonded at the 1,6 and 6' sites of glucose are redistributed in the methyl site of ethanol. When the hydrogen values are determined by NMR this redistribution can be observed in the ratio of stable hydrogen isotopes from the methyl site of ethanol (D/H)<sub>I</sub>. This compound is responsible for the sugar origin that was fermented into ethanol. On the other hand, the hydroxyl hydrogen and deuterium atoms are redistributed at the methylene site of the ethanol molecule (D/H)<sub>II</sub> and provide information about the climatological influences of grape production, such as rainwater and other sources<sup>6-8</sup>.

It was observed that  $\delta^2\text{H}$  values were also effective to significantly differentiate the orange alcohol from market to the orange authentic spirit produced in the laboratory and also to the wine. The orange market alcohol showed an average of -194.23 ‰, these results are higher than the values for wine (-235.27 ‰) and for spirit from orange produced in the laboratory (-240.69 ‰). The higher results for  $\delta^2\text{H}$  for market alcohol probably occurred because the alcohol bought in the local market is adulterated with tap water, making the  $\delta^2\text{H}$  from commercial alcohol less negative than alcohol produced in the laboratory from fermented fruits.

Values of  $\delta^{18}\text{O}$  appeared to be less effective than  $\delta^2\text{H}$  to differentiate alcohols from other fruits in relation to wine alcohol. The values ranged from 10.55 ‰ to 15.21 ‰ for wines and 7.06 to 13.91 ‰ for other fruits. The  $\delta^{18}\text{O}$  values of jabuticaba, blueberry and watermelon showed a statistical difference in relation to the wine values.

Values of  $\delta^{13}\text{C}$  are also a great information of the isotope signature for fruits, but all the fruits studied follow the Calvin Cycle pathway to realize the photosynthesis, and the pathway is the main influence on the  $\delta^{13}\text{C}$  values. In this case, the values for wine ranged from -29.24 ‰ to -27.01 ‰ and

-28.74 ‰ to -23.21 ‰ for fruits, there is no significant differences among them. However, the characterization of the  $\delta^{13}\text{C}$  values from different fruits is important because it can be used to prevent fraud in products derived from fruits in relation to the sugar cane, since sugar cane showed values close to  $-13.11 \text{ ‰} \pm 0.20 \text{ ‰}$ <sup>17</sup>. For the first time  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^2\text{H}$  values were described for jabuticaba.

A way to improve the separation of the alcohol from different fruits was by evaluating the graphical representation  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  from the ethanol extracted from the samples. In the Figure 1 can be observed that wines separate clearly from other fruits and there is a huge difference between wine and the market alcohol from orange.

The separation found for some alcohols can be explained by the higher evapotranspiration that occurs in plants, in which there is a considerable exchange between the atmosphere and skin, causing an enrichment in deuterium ( $^2\text{H}$ ) and  $^{18}\text{O}$  oxygen<sup>18</sup>. In a study performed by Dunbar and Wilson (1983)<sup>19</sup> different isotopic values were found in vegetables and fruits that have a higher water content and faster growth (watermelon, zucchini and cucumber) whilst fruits with slower growth (apples, pears and plums) was found to be less enriched.

The  $\delta^2\text{H}$  for apple alcohol were less negative than wine and  $\delta^{18}\text{O}$  were quite similar to the wine. However, apples can be easily separated from grapes by NMR analyzing the hydrogen/deuterium<sup>7</sup> or also determining the phlorizin, a compound that apples contain but is not found in grapes. Phlorizin is a phenolic compound and represents 90 % of the water-soluble phenolic compounds found in apples. For this reason, this specific compound has been widely used for identifying adulteration<sup>20</sup>.

In our study, we also verified the graphic representation of  $\delta^{18}\text{O}$  from water and  $\delta^2\text{O}$  from ethanol (Figure 2). However, the separation was less effective when compared to the  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  from ethanol. Perini and Camin<sup>2</sup> also concluded that  $\delta^{18}\text{O}$  analysis on its own is not sufficient to improve the detection of illegal cane and beet sugar addition to wine.

The addition of some selected alcohols into wine was also tested. We selected the variety Ives as it has an intense color and normally produces cheaper wines. Due to these characteristics, the wine is most susceptible to adulteration because a small addition of alcohol does not change the visual characteristics in this type of wine. The correlation of hydrogen after the addition of different alcohol concentrations to the Ives wine is shown in Figure 3.

We found significant correlations for orange alcohol ( $R^2 = 0.97$ ) and watermelon alcohol ( $R^2 = 0.91$ ). This was a great result as it shows that it is possible to differentiate between these alcohols and quantify the concentration added when mixed in the wine. Similarly to hydrogen, a great correlation was also found for  $\delta^{18}\text{O}$  (Figure 4), for orange alcohol  $R^2 = 0.96$  and watermelon alcohol  $R^2 = 0.97$ . It is because the oxygen atoms of ethanol also originate from the water in the fermentation. The natural water is incorporated into sugar and thereafter into ethanol when sucrose is converted to glucose and fructose through enzymatic hydrolysis, and acetaldehyde (the precursor of ethanol) forms the acetaldehyde hydrate<sup>2-21</sup>.

Considering the correlation found, it was possible to identify and quantify the concentrations of the different alcohols added to wine. The explanation is based on the isotope content in the precursor sites of the starting materials followed by the fractionating events (climate factors, soil, plant physiology, evapotranspiration and geographical origin)<sup>5</sup>.

#### 4 Conclusions

This study demonstrated that it was possible to differentiate ethanol from fruits by isotope ratio mass spectrometry. The hydrogen is the most efficient isotope to identify alcohol sources, followed by oxygen. Carbon is less effective.

The values of hydrogen and oxygen are directly proportional to the concentration of the alcohol from fruits when they are added into the wine. Furthermore, with the isotopic values described

for fruits the method can be applied to quantify non-grape alcohols when they are mixing into the wine, allowing to control the wine authenticity.

### **Funding information**

This study was part of a Research Grant supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Foundation) by the Grant\Award Number: 88887.310908/2018-00, the University of Caxias do Sul (UCS), the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN) and the Secretary of Agriculture of the State of Rio Grande do Sul (SEAPDR).

### **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the University of Caxias do Sul (UCS), the Oenological Reference Laboratory Evanir da Silva (LAREN) and Secretary of Agriculture from Rio Grande do Sul (SEAPDR), the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN), the Uruguay National Wine Institute (INAVI) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Foundation).

### **Compliance with Ethics Requirements**

All of the authors who have been involved with the work agree to submit this paper, and all of them claim that none of the material in the paper has been published or is under consideration for publication elsewhere. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### **Conflicts of Interest**

The authors have no conflicts of interest to report.

## References

1. Csapó, J., & Albert, C. Wine adulteration and its detection based on the rate and the concentration of free amino acids. *Acta Agraria Debreceniensis*. 2018;150, 139–151. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/150/1710>.
2. Perini, M., & Camin, F. (2013).  $\delta^{18}\text{O}$  of Ethanol in Wine and Spirits for Authentication Purposes. *J. Food Sci.* 2013;78(6), 839–844. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12143>.
3. Lachenmeier, D. W. Advances in the detection of the adulteration of alcoholic beverages including unrecorded alcohol. In G. Downey (Ed.), *Advances in Food Authenticity Testing*. 2016; (pp. 565-584). United Kingdom: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100220-9.00021-7>.
4. Bampa, G., Moraitou, D., Metallidou, P., & Tsolaki, M. (2017). Metacognition in MCI: A research proposal on assessing the efficacy of a metacognitive intervention. *Hell. J. Nucl. Med.* 2017; 20(2), 12–20.
5. Martin, J., Akoka, S., & Martin, M. L. *SNIF-NMR — Part 1: Principles*. In: G.A. Webb (Ed.) *Modern Magnetic Resonance*. 2008; pp. 1651-1658. Dordrecht: Springer.
6. Smajlović, I., Sparks, K. L., Sparks, J. P., Čukalović, I. L., & Jović, S. Ethanol isotope method (EIM) for uncovering illegal wine. *Natural Product Research*. 2013; 27(6), 513–517. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.673610>.
7. OIV, International Organisation of Vine and Wine (2020). *Compendium of international methods of wine and must analysis*. 2020; 2020th ed. Paris, France.
8. Martin, Y. loïc. Detection of added beet or cane sugar in maple syrup by the site-specific deuterium nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR®) method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*. 2001; 84(5), 1509–1521. <https://doi.org/10.1093/jaoac/84.5.1509>.
9. Cabello, C. Matérias primas amiláceas para fins energéticos. Lecture session presentation at the

- meeting of V Workshop Sobre Tecnologias Em Agroindústria de Tuberosas Tropicais, 2007; 31p. Botucatu, SP. <https://www.cerat.unesp.br/>. Accessed 20 January 2020.
10. IAEA. Reference Sheet for Reference Material GISP and VSMOW2. *International Atomic Energy Agency*. 2012; 4p. <http://www.iaea.org/> Accessed 12 May 2020.
  11. IAEA. Reference Sheet for International Measurement Standards SLAP2. *International Atomic Energy Agency*. 2020; 8p. <http://www.iaea.org/> Accessed 12 May 2020.
  12. IAEA. Reference Sheet for Reference Material CH-6 Sucrose. *International Atomic Energy Agency*. 2011; 2p. <http://www.iaea.org/> Accessed 26 Jan 2021.
  13. Commission Regulation (EEC) No 2676/90 of 17 September 1990. Determining community methods for the analysis of wines. *Official Journal*. 1990; 272(34):3, 0001-0192.
  14. Sheskin, D. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. (5<sup>th</sup> edition). Boca Raton, FL, United States: Chapman & Hall/CRC. 2011; 1928p.
  15. Jamin, E., Guérin, R., Rétif, M., Lees, M., & Martin, G. J. Improved detection of added water in orange juice by simultaneous determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of water and ethanol derived from sugars. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(18), 5202–5206. <https://doi.org/10.1021/jf030167m>.
  16. Gómez-Alonso, S. & García-Romero, E. Effect of irrigation and variety on oxygen ( $\delta^{18}\text{O}$ ) and carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) stable isotope composition of grapes cultivated in a warm climate. *Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.* 2009; <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00089.x>.
  17. Figueira, R., Nogueira, A. M., Venturini Filho, W. G., Ducatti, C. & Michan, M. M. Isotope analysis ( $\delta^{13}\text{C}$ ) method and quantification of percent  $\text{C}_3$  sources in commercial grape juices. *Braz. J. Food Tehcnol.* 2010; 13(2), 147–155. <https://doi.org/10.4260/BJFT2010130200020>.
  18. Rossmann, A., Koziel, J., Martin, G. J., & Dennis, M. J. Determination of the carbon-13 content

of sugars and pulp from fruit juices by isotope-ratio mass spectrometry (internal reference method)

A European interlaboratory comparison. *Anal. Chim. Acta.* 1997; 340(1-3), 21–29.

[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)00538-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00538-7).

19. Dunbar, J., & Wilson, A. T. Oxygen and Hydrogen Isotopes in Fruit and Vegetable Juices. *Plant Physiol.* 1983; 72(3), 725–727. <https://doi.org/10.1104/pp.72.3.725>

20. Spinelli, F. R. R., Dutra, S. V. V., Carnieli, G., Leonardelli, S., Drehmer, A. P. P., & Vanderlinde, R. Detection of addition of apple juice in purple grape juice. *Food Control.* 2016;69, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.005>.

21. Monsallier-Bitea, C., Jamin, E., Lees, M., Zhang, B. L., & Martin, G. J. Study of the influence of alcoholic fermentation and distillation on the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratio of ethanol. *J. Agric. Food Chem.*, 2006; 54(2), 279–284. <https://doi.org/10.1021/jf0516686>.

1 Table 1: Description and geographical location of the samples for producing fermented beverages.

| Samples        | Variety            | Quantity | Harvest | Location                        | GPS* Coordinates |              |
|----------------|--------------------|----------|---------|---------------------------------|------------------|--------------|
|                |                    |          |         |                                 | Longitude        | Latitude     |
| Red Wines      | Cabernet Sauvignon | 2        | 2019    | Santana do Livramento           | 30°47'47.2"S     | 55°21'42.1"W |
|                | Cabernet Sauvignon | 2        | 2019    | Farroupilha                     | 29°08'39.5"S     | 51°23'44.3"W |
|                | Merlot             | 2        | 2019    | Bento Gonçalves                 | 29°03'50.5"S     | 51°33'44.9"W |
|                | Merlot             | 2        | 2019    | Cotiporã                        | 28°59'22.2"S     | 51°38'24.9"W |
|                | Ives               | 2        | 2018    | Flores da Cunha                 | 28°59'31.3"S     | 51°14'20.7"W |
|                | Isabella           | 2        | 2018    | Farroupilha                     | 29°08'19.5"S     | 51°24'14.7"W |
| White Wines    | Chardonnay         | 2        | 2019    | Monte Belo do Sul               | 29°08'16.5"S     | 51°39'44.4"W |
|                | Chardonnay         | 2        | 2019    | Encruzilhada do Sul             | 30°53'16"S       | 52°22'10.1"W |
|                | White Muscat       | 2        | 2019    | Farroupilha                     | 29°06'52.2"S     | 51°21'09.1"W |
|                | White Muscat       | 2        | 2019    | Farroupilha                     | 29°08'21.8"S     | 51°22'36.5"W |
|                | Niagara            | 1        | 2018    | Farroupilha                     | 29°07'42.2"S     | 51°23'57.9"W |
| Suspected Wine | Ives               | 1        | 2018    | Flores da Cunha                 | 29°03'44"S       | 51°07'43"W   |
| Beverages      | Oranges            | 2        | 2018    | Caxias do Sul                   | 29°08'42"S       | 51°04'59"W   |
|                | Apples             | 2        | 2018    | Antonio Prado                   | 28°51'07"S       | 51°18'10"W   |
|                | Watermelons        | 2        | 2018    | Caxias do Sul                   | 29°14'26"S       | 51°01'03"W   |
|                | Persimmons         | 2        | 2018    | Caxias do Sul                   | 29°10'18"S       | 51°07'49"W   |
|                | Jabuticaba         | 1        | 2019    | Braço do Norte                  | 28°16'58"S       | 49°08'58"W   |
|                | Blueberry          | 2        | 2018    | Caxias do Sul e Flores da Cunha | 29°05'34"S       | 51°10'50"W   |
| Market alcohol | Orange A           | 1        | 2018    | No information                  | -                | -            |
|                | Orange B           | 1        | 2018    | No information                  | -                | -            |

\*GPS: Global System Position.

3

Table 2:  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  of ethanol and  $\delta^{18}\text{O}$  of water from different fruits, expressed in ‰.

| Beverage              | $\delta^2\text{H}$ Ethanol | $\delta^{18}\text{O}$ Ethanol | $\delta^{18}\text{O}$ Water | $\delta^{13}\text{C}$ Ethanol |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Orange market Alcohol | $-194.23 \pm 0.43^a$       | $26.30 \pm 0.19^a$            | $-33.88 \pm 0.19^a$         | $-27.75 \pm 0.34^a$           |
| Wine                  | $-235.27 \pm 6.61^b$       | $13.17 \pm 1.40^b$            | $-0.53 \pm 1.24^b$          | $-27.33 \pm 1.66^a$           |
| Orange                | $-240.69 \pm 1.07^b$       | $13.83 \pm 0.10^b$            | $-1.64 \pm 0.03^b$          | $-27.62 \pm 0.05^a$           |
| Jabuticaba            | $-255.26 \pm 0.14^c$       | $8.91 \pm 0.64^c$             | $-0.12 \pm 0.09^b$          | $-28.69 \pm 0.07^a$           |
| Apple                 | $-255.61 \pm 0.15^c$       | $13.00 \pm 0.36^b$            | $-4.28 \pm 0.07^c$          | $-27.92 \pm 0.01^a$           |
| Blueberry             | $-257.47 \pm 0.48^c$       | $9.65 \pm 0.39^c$             | $-0.43 \pm 2.75^b$          | $-25.27 \pm 1.08^b$           |
| Persimmon             | $-260.41 \pm 0.61^c$       | $12.60 \pm 0.33^b$            | $-5.42 \pm 0.14^c$          | $-27.39 \pm 0.10^a$           |
| Watermelon            | $-267.30 \pm 0.22^c$       | $7.45 \pm 0.49^d$             | $-2.58 \pm 0.13^d$          | $-24.60 \pm 0.03^b$           |

4

Means followed by different letters in the column differ significantly by Tukey test; significance level of 5%.

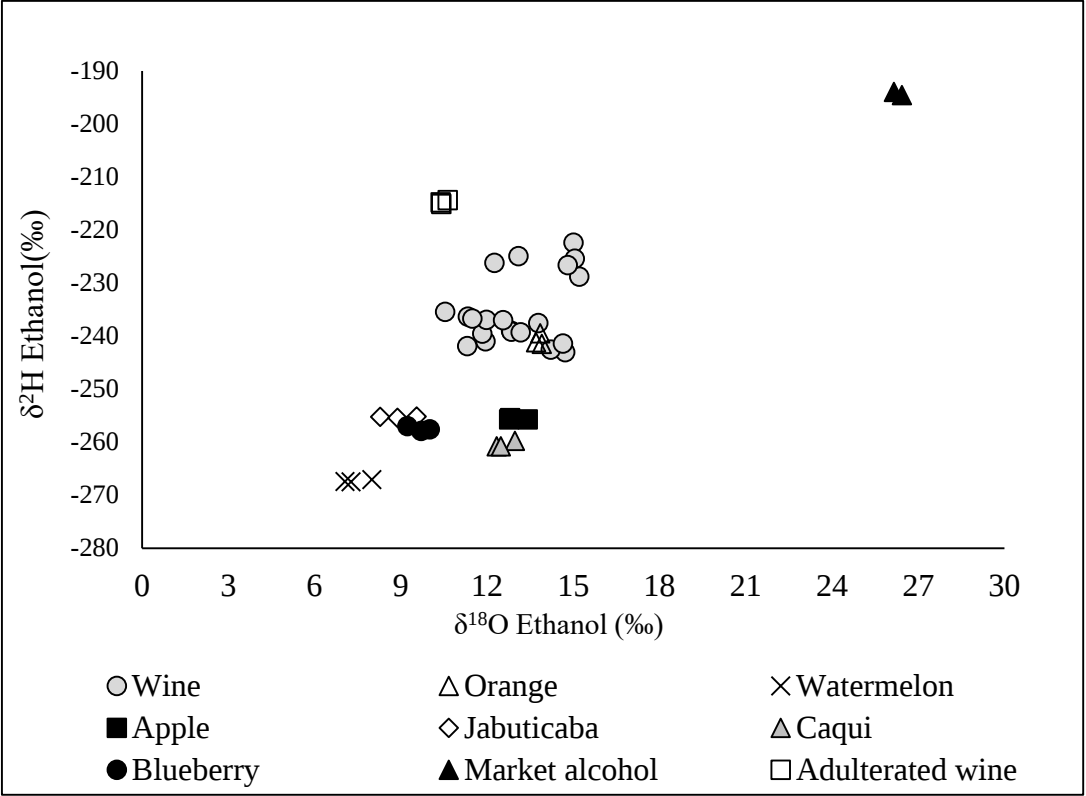


Figure 1: Graphic representation of  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of ethanol from different fruits.

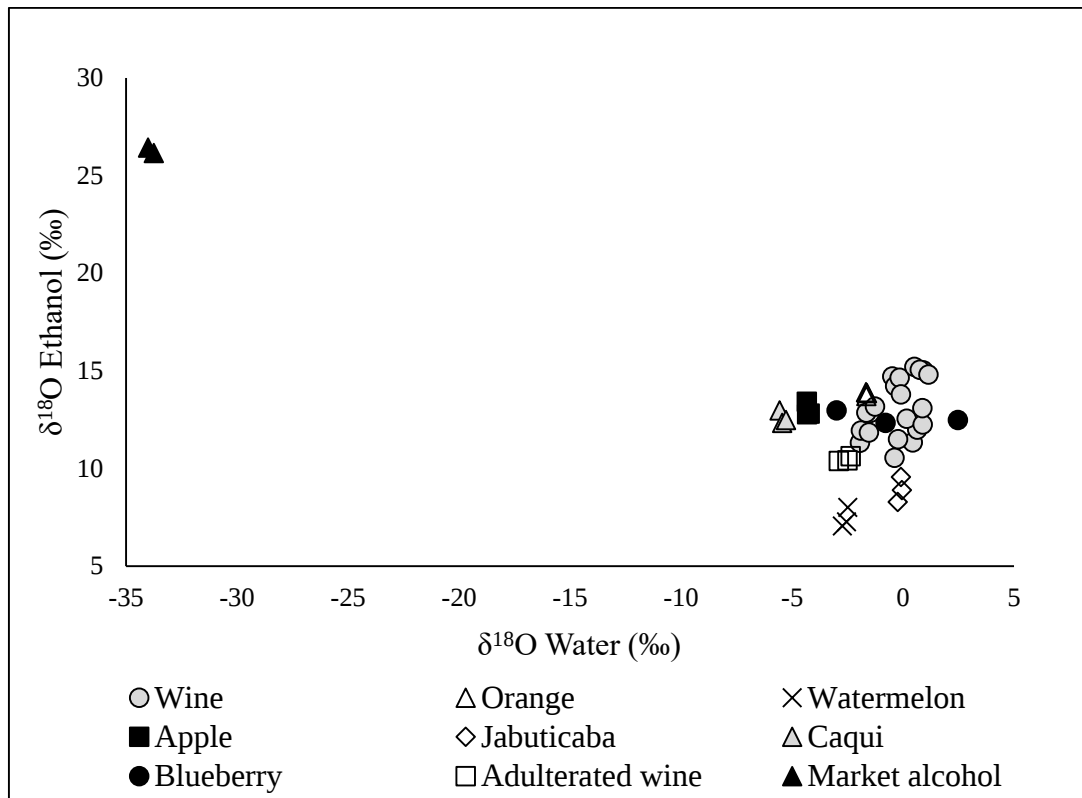


Figure 2: Graphic representation of  $\delta^{18}\text{O}$  of ethanol and  $\delta^{18}\text{O}$  of water from different fruits.

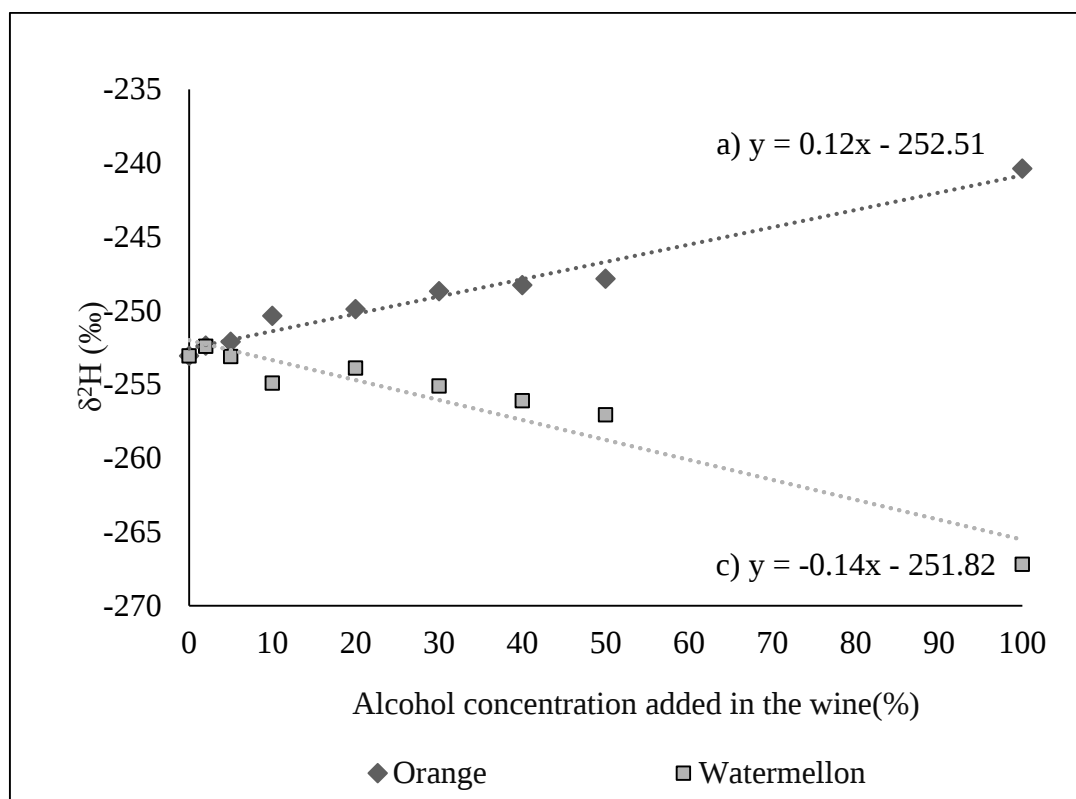


Figure 3: Correlation between the concentration of alcohol at 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 and 50% and  $\delta^2\text{H}$  values of the wine spiked with different alcohols sources. The alcohol added were: a) orange and b) watermelon.

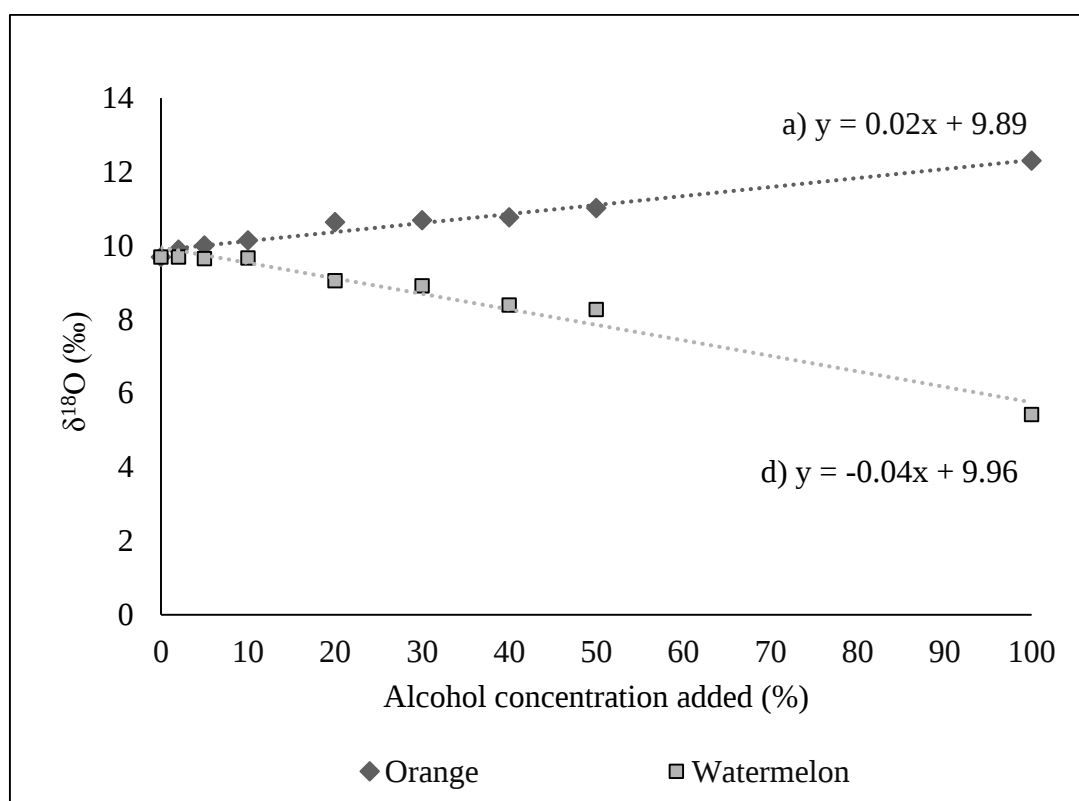


Figure 4: Correlation between the concentration of alcohol at 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 and 50% and  $\delta^{18}\text{O}$  values of the wine spiked with different alcohols sources. The alcohol added were: a) orange, b) sweet potato, c) watermelon and d) rice.

## 4.2 CAPÍTULO II

### **Characterization of isotopic ratio to identify alcohol from rice, cassava and sweet potato in relation to wine for authenticity control**

Enviado para publicação

**Characterization of isotopic ratio to identify alcohol from rice, cassava and sweet potato in relation to wine for authenticity control**

Susiane LEONARDELLI<sup>a,b\*</sup>, Gilberto J. CARGNEL<sup>b</sup> and Regina VANDERLINDE<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>University of Caxias do Sul (UCS), Institute of Biotechnology, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

<sup>b</sup>Oenological Reference Laboratory Evanir da Silva – LAREN (SEAPDR), Av. da Vindima, 1855, 95084-470, Caxias do Sul, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Susiane Leonardelli

E-mail: susileonardelli@gmail.com, sleonardelli@ucs.br

## Abstract

Roots and cereals are great sources of ethanol with low production cost. These aspects contribute to turn these cultures into an adulterant for increasing the alcohol volume in wines. We measured  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  at alcohols from rice, cassava and sweet potato in order compare them to the wine isotopic values, as a way to control the authenticity and to quantify non-grape alcohols added into wine. The  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  were determined by isotope ratio mass spectrometry (IRMS) combined with high temperature conversion elemental analyser (TC/EA-IRMS) for  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ , and for  $\delta^{13}\text{C}$  combined with an elemental analyser (EA-IRMS). The  $\delta^2\text{H}$  of wine is significantly different to other alcohols with values ranging from -242.9 ‰ to -222.4 ‰,  $\delta^{18}\text{O}$  10.5 ‰ to 15.2 ‰ and  $\delta^{13}\text{C}$  -29.4 ‰ to -29.6 ‰ (years 2018 to 2019). Rice showed values ranging from  $\delta^2\text{H}$  -269.0 ‰ to -267.1 ‰,  $\delta^{18}\text{O}$  9.7 ‰ to 8.8 ‰ and  $\delta^{13}\text{C}$  -29.2 ‰ to -27.0 ‰. Cassava showed  $\delta^2\text{H}$  -268.0 ‰ to -267.7 ‰,  $\delta^{18}\text{O}$  -9.5 ‰ to 8.9 ‰ and  $\delta^{13}\text{C}$  -27.5 ‰ to -26.3 ‰. Sweet potato  $\delta^2\text{H}$  -254.5 ‰ to -254.1 ‰,  $\delta^{18}\text{O}$  9.0 ‰ to 9.0 ‰ and  $\delta^{13}\text{C}$  -27.1 ‰ to -27.0 ‰. Hydrogen showed to be possible differentiate ethanol from rice, cassava and sweet potato from wine ethanol. The hydrogen is the most efficient isotope to identify the alcohol source. This methodology can be used to control the wine authenticity.

**Key words:** alcohol volume; adulterant; hydrogen; oxygen; carbon.

## 1 Introduction

The production of alcoholic beverages is an important field of the agrarian industry. The quality and the price of the raw materials to produce beverages are determined mainly by the variety, production and origin (Bauer-Christoph, Wachter, Christoph, Rossmann, & Adam, 1997). There are several types of alcoholic beverages produced by different raw materials, some of them with high economic value, such as wine. Specific beverages categories are protected by definition in the legislation (Aylot, 2013).

The Organization of Vine and Wine (OIV) established a basic definition for wine, where wine is defined as the beverage resulting from partial or complete alcoholic fermentation of fresh grapes by yeast. The alcohol content for wine shall not be less than 8.5 % vol. (OIV, 2021). Alcohol from other source than grapes is not allowed in wine, because of this there is a great interest to find an effective method to detect adulteration with alcohol from sources other than grapes (Perini & Camin, 2013). In addition, adulteration could happen due to alcohol can be produced from many sources, such as fruits, roots and cereals. Some of these raw materials with a higher conversion efficiency to ethanol and producing cheaper alcohols (Cabello, 2007).

An important source of energy is rice (*Oryza sativa*), it has a good concentration of starch with high yield for ethanol production. In addition, it is not just unbroken rice that is suitable for ethanol production, but also broken rice or grits from industrial waste processing grains blends (Schneider, Siedel, Fornasier, Souza & Corbellini, 2018).

Cassava (*Manihot esculenta*) also represents a great source of alcohol because it has a high starch yield and total dry matter content. Besides that, this crop needs few requirements for producing ethanol resulting in a 95 % energy yield. The cassava culture

is 30 % rich in carbohydrates of which 25 - 40 % is starch (Kuila, 2019). Veiga, Valle, Feltran and Bizzo (2016) demonstrated that the yield of the ethanol production from cassava and sugar cane is quite similar with values of 4.9 tons per hectare per year for cassava and 5.4 for sugar cane. Furthermore, the use of the cassava agricultural waste can increase the viability of the roots as a raw material for ethanol production.

In the same way sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) represents an important biomass for alcohol production, because it has high density of starch and it is a cheaper raw material, readily available in the local market and offers ease in product processing. The starch can be hydrolysed to monomer units of carbohydrates and can be used by the microorganisms in fermentation process (Swain, Mishra, & Thatoi, 2013). Sweet potato contain a concentration of starch of  $178 \text{ g.kg}^{-1}$ , total sugars  $26 \text{ g.kg}^{-1}$  and protein  $3.2 \text{ g.kg}^{-1}$  on fresh weight basis (Tian, Rickard, & Blanshard, 1991).

Ethanol can be produced from any polysaccharide that contains sugars or starches. Sugar cane are commonly used in Brazil and it represents the biomass most widely used for ethanol production (Scheneider, Seidel, Fornasier, Souza, & Corbellini, 2018). However, in Brazil, rice, cassava and sweet potato are also potential adulterants for wine, because these starchy materials produce cheaper ethanol with high yield (Lopes, et al., 2016).

The sugar cane when added into wine and converted in ethanol is easily detected by the carbon isotopic ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  using isotope ratio mass spectrometry (IRMS), method OIV-MA-AS312-06 (OIV, 2020). Sugar cane is a type  $\text{C}_4$  plant and it follows the Hatch-Slack pathway of carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) fixation. Discrimination of alcohol made from  $\text{C}_3$  plants (Calvin Cycle pathway for  $\text{CO}_2$  fixation) is more difficult, being possible only by D/H ratio by nuclear magnetic resonance (NMR), such as beet (Ishida-Fuji, et al., 2005).

The methods that have been studied in recent years focus on identifying the sources of sugar, with the purpose to detect adulteration in wine separating the ethanol produced from beet sugar and grape sugar, used to increase the alcohol of wine during the fermentation process. The main method used to determine ethanol from plants that have the same metabolic pathway is by NMR (Viskić, Bandić, Korenika, & Jeromel, 2021). Other techniques are emerging with the same purpose, such as EIM-IRMS. It is a module coupled to a IRMS and it works with a relative ratio of non-exchangeable hydrogen stable isotopes in ethanol, previously quantitatively extracted from wine, fruit juice, strong spirit or fermented honey samples (Smajlović, et al., 2019). The ethanol molecule, present in beverages, contains informations regarding to the isotope ratios of oxygen, hydrogen and carbon. These isotopes can be an important tool to detect the source of ethanol to control wine authenticity (Yamada, Yohida, Calderone, & Guillou, 2007).

The aim of this study was to identify the ethanol originating from rice, cassava and sweet potato in relation to the ethanol from wine using  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  by isotopic ratio mass spectrometry. In order to verify the ability to be applied the isotopes to control the authenticity of wine and to prevent adulteration. The alcohol sources studied in this research have not been investigated in the literature to date in such a comparative way.

## **2 Material and methods**

### **2.1 Reference materials**

Primary reference materials were obtained from International Atomic Energy Agency (IAEA, Vienna, Austria). The standards for hydrogen and oxygen used for calibration were Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW2,  $\delta^2\text{H} = 0 \text{ ‰}$  and  $\delta^{18}\text{O} = 0 \text{ ‰}$ ), Greenland Ice Sheet Precipitation (GISP,  $\delta^2\text{H} = -189.50 \text{ ‰}$  and  $\delta^{18}\text{O} = -24.78 \text{ ‰}$ )

and Standard Light Antarctic Precipitation SLAP (SLAP,  $\delta^2\text{H} = -428.0 \text{ ‰}$  and  $\delta^{18}\text{O} = -55.5 \text{ ‰}$ ) and for stable carbon Sucrose ( $\delta^{13}\text{C} = -10.45 \text{ ‰}$ ).

High purity gases were used as reference gases, carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ , purity 99.998 %), hydrogen ( $\text{H}_2$ , purity 99.999 %) and carbon monoxide ( $\text{CO}$ , purity 99.997 %). Helium ( $\text{He}$ , purity 99.9999 %) was used as a carrier gas during the analytical process in the whole system. All high purity gases were supplied by Air Liquide S.A. (São Paulo, Brazil).

## 2.2 Samples

A total of 33 samples from South Brazil were elaborated in the laboratory, including 12 red wines and 9 white wines, from 2018 and 2019 harvests. It was also produced fermented beverages from rice, cassava and sweet potato, in triplicate, all of them from 2018 harvest. In addition, 2 market alcohol from rice bought in the local market were tested and one suspected adulterated wine.

Furthermore, a wine sample of Ives variety was spiked with different alcohol concentrations from rice and sweet potato alcohols to concentrations at 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 and 50 % to verify the isotopic influence when alcohols from rice and sweet potato are mixed into wine to detect adulteration.

## 2.3 Fermentation of the samples

The grapes (10 Kg of each) were destemmed and crushed manually and the vinification was conducted in 15 L stainless steel tanks. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* (Maurivin, PDM) was pre-activated to  $0.4 \text{ g.L}^{-1}$  in  $35 \text{ °C}$  water for 30 min and added in the must to undergo alcoholic fermentation (the same yeast was used for all fermentations). The wines were decanted after malolactic fermentation and

sulfur dioxide was added at concentration of  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  as a preservative. The wines were kept for twenty days at  $0^\circ\text{C}$  after which they were transferred to 0.75 L glass bottles in triplicate.

For the rice fermentation, 10 kg was cooked for one hour in warm water at  $55^\circ\text{C}$  for the gelatinization of the starch. Three millilitres of  $\alpha$ -amylase enzyme (Termamyl, Novozymes, Brazil) was added to facilitate starch hydrolysis over 45 minutes at  $60^\circ\text{C}$  to produce the sugars required for the fermentation throughout the liquefaction and saccharification processes. The  $\alpha$ -amylase enzyme is responsible for breaking the  $\alpha$ -1,4 glycosidic bonds to obtain the glucose monomers necessary for the fermentation process. Following the process,  $0.01 \text{ g.L}^{-1}$  potassium metabisulfite was added to prevent oxidation and contamination and the fermentation followed the same procedure of grapes.

For the cassava and sweet potato fermentations, 10 kg of each were used. The samples were washed, peeled and then liquefied by adding water and followed the same process described for the rice fermentation. The water used to start the fermentation procedure was removed in the distillation procedure.

## **2.4 Ethanol extraction**

All samples were submitted to ethanol extraction and water was removed to concentrate the amount of alcohol. This step was conducted carefully as the distillation is a source of isotopic fractionation. The distillation procedure followed according to the official EU regulations for wine analyses (Regulation (EEC) No 2676/ 90). The ethanol was extracted from the samples by using a Cadiot spinning band column (Eurofins, France).

Homogeneous samples was introduced into the flask in the distillation apparatus with a constant reflux ratio of 0.9. A conical flask beforehand calibrated (125 mL) was

placed to collect the ethanol. The boiling liquid was collected between 78 and 78.2 °C, the collection was stopped when the temperature exceeded 78.5 °C and restarted to collect when the temperature returns to 78 °C. The complete distillation took approximately four hours. This method is suitable as it guarantees a higher concentration of ethanol (more than 95 % alcohol) with a distillation temperature set up at 78 °C.

For samples with ethanol content higher than 10 % v/v, 0.25 L were used for each extraction and resulted in 0.012 L of concentrated ethanol (above 95 % v/v). Whereas, for samples with ethanol content less than 10 % v/v it was used 0.3 L to get approximately 0.012 L of concentrated ethanol (above 95 % v/v).

## 2.5 Determination of $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of ethanol by pyrolysis system

The isotopic ratio of hydrogen ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) and of oxygen ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) were determined with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS) Delta V Advantage coupled to a thermal conversion/elemental analyzer - TC/EA and a CONFLO IV (all of them from Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The reaction tube for hydrogen and oxygen analysis was set up at 1450 °C and a chromatograph column at 90 °C. Helium was used as carrier gas at 1.5 bar. The instrument used an autosampler (AS3000, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) from which samples (0.2  $\mu\text{L}$ ) were injected directly into the pyrolysis furnace with a micro syringe. The hydrogen atom of ethanol was converted to hydrogen ( $\text{H}_2$ ) inside the pyrolysis reactor. For the determination of  $\delta^2\text{H}$  the ions were collected by two Faraday cups at  $m/z$  values 2 and 3.

The measurement of hydrogen in the presence of helium as a carrier gas can show some difficulties. The collisions in the ion source of the IRMS along the flight tube lead to an energy loss with a tailing of  $^4\text{He}^+$  and a portion of this tail could be collected in the  $m/z$  3 cup. To overcome this effect the  $m/z$  3 cup has an electrostatic energy filter with

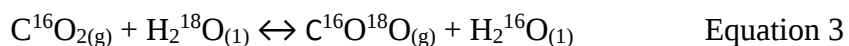
three elements for decelerating the ion arrangement, which is integrated in the ion collector between the slit and Faraday cup. The internal analytical error was less than 0.05 ‰, and the samples were analyzed in triplicate. The  $^2\text{H}/^1\text{H}$  was reported as  $\delta^2\text{H}$  as an interpolation of the results relative to the standards VSMOW2, GISP (IAEA, 2012) and SLAP from International Atomic Energy Agency (IAEA, 2020).

The samples of concentrated ethanol (0.2  $\mu\text{L}$ ) for  $^2\text{H}/^1\text{H}$  determinations were injected 10 times of which the first three results were discarded to ensure that there is no contamination from previous samples. It resulted in an analytical error less than 2 ‰. The samples were injected directly into the pyrolysis furnace in the graphite crucible, which is exactly positioned in the hottest zone of the glassy carbon reactor. A high temperature was applied for the conversion of hydrogen and organic oxygen to form the measurement gases  $\text{H}_2$  and  $\text{CO}$  for the determination of  $^2\text{H}/^1\text{H}$  and  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .

The samples for  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  determinations were analyzed five times of which the first two results were discarded to ensure that there is no contamination from the previous samples. The  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  required less analysis than the hydrogen as there is less influence inside the iron source. The analytical error was less than 0.4 ‰. The  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  was reported as  $\delta^{18}\text{O}$  and related to the VSMOW2. The ions were collected by two Faraday cups at  $m/z$  values 28 and 30.

## 2.6 Determination of $\delta^{18}\text{O}$ of water by equilibration

Sample preparation was based on the  $\text{CO}_2$  equilibrium obtained through the isotopic exchange reaction between  $\text{CO}_2(\text{g})$  and water in the sample (l), under controlled temperature of 25 °C over 24h (OIV, 2019), according to equation 3.



Samples (500  $\mu\text{L}$ ) were transferred into the vial using a pipette, and then the vial

was flushed with a mixture of 0.3 % CO<sub>2</sub> in helium at flow of 100 mL.min<sup>-1</sup> for 5 min. The complete exchange between the CO<sub>2</sub> from the sample and the helium-CO<sub>2</sub> gas was reached after 24 hours of equilibration at 25 °C. The headspace formed was injected into the peripheral device (Gasbench II, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

The helium flow gently moves the headspace of the vial into the fused-silica capillary through the diffusion traps (Nafion) to remove the water and then to a valco loop for injection into the gas chromatograph. The loop injection set up 100 µL aliquots of the sample gas into the gas chromatography column at 70 °C, with a helium flow of 20 mL.min<sup>-1</sup> at 10-12 psi. Hereafter the isotope species with mass 44, 45 and 46 were measured by the spectrometer. The analytical error was lower than 0.2 ‰, and the samples were analyzed in triplicate.

## **2.7 Determination of $\delta^{13}\text{C}$ of ethanol by elemental analyzer**

The sample (0.2 µL) was combusted inside the elemental analyzer (EA 1112 Series, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) in a vertical quartz tube at 900 °C, containing copper oxide and silvered cobaltous-cobaltic oxide under a continuous flow of ultra-pure helium at 90 mL.min<sup>-1</sup>. The gases were passed through a reduction column at 680 °C containing reduced copper whilst the water was trapped with magnesium perchlorate to allow for the separation of the gases on a Porapak Q chromatographic column at 45 °C. The gases were then transferred to the Delta plus XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), containing a triple ion collector for the simultaneous measurement of the *m/z* 44, 45 and 46 CO<sub>2</sub> signals formed in the combustion. All samples were analyzed in triplicate.

## 2.8 Statistical analysis

To evaluate the normality and equality of covariance the Kolmogorov Smirnov test was applied. Assuming the data normality Tukey test was used to analyze the principal component scores for significant group differences ( $p < 0.05$ ) (Sheskin, 2011). All statistical tests were performed using SPSS 26.0 (IBM Corp.).

## 3 Results and Discussion

The variation of hydrogen, oxygen and carbon of a given molecule is caused by the isotope enrichment or depletion during physical, chemical and metabolic process (Farquhar, Ehleringer, & Hubick, 1989). The values of  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  were evaluated for each compound as shown in Table 1.

The wine showed significant differences for  $\delta^2\text{H}$  values when compared to rice, cassava, sweet potato and market alcohol. These results indicate that through the  $\delta^2\text{H}$  values it is possible to distinguish the alcohol source of grapes from the other alcohols.

The values of  $\delta^2\text{H}$  of ethanol from wines range from -242.9 ‰ to -222.4 ‰. The wines indicates a difference of  $\delta^2\text{H}$  by year, where the values ranging from -242.9 to -238.9 in the 2018 year and -237.5 ‰ to -222.4 ‰ in the 2019 year. The results showed an influence caused by climatic conditions during the harvesting. The remarkable shift in the  $\delta^2\text{H}$  values could be a result of hot and dry climatic conditions and low levels of precipitation during the harvesting (Raco, Dotsika, Poutoukis, Battaglini, & Chantzi, 2015). In general, it was observed an increased temperature and a reduced rainfall in the 2018 harvest in the South of Brazil (Alves, Zanus, & Tonietto, 2019).

On the other hand, the difference in the values of  $\delta^{18}\text{O}$  of ethanol from wine was smaller, indicating in this case a weaker influence by year, ranging from 11.3 ‰ to 14.7 ‰ in the 2018 harvest and 10.5 ‰ to 15.2 ‰ in the 2019 year. However, similarly

to hydrogen values of  $\delta^{18}\text{O}$  of water in the wine showed a higher influence of the climatic conditions with mean values of  $-1.2\text{‰} \pm 0.7\text{‰}$  in the 2018 and  $0.5\text{‰} \pm 0.3\text{‰}$  in the 2019 harvest.

The grape variety also influence the isotope values of  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ , it was observed a small difference between the values for red grapes (Merlot and Cabernet Sauvignon) and white grapes (Chardonnay and White Muscat) in the 2019 harvest. Red grapes showed values of  $\delta^2\text{H}$  of  $-225.7\text{‰} \pm 2.1\text{‰}$  and  $\delta^{18}\text{O}$   $14.2\text{‰} \pm 1.3\text{‰}$  and white grapes showed a mean of  $\delta^2\text{H}$  of  $-236.6\text{‰} \pm 0.7\text{‰}$  and  $\delta^{18}\text{O}$   $12.1\text{‰} \pm 1.2\text{‰}$ . For the values of wine water were found  $\delta^{18}\text{O}$  values of  $0.9\text{‰} \pm 0.2\text{‰}$  (red) and  $0.10\text{‰} \pm 0.4\text{‰}$  (white). Varieties with early mature, such as Cabernet and Merlot usually lead to higher  $\delta^{18}\text{O}$  values of the wine water as compared to late-ripening varieties, such as Sangiovese, considering regular climatic conditions (Raco, Dotsika, Poutoukis, Battaglini, & Chantzi, 2015).

Independent of the variation between values of  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  in the ethanol from wine and even considering the variation of year, climatic conditions, precipitation, temperature, humidity and grape variety, there is a great range between the values of  $\delta^2\text{H}$  from wine in relation to the alcohol from rice, the difference found was  $32.7\text{‰}$ . The large difference allows to detect adulteration when rice alcohol is added into wine. Furthermore, a range even great was observed when compared wine to the alcohol market from rice, probably because the alcohol from market contain not declared water on its composition. Values less negative for  $\delta^2\text{H}$  were found by Chen et al. (2016) in grains of rice from China and more positive for  $\delta^{18}\text{O}$ , in the study they found values of  $\delta^{18}\text{O}$  ranging from  $19.6\text{‰}$  to  $22.2\text{‰}$  and  $\delta^2\text{H}$  between  $-99.5\text{‰}$  and  $82.8\text{‰}$ .

The results found from  $\delta^{18}\text{O}$  of water of alcoholic beverage from rice range from  $-4.7\text{‰}$  to  $-4.9\text{‰}$ , values even less negative was found by Hashiguchi et al. (2015) in

sake, a traditional Japanese alcoholic beverage. The value more negative is relative to the water used in the production of the beverage, because the major component of sake is water and there is also an influence of the geographical origin (Yoshizawa, 1999; Hashiguchi, Akamatsu, Izu, & Fujii, 2015).

Cassava showed the highest difference when compared to wine. Values for  $\delta^2\text{H}$  ranging from -268.0 to -267.9 ‰,  $\delta^{18}\text{O}$  -9.5 to -8.9 ‰ and  $\delta^{13}\text{C}$  -27.5 to -26.4 ‰ for ethanol from cassava, and  $\delta^{18}\text{O}$  of water cassava -4.1 to -3.9 ‰. This is the first time that values of isotope ratio were described for cassava, there is no previous studies. Cassava showed similar values to the alcohol from beet, as found by Smajlović et al. (2013).

Other important root for producing alcohol is sweet potato, it is a perennial crop of wide adaptation, easy growth, high resistance and low production cost. It is a culture considered also for bioethanol producing (Silva, Almeida, Ferraz, & Dias, 2018). Alcohol from sweet potato showed values  $\delta^2\text{H}$  ranging from -254.6 to -254.1 ‰,  $\delta^{18}\text{O}$  9.0 to 9.7 ‰ and  $\delta^{13}\text{C}$  -27.1 to -27.0 ‰ for ethanol. Similar values for  $\delta^{13}\text{C}$  was found by Gouveia et al. (2019) in a study with shoots and tubers from sweet potato.

A way to improve the separation of the alcohol from different raw materials was by evaluating the graphical representation  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  from the ethanol extracted from the samples (Figure 1). In the Figure 1 can be observed that the values for adulterated wine are very close to the market rice alcohol.

We also verified the graphic representation of  $\delta^{18}\text{O}$  from water and ethanol (Figure 2). However, the separation was less effective when compared to the  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  from ethanol. Perini and Camin (2013) also concluded that  $\delta^{18}\text{O}$  analysis on its own is not sufficient to improve the detection of illegal cane and beet sugar addition to wine.

The addition of some selected alcohols into wine was also tested. We selected the variety Ives as it has an intense color and normally produces cheaper wines. Due to these

characteristics, the wine is most susceptible to adulteration because a small addition of alcohol does not change the visual characteristics in this type of wine. The correlation of hydrogen after the addition of different alcohol concentrations to the Ives wine is shown in Figure 3.

We found significant correlations for rice alcohol ( $R^2 = 0.99$ ), but not so good correlation for sweet potato alcohol ( $R^2 = 0.72$ ). The result for rice was great as it shows that it is possible to differentiate between these alcohols and quantify the concentration added when mixed into the wine. Similarly to hydrogen, a great correlation was also found for oxygen (Figure 4) as the oxygen atoms of ethanol also originate from the water in the fermentation.

The correlation found for oxygen from rice alcohol ( $R^2 = 0.95$ ) and for sweet potato ( $R^2 = 0.90$ ) added in different concentrations to the Ives wines. Similarly to hydrogen, it was possible to identify and quantify the concentrations of the different alcohols added to wine. It is important to emphasize that the addition of different alcohols in some beverages, like wine, is not allowed.

#### **4 Conclusions**

In conclusion, this study demonstrated that it is possible to differentiate ethanol from rice, cassava and sweet potato from wine ethanol by isotope ratio mass spectrometry. The hydrogen is the most efficient isotope to identify the alcohol source, followed by the oxygen. Carbon is less effective.

In addition, hydrogen and oxygen are directly proportional to the concentration of the ethanol from rice and sweet potato added into the wine. Furthermore, this methodology can be used to control the wine authenticity, when the adulteration occurred

with addition of alcohol from rice, cassava and sweet potato, with the purpose to increase the alcohol volume into the wine.

## **Declarations**

### **Funding**

This study was part of a Research Grant supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Foundation) by the Grant\Award Number: 88887.310908/2018-00, the University of Caxias do Sul (UCS), the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN) and the Secretary of Agriculture of the State of Rio Grande do Sul (SEAPDR).

### **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the University of Caxias do Sul, the Laboratory of Oenological Reference Evanir da Silva (LAREN) and Secretary of Agriculture from Rio Grande do Sul (SEAPDR), the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN), the Uruguay National Wine Institute (INAVI) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Foundation).

### **Compliance with Ethics Requirements**

All of the authors who have been involved with the work agree to submit this paper, and all of them claim that none of the material in the paper has been published or is under consideration for publication elsewhere. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

- Alves, M., Zanús, M., & Tonietto, J. (2019). EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Uva e Vinho. Condições meteorológicas e sua influência na safra vitícola de 2019 em regiões produtoras de vinhos finos do Sul do Brasil: <https://www.embrapa.br>
- Aylot, R. (2013). Chapter 16 - Analytical Strategies Supporting Protected Designations of Origin for Alcoholic Beverages. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 60, 409-438. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59562-1.00016-5>
- Bauer-Christoph, C., Wachter, H., Christoph, N., Rossmann, A., & Adam, L. (1997). Assignment of raw material and authentication of spirits by gaschromatography, hydrogen- and carbon-isotope ratio measurements. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 204, 445-452.
- Cabello, C. (2007). Matérias primas amiláceas para fins energéticos. In: Lecture session presentation at the meeting of V Workshop Sobre Tecnologias Em Agroindústria de Tuberosas Tropicais. <http://www.cerat.unesp.br>
- Chen, T., Zhao, Y., Zhang, W., Yang, S., Ye, Z., & Zhang, G. (2016). Variation of the light stable isotopes in the superior and inferior grains of rice (*Oryza sativa* L.) with different geographical origins. *Food Chemistry*, 209, 95-98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.029>
- Farquhar, G., Ehleringer, J., & Hubick, K. (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 503-537.
- Gouveia, C., Ganança, J., Slaski, J., Lebot, V., & Carvalho, M. (2019). Variation of carbon and isotope natural abundances ( $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ ) of whole-plant sweet

- potato (*Ipomoea batatas* L.) subjected to prolonged water stress. *Journal of Plant Physiology*, 243, 1-13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153052>
- Hashiguchi, T., Akamatsu, F., Izu, H., & Fujii, T. (2015). Preliminary detection method for added rice and sugar cane derived brewer's alcohol in bulk samples of sake by measurement of hydrogen, oxygen and carbon isotopes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(6), 1018-1020. doi:<https://dx.doi.org/10.1080/09168451.2015.1008974>
- Ishida-Fuji, K., Goto, S., Uemura, R., Yamada, K., Sato, M., & Yoshida, N. (2005). Botanical and geographical origin identification of industrial ethanol by stable isotope analyses of C, H and O. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(11), 2193-2199. Doi: <https://dx.doi.org/10.1271/bbb.69.2193>
- Kuila, A. (2019). *Sustainable Biofuel and Biomass* (1st ed.). Palm Bay: Apple Academic Press.
- Lopes, M., Paulillo, S., Godoy, A., Cherubin, R., Lorenzi, M., Giometti, F., Amorin, H. (2016). Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Braz. J. Microbiol.*, 47, 64-76. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>
- OIV, International Organisation of Vine and Wine (2020). Compendium of international methods of wine and must analysis. 2020; 2020th ed. Paris, France.
- OIV, International Organisation of Vine and Wine (2021). International Code of Oenological Practices. 2021; 2021th ed. Paris, France.
- Perini, M., & Camin, F. (2013).  $\delta^{18}\text{O}$  of Ethanol in Wine and Spirits for Authentication Purposes. *Journal of Food Science*, 78(6), 839-844. doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12143>

- Raco, B., Dotsika, E., Poutoukis, D., Battaglini, R., & Chantzi, P. (2015). O–H–C isotope ratio determination in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin. *Food Chemistry*, 168, 588-594. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.043>
- Schneider, R., Seidel, C., Fornasier, F., Souza, D., & Corbellini, V. (2018). Bioethanol production from broken rice grains. *Interscience*, 43(12), 846-851.
- Sheskin, D. (2011). Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. (5<sup>th</sup> edition). Boca Raton, FL, United States: Chapman & Hall/CRC, 1928p.
- Silva, J., Almeida, M., Ferraz, M., & Dias, J. (2018). Integrated production of biodiesel and bioethanol 1 from sweet potato. *Renewable Energy*, 114-120. doi:<https://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.052>.
- Smajlović, I., Wang, D., Túri, M., Qiding, Z., Futo, I., Veres, M., Vujadinović, M. (2019). Quantitative analysis and detection of chaptalization and watering down of wine using isotope ratio mass spectrometry. *BIO Web of Conferences*, 15. doi:<https://dx.doi.org/10.1051/bioconf/20191502007>.
- Smajlović, I., Sparks, K. L., Sparks, J. P., Čukalović, I. L., & Jović, S. (2013). Ethanol isotope method (EIM) for uncovering illegal wine. *Natural Product Research*, 27(6), 513–517. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.673610>.
- Swain, M. R., Mishra, J., & Thatoi, H. (2013). Bioethanol production from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) flour using co-culture of *Trichoderma* sp. and *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation. *Braz. arch. biol. technol.*, 56(2), 171-179. doi:<https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000200002>

- Tian, S. J., Rickard, J. E., & Blanshard, M. (1991). Physicochemical properties of sweet potato starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4), 459-491. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740570402>
- Veiga, J. P. S., Valle, T. L., Feltran, J. C., & Bizzo, W. A. (2016). Characterization and productivity of cassava waste and its use as an energy source. *Renewable Energy*, 93, 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.078>.
- Viskić, M., Bandić, L., Korenika, A., & Jeromel, A. (2021). NMR in the Service of wine differentiation. *Foods*, 10, 1-21. doi:<https://doi.org/10.3390/foods10010120>
- Yamada, K., Yohida, N., Calderone, G., & Guillou, C. (2007). Determination of hydrogen, carbon and oxygen isotope ratios of ethanol in aqueous solution at millimole levels. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 1431-1437. doi:<https://doi.org/10.1002/rcm.2977>
- Yoshizawa, K. (1999). Sake: Production and flavor. *Food Reviews International*, 15(1), 83-107. doi:<https://doi.org/10.1080/87559129909541178>

### Legend of figures

Figure 1: Graphic representation of  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of ethanol from wine, rice, cassava, sweet potato, market alcohol from rice and a suspected adulterated wine.

Figure 2: Graphic representation  $\delta^{18}\text{O}$  from ethanol and  $\delta^{18}\text{O}$  of water from wine, rice, cassava, sweet potato, market alcohol from rice and a suspected adulterated wine.

Figure 3: Correlation between the concentration of alcohol at 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 and 50% and  $\delta^2\text{H}$  values of the wine spiked with different alcohols sources. The alcohol added were: a) rice and b) sweet potato.

Figure 4: Correlation between the concentration of alcohol at 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 and 50% and  $\delta^2\text{H}$  values of the wine spiked with different alcohols sources. The alcohol added were: a) rice and b) sweet potato.

Table 1:  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  of ethanol and water from rice, cassava, sweet potato, wine and market alcohol, expressed in ‰.

| Beverage       | $\delta^2\text{H}$ Ethanol | $\delta^{18}\text{O}$ Ethanol | $\delta^{18}\text{O}$ Water | $\delta^{13}\text{C}$ Ethanol |
|----------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Rice           | $-267.92 \pm 0.97^a$       | $9.15 \pm 0.46^{ac}$          | $-4.89 \pm 0.12^a$          | $-29.54 \pm 0.07^a$           |
| Cassava        | $-267.93 \pm 0.13^{ac}$    | $-9.31 \pm 0.34^b$            | $-4.06 \pm 0.07^a$          | $-26.83 \pm 0.59^b$           |
| Sweet Potato   | $-254.33 \pm 0.20^a$       | $9.28 \pm 0.34^{ac}$          | $-3.41 \pm 0.04^{ac}$       | $-27.06 \pm 0.02^{bc}$        |
| Wine           | $-235.27 \pm 6.61^b$       | $13.17 \pm 1.43^a$            | $-0.24 \pm 1.02^b$          | $-27.90 \pm 0.69^c$           |
| Market alcohol | $-176.79 \pm 13.53^d$      | $6.11 \pm 8.32^c$             | $-1.90 \pm 0.07^c$          | $-29.42 \pm 0.25^{ad}$        |

Means followed by different letters in the column differ significantly by Tukey test; significance level of 5%.

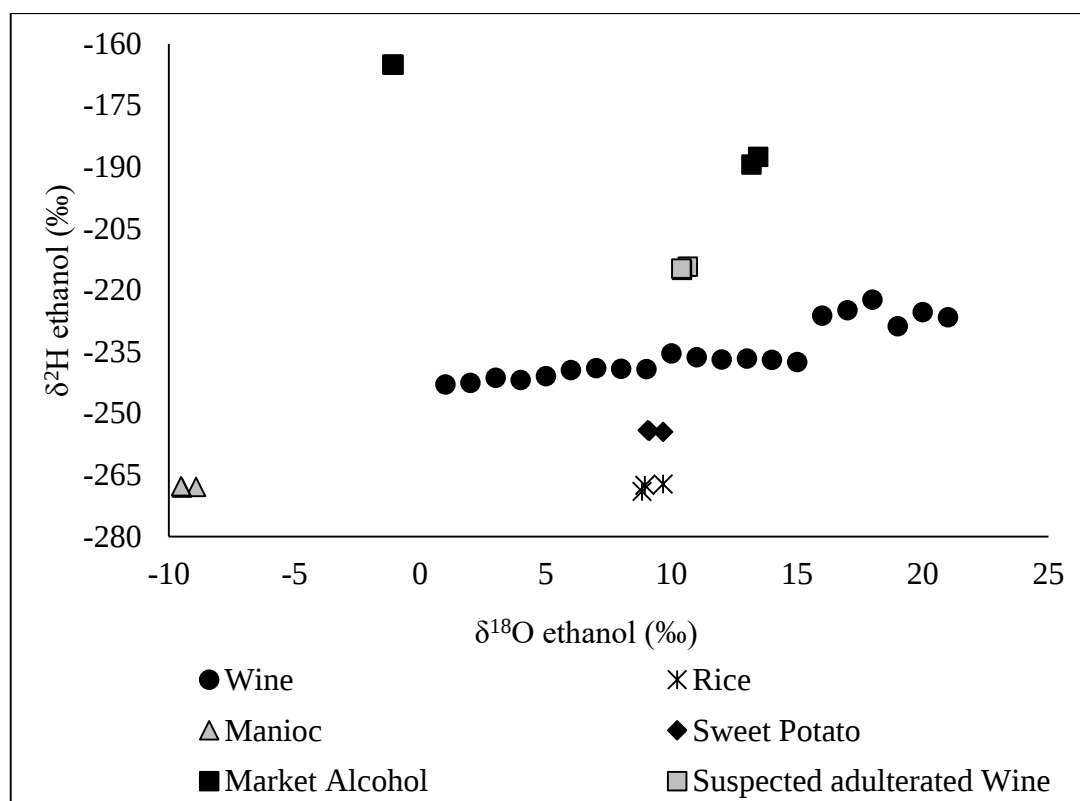


Figure 1: Graphic representation of  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of ethanol from wine, rice, cassava, sweet potato, market alcohol from rice and a suspected adulterated wine.

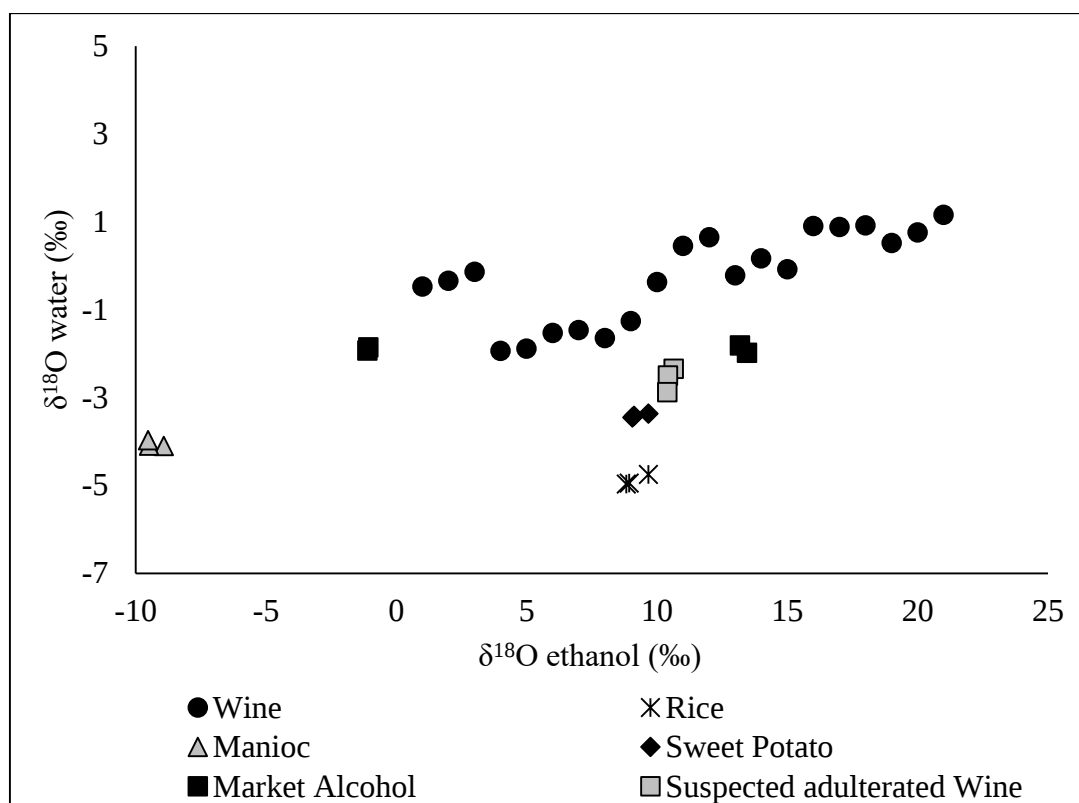


Figure 2: Graphic representation  $\delta^{18}\text{O}$  from ethanol and  $\delta^{18}\text{O}$  of water from wine, rice, cassava, sweet potato, market alcohol from rice and a suspected adulterated wine.

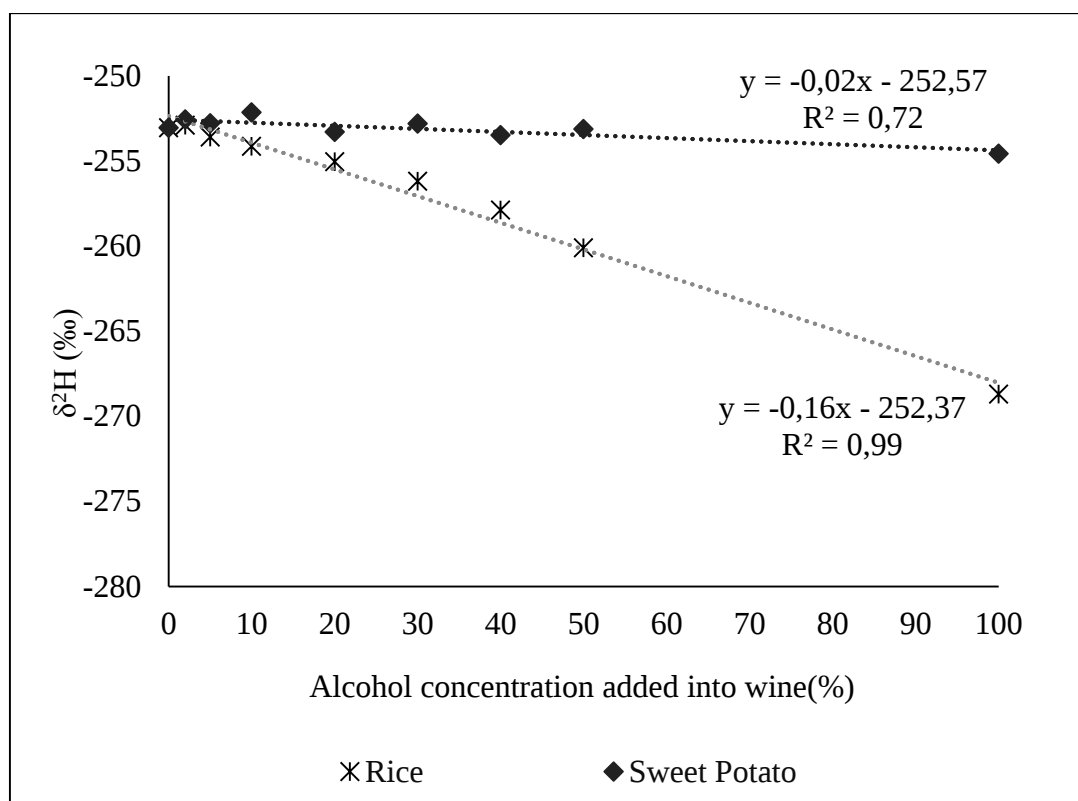


Figure 3: Correlation between the concentration of alcohol at 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 and 50% and  $\delta^2\text{H}$  values of the wine spiked with different alcohols sources. The alcohols added into wine were: a) rice and b) sweet potato.

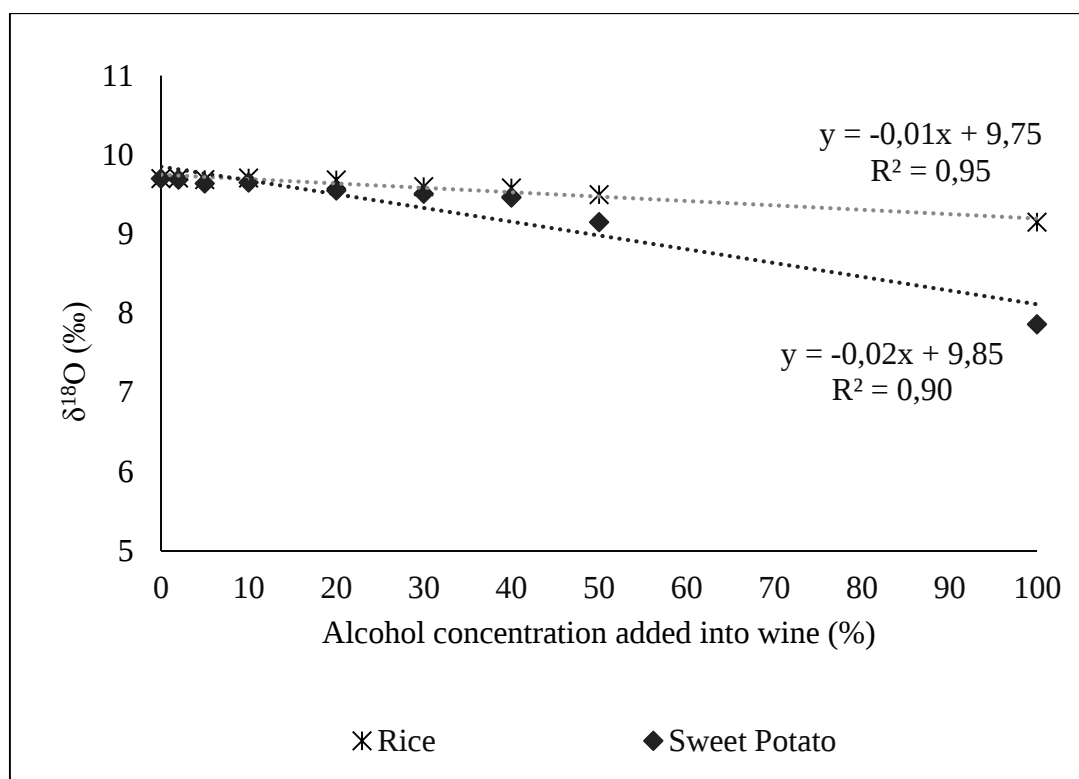


Figure 4: Correlation between the concentration of alcohol at 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 and 50% and δ<sup>2</sup>H values of the wine spiked with different alcohols sources. The alcohols added into wine were: a) rice and b) sweet potato.

### 4.3 CAPÍTULO III

#### **A direct and fast ethanol cryogenic extraction for isotopic determinations**

Enviado para publicação.

## **A direct and fast ethanol cryogenic extraction for isotopic determinations**

Susiane Leonardelli<sup>a,b,\*</sup>, Júlia Panozzo<sup>a,b</sup> and Regina Vanderlinde<sup>a</sup>

<sup>a</sup> University of Caxias do Sul (UCS), Institute of Biotechnology, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

<sup>b</sup>Oenological Reference Laboratory Evanir da Silva – LAREN (SEAPDR), Av. da Vindima, 1855, 95084-470, Caxias do Sul, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Susiane Leonardelli  
E-mail: [susileonardelli@gmail.com](mailto:susileonardelli@gmail.com), [sleonardelli@ucs.br](mailto:sleonardelli@ucs.br)

**Abstract**

Analytical methods for identification of different raw materials and process biomarkers of alcoholic beverages are emerging, most of them based on the ethanol molecule. Some alternatives to ethanol extraction have been proposed and improved with the purpose to avoid isotopic fractionation in isotopic methods, but normally involves a long time and high cost for extraction. The aim of this research was investigating a cryogenic ethanol extraction to prepare samples for isotopic determinations, with the purpose to evaluate the system in relation to the official method using spinning band column and to check the performance of the extraction. Cryogenic extraction showed  $\delta^{13}\text{C}$  values ranging from -29.54 to -24.60 ‰ lower than spinning band column that showed values between -29.12 and -24.64 ‰. However, the trueness showed values equivalent for both extractions with Z-score of -0.83 and a relative error 0.57 %. The hydrogen values were significantly different between the two methods, with a  $\delta^2\text{H}$  for cryogenic system ranging from -19.25 to -7.30 ‰ higher than -237.53 and -222.35 ‰ obtained for spinning band column. In the opposite way for oxygen, where  $\delta^{18}\text{O}$  for cryogenic system (-2.56 to 0.55 ‰) are lower than spinning band (11.50 to 15.21 ‰). For hydrogen and oxygen, the results are significantly different, showing that the method is not efficient for that determinations. In conclusion, this study showed a direct, fast and effective ethanol cryogenic extraction for carbon isotopic determinations with values similar by the official method using spinning band.

**Key words:** ethanol, cryogenic extraction, spinning band, isotopic composition.

## 1 Introduction

Distillation has been an important separation method along the humanity history, it was invented 5500 years ago. The knowledge about this method spread out over Europe in the early Middle Ages, and it was used to produce alcoholic beverages, medical products, and perfumes. Furthermore, products from distillation such as ethyl alcohol and petrol have been influencing the cultural developments throughout the world [1].

With the modern chemistry, new researches provide solutions for the industry with fast applicability and production. The technology became beverage field progressively complex, in which new products, different blends, innovations or isotope separations in conjunction with a computer performance and sophisticated equipment are the new reality. These factors allow to manage the driving factors to improve beverage production and alcohol purity, with lower energy demand and total cost [2].

Ethanol is one of the most widely used alcohols and is an important constituent or ingredient of several foods and beverages. However, the purification is a critical point for any kind of purpose and this process is done mainly by distillation. Distillation in the industry is a strong and difficult separation technique and it brings some disadvantages, such as interference in the volatile compounds, cost and time [3, 4].

Ethanol purification is difficult, because ethanol-water solution forms an azeotrope, with 89.4 mol % of ethanol and 10.6 % of water. The boiling point of this azeotrope is 78.2 °C at one bar absolute standard atmospheric pressure, then the minimum temperature of the ethanol-water solution can boil is 78.2 °C, the boiling point of ethanol is 78.4 °C and the water 100 °C. Due to these aspects and composition, separations by conventional distillation are not effective for isotopic determinations [5].

There are a several alternatives to distillation for recovering and purification of ethanol from aqueous solutions, some process includes membrane permeation, vacuum stripping, gas stripping, solvent extraction, adsorption and various hybrid processes.

Therefore, special process for removal of the remaining water is required for separation [6]. In addition, when the interest of the ethanol purification is for evaluating the authenticity or geographical origin using stable isotope, the distillation process might influence the applicability of the isotopes [7].

Some isotopic determinations in spirit drinks need a specific method for ethanol extraction to avoid isotopic fractionation in the distillation process. Some examples that need this attention during the ethanol extraction are the determination of the distribution of deuterium in ethanol of spirit drinks of vitivinicultural origin by application of nuclear magnetic resonance of deuterium using the site-specific natural isotopic fractionation (SNIF-NMR), or the determination by isotope ratio mass spectrometry (IRMS)  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  of wine ethanol [8] and the determination of  $\delta^{18}\text{O}$  of ethanol in wine and spirits for authentication purposes [9].

The methods above indicate that the extraction can be done by any method as long as 98 to 98.5 % of the total alcohol in the wine is recovered in a distillate which contains 92 to 93 % (*m/m*) (95 % vol.), avoiding isotopic fractionation [8]. However, nowadays there is one official method that satisfies this recovery, it is expensive and it takes a long time to complete a distillation. Thus the aim of the present research is to investigate the cryogenic system for ethanol extraction, as a way to prepare samples for isotopic determinations and to evaluate the data accuracy and time of ethanol extraction comparing with the official method using spinning band.

## **2 Material and methods**

### **2.1 Reference materials**

Primary reference materials were obtained from International Atomic Energy Agency (IAEA, Vienna, Austria). The standard for stable carbon was Sucrose ( $\delta^{13}\text{C} = -10.45\text{‰}$ ) and for hydrogen and oxygen used for calibration were Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW2,  $\delta^2\text{H} = 0\text{‰}$  and  $\delta^{18}\text{O} = 0\text{‰}$ ), Greenland Ice Sheet Precipitation (GISP,  $\delta^2\text{H} = -189.50\text{‰}$  and  $\delta^{18}\text{O} = -24.78\text{‰}$ )<sup>10</sup> and Standard Light Antarctic Precipitation SLAP (SLAP,  $\delta^2\text{H} = -428.0\text{‰}$  and  $\delta^{18}\text{O} = -55.5\text{‰}$ )<sup>11</sup>.

High purity gases were used as reference gases, carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ , purity 99.998 %), hydrogen ( $\text{H}_2$ , purity 99.999 %) and carbon monoxide ( $\text{CO}$ , purity 99.997 %). Helium ( $\text{He}$ , purity 99.9999 %) was used as a carrier gas during the analytical process in the whole system. All high purity gases were supplied by Air Liquide S.A. (São Paulo, Brazil).

## 2.2 Samples

A total of 17 samples from South Brazil were considered for carbon isotopic ratio ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) for this research from different matrices, being: eleven wines, four authentic fermented drinks from fruits, one from rice and one from sweet potato. Furthermore, it was obtained 51 determinations for comparing with the official method.

For ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) and oxygen ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ), five wine samples from South Brazil were prepared and analyzed five times for each sample by the extraction systems. Resulting in 25 determinations each system for hydrogen and oxygen for comparing the values.

## 2.3 Cryogenic extraction

The cryogenic distillation apparatus used in this study consists in a closed system controlled by valves and a vacuum manifold with six extraction lines. The system (Figure 1) is composed by one diffuser pump and one mechanical pump, one glass tube of 1 m,

two traps (number 6) for liquid nitrogen and extraction lines with six manifold traps (numbers 8 to 13) plugged in series through glass capillaries with diameter of 9 mm (Vidropin, São Paulo, Brazil).

The samples (1.5 mL) were placed into a flask of 35 mL and connected in the side A (Figure 1) and the ethanol extracted was collected in a rimless glass tube of 9 mL immersed in liquid nitrogen at -196 °C. The distillation worked under cryogenic action and high vacuum at  $10^{-2}$  mbar. The complete process takes one hour and the extraction 25 min. [10, 11]. In the end of the process one mL of distillate were transferred to a 2 mL vial for determinations.

The vacuum is generated by two stages rotary vane pump (Edwards, Burgess Hill, United States) and monitored by a PIRANI® vacuum gauge (Pfeiffer Vacuum, Aßlar, Germany). In the end of the extraction line there was attached gaseous nitrogen with minimum purity level of 99.999 % (Air Liquide, São Paulo, Brazil) for purging the system and cleaning the line.

## **2.4 Spinning band column**

The distillation procedure using spinning band column (Figure 2) followed according to the official EU regulations for wine analyses (Regulation (EEC) No 2676/90) [12]. The ethanol was extracted from the samples by using a Cadiot column (Eurofins, Nantes, France).

The samples were introduced into the flask (500 mL) in the distillation apparatus with a constant reflux ratio of 0.9. An erlenmeyer flask beforehand calibrated (125 mL) was placed to collect the ethanol above. The boiling liquid was collected between 78 and 78.2 °C, the collection was stopped when the temperature exceeded 78.5 °C and restarted

to collect when the temperature returns to 78 °C. The complete distillation took approximately four hours. This method is suitable as it guarantees a higher concentration of ethanol (more than 95 % alcohol) with a distillation temperature set up at 78 °C.

The volume used for distillation depends on the alcohol degree in the sample, which was, for samples with ethanol content higher than 10 % (v/v) were used 300 mL and resulted about 12 mL of ethanol (over than 95% vol.), whereas, for samples with alcohol lower than 10 % were used 400 mL to get approximately 12 mL of ethanol.

## 2.5 Determination of $\delta^{13}\text{C}$ of ethanol by elemental analyzer

The ethanol extracted from 17 samples in triplicate by both distillation system was submitted to the carbon isotopic ratio determination ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) to compare the results. The sample volume used was determined monitoring the mass/carga ( $m/z$ ) 44 signal of the high vacuum intensity at 3 Volts. Considering the 44 signal the sample volume used for ethanol extracted with cryogenic system was one  $\mu\text{L}$  and with spinning band column 0.2  $\mu\text{L}$ .

The ethanol samples were combusted inside the elemental analyzer (EA 1112 Series, Thermo Scientific, Bremen, Germany) in a vertical quartz tube at 900 °C, containing copper oxide and silvered cobaltous-cobaltic oxide under a continuous flow of ultra-pure helium at 100  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . After the gases produced were passed through a reduction column at 680 °C containing reduced copper, the water was trapped with magnesium perchlorate, and the gases were separated on a chromatographic column at 45 °C Poraplot Q fused silica gas (25 m x 0.32 mm - CP 7551, Agilent Technologies, Santa Clara, United States). The gases were then transferred to the Delta plus XL mass spectrometer (Thermo Scientific), which has a triple ion collector for the simultaneously measures of the  $m/z$  44, 45 and 46 of  $\text{CO}_2$  signals formed in the combustion [8].

The analytical error was lower than 0.05 ‰, and the samples were analyzed in triplicate. Results of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  are expressed in  $\delta^{13}\text{C}$  units as per mil (‰) deviation relative to the international standard Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB). The laboratory standard gas was calibrated in the V-PDB scale using Sucrose (NIST 8542) with a  $\delta^{13}\text{C}$  value of -10.45 ‰.

### **2.5.1 Performance of the extraction method for carbon**

Linearity was determined through repeated analysis of the different enrichment levels, tests were carried out by adding ethanol from sugar cane to a wine sample at following concentrations (0, 1, 10, 30, 50, 70, 90, 99 and 100 %). To evaluate the linearity and working range, the ethanol was extracted from the enriched samples using cryogenic system by each concentration, and the ethanol was analyzed in seven replicates. The determination coefficient ( $R^2$ ) of the regression analysis should be greater than 0.99.

The accuracy was determined by recovery studies performed at the high, medium and low concentrations of the analyte. It was evaluated following the Codex Alimentarius criteria [13].

The precision was evaluated by the repeatability and reproducibility. For the repeatability was considered 8 replicates from the same sample, same distillation, same equipment and same analyst in a short timescale. Reproducibility was measured comparing the  $\delta^{13}\text{C}$  values from two extraction methods. The repeatability and reproducibility limit were calculated following the Eurachem Guide [14].

The ruggedness was tested by three different volumes at 1.0, 1.5 and 2.0 mL and time for a complete distillation was also tested, considering at 10, 15, 20, 25 and 30 min. All data were performed by one-way ANOVA following by Tukey multiple comparisons with significance level ( $p > 0.05$ ).

## 2.6 Determination of $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of ethanol by pyrolysis system

The isotopic ratio of hydrogen ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) and of oxygen ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) were determined with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS) Delta V Advantage coupled to a thermal conversion/elemental analyzer - TC/EA and a CONFLO IV (all of them from Thermo Fisher Scientific). The reaction tube for hydrogen and oxygen analysis was set up at 1450 °C and a chromatograph column at 90 °C. Helium was used as carrier gas at 1.5 bar.

The instrument used an autosampler (AS3000, Thermo Fisher Scientific) from which samples (0.2  $\mu\text{L}$ ) were injected directly into the pyrolysis furnace with a micro syringe. The hydrogen atom of ethanol was converted to hydrogen ( $\text{H}_2$ ) inside the pyrolysis reactor. For the determination of  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , the mass spectrometer contained Faraday collectors for  $m/z$  2 and  $m/z$  3.

The  $^2\text{H}/^1\text{H}$  was reported as  $\delta^2\text{H}$  as an interpolation of the results relative to VSMOW2, GISP and SLAP, with a  $\delta^2\text{H}$  values respectively 0 ‰, -189.5 ‰ and -428 ‰. The samples were injected 5 times of which the first two results were discarded to ensure that there is no contamination from previous samples. The analytical error was less than 2 ‰.

The samples for  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  determinations also were analyzed 5 times of which, the first two results were discarded to ensure that there is no contamination from the previous samples. The analytical error was lower than 0.4 ‰. The  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  was reported as  $\delta^{18}\text{O}$  related to the VSMOW2 with a  $\delta^{18}\text{O}$  value 0 ‰. The ratios in the Faraday collectors  $m/z$  30 ( $^{12}\text{C}^{18}\text{O}$ ) and 28 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ ) determine the value of  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .

## 2.7 Statistical analysis

A test of normality Kolmogorov Smirnov was applied to evaluate the normality and equality of covariance. Assuming the data homogeneity was not confirmed, the

Wilcoxon test was applied to analyze the principal component scores for significant group differences ( $p > 0.05$ ) and z-score was calculated to ensure the accuracy. When the homogeneity was confirmed one-way ANOVA following by Tukey multiple comparisons was used with significance level ( $p > 0.05$ ) [15]. All statistical tests were performed using SPSS 26.0 (IBM Corp.).

### 3 Results and Discussion

#### 3.1 Carbon

The carbon isotopic distribution has been determined from different beverages and the  $\delta^{13}\text{C}$  values can be observed in Table 1:

The  $\delta^{13}\text{C}$  values of ethanol samples showed a small difference between the distillation system in some samples. The mean difference found between the methods was 0.16 ‰, this difference was smaller than the results found for Rossmann et al. [16], using the same distillation system, in two different laboratories in France and Germany and the authors concluded that differences of  $\delta^{13}\text{C}$  coming from the material investigated, but any value exceeded the calibration effect.

Cryogenic extraction showed  $\delta^{13}\text{C}$  values lower than spinning band column (Table 1). This effect can be explained by the vapor pressure due to the influence of the intermolecular forces on the motions of molecules in the condensed material [17]. Moussa et al. [18] also observed a progressively enrichment for carbon studying the isotope fractionation parameters in two different systems, a spinning band column and a packed column. They showed that the isotopic enrichment produced in fractionating columns has been related to the number of theoretical plates, to the reflux and to the equilibrium liquid-vapor fractionation. They concluded that using spinning band column isotopic effects of -1.2 ‰ must be considered.

The mean difference found in our study between values can be considered acceptable and lower than the official method from International Organisation of Vine and Wine (OIV), that the reproducibility limit (R) for alcohol is 0.87 ‰, for white wines 0.76 ‰ and red wines 0.64 ‰ [8].

Values obtained by Baudler et al. [7] were more negative using spinning band column. They investigated a comparison of two extraction systems in relation to the start material and they showed the distillation proceeds with an inverse vapor pressure isotopic effect decreasing  $\delta^{13}\text{C}$  values.

The practical assessment of the trueness of the cryogenic system was made and expressed quantitatively in terms of bias. The value was calculated in relation to  $\delta^{13}\text{C}$  from samples obtained by spinning band column, and the mean result for relative error was 0.57 % and the mean Z-score value was -0.83. These results were considered as satisfactory because  $|Z|$  is lower than 2 [19]. It demonstrated that the  $\delta^{13}\text{C}$  for cryogenic method is equivalent to the spinning band method.

The greatest advantages of the cryogenic system are in the distillation time and the sample volume. The time for a complete distillation by spinning band with eight columns was about four hours, while for distillation by cryogenic system with six traps the time spent was one hour. The cryogenic method showed to be faster than spinning band, optimizing the sample preparation for further carbon isotope determinations.

The volume used for distillation in cryogenic extraction requires only 1.5 mL, while for the spinning band column it is much larger and dependent on the percentage of alcohol in the sample. For samples with alcohol content higher than 10 % (v/v) were used 300 mL, whereas samples with alcohol lower than 10 % were used 400 mL. Comparing the volume used between the two distillations, the spinning band needs 200 times more

sample than cryogenic extraction. It is very important to consider the volume because sometimes there is a small available volume and the sample is too expensive or rare.

### **3.2 Performance of the method for carbon**

Taking into account that the cryogenic extraction can be applied for determining the carbon isotopic composition, the results for the validation parameters can be seen in Table 2:

The data showed a good linear range where the values for the determination coefficient ( $R^2$ ) were 0.99. The working range is linear and directly proportional to the concentrations and it is fit for the purpose. In addition, the method showed a satisfactory accuracy for the carbon isotopic parameters in relation to the limit established by Codex Alimentarius with a recovery between 98–102 % [13].

The precision was represented by repeatability and reproducibility, the values were very similar and comparable to the previously studies for wine and fruit juices using similar methods [8, 20].

Another important consideration is the ruggedness, where it involves making deliberate changes to the method and investigating the subsequent effect on the method performance [14]. The ruggedness of the method is shown in Table 3.

The cryogenic method extraction was considered robust because the parameters analyzed did not show significant statistical differences for the carbon isotopic composition. The only difference is between the time extraction 10 min. and 30 min. Thus, it is important to follow and control the time extraction suggested of 20 min.

### **3.1 Hydrogen and Oxygen**

Influences of the distillation in the  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values showed in Table 4.

A huge difference was observed in the  $\delta^2\text{H}$ , spinning band column resulted in a significant decrease of  $\delta^2\text{H}$  values. An inverse effect occurred for  $\delta^{18}\text{O}$  values, where the values for spinning band increase. These influences can be explained by the potential interactions between water/ethanol, because the cryogenic system does not separate all the water content in the sample and the final ethanol extracted carry water on its composition.

The results obtained in the cryogenic system are close to the values found to the meteorological water by Chelsey et al. [21], ranging from -79.1 ‰ to -22.5 ‰ for  $\delta^2\text{H}$  and -11.4 ‰ to -4.3 ‰ for  $\delta^{18}\text{O}$  and the values found in Germany that varying between -170 ‰ and +18 ‰ for  $\delta^2\text{H}$  and -24 ‰ to +2 ‰ for  $\delta^{18}\text{O}$  [22]. These authors explained that the values of water are variable due to the latitude and altitude and also they are strongly influenced by seasonal temperatures.

The cryogenic extraction is not effective for  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  determinations, due to the water influence in the final sample. For this application it is necessary to reevaluate the system to trap the water and minimize its influence.

#### **4 Conclusion**

In conclusion, this study showed a direct, fast and effective ethanol cryogenic extraction for carbon isotopic determinations. The values for carbon found by ethanol cryogenic extraction were similar to the values found by the official method, as the difference is lower than the repeatability. In addition, the cryogenic extraction is three times faster and needs a volume considerably lower than the official method by spinning band column.

The cryogenic extraction cannot be applied for hydrogen and oxygen, because there is a huge influence of the water in the ethanol extracted and it makes the  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values changing in the final result.

**Funding Sources:** This study was part of a Research Grant supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Foundation) by the Grant\Award Number: 88887.310908/2018-00, the University of Caxias do Sul (UCS), the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN), the Secretary of Agriculture of the State of Rio Grande do Sul (SEAPDR) and the Uruguay National Wine Institute (INAVI).

### **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the University of Caxias do Sul, the Laboratory of Oenologic Reference Evanir da Silva (LAREN) and Secretary of Agriculture from Rio Grande do Sul (SEAPDR), the Brazilian Wine Institute (IBRAVIN), the Uruguay National Wine Institute (INAVI) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Foundation).

### **Compliance with Ethics Requirements**

All of the authors who have been involved with the work agree to submit this paper, and all of them claim that none of the material in the paper has been published or is under consideration for publication elsewhere. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

- [1] Kockmann, N. (2014). History of Distillation. Em A. Górak, & E. Sorensen, *Distillation: Fundamentals and Principles*. London, England: Academic Press. 1 519, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386547-2.00001-6>
- [2] Coldea, T. E., Mudura, E., & Socaciu, C. (2017). Advances in Distilled Beverages Authenticity and Quality Testing. In Stauffer, M. Ideas and Applications Toward Sample Preparation for Food and Beverage Analysis, 182. Intechopen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72041>
- [3] Hattoi, R., Yamada, K., Hasegawa, K., Ishikawa, Y., Ito, Y., Sakamoto, Y., & Yoshida, N. (2008). An improved method for the measurement of the isotope ratio of ethanol in various samples, including alcoholic and non-alcoholic beverages. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 3410-3414. <https://doi.org/10.1002/rcm.3753>
- [4] Onuki, S., Koziel, J. A., Leeuwen, J. V., Jenks, W. S., & Grewell, D. A. (2008). Ethanol production, purification, and analysis techniques: a review. Presentation at the 2008 ASABE Annual International Meeting - Agricultural and Biosystems Engineering.
- [5] Kumar, S., Singh, N., & Prasad, R. (2010). Anhydrous ethanol: a renewable source of energy. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14 (2010) 1830-1844. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.015>
- [6] Offeman, R. D., Stephenson, S. K., Franqui, D., Cline, J. L., Robertson, G. H., & Orts, W. J. (2008). Extraction of ethanol with higher alcohol solvents and their toxicity to yeast. *Sep. Purif. Technol.* 63 (2008) 444-451. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.06.005>

- [7] Baudler, R., Adam, L., Rossmann, A., Versini, G., & Engel, K.-H. (2006). Influence of the distillation step on the ratios of stable isotopes of ethanol in cherry brandies. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 864-869. <https://doi.org/10.1021/jf052043a>
- [8] OIV, I. O. of V. and W. (2020). Compendium of international methods of wine and must analysis (2020<sup>th</sup> ed.). Paris, France, 593 p.
- [9] Perini, M., & Camin, F. (2013).  $\delta^{18}\text{O}$  of Ethanol in Wine and Spirits for Authentication Purposes. *Journal of Food Science*, 78(6), 839–844. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12143>.
- [10] Dutra, S. V., Adami, L., Marcon, A. R., Carnieli, G. J., Roani, C. A., Spinelli, F. R., Vanderlinde, R. (2011). Determination of the geographical origin of Brazilian wines by isotope and mineral analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1571-1576. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5181-2>
- [11] Ducatti, C., Vanderlinde, R., Guerra, C., Carnevalli, W. T., Llorca, R. F., & Bonassi, J. A. (2003) Isotopic analysis ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of wines and distillates by cryogenic distillation. IX Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Santiago, Chile.
- [12] Commission Regulation (EEC) No 2676/90 of 17 September 1990. Determining community methods for the analysis of wines. *Official Journal*. 272(34):3 (1990) 0001-0192.
- [13] FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). Codex Alimentarius Commission. Rome, 26<sup>th</sup>, Rome, Italy, 264p. <https://doi.org/10.1007/BF02582346>.

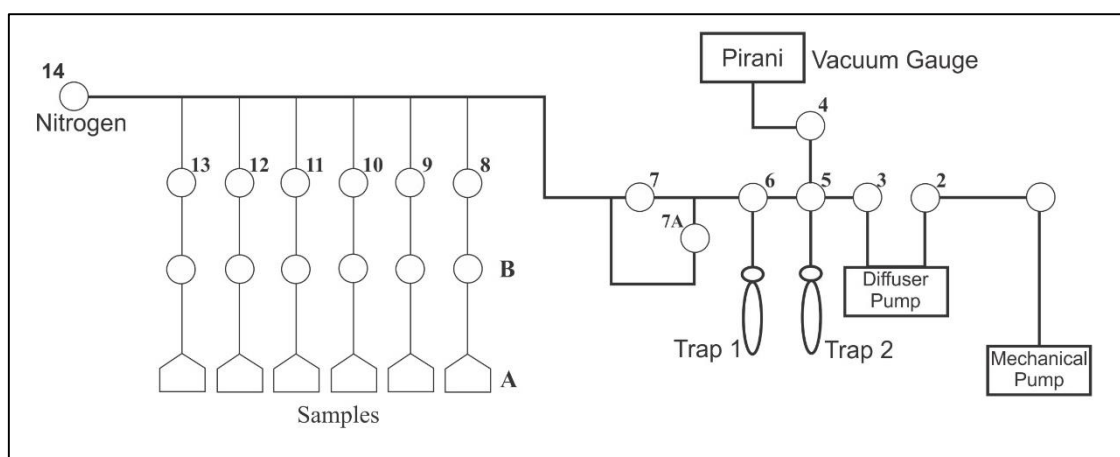
- [14] Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. 70 p. ISBN 978-91-87461-59-0.
- [15] Sheskin, D. (2011). Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. Boca Raton, United States: Chapman & Hall/CRC, 1928 p. <https://doi.org/10.1201/9780429186196>.
- [16] Rossmann, A., Schmidt, H.-L., Reniero, F., Versini, G., Moussa, I., & Merle, M. H. (1996). Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and German. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 203, 293-301. <https://doi.org/10.1007/BF01192881>.
- [17] Bigeleisen, J. (1961) Statistical Mechanics of Isotope Effects on the Thermodynamic Properties condensed systems. *Int. J. Chem. Phys.* 34, 1485-1493. <https://doi.org/10.1063/1.1701033>.
- [18] Moussa, I., Naulet, N., Martin, M. L., & Martin, G. J. (1990). A Site-Specific and Multielement Approach to the Determination of Liquid-Vapor Isotope Fractionation Parameters. The Case of Alcohols. *J. Phys. Chem.* 94, 8303-8309. <https://doi.org/10.1021/j100384a056>.
- [19] Czichos, H., Saito, T., & Smith, L. (2011) Handbook of Metrology and Testing. Heidelberg: Springer, 1500 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16641-9>.
- [20] Thomas, F., & Jamin, E. (2009).  $^2\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$ -IRMS analyses of acetic acid from vinegar,  $^{18}\text{O}$ -IRMS analysis of water in vinegar: International collaborative study report. *Anal. Chim. Acta*, 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.014>.

- [21] Chelsey, J. A., Ramey, R., Flaherty, D. T., & Akpa, B. (2020). Oxygen and Hydrogen isotopes in human hair and tap water: Modeling relationships in a Modern Mexican Population. *Hum. Biol.* 141, 1-42. <https://doi.org/10.1002/9781119482062.ch23>.
- [22] Stumpp, C., Klaus, J., & Stichler, W. (201). Analysis of long-term stable isotopic composition in German precipitation. *J. Hydrol.*, 517, 351-361. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2014.05.034>

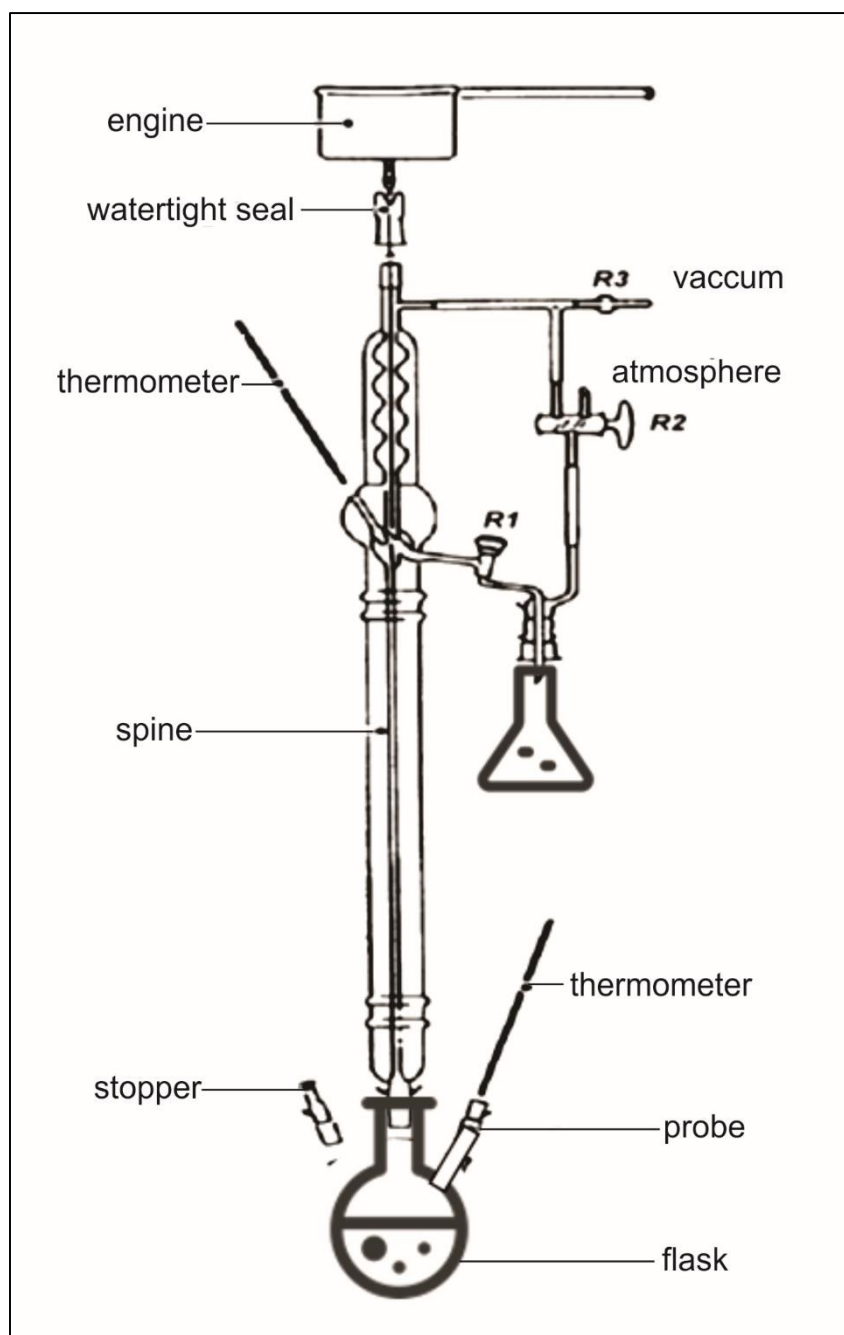
**Legend of figures**

**Figure 1:** Scheme of the device by cryogenic extraction used in the ethanol distillation.

**Figure 2:** Scheme of the device by spinning band column used in the ethanol distillation.



**Figure 1:** Scheme of the cryogenic distillation device used in the ethanol extraction.



**Figure 2:** Scheme of the device by spinning band column used in the ethanol distillation.

Table 1:  $\delta^{13}\text{C}$  values of ethanol from two distillation systems in different products.

| Beverage | Sample                    | Spinning band<br>column<br>(‰) | Cryogenic<br>extraction<br>(‰) | Z<br>score | Relative<br>error (%) |
|----------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------|-----------------------|
| Wines    | Niagara                   | $-27.02 \pm 0.01^a$            | $-27.38 \pm 0.13^b$            | -1.69      | 1.36                  |
|          | Isabella                  | $-27.67 \pm 0.03^a$            | $-27.75 \pm 0.15^a$            | -0.77      | 0.29                  |
|          | Ives                      | $-28.23 \pm 0.02^a$            | $-28.83 \pm 0.03^b$            | -1.82      | 2.12                  |
|          | Chardonnay 87             | $-27.98 \pm 0.07^a$            | $-28.13 \pm 0.07^b$            | -1.44      | 0.52                  |
|          | Chardonnay 71             | $-28.54 \pm 0.14^a$            | $-29.07 \pm 0.08^b$            | -1.72      | 1.83                  |
|          | White Muscat<br>262       | $-27.52 \pm 0.09^a$            | $-27.66 \pm 0.03^b$            | -1.45      | 0.52                  |
|          | White Muscat<br>285       | $-27.42 \pm 0.08^a$            | $-27.58 \pm 0.07^a$            | -1.45      | 0.60                  |
|          | Merlot 248                | $-28.36 \pm 0.13^a$            | $-28.35 \pm 0.07^a$            | 0.17       | -0.06                 |
|          | Merlot 212                | $-27.07 \pm 0.12^a$            | $-27.38 \pm 0.02^b$            | -1.65      | 1.13                  |
|          | Cabernet<br>Sauvignon 264 | $-29.16 \pm 0.06^a$            | $-28.86 \pm 0.04^b$            | 1.76       | -1.00                 |
| Fruits   | Cabernet<br>Sauvignon 300 | $-29.12 \pm 0.09^a$            | $-29.21 \pm 0.04^a$            | -1.03      | 0.30                  |
|          | Apple                     | $-27.92 \pm 0.01^a$            | $-27.20 \pm 0.03^a$            | 1.82       | -2.60                 |
|          | Orange                    | $-27.62 \pm 0.04^a$            | $-27.62 \pm 0.05^a$            | 0.05       | -0.01                 |
|          | Persimmon                 | $-26.98 \pm 0.04^a$            | $-27.39 \pm 0.10^b$            | -1.75      | 1.53                  |
|          | Watermelon                | $-24.64 \pm 0.10^a$            | $-24.60 \pm 0.03^a$            | 0.51       | -0.15                 |
|          | Sweet Potato              | $-26.60 \pm 0.03^a$            | $-27.06 \pm 0.02^b$            | -1.82      | 1.70                  |
|          | Rice                      | $-29.07 \pm 0.05^a$            | $-29.54 \pm 0.07^b$            | -1.79      | 1.62                  |

\* Mean  $\pm$  Standard Deviation (n = 51). Means followed by different letters in the line differ significantly by Wilcoxon test; significance level of 5%.

Table 2: Results of validation parameters of the method for carbon.

| Parameter                       | Result |
|---------------------------------|--------|
| Linear Range (%)                | 0-100  |
| Determination coefficient $R^2$ | 0.99   |
| Accuracy (recovery %)           | 99     |
| Repeatability (sr%)             | 0.21   |
| Reproducibility (Sr %)          | 0.30   |

Table 3: Results for carbon isotopic composition from ethanol extracted by cryogenic system in different volume and time.

| Parameter   | Condition | Mean $\pm$ SD                   |
|-------------|-----------|---------------------------------|
| Volume (mL) | 1.0       | -29.27 <sup>a</sup> $\pm$ 0.08  |
|             | 1.5       | -29.27 <sup>a</sup> $\pm$ 0.05  |
|             | 2.0       | -29.30 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04  |
| Time (min)  | 10        | -29.31 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06  |
|             | 15        | -29.27 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.08 |
|             | 20        | -29.25 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.06 |
|             | 25        | -29.29 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.05 |
|             | 30        | -29.24 <sup>b</sup> $\pm$ 0.11  |

\* Mean  $\pm$  Standard Deviation (n = 18). Means followed by different letters in the column differ significantly by ANOVA complemented by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

Table 4:  $\delta^2\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values of ethanol from two distillation systems in wine.

| Wine                     | $\delta^2\text{H}$ (‰) |                      | $\delta^{18}\text{O}$ (‰) |                    |
|--------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------|
|                          | Cryogenic              | Spinning band        | Cryogenic                 | Spinning band      |
| White Muscat (262)       | $-12.37^a \pm 0.62$    | $-237.53^b \pm 0.75$ | $-1.23^a \pm 0.11$        | $13.79^b \pm 0.12$ |
| White Muscat (285)       | $-19.25^a \pm 0.42$    | $-236.67^b \pm 0.69$ | $-2.56^a \pm 0.14$        | $11.50^b \pm 0.17$ |
| Merlot (248)             | $-6.92^a \pm 0.62$     | $-222.35^b \pm 0.52$ | $-0.27^a \pm 0.13$        | $15.02^b \pm 0.16$ |
| Cabernet Sauvignon (264) | $-9.38^a \pm 0.61$     | $-226.39^b \pm 0.66$ | $0.55^a \pm 0.05$         | $14.81^b \pm 0.17$ |
| Cabernet Sauvignon (300) | $-10.10^a \pm 0.15$    | $-228.76^b \pm 0.47$ | $-0.05^a \pm 0.13$        | $15.21^b \pm 0.11$ |

\* Mean  $\pm$  Standard Deviation (n = 50). Means followed by different letters in the column differ significantly by ANOVA complemented by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

## 5. DISCUSSÃO GERAL

O vinho não pode ser adicionado de álcool, independente da matéria-prima utilizada. A lei brasileira permite somente a adição de açúcar de cana durante a fermentação do mosto para elevar o grau alcoólico do vinho, dentro do limite estabelecido em lei. Em função disso, o vinho é um produto suscetível a adulterações, visto que, o álcool do vinho é proveniente exclusivamente da fermentação da uva. E a uva, por sua vez, em algumas safras apresenta uma produção pequena, elevando o preço da comercialização, ou com baixa concentração de açúcares para conversão em álcool quando comparada a outras culturas.

Diversas matérias-primas podem ser utilizadas para produção de álcool, principalmente, quando apresentam um grande volume de produção. O excedente de produção, em uma determinada safra, é um dos principais fatores que determinam a viabilidade econômica de se utilizar a matéria-prima para outra destinação, como por exemplo, para produção de álcool. Além disso, no decorrer do estudo observamos que além da produção, outros fatores podem contribuir para tornar a matéria-prima uma fonte de álcool, como a eficiência de conversão dos açúcares em etanol ou ainda utilização de resíduos e biomassas para produção. Os fatores citados direcionam principalmente para o arroz, a laranja e a mandioca que, atualmente, são consideradas os principais adulterantes do vinho em relação à origem do álcool no Brasil.

Considerando a adulteração com os álcoois apresentados, e que, além disso, os métodos existentes para controle de adulteração com açúcar de beterraba não são eficientes para o controle do arroz, laranja e mandioca surgiu a necessidade de estudar um método para atender essa demanda de controle de autenticidade. O nosso estudo apresentou um método eficiente para identificação dos álcoois de diferentes matérias-primas, utilizando a técnica de isótopos estáveis por espectrometria de massa de razão isotópica.

No **capítulo I** foi caracterizada a relação isotópica de  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  por espectrometria de massas de razão isotópica, para identificar a origem de etanol de

diferentes matérias-primas para controle de autenticidade do vinho. Para realizar a caracterização dos isótopos foram elaborados, em laboratório, vinhos das variedades Bordô, Isabel, Niágara Branca, Chardonnay, Moscato Branco, Merlot e Cabernet Sauvignon e também bebidas fermentadas de laranja, maçã, melancia, jabuticaba, caqui e mirtilo. Após destiladas as amostras e separado o álcool, os isótopos de  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  foram determinados. Como resultado o isótopo de  $\delta^2\text{H}$  foi eficiente na separação dos álcoois, apresentando diferença significativa em todas as matérias-primas avaliadas quando comparadas ao vinho, com exceção somente para o álcool de laranja, os quais não se separaram do vinho através do  $\delta^2\text{H}$ . O  $\delta^{13}\text{C}$  é menos eficiente na diferenciação, mas constitui uma característica importante da planta, em função disso foi mantido em nosso estudo.

O método aplicado no **capítulo I** permitiu determinar as razões isotópicas do  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  em vinhos e em álcoois de frutas, sendo pela primeira vez identificados e descritos estes valores isotópicos para melancia e jabuticaba. Neste capítulo, também foi observado que, tanto o  $\delta^2\text{H}$  como o  $\delta^{18}\text{O}$  apresentam uma resposta diretamente proporcional à concentração do álcool adicionado ao vinho, possibilitando a quantificação do álcool adicionado. Desta forma, o método demonstrou que é possível controlar a adulteração com álcoois utilizando a espectrometria de massas de razão isotópica, atendendo uma demanda de controle que até a momento não havia metodologia.

No **capítulo II** foram estudados outros três potenciais adulterantes em vinhos, o arroz, a mandioca e a batata doce, sendo pela primeira vez identificados e descritos os valores isotópicos para mandioca. O método aplicado também permitiu identificar as razões isotópicas do  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  em vinhos e em álcoois de arroz, mandioca e batata doce. No capítulo II, também foi observado que, tanto o  $\delta^2\text{H}$  como o  $\delta^{18}\text{O}$  apresentam

uma resposta diretamente proporcional à concentração do álcool de arroz e batata doce quando adicionados ao vinho, possibilitando a quantificação do álcool adicionado. Desta forma, o método demonstrou que é possível diferenciar as fontes de álcool, podendo ser utilizado para controle de autenticidade em vinhos.

Considerando a eficiência do método para separação dos álcoois citados anteriormente, no **capítulo III** foi avaliado o sistema de destilação para separar o álcool das amostras. O sistema de destilação utilizado para separar os álcoois no capítulo I e II é específico para evitar o fracionamento isotópico. Esse sistema, sugerido como método oficial pela OIV, é um sistema de valor elevado quando comparado com outros sistemas de destilação. Como forma de otimizar a destilação, e por consequência, o preparo de amostras para as determinações isotópicas, o método oficial que utiliza colunas de banda rotativa foi comparado com um segundo sistema de destilação criogênica, desenvolvido no Brasil. O sistema de destilação criogênica necessita somente 1,5 mL de amostra, enquanto, o método oficial utiliza em média 300 mL. Além disso, o processo de destilação criogênica ocorre em somente uma hora, uma redução de 2 h quando comparado ao método oficial, o qual necessita de aproximadamente 4 h para concluir a destilação.

O sistema de destilação criogênico apresentou-se eficiente para a determinação do  $\delta^{13}\text{C}$  em relação ao método de colunas rotativas. Os valores do erro relativo e do Z-score foram considerados satisfatórios conforme determinação dos órgãos reguladores, demonstrando que a destilação criogênica é equivalente ao método oficial para a determinação de carbono.

A mesma eficiência não se confirmou para as determinações de  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$ , visto que, foi observado que há uma grande diferença entre os valores obtidos pelo sistema criogênico em relação ao de colunas rotativas tanto para o  $\delta^2\text{H}$  como para o  $\delta^{18}\text{O}$ . Os valores obtidos para o sistema criogênico mostram que houve influência da água na

destilação. Para a determinação do  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  é necessário melhorar o sistema criogênico para remover a água de forma mais eficiente.

Ao final do estudo, como material complementar nos anexos, estão listadas as validações dos métodos das determinações de  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ . Nos estudos de validação dos métodos foram avaliados os procedimentos estabelecidos pelo Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2018) e pelo guia da Eurachem (Magnusson & Örnemark, 2014). Todos os parâmetros avaliados foram considerados satisfatórios, demonstrando que os métodos de determinação atendem os requisitos estabelecidos para aplicação de métodos analíticos.

De um modo geral, os resultados apresentados neste trabalho evidenciaram o potencial da aplicação da técnica dos isótopos estáveis para identificação de álcoois de diferentes matérias-primas, sendo determinados por espectrometria de massas de razão isotópica. Nosso estudo, permitiu desenvolver uma ferramenta para o controle de autenticidade dos vinhos, que até o momento não era possível para as matérias-primas avaliadas.

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

- O método estudado permitiu determinar as razões isotópicas do  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  em vinhos e em álcoois de frutas, raízes e cereais, sendo pela primeira vez identificados e descritos estes valores isotópicos para melancia, jabuticaba e mandioca.
- O isótopo de hidrogênio foi o mais eficiente para separação dos álcoois, seguido pelo oxigênio. O carbono apresenta variações muito pequenas e menos efetivas quando avaliado independentemente.
- Entre os isótopos estudados o hidrogênio do etanol permitiu a melhor separação entre as diferentes matérias-primas.
- O estudo demonstrou que, tanto o  $\delta^2\text{H}$  como o  $\delta^{18}\text{O}$  apresentam uma resposta diretamente proporcional à concentração do álcool adicionado ao vinho, possibilitando a quantificação do álcool adicionado, quando os valores isotópicos do material precursor são conhecidos.
- O sistema de destilação criogênica apresentou resultados efetivos para o isótopo do carbono, permitindo uma destilação mais rápida e com menor volume de amostra. Entretanto, para os valores de  $\delta^2\text{H}$  e  $\delta^{18}\text{O}$ , este sistema não demonstrou ser eficaz devido a influência da água no etanol extraído.

## 7. PERSPECTIVAS

- Aplicar o método estabelecido utilizando os isótopos de hidrogênio e oxigênio da molécula de etanol em bebidas comerciais para verificar a sua autenticidade;
- Avaliar o isótopo de nitrogênio, o qual os seus valores refletem a razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  do nitrogênio absorvido pela planta, para diferenciar as matérias-primas, as quais não foram possíveis separar com os isótopos de hidrogênio, oxigênio e carbono;
- Aplicar método utilizando os isótopos de hidrogênio e oxigênio da molécula de etanol com foco em outras bebidas, como por exemplo para controle de autenticidade do saquê que é uma bebida proveniente da fermentação do arroz;
- Avaliar o isótopo de carbono dos álcoois superiores encontrados no vinho como o metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e ainda o éster acetato de etila, de forma isolada para verificar a identidade isotópica do carbono de cada álcool separadamente;
- Melhorar o sistema de destilação criogênica, incluindo na sua estrutura de destilação mais uma etapa de separação, entre o balão contendo a amostra e o tubo de ensaio de coleta. Na proposta poderia ser adaptado uma tubulação para passagem da amostra, com um sistema que mantenha a temperatura da tubulação em 0 °C e a amostra de água seria separada do álcool por solidificação, através da diferença do ponto de fusão, visto que, a água solidifica em 0 °C e o álcool, por sua vez, solidifica em -114 °C. Nesta proposta, quando a mistura de água e álcool da amostra passar através da tubulação em temperaturas de 0 °C a água irá solidificar enquanto que o álcool não, continuando o seu trajeto através da ação do vácuo do sistema até o tubo de coleta do destilado.

## 8. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- ABE. Associação Brasileira de Enologia. (2017). **Disponível (online):** <http://www.enologia.org.br> (31 de outubro).
- Asquieri, E. R., Silva, A., & Cândido, M. (2009). Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 29(4): 896-904.
- Awri, T. A. (2015). Wine History. **Disponível (online):** <http://winehistory.com.au> (20 de junho).
- Batista, Â. M. (2016). Desenvolvimento do fermentado alcoólico do fruto goiaba branca (*Psidium guajava*) cv. Kumagai – Myrtaceae. **Dissertação de Mestrado**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Uberaba, Brasil
- Bonney, A. (2020). Even the sacramental cup was not exempt from adulteration” – the hazards of drinking an old bottle of claret. **Disponível (online):** <https://review.gale.co> (31 de outubro).
- Boutton, T. (1996). **Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicator for vegetation and climate change**. In Boutton, T.W; Yamasaki, S. (Ed.) *Mass Spectrometry of soils*, 1ed. pp. 47-82.
- Brasil. (1988). Lei 7678 de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. **Disponível (online):** <http://www.agricultura.gov.br> (20 de janeiro).
- BRASIL. (2009). Instrução Normativa nº 16 - Regulamento Técnico do Arroz . **Disponível (online):** <http://www.agricultura.gov.br> (25 de janeiro).
- Brasil. (2014). Decreto 8198 de 20 de fevereiro de 2014. Regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. **Disponível (online):** <http://www.agricultura.gov.br> (10 de fevereiro).
- Brasil. (2018). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 9348 de 17 de abril de 2018. Altera o Decreto 8198 de 20 de fevereiro de 2014. **Disponível (online):** <http://www.agricultura.gov.br> (05 de março).
- Bräutigam, A., & Gowik, U. (2016). Photorespiration connects C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> photosynthesis. **J. Exp. Bot.** 67(10): 2953-2962.
- Bringhenti, L. (2004). Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, Brasil.
- Brooks, R., Buchmann, N., Phillips, S., Ehleringer, B., Evans, D., Lott, M., Ehleringer, J. (2002). Heavy and light beer: a carbon isotope approach to detect C<sub>4</sub> carbon in beers of different origins, styles and prices. **J. Agric. Food Cehm.** 50: 6413-6418.

- Buchmann, N. & Ehleringer, J. (1998). Co<sub>2</sub> concentration profile and carbon and oxygen isotope in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> crop canopies. **Agric. For. Meteorol.** 89:45-58.
- Cabello, C. (2007). Matérias primas amiláceas para fins energéticos. In: V Workshop sobre tecnologias em agroindústrias de tuberosas tropicais. **Anais**. Pp. 02-06. Botucatu: 2007. p. 02-06. Botucatu, 2007.
- Calderone, G., & Guillou, C. (2008). Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages. **Food Chem.**, 106:1399-1405.
- Camacho, I. (2009). Caracterização dos resíduos do processamento de mandioca para produção de bioetanol e sua utilização na alimentação de aves. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita. Botucatu, Brasil.
- Carvalho, L., Souza, A., Provesi, J., & Veeck, A. (2020). Elaboração e caracterização de bebida fermentada alcoólica de caqui (*Diospyros kaki L.*) cv *Fuyu*. **Monografia**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina. Lajes, Brasil.
- Castro, E., Vieira, N., Rabelo, R. R. & Silva, S. A. (1999). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Acesso em 20 de Junho de 2017, **Disponível (online)**: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br> (15 de julho)
- Caxito, F. A., & Silva, A. (2015). Isótopos estáveis: fundamentos e técnicas aplicadas à caracterização e proveniência geográfica de produtos alimentícios. **Genomos.**, 23(1):10-17.
- Chicherchio, C. (2013). *Mandioca e Principais Derivados*. **Disponível (online)**: <http://www.conab.gov.br> (10 agosto)
- Christoph, N., Hermann, A., & Wachter, H. (2015). 25 Years authentication of wine with stable isotope analysis in the European Unios - Review and outlook. **Bio Web Conf.** 5:1-8.
- Colman, T. (2008). Wine politics: how governments, environmentalists, mobsters, and critics influence the wines we drink. Los Angeles: University of California Press, 206p.
- Coplen, B.T.(2011). Guidelines and recommended terms for expressions of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 25:2538-2560.
- Costa, D. F. (2015). Desenvolvimento de bebidas fermentadas a partir de subprodutos da indústria da castanha. **Dissertação de mestrado**. Engenharia Alimentar, Universidade de Lisboa, Portugal.
- Costinel, D., Tudorache, A., Ionete, R., & Vremera, R. (2011). The impact of grape varieties to wine isotopic characterization. **Anal. Lett.** 44:2856-2864.

- Coutinho, L., Coutinho Filho, U., & Caliar, M. (2017). Estudo comparati; vo do processo fermentativo entre polpa de mirtilo e casca de mirtilo. In 10º Encontro Nacional de Tecnologia Química. **Resumo**. Rio de Janeiro, 2017.
- Craig, H. (1961). Isotopic variations in meteoric waters. **Science**, 133:1702-1703.
- Day, L., & McSweeney, P. L. (2016). **Beverages**. In. Smithers, G. W. (Ed.). **Food science**. Elsevier. pp. 1-5
- Dias, D. R., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2017). **Methods of evaluation of fruit wines**. In: Kosseva, M. R.; Joshi, V. K., & Panesar, P. S. **Science and Technology of Fruit Wine Production** San Diego: Elsevier, 756p.
- Dias, R. d., & Rezende, G. (2010). Sistemas de Produção de Melancia. **Disponível (online)**: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br> (15 de março).
- Ducatti, C., Vanderlinde, R., Guerra, C., Carnevalli, W. T., Llorca, R. F., & Bonassi, J. A. (2003). Isotopic analysis (delta per mil 13C) of wines and distillates by cryogenic distillation. In: IX Congresso Latinoamericano de Viticultura y Enología. **Resumos** Santiago, Chile.
- Dutra, S. V., Adami, L., Marcon, A. R., Carnieli, G. J., Roani, C. A., Spinelli, F. R., . . . Vanderlinde, R. (2011). Determination of the geographical origin of Brazilian wines by isotope and mineral analysis. **Anal. Bioanal. Chem.** 401:1571-1576.
- Edagi, F. K., & Kluge, R. A. (2009). Remoção de adstringência de caqui: um enfoque bioquímico, fisiológico e tecnológico. **Cienc. Rura**. 39(2): 585-594.
- Estreicher, S. K. (2006). **Wine: from Neolithic times to the 21st century**. New York: Algora. 200p.
- Fagundes, D., Silveira, M., Santos, C., Sautter, C., & Penna, N. (2015). Fermentado alcoólico de fruta: Uma Revisão. In: 5º Simpósio de Segurança Alimentar. Resumo. p 5. Bento Gonçalves, 2015.
- FAO/WHO. (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Disponível (online)**: <http://www.fao.org>: <http://www.fao.org> (05 de maio).
- FAO/WHO. (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Codex Alimentarius Commission. **Disponível (online)**: <http://www.codexalimentarius.org> (05 de maio).
- Fernandes, L., & Silva, B. (2018). Alimento funcional: propriedades da jabuticaba. **Rev. Farol**. 6(6): 49-60.
- Ferreira Filho, J. (1997). Efeito da adubação orgânica e densidade populacional na cultura da mandioca em solo de tabuleiro. **Rev. Bras. Mand.** 16:7-14.
- Ferreira, A.I.J.V, (2008). Espectrometria de Massas de Razões Isotópicas. **Tese de Doutorado**. Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa, Portugal.

- Fish, W., Bruton, B., & Russo, V. (2009). Watermelon juice: a promising feedstock supplement, diluent, and nitrogen supplement for ethanol biofuel production. **Biotechnol. Biofuels**. 26:2-18.
- Furlaneto, F., & Bertani, R. (2015). Revista Campo e Negócio. Melancia do Brasil para o mundo. **Disponível (online):** <http://www.revistacampoenegocios.com.br> (03 de março)
- Gilbert, A., Yamada, K., & Yoshida, N. (2013). Accurate method for the determination of intramolecular  $^{13}\text{C}$  isotope composition of ethanol from aqueous solutions. **Anal. Chem.** 85:6566-6570.
- Gomes, C. (2016). Mandioca Pernambuco. **Disponível (online):** <http://www.conab.gov.br> (05 de setembro).
- Grigoras, C., Destandau, E., Fougere, L., & Elfakir, C. (2013). Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. **Ind. Crop. Prod.** 49:794-804.
- Groxko, M. (2016). Análise da Conjuntura Agropecuária - Mandioca 2014/2015. **Disponível (online):** <http://www.agricultura.pr.gov.br> (15 de setembro).
- Guillou, C., & Reniero, F. (2001). Isotope methods for the control of food products and beverages. **International Atomic Energy Agency**. 4:39-53.
- Hoefs, J. (2018). **Stable Isotope Geochemistry** (8<sup>o</sup> ed.). Göttingen: Springer Science & Business Media. 464p.
- IBGE. (2016). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. **Disponível (online):** <http://www.ibge.gov.br> (05 de maio).
- IBGE. (2017). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Disponível (online):** <http://www.ibge.gov.br> (05 de maio).
- IBRAVIN. (2019). Cadastro Vinícola - Elaboração de Vinhos e Derivados no Rio Grande do Sul - 2006 a 2019. **Disponível (online):** <http://www.ibravin.org.br> (05 de maio).
- Jesus, T. (2013). O Mirtilo e suas Propriedades Terapêuticas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, Portugal.
- Johnson, C.A., Stricker, C.A., Gulbransen, C.A., and Emmons, M.P. (2018). **Determination of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ , or  $\delta^{34}\text{S}$  by isotope-ratio-monitoring mass spectrometry using an elemental analyzer: U.S. Geological Survey Techniques and Methods**. (5<sup>o</sup> ed.). Virginia: USGS. 19 p.
- Kelly, S., Brodie, C., & Hilk, A. (2018). **Isotopic-Spectroscopic Technique: Stable Isotope-Ratio Mass Spectrometry (IRMS)**. In Sun D.W. **Modern Techniques for Food Authentication** 2<sup>o</sup> ed. Dublin: Academic Press. 2018. 805p.
- Leão, P. C. (2010). Breve histórico da vitivinicultura e a sua evolução na região semiárida brasileira. **Disponível (online):** <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br> (15 de março).

- Leonardelli, S. (2015). Determinação do  $\delta^{13}C$  para avaliar a origem do  $CO_2$  de vinhos espumantes. **Dissertação de mestrado**. Engenharia de Alimentos, Universidade de Caxias do Sul, Brasil.
- Lindsey, A. (2011). On Reserve. Domitian's Vine Edict: The Story of the First Wine Law: **Disponível (online)**: <http://www.winelawonreserve.com> (15 de março).
- Lopes, P., Oliveira, I., Oliveira, J., & Assis, J. (2014). Cultivo do Caquizeiro no Vale do São Francisco. **Disponível (online)**: <https://www.embrapa.br> (05 de novembro).
- Magdas, D., Cristea, G., Puscas, R., & Tusa, F. (2014). The use of isotope ratios in commercial fruit juices authentication. **Rom. Journ. Phys.** 59(3-4): 355-359.
- Magyar, M., Sousa, L. C., Jin, M., Sarks, C., & Balan, V. (2016). Conversion of apple pomace waste to ethanol at industrial relevant conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 100:7349-758.
- Martinelli, L. A.; Ometto, J. P. H. B.; Ferraz, E. S.; Victoria, R. L.; Camargo, P. B.; Moreira, M. Z. (2009). **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. São Paulo: Copyright, v.1, 144p.
- Matos, E. H. (2007). Cultivo da Laranja. **Disponível (online)**: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br> (15 de março).
- Mattos, P., Farias, A., & Filho, J. (2006). Mandioca. **Disponível (online)**: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br> (15 de março).
- Mounier, L. (2020). Fundamentals of Isotopic Ratios Mass Spectrometry. **Disponível (online)**: <https://www.thermofisher.com> (30 de outubro).
- Moussa, I., Naulet, N., Martin, M. L., & Martin, G. J. (1990). A Site-Specific and Multielement Approach to the Determination of Liquid-Vapor Isotope Fractionation Parameters. The Case of Alcohols. **J. Phys. Chem.** 94: 8303-8309.
- Munsie, J. (2002). A Brief History of the International Regulation of Wine Production: **Disponível (online)**: <https://dash.harvard.edu> (15 de março).
- Naik, S., Goud, V., Rout, P., & Dalai, A. (2010). Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 14:578-597.
- Neto, E., Cruz, J., Braga, A., & Souza, J. (2010). Elaboração de bebida fermentado de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). **Rev. Bras. Tecnol. Agroind.** 4(2): 186-197.
- Neves, M. F. (2012). *CITRUS* - Associação Nacional de Exportadores de Sucos Cítricos. **Disponível (online)**: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br> (15 de março).
- Noletto, F., Cordeiro, R., & Chaves, R. (2004). Utilização do farelo de arroz. **Disponível (online)**: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br> (15 de março).
- OIV. (2020). International Code of Oenological Practices. **Disponível (online)**: <http://www.oiv.int> (03 de setembro).

- OIV. (2020). State of the world vitivinicultural sector in 2019. **Disponível (online):** <http://www.oiv.int> (03 de setembro).
- Oka, H. I. **Origin of cultivated rice**. Tokyo: Elsevier, v. 14, 1988. 253 p.
- Oliveira, I. F. (2015) **Semiárido baiano: a dinâmica contraditória do desenvolvimento**. 1º. ed. São Paulo: Baraúna, 2015. 457p.
- Parker, I., Kelly, S., Sharman, M., Dennis, M., & Howie, D. (1998). Investigation into the use of carbon isotope ratios ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) of Scotch whisky congeners to establish brand authenticity using gas-chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Food Chem.* 63:423-428.
- Perini, M., & Camin, F. (2013).  $\delta^{18}\text{O}$  of ethanol in wine and spirits for authentication purposes. *J. Food Sci.* 78(6):839-844.
- Petri, J. L., & Leite, G. B. (2008). Macieira. *Rev. Bras. Frut.* 30(4):857-1166.
- Phillips, R. (2016). **French Wine: A History**. 1º ed. Oakland: University of California Press, 2016. 319p.
- Rocha, M. (2010). Sistemas de Cultivo para a Cultura da Melancia. **Dissertação de mestrado**. , Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, Brasil.
- Rossmann, A., Reniero, F., Moussa, I., Schimidt, H., Versini, G., & Merle, M. (1999). Stable oxygen isotope content of water of EU data-bank wines from Italy, France and Germany. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 208:400-407.
- Rudolph, H. McGovern, M. McGovern, P. Badler V. (1993). The first wine & beer chemical detection of ancient fermented beverages. *Anal. Chem.* 65(8): 408-413.
- Santos, L. Mota, P. Rebouças, S. Nascimento, M. & Santos, A. (2020). Produção e caracterização física e química do bioetanol a partir de resíduos de biomassa da banana *Musa acuminata*, laranja *Citrus sinensis* e maracujá *Passiflora edulis f. flavicarpa*. *Rev. Bras. Gestão Amb. Sustentab.*, 7(16), 525-535.
- Sobczak, A. (2014). Etanol de arroz poderá mudar o cenário dos biocombustível no Rio Grande do Sul. **Disponível (online):** <http://www.uagro.com.br> (03 de setembro).
- Souza, J., & Otsubo, A. A. (2002). Perspectivas e potencialidades de mercados para os derivados de Mandioca. In: Otsubo, A.A.; Mercante, F. M.; Martins, C. de S. **Aspectos do cultivo da mandioca em Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: Embrapa Agropecuária Oeste/UNIDERP, 2002. pp. 13-30.
- Tinker, B., Bhalla, G., Gale, M., Hibino, H., Plucknett, D., Paul, L., & Smith, R. (1998). FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Disponível (online):** <http://www.fao.org> (10 de novembro).
- Tiwari, M., Singh, A. K., & Sinha, D. K. (2015). **Chapter 3 - Stable Isotopes: Tools for Understanding Past Climatic Conditions and Their Applications in**

**Chemostratigraphy.** In: Ramkumar, M. (Ed.) **Chemostratigraphy: Concepts, Techniques, and Applications.** 1º ed. pp. 65-92).

USDA. (Maio de 2017). *United States Department of Agriculture.* **Disponível (online):** <https://apps.fas.usda.gov> (07 de junho)

Vendruscolo, F., Albuquerque, P., & Streit, F. (2008). Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. **Crit. Rev. Biotechnol.** 28:1-12.

Villas-Bôas, S., Esposito, E., & Mendosca, M. (2003). Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus*. **World J. Microb. Biot.** 19:461-467.

## 9. ANEXOS

A validação dos métodos foram realizadas seguindo os procedimentos definidos no Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2018) e no guia da Eurachem (Magnusson & Örnemark, 2014).

### 9.1 ANEXO A – Validação do método de determinação do hidrogênio

Os parâmetros avaliados para determinação de hidrogênio, por espectrometria de massas de razão isotópica acoplada a um conversor térmico e analisador elementar (TC/EA), podem ser observados na Tabela 01 apresentada abaixo:

Tabela 01: Parâmetros da validação do método de determinação de hidrogênio.

| <b>Parâmetros</b>                  | <b>Resultados</b> | <b>Critério de Aceitação</b> |
|------------------------------------|-------------------|------------------------------|
| Linearidade (R)                    | 0,99              | $\geq 0,90$                  |
| Faixa de trabalho (%)              | 0 - 100           | -                            |
| Precisão (%)                       | 0.49%             | Inferior a 1,3 %             |
| Precisão Intermediária (‰)         | 2.63              | -                            |
| Limite de Detecção (‰)             | 1.59              | -                            |
| Limite de Quantificação (‰)        | 6.9               | -                            |
| Exatidão (Z-score)                 | 0.36              | $-2 < Z < +2$                |
| Recuperação (%)                    | 99.5              | 98 - 102 %                   |
| Incerteza de Medição do Método (‰) | 3,92              |                              |

Os parâmetros avaliados foram considerados satisfatórios de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos nos guias de validação utilizados para avaliar o método.

Além dos parâmetros citados, a robustez do método também foi verificada, conforme pode ser observado na Tabela 02:

Tabela 02: Resultados da robustez do método de determinação de hidrogênio ( $^2\text{H}$ ), resultados expressos em  $\delta^2\text{H}$  (‰).

| Parâmetro                               | Condição          | Média $\pm$ DP                  |
|-----------------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| Cálculo do resultado final              | Interpolação      | 0.0007 <sup>a</sup> $\pm$ 1,04  |
|                                         | Fator de Correção | 0.0000 <sup>a</sup> $\pm$ 1,00  |
| Temperatura da coluna de separação (°C) | 80                | 0,54 <sup>a</sup> $\pm$ 0,90    |
|                                         | 90                | 0,00 <sup>a</sup> $\pm$ 1,00    |
| Temperatura do reator de pirólise (°C)  | 1450              | -187,96 <sup>a</sup> $\pm$ 1,73 |
|                                         | 1430              | -189,01 <sup>a</sup> $\pm$ 1,85 |

\* Média  $\pm$  desvio padrão (DP) (n = 7). Média seguida de letras diferentes em cada categoria diferem significativamente através do teste de variância ANOVA complementada pelo Teste de Tukey (p < 0.05).

O método demonstrou-se robusto, não apresentando diferença nos resultados quando submetido a pequenas variações nas condições estabelecidas.

## 9.2 ANEXO B – Validação do método de determinação do oxigênio por pirólise

Os parâmetros avaliados para determinação do oxigênio através da pirólise da amostra, por espectrometria de massas de razão isotópica acoplada a um conversor térmico e analisador elementar (TC/EA), podem ser observados na Tabela 01 apresentada abaixo:

Tabela 01: Parâmetros da validação do método de determinação de oxigênio por pirólise.

| <b>Parâmetros</b>                  | <b>Resultados</b> | <b>Critério de Aceitação</b> |
|------------------------------------|-------------------|------------------------------|
| Linearidade (R)                    | 0,97              | $\geq 0,90$                  |
| Faixa de trabalho (%)              | 0 - 100           | -                            |
| Precisão (%)                       | 0.55              | Inferior a 1,3 %             |
| Precisão Intermediária (‰)         | 0.37              | -                            |
| Limite de Detecção (‰)             | 0.35              | -                            |
| Limite de Quantificação (‰)        | 1.50              | -                            |
| Exatidão (Z-score) padrão GISP     | 0.26              | $-2 < Z < +2$                |
| Recuperação (%)                    | 100.9             | 98 - 102 %                   |
| Incerteza de Medição do Método (‰) | 0.65              | -                            |

Os parâmetros avaliados foram considerados satisfatórios de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos nos guias de validação utilizados para avaliar o método.

Além dos parâmetros citados, a robustez do método também foi avaliada, conforme pode ser observado na Tabela 02:

Tabela 02: Resultados da robustez do método de determinação de oxigênio por pirólise ( $^{18}\text{O}$ ), resultados expressos em  $\delta^{18}\text{O}$  (‰).

| Parâmetro                                                 | Condição          | Média $\pm$ DP      |
|-----------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| Cálculo do resultado final                                | Interpolação      | $0.00^a \pm 0,15$   |
|                                                           | Fator de Correção | $0.03^a \pm 0,18$   |
| Temperatura da coluna de separação ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 80                | $-0,02^a \pm 0,14$  |
|                                                           | 90                | $0,00^a \pm 0,12$   |
| Temperatura do reator de pirólise ( $^{\circ}\text{C}$ )  | 1450              | $-55,50^a \pm 0,16$ |
|                                                           | 1430              | $-55,53^a \pm 0,11$ |

\* Média  $\pm$  desvio padrão (DP) (n = 7). Média seguida de letras diferentes em cada categoria diferem significativamente através do teste de variância ANOVA complementada pelo Teste de Tukey (p < 0.05).

O método demonstrou-se robusto, não apresentando diferença nos resultados quando submetido a pequenas variações nas condições estabelecidas.

### 9.3 ANEXO C – Validação do método de determinação do oxigênio por equilíbrio

Os parâmetros avaliados para determinação do oxigênio através de equilíbrio da molécula do CO<sub>2</sub> da amostra, por espectrometria de massas de razão isotópica acoplada a um cromatógrafo gasoso GasBench II (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) podem ser observados na Tabela 01 apresentada abaixo:

Tabela 01: Parâmetros da validação do método de determinação de oxigênio por equilíbrio.

| <b>Parâmetros</b>                  | <b>Resultados</b> | <b>Critério de Aceitação</b> |
|------------------------------------|-------------------|------------------------------|
| Linearidade (R)                    | 0,99              | $\geq 0,90$                  |
| Faixa de trabalho (%)              | 0 - 100           | -                            |
| Precisão (%)                       | 0,33              | Inferior a 1,3 %             |
| Precisão Intermediária (‰)         | 0,13              | -                            |
| Limite de Detecção (‰)             | 0,14              | -                            |
| Limite de Quantificação (‰)        | 0,43              | -                            |
| Exatidão (Z-score)                 | 1,42              | $-2 < Z < +2$                |
| Recuperação (%)                    | 99,0              | 98 - 102 %                   |
| Incerteza de Medição do Método (‰) | 0,55              | -                            |

Os parâmetros avaliados foram considerados satisfatórios de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos nos guias de validação utilizados para avaliar o método.

Além dos parâmetros citados, a robustez do método também foi avaliada, conforme pode ser observado na Tabela 02:

Tabela 02: Resultados da robustez do método de determinação de oxigênio por pirólise ( $^{18}\text{O}$ ), resultados expressos em  $\delta^{18}\text{O}$  (‰).

| Parâmetros Testados                                                  | Condição | Mean $\pm$ SD                  |
|----------------------------------------------------------------------|----------|--------------------------------|
| Temperatura do bloco de equilíbrio da amostra ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 24       | -1,23 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08  |
|                                                                      | 25       | -1,27 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06  |
|                                                                      | 26       | -1,39 <sup>b</sup> $\pm$ 0,08  |
| Volume de amostra para o equilíbrio ( $\mu\text{L}$ )                | 450      | -1,39 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03  |
|                                                                      | 500      | -1,30 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05  |
|                                                                      | 550      | -1,21 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03  |
| Tempo de equilíbrio da amostra (h)                                   | 24       | -1,27 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06  |
|                                                                      | 25       | -1,22 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08  |
|                                                                      | 26       | -1,12 <sup>b</sup> $\pm$ 0,02  |
|                                                                      | 27       | -1,22 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07  |
|                                                                      | 28       | -1,20 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,04 |
|                                                                      | 29       | -1,14 <sup>b</sup> $\pm$ 0,05  |
|                                                                      | 30       | -1,18 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,03 |

\* Média  $\pm$  desvio padrão (DP) (n = 7). Média seguida de letras diferentes em cada categoria diferem significativamente através do teste de variância ANOVA complementada pelo Teste de Tukey (p < 0.05).

O método demonstrou que é sensível a mudança de alguns aspectos, como a temperatura do bloco de armazenamento da amostra para o equilíbrio e o tempo do referido equilíbrio. É importante ressaltar que, neste caso deve ser respeitadas as configurações de temperatura e tempo estabelecidos no método oficial OIV-MA-AS2-12 (OIV, 2019), o qual define uma temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e 24 horas de equilíbrio. Além disso, o controlador de temperatura do bloco de aquecimento deve ser calibrado periodicamente, assim como, deve ser realizado o teste de homogeneidade da temperatura do bloco, assegurando que independentemente da posição da amostra no bloco a temperatura mantenha-se correta e constante.

#### 9.4 ANEXO D – Validação do método de determinação do carbono

Os parâmetros avaliados para determinação do carbono, por espectrometria de massas de razão isotópica acoplada a um analisador elementar Flash EA 1112 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) podem ser observados na Tabela 01 apresentada abaixo:

Tabela 01: Parâmetros da validação do método de determinação de oxigênio por equilíbrio.

| <b>Parâmetros</b>                  | <b>Resultados</b> | <b>Critério de Aceitação</b> |
|------------------------------------|-------------------|------------------------------|
| Linearidade (R)                    | 0,98              | $\geq 0,90$                  |
| Faixa de trabalho (%)              | 0 - 100           | -                            |
| Precisão (%)                       | 0,75              | Inferior a 1,3 %             |
| Precisão Intermediária (‰)         | 0,11              | -                            |
| Limite de Detecção (%)             | 3                 | -                            |
| Limite de Quantificação (%)        | 10                | -                            |
| Exatidão (Z-score)                 | 0,00              | $-2 < Z < +2$                |
| Recuperação (%)                    | 100,0             | 98 - 102 %                   |
| Incerteza de Medição do Método (‰) | 0,51              | -                            |

Os parâmetros avaliados foram considerados satisfatórios de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos nos guias de validação utilizados para avaliar o método.

Além dos parâmetros citados, a robustez do método também foi avaliada, conforme pode ser observado na Tabela 02:

Tabela 02: Resultados da robustez do método de determinação de oxigênio por pirólise ( $^{18}\text{O}$ ), resultados expressos em  $\delta^{18}\text{O}$  (‰).

| Parâmetros Testados                                        | Condição     | Mean $\pm$ SD                  |
|------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------|
| Volume de injeção da amostra ( $\mu\text{L}$ )<br>(n = 21) | 1            | -14,27 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07 |
|                                                            | 2            | -14,16 <sup>b</sup> $\pm$ 0,07 |
|                                                            | 3            | -14,07 <sup>c</sup> $\pm$ 0,08 |
| Tipo de amostrador<br>(n = 7)                              | Sólido       | -23,34 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19 |
|                                                            | Líquido      | -23,36 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10 |
| Ponteiras<br>(n = 21)                                      | Novas        | -29,23 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07 |
|                                                            | Reutilizadas | -29,25 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06 |
| Frascos<br>(n = 21)                                        | Novas        | -14,15 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06 |
|                                                            | Higienizados | -14,16 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07 |

\* Média  $\pm$  desvio padrão (DP). Média seguida de letras diferentes em cada categoria diferem significativamente através do teste de variância ANOVA complementada pelo Teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

O método demonstrou que é sensível a mudança do volume de injeção para determinação, neste caso, é importante considerar o volume de injeção que foi realizada a calibração do sistema. Além disso, também deve ser considerado o volume que apresenta uma intensidade de sinal próximo da configuração de intensidade do gás de referência.