

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Departamento de Química Fundamental

Programa de Pós-Graduação em Química

Marcelo Farias de Andrade

Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos  
para a determinação de polifenóis totais e  
elementos minerais em vinhos

Tese de Doutorado

Recife

2014

*Marcelo Farias de Andrade*

Técnico em Química (2000)

Bacharel em Química (2006)

Mestre em Química Analítica (2008)

Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos  
para a determinação de polifenóis totais e elementos  
minerais em vinhos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química do Departamento de Química Fundamental da  
Universidade Federal de Pernambuco como parte  
integrante do requisito para obtenção do título de doutor  
em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Ana Paula Silveira Paim.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Luisa Cervera Sanz.

Recife

2014

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Andrade, Marcelo Farias de.

Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos para determinação de polifenóis totais e elementos minerais em vinhos / Marcelo Farias de Andrade. – Recife: O Autor, 2014.

161 f.: fig., tab.

Orientadora: Ana Paula Silveira Paim.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2014.  
Inclui referências e apêndices.

1. Química analítica . 2. Vinho. 3. Espectroscopia de emissão atômica. I. Paim, Ana Paula Silveira (orientadora). II. Título.

543

(22. ed.)

FQ 2014-33

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada:

---

**Profa. Ana Paula Silveira Paim (Orientadora)**  
Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Profa. Maria Fernanda Pimentel Avelar**  
Departamento de Engenharia Química  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof. Ricardo Saldanha Honorato**  
Departamento da Polícia Federal  
Superintendência Regional de Pernambuco

---

**Profa. Clésia Cristina Nascentes**  
Departamento de Química  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

**Prof. Edvan Cirino da Silva**  
Departamento de Química  
Universidade Federal da Paraíba

## **Determinação do Polifenóis Totais e Elementos Minerais em Vinhos**

*Por*

**Marcelo Farias de Andrade**

Departamento de Química Fundamental  
Centro de ciências exatas e da natureza  
Universidade Federal de Pernambuco

Recife-PE- Brasil  
27 de Janeiro de 2014

## ***Agradecimentos***

Mãe só tem uma, e eu não troco a minha. Assim, obrigado tia Ana, obrigado pelas oportunidades, obrigado pela chance de descobrir minha vocação;

Para se chegar a uma tese, deve haver uma graduação. Se cheguei até aqui, agradeço a Aldo Bueno, Arnóbio Gama, Ricardo Longo, Joachim Demnitz, Rajendra Mohan Srivastava, Ricardo Honorato e Wagner Faustino;

A Maurílio, Patrícia e Carlos, pelas ajudas com os perrengues da burocracia e também ao Sr. Wellington, por não deixar o DQF parar (pelo menos não no meu tempo);

Aos membros do LIAAQ, Fabíola, Sueny, Joilton, Marília, Luciana, Waleska, Valeu. Diego e Suelle, obrigado;

Pelas oportunidades de aprendizado, Ivo Raimundo, Célio Pasquini, Fernanda Pimentel. Muito Obrigado;

Pela receptividade em Campinas, obrigado a Heron e Thiago;

Ao PROFESSOR Boa, pai, avô, amigo. E aos companheiros de estudo (e farrinhas) Tuanne, Alessandra, Andrea, Carla, Lidiane, Jeová, Mário, Milton, Vitória e a portuguesinha Sofia, acolhedora e amiga, sou grato;

A los maestros Ángel Morales, Salvador Garrigues (Boro), Agustín Pastor, Marisa Cervera y Miguel de La Guardia, muchas gracias por las contribuciones, académicas y personales;

A los estudiantes Ana, Alba, Isabel, Júlia, Mercê, Manuela, Luis, David y Daniel; a los brasileños en España Luís Gustavo (gràcies per Eivissa), Ricardo Honorato (Gràcies per haver-me permès complir un dels meus somnis en Alacant) y Flávia Borba (Gràcies per aguantar-m'en l'apartament); a la rusa/alemana Uliana Beser (Vielen Dank für Ihre Anregungen und Ihre Unterstützung); al italiano Gianni Gallelo (Grazie per il vostro sostegno e insegnamenti) y a la española Diana Pueyo Estelles, muchas gracias por todo.

Mesmo fora da UFPE, mas de importância para minha continuação do doutorado, agradeço também às contribuições de Elisabete Menezes, Bruno Parente, Paulo Roberto David e Ialy Barros (no Lanagro-MAPA) e a Sueny Freitas, Sófacles Figueredo, Riva Guedes, Vanessa Gomes e, em especial, a Gardênia Marinho. Obrigado pela força.

Agradeço também a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram com o andamento desta tese e com a manutenção de minha saúde mental – mas, devido à pressa na escrita, não me permitiu recordar seus nomes. DESCULPEM-ME.

Da mesma forma, e não menos importante, agradeço a todos aqueles que não atrapalharam o andamento da mesma.

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo fornecimento das bolsas de estudo que me permitiram realizar este doutorado, bem como a ida à Espanha, em meu estágio sanduíche.

Por último, obrigado Joyce. Obrigado pela força, obrigado pelo incentivo, pelos carinhos, pelos aperseios, pelas broncas, pelos foras (infelizmente eles vêm de brinde e acompanham o pacote, né?...). Enfim, só terminei graças a você.

Obrigado.

Sem mais,

UFA!

*Nunca tenha medo de tentar algo novo.  
Lembre-se, amadores construíram a arca,  
profissionais construíram o Titanic.  
(autor desconhecido)*

## **Resumo**

O vinho é constituído por sais minerais, vitaminas, polifenóis e diversos outros nutrientes que o faz ser uma bebida benéfica à saúde. De acordo com as técnicas de vinificação empregadas, bem como as peculiaridades inerentes ao ambiente de plantio, o vinho pode adquirir características que o tornem único daquela região, tornando-o capaz de receber uma Denominação de Origem (D.O.). Objetivando-se caracterizar e fornecer dados para se contribuir com a D.O. foram desenvolvidos métodos de análise espectroanalíticas para determinação de polifenóis totais e minerais, os quais foram aplicados em amostras de Vinhos do Vale do São Francisco (VSF) e de outras regiões para efeito de comparação. No primeiro capítulo, foi desenvolvida uma metodologia de análise em fluxo com minibombas solenóide, com o intuito de caracterizar vinhos com relação ao seu teor de polifenóis totais. Para tanto, se oxida os compostos polifenólicos nas amostras com o uso de hipoclorito proveniente de água sanitária comercial e, posteriormente, detecta-se a quimiluminescência gerada pela reação entre luminol e o excesso de hipoclorito, por meio de um luminômetro *lab-made*. Após a otimização de variáveis e validação da metodologia proposta, o método foi aplicado a 16 amostras de vinhos comerciais elaborados no Vale do São Francisco, Rio Grande do Sul e do Chile. A Análise da Variância realizada nestes dados demonstrou a diferença significativa entre os valores obtidos, com os vinhos do VSF possuindo os maiores teores, permitindo-se inferir que os vinhos provenientes do Vale são distintos dos demais analisados – no que tange ao teor de polifenóis totais. No segundo capítulo, desenvolveu-se uma metodologia utilizando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e introdução de amostras por nebulizador ultrassônico (USN) para se determinar elementos minerais nos vinhos brasileiros (do VSF) e espanhóis. Realizou-se uma avaliação multivariada dos principais fatores que poderiam influenciar a resposta analítica por meio de um planejamento fatorial de dois níveis ( $2^4$ ), selecionando-os as melhores condições dos parâmetros estudados. Uma análise estatística descritiva eliminou os valores obtidos que se apresentaram como *anômalas* e, após um autoescalamento dos dados, a Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada com o intuito de se verificar tendência de agrupamento entre as amostras. Observou-se uma separação entre os vinhos da Espanha e do Brasil e, em relação aos vinhos do VSF, apenas uma tendência de separação entre comerciais e experimentais. Entre os vinhos tintos do VSF houve um grande espalhamento, não sendo possível agrupá-los.

Palavras-chave: Vinho. Vale São Francisco. Análise em fluxo. USN ICP OES. Quimiometria.

## ***Abstract***

Wine is composed by minerals, vitamins, polyphenols and other nutrients which a beverage is to be beneficial to health. According to the winemaking techniques employed as well as the peculiarities inherent to the planting environment, wine can acquire unique features that make this region, a Denomination of Origin (D.O.). Aiming to characterize and provide data to contribute to the D.O., in this thesis were developed spectroanalytical methods for wines analysis of the São Francisco Valley (VSF) and also applied to wines from other regions, for comparison. In the first chapter, a flow analysis methodology was developed with solenoid mini-pumps in order to characterize wines with respect to their total polyphenols content. Thus, it oxidizes the polyphenolic compounds in the samples with the use of hypochlorite from commercial bleach and subsequently to detect chemiluminescence generated by the reaction between luminol and excess unreacted of hypochlorite by means of a lab-made luminometer, constructed for this purpose. After an optimization variables and validation of the proposed methodology, the method was applied to 16 samples of commercial wines from the São Francisco Valley, Rio Grande do Sul and Chile. Analysis of variance performed on these data showed a significant difference between the values obtained, with the wines of VSF possessing the highest levels, allowing infer that the wines from the Valley are distinct from the others analyzed – with regard to the total polyphenol. In the second chapter developed a methodology with inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and introduction of samples by ultrasonic nebulizer to determine mineral elements in wines of VSF and also Spanish wines - for comparison. Were performed a multivariate assessment of the main factors that influencing the analytical response through a two-level factorial design ( $2^4$ ), selecting the best value in its studied and subsequently validated the methodology, indicated by their figures of merit. A descriptive statistical analysis eliminated the values that appeared as outliers and, after a auto-scale data, the Principal Component Analysis (PCA) was applied in order to verify a trend of clustering among the samples. There was a separation between wines from Spain and Brazil, and for wines from VSF, a separation between commercials and experimentals red wines, and also a large spread among the red wines was observed.

Keyword: Wine. São Francisco Valley. Flow Analysis. USN ICP OES. Chemometric

## ***Lista de figuras***

Figura 1: Divisão dos principais grupos polifenólicos. ....	24
Figura 2: Estrutura básica dos flavonóides. A e B: anéis benzênicos e C: anel heterocíclico. ....	25
Figura 3: Esquema simplificado da oxidação de polifenóis. ....	25
Figura 4: Subdivisões da luminescência. ....	31
Figura 5: Esquema simplificado da oxidação do luminol. ....	33
Figura 6: Reações propostas para o sistema em estudo. (a) Oxidação dos polifenóis, expressos como ácido gálico e (b) oxidação do luminol pelo excesso de hipoclorito, em meio alcalino. ....	34
Figura 7: Cella de fluxo utilizada neste trabalho (a) vista superior e (b) vista lateral, mostrando a posição do detector, indicado em azul, os parafusos de sustentação, em vermelho, e o sentido do fluxo (unidades em mm). ....	40
Figura 8: Descrição do circuito eletrônico do luminômetro: A = Amplificador Operacional OP07; Dx = Diodos Zener; Cx = Capacitores; Rx = Resistores; S <sub>0</sub> = Saída do sinal para PCL 711 (em mV). ....	41
Figura 9: Fontes de alimentação para o acionamento (a) das minibombas e (b) para o luminômetro. LM337 e LM317 = Reguladores ajustáveis de voltagem para negativo e positivo, respectivamente, E = entrada, S = saída, A = Ajuste, Dx = Diodos zener, C = capacitor, Rx = resistores. ....	42
Figura 10: Interface eletrônica baseada no CI ULN2803 para controle das minibombas solenóide (Vx) através da porta serial (DB25). ....	42
Figura 11: Diagrama esquemático do sistema utilizado na análise em fluxo. Am = Amostra ou solução de referência; C = Solução transportadora (H <sub>2</sub> O); R1 = Solução de hipoclorito; R2 = Solução de luminol; B = Reator PTFE, 0,8 mm d.i., 40 cm; Det = Detector (luminômetro); D = descarte; P1 e P2 (8 µL), P3 e P4 (12 µL) = minibombas solenóide; Posições ON e OFF representam as minibombas ligada e desligada, respectivamente. ....	43
Figura 12: Ruído instrumental observado com a utilização de água em todas as minibombas e sua ampliação de escala (a) e repetibilidade do método, demonstrada pela análise do branco analítico (b). ....	50
Figura 13: Estudo do ruído devido à reação entre ácido gálico e luminol. Valores válidos também para a reação entre ácido gálico e hipoclorito no sistema em estudo. ....	51

Figura 14: Estudo da estabilidade da solução de hipoclorito em diferentes datas e concentrações de preparo. sbr: sinal do branco; a: coeficientes angular; r: coeficiente de correlação.....	52
Figura 15: Estabilidade da solução de luminol 3,6 mmol L <sup>-1</sup> em função de seu envelhecimento. sbr: sinal do branco; a: coeficientes angular; r: coeficiente de correlação.....	53
Figura 16: Efeito da proporção de pulsos entre solução de amostra/padrão e solução de hipoclorito.....	54
Figura 17: Resposta de Sinal do Branco (Sbr) da curva analítica em função da variação do pH da solução do luminol.....	55
Figura 18: Respostas relativas de Sinal do Branco (SBr); coeficiente de correlação (r) e coeficiente angular (a) da curva analítica em função da variação da concentração da solução do hipoclorito.....	56
Figura 19: Respostas relativas de Sinal do Branco (Sbr), coeficiente de correlação (r) e angular (a) da curva analítica em função da variação da concentração do luminol.....	57
Figura 20: Respostas relativas de Sinal do Branco (Sbr), coeficiente de correlação (r) e angular (a) da curva analítica em função da variação do meio solvente do hipoclorito.....	58
Figura 21: Respostas relativas de Sinal do Branco (Sbr), coeficiente de correlação (r) e angular (a) da curva analítica em função da variação do número de pulsos.....	59
Figura 22: Gráfico das respostas relativas de Sinal do Branco (SBr), coeficiente de correlação (r) e angular (a) da curva analítica em função da variação do tamanho do reator, medido em cm.....	60
Figura 23: Estudo do efeito matriz na análise de vinhos tinto ( <b>triângulos vermelhos</b> ), vinho branco ( <b>bolas verdes</b> ) e solução aquosa (quadrados pretos).....	61
Figura 24: Recuperações obtidas para as amostras analisadas de acordo com a região de origem. O valor utilizado corresponde a uma adição de 2 g L <sup>-1</sup> de ácido gálico nos vinhos. Os números na abscissa (eixo das amostras) são os mesmos da tabela 1.....	63
Figura 25: Valores médios e desvio-padrão por grupo de amostras analisadas.....	66
Figura 26: Estudo entre variação de teor alcoólico e intensidade de sinal analítico. (a) lantanídeos a 20 µg L <sup>-1</sup> e (b) demais elementos a 0,50 mg L <sup>-1</sup> adicionados a solução aquosa.....	89
Figura 27: Intensidade de sinal (R) de diferentes analitos versus teor alcoólico da solução testada.....	90

Figura 28: Intensidade de sinais obtidos no USN-ICP OES para lantanídeos (a) e metais de transição / representativos (b) adicionados no vinho diluído contendo diferentes teores alcoólicos. ....	91
Figura 29: Resultado de teste de efeito matriz. Padrões ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para lantanídeos, $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ para os demais) adicionados a: V1 = vinho tinto 1 (11%), V2 = vinho tinto 2 (13,5%), EtOH = solução alcoólica a 2% de etanol em água e $\text{H}_2\text{O}$ = padrões dissolvidos em água. Todos acidificados com 1% de $\text{HNO}_3$ . $a_1$ e $a_0$ = coeficientes angulares das curvas analíticas, sendo $a_0$ utilizando-se apenas V1 (referencial). ....	97
Figura 30: Curvas analíticas obtidas para os diferentes metais usando como padrão interno Ga 417,2 nm (a), In 230,6 nm (b) e In 325,6 nm (c), todos na concentração de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta variação indica interferência espectral nas três linhas, com consequente eliminação das mesmas. ....	98
Figura 31: Imagens do software controlador do ICP para demonstrar a seletividade alcançada. ....	101
Figura 32: Limites de detecção instrumental e do método (considerando o fator de diluição) obtidos por USN-ICP OES. ....	102
Figura 33: Comparação entre os valores de LODs do método proposto e de trabalhos citados na literatura. ....	103
Figura 34: RSD ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de lantanídeos, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ demais elementos, $n = 9$ ) obtidos para a técnica USN-ICP OES. ....	104
Figura 35: Resultados do teste de adição e recuperação do método proposto. (L) lantanídeos e (M) metais de transição e representativos. ....	105
Figura 36: Gráfico de escores da PCA. Nesta figura, <b>em vermelho</b> estão as amostras da Espanha; <b>em verde</b> , os vinhos brancos; <b>em azul</b> e roxo os vinhos tintos varietais experimentais e, <b>em preto</b> , os vinhos comerciais brasileiros. No zoom, está indicado o gráfico de loadings da mesma PCA. ....	111
Figura 37: Gráfico de escores da segunda PCA, realizada excluindo oito amostras. Em tons de <b>verde</b> estão as amostras brancas; em tons de <b>azul</b> , amostras tintas varietais experimentais; em <b>preto</b> , vinhos tintos comerciais brasileiros e, <b>em vermelho</b> , tintos espanhóis. ....	112
Figura 38: Gráfico de Loadings da terceira PCA (excluindo as oito amostras). ....	113
Figura 39: Gráfico de loadings da PCA realizada apenas com os vinhos tintos Tempranillo e Syrah. ....	114

Figura 40: Gráfico de escores da terceira PCA, realizada apenas com os vinhos tintos das uvas Tempranillo e Syrah. <b>Em vermelho</b> os vinhos espanhóis; <b>em preto</b> , comerciais brasileiros e <b>em azul</b> , varietais experimentais brasileiros. Detalhes são dados quanto à variedade das amostras comerciais e quanto à safra das varietais experimentais brasileiras.....	115
Figura 41: Gráfico de escores da PCA realizada somente com os vinhos tintos brasileiros.	117
Figura 42: Gráfico de loadings da PCA dos vinhos tintos do VSF. ....	118

## *Lista de tabelas*

Tabela 1: Descrição geral dos vinhos utilizados neste trabalho. ....	48
Tabela 2: Resultados obtidos, volume médio e seu respectivo desvio padrão (SD) para o volume por pulso de cada minibomba solenóide e seus respectivos valores nominais. ....	49
Tabela 3: Valores selecionados após o processo de otimização do sistema. ....	60
Tabela 4: Estudo de possíveis interferentes para o sistema proposto. ....	64
Tabela 5: Concentração de polifenóis nas amostras de vinhos analisados. ....	65
Tabela 6: Tabela ANOVA para os resultados de polifenóis totais nos vinhos analisados. ....	66
Tabela 7: Parâmetros instrumentais utilizados na análise de vinhos. ....	82
Tabela 8: Relação das amostras analisadas por USN-ICP OES. ....	87
Tabela 9: Fatores, níveis de estudo (e suas unidades de medida) e valores selecionados ....	92
Tabela 10: Fatores e níveis de estudo (com suas unidades de medida) para a maximização da resposta analítica na análise de vinhos por ICP OES ....	93
Tabela 11: Efeitos principais, de interações entre os fatores estudados e o valor do erro puro obtidos usando USN- ICP OES para os analitos determinados nas amostras de vinhos. ....	94
Tabela 12: Condições finais utilizadas para a análise de elementos por USN-ICP OES em amostras de vinhos, após os resultados da análise multivariada. ....	96
Tabela 13: Faixa de trabalho para cada elemento determinado, suas linhas de emissão e respectivos padrões internos e o coeficiente de determinação da curva analítica. ....	100
Tabela 14: Resumo das figuras de mérito obtidas para a técnica USN-ICP OES. ....	106
Tabela 15: Contribuição para a concentração dos elementos estudados ocasionados pela adição do ácido e do etanol às soluções de referência (já considerada a diluição realizada). ....	108
Tabela 16: Concentração mínima (Min) e máxima (Max), medianas (Md), médias (M) e desvios-padrão (Sd) para pH e elementos determinados nos vinhos analisados. ....	109
Tabela B 1: Teores, e respectivos desvios-padrão (n = 3), de pH e elementos majoritários nas amostras de vinhos varietais, tintos e brancos, elaborados no Vale do São Francisco. ....	154

Tabela B 2: Teores e respectivos desvios-padrão, de pH e elementos majoritários em amostras de vinhos tintos comerciais do Vale do São Francisco.....	155
Tabela B 3: Teores e respectivos desvios-padrão de pH e elementos majoritários (n = 3) em amostras de vinhos tintos espanhóis com denominação de origem.....	155
Tabela B 4: Teores e respectivos desvios-padrão (em mg L <sup>-1</sup> , n = 3) dos elementos minoritários nas amostras de vinhos varietais, tintos e brancos, elaborados no Vale do São Francisco. ....	156
Tabela B 5: Teores e respectivos desvios-padrão (em mg L <sup>-1</sup> , n = 3) dos elementos minoritários nas amostras de vinhos comerciais elaborados no Vale do São Francisco.....	157
Tabela B 6: Teores e respectivos desvios-padrão (em mg L <sup>-1</sup> , n = 3) dos elementos minoritários em amostras de vinhos tintos espanhóis com denominação de origem. ....	157
Tabela B 7: Teores e respectivos desvios-padrão (em µg L <sup>-1</sup> , n = 3) dos elementos traços nas amostras de vinhos varietais, tintos e brancos, elaborados na região do Vale do São Francisco. ....	158
Tabela B 8: Teores e respectivos desvios-padrão (em µg L <sup>-1</sup> , n = 3) dos elementos traços nas amostras de vinhos comerciais elaborados na região do Vale do São Francisco.....	159
Tabela B 9: Teores e respectivos desvios-padrão (em µg L <sup>-1</sup> , n = 3) dos elementos traços em amostras de vinhos tintos espanhóis com denominação de origem.....	159
Tabela B 10: Teores e respectivos desvios-padrão (em µg L <sup>-1</sup> , n = 3) dos lantanídeos nas amostras de vinhos varietais, tintos e brancos, elaborados na região do Vale do São Francisco. ....	160
Tabela B 11: Teores e respectivos desvios-padrão (em µg L <sup>-1</sup> , n = 3) dos lantanídeos em amostras de vinhos tintos espanhóis com denominação de origem. ....	161
Tabela B 12: Teores e respectivos desvios-padrão (em µg L <sup>-1</sup> , n = 3) dos lantanídeos em amostras de vinhos tintos comerciais do Vale do São Francisco.....	161

## Sumário

INTRODUÇÃO.....	17
APRESENTAÇÃO .....	19
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>22</b>
1.1 OBJETIVOS .....	23
1.1a Geral.....	23
1.1b Específicos.....	23
1.2 PARTE TEÓRICA .....	24
1.2.1 Compostos Polifenólicos .....	24
1.2.2 Compostos fenólicos em vinhos .....	26
1.2.3 Análise em Fluxo .....	27
1.2.4 Análise em fluxo aplicada a vinhos .....	30
1.2.5 Luminescência.....	31
1.2.6 Luminescência e análise em fluxo.....	34
1.2.7 Quimiluminescência, fluxo e polifenóis nos vinhos .....	35
1.3 PARTE EXPERIMENTAL .....	38
1.3.1 Soluções e reagentes.....	38
1.3.1.1 Soluções estoque .....	38
1.3.1.2 Soluções de trabalho .....	38
1.3.2 Equipamentos e acessórios.....	39
1.3.2.1 Descrição geral do sistema .....	39
1.3.2.2 Operação do sistema em fluxo proposto.....	43
1.3.3 Avaliação da vazão e estabilidade das minibombas.....	44
1.3.4 Estudo do ruído do sistema e luminescência da amostra .....	44
1.3.5 Estudo da estabilidade dos reagentes .....	44
1.3.6 Influência dos parâmetros físicos e químicos na resposta do sistema.....	45
1.3.6.1 Efeito da proporção de pulsos .....	45
1.3.6.2 Efeito do pH da solução do luminol .....	45
1.3.6.3 Efeito da concentração do luminol .....	45
1.3.6.4 Efeito do meio solvente para solução de hipoclorito .....	46
1.3.6.5 Efeito da concentração do hipoclorito.....	46
1.3.6.6 Efeito do número de pulsos.....	46
1.3.6.7 Efeito do comprimento do reator.....	46
1.3.7 Figuras de mérito do método.....	47
1.3.8 Amostras e análise das amostras .....	47
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
1.4.1 Estudo da vazão das minibombas.....	49
1.4.2 Estudo do ruído do sistema e luminescência da amostra .....	50
1.4.3 Estabilidade dos Reagentes .....	51

1.4.4	<i>Influência dos parâmetros físicos e químicos na resposta do sistema</i>	53
1.4.4.1	<i>Influência da proporção de pulsos</i>	54
1.4.4.2	<i>Influência do pH da solução do luminol</i>	55
1.4.4.4	<i>Efeito da concentração do luminol</i>	56
1.4.4.5	<i>Efeito do meio solvente para a solução do hipoclorito</i>	57
1.4.4.6	<i>Efeito do número de pulsos</i>	58
1.4.4.7	<i>Efeito do comprimento do reator</i>	59
1.4.5	<i>Figuras de mérito</i>	60
1.4.6	<i>Interferentes</i>	64
1.4.7	<i>Análise das amostras</i>	65
1.5	CONCLUSÕES PARCIAIS	67
1.6	PERSPECTIVAS	68
<b>CAPÍTULO 2</b>		<b>69</b>
2.1	OBJETIVOS	70
2.1a	<i>Geral</i>	70
2.1b	<i>Específicos</i>	70
2.2	PARTE TEÓRICA	71
2.2.2	<i>Metais e espectrometria atômica em vinhos</i>	73
2.2.3	<i>Quimiometria</i>	75
2.2.4	<i>Quimiometria e sua aplicação em vinhos</i>	76
2.2.5	<i>Metais, quimiometria e vinhos</i>	78
2.3.1	<i>Soluções e reagentes</i>	81
2.3.2	<i>Preparo de soluções</i>	81
2.3.3	<i>Equipamentos e acessórios</i>	82
2.3.3.1	<i>Descrição geral do equipamento</i>	82
2.3.4	<i>Procedimentos</i>	83
2.3.4.1	<i>Funcionalidade do plasma</i>	83
2.3.4.2	<i>Planejamento fatorial para avaliação das condições de operação do ICP</i>	84
2.3.4.3	<i>Efeito matriz</i>	84
2.3.4.4	<i>Seleção do padrão interno</i>	84
2.3.4.5	<i>Figuras de mérito do método proposto</i>	85
2.3.4.6	<i>Análise das amostras</i>	86
2.3.4.7	<i>Análise quimiométrica</i>	86
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
2.4.1	<i>Estudo das condições operacionais do ICP OES</i>	88
2.4.2	<i>Planejamento fatorial para avaliação das condições de operação do ICP</i>	92
2.4.3	<i>Efeito matriz</i>	96
2.4.4	<i>Seleção do padrão interno</i>	97
2.4.5	<i>Figuras de mérito</i>	101
2.4.6	<i>Análise das amostras</i>	107

2.4.7 <i>Análise de Componentes Principais</i> .....	110
2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	119
2.6 PERSPECTIVAS.....	120
<b>3 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>121</b>
<b>4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>122</b>
<b>5.1 APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO REFERENTE À DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS EM     VINHOS. ....</b>	<b>143</b>
<b>5.2 APÊNDICE B – RESULTADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DE PH E ELEMENTOS MINERAIS NOS     VINHOS ANALISADOS. ....</b>	<b>154</b>

## ***Introdução***

A vitivinicultura consiste no cultivo de uvas e elaboração de vinhos e, tradicionalmente, ocorre em regiões de clima temperado, entre os paralelos 30 e 50° norte e sul. Essas condições – adotadas como padrões – sugerem que ocorra no inverno o período de hibernação da videira, seguido pela brotação, na qual deve ser em estação chuvosa para ocorrer o desenvolvimento da planta. Por fim, a maturação e colheita (vindima) em um verão quente e seco, favorecendo assim a produção de uvas com maior aroma. Os principais países do globo terrestre que detêm estas características estão localizados na Europa: França, Espanha, Itália e Portugal, e na América do Sul: Argentina, Chile e sul do Brasil<sup>1-3</sup>.

A videira, e conseqüentemente a vitivinicultura, foi introduzida no Brasil em 1532 por Martín Afonso de Souza na região do atual estado de São Paulo. Com o passar dos anos a cultura difundiu-se pelo país e encontrou a melhor adaptação no Rio Grande do Sul. Estado que até os dias atuais é o principal representante, como produtor, em vinhos nacionais<sup>1-3</sup>.

No Nordeste, mais especificamente no Vale do São Francisco (VSF), a viticultura (cultivo da uva) foi introduzida nos anos 1950 pela antiga Comissão do Vale do São Francisco (hoje, Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba, CODEVASF). Contudo, foi somente após a criação da Embrapa Semiárido, em 1975, que se iniciou o desenvolvimento de pesquisas para contribuir com a geração de produtos com características típicas regionais, visando elaborar processos de produção para a obtenção de agroderivados melhores e mais adaptados à região<sup>4,5</sup>.

O Vale do São Francisco corresponde à região geográfica brasileira que compreende a bacia do rio São Francisco, cuja nascente é na cidade de São Roque de Minas, na Serra da Canastra – MG, e a foz no oceano Atlântico, entre os estados de Sergipe e Alagoas. Abrangendo 504 municípios em seis estados, além do Distrito Federal, o VSF é subdividido em quatro regiões – de acordo com acidentes geográficos e variações de clima e cobertura vegetal – que vão desde a nascente à foz: Alto, Médio, Submédio e Baixo São Francisco<sup>5-7</sup>.

Destas regiões, o Vale do Submédio do São Francisco (VSMSF) é a região mais inóspita. Está localizado entre os paralelos 9° e 10° de latitude Sul, possui clima semi-árido e árido, vegetação de caatinga, baixo índice pluviométrico (média de 350 mm) com grande período seco e alta incidência solar – temperatura média anual de 28 °C. Entretanto, apesar destes inconvenientes, a região é destacadamente a maior produtora de uvas de mesa do Brasil e está se sobressaindo também na elaboração de vinhos finos, ocupando a 2ª posição. Nesta região são elaborados vinhos conhecidos como vinhos tropicais ou “vinhos do sol”<sup>5-8</sup>.

Devido às características mencionadas acima, a irrigação é a principal forma de fornecimento de água para a agricultura. Para a vitivinicultura, a irrigação possibilita a produção e elaboração de uvas e vinhos ao longo de todos os meses do ano. Porém, devido a região possuir uma temperatura média sempre acima de 12 °C, possuir um terreno em que antes não havia plantação e pelo estado de hibernação da videira (seu “descanso”) ser dado apenas pela não irrigação do parreiral após a colheita, não se conhece por completo quais os potenciais que os produtos desta possam ter. Necessitando, desta forma, de mais estudos que venham a definir o seu potencial vitivinícola e também se seus vinhos podem ser diferenciados dos demais quanto às suas características<sup>7,9-11</sup>, fornecendo-lhe uma identidade.

A Indicação de Procedência (IP) corresponde a “o nome geográfico (...) que se tenha tornado conhecido como centro de extração, produção ou fabricação de determinado produto (...)”, e a Denominação de Origem (DO) é definida como o “nome geográfico (...) que designe produto ou serviço cujas qualidades ou características se devem exclusiva e essencialmente ao meio geográfico, incluídos fatores naturais e humanos”. Estes dois definem a Indicação Geográfica (IG), termo de referência à qualidade de um produto, segundo a Lei de Propriedade Intelectual<sup>12</sup>, equivalente aos termos Denominação de Origem Controlada (D.O.C.) da Espanha e Portugal.

No Vale, há diversas entidades já mobilizadas na caracterização dos seus vinhos em busca de obter, inicialmente, a IP<sup>11</sup>, que trará, com isso, maior notoriedade aos seus vinhos.

Este trabalho apresenta, no primeiro capítulo, o desenvolvimento de metodologia para a determinação de compostos polifenólicos totais em vinhos com detecção indireta, por meio de reação quimiluminescente entre o hipoclorito e o luminol. A estratégia de multicomutação em fluxo foi utilizada para minimizar o consumo de soluções de reagentes, a geração de efluentes e o custo da análise. No segundo capítulo é descrita uma metodologia para determinação do teor de elementos minerais em vinhos, utilizando-se a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado – ICP OES, com mínima preparação de amostras, sem perda de sensibilidade e com menor risco de contaminação. Buscando-se aplicar as metodologias desenvolvidas na análise de amostras de vinhos do VSF, contribuindo, assim, com dados que auxiliarão para a sua caracterização.

## ***Apresentação***

Vinho é a bebida oriunda da fermentação alcoólica da uva sã, fresca e madura e, segundo a lei<sup>13</sup>, esse nome somente pode ser atribuído ao produto da uva. É uma bebida há muito tempo conhecida, com relatos tanto na Bíblia quanto em textos mais antigos. Remonta a 10 mil a.C. em regiões como a Mesopotâmia e Egito<sup>1,2</sup> aproximando Deus, deuses e homens em cerimônias sacras (o sangue de Cristo no cálice) e mundanas (celebrando os deuses do vinho – Baco/Dionísio).

Apresenta em sua composição água, sais minerais e outros nutrientes que, segundo alguns estudos, se consumido adequadamente, é uma bebida extremamente benéfica à saúde. Originando-se, assim, a idéia dele ser definido como um alimento<sup>2,3,14-17</sup>.

A vitivinicultura, a arte de cultivar uvas e elaborar vinhos, é também um comércio que envolve muito dinheiro e traz consigo história e cultura. Algumas regiões que são conceituadas há bastante tempo devido ao sucesso na elaboração de vinhos, detêm em suas cidades um turismo cultural que aumenta a demanda de empregos (in)formais, gerando riquezas (i)materiais para a população.

No Brasil, existem diferentes regiões produtoras de vinho<sup>18-20</sup>, porém a grande maioria somente é capaz de atender a um comércio local com vinhos de qualidade inferior aos já reconhecidos. Segundo a *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*<sup>21</sup> (OIV), há distinção na classificação como regiões produtoras somente para a Serra Gaúcha e a Campanha, ambas no Rio Grande do Sul, e o Vale do São Francisco – compreendendo os estados da Bahia e Pernambuco. Também de acordo com a OIV, a única região que possui destaque com vinhos de qualidade de Indicação Geográfica está no Rio Grande do Sul, o Vale dos Vinhedos.

A título de simples comparações, utilizando-se dados oficiais (e alguns não oficiais), cerca de 310 milhões de garrafas de vinhos de Bordeaux, França, foram exportadas, gerando um total de 8,18 bilhões de euros comercializados – no período de Julho de 2011 a Junho de 2012. Nesta região, 17% da população trabalha nos vinhedos, que recebem cerca de 3 milhões de visitantes ao ano<sup>22,23</sup>. Dos poucos dados disponíveis no Brasil, o Rio Grande do Sul, responsável por 90% da comercialização nacional, elaborou em 2011 cerca de 19,5 milhões de litros de vinho<sup>24,25</sup>. Somente no Vale dos Vinhedos<sup>26</sup>, quase 13 milhões de litros foram comercializados, tendo apenas duas das 31 vinícolas locais, registrado a visita de 330 mil turistas<sup>27,28</sup> no ano de 2012.

Desta forma, esforços visando melhorar (tanto em qualidade quanto em elaboração) os vinhos elaborados nas demais regiões brasileiras são necessários. O Vale do São Francisco é uma região que vem recebendo investimentos financeiros e de recursos humanos especializados na elaboração de vinhos. Porém, há pouca informação na literatura sobre seus vinhos. É uma região totalmente distinta das tradicionais européias devido ao seu clima tropical, sem a presença de um inverno frio rigoroso, e que pode permitir a elaboração de vinhos de qualidade com a aplicação de conhecimento científico nas práticas agrícolas empregadas.

Para alcançar o reconhecimento almejado, a região do VSF deve proceder a estudos científicos que venham a caracterizar e provar cientificamente (e claro, também sensorialmente), que a composição do vinho desta região é de qualidade única e exclusivamente concebida ali.

Primeiramente, dados agronômicos do potencial enológico da videira no microclima local e sua adaptação ao solo, através do conhecimento da Pedologia (estudo do solo) e Edafologia (influência dos solos nas plantas), fornecem as condições iniciais para o plantio e elaboração (principalmente em áreas sem aptidão para o plantio).

O próximo passo consiste em adequar a produção do vinho às normas vigentes do país, bem como às recomendações da OIV<sup>29</sup>, quanto aos teores máximos permitidos de alguns compostos. No Brasil, a portaria 229 do Ministério da Agricultura<sup>30</sup>, de 25/10/1988, especifica esses limites.

A contribuição da Química (Analítica) para o processo se dá de forma a caracterizar e quantificar os componentes presentes no vinho, fornecendo informações que assistem os enólogos/estudiosos quanto às características do mesmo. Das centenas de compostos presentes no vinho, pode-se citar os compostos polifenólicos. A identificação individual de novas moléculas desta classe (ou se ela se encontra ligada à outra, numa estrutura mais estável) pode ser realizada com técnicas como RMN e Espectrometria de Massas, acopladas ou não à cromatografia<sup>31</sup>. Entretanto ainda há a necessidade de métodos mais eficientes, rápidos e de baixo custo para a determinação do teor total de polifenóis e sua capacidade antioxidante<sup>32</sup>, pois esses são os principais responsáveis pelos benefícios do vinho.

Também de presença essencial nos vinhos, os metais são capazes de alterar as propriedades organolépticas dos mesmos e são indicadores de tipos de solo, clima e processos vitivinícolas usados, tornando-se adequados para garantir a origem e autenticidade do vinho a uma região<sup>33</sup>.

Outra forma de contribuição da Química está no controle de qualidade, buscando confirmar os requisitos legislativos, a identificação de componentes tóxicos (metais pesados ou contaminantes orgânicos), bem como a identificação de alguns metais responsáveis por alterações químicas que degradam o vinho<sup>2</sup>, como, por exemplo,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

Neste contexto, essa tese vem contribuir com o desenvolvimento de um método analítico que emprega multicomutação em fluxo para análise de compostos polifenólicos determinados por reação quimiluminescente com detecção espectroscópica e com a determinação de minerais nos vinhos através da espectroscopia atômica com plasma acoplado indutivamente.

# Capítulo 1

Desenvolvimento de método para  
a determinação de polifenóis  
totais em vinhos

*O verdadeiro significado das coisas se encontra na capacidade  
de dizer as mesmas coisas com outras palavras.*

*Charles Chaplin*

## **1.1 Objetivos**

### 1.1a Geral

Desenvolver um sistema em fluxo multicomutado para a determinação do teor de polifenóis totais em vinhos usando luminol e água sanitária e detecção por quimiluminescência.

### 1.1b Específicos

- Construir um luminômetro para ser empregado como sistema de detecção da reação em estudo;

- Estudar o efeito e otimizar as variáveis do sistema em fluxo;

- Aplicar as recomendações da Química verde, com redução de gastos de reagentes, utilização de reagentes menos danosos ao ambiente e redução da quantidade e toxicidade do efluente gerado;

- Validar a metodologia proposta, estabelecendo as figuras de mérito;

- Aplicar o método baseado na reação quimiluminescente entre luminol e hipoclorito para determinação do teor de polifenóis totais nos vinhos.

## 1.2 Parte teórica

Diversos parâmetros são úteis para a caracterização do vinho de uma determinada região, podendo fornecer informações sobre substâncias presentes, e também suas concentrações, de maneira que indiquem a peculiaridade daquela região vinícola. Fornecendo assim, através da identidade química, uma identidade geográfica para o vinho.

### 1.2.1 Compostos Polifenólicos

Dentre os constituintes da uva e, conseqüentemente, do vinho que são importantes para poder caracterizá-los como sendo oriundos de uma região específica estão os compostos polifenólicos – CPs. Estas substâncias são os principais responsáveis pelas propriedades benéficas que o vinho traz à saúde do consumidor, pois são antioxidantes, anticancerígenos, anti-inflamatórios e antiteratogênicos naturais. Além destas propriedades, os CPs têm grande importância na composição dos vinhos devido à sua atuação na intensidade e tonalidade de cor, no sabor, aroma e maturação<sup>14,32,34</sup>.

Os polifenóis são uma classe química de ampla faixa de estruturas, que vão desde uma simples molécula fenólica a grandes estruturas condensadas. Inicialmente são classificados em flavonóides e não-flavonóides. Os compostos não-flavonóides principais são os ácidos benzóicos, cinâmicos e os estilbenos cujos exemplos podem ser vistos na Figura 1. Esses são os responsáveis pelas modificações de coloração e de aromas – devido às oxidações que liberam fenóis voláteis –, sendo os não-flavonóides os mais importantes, em relação aos flavonóides, nos vinhos brancos<sup>35</sup>.

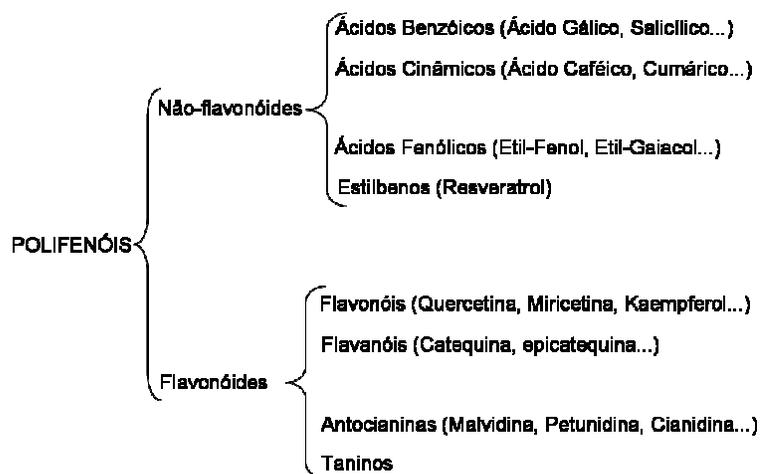


Figura 1: Divisão dos principais grupos polifenólicos.

Os compostos flavonoides são caracterizados por sua estrutura química composta por dois anéis benzênicos (A e B) ligados por um anel heterocíclico oxigenado (C), como mostra a Figura 2. As alterações no anel C, com diferentes estados de oxidação, geram as subclasses, enquanto que substituições nos anéis A e B fornecem os compostos específicos de cada classe. São estes constituintes que dão a coloração aos vinhos, sendo os flavonóis e flavanóis substâncias de coloração amarelada e as antocianinas de coloração avermelhada<sup>14,32,36</sup>. Seus efeitos benéficos como antioxidantes são gerados por sua capacidade de doar elétrons e esta é dependente tanto do número e posicionamento de grupos hidroxilas quanto da extensão da conjugação<sup>37</sup>.

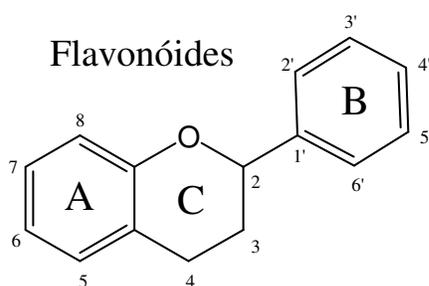


Figura 2: Estrutura básica dos flavonóides. A e B: anéis benzênicos e C: anel heterocíclico.

Comumente, em se tratando de estudo de teor total de alguma classe específica de polifenol, um exemplar “x” (em alta concentração na amostra) é escolhido como representante principal e, desta forma, a concentração desta classe é expressa como sendo a concentração do exemplar “x”. Para as antocianinas, por exemplo, seu teor é expresso em  $\text{mg L}^{-1}$  de malvidina (ou seu derivado, malvidina-3-*O*-glucosídeo), enquanto que para os CPs em geral, ácidos caféico e gálico são os escolhidos<sup>36b</sup>.

Nas reações redox, os CPs agem como redutores (anti-oxidantes) e possuem como principal via de oxidação, primeiro a diona correspondente, e, em seguida, a compostos mais complexos<sup>38</sup>, Figura 3.

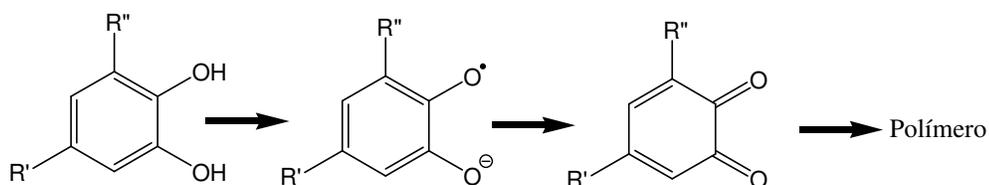


Figura 3: Esquema simplificado da oxidação de polifenóis.

### 1.2.2 Compostos fenólicos em vinhos

Um grande número de trabalhos foi publicado estudando os vinhos de regiões específicas que possuem certificados de origem. Para tanto, várias técnicas analíticas são aplicadas buscando caracterizá-los quanto às suas propriedades químicas e sensoriais que os tipificam como oriundos daquela região específica.

Com este propósito, oito compostos fenólicos foram caracterizados por micro extração em fase sólida hifenizado à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (SPME-LC-MS) em vinhos portugueses<sup>39</sup> e outros 60, em vinhos argentinos, utilizando-se a cromatografia a líquido com detecção no visível e também acoplada à espectrometria de massas (LC-DAD-MS)<sup>40</sup>. Um nariz bioeletrônico baseado em um biosensor enzimático com diferentes modificadores foi desenvolvido para a caracterização de 10 compostos fenólicos e seu teor total em vinhos da Espanha<sup>41</sup>. Vinhos catarinenses foram caracterizados quanto ao seu perfil mineral, fenólico, cor e atividade antioxidante e os resultados mostraram viabilidade na diferenciação de vinhos provenientes de duas regiões distintas apenas com a composição mineral (10 elementos determinados por plasma acoplado indutivamente com espectrometria de massas: ICP-MS)<sup>42</sup>.

Conhecendo a importância que a estabilidade, a qualidade gustativa e visual do vinho têm tanto para o produtor quanto para o consumidor, vinhos chilenos foram fortificados com cobre e ferro e analisados quanto à atividade antioxidante, os autores verificaram uma redução desta atividade, atribuída à complexação destes cátions, em concentrações diferenciadas, pelos compostos polifenólicos<sup>43</sup>.

A capacidade antioxidante total (TAC) e o teor de fenóis totais foram medidas utilizando-se ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromon-2-carboxílico (Trolox) e ácido gálico como soluções de referência, respectivamente. A TAC e a concentração de fenóis totais foram determinadas, por metodologias clássicas, em amostras de vinhos provenientes de cinco etapas diferentes do processo de vinificação. Observou-se que não há variação, nestas etapas, para o teor de fenóis. Porém com a evolução da etapa de elaboração há uma queda no valor da TAC<sup>44</sup>.

Vários fatores que podem causar variações na composição química e sensorial, e consequentemente sua qualidade, em vinhos gaúchos foram estudados. A forma de condução das videiras<sup>45</sup>, a produtividade<sup>46</sup>, a safra<sup>47</sup> e processos fermentativos<sup>48</sup> foram avaliados através de análises enológicas clássicas e verificou-se que diferentes técnicas originam vinhos distintos. O mesmo foco foi aplicado por pesquisadores espanhóis, os quais usaram os

resultados obtidos de análises de coloração e cromatográficas para concluir que é possível distinguir vinhos que foram submetidos a diferentes tempos de envelhecimento<sup>49</sup>. Diferentes técnicas fermentativas de elaboração permitiram as mesmas conclusões em vinhos espanhóis<sup>50</sup>, sérvios<sup>51</sup> e macedônios<sup>52</sup>.

Vinhos gaúchos elaborados da cv. Isabel foram analisados quanto aos seus teores de antocianinas, ácidos hidroxicinâmicos e flavonóis por LC-MS e também por sua capacidade antioxidante, através do método do radical 2,2-difenil-p-picrilhidrazil (DPPH). Os resultados obtidos mostraram que esta variedade possui composição de antocianinas diferenciada e menor capacidade antioxidante em relação a vinhos originados das variedades *Vitis vinifera*<sup>53</sup>. A mesma discriminação por variedades de uvas foi obtida por pesquisadores húngaros<sup>54</sup> e canadenses<sup>55</sup>, ambos com análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os primeiros<sup>54</sup> indicaram que a variedade da uva e o ano de colheita influenciavam o teor de trans-resveratrol, ao passo que os segundos<sup>55</sup> verificaram a variação na concentração de antocianinas.

Tais estudos demonstram que as técnicas vinícolas empregadas pelo vinicultor, bem como o clima local, são fatores que podem alterar as características de um vinho.

Apesar do crescente interesse pela identificação individual dos compostos polifenólicos nos vinhos e, assim, sua total caracterização, ainda existe a necessidade de oferecer métodos relativamente simples que forneçam rapidamente o teor total de polifenóis, pois quanto maior esta concentração, maior seu potencial anti-oxidante<sup>23</sup>. Das possíveis escolhas disponíveis, os métodos de análise em fluxo compreendem uma opção viável tanto em custos quanto em velocidade.

### 1.2.3 Análise em Fluxo

O crescente avanço nas ciências permite que ocorram melhorias na qualidade de vida das pessoas. Dentre as ciências, a Química analítica contribui, entre outros fatores, com o aumento no número de análises para o controle de qualidade de alimentos e de testes clínicos, por exemplo. Porém, os métodos utilizados podem ser morosos e tecnicamente difíceis de serem realizados, exigindo assim recursos humanos especializados para a execução dos mesmos. Isto gera a necessidade de novos métodos de análises, de modo que estes sejam mais rápidos, mais eficientes e que demandem analistas bem treinados, porém não obrigatoriamente especializados, para realizá-los<sup>56</sup>.

Em 1957, Leonard T. Skeggs publicou um trabalho relatando o desenvolvimento de uma ferramenta mecanizada para (parcial) automação de métodos analíticos rotineiros de laboratórios clínicos. Esta técnica foi nomeada de análise em fluxo contínuo segmentado (do inglês, Continuous Flow Analysis – CFA). Naquela época, o CFA surgiu como uma solução adequada para os laboratórios (clínicos), pois poderia funcionar por maior tempo com menor interferência dos seres humanos, gerando um maior lucro para a empresa<sup>57</sup>.

Com o passar dos anos, evoluções naturais vieram para melhorar cada vez mais as ferramentas de análises. Em acréscimo às vantagens já existentes do CFA surgiu a melhora na introdução de soluções no sistema analítico; melhoria na eficiência de mistura entre as soluções de reagentes e amostras/padrões; a possibilidade de aplicação em quase todo tipo de etapa analítica, seja pré-concentração, difusão, extração, análise direta, etc.; o acoplamento com diversos tipos de detectores; a diminuição de intercontaminação entre amostras sucessivas; a inserção do microcomputador para gerenciamento e controle e de pequenos instrumentos de manuseio de soluções, as válvulas e minibombas solenóide, dentre várias outros<sup>58,59</sup>.

Surgiram, com isso, os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês, Flow Injection Analysis)<sup>60</sup>, análise em fluxo contínuo monosegmentado (MSFA, Monosegmented Continuous Flow Analysis)<sup>61</sup>, análise por injeção sequencial (SIA, Sequential Injection Analysis)<sup>62</sup>, análise em fluxo com multicomutação (MCFA, Multicommutation Flow Analysis)<sup>63</sup>, sistema multisingra de análises em fluxo (MSFIA, Multisyringe Flow Injection Analysis)<sup>64</sup> e a análise em fluxo com mini-bombas solenóide (MPFA, multipumping Flow Analysis)<sup>65</sup>.

Uma grande variedade de textos está disponível na literatura abordando os conceitos das diferentes estratégias de análise em fluxo, bem como as aplicações a distintos analitos e aos variados tipos de detecção que podem ser empregados<sup>58,59,66</sup>.

O MPFA surgiu como uma tendência para uso de dispositivos mais simples, compactos e robustos no desenvolvimento de metodologias analíticas. Essa estratégia é baseada na introdução de soluções de amostras e reagentes por uma série de mini-bombas solenóide acionadas individualmente ou em combinação, produzindo um fluxo pulsado no caminho analítico aumentando-se a versatilidade das análises em fluxo e sua utilização em diferentes aplicações<sup>65</sup>.

O fluxo pulsado que é gerado inicialmente pelas mini-bombas, mas à medida que avança no percurso analítico se tornará laminar, fornece melhor mistura da zona de amostra, devido à maior turbulência, e permite obter, também, maior sensibilidade e menores volumes

de amostras requeridas para a realização das análises. Desta forma, obtêm-se maior simplicidade na configuração do módulo de análise, bem como na operação e manuseio do sistema<sup>67</sup>.

Mini-bombas solenóide são dispositivos de pequenas dimensões e massa (normalmente em formato cilíndrico com 2 cm de diâmetro, 5 cm de altura e cerca de 60 g) que funcionam por compressão de um diafragma quando uma determinada potência e corrente são fornecidas as mesmas. Ao cessar esta energia, o diafragma é liberado e permite a passagem do líquido num volume específico, que pode variar de 3 a 50  $\mu\text{L}$  a uma frequência individual com alta reprodutibilidade e vazão estável, podendo chegar a 300 pulsos  $\text{min}^{-1}$ . Ao comparar com uma bomba peristáltica, observa-se que quatro mini-bombas são muito mais leves, menores e consomem apenas 5% da potência requerida por uma bomba peristáltica de quatro canais<sup>68</sup>.

Antes do desenvolvimento do MPFA, as mini-bombas já eram utilizadas, em sistemas FIA, no bombeamento de soluções, tais como na introdução de reagentes na determinação de nitrito pelo método de Griess<sup>68</sup> (amostras ou padrões foram injetados por bomba peristáltica e válvula rotatória) e na introdução de solução indicadora de pH para a determinação de  $\text{pCO}_2$  da água do mar *in situ*<sup>69</sup>. Ambos os trabalhos utilizaram-se de mini-bombas solenóide que inseriam 50  $\mu\text{L}$  de solução por pulso. Porém, o primeiro trabalho somente verificou a possibilidade de sua utilização em sistemas FIA, observada pela reprodutibilidade dos sinais de três concentrações diferentes de  $\text{NO}_2^-$ . Apenas com o trabalho de Lapa e colaboradores<sup>65</sup> é que a potencialidade das minibombas para fins analíticos foi disseminada.

O acionamento por um intervalo de tempo específico destes dispositivos é controlado via computador, em linguagem de programação que depende da escolha do usuário. Isto permite alta reprodutibilidade na inserção de pequenos volumes e, por conseguinte, a necessidade da integração de conhecimentos de informática para a criação de programas para este controle. Como as minibombas não podem ser ligadas diretamente ao computador, para o controle e a alimentação por fonte externa de energia são utilizadas interfaces eletrônicas que podem ser adquiridas em empresas especializadas ou mesmo construídas em laboratório, utilizando-se simples peças obtidas em comércio local, baseadas, por exemplo, no circuito integrado ULN2803<sup>66f,70</sup>.

Multicomutação pode ser definido como “uma rede analítica que envolve a ação de  $n$  aparelhos ativos (ou  $n$  operações com um simples aparelho) numa única amostra permitindo a criação de até  $2n$  estados<sup>66a</sup>”. Assim, este termo pode ser utilizado tanto para a MCFA quanto para MPFA.

### 1.2.4 Análise em fluxo aplicada a vinhos

Os sistemas de análise em fluxo têm sido aplicados há muitas décadas para a determinação de diferentes analitos em amostras de vinho. Com a utilização de estratégias baseadas em FIA pode-se citar a determinação do teor total de flavonoides em vinhos e chás, através da reação entre  $\text{Al}^{3+}$  e os flavonoides em meio alcalino<sup>71</sup>; a determinação de sulfitos e etanol em vinhos através da difusão gasosa por uma membrana semipermeável a  $\text{SO}_2$  e etanol, com posterior reação destes com verde de malaquita e  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , respectivamente, e detecção espectrofotométrica<sup>72</sup> e a determinação do pH, acidez titulável e a soma dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , utilizando-se um eletrodo sensível ao pH baseado num compósito de grafite/silicone/hidroquinona:benzoquinona<sup>73</sup>.

Procedimento automático em fluxo monosegmentado foi desenvolvido para a determinação potenciométrica do teor de cloretos em leite e vinhos utilizando titulação e um eletrodo seletivo a este ânion, com obtenção de resultados comparáveis ao método de referência da AOAC<sup>74</sup>.

A análise por injeção sequencial, SIA, com detecção por absorção atômica foi utilizado para a determinação do teor de Fe(III) e ferro total<sup>75</sup> através de um módulo de extração líquido-líquido para separação do  $\text{FeSCN}^{2+}$  em fase orgânica, e também foi utilizada na determinação enzimática de etanol (por meio da enzima álcool desidrogenase), com diluição em linha da amostra, acoplado a uma unidade de difusão gasosa<sup>76</sup>.

A multicomutação em fluxo com detecção espectrofotométrica e válvulas solenóide foi aplicada para determinar ácido tartárico tanto por uso prévio de resina de troca aniônica<sup>77</sup> quanto por diálise em linha<sup>78</sup>. A acidez total foi determinada por Garcia e Reis usando um fotômetro construído com LED como fonte de luz e um foto transístor como detector<sup>79</sup>. Esta mesma estratégia foi aplicada para a determinação de resveratrol e *piceid* utilizando-se um espectrofluorímetro para detectar os subprodutos destes após irradiação com UV e separação em linha com uma minicoluna  $\text{C}_{18}$ <sup>80</sup>.

Sistemas MSFIA com detecção espectrofotométrica foram desenvolvidos para a determinação da capacidade antioxidante total tanto pelo método do DPPH<sup>81</sup> como também através da automação do método de Folin-Ciocalteu<sup>82</sup>.

O emprego da estratégia de multicomutação com minibombas solenóides foi implementada, apenas, na determinação de taninos totais em amostras de chá, cerveja e vinho, automatizando-se a o método já conhecido de Folin-Denis<sup>83</sup>.

Como os sistemas de análise em fluxo são apenas sistemas de inserção de soluções, para se realizar a determinação dos analitos faz-se necessário o acoplamento com algum detector. O tipo de detecção mais comum e amplamente utilizado consiste na espectrofotometria<sup>59</sup>. Porém, outros tipos também podem ser usados, tais como infravermelho com transformada de Fourier<sup>84</sup>, ICP OES<sup>85</sup>, amperometria<sup>86</sup> e a luminescência<sup>59,87</sup>.

### 1.2.5 Luminescência

Luminescência corresponde ao fenômeno de emissão de radiação luminosa por espécies químicas em estados eletrônicos excitados de energia. De acordo com a forma (o modo) de excitação dos sistemas em estudo, a luminescência pode subdividir-se em vários tipos<sup>88</sup>, conforme mostra a Figura 4.

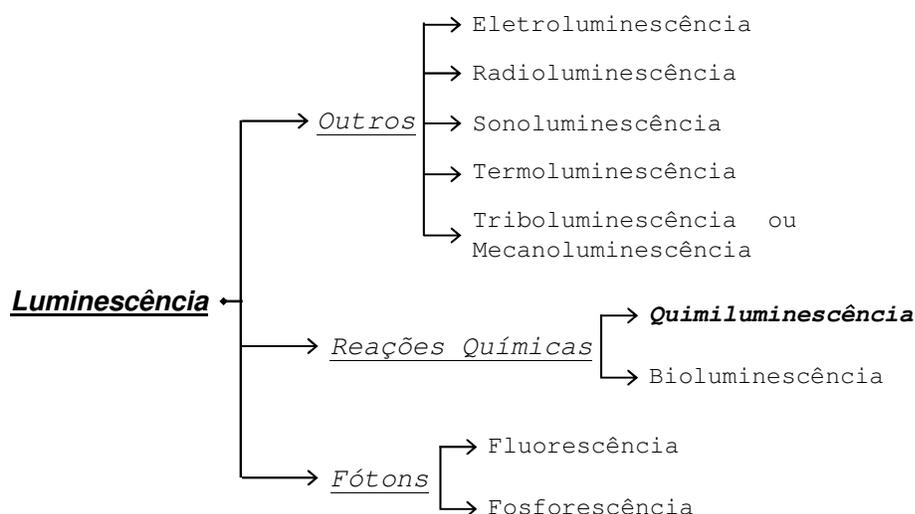


Figura 4: Subdivisões da luminescência.

Os métodos pouco comuns que envolvem luminescência e também utilizados em pesquisas são: a eletroluminescência, emissão por excitação eletrônica gerada pela passagem de corrente elétrica através de um material<sup>89</sup>; a radioluminescência, emissão devida à incidência de radiações de alta energia (raios X,  $\gamma$ , partículas  $\beta$ ,  $\alpha$ )<sup>90</sup>; a sonoluminescência, emissão devida à energia sonora (ondas acústicas)<sup>91</sup>; a termoluminescência, emissão por ativação térmica da amostra<sup>92</sup> e a triboluminescência ou meanoluminescência, emissão causada por fricção ou ação mecânica<sup>93</sup>.

Métodos mais comuns, e também muito mais usuais, de luminescência ocorrem quando a excitação é gerada pela absorção de fótons, a fotoluminescência. A transição radiativa originada de um estado triplete excitado mais baixo em energia para o estado fundamental singlete é chamada de *fosforescência*. Se a transição radiativa ocorrer sem a mudança do spin eletrônico, estado singlete excitado para singlete fundamental, verifica-se a *fluorescência*. Devido à transição com variação de spin ser proibida por regras de seleção, fluorescência é mais comum que fosforescência<sup>88,94,95</sup>.

*Quimiluminescência* é a produção de radiação eletromagnética por uma reação química entre, ao menos, dois reagentes, em que um intermediário ou produto eletronicamente excitado é obtido e subsequentemente relaxa ao estado fundamental ou com emissão de um fóton ou por doação desta energia para outra molécula, que então luminesce. Se isto ocorrer em um organismo vivo, chama-se *bioluminescência*<sup>96</sup>.

A luminescência pode ocorrer em todos os sistemas químicos, seja na fase gasosa ou na fase condensada, simples ou complexos. Os casos mais simples são os de vapores atômicos em baixa concentração, como o exemplo das lâmpadas de vapor de sódio com suas duas linhas características no amarelo – 589,0 e 589,6 nm. Para os casos mais complexos, há sempre algum tipo de fator, seja ele químico ou físico, que possa interferir no sistema<sup>88,95</sup>.

Os principais fatores que afetam a luminescência são:

*i. estrutura molecular*, quanto mais rígido o esqueleto carbônico – e menor o número de substituintes pequenos e livres, maior a possibilidade do estado excitado desativar por emissão de luz;

*ii. o meio* - quanto ao solvente - solventes mais viscosos diminuem as perdas de energia por colisões, favorecendo a luminescência e quanto ao pH, a (des)protonação altera os níveis de energia dos compostos por (des)favorecer possíveis ressonâncias, deslocando tanto a posição quanto a intensidade da emissão e

*iii. temperatura*, quanto maior a temperatura, maior quantidade de colisões – maior probabilidade de desativação por processos não radiativos – e, conseqüentemente, menor luminescência. Estes fatores são decisivos para a intensidade e comprimento de onda da emissão, quando eles permitem que ela ocorra<sup>88,95</sup>.

Na literatura são reportadas várias moléculas que participam de reações como reagentes quimiluminescentes, sendo luciferina, lucigenina, lofina, isoluminol e luminol os principais exemplos. Destas, a 5-amino-2,3-ftalazina-1,4-diona, luminol, é a mais conhecida e tem sido frequentemente aplicada em estudos analíticos<sup>97,98</sup>.

Apesar do mecanismo de luminescência do luminol não estar totalmente esclarecido, a proposta inicial realizada por H. O. Albrecht, em 1928 sugere a formação do aminoftalato (Figura 5) como produto final da reação<sup>98,99</sup>.

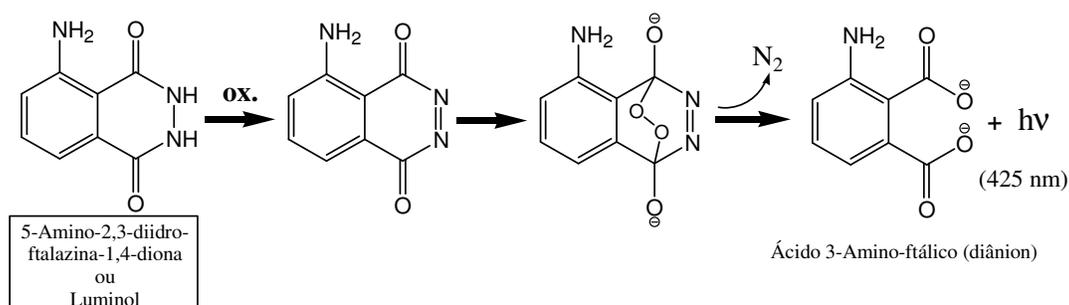


Figura 5: Esquema simplificado da oxidação do luminol.

O principal e mais conhecido oxidante desta reação é o peróxido de hidrogênio na presença de algum catalisador ( $\text{Cu}^{2+}$  ou  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ), porém vários outros reagentes podem ser usados, tais como  $\text{MnO}_4^-$ ,  $\text{I}_2$ ,  $\text{IO}_4^-$  ou  $\text{ClO}^-$ <sup>100</sup>.

O íon hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) foi um dos primeiros oxidantes empregados no estudo da luminescência do luminol e pode ser considerado o mais adequado em comparação ao peróxido de hidrogênio. A reação entre o  $\text{ClO}^-$  e o luminol apresenta menor quantidade de interferentes, além de possuir menor custo. Quanto ao solvente, estudos têm demonstrado que a utilização de solução de carbonato como meio solvente para a solução de luminol gera uma maior eficiência quântica na emissão<sup>101</sup>.

Desta forma, busca-se neste trabalho realizar, em um sistema em fluxo pulsado utilizando-se minibombas solenoide, a oxidação de compostos polifenólicos totais em vinhos, expressos como equivalentes de ácido gálico. Ou seja, indicar que quantidade de compostos peoifenólicos se comportaria na reação como se fossem apenas o ácido gálico.

O composto polifenólico (ácido gálico) reage com a solução de hipoclorito e em seguida, o luminol reage com o excesso de hipoclorito, originando a quimiluminescência. A reação química envolvida é mostrada na figura 6, cuja aplicação em vinhos ainda não foi observada na literatura.

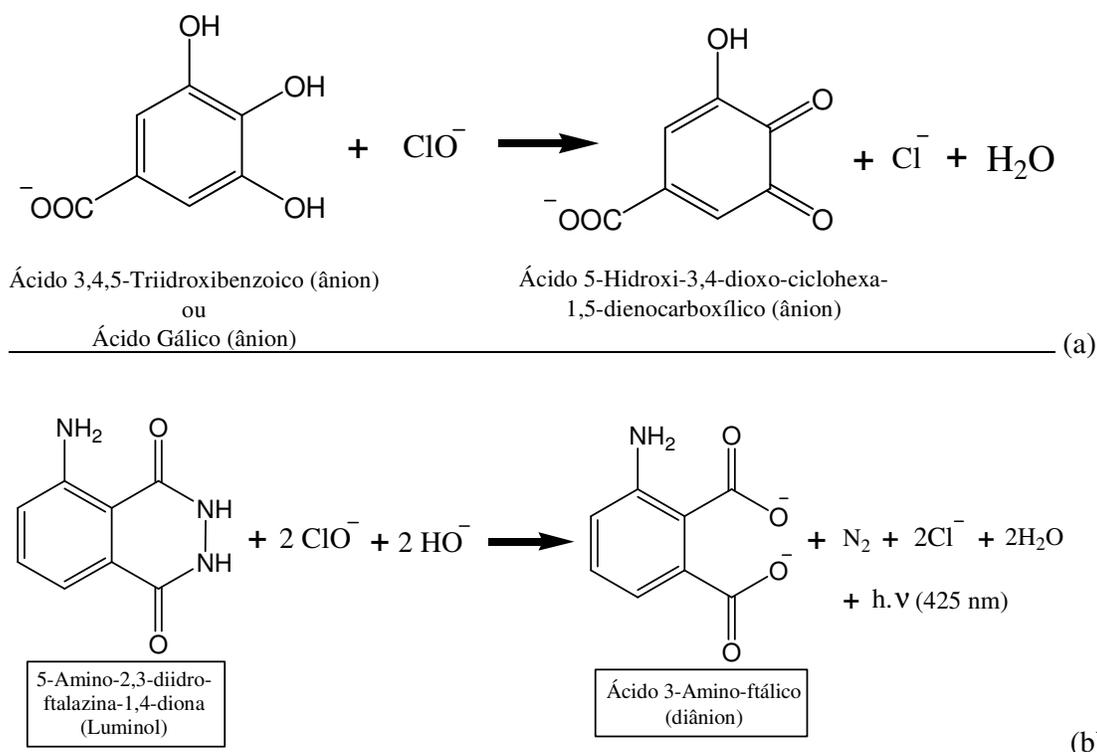


Figura 6: Reações propostas para o sistema em estudo. (a) Oxidação dos polifenóis, expressos como ácido gálico e (b) oxidação do luminol pelo excesso de hipoclorito, em meio alcalino.

A quimiluminescência tem grande importância não somente na área de química analítica, mas também em outras áreas do conhecimento, o que pode ser confirmado através do grande número de trabalhos e revisões publicados sobre o tema<sup>102</sup>.

### 1.2.6 Luminescência e análise em fluxo

O uso de reações quimiluminescentes (CL) como forma de detecção de analitos em análise em fluxo é bastante utilizada em matrizes variadas. A concentração de dopamina em injeções farmacêuticas comerciais foi determinada por FIA-CL através da reação entre luminol e [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> em meio básico<sup>103</sup>. A reação entre permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) e formaldeído (HCOH) foi utilizada em FIA para a determinação quimiluminescente de quatro drogas anti-câncer<sup>104</sup>.

Um método automático em fluxo empregando válvulas solenóide foi desenvolvido para a determinação de brometo residual em L-alanina, utilizando-se cloramina-T como oxidante do brometo e posterior oxidação do luminol<sup>105</sup>. Para a determinação de ácido ascórbico em preparados em pó para sucos de frutas foi proposta uma metodologia em fluxo<sup>106</sup> utilizando minibombas solenóide baseada no sistema luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>.

Um método baseado em MPFA foi desenvolvido para a determinação da capacidade antioxidante total (TAC) em preparações farmacêuticas. A TAC foi expressa como Trolox, ácido ascórbico e resveratrol por reação quimiluminescente. Os dois reagentes quimiluminescentes foram o luminol e a lucigenina com peróxido de hidrogênio. Porém, o trabalho não apresenta validação do método proposto<sup>107</sup>.

Catequina foi determinada em águas de rios através de um sistema de parada de fluxo (stopped-flow). A medida do aumento da intensidade de emissão na reação entre lucigenina e peróxido de hidrogênio consistia no sinal a ser medido<sup>108</sup>.

Exemplos de outros compostos usados em reações quimiluminescentes são a reação entre peróxido de hidrogênio e acetonitrila, cuja luminescência é fortemente aumentada na presença de certos compostos (que são considerados os analitos do estudo), e foi utilizada para a determinação, em produtos farmacêuticos, de tetraciclina<sup>109</sup> e melatonina<sup>110</sup> e a reação do complexo rutênio-bipiridina ( $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ ) com Ce (IV), na determinação de citrato e piruvato em formulações farmacêuticas, soro e urina<sup>111</sup>.

A reação quimiluminescente entre luminol e hipoclorito já foi empregada para algumas determinações analíticas, tais como para a determinação dos fármacos carvedilol<sup>112</sup> e gabapentina<sup>113</sup> utilizando-se a estratégia MPFA e paracetamol<sup>114</sup> por MCFA. Todos os artigos foram aplicados a formulações farmacêuticas e se basearam na captura de hipoclorito pelo analito, com diminuição da luminescência entre o excesso de hipoclorito e o luminol. A estratégia MSFIA foi aplicada com estas mesmas reações em drogas anti-inflamatórias não-esteroidais<sup>115</sup>.

### 1.2.7 Quimiluminescência, fluxo e polifenóis nos vinhos

Métodos quimiluminescentes possuem várias aplicações em vinhos, tais como a determinação do teor de 20 compostos fenólicos em vinhos chineses, sem pré-tratamento da amostra, por HPLC-CL. A metodologia consiste no aumento da quimiluminescência entre Cério(IV)-Rodamina-6G em meio de ácido sulfúrico ocasionado pela presença dos fenóis. Porém o mesmo utiliza-se de composto mais tóxico e meio fortemente ácido para a análise<sup>116</sup>. A determinação de prolina também foi realizada usando-se FIA-CL com  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$  e  $\text{PbO}_2$  em meio ácido, porém, houve a necessidade de extração inicial dos compostos fenólicos que interferiram na análise<sup>117</sup>.

Concentrações traços de sulfito foram determinadas pela oxidação do  $\text{SO}_2$ , após extração deste por uma unidade de difusão gasosa, induzida pelo complexo Ni(II)/tetraglicina na presença de luminol<sup>118</sup>.

A determinação de compostos fenólicos e ácidos orgânicos em vinhos australianos foi realizada utilizando-se LC-MS e HPLC-CL com  $\text{KMnO}_4$  em meio ácido e a classificação geográfica dos vinhos foi obtida com auxílio de ferramentas quimiométricas<sup>119</sup>.

A determinação de etanol foi realizada por MCFA e detecção da quimiluminescência gerada entre uma solução de luminol e radicais peróxidos formados após reação enzimática entre etanol e a enzima álcool oxidase<sup>120</sup>.

O teor de polifenóis totais foi determinado em vinhos por meio do reagente de Folin-Ciocalteu usando FIA com detecção espectrofotométrica. Os resultados obtidos foram satisfatórios quando comparados ao método de bancada que consiste na utilização do mesmo reagente<sup>121</sup>.

O sistema FIA-CL também foi utilizado tanto para a monitoração do teor de polifenóis totais em vinhos, chás e sucos por meio de reação quimiluminescente entre  $\text{MnO}_2$  (diluído em ácido fosfórico), formaldeído e a amostra<sup>122</sup> quanto para a determinação da capacidade antioxidante de vinhos pela reação entre permanganato de potássio/polifosfato de sódio em meio fortemente ácido e a amostra<sup>123</sup>. O primeiro artigo apresenta a desvantagem de ter um consumo muito alto de reagentes (vazão de  $11,7 \text{ mL min}^{-1}$ ) e o segundo, de usar soluções fortemente ácidas.

O complexo Co(II)/EDTA foi utilizado na atenuação da quimiluminescência da mistura luminol-perborato na determinação da capacidade antioxidante de vinhos, chás e sementes de uva por FIA<sup>124</sup>. Porém o método foi lento (cerca de 5 minutos por uma análise de uma simples amostra) e apresentou alto consumo de reagentes ( $10$  e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Co}^{2+}$  e EDTA, respectivamente).

Uma metodologia proposta para a determinação da capacidade antioxidante total (TAC) foi aplicada a vinhos gregos com SIA-CL, cuja luminescência era fornecida pela reação entre luminol e peróxido de hidrogênio catalisada por íons  $\text{Co}^{2+}$ . Este trabalho foi comparado ao método DPPH e Folin-Ciocalteu (FC), porém seus valores superestimavam (4,3 vezes) a TAC fornecida pelo método FC<sup>125</sup>.

A estratégia MSFIA foi utilizada para a automatização dos métodos de Folin-Ciocalteu e ABTS<sup>\*+</sup> e a metodologia desenvolvida aplicada a análise destes índices em amostras de chás, vinhos, cervejas e ervas com detecção espectrofotométrica<sup>126</sup>. Porém

apresentou a grande desvantagem de baixa frequência analítica (1h apenas para a construção da curva de calibração).

Para os vinhos do Vale do São Francisco, há poucas referências na literatura que os descrevam quanto às suas propriedades químicas. Neste contexto, Azevedo e colaboradores<sup>127</sup> realizaram a determinação de compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) de baixa massa molecular ( $C_1$  a  $C_8$ ) por HPLC-UV. O uso de medidas por RMN-<sup>1</sup>H e cálculos quimiométricos foram empregados em um estudo preliminar para a diferenciação de vinhos por variedades de uvas<sup>128</sup>. A determinação de parâmetros físico-químicos (pH, acidez, densidade, teor alcoólico...) e os cálculos quimiométricos envolvendo PCA e HCA foram aplicados para a distinção de vinhos do VSF e de outros vinhos comerciais<sup>129</sup> e a determinação de catequina e epicatequina por HPLC e detecção por fluorescência sem pré-tratamento da amostra<sup>130</sup>.

Como observado, não foi encontrado na literatura trabalho envolvendo a determinação de compostos polifenólicos em vinhos usando-se metodologias em fluxo mais recentes que FIA, nem mesmo a aplicação da reação entre luminol e hipoclorito em sistema em fluxo para essas determinações. Assim, esta tese vem contribuir com o desenvolvimento de um método MPFA para a determinação de compostos polifenólicos em vinhos, baseado na reação quimiluminescente entre luminol e hipoclorito e aplica-lo a amostras de vinhos elaborados no Vale do São Francisco e de outras regiões – para fins de comparação.

Espera-se, ainda, que esta metodologia venha a contribuir com os ensinamentos da química verde, pela redução do consumo de reagentes, uso de reagentes menos danosos ao ambiente e redução do rejeito gerado.

## 1.3 Parte Experimental

### 1.3.1 Soluções e reagentes

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água destilada e deionizada.

#### 1.3.1.1 Soluções estoque

Solução de carbonato de sódio  $0,250 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Vetec, 99,5%), pH = 11,00 foi preparada por dissolução de 6,659 g do reagente em 225 mL de água. O pH foi ajustado com volume necessário de solução de HCl  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  (preparado por diluição de HCl 37,0%, Merck) e o volume foi completado para 250 mL em balão volumétrico. Esta solução foi utilizada por, no máximo, dois meses.

Solução de luminol  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (3-aminofthalhidrazida,  $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ , Aldrich, 97%) foi preparada por dissolução de 0,1826 g do composto em 70 mL da solução de carbonato  $0,250 \text{ mol L}^{-1}$  e o volume foi completado em balão volumétrico para 100 mL com a solução de carbonato. Esta solução foi utilizada após um período de 48 h<sup>106</sup> e, no máximo, por um mês.

Solução de ácido gálico  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_6$ , Sigma-Aldrich, +98%) foi preparada por dissolução de 0,1106 g do ácido gálico monohidratado em 60 mL de água e o volume foi completado à 100 mL em balão volumétrico. Esta solução foi preparada diariamente.

Solução de hipoclorito de sódio  $20,5 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparada diariamente por diluição de solução branqueadora comercial (com teor de cloro ativo entre 2,0 e 2,5% v/v), previamente padronizada.

#### 1.3.1.2 Soluções de trabalho

##### 1.3.1.2.1 Solução de hipoclorito

Para a padronização do teor de hipoclorito na água sanitária, por titulação redox, utilizou-se as seguintes soluções: i)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , VETEC, 99%) – contendo 3 gotas de  $\text{CHCl}_3$  para maior estabilidade da solução; ii) 0,5% m/v de amido (VETEC); iii) 10% m/v de iodeto de sódio (NaI, Reagen, 99,5 %); iv)  $5,6 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , VETEC, 99,5%).

Na padronização inicial da solução de  $S_2O_3^{2-}$  foram medidos cerca de 20,0 mg de  $KBrO_3$  (Merck), previamente seco a 110 °C por 2 horas e dissolvidos com 5 mL de água, em erlenmeyer. Em seguida foram adicionados 5 mL da solução de NaI e 10 mL de solução de  $H_2SO_4$  4 mol  $L^{-1}$  (preparado por diluição de  $H_2SO_4$  95-97%, Merck), observando-se coloração marrom-castanho. Titulou-se imediatamente com a solução de tiosulfato até coloração amarelo-clara quando então se adicionou 5 mL da solução de amido, observando-se cor azul intensa da mistura, e a titulação continuou até a mudança da coloração para incolor.

Para a segunda padronização, teor de hipoclorito na água sanitária, procedeu-se de forma similar ao parágrafo anterior, substituindo-se a massa de  $KBrO_3$  por 5,00 mL de solução de água sanitária diluída na proporção 1:5 com água, e a solução de ácido sulfúrico por ácido acético.

Após esta padronização, diluiu-se a água sanitária para as concentrações indicadas no estudo com água.

#### 1.3.1.2.2 Luminol

A partir da solução estoque de 10,0 mmol  $L^{-1}$ , diluiu-se esta solução para concentrações variando de 0,66 a 1,06 mmol  $L^{-1}$  (em intervalo de 0,1 mmol  $L^{-1}$ ). As soluções foram diluídas com solução 0,25 mol  $L^{-1}$  de carbonato de sódio, em quantidade suficiente para um dia de trabalho.

#### 1.3.1.2.3 Ácido Gálico

As soluções de trabalho foram diluídas a partir da solução estoque, com água, para as concentrações de trabalho, variando de 10 a 100 mg  $L^{-1}$ .

### 1.3.2 Equipamentos e acessórios

#### 1.3.2.1 Descrição geral do sistema

O sistema em fluxo foi composto por duas minibombas solenóide (Bio-Chem Valve INC, 090SP12-8) com volume nominal de 8  $\mu L$  por pulso e duas minibombas solenóide (Bio-Chem Valve INC, 130SP1210) com volume nominal de 12  $\mu L$  por pulso. As linhas de transmissão foram feitas em PTFE (PoliTetraFluorEtileno ou Teflon®) de 0,8 mm de

diâmetro interno e confluência de quatro vias feita em acrílico. A cela de fluxo (figura 7) foi construída com duas peças de acrílico que comprimiam uma terceira, mais fina, na qual foi construído o percurso analítico, cujo volume interno era de, aproximadamente, 150  $\mu\text{L}$ .

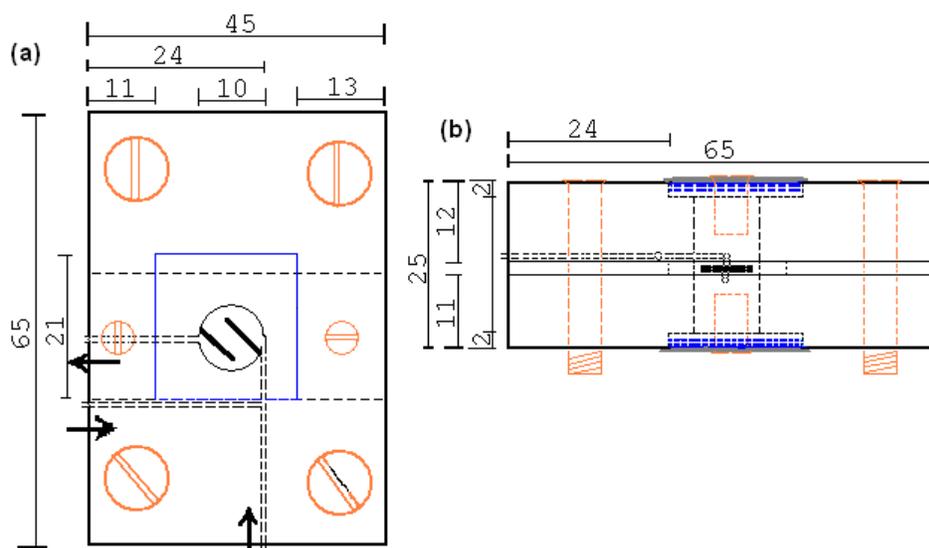


Figura 7: Cella de fluxo utilizada neste trabalho (a) vista superior e (b) vista lateral, mostrando a posição do detector, indicado em azul, os parafusos de sustentação, em vermelho, e o sentido do fluxo (unidades em mm).

Foram utilizados dois detectores Hamamatsu 1337-BR posicionados acima e abaixo do caminho de reação, visando captar o máximo possível da luminescência liberada.

O luminômetro construído consistiu de um circuito eletrônico para fornecimento de energia, uma cela de fluxo, dois detectores (Hamamatsu 1337-BR) e um sistema de transdução e amplificação de sinal (Figura 8).

O conjunto luminômetro mais cela de fluxo contendo os detectores foram acondicionadas numa caixa metálica fechada, para evitar penetração de luz. A caixa continha apenas três pequenos orifícios por onde entravam duas linhas de fluxo (mistura de hipoclorito mais amostra e luminol) e saía a linha de fluxo para o descarte.

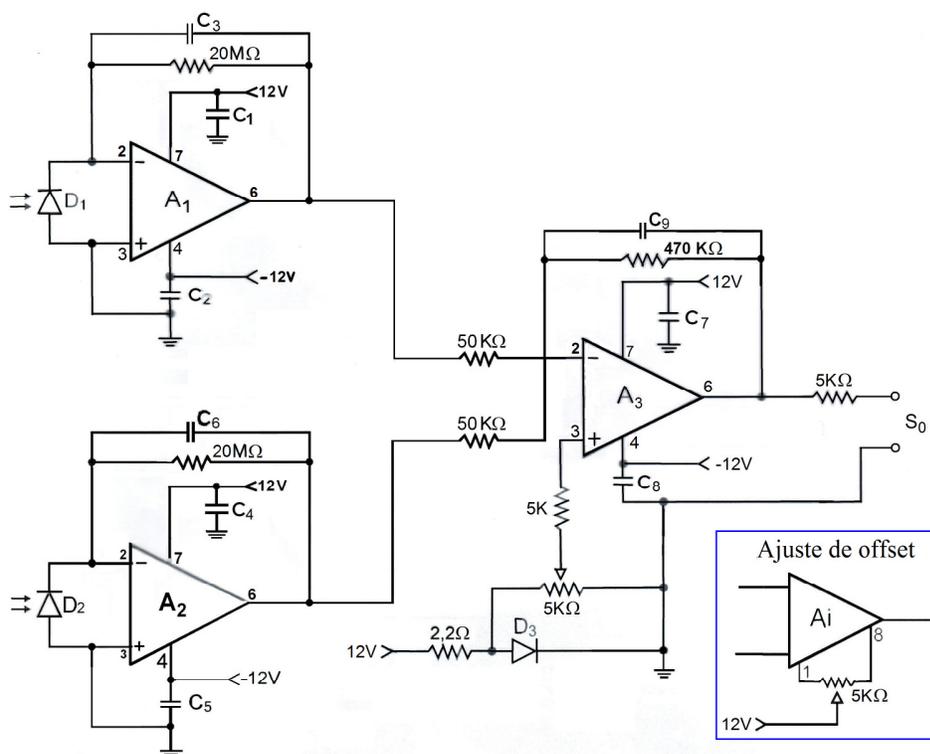


Figura 8: Descrição do circuito eletrônico do luminômetro: A = Amplificador Operacional OP07; Dx = Diodos Zener; Cx = Capacitores; Rx = Resistores; S<sub>0</sub> = Saída do sinal para PCL 711 (em mV).

Uma fonte de alimentação regulada em 12 V foi construída sobre uma placa de circuito impressa para o acionamento das minibombas e do luminômetro, Figura 9a e 9b, respectivamente. A fonte era constituída por um transformador 220 V/12 V de saída, dois diodos retificadores, um regulador de voltagem ajustável, capacitores eletrolíticos e resistores.

O controle do sistema foi realizado por meio de um microcomputador AMD K6 366 MHz, 128MB RAM, equipado com uma interface PCL-711 utilizada para a aquisição do sinal analítico empregando um programa escrito no software QuickBasic 4.5. Uma interface eletrônica lab-made baseada no circuito integrado ULN2803A (Figura 10), acoplada à saída de impressora, foi usada para permitir o controle das minibombas através da porta paralela

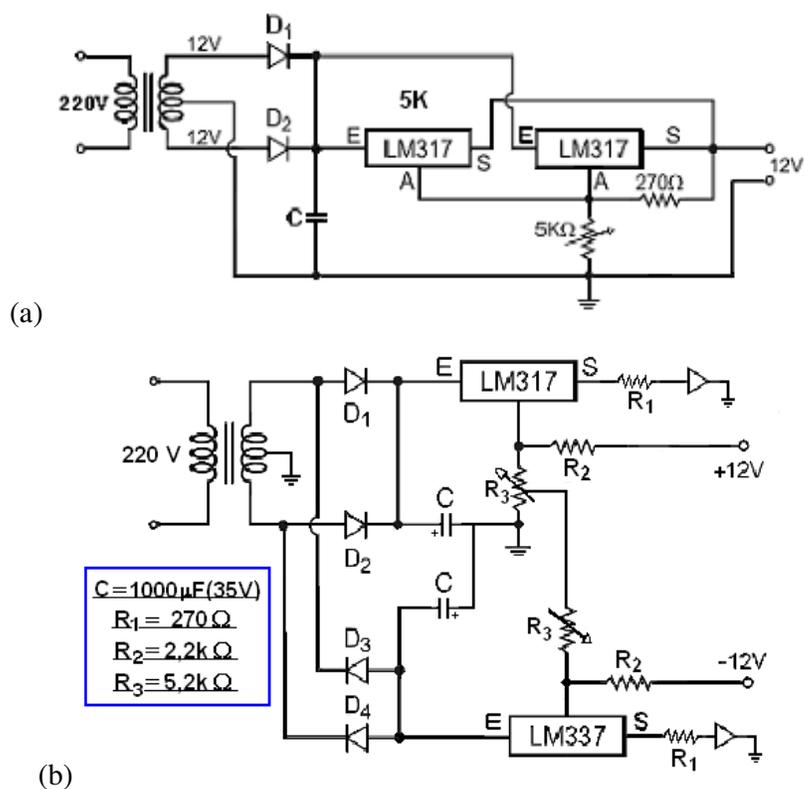


Figura 9: Fontes de alimentação para o acionamento (a) das minibombas e (b) para o luminômetro. LM337 e LM317 = Reguladores ajustáveis de voltagem para negativo e positivo, respectivamente, E = entrada, S = saída, A = Ajuste, Dx = Diodos zener, C = capacitor, Rx = resistores.

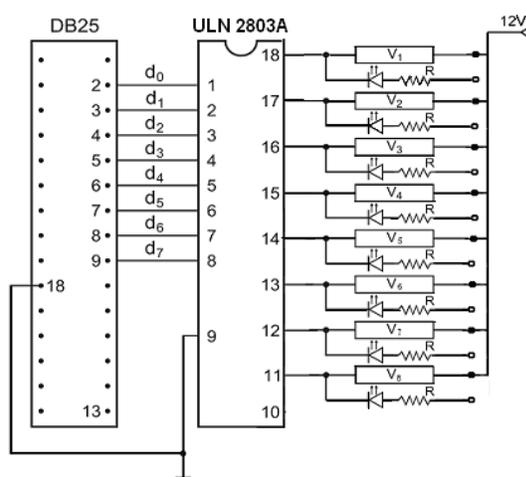


Figura 10: Interface eletrônica baseada no CI ULN2803 para controle das minibombas solenóide ( $V_x$ ) através da porta serial (DB25).

### 1.3.2.2 Operação do sistema em fluxo proposto

O diagrama esquemático do sistema MPFA proposto, bem como da sequência de pulsos, está indicado na figura 11.

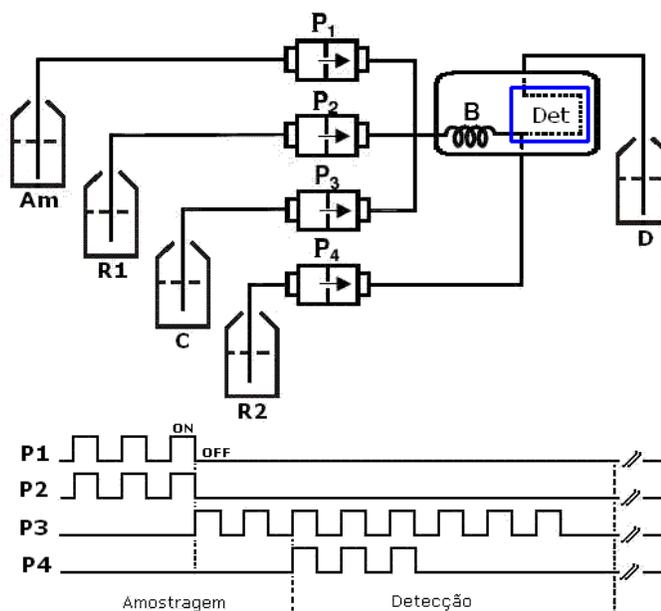


Figura 11: Diagrama esquemático do sistema utilizado na análise em fluxo. Am = Amostra ou solução de referência; C = Solução transportadora (H<sub>2</sub>O); R1 = Solução de hipoclorito; R2 = Solução de luminol; B = Reator PTFE, 0,8 mm d.i., 40 cm; Det = Detector (luminômetro); D = descarte; P1 e P2 (8 µL), P3 e P4 (12 µL) = minibombas solenóide; Posições ON e OFF representam as minibombas ligada e desligada, respectivamente.

Inicialmente a minibomba P1 (soluções de referência ou a amostra) pulsa conjuntamente com a minibomba P2 (primeiro reagente – solução de hipoclorito) para a efetivação da primeira reação (ver Figura 6, página 34). Em seguida, a minibomba P3 (transportador – água) bombeia a mistura até a cela de detecção com um número de pulsos determinado pelo comprimento do reator.

Neste ponto, o excesso de hipoclorito que não reagiu irá oxidar a solução de luminol, bombeada pela minibomba P4 em conjunto com P3, gerando a quimiluminescência (Figura 6, página 34), cuja intensidade é captada pelo detector e o sinal obtido é traçado na tela do computador.

A limpeza da cela é realizada pelo acionamento de P3 que insere o transportador, H<sub>2</sub>O, no sistema, transportando o produto da reação para o descarte, lavando o sistema e iniciando um novo ciclo de amostragem.

### 1.3.3 Avaliação da vazão e estabilidade das minibombas

Como cada sistema em fluxo possui uma resistência hidrodinâmica determinada, estudou-se como as minibombas se comportam neste sistema específico, verificando se os volumes propelidos são os mesmos que os indicados em suas especificações de fábrica.

O sistema em fluxo foi preenchido com água destilada e em seguida se bombeou 05 pulsos individuais de cada minibomba, medindo-se a massa de água recolhida em um pequeno frasco previamente seco, num total de 10 replicatas.

Utilizou-se a densidade ( $d = m / v$ ) para encontrar o volume de água expelida, tendo o cuidado de se manter todo o conjunto em equilíbrio térmico a uma temperatura determinada.

### 1.3.4 Estudo do ruído do sistema e luminescência da amostra

Para verificar como o sistema eletrônico se comporta frente a possíveis variações de tensão do fornecimento de energia elétrica, bem como a presença de radiação espúria, com e sem reação, realizou-se o monitoramento tanto do sinal do branco analítico quanto de água usada no lugar de todos os reagentes.

Em relação à possível luminescência da amostra, substituiu-se apenas a solução de hipoclorito por água na minibomba P2 para verificar os sinais obtidos da reação do ácido gálico com o luminol.

Um segundo teste de luminescência da amostra foi realizado, substituindo-se o luminol, na minibomba P4, por água para verificar se a emissão vermelha que ocorre na reação entre ácido gálico e hipoclorito se mantém até a chegada da mistura ao detector, causando alguma interferência.

### 1.3.5 Estudo da estabilidade dos reagentes

Buscando-se verificar o tempo de vida útil das soluções preparadas para as análises, comparou-se a resposta analítica do sistema com soluções recém-preparadas e soluções preparadas com alguns dias de antecedência. Desta forma estudou-se a estabilidade das soluções de hipoclorito, luminol e ácido gálico.

Para a verificação da estabilidade da solução de carbonato de sódio, realizou-se medida semanal do valor do pH da mesma.

Quanto à estabilidade da solução de hipoclorito (água sanitária), realizou-se titulações semanais com a solução padronizada de tiosulfato de sódio.

### 1.3.6 Influência dos parâmetros físicos e químicos na resposta do sistema

#### 1.3.6.1 Efeito da proporção de pulsos

Para se estudar a estequiometria reacional, buscou-se avaliar qual seria a melhor proporção de pulsos entre as soluções de hipoclorito e solução de referência  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Variou-se as proporções de 2:1; 1:1 e 1:2, mantendo-se constantes o pH da solução de carbonato (11,0), as concentrações de luminol ( $0,86 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e hipoclorito ( $26,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), o solvente do hipoclorito (água), cinco pulsos das minibombas contendo as soluções de amostras e reagentes e 40 cm para a bobina de reação.

#### 1.3.6.2 Efeito do pH da solução do luminol

Sabe-se da literatura que o luminol possui luminescência em soluções básicas. Para verificar qual o melhor pH da solução de luminol neste sistema, variou-se o mesmo na faixa de 9,5 a 12,0. Este ajuste foi realizado com a adição de volume necessário de ácido clorídrico  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  na solução de carbonato de sódio  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ . Foram fixados os valores de concentração do luminol ( $0,86 \text{ mmol L}^{-1}$ ), água como solvente do hipoclorito, concentração do hipoclorito em  $26,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , 5 pulsos para as minibombas contendo as soluções dos reagentes e dos padrões e bobina de reação em 40 cm.

#### 1.3.6.3 Efeito da concentração do luminol

Verificou-se a quantidade de reagente necessária à reação variando-se a concentração do luminol na faixa de  $0,66 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $1,06 \text{ mmol L}^{-1}$ . Manteve-se constante água como solvente do hipoclorito, concentração do hipoclorito  $26,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , 5 pulsos das minibombas dos reagentes e padrões e 40 cm para a bobina.

#### *1.3.6.4 Efeito do meio solvente para solução de hipoclorito*

Foram estudados quatro sistemas que poderiam ser usados como solvente da solução do hipoclorito: água,  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  NaOH,  $0,250 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$ . Como a diluição do hipoclorito comercial com água na concentração de trabalho fornece o valor de pH 11, buscou-se manter este valor fixo nas outras duas soluções alcalinas. O emprego da solução de  $\text{HNO}_3$  para fornecer um pH 4 foi utilizado, pois sabe-se que o HClO é um oxidante mais forte que o íon  $\text{ClO}^-$ , e isto poderia fornecer uma reação mais efetiva<sup>101a</sup>. Fixaram-se os valores de concentração do hipoclorito em  $26,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , 5 pulsos das soluções de reagentes e padrões e 40 cm para a bobina.

#### *1.3.6.5 Efeito da concentração do hipoclorito*

Visando descobrir qual a melhor concentração do hipoclorito para o sistema, variou-se sua concentração na faixa de 19,5 a  $33,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , mantendo-se constante 5 pulsos das soluções de reagentes e padrões e 40 cm para a bobina.

#### *1.3.6.6 Efeito do número de pulsos*

A influência da quantidade de solução de reagentes e amostra sobre a resposta do sistema foi verificada com a variação do número de pulsos de cada minibomba. Variou-se o número de acionamentos entre 3 e 8, mantendo-se constante o comprimento da bobina de reação em 40 cm.

#### *1.3.6.7 Efeito do comprimento do reator*

Para verificar a influência da cinética da reação de oxidação do ácido gálico pelo hipoclorito, variou-se o comprimento do reator de 30 a 60 cm, mantendo-se constante os parâmetros selecionados nas etapas de otimização anteriores.

### 1.3.7 Figuras de mérito do método

Com o objetivo de se determinar as características analíticas do método proposto, foram avaliados o efeito matriz e as figuras de mérito, tais como linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetitividade) e veracidade.

### 1.3.8 Amostras e análise das amostras

As amostras de vinhos foram adquiridas no comércio local da região metropolitana de Recife. A tabela 1 indica as características dos vinhos analisados neste trabalho.

Após abertos, os vinhos tintos foram diluídos 200 vezes com água deionizada. Os vinhos brancos, devido ao seu menor teor de compostos polifenólicos, foram diluídos 15 vezes.

Tabela 1: Descrição geral dos vinhos utilizados neste trabalho.

Amostra	Região	Variedade	Safra	Teor alcoólico	Tipo
1	VSF	Chenin Blanc	2009	12%	Branco seco
2	VSF	Chenin Blanc	2009	12%	Branco seco
3	VSF	Chenin Blanc	2009	12%	Branco seco
4	RS	Chardonnay	2011	12%	Branco seco
5	VSF	Cabernet Sauvignon	2010	12%	Tinto seco
6	VSF	Cabernet Sauvignon	2010	12%	Tinto seco
7	VSF	Cabernet Sauvignon	2010	12%	Tinto seco
8	VSF	Shiraz/Syrah	2010	13%	Tinto seco
9	RS	Cabernet Sauvignon	2010	12%	Tinto seco
10	RS	Cabernet Sauvignon/Merlot	2010	12%	Tinto seco
11	Chile	Cabernet Sauvignon	2012	13,5%	Tinto seco
12	Chile	Cabernet Sauvignon	2009	13%	Tinto seco
13	Chile	Cabernet Sauvignon	2010	13,5%	Tinto seco
14	Chile	Cabernet Sauvignon	2009	14%	Tinto seco
15	Chile	Cabernet Sauvignon	2009	13%	Tinto seco
16	Chile	Shiraz/Syrah	2010	13,5%	Tinto seco

## 1.4 Resultados e Discussão

### 1.4.1 Estudo da vazão das minibombas

O trabalho foi realizado a temperatura de 23 °C, na qual a densidade tabelada para a água possui o valor  $d = 0,99757 \text{ g mL}^{-1}$  <sup>131</sup>.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos, indicando os valores encontrados para o bombeamento de 5 pulsos, a massa média e o respectivo desvio padrão, o volume correspondente e o volume médio por pulso para cada minibomba utilizada no estudo.

Tabela 2: Resultados obtidos, volume médio e seu respectivo desvio padrão (SD) para o volume por pulso de cada minibomba solenóide e seus respectivos valores nominais.

	P1 (amostra)	P2 (hipoclorito)	P3 (H <sub>2</sub> O)	P4 (luminol)
Volume nominal:	8,0 µL	8,0 µL	12,0 µL	12,0 µL
Valores individuais (g):	0,0265	0,0278	0,0334	0,0302
	0,0668	0,0620	0,0285	0,0270
	0,0268	0,0278	0,0320	0,0302
	0,0666	0,0647	0,0280	0,0265
	0,0273	0,0288	0,0325	0,0306
	0,0671	0,0672	0,0270	0,0279
	0,0271	0,0288	0,0314	0,0311
	0,0655	0,0673	0,0263	0,0262
	0,0270	0,0288	0,0311	0,0314
	0,0672	0,0667	0,0268	0,0288
Média (g):	0,0277	0,0314	0,0661	0,0273
Desvio-padrão (g):	0,0009	0,0010	0,0017	0,0009
Desvio-padrão (%):	3,2	3,2	2,6	3,3
Volume (µL):	27,7	31,5	66,3	27,4
Volume/pulso (µL):	5,5 ± 0,2	6,3 ± 0,2	13,3 ± 0,3	5,5 ± 0,2

Observa-se que as minibombas estão inserindo volumes distintos de seus respectivos valores nominais. Somente a minibomba P3 está inserindo volume médio superior ao seu catalogado e que as demais apresentam desgaste, sendo a P4 com maior variação – provavelmente devido ao desgaste natural pelo seu maior tempo de uso no laboratório. Estes dados são importantes para a estequiometria da reação química envolvida bem como para os cálculos do consumo de soluções e geração de resíduos.

Os volumes liberados pelas minibombas, juntamente com a frequência de pulso inserida no programa de controle, fornece as seguintes vazões para cada uma delas: P1 = 27,5 µL s<sup>-1</sup>; P2 = 31,5 µL s<sup>-1</sup>; P3 = 66,5 µL s<sup>-1</sup> e P4 = 27,5 µL s<sup>-1</sup>.

### 1.4.2 Estudo do ruído do sistema e luminescência da amostra

Em relação a possíveis variações da tensão ou presença de radiação espúria, observou-se um ruído instrumental de cerca de 2,2 mV, correspondendo a 0,1 % do fundo de escala (figura 12a), quando todo o sistema está preenchido com água. Com a adição dos reagentes e análise do branco analítico verificam-se boa repetibilidade dos valores (figura 12b) e uma variação de fundo (drift) menor que  $7 \text{ mV h}^{-1}$ .

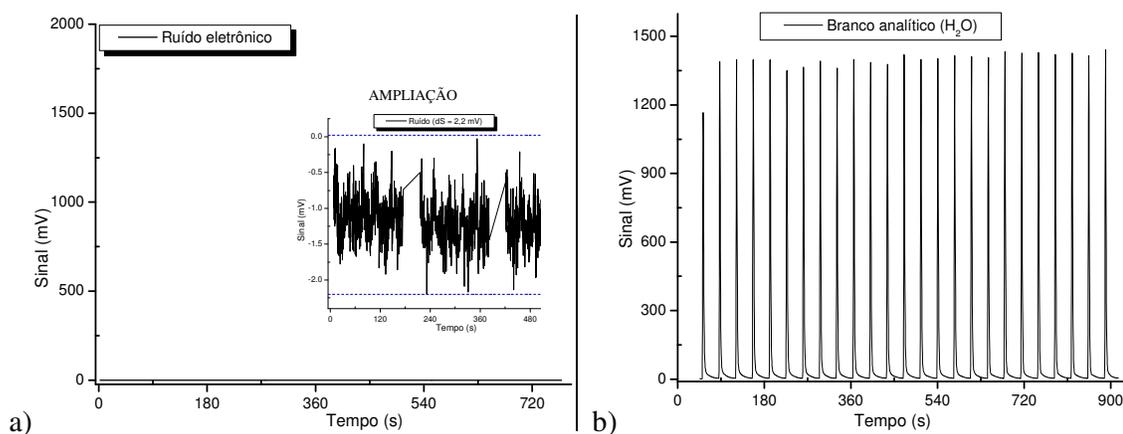


Figura 12: Ruído instrumental observado com a utilização de água em todas as minibombas e sua ampliação de escala (a) e repetibilidade do método, demonstrada pela análise do branco analítico (b).

Quando da substituição do luminol por água para verificação do sinal devido à luminescência entre ácido gálico e hipoclorito, observa-se que a mesma não interfere na análise (figura 13). Esta mesma conclusão é obtida para a reação entre ácido gálico e luminol, sem a presença de hipoclorito.

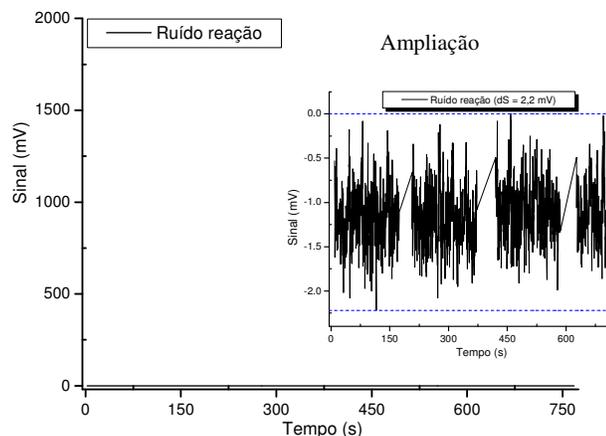


Figura 13: Estudo do ruído devido à reação entre ácido gálico e luminol. Valores válidos também para a reação entre ácido gálico e hipoclorito no sistema em estudo.

Todas estas conclusões interpretadas até o momento sugerem a possibilidade da aplicação desta reação na determinação de ácido gálico (tomado como padrão de polifenóis).

#### 1.4.3 Estabilidade dos Reagentes

A estabilidade da solução de hipoclorito foi testada com soluções nas concentrações de 8,8; 11,2 e 14,7 mmol L<sup>-1</sup> preparadas para análise imediata e outras com as mesmas concentrações, porém preparadas no dia anterior contra uma curva padrão de ácido gálico. Obtiveram-se os resultados (normalizados) expostos na figura 14. Utilizando-se estas soluções, construíram-se curvas analíticas para obter os parâmetros sinal do branco (o coeficiente linear da reta – sbr, medido em mV) e coeficientes angular (a, medido em mV L mol<sup>-1</sup>) e de correlação (r). Avaliaram-se estes três parâmetros para melhor estudar o sistema.

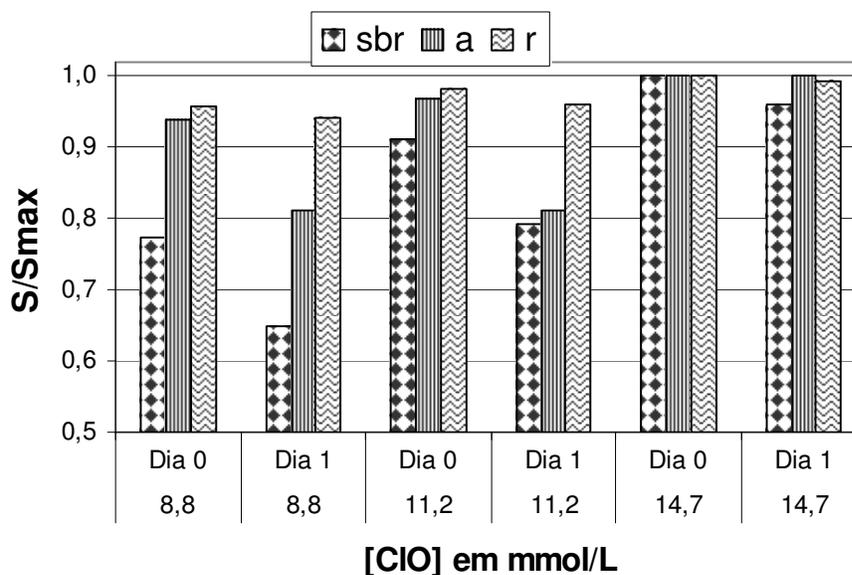


Figura 14: Estudo da estabilidade da solução de hipoclorito em diferentes datas e concentrações de preparo. sbr: sinal do branco; a: coeficientes angular; r: coeficiente de correlação.

Observa-se no gráfico que a variação de um dia no preparo da solução afeta a resposta do sistema, principalmente em concentrações mais baixas de hipoclorito, indicando serem estas mais instáveis. Para a maior concentração,  $14,7 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{ClO}^-$ , ainda ocorre uma variação significativa para o sinal do branco (SBr). Portanto, soluções de hipoclorito foram utilizadas somente no dia do preparo.

A solução de luminol foi testada por um período de sete semanas, comparando-se com uma solução anteriormente preparada com outra, no dia da análise. Os resultados estão expressos na figura 15.

Verifica-se queda brusca nos parâmetros avaliados após 49 dias de uso. Decorridos 28 dias ainda observa-se aumento, em relação ao dia 0, no coeficiente angular da curva analítica. Tais resultados também confirmam o conhecimento prévio que soluções de luminol somente deverão ser utilizadas após 48h de preparo, pois – como pode ser visto na figura 15 – a sensibilidade (dada pelo coeficiente angular) aumenta com o tempo, até que seja alcançado o prazo de validade da mesma. Portanto, neste experimento, a solução de luminol deve ser utilizada por um período não superior a 28 dias.

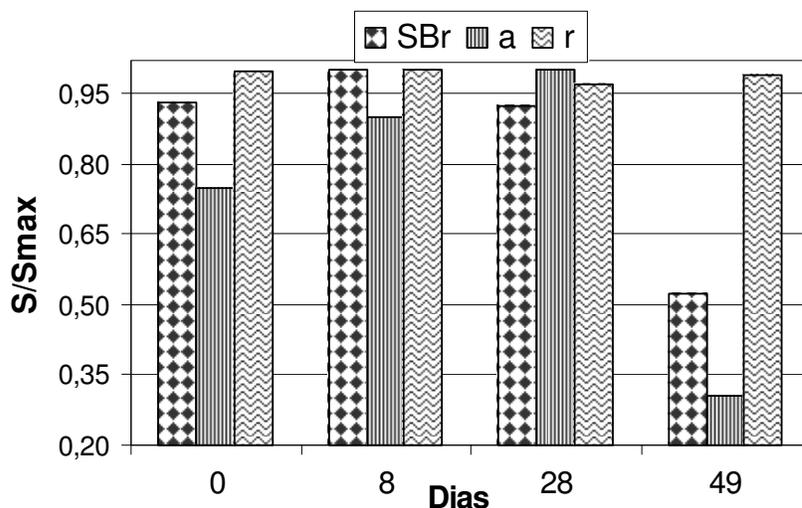


Figura 15: Estabilidade da solução de luminol  $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$  em função de seu envelhecimento. sbr: sinal do branco; a: coeficientes angular; r: coeficiente de correlação.

O ácido gálico foi testado com um intervalo de seis dias no preparo das soluções. Observou-se variação significativa para o coeficiente angular, com decréscimo da sensibilidade neste período, já no segundo dia de estocagem. Desta forma, devem ser utilizadas apenas soluções recém-preparadas deste ácido.

As medições periódicas do valor do pH da solução de carbonato de sódio, inicialmente pH 11,01, mostraram pouca variação ao longo do período. Verificando-se diferenças de -1 % no valor após 51 dias de trabalho (pH 10,90), e -2,4 % após 58 dias (pH 10,76). Portanto, a solução de carbonato permaneceu estável (admitindo-se variação menor que 1%) nas determinações por, no máximo, sete semanas.

Nas titulações da solução comercial de água sanitária observou-se que houve estabilidade no teor de hipoclorito em torno do valor  $0,36 \text{ mol L}^{-1}$ , com variação menor que  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  – durante um período de seis semanas – quando armazenada sob refrigeração. Não foi testada a estabilidade da mesma num período superior a este.

#### 1.4.4 Influência dos parâmetros físicos e químicos na resposta do sistema

Para o estudo dos parâmetros que influenciam o desempenho do sistema, construiu-se uma curva analítica de concentração do ácido gálico  $x$  sinal instrumental detectado, para cada parâmetro avaliado. A partir da construção destas curvas, foram obtidos o coeficiente linear (Sbr), coeficiente angular da curva (a) e coeficiente de correlação (r).

Optou-se por maximizar o coeficiente linear da curva. Porém, quando apenas este valor deixa dúvidas quanto à escolha do ponto ótimo de análise, traçou-se (no mesmo gráfico) outro parâmetro da curva obtida para, assim, selecionar o valor ótimo.

Em cada parâmetro avaliado, informa-se apenas os valores das variáveis ainda em estudo. Os valores já selecionados como pontos ótimos dos estudos anteriores são mantidos constantes, porém não mais mencionados.

#### 1.4.4.1 Influência da proporção de pulsos

Na avaliação da proporção do número de pulsos, mantiveram-se o pH da solução de carbonato (pH = 11,0), as concentrações de hipoclorito ( $26,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e luminol ( $0,86 \text{ mmol L}^{-1}$ ), água como solvente para o hipoclorito, cinco pulsos das minibombas e 40 cm para o comprimento da bobina de reação. Os resultados estão expressos na figura 16.

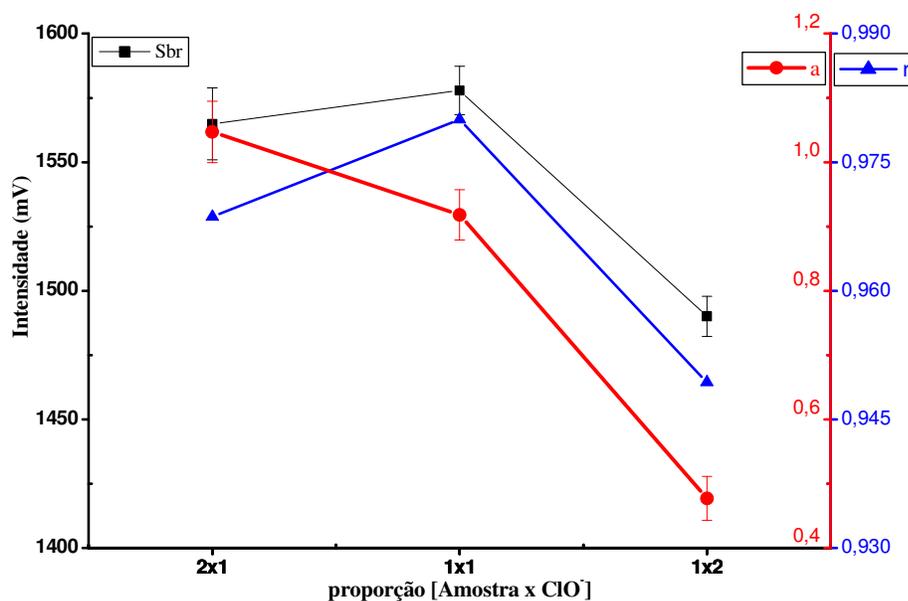


Figura 16: Efeito da proporção de pulsos entre solução de amostra/padrão e solução de hipoclorito.

Nesta figura percebe uma melhora nas respostas quando se opera o sistema numa proporção 1:1 para soluções amostra/padrão e hipoclorito. Para a proporção 1:2, a diminuição dos valores foi devido à menor quantidade de solução de referência utilizada. Portanto, a proporção 1:1 foi escolhida como a melhor para prosseguir com as otimizações.

#### 1.4.4.2 Influência do pH da solução do luminol

A construção das curvas analíticas com as soluções de calibração de ácido gálico variando-se o pH das soluções de luminol, forneceram os parâmetros  $a$ ,  $r$  e  $S_{br}$ . Mantiveram-se constante a concentração do luminol em  $0,86 \text{ mmol L}^{-1}$ , concentração do hipoclorito em  $26,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , água como solvente de hipoclorito, 5 pulsos das minibombas e 40 cm para o comprimento da bobina.

Na Figura 17, observa-se que, em relação à  $S_{br}$ , pH 11,5 e 12,0 apresentam uma resposta constante, com saturação do detector. Assim, selecionou-se o valor imediatamente inferior a esses dois para aumentar a estabilidade do sinal e o valor de pH igual a 11,0 será utilizado nos estudos futuros como ponto ótimo.

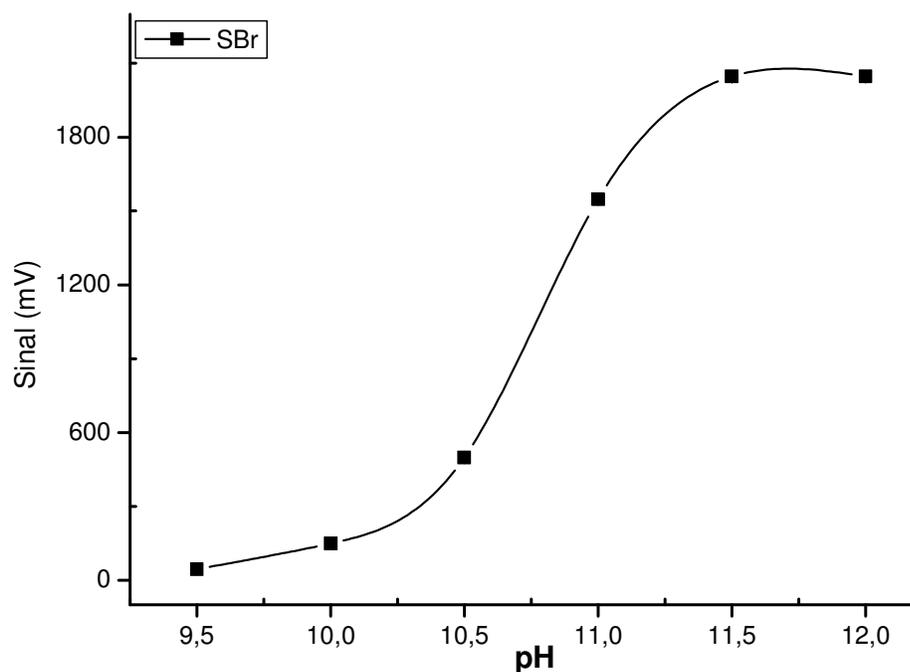


Figura 17: Resposta de Sinal do Branco ( $S_{br}$ ) da curva analítica em função da variação do pH da solução do luminol.

#### 1.4.4.3 Efeito da concentração do hipoclorito

No estudo da variação da concentração do hipoclorito os resultados obtidos para a maximização da resposta do branco, são mostrados na figura 18. Mantiveram-se constantes a concentração do luminol em  $0,86 \text{ mmol L}^{-1}$  (em  $\text{pH} = 11,0$ ), água como solvente do hipoclorito, 5 pulsos das minibombas e o comprimento da bobina em 40 cm.

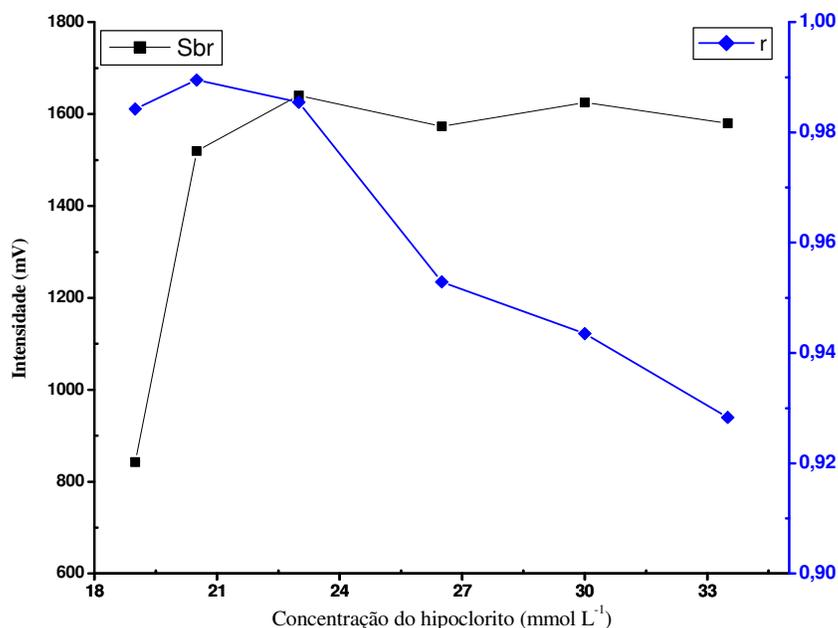


Figura 18: Respostas relativas de Sinal do Branco (SBr); coeficiente de correlação (r) e coeficiente angular (a) da curva analítica em função da variação da concentração da solução do hipoclorito.

Visivelmente, no intervalo de 23,0 a 33,5 mmol L<sup>-1</sup>, praticamente não há variação para Sbr (0,6% de diferença entre o maior e o menor valor). Portanto, traçou-se também os valores do coeficiente de correlação para auxiliar na escolha. Verifica-se que com o aumento da concentração do hipoclorito, ocorreu também o aumento do sinal de todas as soluções injetadas, implicando na redução da linearidade e, conseqüentemente, do valor de r. Assim sendo, optou-se por trabalhar com a concentração 23,0 mmol L<sup>-1</sup> no restante do trabalho.

#### 1.4.4.4 Efeito da concentração do luminol

A concentração de luminol que melhor se adequou ao sistema em estudo foi avaliada analisando-se os resultados da figura 19. Mantiveram-se constantes a água como solvente do hipoclorito, 5 pulsos das soluções de reagentes e amostras e 40 cm para o comprimento da bobina.

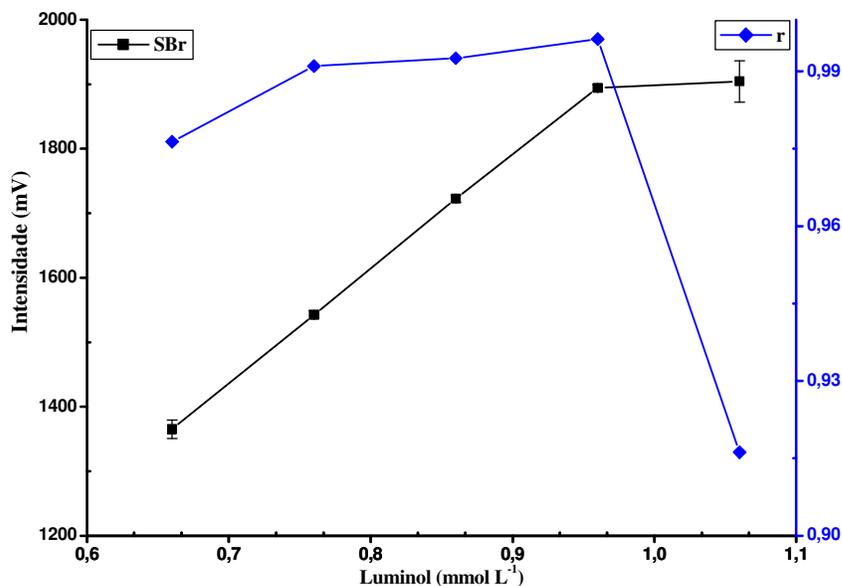


Figura 19: Respostas relativas de Sinal do Branco (SBr), coeficiente de correlação (r) e angular (a) da curva analítica em função da variação da concentração do luminol.

Em relação à intensidade do sinal do branco (Sbr), verifica-se um crescente (e linear) aumento nas respostas, até alcançar um patamar, entre 0,96 e 1,06 mmol L<sup>-1</sup>, com valores praticamente idênticos. Para melhorar a avaliação, observa-se que os valores para o coeficiente de correlação vão ganhando um leve aumento até a concentração de 0,96 mmol L<sup>-1</sup>, quando ocorre um decréscimo acentuado da linearidade.

Desta forma, a concentração de luminol em 0,96 mmol L<sup>-1</sup> foi selecionada para as demais etapas do trabalho.

#### 1.4.4.5 Efeito do meio solvente para a solução do hipoclorito

As respostas obtidas neste estudo estão indicadas no gráfico da figura 20. Mantiveram-se constantes os valores selecionados até o presente momento, cinco pulsos para as soluções de amostra e reagentes e 40 cm para a bobina.

Já foi mencionado na literatura<sup>101</sup> que o HClO é um oxidante mais efetivo que o íon ClO<sup>-</sup>, desta forma, testou-se também como solvente da água sanitária uma solução de HNO<sub>3</sub> 0,5 mmol L<sup>-1</sup> (pH ≈ 4).

Porém, para o pH ácido, há decréscimo das respostas. Não é possível afirmar se ocorre ou não melhorias no poder oxidante da solução de hipoclorito, pois pode ter ocorrido

consumo parcial da alcalinidade da solução do luminol, com diminuição da eficiência de luminescência. Para as soluções de pH básico, ocorre uma saturação de sinal – na concentração  $c = 0 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico – para a solução de carbonato de sódio. Comparando-se água com solução de hidróxido de sódio, pela sua maior linearidade (melhor valor de  $r$ ), recomenda-se a utilização da água – mais prático e menos danoso ao ambiente.

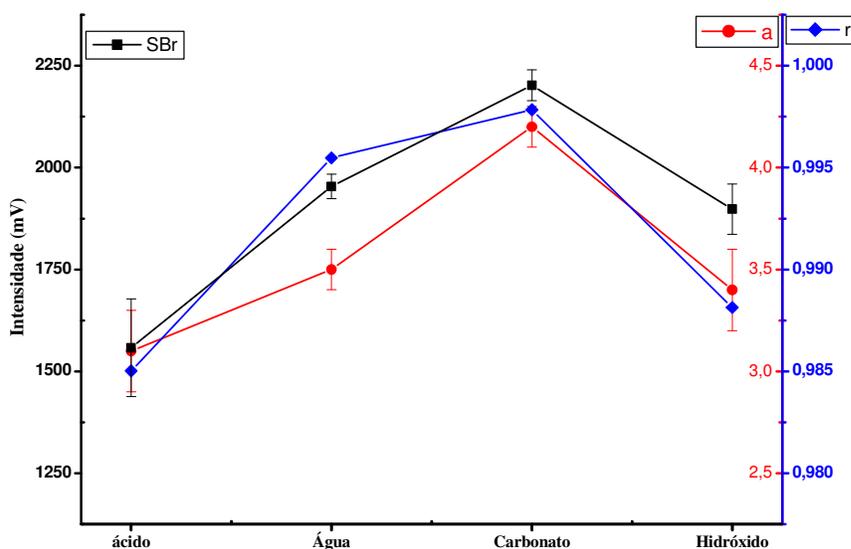


Figura 20: Respostas relativas de Sinal do Branco (Sbr), coeficiente de correlação ( $r$ ) e angular ( $a$ ) da curva analítica em função da variação do meio solvente do hipoclorito.

#### 1.4.4.6 Efeito do número de pulsos

Os valores de Sbr,  $a$  e  $r$  obtidos nesta etapa de otimização estão indicados na figura 21. Manteve-se constante o comprimento da bobina em 40 cm.

Verifica-se um contínuo aumento dos três parâmetros obtidos até o número de pulsos igual a seis. Com sete pulsos observou-se saturação de sinal – na concentração  $c = 0 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico. Portanto se selecionou seis pulsos como valor ótimo de cada minibomba.

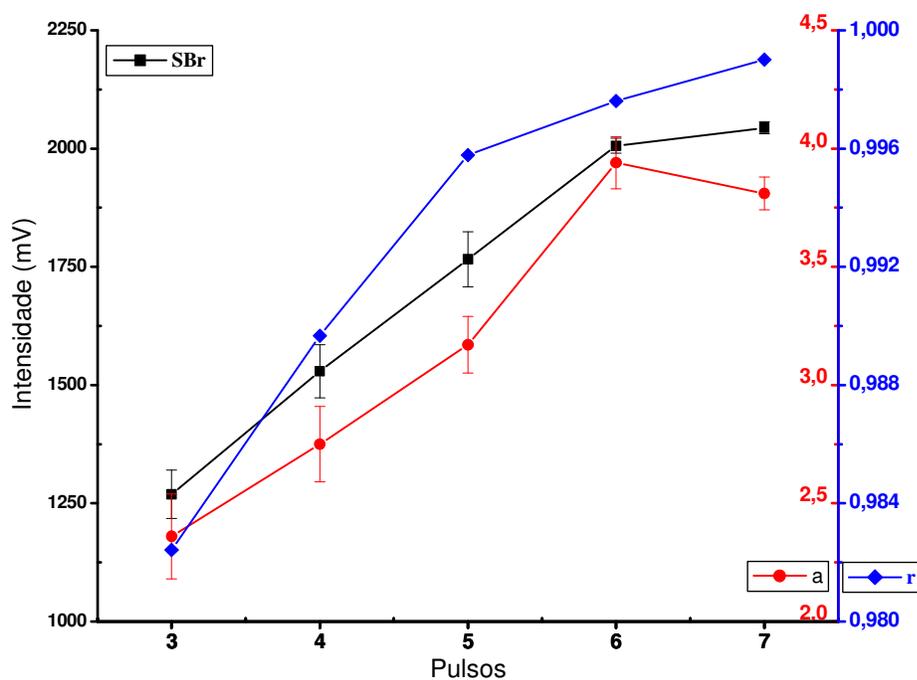


Figura 21: Respostas relativas de Sinal do Branco (SBr), coeficiente de correlação ( $r$ ) e angular ( $a$ ) da curva analítica em função da variação do número de pulsos.

#### 1.4.4.7 Efeito do comprimento do reator

Os resultados obtidos no estudo do efeito do comprimento do reator estão indicados na figura 22. Todos os valores selecionados anteriormente foram mantidos constantes.

Observa-se na figura 22 que os melhores valores em conjunto estariam distribuídos na faixa de 45 e 60 cm para o reator. Porém, há saturação do sinal acima de 45 cm e este, conseqüentemente, foi tomado como valor ótimo.

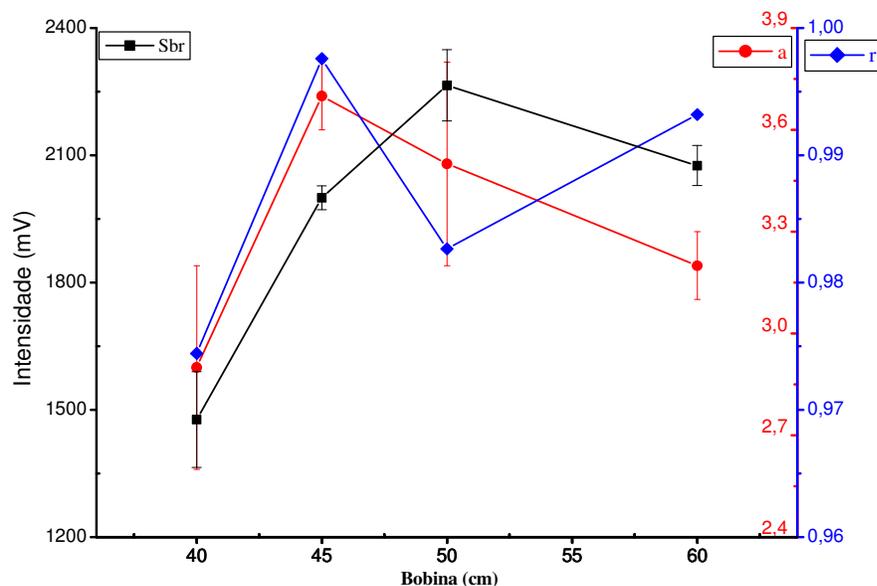


Figura 22: Gráfico das respostas relativas de Sinal do Branco (SBr), coeficiente de correlação (r) e angular (a) da curva analítica em função da variação do tamanho do reator, medido em cm.

Após o processo de otimização do sistema, cujos valores selecionados estão indicados na tabela 3, prosseguiu-se com a validação do método, através da determinação das figuras de mérito do sistema desenvolvido.

Tabela 3: Valores selecionados após o processo de otimização do sistema.

Variável	Faixa estudada	Valor selecionado
Proporção de pulsos (AG:ClO <sup>-</sup> )	2x1; 1x1; 1x2	1x1
pH	9,5 – 12,0	11,0
[ClO <sup>-</sup> ] (mmol L <sup>-1</sup> )	19,0 – 33,5	23,0
[Luminol] (mmol L <sup>-1</sup> )	0,66 – 1,06	0,96
Solvente hipoclorito	Ácido; água; carbonato; hidróxido	Água
Número de pulsos	3 – 7	6
Bobina (cm)	40 – 60	45

#### 1.4.5 Figuras de mérito

Inicialmente buscou-se verificar se a matriz do vinho poderia interferir nas análises. Desta forma, realizou-se a construção de três curvas de calibração: i) soluções de referência dissolvidas em água; ii) **solução de ácido gálico adicionadas a um vinho tinto** e iii) **solução de ácido gálico adicionada a um vinho branco**. O resultado está mostrado na figura 23.

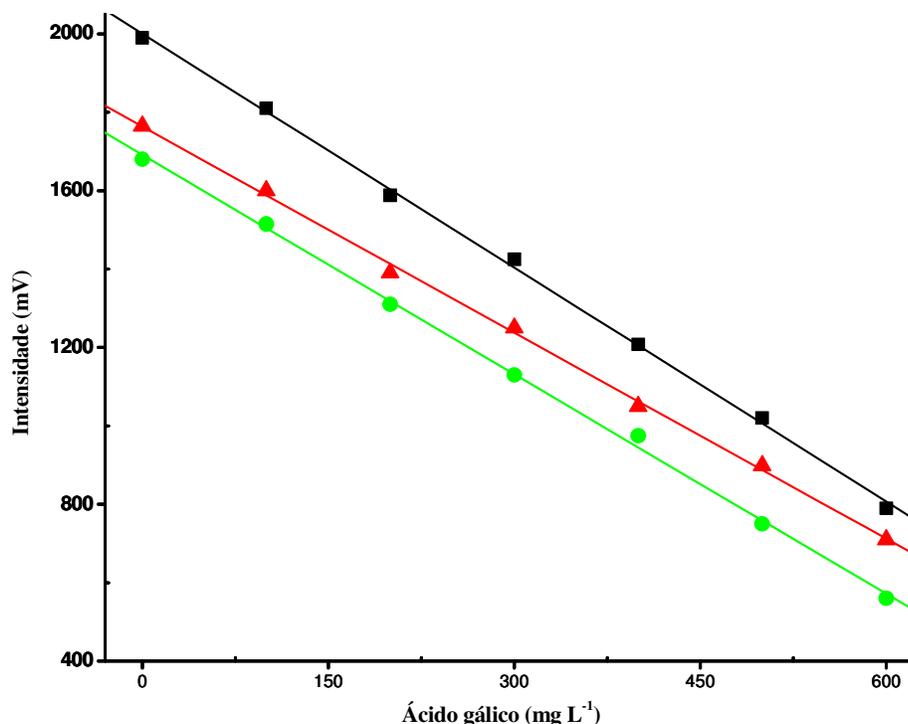


Figura 23: Estudo do efeito matriz na análise de vinhos tinto (triângulos vermelhos), vinho branco (bolas verdes) e solução aquosa (quadrados pretos).

Os vinhos utilizados neste teste foram diluídos nas razões de 15 (branco) e 100 (tinto) vezes. As seguintes equações foram obtidas:

Água	(■)	$y = 1991 (\pm 11) - 1,969 (\pm 0,030) * C;$	$r = 0,997$
Vinho tinto	(▲)	$y = 1763 (\pm 10) - 1,753 (\pm 0,028) * C;$	$r = 0,998$
Vinho branco	(●)	$y = 1691 (\pm 11) - 1,866 (\pm 0,031) * C;$	$r = 0,999$

Para melhor comparação das curvas e se poder afirmar que elas são paralelas, utilizou-se inicialmente o teste F para verificar se as variâncias pertencem à mesma distribuição. Comparando-se os valores extremos de inclinação (água  $x$  vinho tinto), obteve-se  $F_{\text{calc}} = 1,09$  enquanto que o valor de  $F_{\text{crit}}^{(5;5;0,95)} = 5,05$ . Como o  $F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$ , não há evidência de diferença estatisticamente significativa, podendo-se considerar que ambas as curvas pertencem a mesma distribuição. Desta forma, o teste t pode ser aplicado com segurança para a comparação das inclinações.

O teste t (student), para os coeficientes angulares das curvas de água e vinho tinto (os mais distintos no conjunto), foi aplicado segundo Honorato e colaboradores<sup>132</sup>. Obteve-se um valor de  $t_{\text{crit}} = 3,45$ , enquanto que o valor de referência (tabelado) com  $5 + 5 - 4 = 6$  graus de

liberdade é  $t_{(0,99;6)}^{tab} = 3,71$ . Assim, como  $t_{calc} < t_{crit}$ , pode-se concluir que não há diferença estatística significativa entre os valores, logo, não há evidências de existir o efeito de matriz significativo no método empregado e, com isto, as figuras de mérito puderam ser estabelecidas para a curva aquosa.

A frequência analítica foi encontrada como sendo 180 determinações por hora, fornecendo consumo de reagentes na ordem de 5,8 µg de luminol e 2,5 µL de água sanitária, gerando um resíduo total de 1,14 mL por determinação.

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método proposto foram determinados pela aplicação das equações:

$$LD = 3s/a \text{ e } LQ = 10s/a,$$

onde: s = desvio-padrão da injeção de 11 soluções do branco e  
a = coeficiente angular (slope) da curva analítica.

Obtiveram-se valores de LD = 6,6 mg L<sup>-1</sup> e LQ = 22,0 mg L<sup>-1</sup>, o que resulta na faixa linear de 22,0 a 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico.

Para se determinar a precisão (repetitividade) do método, 11 réplicas de solução de vinho tinto, vinho branco e solução de referência a 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico foram analisadas, obtendo-se os respectivos valores de RSD de 2,8; 2,2 e 3,4%.

Com relação à veracidade, oito amostras de vinhos foram também analisadas pelo método tradicional, de bancada (Folin-Ciocalteu<sup>29</sup>). Obteve-se boa correlação entre o método proposto (MPFA) e o método oficial (FC), com uma relação linear descrita pela equação:

$$MPFA = (2,5 \pm 0,4) \times FC - (0,3 \pm 0,8); \quad r = 0,960$$

Apesar da boa correlação encontrada, o coeficiente angular é diferente da unidade – o que leva ao método proposto fornecer valores superiores ao método tradicional. Alguns trabalhos já relataram metodologias propostas cujas relações matemáticas obtidas também diferenciavam seus coeficientes angulares da unidade (valor esperado similar ao obtido).

Assim, utilizando-se metodologia em bancada (batch)<sup>133</sup> foram obtidos valores superiores para vinhos tintos e inferiores para vinhos brancos. Com a estratégia FIA-CL<sup>122</sup> foram obtidos valores 2,1 vezes mais concentrados pelo método oficial em relação ao método proposto, enquanto que se utilizando SIA-CL<sup>125</sup> os valores foram 4,3 vezes maiores para o

proposto. Uma metodologia baseada em voltametria cíclica subestimou o teor de polifenóis em cerca de 50% ( $S = 0,48 \times FC$ ), ao passo que o uso – no mesmo trabalho – da amperometria superestimava este teor em 2,2 vezes<sup>134</sup>.

Vale ressaltar, também, que alguns trabalhos descrevem que os métodos tradicionais não são específicos para os analitos que se propõem a determinar, possuindo muitas substâncias interferentes no decorrer de uso de sua metodologia<sup>135</sup>.

Mesmo detendo estas informações (que a metodologia já estaria apta à sua função), optou-se por executar, também, o teste de adição e recuperação para confirmar a veracidade do método desenvolvido. Os resultados encontrados estão indicados na figura 24, cujas adições foram equivalentes a  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  nas amostras de vinhos não diluídas.

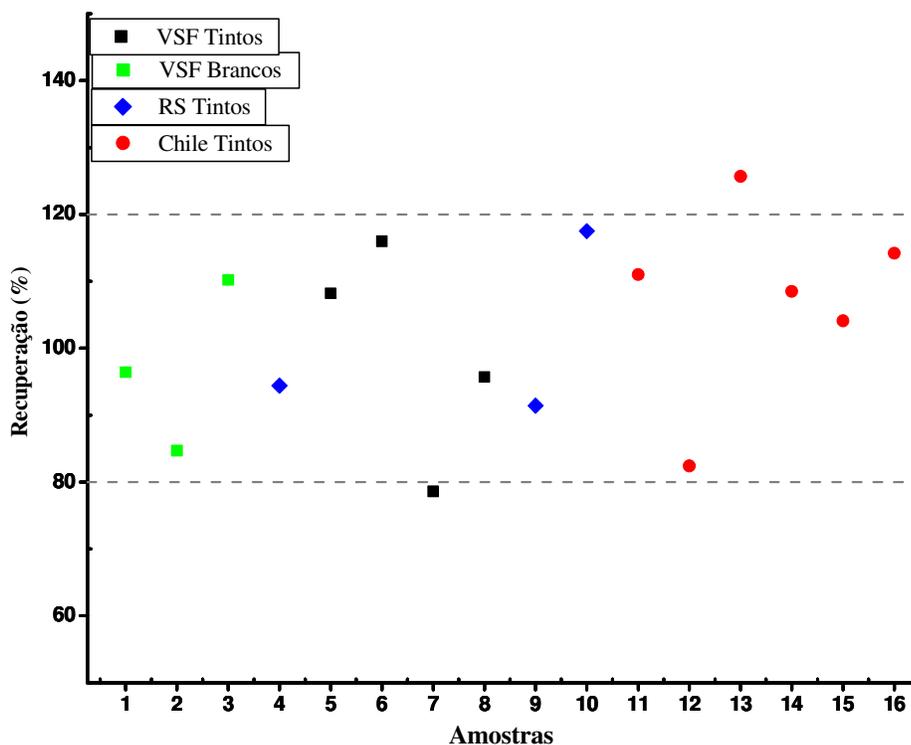


Figura 24: Recuperações obtidas para as amostras analisadas de acordo com a região de origem. O valor utilizado corresponde a uma adição de  $2 \text{ g L}^{-1}$  de ácido gálico nos vinhos. Os números na abscissa (eixo das amostras) são os mesmos da tabela 1.

Obtiveram-se resultados adequados neste teste de adição e recuperação, com valor médio de 102,4%.

### 1.4.6 Interferentes

Algumas das principais substâncias presentes nos vinhos foram avaliadas quanto à seletividade do método proposto. Tal estudo se realizou devido à avaliação do efeito matriz indicar se a mesma pode interferir na determinação do analito nas amostras, enquanto que o estudo de interferentes avalia individualmente, o efeito de cada composto sobre a resposta do analito.

Tipicamente, substâncias interferentes são aquelas que causam uma variação maior que 5% no sinal de uma solução de referencia. Neste estudo, soluções de concentração variável de possíveis interferentes foram adicionadas a uma solução de referencia de ácido gálico, cujas máximas variações encontradas estão indicadas na tabela 4.

Destes compostos, os ácidos tartárico e cítrico, e os íons sulfito e cobre são os principais possíveis interferentes – principalmente pelo cobre ser um catalisador da luminescência do luminol. Porém, é conhecido que os máximos valores permitidos<sup>29</sup> para SO<sub>2</sub> e Cu<sup>2+</sup> são, respectivamente, 50 e 1 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que para o ácido tartárico seus valores normalmente se situam entre 1 e 6 g L<sup>-1</sup>. Desta forma, após o processo de diluição dos vinhos para a análise, as concentrações nas amostras caem abaixo destes limites e, conseqüentemente, estas três substâncias não são interferentes.

Tabela 4: Estudo de possíveis interferentes para o sistema proposto.

Substância	Unidade	Efeito (%)	Razão molar (interferente/ácido gálico)
Etanol	<sup>a</sup> 2 %	+ 1,4	291:1
<i>Ácido Tartárico</i>	<b>1,0 g L<sup>-1</sup></b>	<b>+ 5,3</b>	5,7:1
<i>Ácido Cítrico</i>	<b>33 µg L<sup>-1</sup></b>	<b>- 6,7</b>	0,0002:1
<i>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</i>	<sup>a</sup> 0,15 mg L <sup>-1</sup>	+ 4,3	3,5:1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<sup>a</sup> 115 mg L <sup>-1</sup>	- 2,2	1,2:1
NaCl	<sup>a</sup> 42 mg L <sup>-1</sup>	- 0,4	1,1:1
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	5,0 mg L <sup>-1</sup>	- 5,4	0,05:1
<i>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></i>	<b>5,0 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>+ 7,6</b>	0,06:1
<i>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</i>	<b>30 µg L<sup>-1</sup></b>	<b>+ 6,7</b>	0,0004:1
FeNH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	<sup>a</sup> 2,0 mg L <sup>-1</sup>	+ 0,6	0,03:1
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	<sup>a</sup> 2,0 mg L <sup>-1</sup>	+ 1,6	0,03:1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	<sup>a</sup> 30 mg L <sup>-1</sup>	+ 1,5	1,2:1

a: máxima concentração estudada.

### 1.4.7 Análise das amostras

Com base nestes parâmetros acima expostos, pode-se afirmar que o método apresentou-se adequado à determinação de polifenóis na análise de vinhos em geral. A tabela 5 mostra os valores encontrados para o teor de polifenóis totais nos vinhos analisados.

Em relação aos valores numéricos encontrados, observa-se coerência com concentrações obtidas em outros trabalhos na literatura cujos valores variam de 0,1 (para brancos) até 5,86 g L<sup>-1</sup> <sup>133,136</sup> (para tintos).

Tabela 5: Concentração de polifenóis nas amostras de vinhos analisados.

Amostra*	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
1	0,709 ± 0,099
2	0,790 ± 0,029
3	0,739 ± 0,027
4	1,073 ± 0,067
5	7,22 ± 0,22
6	6,39 ± 0,25
7	5,99 ± 0,25
8	5,163 ± 0,070
9	4,02 ± 0,17
10	4,54 ± 0,25
11	4,78 ± 0,15
12	4,37 ± 0,13
13	4,11 ± 0,12
14	5,35 ± 0,16
15	4,994 ± 0,095
16	4,19 ± 0,11

\* Codificação de acordo com a tabela 1.

Para melhor comparação dos valores encontrados com a metodologia proposta neste trabalho para cada região utilizada, plotou-se a média, desvio-padrão e valores máximos-mínimos na figura 25. Nesta, percebe-se diretamente e com mais clareza a diferença entre os vinhos tintos e brancos, cuja variação já era esperada. Entretanto, para se cotejar corretamente os vinhos tintos utilizou-se da técnica de análise da variância, cujos cálculos encontram-se sumarizados na tabela 6.

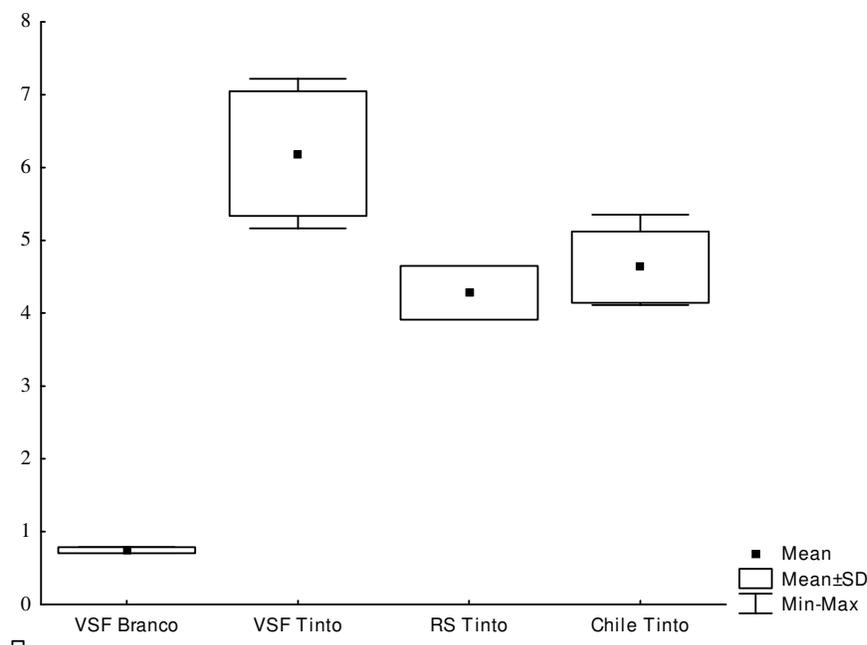


Figura 25: Valores médios e desvio-padrão por grupo de amostras analisadas.

Utilizando-se ANOVA, fator único, apenas para analisar os resultados obtidos para os vinhos tintos, percebe-se que há uma diferença significativa entre os grupos ( $F_{\text{calc}} = 9,44 > F_{\text{crit}} = 4,26$ ) a um nível de confiança de 95%.

Tabela 6: Tabela ANOVA para os resultados de polifenóis totais nos vinhos analisados.

Fonte Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (gl)	Média Quadrática (MQ)	$F_{\text{calc}}$	$F_{\text{crit}}^{(0,95;2;9)}$
Entre grupos	7,415	2	3,708	9,44	4,26
Dentro do grupo	3,536	9	0,393		
Total	10,951	11			

A ANOVA em si não é capaz de informar qual (ou quais) grupo(s) é (são) distinto (s). Porém, observando-se a figura 25, percebe-se claramente que a distinção entre os vinhos tintos se dá pelos maiores valores para os vinhos oriundos do Vale do São Francisco e estes são, portanto, distintos das demais amostras analisadas neste trabalho.

Como a maioria das uvas tintas analisadas pertence à variedade Cabernet Sauvignon, pode-se inferir, mesmo com um número reduzido de amostras analisadas, que a diferença observada pode não ser consequência da variedade da uva e sim da área onde esta foi plantada.

### ***1.5 Conclusões parciais***

O desenvolvimento e validação do método de determinação de polifenóis em vinhos apresentaram bons resultados, indicados pelas figuras de mérito do sistema.

Este método pôde-se ser bem aplicado a amostras reais, caracterizando-as quanto ao seu teor de polifenóis totais.

A análise estatística dos dados obtidos permitiu concluir, mesmo com um pequeno número de amostras analisadas, que os vinhos tintos do Vale do São Francisco apresentam-se, em relação ao teor de polifenóis totais, distintos de vinhos tintos provenientes do Rio Grande do Sul e do Chile, também analisados.

## ***1.6 Perspectivas***

Devido ao reduzido número de amostras analisadas, uma perspectiva inicial consiste no aumento da quantidade de vinhos avaliados para melhorar a confiabilidade do método.

Porém, como observado durante as atividades, a emissão de luminescência entre as soluções de ácido gálico e hipoclorito foi avaliada como possibilidade de desenvolvimento de um novo método, mais limpo (utilizando-se menos reagente – apenas água sanitária). O trabalho está sendo desenvolvido como dissertação de mestrado de uma aluna do grupo, e apresenta-se em fase de escrita de artigo.

## Capítulo 2

*Desenvolvimento de metodologia  
para a determinação de  
elementos minerais em vinhos*

*“Cada lectura és una aventura”  
(Gianni Gallelo)*

## **2.1 Objetivos**

### 2.1a Geral

Desenvolver uma metodologia para a determinação de metais por análise direta de amostras de vinhos por espectroscopia de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente e nebulização ultrassônica (USN-ICP OES).

### 2.1b Específicos

Avaliar, por meio de um planejamento fatorial, quais as principais variáveis que influenciam a resposta analítica, selecionando-as em seus melhores valores;

Aplicar a metodologia a vinhos em gerais, mas focando em vinhos do Vale do São Francisco;

Utilizar a ferramenta quimiométrica de Análise de Componentes Principais, PCA, para buscar uma possível distinção entre os vinhos do VSF de vinhos provenientes da Espanha.

## 2.2 Parte teórica

### 2.2.1 Metais e espectrometria atômica

No vinho, a presença de metais é devida basicamente a três fatores: i) solo, presença natural oriunda da absorção pelas raízes, chegando ao vinho através da uva; ii) ambiental, pela exposição à defensivos agrícolas/ fertilizantes ou por poluição nos entornos da plantação e iii) contaminação durante o processo produtivo<sup>33,137,138</sup>.

A concentração destes elementos contribui nos sistemas vivos para a manutenção da vida, ou com o seu fim (dependendo da dosagem) e, nos vinhos, os divide em subclasses, não totalmente estabelecidas – mas de caráter orientador: os elementos majoritários (K, Na, Ca e Mg), em teores superiores a 10 mg L<sup>-1</sup>; os elementos minoritários (Fe, Mn, Sr, Zn, B, Al e Cu), em concentrações entre 0,1 e 10 mg L<sup>-1</sup> e os elementos traços (Cd, Li, Cr, Ni, Pb, As, lantanídeos e outros), cujos teores estão abaixo de 100 µg L<sup>-1</sup><sup>33,138,139</sup>.

Os teores de elementos minerais nos vinhos dependem também de outros fatores mais específicos, com a variedade da uva empregada na elaboração e a maturidade da mesma, das técnicas enológicas empregadas e do tipo de solo na qual a planta está inserida<sup>137,138</sup>.

Os minerais são diretamente responsáveis ou influenciadores de características organolépticas nos vinhos, tais como sabor, aroma, cor e na estabilidade (ou falta dela) nos mesmos. Podendo alguns deles causar danos tanto na qualidade (íons Cu causam turvação vermelha; íons de ferro, a quebra férrica e precipitação de alguns compostos fenólicos, com alteração também na coloração) quanto na segurança alimentar (Hg, As, Pb, Cd em concentrações mais elevadas que seus respectivos limites aceitáveis)<sup>2,137,139</sup>.

Segundo Catarino e colaboradores<sup>33</sup>, os elementos estão solubilizados no vinho sob a forma de sais dos principais ácidos orgânicos (tartárico, málico, acético) e sua forma de apresentação determina a biodisponibilidade e a toxicidade para os consumidores. Sendo que a presença de metais pesados está diretamente relacionada à atividade industrial nos entornos e a poluição gerada por ela.

Assim, admite-se que, além das técnicas específicas de vinificação, a presença dos cátions e sua variação de concentração nos vinhos são marcadores da região na qual a videira foi cultivada e o vinho elaborado. E o estudo da composição mineral (e também de vários outros constituintes, tanto do vinho como de outras matrizes) serve como garantias de autenticidade e denominação de origem do produto<sup>33,138-140</sup>.

Das diversas possibilidades de identificação química de cátions minerais nas amostras, a espectrometria atômica é a mais difundida e de maior aplicabilidade, principalmente no que se refere à detecção multielementar.

Apresentando a possibilidade de aplicação numa ampla faixa linear (podendo detectar de elementos majoritários a traços), baixos limites de detecção, análise simultânea multielementar, menor interferência química devido à maior temperatura do plasma – em relação à chama – fazem das técnicas de Plasma Acoplado indutivamente (ICP) as preferidas para a análise da composição mineral de uma grande variedade de amostras<sup>95,139,141</sup>. Destas, a espectroscopia de emissão ótica (ICP OES) é um pouco mais econômica que a espectrometria de massas (ICP MS) e, desta forma, está mais presente nos laboratórios de pesquisa.

Uma das desvantagens da ICP OES é a relativamente elevada quantidade de amostra (líquida e/ou em solução) necessária para introdução no sistema, de 2 a 5 mL. Porém esta característica fornece também a vantagem de terem sido criados vários nebulizadores para sua inserção. Os principais são pneumáticos ou por ultrassom<sup>141</sup>.

O nebulizador ultrassônico (USN) consiste num transdutor piezoelétrico vibrando a uma frequência de 1,4 MHz, que produz um aerossol denso e fino, com uma eficiência de nebulização cerca de 10 vezes maior que os nebulizadores pneumáticos. O fluxo de argônio de nebulização arrasta o aerossol para uma câmara de aquecimento, na qual o solvente é evaporado e posteriormente removido ao passar por um condensador. Como a eficiência é maior, uma maior carga de água poderá chegar ao plasma. Desta forma, uma membrana de dessolvatação (uma membrana de PTFE porosa) é acoplada ao USN para remoção deste excesso<sup>141,142</sup>.

A utilização de solventes orgânicos diminui a tensão superficial da solução, aumenta a taxa de vaporização, devido a sua maior pressão de vapor e forma menores gotículas, aumentando ainda mais a eficiência de nebulização. Porém, o solvente orgânico também causa o inconveniente de esfriamento do plasma devido ao gasto energético para a combustão da matéria orgânica e dissociação de carbonos moleculares, podendo gerar instabilidade ou mesmo extinção do plasma. O uso da membrana de dessolvatação, por diminuir a quantidade de matéria que alcança o plasma, favorece a utilização destes solventes na solução, desde que se modifiquem também as condições de potência da radiofrequência (aumento) e vazão de argônio (maior o fluxo principal, menor o de nebulização)<sup>141-143</sup>.

## 2.2.2 Metais e espectrometria atômica em vinhos

Utilizando-se espectrometria atômica, vinte e quatro elementos foram determinados em nove vinhos croatas por ICP MS. Com auxílio de análise de correlação e ANOVA os autores concluíram que as diferenças regionais observadas são devidas aos elementos Al, Li, Be e Ti<sup>144</sup>.

Cinquenta vinhos espanhóis da província de Huelva foram caracterizados pela quantificação de doze elementos por ICP OES com nebulizador tipo Meinhard. Neste trabalho, os vinhos foram digeridos com ácido nítrico e água oxigenada antes das análises<sup>145</sup>.

Com o objetivo de estudar as influências tanto dos processos vinícolas quanto do solo de plantio, quarenta e sete elementos foram determinados em amostras de solo e suco ou vinho em diferentes etapas da vinificação de duas regiões portuguesas por ICP MS. Utilizando-se testes de correlação os autores concluíram que existe diferença na composição mineral de acordo com o processo de vinificação aplicado<sup>146</sup>.

A caracterização de 19 vinhos da Romênia por ICP MS com nebulizador Meinhard determinou os elementos terras raras nas amostras previamente digeridas. Os autores puderam concluir que o teor destes elementos aumenta em até cinco vezes, de acordo com o tipo de bentonita utilizada para clarificação do vinho<sup>147</sup>.

O efeito do tratamento de vinhos com bentonitas foi estudado por ICP equipado com nebulizador de fluxo cruzado (cross-flow). Foi observado que ocorre um aumento na concentração de vários elementos após este tratamento, sendo necessário se caracterizar antes as bentonitas utilizadas para poder se concluir alguma autenticidade ou denominação de origem para os vinhos<sup>148</sup>.

Com o intuito de se estudar diferentes tipos de pré-tratamento de amostras de vinhos (evaporação e combustão a 450 °C; digestão ácida e redução do volume e de voláteis por aquecimento), onze elementos foram determinados por ICP OES com nebulizador Babington. Tratando-se os dados por uso da ANOVA, os autores concluíram que não há diferenças entre os três procedimentos, porém a simples evaporação para redução do volume gera resultados menos reprodutíveis<sup>149</sup>.

Para se estudar a possibilidade de contaminação durante a vinificação, dez elementos foram determinados por ICP OES em 54 amostras retiradas de várias etapas da elaboração do vinho de duas regiões da China. As variações observadas nos teores dos minerais foram atribuídas à contaminação durante o processo<sup>150</sup>.

Arsênio foi determinado em vinhos sérvios por ICP OES com nebulizador concêntrico. Um estudo de padrões internos indicou o uso de Vanádio para se obter as melhores respostas<sup>151</sup>.

Utilizando-se de dessolvatação por micro-ondas como sistema de introdução de amostra, trinta elementos foram determinados em amostras de vinhos espanhóis por ICP OES e ICP MS. A comparação com um sistema de introdução de amostras convencional não forneceu diferenças significativas entre ambos<sup>152</sup>.

Com o objetivo de demonstrar a melhor eficiência do nebulizador ultrassônico, Galli e Oddo aplicaram este nebulizador a diversas matrizes, incluindo o vinho. Compararam, ao final, as respostas para indicar o aumento de sinal ganho pelo uso do USN<sup>153</sup>.

O USN acoplado ao ICP OES foi utilizado para se determinar oito elementos em vinhos argentinos. O trabalho baseou-se na caracterização das amostras de 20 amostras de vinhos previamente digeridas em relação aos oito elementos, e a discussão quanto à faixa encontrada, na comparação com outros artigos<sup>154</sup>.

Acoplado a um sistema em fluxo, cádmio foi pré-concentrado em um reator de PTFE Knotted e determinado por USN-ICP OES. As amostras de vinhos (num total de 10) foram digeridas com ácido sulfúrico e posteriormente mineralizadas por combustão a 500 °C. Ao comparar os resultados obtidos com GFAAS observou-se não haver diferenças significativas entre os dois métodos<sup>155</sup>.

Procedimento semelhante foi aplicado à determinação de chumbo. Foi utilizada uma resina Amberlite XAD-16 para pré-concentração do complexo Pb:8-quinolinol, antes de sua quantificação por USN-ICP OES<sup>156</sup>.

Como visto, vinho é o produto da fermentação alcoólica das uvas e, conseqüentemente, apresenta uma composição complexa, formada pela mistura de centenas de componentes químicos que se harmonizam para fornecer uma bebida saborosa e benéfica à saúde do apreciador.

Desta forma, sua caracterização pode envolver uma grande variedade de analitos a se determinar, gerando cada vez mais informações a se interpretar. Dificultando-se, assim, a obtenção da informação realmente útil por trás da grande quantidade de dados obtidos.

### 2.2.3 Quimiometria

A quimiometria é um ramo da matemática-estatística aplicada à química que foi desenvolvida com o intuito de resolver estes dados obtidos, contribuindo não somente para sua extração e interpretação, mas também com o planejamento dos experimentos (*design of experiments – DOE*) que proporcionarão o fornecimento da informação de uma forma mais segura, evitando-se desperdícios tanto de dinheiro quanto de tempo do pesquisador<sup>157</sup>.

Inicialmente, a quimiometria auxilia (sabendo o pesquisador as respostas que deseja encontrar) na planificação de quais experimentos serão realizados para se obter mais informações (com fiabilidade) sobre o sistema em estudo<sup>157</sup>.

Segundo Prasad e colaboradores, DOE é um método para expressar significativamente a relação entre parâmetros estudados e respostas obtidas, em que uma maneira sistemática de planejamento de experimentos, coleta e análise de dados é executada<sup>158</sup>.

Assim, é possível fazer uma triagem das variáveis que realmente são importantes no estudo, considerando todas elas simultaneamente, desprezando aquelas que não influenciam a resposta do sistema. O método mais simples de se realizar isto consiste em utilizar o planejamento fatorial fracionário de dois níveis, na qual cada variável é estudada em dois valores (níveis) distintos<sup>157,159</sup>.

Das variáveis significativas pode-se verificar a extensão do efeito que elas produzem nas respostas e interações com as demais, de forma a melhorar ainda mais sua resposta de interesse, alcançada com o uso de um planejamento fatorial completo. O uso de um ponto central, em replicatas, permite ainda – além de se determinar o erro experimental com um maior número de graus de liberdade – perceber a existência de uma relação não linear no intervalo estudado para as variáveis<sup>157</sup>.

Caso seja necessário otimizar o sistema, mais experimentos podem ser realizados buscando-se o ponto ótimo de cada variável<sup>157-160</sup>.

Posteriormente a este estudo, conhecendo-se as informações de quais parâmetros são os mais importantes, quantificada sua influência e otimizada a metodologia, aplica-se o método para se obter as respostas desejadas. Quando essas respostas são de natureza multivariada, com muitos dados a serem processados em busca da informação, a quimiometria volta a ajudar o pesquisador com outras técnicas de análises de dados.

As técnicas multivariadas oferecem ao analista as ferramentas matemáticas para avaliar de forma relativamente rápida e fácil, a existência de uma relação e padrões nos dados obtidos<sup>161</sup>.

Reconhecimento de padrões é uma destas técnicas que consiste em encontrar similaridades e/ou diferenças entre amostras analisadas, baseado em medidas feitas nas amostras, principalmente quando as matrizes de dados foram geradas com um número elevado de medidas. Quando apenas se deseja visualizar as (dis)similaridades, sem possuir nenhum conhecimento prévio acerca das amostras, tem-se as técnicas de reconhecimento de padrão não-supervisionado, cujas exemplos mais conhecidos são a análise hierárquica de Cluster (HCA, do inglês, Hierarchical Cluster Analysis) e Análise de componentes principais (PCA, do inglês, Principal Components Analysis)<sup>161</sup>.

A idéia base da análise de componentes principais (PCA) consiste na transformação da matriz de dados original em um produto de duas outras matrizes menores (matriz de escores e de loadings), separando a real informação contida nos dados – geralmente localizada nas primeiras componentes na matriz de escores – dos ruídos, deixados nas últimas componentes desta matriz<sup>160,161</sup>.

Observando-se algum padrão de agrupamento e/ou de separação nas amostras no gráfico de escores, a matriz de loadings fornecerá informação sobre quais as variáveis mais significativas para este agrupamento. As variáveis que não detenham informações relevantes à análise (sem muita variabilidade no conjunto de dados) poderiam ser excluídas e uma nova avaliação ser realizada em busca de uma melhor visualização de padrões das amostras, agora com uma menor quantidade de ruídos que interfeririam neste processo<sup>161</sup>.

#### 2.2.4 Quimiometria e sua aplicação em vinhos

A quimiometria, seja com o planejamento de experimentos seja com a análise de componentes principais e / ou outras técnicas de classificação, tem grande importância e aplicação na química<sup>160-162</sup>. Exemplos de uso geral de DOE estão na otimização da síntese hidrotérmica de nanopartículas de hidroxiapatita<sup>163</sup>, na extração de flavonóides de plantas medicinais brasileiras<sup>164</sup>, no desenvolvimento de metodologia LC-MS/MS para determinação de impurezas em glucocorticoides<sup>165</sup> e de GC-MS para análise de pesticidas em água<sup>166</sup>. Quanto à PCA, tem-se a distinção entre carnes de frango, peru e porco por meio de infravermelho<sup>167</sup>, a diferenciação da composição de leite bovino em relação à estação do ano que foi extraído da vaca<sup>168</sup> e de óleo diesel de diferentes localidades pela combinação de análises por cromatografia gasosa e razão isotópica<sup>169</sup>.

No que tange aos vinhos, DOE foi aplicado com um planejamento cúbico em dois níveis para se desenvolver um modelo que represente as mudanças das características cromáticas e de compostos fenólicos durante o envelhecimento de vinhos tintos (devido à adição de sementes de uvas no processo), por meio de metodologia de superfície de resposta. Observou-se que não ocorrem grandes mudanças nos parâmetros investigados com uma maior duração do tempo de envelhecimento<sup>170</sup>.

Utilizando-se um planejamento do tipo Doehlert, a otimização de extração líquido-líquido de resveratrol por solventes orgânicos foi investigada. A melhor condição obtida foi com uma mistura de ciclohexano:pentanol (40:60) e com uma proporção de solução/solvente de 30:70, obtendo-se um rendimento de 95%<sup>171</sup>.

Um planejamento do tipo Box-Behnken com três fatores (pH, e tempo de deposição e velocidade de leitura) foi aplicado para a otimização da determinação do teor de polifenóis totais utilizando-se um biosensor imobilizado num eletrodo de carbono e voltametria por pulso diferencial. Com os parâmetros otimizados, obteve-se limite de detecção da ordem de 2 ppb<sup>172</sup>.

As aplicações da análise de componentes principais são vastas em vinhos. Exemplos de uso estão no trabalho de Urbano-Cuadrado e colaboradores<sup>173</sup>, que utilizaram a PCA como detector de outliers para, posteriormente, criar um modelo PLS (regressão por mínimos quadrados parciais) com o intuito de prever parâmetros clássicos (pH, acidez, teor alcoólico...) com uso do infravermelho<sup>173</sup>. O uso da espectroscopia UV-Vis com PCA foi aplicado na diferenciação de vinhos espanhóis de uma mesma região (La Mancha D.O.). Foi possível, com o mesmo conjunto de dados, visualizar diferenças entre as sub-regiões, entre os vinhos envelhecidos dos jovens, bem como por tipo de uva (Cabernet Sauvignon  $\times$  Cencibel)<sup>174</sup>.

A ressonância magnética nuclear (RMN) foi utilizada para se caracterizar uvas e vinhos provenientes de quatro regiões da França<sup>175</sup> e de duas regiões da Grécia<sup>176</sup>. Para ambos os trabalhos o uso de PCA permitiu diferenciar as amostras de cada sub-região. Em relação aos franceses, a mesma conclusão foi obtida com uso da PCA sobre dados obtidos de forma clássica, enquanto que para os gregos, também foi possível a diferenciação quanto à cor dos vinhos e suas vinícolas produtoras.

Um método cromatográfico por HPLC foi desenvolvido para análise de compostos fenólicos em vinhos tintos italianos, com aplicação de uma ferramenta matemática de resolução de picos (do inglês, Multivariate Curve Resolution, MCR) para melhor atribuição dos sinais do cromatógrafo. O uso da PCA nestes dados tratados permitiu a diferenciação dos vinhos de acordo com a variedade da uva<sup>177</sup>.

Análise espectrofotométrica (de polifenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante) e por HPLC (compostos fenólicos específicos e ácidos orgânicos) foram realizadas em vinhos brancos brasileiros com o intuito de se estudar a variação de duas condições de estocagem: a equivalente a condições utilizadas num supermercado ( $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , luz por 12h, garrafa em pé) e outra equivalente a uma adega ( $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , escuro, garrafa deitada). O uso de PCA permitiu distinguir vinhos de vinícolas distintas e, principalmente, obter uma total distinção entre os estocados em condições de adega em relação às condições de supermercado<sup>178</sup>.

Resultados semelhantes foram obtidos por Hopfer e colaboradores, que estudaram a temperatura de estocagem e tipos de estocagem do vinho sobre a concentração de 14 elementos traços determinada por ICP MS<sup>179</sup>.

Também com uso do HPLC para fornecer um perfil cromatográfico de vinhos espanhóis a diferentes comprimentos de onda de detecção, a aplicação da PCA nos dados originais permitiu selecionar as variáveis que melhor separam as amostras por regiões produtoras para, posteriormente, utilizarem regressão por PLS-DA para classificar outras amostras entre estas regiões<sup>180</sup>.

Extraindo-se os compostos do vinho por micro extração em fase sólida com *headspace* e análise por cromatografia bidimensional com espectrometria de massas por tempo de voo como detector, e avaliação quimiométrica por PCA, pôde-se diferenciar vinhos gaúchos quanto as variedades de uva. O uso posterior de análise de discriminante linear (LDA) possibilitou a construção de modelos de previsão de vinhos como sendo destas regiões<sup>181</sup>.

### 2.2.5 Metais, quimiometria e vinhos

Vinhos de duas regiões canadenses foram analisados por ICP-MS dotado de nebulizador concêntrico para obter uma caracterização de 34 elementos presentes nas garrafas. Neste trabalho as amostras foram apenas diluídas 1:1 com solução  $0,2\text{ mol L}^{-1}$  de ácido nítrico para se evitar perdas de elementos voláteis com o processo de digestão da amostra. Utilizando-se PCA e SLDA permitiu-se concluir que o Sr é o principal diferenciador de vinhos destas duas regiões<sup>182</sup>.

Vinte elementos foram determinados em vinhos da África do Sul por ICP-MS com nebulizador *cross-flow*, com e sem digestão da amostra. Os autores concluíram que a diluição 1:1 em  $0,14\text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  permitiu melhores valores de limite de detecção, além de menor risco de contaminação e perdas de elementos voláteis e tempo de preparo das amostras. A

utilização de PCA e LDA permitiu também diferenciar vinhos tintos e brancos de três regiões sul-africanas<sup>183</sup>.

ICP OES com nebulizador Meinhard foi utilizado para a determinação de 38 elementos em vinhos espanhóis, cuja preparação foi digestão ácida. A PCA foi capaz de indicar separação entre algumas amostras e a utilização de um modelo CART (do inglês, Classification and Regression Trees) permitiu distinguir as amostras<sup>184</sup>.

Quarenta e cinco elementos foram determinados em vinhos de 4 países da América do Sul utilizando-se ICP OES com nebulizador microMist e ICP MS com Meinhard e ultrasônico em amostras diluídas e digeridas. Mesmo com o inconveniente de se utilizar dois instrumentos distintos com nebulizadores também diferentes para a análise, os autores concluíram que o processo de digestão da amostra fornece valores de concentração mais altos que os das amostras simplesmente diluídas. A utilização de PCA com apenas cinco destes elementos permitiu a diferenciação dos vinhos provenientes dos quatro países estudados<sup>185</sup>.

Utilizando-se espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS) e de emissão atômica em chama (FAES), onze elementos foram determinados em 45 vinhos provenientes das ilhas Canárias (Espanha). O uso de PCA e *Soft Independent Modelling of Class Analogy* (SIMCA) permitiu diferenciar e classificar vinhos de diferentes sub-regiões destas ilhas<sup>186</sup>.

O estudo de preparação de amostra para determinação de lantanídeos por ICP-MS com nebulizador APEX-Q foi realizado em 32 amostras de vinhos de 3 países da América do Sul. Os autores observaram que a decomposição da amostra fornece valores mais elevados para os lantanídeos e o uso de HCA e LDA permitiu distinguir e classificar os vinhos destes três países estudados<sup>187</sup>.

Onze elementos e outros parâmetros clássicos foram determinados em 66 vinhos Chardonnay e Pinot Noir para caracterização e diferenciação de duas regiões do Rio Grande do Sul. Os metais foram detectados por ICP OES sem pré-tratamento. A utilização de PCA permitiu diferenciar, em análises distintas por cor do vinho, as amostras de acordo com a origem<sup>188</sup>.

Por meio da análise de vinhos russos por ICP OES e técnicas quimiométricas, vinte elementos foram determinados e as amostras, diluídas 20x em 1% HNO<sub>3</sub>, foram diferenciadas por cor e região de origem<sup>189</sup>.

Após um processo de digestão ácida, doze elementos foram determinados por ICP OES com nebulizador Meinhard em 50 amostras de vinhos espanhóis. O uso de PCA não permitiu visualizar uma diferenciação entre vinhos, cuja justificativa foi a grande variabilidade de tipo de vinhos analisados<sup>190</sup>.

Assim, com a utilização de algumas destas técnicas brevemente relatadas nesta tese, e com várias outras existentes no rol da análise química, pesquisadores vêm buscando caracterizar amostras de alimentos (e vinhos) ao longo dos anos com o intuito de garantir meios fidedignos de identificação da origem destes em relação a sua autenticidade relativa a alguma determinada região produtora<sup>140,191</sup>.

Com estas informações em mente, esta tese vem contribuir com o desenvolvimento de uma metodologia para determinação multielementar de minerais em vinhos empregando USN-ICP OES. Ganhando-se em sensibilidade e tempo de análise, devido ao uso do nebulizador ultrassônico, que permite a análise direta dos vinhos sem pré-tratamento de amostras. Conhecendo os teores de minerais, buscou-se a caracterização/distinção de vinhos, principalmente no que tange aos vinhos elaborados na região do Vale do São Francisco.

Espera-se contribuir, também, com os preceitos da química verde, com a diminuição de energia consumida, a não utilização de reagentes danosos (por não necessitar digestão prévia das amostras) e conseqüente redução de volume de rejeito gerado.

## 2.3 Parte experimental

### 2.3.1 Soluções e reagentes

As soluções foram preparadas utilizando-se água de alta pureza com resistividade de 18,2 M $\Omega$ .cm purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> plus (Millipore system, Bedford, EUA).

Soluções estoque 1000  $\pm$  3 mg L<sup>-1</sup> de Sb (em HNO<sub>3</sub> 4% + HF 0,1% – Peak Performance); 1000  $\pm$  5 mg L<sup>-1</sup> de Sn (em HCl 5 mol L<sup>-1</sup> da Scharlau, Espanha); 100  $\pm$  0,5 mg L<sup>-1</sup> em Li, Be, B, Na, Mg, Al, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Sr, Mo, Cd, Ba, Tl, Pb, Bi, La, Ce, Pr e Nd e solução estoque 20  $\pm$  0,1 mg L<sup>-1</sup> de Sc, Y, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb e Lu, fornecidas por Scharlau – Espanha, foram utilizadas para o preparo das soluções de trabalho.

Soluções monoelementares 1000  $\pm$  3 mg L<sup>-1</sup> de K, Ca, Mg, Mn, Fe e Na, fornecidas por Scharlau – Espanha, e B (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 99,8%) por Panreac – Espanha foram utilizadas para preparo de soluções com concentrações superiores à faixa de aplicação das demais soluções estoque multielementares.

Soluções estoque 1000  $\pm$  3 mg L<sup>-1</sup> de Ge e Ru (em HCl 1 mol L<sup>-1</sup> – Fluka, Suíça), Re (em HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> – Fluka, Suíça) e 1000 mg L<sup>-1</sup> de Ga e In (em 5% HNO<sub>3</sub> – Alfa Aesar, Alemanha) foram testadas como padrão interno, após diluição apropriada.

Ácido nítrico 69,6% m/m (para análise de traços), ácido nítrico 60% m/m (grau ISO, para preparo de soluções de lavagem) e etanol (grau HPLC), todos fornecidos por Scharlau – Espanha, foram também utilizados neste trabalho.

### 2.3.2 Preparo de soluções

A faixa de concentração das soluções de trabalho variou de acordo com o analito. As concentrações foram de 1,0 a 500,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> para os lantanídeos; 5,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> até 10,0 mg L<sup>-1</sup> para os elementos majoritários (Na, Mg, K, Ca, Mn e Fe) e de 5,0 a 1000,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> para os elementos minoritários (os demais elementos). Tais soluções foram preparadas com adição de volume apropriado das soluções estoque, acrescidas de 100  $\mu$ L de ácido nítrico 69,6% (m/m) e 200  $\mu$ L de etanol, e o volume da solução foi completado para 10 mL com água purificada.

As amostras de vinho foram diluídas (5,7 vezes) com água purificada, adicionado 100  $\mu$ L de ácido nítrico e seu volume foi aferido em 10 mL.

Estas soluções foram acondicionadas em tubos plásticos de 15 mL (VWR international, EUA), os quais foram previamente descontaminados mediante banho de imersão em HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) durante uma noite e posteriormente enxaguados com água purificada.

### 2.3.3 Equipamentos e acessórios

#### 2.3.3.1 Descrição geral do equipamento

O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado – ICP OES, modelo Optima™ 5300 DV da Perkin Elmer (Norwalk, EUA). Os parâmetros instrumentais de operação estão listados na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros instrumentais utilizados na análise de vinhos.

Parâmetro	Valor	Unidade
Frequência de operação	40	MHz
Potência de trabalho	1500	W
Fluxo de gás principal	15	L min <sup>-1</sup>
Fluxo de gás auxiliar	0,70	L min <sup>-1</sup>
Fluxo de gás de nebulização	0,40	L min <sup>-1</sup>
Vazão de aspiração da amostra	0,80	mL min <sup>-1</sup>
Visão	Dual	-
Correção de Background	2 pontos	-
----- Condições do nebulizador -----		
Nebulizador	Ultrassônico	CETAC U-6000AT <sup>+</sup>
Temp. de aquecimento	140	°C
Temp. de resfriamento	2	°C
Temp. membrana de dessolvatação	160	°C
Fluxo de gás sweep	0,80	L min <sup>-1</sup>

O elemento dispersivo para a região ultravioleta – 165 a 403 nm – foi um “Schmidt cross disperser” (374 linhas/mm) e para a região visível – 404 a 782 nm – um prisma (60°). O espectrofotômetro consiste em um policromador Echelle (79 linhas/mm) combinado com um detector de estado sólido (do inglês, Segmented-array Charge coupled Device - SCD), com área superficial de 13x19 mm<sup>2</sup> e resolução (largura de banda a meia altura – FMWH) de 0,006 nm a 200 nm.

As amostras e soluções de referências foram acondicionadas em um auto-amostrador (modelo AS-93plus da Perkin Elmer) e injetadas para análise no equipamento por meio de uma bomba peristáltica acoplada ao mesmo. O tubo injetor consiste num tubo de alumina com 2,0 mm de diâmetro interno

Argônio comercial de alta pureza (C-45, 99,995%) fornecido por Carbuos Metálicos, (Barcelona, Espanha) foi utilizado como gás auxiliar, de nebulização e na geração do plasma.

Para a nebulização e injeção das soluções no plasma utilizou-se um nebulizador ultrassônico (CETAC, modelo U-6000AT<sup>+</sup>) acoplado a uma membrana de dessolvatação. As condições utilizadas para o nebulizador encontram-se indicadas na tabela 7 acima.

### 2.3.4 Procedimentos

#### 2.3.4.1 Funcionalidade do plasma

Inicialmente, necessitava-se descobrir se o plasma não seria extinto devido à presença do etanol e demais matérias orgânicas existentes no vinho. Desta forma, realizou-se a inserção de soluções de referência contendo a mesma concentração dos elementos ( $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  de metais de transição,  $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de terras raras e  $\text{HNO}_3$  em volume suficiente para solução final 1% v/v) com teor alcoólico variando de 0 a 15% (v/v) de etanol.

Posteriormente, realizou-se o mesmo experimento, substituindo o etanol por vinho, mantendo as mesmas concentrações dos analitos citadas anteriormente. O teor alcoólico variou de 0 a 12% (v/v), tendo como limite o teor alcoólico exposto no rótulo das amostras de vinho utilizadas.

Em ambos os experimentos foram usados os seguintes parâmetros iniciais de estudo:  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  de metais de transição e alcalinos;  $20,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de lantanídeos; 1%  $\text{HNO}_3$ ; potência da radiofrequência = 1400 W; Fluxo Principal =  $15 \text{ L min}^{-1}$ ; Fluxo de gás auxiliar =  $0,2 \text{ L min}^{-1}$ ; Fluxo de gás nebulizador =  $0,6 \text{ L min}^{-1}$ ; Fluxo de amostra =  $1,10 \text{ mL min}^{-1}$ ; Temperatura de aquecimento do nebulizador =  $140 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Temperatura de resfriamento do nebulizador =  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Temperatura da membrana de dessolvatação =  $160 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Fluxo de gás sweep =  $0,80 \text{ L min}^{-1}$ ; Devido a alta intensidade de sinal, Li, Na, K, Ca, Sr e Ba saturaram o detector e não foi possível concluir nada a respeito destes elementos.

#### 2.3.4.2 Planejamento fatorial para avaliação das condições de operação do ICP

Buscando melhorar a sensibilidade do método proposto, realizou-se um estudo multivariado de alguns parâmetros do sistema. Para isso foi delineado e executado um planejamento fatorial de dois níveis com repetição no ponto central ( $n = 4$ ) e utilizou-se como resposta a maior intensidade de sinal do maior número possível de elementos determinados.

Os fatores estudados foram o teor alcoólico (ou a diluição da amostra, em 2 - 4 - 6% v/v), o fluxo de amostra (0,8 - 1,0 - 1,2 mL min<sup>-1</sup>), a potência da radiofrequência (1400 - 1450 - 1500 W) e as taxas de vazão do argônio (15 - 16 - 17 L min<sup>-1</sup>; 0,7 - 1,0 - 1,3 L min<sup>-1</sup> e 0,4 - 0,6 - 0,8 L min<sup>-1</sup> para os fluxos principal, auxiliar e de nebulização, respectivamente).

Todos os estudos foram realizados adicionando-se a concentração de 0,50 mg L<sup>-1</sup> dos elementos minoritários e majoritários e 20 µg L<sup>-1</sup> dos elementos de transição externa e interna à uma amostra de vinho tinto.

#### 2.3.4.3 Efeito matriz

Para verificar se a matriz do vinho interferiria nas análises, procedeu-se com uma comparação entre quatro curvas de calibração: V1, construída com a adição dos analitos a uma amostra de vinho tinto (com teor alcoólico de 11%) diluída 1:6; V2, com adição do analito a outra amostra de vinho tinto (com 13,5% v/v de etanol) diluída 1:6; uma terceira curva com os analitos adicionados a água, e a última com os analitos adicionados a uma solução de etanol 2% v/v. Todas as quatro matrizes foram acidificadas para conter ácido nítrico na concentração de 1% v/v.

#### 2.3.4.4 Seleção do padrão interno

Comumente, os elementos Y e Sc são utilizados como padrão interno em análises realizadas por ICP-OES. Porém, estes dois elementos são analitos na caracterização dos vinhos neste estudo e, portanto, buscou-se por outros integrantes da tabela periódica que poderiam atuar como padrão interno para a metodologia em desenvolvimento.

Assim, alguns elementos, que normalmente não são determinados nas caracterizações dos vinhos, e suas respectivas linhas de emissão, foram testados como padrão interno para o desenvolvimento desta metodologia:

- i. (a) Ga 417,206 nm (b) Ga 294,364 nm;
- ii. (a) Ge 265,118 nm (b) Ge 209,426 nm;
- iii. (a) Re 227,525 nm (b) Re 197,248 nm;
- iv. (a) In 325,609 nm (b) In 230,606 nm;
- v. (a) Ru 240,272 nm.

Todos eles foram testados na concentração de  $0,20 \text{ mg L}^{-1}$  adicionados à:

- > Soluções aquosas contendo 2% de etanol e concentrações variáveis de todos os metais;
- > Vinho diluído para teor alcoólico de 2%, sem e com adição de concentrações variáveis de metais.

#### 2.3.4.5 Figuras de mérito do método proposto

Com as melhores condições de análise já estabelecidas, realizou-se a avaliação das características analíticas da metodologia proposta por meio da determinação das figuras de mérito descritas a seguir:

##### i) Linearidade

Caracterizada pela determinação da faixa linear, equação de calibração e coeficiente de correlação da respectiva curva analítica;

##### ii) Seletividade

Avaliada por meio da inspeção visual dos gráficos de linhas de emissão fornecidas pelo equipamento;

##### iii) Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

LD e LQ instrumentais foram calculados como sendo 3 (para LD) e 10 (para LQ) vezes o desvio padrão do branco ( $n = 10$ ) dividido pelo coeficiente angular da curva analítica ( $LD = 3s/a \therefore LQ = 10s/a$ )<sup>95</sup>; LD e LQ do método levam em consideração o fator de diluição da amostra (~5,7 vezes).

##### iv) Precisão instrumental

Dividida em três fatores: a) precisão do equipamento, representado como o desvio padrão do sinal de cada elemento, em nove réplicas; b) o desvio padrão conjunto para cada

elemento, considerando-se o fator de diluição das amostras e c) estabilidade de longa duração, calculado como o desvio padrão relativo para uma solução contendo os padrões internos na concentração de  $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{HNO}_3$  1% v/v e 2% v/v de etanol, injetada alternadamente entre as soluções de referência e as amostras, ao longo de um dia de análise;

v) Veracidade (exatidão)

Estimada pelo grau de recuperação de analito, adicionado em quatro distintos níveis de concentração ao vinho.

*2.3.4.6 Análise das amostras*

As amostras utilizadas, indicadas na tabela 8, consistiram em vinhos tintos espanhóis (Es – num total de 14 garrafas), adquiridos em comércio local em Valência – Espanha e em vinhos brancos e tintos brasileiros, subdivididos em tintos comerciais (adquiridos em comércio local na cidade de Recife – total de 14 garrafas) e tintos (16 garrafas) e brancos (15 garrafas) varietais experimentais (garantia de elaboração com 100% da uva indicada), adquiridos junto à Embrapa Semi-Árido.

Após abertas as garrafas de vinho, o valor do pH das amostras foi aferido e as mesmas (1,75 mL) foram, em triplicata, posteriormente acidificadas com 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  (69,6% m/m), diluídas com água para 10 mL e injetadas no equipamento de ICP.

*2.3.4.7 Análise quimiométrica*

Os dados obtidos por USN-ICP OES foram tratados com o software Statistica 6.0<sup>®</sup> para obtenção das médias, desvios-padrão, e valores máximos e mínimos. Posteriormente o mesmo software foi aplicado para a análise multivariada de dados por meio da Análise de Componentes Principais (PCA), objetivando-se a visualização de algum padrão existente. Antes da análise de PCA os dados foram autoescalados para se evitar tendências devido às diferentes ordens de grandeza dos valores.

Tabela 8: Relação das amostras analisadas por USN-ICP OES.

Origem	Código	Uva	safra	Descrição	Teor Alc.
Espanha	E6, E7, E8	Tempranillo (90%)	2009	D.O.C. La Rioja, Crianza	13%
	E9 – E11	Tempranillo (90%) + Granacha (10%)	2008	D.O.C. La Rioja, Crianza	13%
	E12 – E17	Tempranillo	2010	D.O.C. Valência	12%
	E18, E19	Tempranillo	2010	D.O.C: Alicante	13%
Brasil VSF comercial	V1, V2	Tannat	2009	-	12%
	V3, V4	Tempranillo	2009	-	12%
	V5 – V8	Shiraz (Syrah)	2009	-	13%
	V9 – V12	Tempranillo	2008	-	12%
	V13, V14	Shiraz (Syrah)	2008	-	13%
Brasil Experimental tinto	T1, T3, T5, T7	Tempranillo (100%)	2008	Faz. Ouro Verde	NI
	T2, T4, T6, T8	Tempranillo (100%)	2009	Faz. Ouro Verde	NI
	S1 – S4	Shiraz/Syrah (100%)	2008	Faz. Ouro Verde	NI
	S5 – S8	Shiraz/Syrah (100%)	2009	Faz. Ouro Verde	NI
Brasil Experimental branco	Vd1, Vd3, Vd5, Vd7	Verdejo (100%)	2008	Faz. Ouro Verde	NI
	Vd2, Vd4, Vd6	Verdejo (100%)	2009	Faz. Ouro Verde	NI
	Vg1, Vg3, Vg5, Vg7	Viognier (100%)	2008	Faz. Ouro Verde	NI
	Vg2, Vg4, Vg6, Vg8	Viognier (100%)	2009	Faz. Ouro Verde	NI

## 2.4 Resultados e discussão

De acordo com a tabela periódica, Sc e Y não são classificados como elementos de transição interna. Porém, devido às suas baixas concentrações nos vinhos e por estarem contidos na solução multielementar dos elementos terras raras, esses dois elementos serão, nesta tese, *por simplicidade de nomenclatura*, tratados como pertencentes ao grupo dos lantanídeos.

### 2.4.1 Estudo das condições operacionais do ICP OES

A análise das soluções aquosas contendo etanol com diferentes concentrações, não extinguiu o plasma, entretanto, observou-se diminuição do sinal com o aumento do teor alcoólico como pode ser visto nas figuras 26a e 26b. Isto ocorre devido à presença de matéria orgânica (etanol) que ao atingir o plasma causa efeitos de esfriamento e diminuição da sensibilidade do mesmo devido à maior energia requerida para dissociar as espécies orgânicas<sup>143</sup>.

Observa-se que o decréscimo de sinal segue uma tendência de relação linear no intervalo de 0 a 9% (v/v), de acordo com a equação:

$$R = 99 - 8,5xTA$$

Onde  $R = [S_i/S_0] \times 100\%$ ,  $S_i$  = sinal em um teor alcoólico de  $x\%$ ,  $S_0$  = Sinal com teor alcoólico de  $0\%$  e  $TA$  = teor alcoólico.

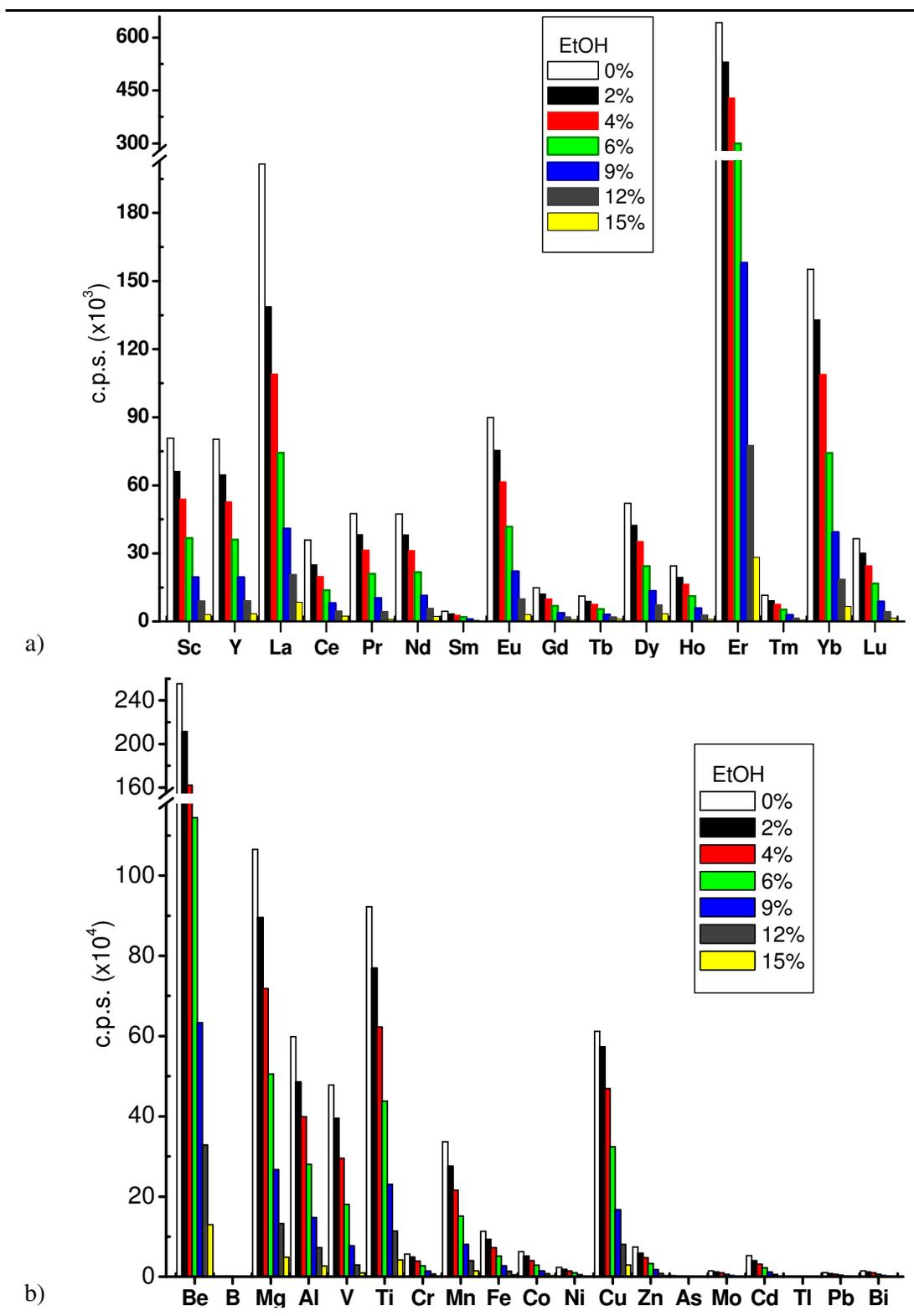


Figura 26: Estudo entre variação de teor alcoólico e intensidade de sinal analítico. (a) lantanídeos a  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  e (b) demais elementos a  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  adicionados a solução aquosa.

Esta relação pode ser melhor visualizada na figura 27.

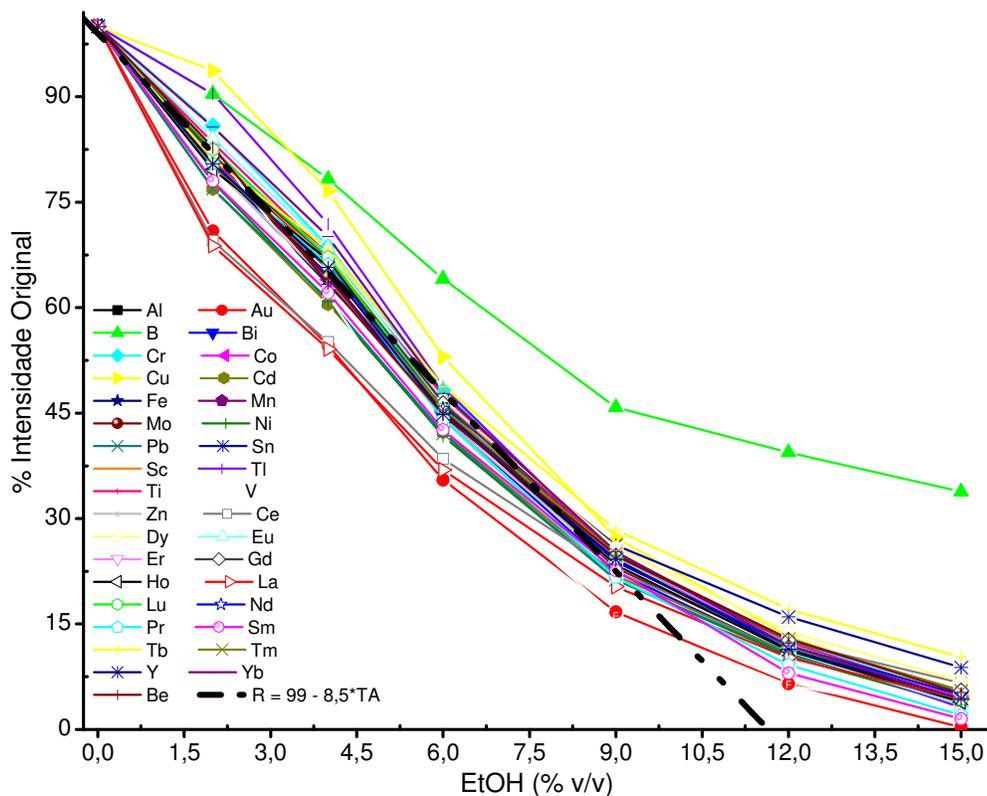


Figura 27: Intensidade de sinal (R) de diferentes analitos versus teor alcoólico da solução testada.

Após 9% (v/v) de teor alcoólico não se observa mais um decréscimo regular, com o sinal reduzindo-se lentamente.

O vinho é uma bebida que possui uma grande quantidade de matéria orgânica devido à presença dos polifenóis, álcoois superiores, antocianinas, etc., por isso, também se faz necessário sua avaliação preliminar quanto à estabilidade do plasma. Da mesma forma como observado para soluções aquosas contendo etanol, a extinção do plasma não foi observada com a adição das soluções dos elementos estudados ao vinho, figura 28. Porém a mesma não segue uma relação linear ao relacionar sinal analítico e percentual de vinho na solução. Provavelmente devido à complexidade da matriz que apresenta diversas substâncias com os mais variados calores de vaporização, densidades, pressão de vapor, tensões superficiais, dentre outras.

Essas propriedades físicas podem ocasionar variações na formação do aerossol, alterando a temperatura do plasma e gerando alteração na excitação / ionização dos analitos, refletindo assim, no sinal analítico<sup>143</sup>.

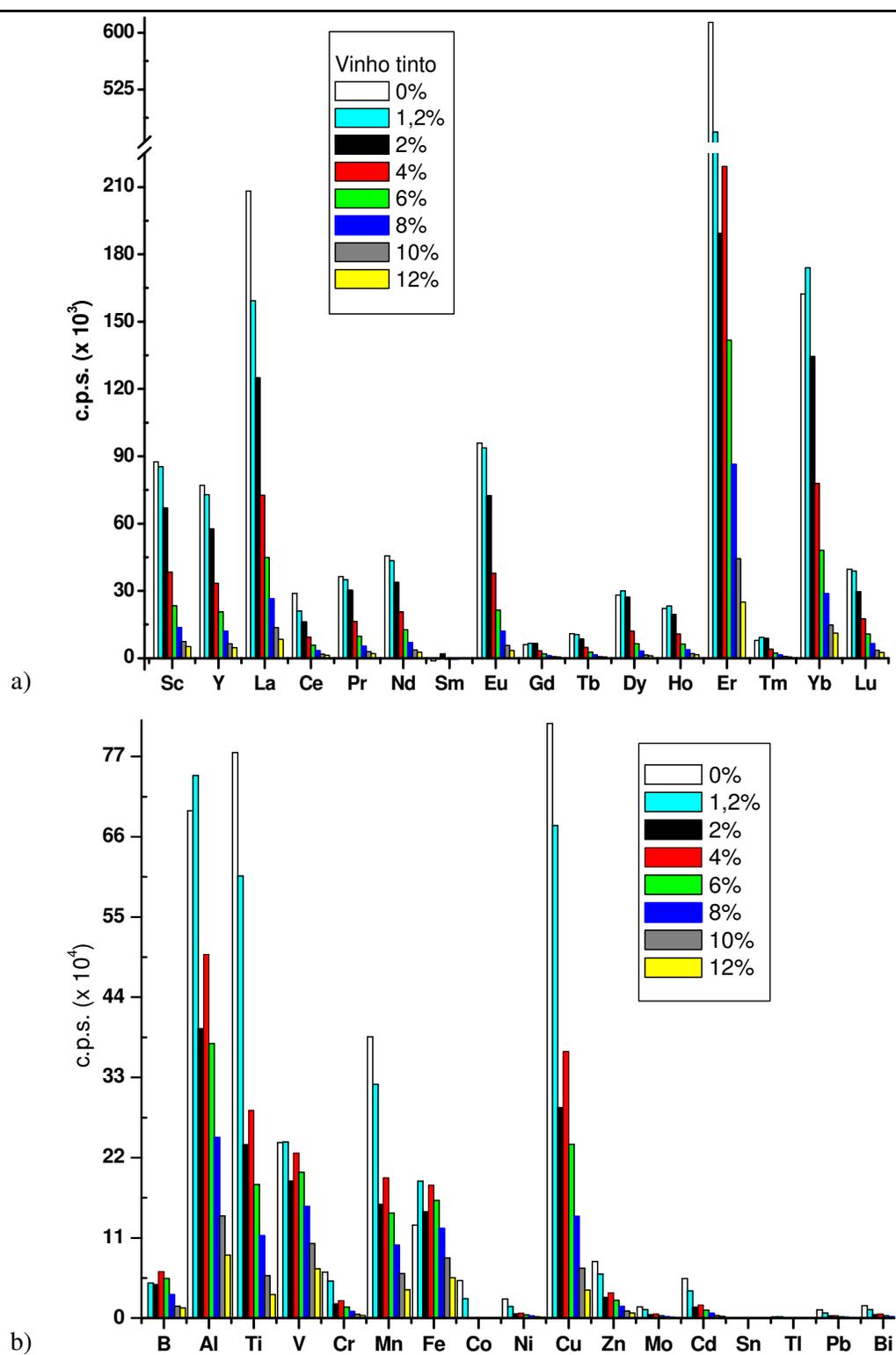


Figura 28: Intensidade de sinais obtidos no USN-ICP OES para lantanídeos (a) e metais de transição / representativos (b) adicionados no vinho diluído contendo diferentes teores alcoólicos.

As concentrações naturais de vários dos analitos presentes no vinho estão próximas ao valor adicionado de  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  e isso pode contribuir para a irregularidade no decréscimo do sinal analítico na figura 28b, pois não haverá apenas a variação da matéria orgânica com as diluições, mas também ocorrerá variação na concentração dos elementos naturalmente presentes no vinho.

Ao contrario, na figura 28a, a quantidade de lantanídeo adicionada ( $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) proporcionalmente é maior que a quantidade originalmente presente nas amostras de vinhos, e uma regularidade é “melhor” visualizada.

Ressalta-se que não foi observado precipitação dos polifenóis com a acidificação dos vinhos, durante o período de análise.

Após avaliar os resultados, fixou-se o teor alcoólico em 2% (v/v) para iniciar os estudos de maximização de sinal do sistema analítico. Esta condição foi selecionada por não se tratar de uma diluição muito alta e por manter mais de 50% do sinal original (sem etanol) para a maioria dos elementos analisados.

#### 2.4.2 Planejamento fatorial para avaliação das condições de operação do ICP

Os valores dos níveis dos fluxos de gás empregados se basearam em recomendações gerais existentes no manual do fabricante do equipamento, enquanto que os valores de teor alcoólico foram estabelecidos de acordo com o estudo, anterior, das condições operacionais do ICP OES.

O resultado do planejamento fatorial de dois níveis ( $2^4$ ) com 4 repetições no ponto central, com seus fatores, valores dos níveis e valores selecionados, estão indicados na tabela abaixo.

Tabela 9: Fatores, níveis de estudo (e suas unidades de medida) e valores selecionados para a maximização da resposta analítica na análise de vinhos por ICP OES.

Fator	Unidade	Nível			Valor selecionado
		-1	0	+1	
Teor Alcoólico – TA	% v/v	2,0	4,0	6,0	2,0
Fluxo da amostra – FBp	$\text{mL min}^{-1}$	0,80	1,00	1,20	0,80
Fluxo gás auxiliar – Faux	$\text{L min}^{-1}$	0,20	0,50	0,80	0,20
Fluxo gás nebulizador – Fneb	$\text{L min}^{-1}$	0,6	1,0	1,4	0,6

Condições mantidas constantes: Radiofrequência =  $1400 \text{ W}$ ; Fluxo principal =  $15 \text{ L min}^{-1}$ ; Temperaturas do nebulizador ultrassônico: Aquecimento =  $140 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ , resfriamento =  $2,0 \pm 0,3 \text{ } ^\circ\text{C}$  e membrana de dessolvatação =  $150 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Após um período de trabalho, observou-se a formação de uma crosta negra na tocha do ICP, provavelmente devido à queima incompleta da matéria orgânica contida no vinho, com o depósito de carbono não convertido a  $\text{CO}_2$  ou totalmente atomizado. Para evitar um possível desgaste, ou mesmo a inutilização do equipamento, realizou-se uma nova avaliação de parâmetros que ainda maximizassem os valores de resposta analítica e gerassem uma queima completa da matéria orgânica do vinho. Para tanto, novas variáveis foram incluídas no estudo, como indicado na tabela 10, e outras variáveis já estudadas como o fluxo da amostra e o teor alcoólico, foram empregadas no nível selecionado.

Tabela 10: Fatores e níveis de estudo (com suas unidades de medida) para a maximização da resposta analítica na análise de vinhos por ICP OES

Codificação	Fator	Unidade	Níveis		
			-1	0	+1
Rf	Potência do gerador de Radiofrequência	W	1400	1450	1500
Fp	Fluxo de gás principal	$\text{L min}^{-1}$	15	16	17
Fa	Fluxo de gás auxiliar	$\text{L min}^{-1}$	0,7	1,0	1,3
Fn	Fluxo de gás nebulizador	$\text{L min}^{-1}$	0,4	0,6	0,8

Condições mantidas constantes: Teor alcoólico (diluição) = 2%; Fluxo de amostra =  $0,80 \text{ mL min}^{-1}$ ; Temperaturas do nebulizador ultrassônico: aquecimento =  $140 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , resfriamento =  $2,0 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$  e membrana de dessolvatação =  $150 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Sabe-se que o fluxo de gás auxiliar serve para afastar, do plasma já formado, a saída do fluxo interno (o tubo de injeção), evitando que o aerossol da amostra seja queimado (evaporado, atomizado, excitado/ionizado e excitado) ainda no tubo e auxiliando também na formação de um plasma mais eficiente, devido à maior quantidade de argônio que o alcança. Por isso, o menor valor do segundo estudo (tabela 10) iniciou-se como sendo um valor superior do estudo anterior (tabela 9).

A função do fluxo de gás de nebulização consiste em conduzir a amostra até o plasma. Portanto, quanto mais amostra atinge o mesmo, maior será a carga orgânica. Desta forma, reduziram-se seus valores tendo, agora, como limite inferior o menor valor de fluxo permitido pelo equipamento ( $0,40 \text{ L min}^{-1}$ ).

Os resultados obtidos para os elementos são mostrados na tabela 11, com a codificação dada na tabela 10. Nesta tabela, são indicadas as estimativas de cada efeito principal e de interações, obtidas utilizando-se o sinal líquido de cada elemento estudado, com o objetivo de aumentar este valor para o maior número possível de analitos.

Tabela 11: Efeitos principais, de interações entre os fatores estudados e o valor do erro puro obtidos usando USN- ICP OES para os analitos determinados nas amostras de vinhos.

Analito	Média	$x_{Rf}$	$x_{Fp}$	$x_{Fa}$	$x_{Fn}$	$x_{Rf*Fp}$	$x_{Rf*Fa}$	$x_{Fp*Fa}$	$x_{Fp*Fn}$	$x_{Fa,x_{Fn}}$	$x_{Rf,x_{Fp},x_{Fa}}$	$x_{Fp,x_{Fa},x_{Fn}}$	Erro puro
Li 610	2,8				+9,8								$\pm 1,8 \times 10^3$
Be 313	64	+42		-12	-33			+53		+87		-42	$\pm 11 \times 10^3$
B 249													$\pm 4$
Na 589	199			+55	+123			-41			+41		$\pm 11 \times 10^3$
Mg280	42,0				-13,9								$\pm 1,6 \times 10^3$
Al 396	84												$\pm 8$
K 766	44,8												$\pm 3,8 \times 10^3$
Ca 317	1950				-504								$\pm 98$
Sc 361	47,9				-13,3								$\pm 2,6 \times 10^3$
Ti 334	169				-51								$\pm 9 \times 10^3$
V 292	25,1				-8,4								$\pm 1,3 \times 10^3$
Cr 283	11,8				-4,9								$\pm 0,5 \times 10^3$
Mn259	88,4				-36,7								$\pm 4,1 \times 10^3$
Fe 259	23,3				-9,2								$\pm 0,7 \times 10^3$
Co 228	2442				-1130								$\pm 77$
Ni 221	692				-602								$\pm 61$
Cu 324	181												$\pm 9 \times 10^3$
Zn 213	5,30				-1,83								$\pm 0,29 \times 10^3$
As 188	661				-97								$\pm 21 \times 10^3$
Se 196	974												$\pm 53$
Sr 421	4,35				-0,94								$\pm 0,23 \times 10^6$
Y 371	50,8				-13,6								$\pm 2,7 \times 10^3$
Mo202	1827			-168	-803								$\pm 44$
Cd 228	5,05				-1,80								$\pm 0,28 \times 10^3$
Sn 189	391	+34			-109								$\pm 7,5$
Sb 206	103,4	+7,0	-11,1	-17,6	-28,4	-5,1	-4,7	+14,9	+10,6	+14,7	+6,1	-12,4	$\pm 1,3$
Ba 493	391												$\pm 13 \times 10^3$
La 408	133,3				-24,4								$\pm 5,6 \times 10^3$
Ce 413	14,4				-3,9								$\pm 0,7 \times 10^3$
Pr 390	40,1				-4,4								$\pm 1,2 \times 10^3$
Nd 401	37,8				-6,2								$\pm 1,3 \times 10^3$
Sm442	12,9				-2,2								$\pm 0,6 \times 10^3$
Eu 381	45,4				-10,6								$\pm 2,6 \times 10^3$
Gd 342	5,4				-1,2								$\pm 0,3 \times 10^3$
Tb 350	9,9				-1,6								$\pm 0,4 \times 10^3$
Dy 353	37,6				-5,1								$\pm 1,2 \times 10^3$
Ho 345	23,1				-3,6								$\pm 0,8 \times 10^3$
Er 337	140,0				-38,4								$\pm 6,6 \times 10^3$
Tm346	9,5				-1,9								$\pm 0,4 \times 10^3$
Yb 328	91,1				-25,0								$\pm 4,8 \times 10^3$
Lu 261	21,6				-6,9								$\pm 1,1 \times 10^3$
Tl 190	422			-52	-42			+53	+27	+41		-38	$\pm 8$
Pb 220	1,5		-1,3		-1,0				+1,0				$\pm 0,1 \times 10^3$
Bi 223	1,5												$\pm 0,1 \times 10^3$

São indicados apenas os termos significativos ( $p < 0,05$ ). Para o cálculo do erro puro foram usadas as replicatas do ponto central ( $n = 4$ ).

Visualizando-se a tabela 11, empregando o nível de 95% de confiança, as conclusões obtidas são:

- a) Apenas o efeito principal Fn (fluxo de gás de nebulização) foi significativo, com sinal negativo, para os elementos Mg, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, As, Sr, Y, Cd, La, Ce, Nd, Pr, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb e Lu. Indicando que a melhor condição é o nível inferior (Fn = -1) para os mesmos;
- b) Nenhum efeito principal ou de interação foi significativo para os elementos B, Al, K, Cu, Se, Ba e Bi. Desta forma, a melhor condição estabelecida para os outros elementos serão as utilizadas;
- c) Em relação à potência da Radiofrequência (Rf), observa-se uma influência significativa com sinal positivo (Rf = +1) para os elementos Be, Sn e Sb. Seus efeitos de interação com  $x_{Fp}$  e  $x_{Fn}$  são significativos com sinal negativo, o que é condizente com Fn na condição (-1);
- d) O fluxo principal (Fp) foi significativo, com sinal negativo, para Sb e Pb e seus sinais positivos nas interações com Fn e Fa para os elementos Sb, Tl e Pb ratificam sua melhor condição no nível inferior (-1);
- e) O fluxo de gás auxiliar (Fa) foi, exceto para o Na, significativo para os elementos Be, Mo, Sb e Tl, com sinal negativo. Suas interações com  $x_{Fn}$  e  $x_{Fp}$  com sinais negativos e com  $x_{Rf}$  com valores negativos ratificam o nível inferior (Fa = -1) com melhor condição

Para o fator potência da radiofrequência (Rf), seu efeito principal é significativo com sinal positivo (ou seja, melhor condição em seu nível superior), o que já se esperaria observar devido à necessidade de maior energia quando se analisa amostras contendo matéria orgânica<sup>141</sup>.

Após se avaliar as informações descritas, as condições estabelecidas como adequadas para o andamento das análises, em termos dos níveis nos quais os fatores serão utilizados, foram: Rf = +1; Fp = -1; Fa = -1 e Fn = -1. Os valores numéricos selecionados estão sumarizados na tabela 12.

Admite-se que os resultados obtidos com este estudo multivariado são suficientes para os propósitos do trabalho, e, portanto, os valores escolhidos serão utilizados para as determinações de metais em vinhos, sem a necessidade de se realizar uma otimização dos parâmetros.

Tabela 12: Condições finais utilizadas para a análise de elementos por USN-ICP OES em amostras de vinhos, após os resultados da análise multivariada.

Parâmetro	Valor	Unidade
Potência do gerador de Radiofrequência	1500	W
Fluxo de gás principal	15	L min <sup>-1</sup>
Fluxo de gás auxiliar	0,7	L min <sup>-1</sup>
Fluxo de gás nebulização	0,4	L min <sup>-1</sup>
Fluxo da amostra	0,80	mL min <sup>-1</sup>
Teor Alcoólico (diluição)	~ 2 (1:5,7)	% v/v

### 2.4.3 Efeito matriz

Os sinais obtidos para as soluções de referência preparadas no vinho tinto 13,5% (V2), na solução alcoólica a 2% de etanol em água (EtOH) e na água foram utilizadas para construir suas curvas analíticas e os coeficientes angulares ( $a_i$ ) foram comparados com o obtido com o vinho tinto 11 % (V1) - vinho que foi atribuído, arbitrariamente, como o valor de referência (ou seja, seu coeficiente angular,  $a_0$ , foi tomado como o nível zero). Avaliou-se, figura 30, o quanto as respostas variavam percentualmente em relação ao coeficiente angular ( $a_0$ ) da curva analítica obtida com o vinho V1, tomada como referência.

Observa-se que praticamente não há diferenças entre as duas matrizes de vinho tinto. Em relação aos padrões adicionados à solução contendo etanol, verifica-se que, exceto apenas para Se e Sb, a variação é menor que 15% e, portanto, aceitável. Estes dois elementos continuarão nos estudos de validação para se verificar se essa influência será marcante ou não. Verifica-se também que, para as soluções aquosas, poucos são os elementos que respondem similar à matriz vinho e, portanto, não passível de utilização.

Desta forma, trabalhar com uma solução etanólica como solvente das soluções de referência fornece uma boa simulação de matriz (do inglês, matrix matched), além de evitar a interferência causada pela composição natural do vinho que venha a ser usado como referência, diminuindo o efeito matriz.

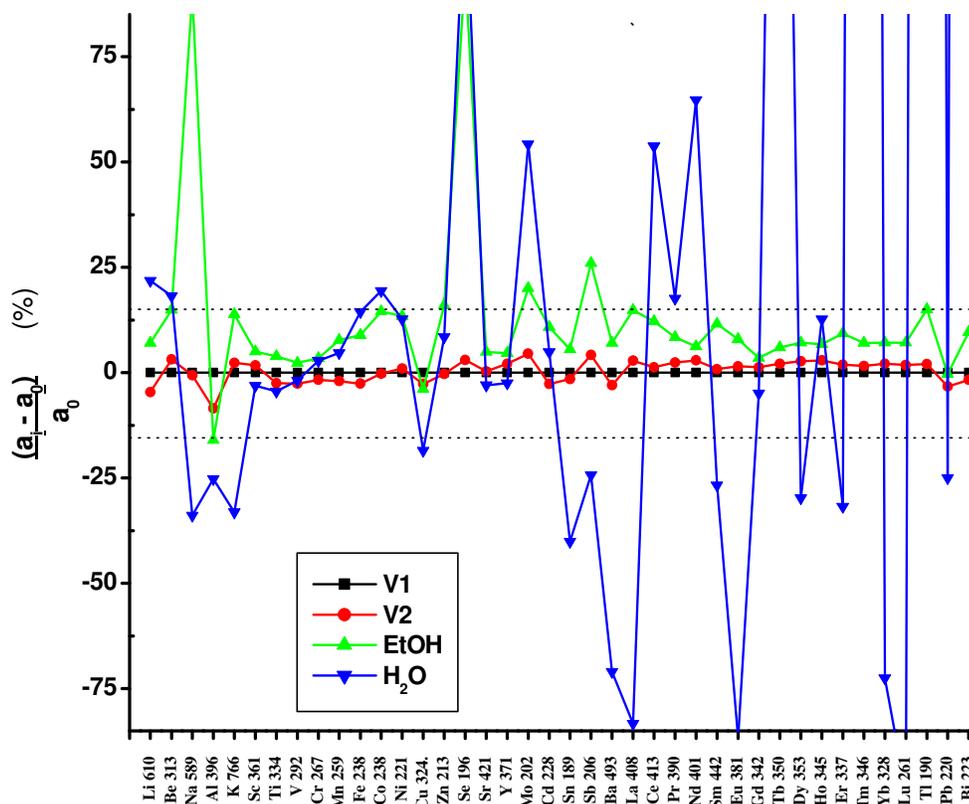


Figura 29: Resultado de teste de efeito matriz. Padrões ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$  para lantanídeos,  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  para os demais) adicionados a: V1 = vinho tinto 1 (11%), V2 = vinho tinto 2 (13,5%), EtOH = solução alcoólica a 2% de etanol em água e  $\text{H}_2\text{O}$  = padrões dissolvidos em água. Todos acidificados com 1% de  $\text{HNO}_3$ .  $a_i$  e  $a_0$  = coeficientes angulares das curvas analíticas, sendo  $a_0$  utilizando-se apenas V1 (referencial).

#### 2.4.4 Seleção do padrão interno

Inicialmente foram eliminadas ambas as linhas de Ge (265,118 nm e 209,426 nm) e Re (227,525 nm e 197,248 nm) por apresentarem sinais muito abaixo de  $10^4$  c.p.s. (valor tomado como limite para que as flutuações naturais no detector não sejam significativas na resposta do padrão interno, a relação Sinal/Ruído). Tais respostas poderiam ser aumentadas, porém com um custo maior devido à maior concentração exigida destes, e, portanto, não realizada.

Em seguida, observou-se que ambas as linhas do In (325,609 nm e 230,606 nm) e a linha 417,206 nm do Ga apresentaram interferência com os outros elementos em estudo nos vinhos, com os sinais variando (mesmo com a concentração do padrão interno sendo fixa) à medida que se construía a curva de calibração dos analitos (figura 31), desta forma estes elementos também foram descartados.

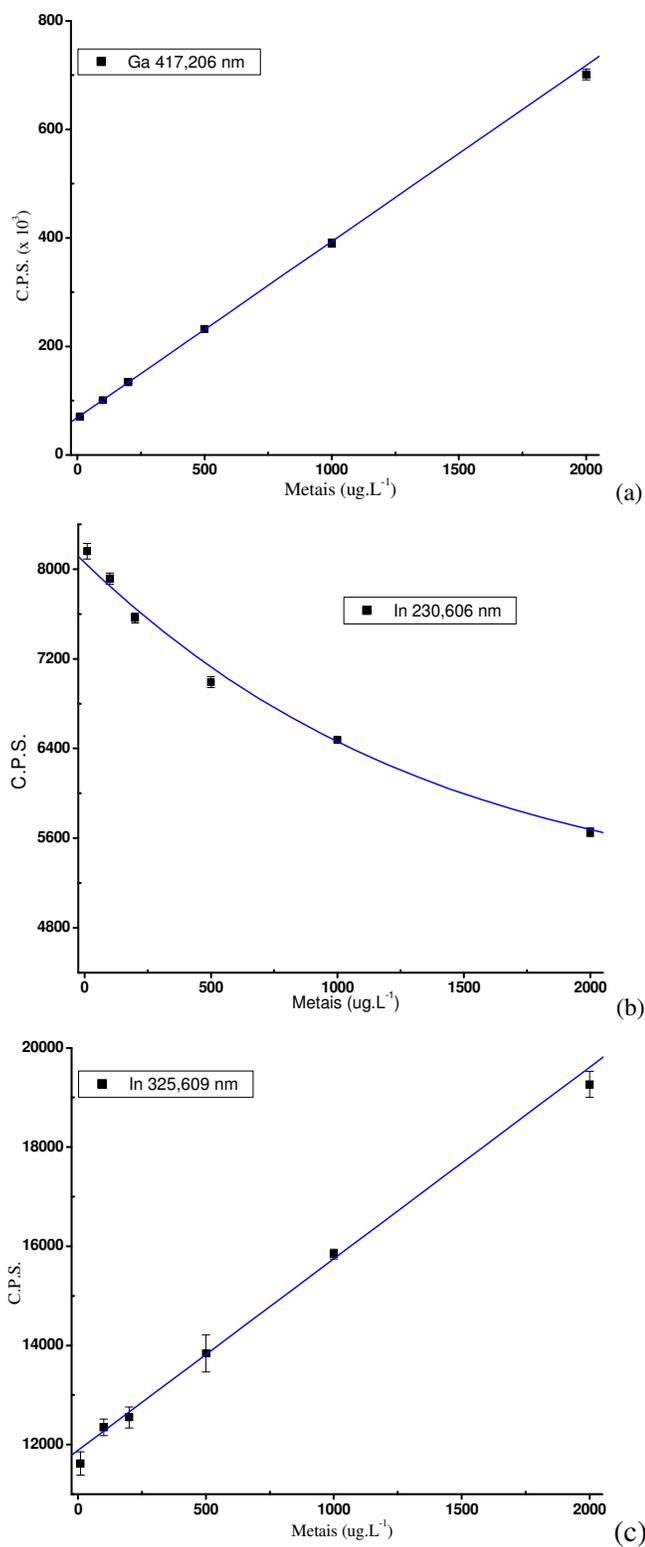


Figura 30: Curvas analíticas obtidas para os diferentes metais usando como padrão interno Ga 417,2 nm (a), In 230,6 nm (b) e In 325,6 nm (c), todos na concentração de 0,20 mg L<sup>-1</sup>. Esta variação indica interferência espectral nas três linhas, com conseqüente eliminação das mesmas.

Os dois elementos restantes, Ga 294,364 e Ru 240,272 nm, que apresentaram boa resposta analítica (maior que  $10^4$  cps), sem causar interferência, foram avaliados quanto à sensibilidade (inclinação da curva de calibração) do método e o percentual de recuperação do teste realizado para duas amostras reais para saber qual destes candidatos seria o melhor padrão interno.

Verificou-se que a melhor opção corresponde a atribuir diferentes padrões internos a diferentes elementos em estudo, inclusive com alguns dos analitos não necessitando de um padrão interno para resultar em uma taxa de recuperação adequada.

Esta conclusão é respaldada pelo fato de que o padrão interno somente é efetivo na compensação de interferências não espectrais se o mesmo apresenta características similares ao analito que se deseja corrigir em relação às energias de excitação/ionização, velocidade de evaporação e nas condições de formação do aerossol<sup>192</sup>.

As condições escolhidas, em termos de padrões internos e linhas de emissão, estão resumidas na tabela 13.

Tabela 13: Faixa de trabalho para cada elemento determinado, suas linhas de emissão e respectivos padrões internos e o coeficiente de determinação da curva analítica.

<b>Z</b>	<b>Ru 240</b>	<b>Ga 294</b>	<b>Sem padrão interno</b>
3		Li 610,362 (A, I)*	
4			Be 313,042 (A, II)
5			B 249,677 (A, I)
11			Na 589,592 (R, I)
12			Mg 280,271 (R, II)
13		Al 396,153 (A, I)	
19			K 766,490 (R, I)
20			Ca 317,933 (A, II)
21			Sc 361,383 (A, II)
22			Ti 334,940 (A, II)
23			V 292,402 (A, II)
24		Cr 267,716 (A, II)	
25			Mn 259,372 (A, II)
26			Fe 238,204 (A, II)
27	Co 238,892 (A, II)		
28			Ni 221,648 (A, II)
29		Cu 324,752 (A, I)	
30	Zn 213,857 (A, I)		
33			As 188,979 (A, I)
34	Se 196,026 (A, I)		
38		Sr 421,552 (R, II)	
39			Y 371,099 (A, II)
42			Mo 202,031 (A, II)
48			Cd 228,802 (A, I)
50			Sn 189,927 (A, I)
51	Sb 206,836 (A, I)		
56			Ba 493,408 (A, II)
57			La 408,672 (A, II)
58			Ce 413,764 (A, II)
59			Pr 390,844 (A, II)
60			Nd 401,225 (A, II)
62			Sm 442,434 (A, II)
63		Eu 381,967 (A, II)	
64		Gd 342,247 (A, II)	
65		Tb 350,917 (A, II)	
66			Dy 353,170 (A, II)
67	Ho 345,600 (A, II)		
68		Er 337,271 (A, II)	
69			Tm 346,220 (A, II)
70		Yb 328,937 (A, II)	
71		Lu 261,542 (A, II)	
81		Tl 190,801 (A, II)	
82	Pb 220,353 (A, II)		
83			Bi 223,061 (A, I)

A = visão Axial; R =visão radial e I = linha atômica e II = linha iônica.

\*Li 610,362 (A, I): representa o elemento Li, na linha de emissão 610,362 nm, visão axial e linha atômica.

### 2.4.5 Figuras de mérito

A seletividade foi verificada pela observação visual da raia espectral fornecida pelo equipamento, somada ao conhecimento das linhas de emissão escolhidas e suas possíveis interferências (segundo o manual do equipamento) já bem conhecidas.

Na figura 31 estão indicadas as imagens do software controlador do ICP que servem como exemplo para indicar que não ocorre sobreposição de linhas espectrais e que, portanto, a seletividade adequada ao trabalho foi alcançada.

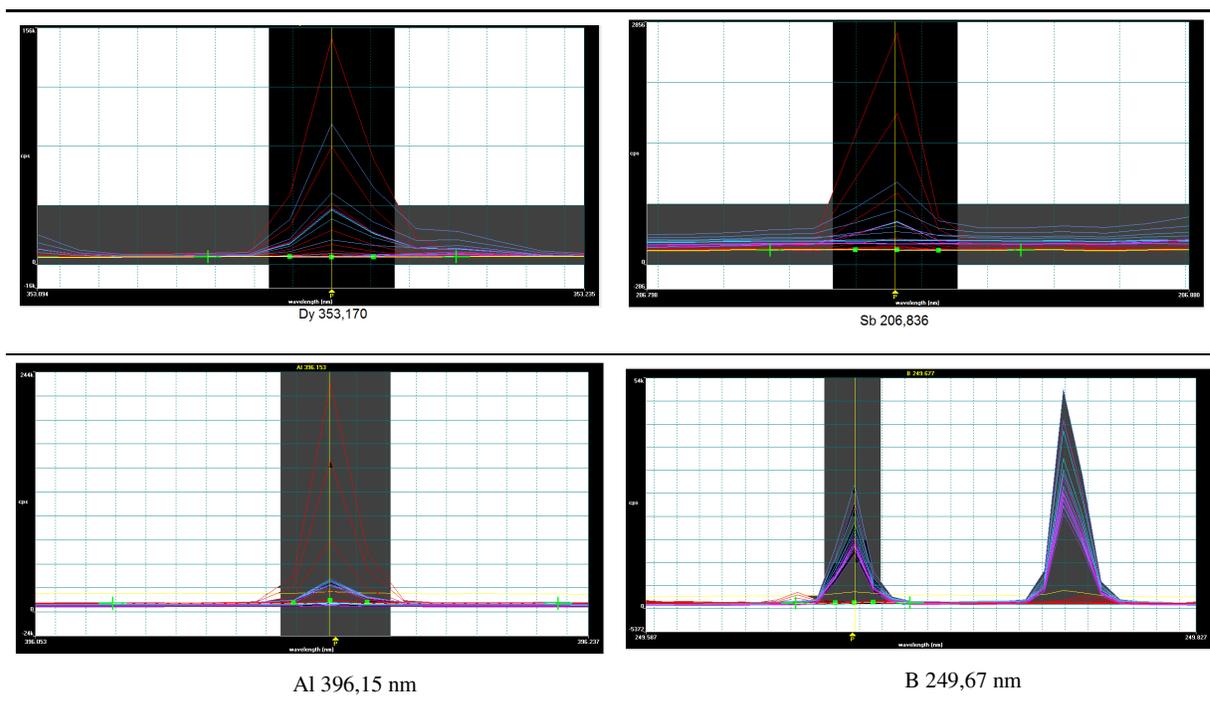


Figura 31: Imagens do software controlador do ICP para demonstrar a seletividade alcançada.

A linearidade foi obtida para cada elemento nas faixas de concentração indicadas na tabela 14. Todos os analitos apresentaram um coeficiente de determinação superior a 0,998.

Os limites de detecção observados encontram-se indicados na figura 32, na qual os valores de LD do método correspondem à 5,7 vezes LD instrumental (diluição da amostra = 10 mL / 1,75 mL  $\approx$  5,7). Na figura 32, observa-se que alguns poucos elementos apresentaram valores de LOD relativamente altos (LOD > 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ): B, As, Se, Sn, Sb e Tl.

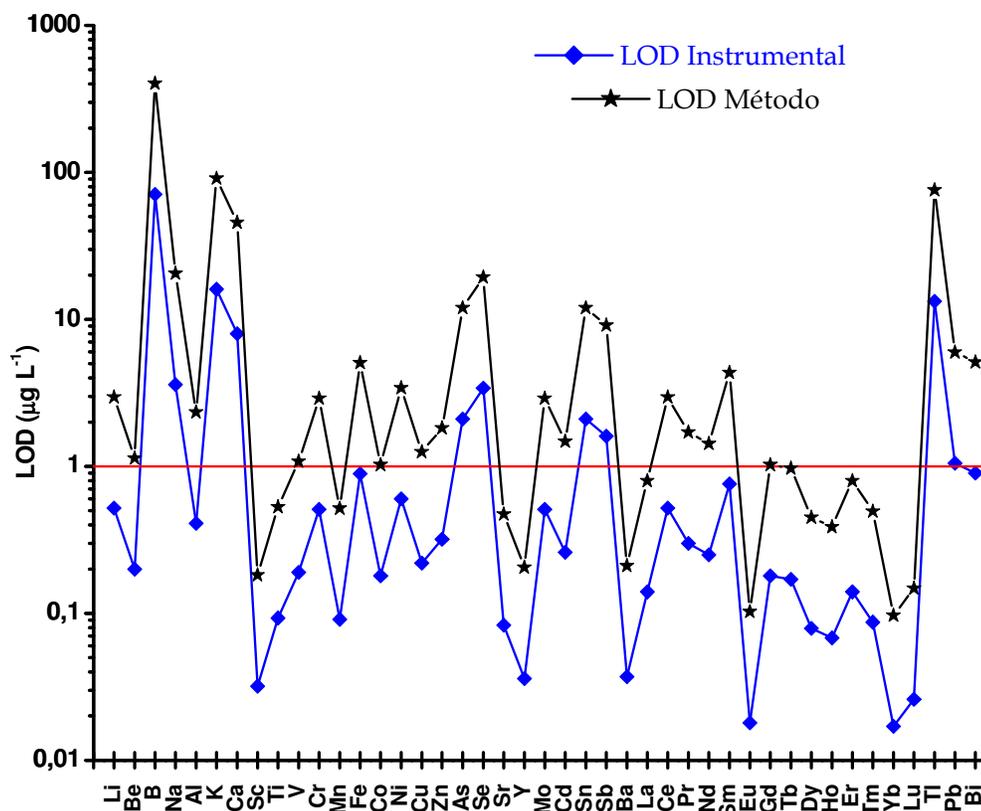


Figura 32: Limites de detecção instrumental e do método (considerando o fator de diluição) obtidos por USN-ICP OES.

Comparando-se todos os valores de LOD instrumental com outros encontrados na literatura (nos artigos citados, os autores não incluem o fator de diluição no cálculo do LOD e/ou LOQ), observa-se na figura 33 que o método proposto foi capaz de fornecer melhores valores de LOD para alguns elementos mesmo quando comparado com o uso de ICP-MS (Li, Al, Ni, Cu e Zn na referência 193; Na, Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn na referência 194 e Na, Mg, Al, Ca, Sc, Ti, Cr, Mn e Zn, referência 183). Observam-se também valores melhores ou similares para diversos elementos quando comparados entre os métodos proposto e ICP-MS e GFAAS: As, Pb e Se.

Outro ponto a ser comentado é o fato dos métodos encontrados na literatura não serem aplicados a alguns elementos, ainda que se utilizem do ICP-MS. Assim, o método desenvolvido tem a vantagem de realizar análise multielementar, incluindo os lantanídeos – poucos citados na literatura.

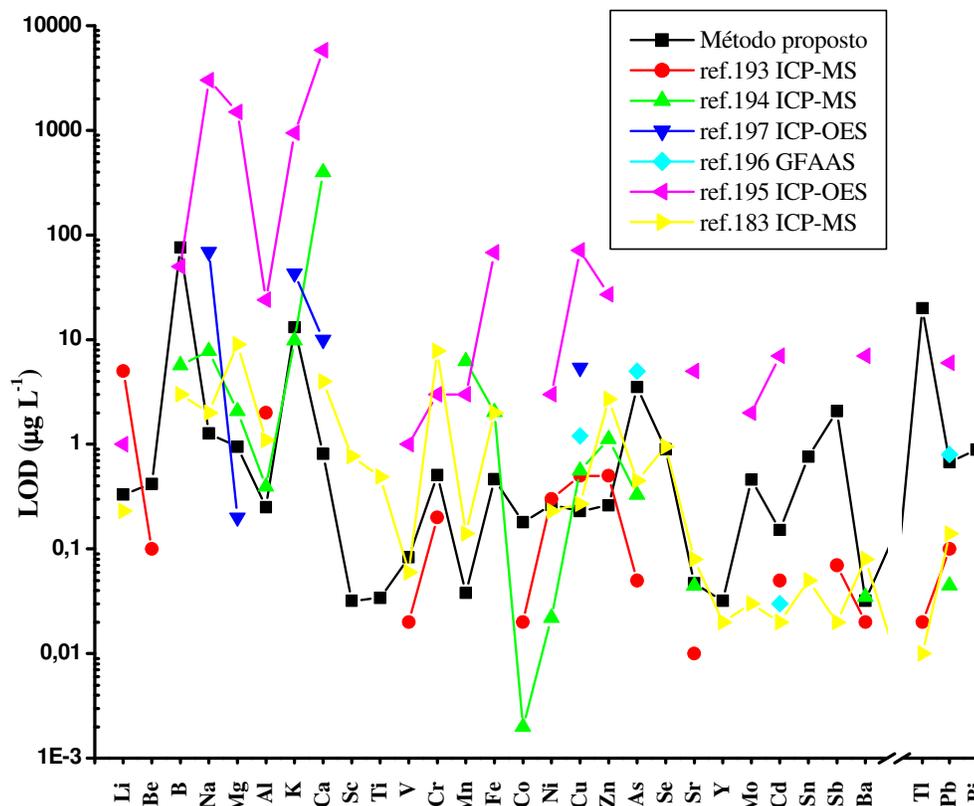


Figura 33: Comparação entre os valores de LODs do método proposto e de trabalhos citados na literatura.

A precisão, avaliada como o desvio padrão relativo da concentração dos elementos (RSD, ou estabilidade em curto prazo), forneceu os valores indicados na figura 34, na qual se observa um valor médio de desvio padrão relativo abaixo de 2,5% – com exceção para B, As, Se, Sn e Tl.

Na literatura, encontram-se valores que variam de 0,2 a 28,0% e de 2,0 a 18,5 % para análises realizadas por ICP-MS<sup>198</sup> e ICP-OES<sup>195</sup>, respectivamente. Logo, o método proposto apresentou melhores resultados para alguns elementos, principalmente em relação aos dados apresentados na literatura para medidas realizadas também com o ICP-OES.

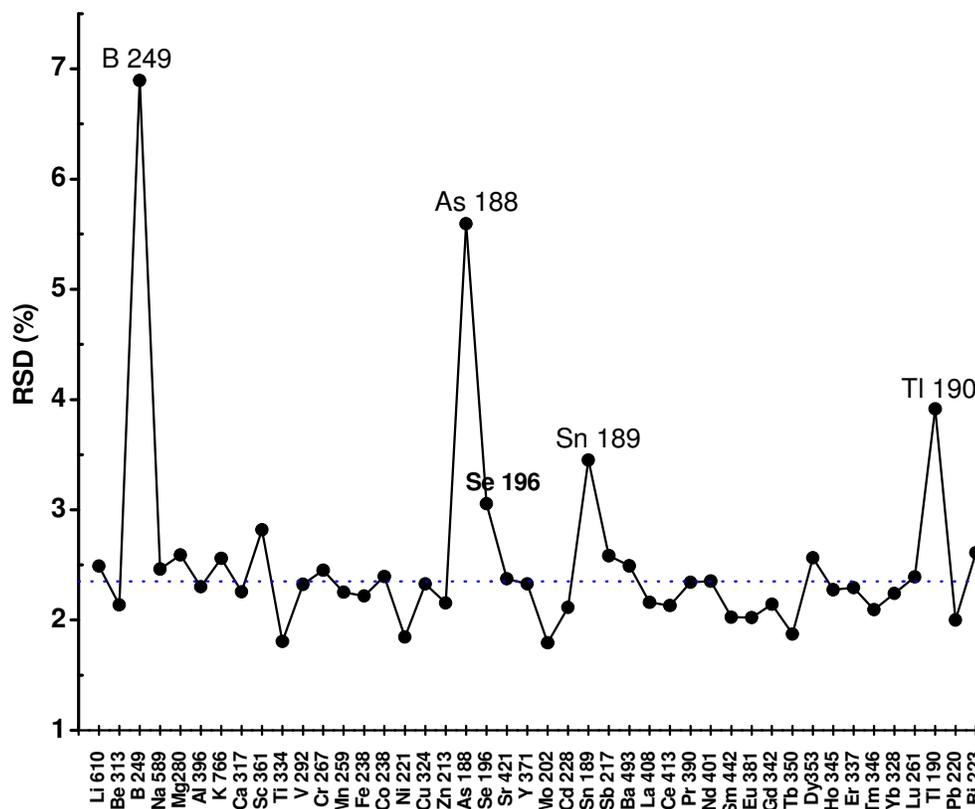


Figura 34: RSD ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$  de lantanídeos,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  demais elementos,  $n = 9$ ) obtidos para a técnica USN-ICP OES.

Os resultados de precisão, obtidos em termos da estabilidade de longa duração para as soluções dos padrões internos, apresentou os valores de 1,18% para Ru e 2,60% para Ga, medidos num intervalo de tempo de 4 horas de análise.

Com relação à veracidade, os resultados do teste de adição e recuperação em quatro distintos níveis estudados, visando abranger uma ampla faixa de possíveis valores dos elementos nos vinhos, estão indicados na figura 35.

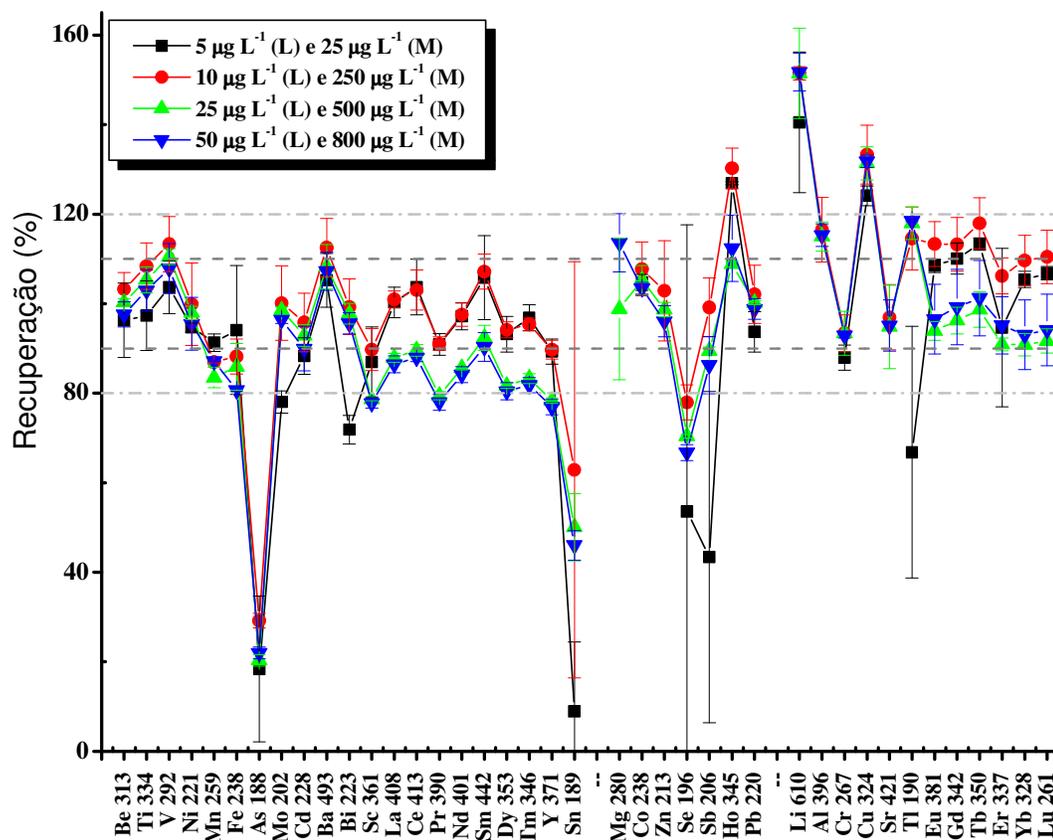


Figura 35: Resultados do teste de adição e recuperação do método proposto. (L) lantânidos e (M) metais de transição e representativos.

O método apresentou resultados de recuperação que variou de 90 a 110% para a maioria dos elementos estudados. Alguns resultados também se apresentaram adequados ao trabalho, com variação um pouco maior, de 80 a 120 % de recuperação, devido às suas baixas concentrações observadas. Portanto os valores foram, em suma, adequados às faixas de concentração para os elementos nos vinhos, sugerindo boa aplicabilidade para o mesmo, no que diz respeito à veracidade. Exceções foram verificadas para os elementos As, Sn e Se, que apresentaram valores muito baixo de recuperação.

Após estabelecer as figuras de mérito do método proposto, observa-se que o mesmo foi linear, seletivo, apresentou valores adequados de precisão, veracidade e limites de detecção/quantificação requeridos à sua correta aplicação para a maioria dos elementos estudados. Na tabela 14 encontra-se um resumo das figuras de mérito obtidas no método de USN-ICP OES desenvolvido. Nessa tabela, a última coluna corresponde aos valores mínimos e máximos de recuperações observados.

Tabela 14: Resumo das figuras de mérito obtidas para a técnica USN-ICP OES.

Z	Faixa ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD (%)	Recuperação* (%)
Li 610	0,33 – 1000	0,99994	0,33	1,11	2,5	140 – 151
Be 313	0,42 – 1000	0,9998	0,42	1,40	2,1	96 – 103
B 249	76 – 10000	0,9986	76	254	6,9	**
Na 589	1,27 – 5000	0,9997	1,27	4,23	2,5	**
Mg 280	0,95 – 10000	0,9998	0,95	3,15	2,6	99 – 129
Al 396	0,25 – 1000	0,99985	0,25	0,83	2,3	115 – 125
K 766	13 – 10000	0,9989	13,1	43,6	2,6	**
Ca 317	0,81 – 10000	0,9996	0,81	2,70	2,3	**
Sc 361	0,032 – 500	0,99994	0,032	0,11	2,8	79 – 90
Ti 334	0,034 – 1000	0,99991	0,034	0,11	1,8	97 – 108
V 292	0,083 – 1000	0,9998	0,083	0,28	2,3	104 – 113
Cr 267	0,51 – 1000	0,9997	0,51	1,70	2,4	88 – 93
Mn 259	0,038 – 5000	0,99996	0,038	0,13	2,2	84 – 91
Fe 238	0,46 – 5000	0,9998	0,46	1,54	2,2	81 – 94
Co 238	0,18 – 1000	0,99986	0,18	0,60	2,4	103 – 108
Ni 221	0,26 – 1000	0,99990	0,26	0,88	1,8	95 – 100
Cu 324	0,23 – 1000	0,9997	0,23	0,77	2,3	124 – 133
Zn 213	0,26 – 1000	0,99991	0,26	0,87	2,2	96 – 103
As 188	3,5 – 1000	0,9998	3,5	11,7	5,6	20 – 30
Se 196	0,90 – 1000	0,9997	0,90	3,0	3,1	67 – 78
Sr 421	0,047 – 1000	0,99991	0,047	0,16	2,4	95 – 100
Y 371	0,032 – 500	0,99993	0,032	0,11	2,3	77 – 90
Mo 202	0,46 – 1000	0,9998	0,46	1,53	1,8	78 – 100
Cd 228	0,15 – 1000	0,9998	0,15	0,51	2,1	88 – 96
Sn 189	0,76 – 500	0,99986	0,76	2,5	3,4	46 – 63
Sb 206	2,1 – 500	0,9996	2,07	6,9	2,6	43 – 99
Ba 493	0,032 – 1000	0,99993	0,032	0,11	2,5	105 – 112
La 408	0,14 – 2500	0,9998	0,14	0,47	2,2	86 – 101
Ce 413	0,36 – 2500	0,99991	0,36	1,20	2,1	88 – 104
Pr 390	0,14 – 2500	0,9998	0,14	0,48	2,3	78 – 91
Nd 401	0,12 – 2500	0,99987	0,12	0,41	2,3	84 – 98
Sm 442	0,21 – 500	0,9998	0,21	0,72	2,0	90 – 107
Eu 381	0,030 – 500	0,9998	0,030	0,10	2,0	94 – 113
Gd 342	0,18 – 500	0,99986	0,18	0,60	2,1	96 – 113
Tb 350	0,12 – 500	0,9998	0,12	0,40	1,9	99 – 118
Dy 353	0,078 – 500	0,99992	0,078	0,26	2,6	81 – 94
Ho 345	0,068 – 500	0,99993	0,068	0,23	2,3	109 – 127
Er 337	0,14 – 500	0,99990	0,14	0,46	2,3	91 – 106
Tm 346	0,034 – 500	0,99989	0,034	0,11	2,1	82 – 97
Yb 328	0,012 – 500	0,99993	0,012	0,040	2,2	91 – 110
Lu 261	0,034 – 500	0,99987	0,034	0,11	2,4	92 – 110
Tl 190	20 – 1000	0,9987	20,0	67	3,9	67 – 118
Pb 220	0,68 – 1000	0,9998	0,68	2,26	2,0	94 – 102
Bi 223	0,89 – 1000	0,9997	0,89	2,96	2,6	72 – 99

\*As recuperações foram feitas em 4 níveis distintos. São mostrados o menor e o maior valor obtido. \*\* As quantidades adicionadas foram muito pequenas comparadas ao seu teor no vinho, portanto não foi possível se determinar uma recuperação para os mesmos.

Após estabelecer as figuras de mérito do método proposto, verifica-se que poucos elementos apresentaram resultados de recuperação fora dos limites comumente aceitos.

Assim, devido aos não adequados valores observados desde o estudo do efeito matriz, somados aos altos valores de limite de detecção (e conseqüente quantificação), RSD e, principalmente, às baixas taxas de recuperações observadas, os elementos **As**, **Se**, **Sn** e **Tl** foram excluídos da sequencia de análises por não estarem totalmente validados.

#### 2.4.6 Análise das amostras

Alguns autores descrevem que o processo de preparo de amostras de vinhos via digestão pode resultar na perda de elementos voláteis bem como, na contaminação da amostra devido ao aumento no número de etapas, aumentando também o tempo total de análise<sup>182,183</sup>. Outros autores demonstram com seus resultados que o processo de digestão gera valores diferenciados de concentração dos elementos em comparação aos resultados obtidos somente com a diluição da amostra<sup>185,187,199</sup>. Desta forma, optou-se pela simples diluição da amostra neste trabalho, buscando-se seguir ao máximo as recomendações da química verde<sup>200</sup> – com a diminuição de reagentes utilizados, visando à minimização dos volumes de efluentes gerados – e a redução da possibilidade de contaminação da amostra.

Com relação ao uso do ácido nítrico no preparo de amostras, é necessária a adição deste para estabilização das soluções. Porém, alguns trabalhos demonstraram que o uso do ácido em concentrações elevadas reduz a eficiência da análise com perda de sinal, sendo recomendado o uso de uma concentração em torno de 0,14 mol L<sup>-1</sup> – equivalente a uma solução 1%<sup>183,192b,201</sup>.

Vale salientar que, como se utilizou nas análises etanol grau HPLC, por não ser comercializado o solvente em grau adequado à espectroscopia atômica, poderia ter ocorrido um aumento na concentração de alguns dos elementos, causando interferência. Porém, como ocorre diluição do etanol para seu uso (50 vezes), as concentrações se tornam baixas o suficiente para não causarem interferência na concentração para a maioria dos elementos analisados (considerando-se apenas os declarados no rótulo do álcool), como indicado na tabela 15.

Tabela 15: Contribuição para a concentração dos elementos estudados ocasionados pela adição do ácido e do etanol às soluções de referência (já considerada a diluição realizada).

Elementos	Contaminação máxima
Al, Sn e Pb	< 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$
Li, Be, B, Ti, V, Cr, Co, Ni, As, Mo, Sb e Tl	< 0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$
Ca, Fe, Zn, Cd e Ba	< 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$
Na, Mg, K, Mn, Cu, Se e Sr	< 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$

Ainda consoante o rótulo dos reagentes, não se pode afirmar se houve, da mesma forma que o exposto acima, possibilidade de interferência nos valores de LOD para os lantanídeos, pois nada é declarado acerca deles.

Os resultados obtidos para a determinação dos elementos minerais e o pH de todas as amostras analisadas encontram-se indicados nas tabelas do apêndice B. Porém, a tabela 16 mostra um resumo destes valores para uma rápida visualização.

Os elementos majoritários tem grande influência nas propriedades físico-químicas dos vinhos e ajudam a regular a acidez do mesmo (principalmente o potássio). Assim, a medição do pH pode contribuir com interpretações de estabilidade, bem como com a de biodisponibilidade dos elementos minoritário, devido ao deslocamento de equilíbrio entre estes e compostos orgânicos<sup>33,138</sup>.

Observa-se que, para os vinhos tintos do Vale, os valores de pH apresentam-se elevados. Podendo contribuir com a instabilidade dos mesmos e sua rápida degradação. Os vinhos brancos, por não realizarem a fermentação malolática (transformação de ácido málico em láctico – um ácido mais fraco), apresentam naturalmente os valores mais baixos de pH<sup>2,3</sup>.

Com relação aos lantanídeos, observa-se que La, Ce e Nd são os elementos que se encontram em maior concentração nas amostras analisadas, e tal fato é o comumente observado na literatura<sup>184-187,202</sup>.

Tabela 16: Concentração mínima (Min) e máxima (Max), medianas (Md), médias (M) e desvios-padrão (Sd) para pH e elementos determinados nos vinhos analisados.

Linha (nm)	Vsf tinto					VEsp tinto					Vsf branco				
	Min	Max	Md	M	Sd	Min	Max	Md	M	Sd	Min	Max	Md	M	Sd
pH	3,72	4,28	3,82	3,90	0,17	3,49	3,66	3,61	3,58	0,07	3,10	3,77	3,42	3,52	0,20
Li 610,362	ND <sup>a</sup>	162,1	29,8	45,3	44,7	16,0	150,6	76,9	76,2	47,0	27,8	93,2	39,8	51,3	22,7
B <sup>c</sup> 249,677	7,3	2618	451	770	789	12,2	1087	104,8	210,3	271	173	5405	501	1460	1893
Na <sup>c</sup> 589,592	1,3	71,6	12,6	18,5	21,0	17,8	36,4	28,8	26,2	6,8	17,3	31,3	23,2	23,5	3,8
Mg <sup>c</sup> 280,271	61,5	395	104	134	85	87,2	172,6	95,9	103,1	25,5	34,7	83,4	55,6	54,7	11,2
Al 396,153	102	597	248	262	116	444	848	496	538	113	303	676	462	471	112
K <sup>b</sup> 766,490	0,61	2,41	1,59	1,46	0,52	0,74	1,69	0,94	0,98	0,26	0,55	0,98	0,65	0,70	0,15
Ca <sup>c</sup> 317,933	20,3	142,6	75,3	80,3	30,4	43,3	131,2	49,4	58,2	25,7	36,1	83,9	52,8	52,6	12,4
Sc 361,383	0,20	7,85	0,75	1,36	1,62	0,33	0,79	0,58	0,57	0,18	0,26	3,65	0,80	1,04	0,88
Ti 334,940	ND	50,0	3,7	10,0	13,8	ND	36,1	8,4	17,0	13,5	0,56	5,78	3,13	3,14	2,09
V 292,402	0,52	282,0	11,2	67,6	101,4	2,2	78,0	32,9	42,1	26,0	1,5	17,4	3,3	5,7	5,2
Cr 267,716	8,3	448,5	83,4	131,9	134,9	12,5	90,3	84,9	63,3	33,1	ND	19,7	10,6	11,7	5,6
Mn 259,372	431	2981	1037	1166	652	422	1915	694	826	456	599	2450	1124	1266	597
Fe <sup>c</sup> 238,204	0,50	4,20	2,11	2,20	0,95	1,21	3,36	1,81	1,95	0,56	0,42	1,79	0,56	0,83	0,47
Co 238,892	6,1	275,9	13,6	32,3	58,5	ND	22,1	14,7	12,4	7,4	1,2	12,9	7,7	6,9	3,5
Ni <sup>c</sup> 221,648	0,13	1,77	0,27	0,41	0,42	0,13	0,36	0,19	0,21	0,08	0,08	0,35	0,16	0,18	0,09
Cu 324,752	16,2	1805	76,0	212	400	20,8	60,5	34,3	39,7	15,5	ND	21,2	ND	5,7	6,5
Zn 213,857	0,18	4,23	0,70	0,93	0,92	0,30	0,51	0,38	0,39	0,08	0,11	0,58	0,33	0,31	0,16
Sr <sup>c</sup> 421,552	0,36	1,82	0,60	0,77	0,43	0,97	1,65	1,07	1,21	0,26	0,29	0,63	0,38	0,41	0,10
Y 371,099	ND	26,1	1,68	4,40	7,94	0,34	1,08	0,71	0,79	0,24	ND	4,33	0,78	1,12	1,13
Mo 202,031	7,4	545	24,1	80,0	156	10,5	37,6	27,9	25,2	9,0	4,1	26,8	8,7	10,6	6,7
Cd 228,802	1,37	39,5	3,24	7,48	10,9	ND	4,28	0,60	1,89	1,10	ND	1,98	0,92	1,10	0,35
Sb 206,836	ND	1469	ND	134	348	ND	52,8	40,8	33,4	15,5	ND	-	-	-	-
Ba 493,408	77,1	510	255	280	147	63,3	195,2	70,3	88,2	44,7	94,7	244	135	138	46
La 408,672	ND	6,42	2,28	2,69	1,85	ND	2,84	ND	1,26	0,75	ND	5,28	1,07	1,70	1,41
Ce 413,764	ND	117	4,7	27,0	41,6	ND	10,13	3,93	4,72	2,72	2,1	40,7	4,3	12,8	14,8
Pr 390,844	ND	96,8	3,3	16,5	25,6	ND	1,07	ND	-	-	ND	7,03	1,02	2,09	1,99
Nd 401,225	ND	44,0	4,2	13,8	16,7	ND	6,26	1,09	1,98	1,70	ND	5,17	0,96	1,55	1,28
Sm 442,434	ND	206	11,4	29,4	49,9	ND	42,3	1,57	4,49	10,9	ND	9,12	ND	3,03	2,52
Eu 381,967	ND	13,71	0,31	2,25	3,78	ND	0,53	0,33	0,34	0,14	ND	0,22	ND	0,18	0,01
Gd 342,247	ND	25,1	1,38	4,93	6,97	ND	2,83	1,27	1,65	0,70	ND	1,14	ND	1,14	0,03
Tb 350,917	ND	13,2	ND	1,95	3,25	ND	5,15	3,86	2,99	1,84	ND	ND	-	-	-
Dy 353,170	ND	10,3	2,44	3,26	2,79	ND	4,33	0,98	1,38	1,12	2,36	8,96	3,89	4,71	2,28
Ho 345,600	ND	12,2	1,03	1,98	3,00	ND	1,29	0,77	0,73	0,27	ND	1,47	ND	0,63	0,35
Er 337,271	ND	32,4	3,81	8,09	8,89	1,64	28,70	7,40	14,08	10,5	ND	10,0	ND	1,94	2,43
Tm 346,220	ND	11,7	0,81	1,96	2,80	ND	0,88	0,58	0,57	0,16	ND	2,49	0,29	0,86	0,91
Yb 328,937	ND	12,7	0,65	2,00	3,62	0,16	0,71	0,58	0,51	0,20	ND	0,86	0,35	0,35	0,23
Lu 261,542	ND	6,62	0,41	1,01	1,47	ND	0,61	0,42	0,38	0,13	ND	1,73	ND	0,69	0,64
Pb 220,353	ND	3027	11,8	328	880	4,5	30,6	13,0	13,9	7,9	ND	16,6	ND	6,8	4,3
Bi 223,061	10,1	519,4	35,6	78,0	113,5	12,1	40,4	24,0	23,4	8,3	11,2	143	25,2	36,0	33,5

a: ND = Não detectado; b: g L<sup>-1</sup>; c: mg L<sup>-1</sup>. Vsf tinto: vinho tinto elaborado no Vale do São Francisco (Brasil); VEsp tinto: vinho tinto elaborado na Espanha; Vsf branco: vinho branco elaborado no Vale do São Francisco (Brasil).

Para os demais elementos, observa-se uma variação normal para as concentrações nos vinhos analisados quando comparados com os resultados publicados em outros trabalhos científicos<sup>33,138</sup>.

O berílio não se encontra expresso na tabela, pois se observou pouco antes de finalizar o trabalho uma possível contaminação do equipamento (por parte de outro usuário) com este elemento. Desta forma, optou-se por sua exclusão.

O acoplamento do nebulizador ultrassônico com o ICP já foi realizado por alguns grupos. Porém, uma série deles foi aplicada apenas a um único elemento determinado em matrizes variadas, como cádmio<sup>155</sup> e chumbo<sup>156</sup> em vinhos com sistema de complexação e pré-concentração em linha; a especiação de vanádio (V vs VI)<sup>203</sup>, determinados em amostras de água utilizando injeção em fluxo; chumbo em chá mate<sup>204</sup> utilizando pré-concentração em linha e Al, Cr, Fe e V em ervas medicinais argentinas<sup>205</sup>. Alguns poucos artigos já usaram o USN para a análise de vinhos, contudo foram aplicados para determinação de poucos elementos – como chumbo<sup>153</sup>, cádmio<sup>155</sup> e Al, Ca, Cr, Fe, Ni e Zn<sup>154</sup> – ou para a determinação de muitos elementos, porém com uma digestão prévia das amostras<sup>184-186</sup>, e com o uso do ICP MS<sup>182,183,185</sup>.

Desta forma, este trabalho aqui apresentado traz o diferencial de realizar uma análise multielementar em vinhos, incluídos os da região do Vale do São Francisco utilizando o acoplamento do nebulizador ultrassônico (USN) com o ICP OES, sem digestão prévia da amostra, utilizando apenas a diluição dos vinhos.

#### 2.4.7 Análise de Componentes Principais

Buscando-se verificar se há alguma tendência de agrupamento das amostras com base nas concentrações dos elementos determinados realizou-se uma avaliação por meio da Análise de Componentes Principais (PCA).

Para as amostras que tiveram a concentração dos elementos determinados abaixo do limite de detecção do método, tais valores foram expressos, na PCA, como sendo igual ao LOD<sup>184,185</sup>.

A PCA foi aplicada inicialmente em todo o conjunto de dados e o gráfico de escores resultante encontra-se na figura 36. Nesta figura observa-se que as amostras V11 a V14 (comerciais tintas do VSF, em preto) apresentam-se muito distinta de todas as demais amostras, dominando a PCA e interferindo na visualização de um possível agrupamento.



Tendência oposta aos vinhos tintos espanhóis, que apresentam menor variabilidade e apresentam-se mais próximos entre si.

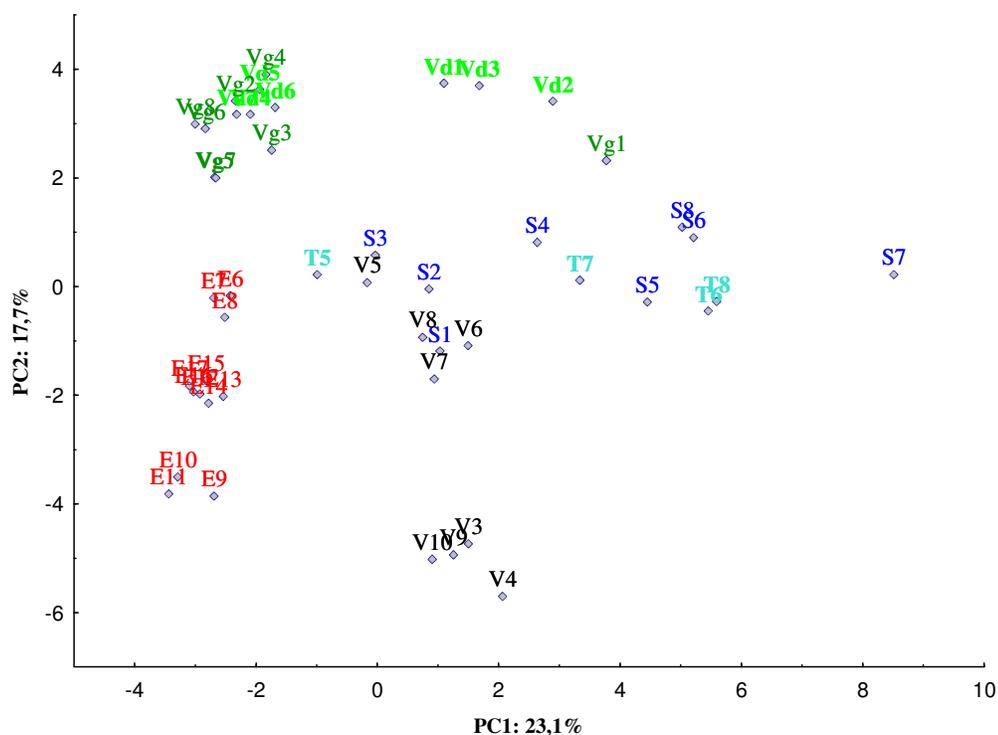


Figura 37: Gráfico de escores da segunda PCA, realizada excluindo oito amostras. Em tons de verde estão as amostras brancas; em tons de azul, amostras tintas varietais experimentais; em preto, vinhos tintos comerciais brasileiros e, em vermelho, tintos espanhóis.

Os vinhos brancos tendem a se separar dos demais, principalmente devido à maior concentração de Na, Al e Lu e menores concentrações dos demais elementos. Dessas amostras, **Vd1** a **Vd3** e **Vg1** destacam-se pelos teores mais elevados de B, Mn, Ce e Dy (gráfico de Loadings na figura 38).

Percebe-se também pelo esposto no gráfico de Loadings (na figura 38) que as maiores concentrações da maioria dos elementos encontram-se nos vinhos tintos brasileiros, mais a direita e abaixo dos eixos das PC1 e PC2. Enquanto que os vinhos espanhóis se caracterizaram, principalmente, pelos maiores teores de Na, Al, Li, Sb, Tb e Sr.

Com o mesmo conjunto de dados, realizaram-se outras análises por componentes principais, utilizando-se apenas os elementos majoritários e também apenas os minoritários. Os resultados observados (dados não indicados) não trouxeram informações diferenciadas das obtidas com a PCA mostrada nas figuras 37 e 38.

Também não foi possível verificar uma clara tendência de agrupamento quando se buscava por variações quanto à safra e quanto à variedade da uva principal utilizada na elaboração dos vinhos.

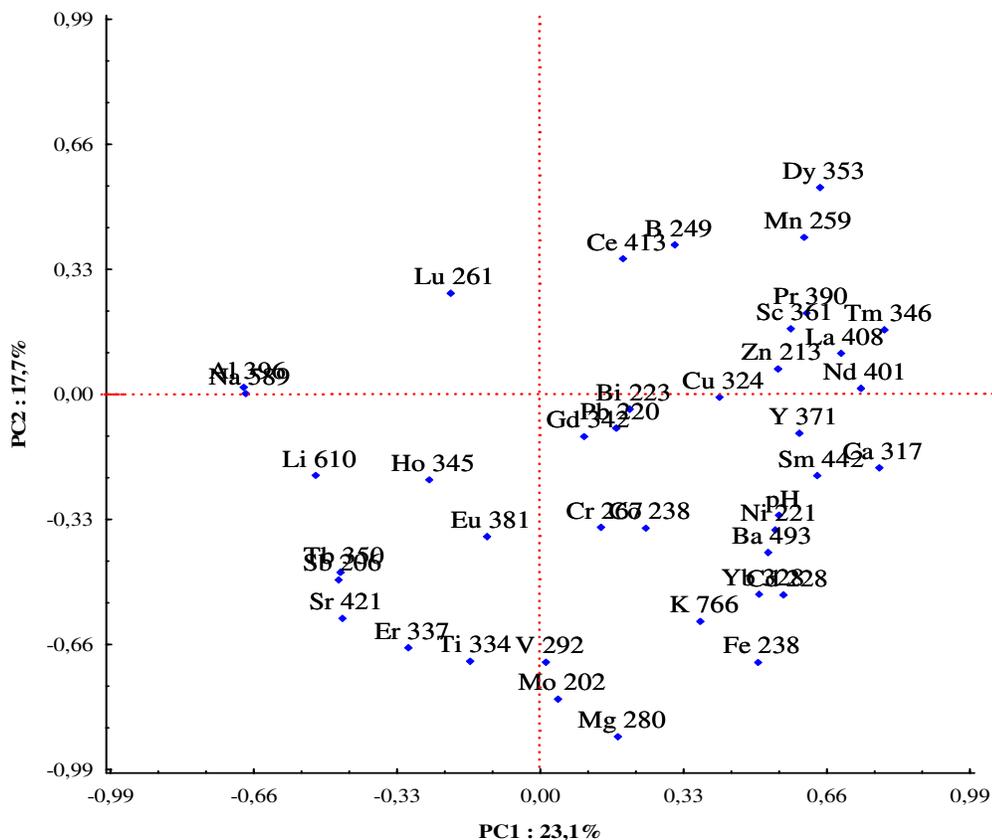


Figura 38: Gráfico de Loadings da terceira PCA (excluindo as oito amostras).

Optou-se também por não se utilizar as amostras de vinhos brancos na PCA, para se estudar apenas as amostras das uvas tintas Tempranillo e Shiraz, buscando algum agrupamento entre as mesmas tanto por safra quanto por localidade.

Assim, uma nova PCA (a quarta) foi executada com base numa matriz de dados contendo 31 amostras tintas (doze espanholas, oito comerciais brasileiras e onze varietais experimentais brasileiras) e 40 variáveis. O gráfico de loadings de PC1 vs PC2 está indicado na figura 39, contendo cerca de 50% da informação original.

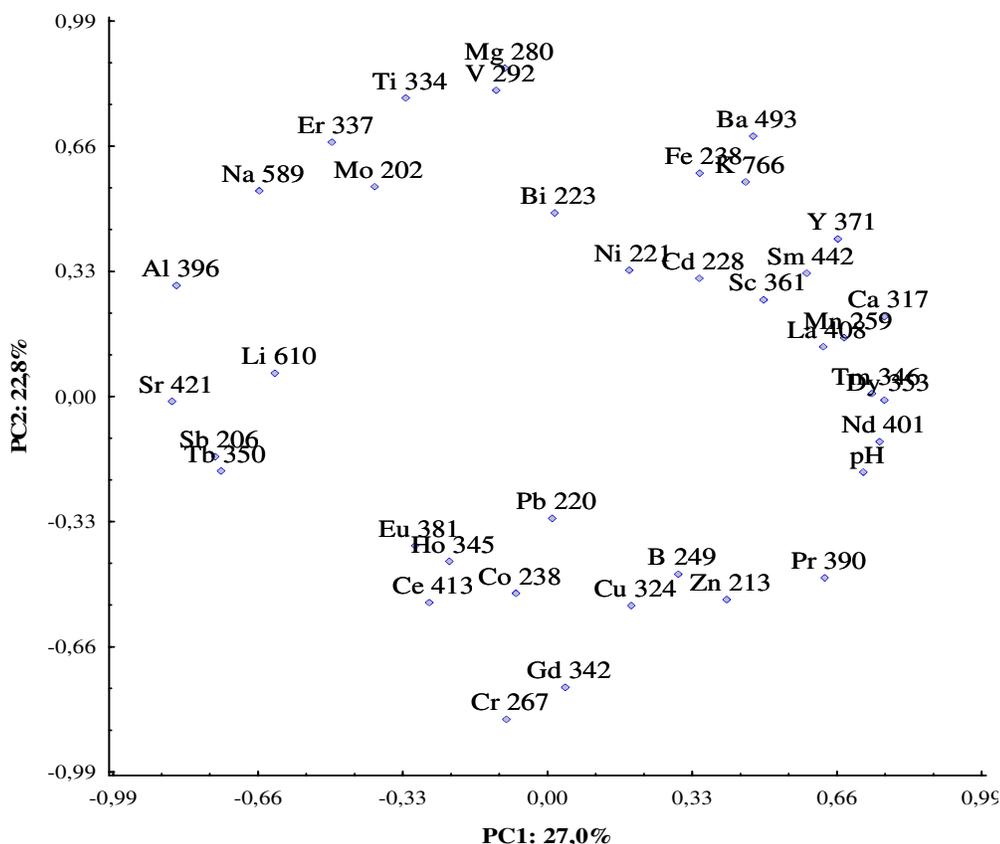


Figura 39: Gráfico de loadings da PCA realizada apenas com os vinhos tintos Tempranillo e Syrah.

Nesta nova análise, os vinhos possuindo altos valores de pH – menos ácidos – tendem a localizarem-se na extrema direita de PC1. Da mesma forma, se encontrarão os vinhos mais concentrados em La, Nd, Dy, Tm, Y, Ca, Mn, Sc e Sm. No outro extremo de PC1 serão visualizadas as amostras contendo maiores teores de Al, Na, Li, Sr, Sb e Tb. O tipo de solo onde a uva foi plantada, bem como a proximidade com o mar podem justificar esta separação<sup>3,138</sup>, o que faria (especificamente com as amostras aqui analisadas) com que os vinhos espanhóis posicionassem-se mais a esquerda em PC1.

Em relação à PC2, altos valores de (principalmente) Ti, V, Mg, Mo e Er levarão as amostras para a parte superior do gráfico de escores. Em oposição encontram-se nos teores de Cr e Gd, que trarão os vinhos para a parte de baixo do gráfico.

O gráfico de escores de PC1 vs PC2, indicando o comportamento das amostras, está mostrado na figura 40.

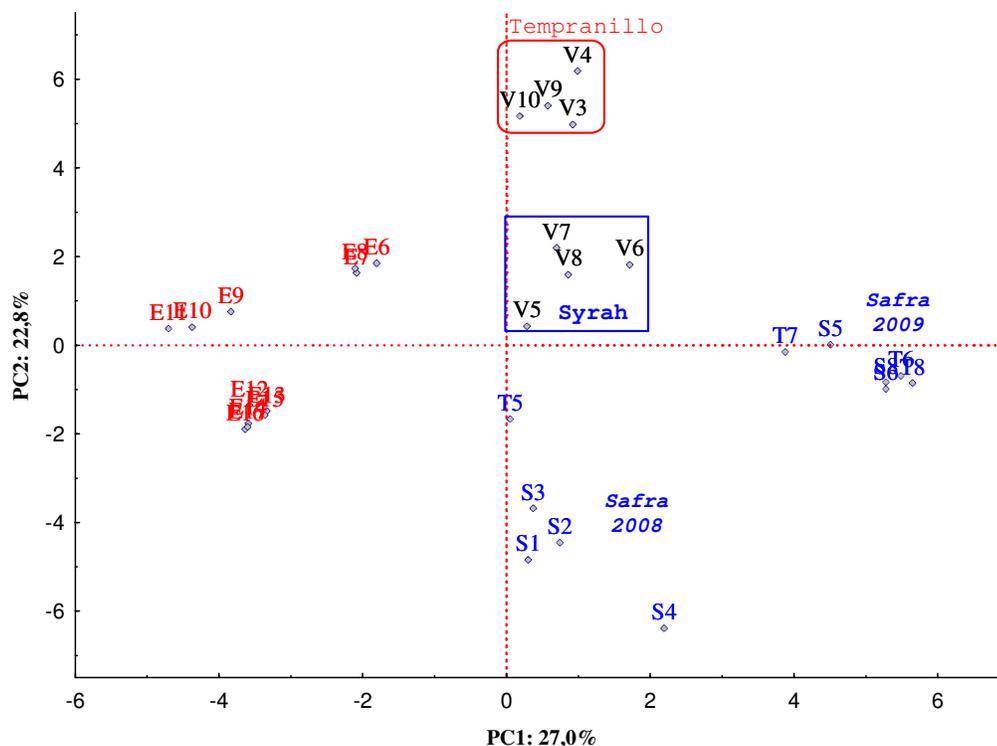


Figura 40: Gráfico de escores da terceira PCA, realizada apenas com os vinhos tintos das uvas Tempranillo e Syrah. Em **vermelho** os vinhos espanhóis; **em preto**, comerciais brasileiros e **em azul**, varietais experimentais brasileiros. Detalhes são dados quanto à variedade das amostras comerciais e quanto à safra das varietais experimentais brasileiras.

Na primeira inspeção visual do gráfico percebe-se a separação nítida dos vinhos espanhóis em relação aos brasileiros, através da PC1. Como exposto acima, essa separação deve-se, principalmente, aos teores de Li, Na, Al, Sr, Sb e Tb – que estão em maiores concentrações nos vinhos da Espanha.

Outra subdivisão observada, mas não tão nítida, é a tendência de separação dos espanhóis quanto à localidade, devida à PC2. Os vinhos de D.O. Valência são influenciados negativamente por PC2, separando-se dos demais ibéricos, principalmente devido aos elementos Ti, V, Er, Ce, Gd, Cr e Co.

Para os vinhos tintos brasileiros visualiza-se um espalhamento das amostras entre experimentais (**em azul**) e comerciais (**em preto**). O corte feito em vinhos comerciais com o objetivo de melhorar características, manter um padrão de determinada qualidade ou mascarar defeitos da uva principal<sup>7</sup> – permitida por legislação brasileira<sup>206</sup>, desde que tenha no mínimo 75% da casta mais importante –, bem como os diferentes tratamentos aplicados aos vinhos experimentais poderiam justificar este espalhamento.

No que tange aos vinhos experimentais elaborados com uvas Syrah (**em azul** no gráfico), há uma tendência de separação pela safra através de PC1, com os vinhos S5 a S8

(safra 2009) tendo maiores valores de pH, Nd, Dy, Tm, La, Mn e Ca que os vinhos da safra 2008 (S1 a S4), que, por sua vez, possuem maiores teores de Cr e Gd. Diferenciação esta não percebida para os vinhos experimentais elaborados com uvas Tempranillo, tanto pela exclusão de quatro delas quanto pelo espalhamento das demais, não se sabendo como justificar a separação apresentada no gráfico.

Para os vinhos comerciais brasileiros, estes se separam em termos de uvas de sua elaboração (mas não por safra). Tendo os originados da uva Tempranillo maiores teores dos elementos dominantes positivamente em PC2 (Ti, V, Mg, Er, K e Fe). Os provenientes da uva Syrah possuem valores medianos dos elementos determinados, visto que se encontram próximo à origem dos eixos da PCA.

Para melhor discussão, realizaram-se outras análises por PCA, desta vez utilizando-se apenas grupos individuais – os brancos, os espanhóis e os tintos brasileiros. Como não se observou uma informação nítida sobre agrupamentos, os dados gráficos não serão mostrados.

Na avaliação apenas dos vinhos brancos, houve uma divisão não muito nítida quanto à safra apenas para os vinhos da uva Viognier através de PC2 (devida ao pH, Al, K, Cr, Ho, Y e Ti). Porém, não foi possível verificar nenhum padrão de separação para as amostras da uva Verdejo, nem entre as duas uvas – Verdejo e Viognier. Como estes vinhos são experimentais, com o intuito de se estudar o potencial vitivinícola destas castas, bem como sua melhor forma de vinificação (tipo de plantio, poda, época de desfolha e outros), estas amostras podem ter sofrido diferentes tratamentos e sua distribuição no gráfico de escores seria justificada por tais tratamentos. Porém, como não se possui o conhecimento destes processos sofridos, não se pode concluir nada.

Outra análise por PCA, realizada apenas com os vinhos espanhóis, mostrou que, avaliando-se qualquer combinação dois a dois entre PC1 até PC4, há uma diferenciação clara entre estas amostras. Nessa, os vinhos de Valência possuíram os maiores valores de pH, Cu, Cd, Ce, Co, Ho, Yb e Sb, os vinhos Rioja 2008 possuíram os maiores teores de Er, V, Ti, Nd, e Li, enquanto que as amostras Rioja 2009 destacaram-se pelo teor de Er, V, Ti, Zn, Ni e Sr.

Por fim, a análise por PCA foi realizada somente com os vinhos tintos brasileiros buscando verificar se há a continuidade de separação entre comerciais e experimentais, bem como alguma outra separação entre os vinhos experimentais. A figura 41 mostra o gráfico de escores desta PC.



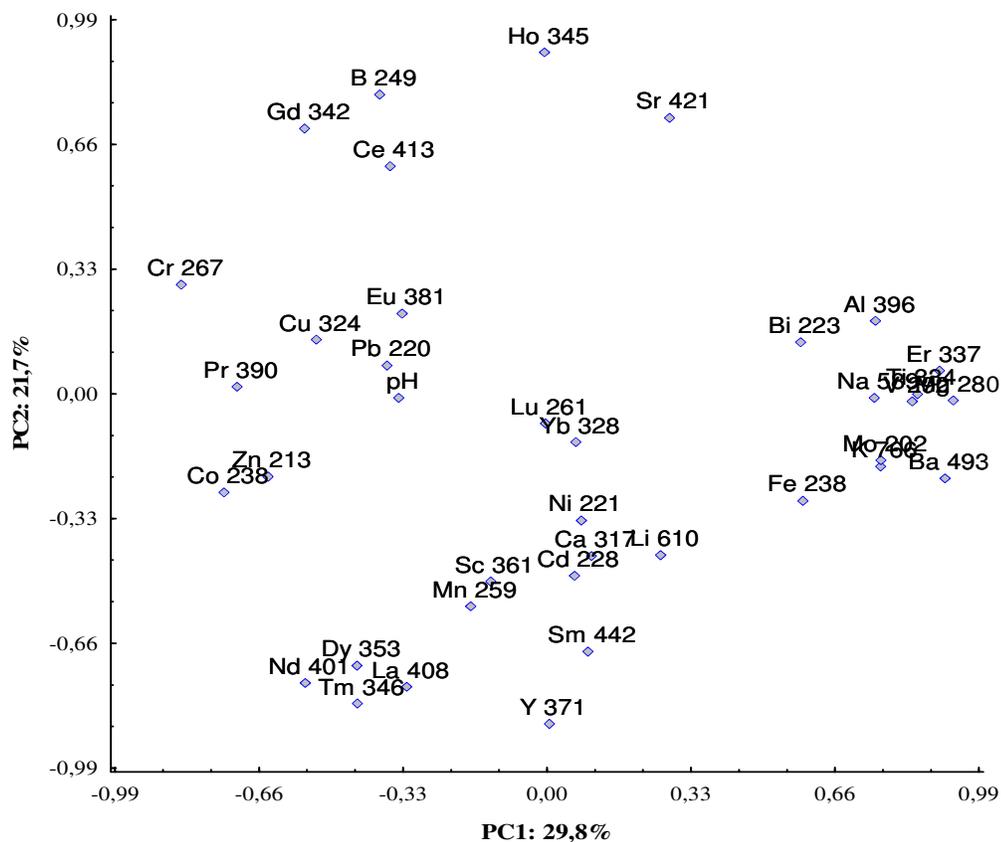


Figura 42: Gráfico de loadings da PCA dos vinhos tintos do VSF.

Em suma, os vinhos espanhóis foram distintos dos vinhos brasileiros estudados. Os vinhos do VSF apresentam distinções quanto à sua elaboração, se já comercializado ou se em fase de estudo do potencial enológico da videira em relação à região.

## ***2.5 Conclusões parciais***

O método de análise de vinhos por USN-ICP OES desenvolvido foi bem sucedido na determinação de elementos minerais nas amostras provenientes do Vale do São Francisco e da Espanha, indicado pelos valores obtidos pelas figuras de mérito do sistema bem como com sua comparação com outras metodologias propostas na literatura.

A Análise de Componentes Principais permitiu diferenciar vinhos provenientes da Espanha de vinhos originados da região do Vale do São Francisco, Brasil.

Observou-se também pelo uso da PCA que os vinhos comerciais podem ser diferenciados de vinhos experimentais – vinhos cujo potencial enológico está sendo estudando de forma a possibilitar sua elaboração nesta região.

Entretanto, todas as conclusões foram obtidas com um número reduzido de amostras, o que as tornam apenas orientativas, permitindo o desenvolvimento com mais segurança de um estudo maior, com um número elevado de amostras, para fornecer conclusões estatisticamente mais seguras.

## ***2.6 Perspectivas***

Buscar alternativas viáveis para a substituição do etanol como forma de simulação de matriz, de forma a diminuir a contribuição na concentração dos analitos e, assim, obter limites de detecção mais baixos.

Analisar um grande número de amostras do Vale do São Francisco, de forma a fornecer, com maior confiança, informações que demonstrem que estes vinhos possuem suas características atreladas ao ambiente de origem.

Realizar estudos com algoritmos de seleção de variáveis para melhor aproveitamento quimiométrico dos resultados gerados pelo método proposto, utilizando-se apenas as variáveis mais importantes para uma (possível) separação por grupos de amostras.

Redigir o artigo deste trabalho e sua publicação em periódicos da área de vinhos.

### ***3 Conclusões Gerais***

Esta tese permitiu caracterizar vinhos oriundos da região do Vale do São Francisco quanto aos seus teores de polifenóis totais, elementos minerais e pH.

Os dois métodos desenvolvidos para esta caracterização puderam contribuir com a Química Verde, utilizando da análise em fluxo com minibombas solenoide – de forma a reduzir o consumo de reagentes e geração de resíduos, bem como com a utilização de reagente menos danoso ao ambiente (água sanitária ao invés de oxidantes mais tóxicos) – e da espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado e introdução de amostra por nebulizador ultrassônico – eliminando-se a necessidade de digestão prévia das amostras (que usaria ácidos e outros oxidantes para tal fim), redução do consumo de energia e também de duração da análise, com diminuição das possibilidades de contaminação.

No primeiro capítulo deste texto, o uso de análise estatística descritiva aplicada aos dados do teor de polifenóis totais nos vinhos permitiu diferenciar os vinhos analisados do VSF em relação aos vinhos oriundos do Rio Grande do Sul e do Chile. A análise de um número maior de amostras de cada região deve ser realizada para fornecer maior segurança estatística nesta conclusão.

Esta metodologia permitiu também observar a possibilidade de desenvolvimento de outro método em fluxo para a quantificação do teor de polifenóis totais em vinhos sem o uso do luminol (apenas utilizando-se água sanitária como reagente). Com isto, reduz-se ainda mais o consumo de reagentes de forma a permitir um método mais limpo para a análise química. Tal metodologia desenvolvida como trabalho de dissertação de uma aluna do grupo já foi aplicada às amostras de vinhos e chás e está em fase de redação de artigo.

No segundo capítulo, a utilização da Análise de Componentes Principais nos dados gerados pela determinação de elementos minerais por USN-ICP OES e do pH em vinhos do VSF experimentais e comerciais e de vinhos espanhóis permitiu diferenciar os vinhos provenientes da Espanha em relação aos brasileiros do VSF. Outras aplicações da PCA aos dados obtidos destes vinhos permitiu também dizer que os vinhos comerciais apresentaram distintos dos vinhos experimentais.

Uma análise de um número maior de amostras do VSF também poderia dar mais segurança à conclusão obtida nesta tese de que seria possível diferenciar os vinhos do VSF quanto à variedade da uva e da safra de elaboração.

#### 4 Referências

1. Pacheco, A. O. **Iniciação à enologia**. 2ª ed., SENAC: São Paulo, 1999.
2. Amarante, J. O. A. **Vinhos do Brasil e do mundo. Para conhecer e beber**. 6ª ed., Summus: São Paulo, 1983.
3. Miranda, F. **Arte e vinho**. Axcel Books: Rio de Janeiro, 2001.
4. EMBRAPA Semi-árido. Disponível em: [www.cpatsa.embrapa.br](http://www.cpatsa.embrapa.br). Acessada em 03/06/2013.
5. CODEVASF. Disponível em: [www.codevasf.gov.br/osvales](http://www.codevasf.gov.br/osvales). Acessada em Ago/2010.
6. Disponível em: <http://www.valedosaofrancisco.com.br>. Acesso em Ago/2010.
7. Cunha, T. J. F.; da Silva, F. H. B. B.; da Silva, M. S. L.; Petreire, V. G.; Sá, I. B.; Neto, M. B. O.; Cavalcanti, A. C.; Solos do Submédio do Vale do São Francisco: potencialidades e limitações para uso agrícola. *EMBRAPA Semi-árido. Documentos 211*, 2088. ISSN 1808-9992.
8. de Mello, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2009; *EMBRAPA Uva e Vinho*, Artigo Técnico. 2010. Disponível em: [www.cnpuv.embrapa.br/publica/autor-1.html](http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/autor-1.html).
9. Guerra, C. C.; Mandelli, F.; Tonietto, J.; Zanús, M. C.; Camargo, U. A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. *EMBRAPA Uva e Vinho*. Documentos n. 48, 2ª ed., 2009. ISSN 1516-8107.
10. Dantas, B. F.; Ribeiro, L. S.; Pereira, M. S. Teor de açúcares solúveis e insolúveis em folhas de videiras cv. Syrah em diferentes posições no ramo e épocas do ano. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29 (2007) 42-47.
11. Tonietto, J.; Camargo, U. A.; Vinhos tropicais no Brasil e no mundo; *Bom Vivant*, 8 (2006) 15-16. [11b]. Tonietto, J.; Zanús, M. C. Indicação geográfica de vinhos finos do Brasil: Leis e normativas para reconhecimento. *Bom Vivant* 100 (2007) 28 – 30.
12. Brasil, lei nº 9.279, de 14 de Maio de 1996. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L9279.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9279.htm). Acesso em 02/08/2010.
13. Brasil, lei 7.678, de 08/11/1988. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/1980-1988/L7678.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L7678.htm). Acesso em 29/04/2013.
14. Sgarbieri, V. C.; Pacheco, M. T. B. Alimentos Funcionais Fisiológicos. *Brazilian Journal of Food Technology* 2 (1999) 7-19.
15. Filho, J. M. S. O vinho e o paradoxo francês. *Adega* 20 (2007) 48-49.

16. Pal, S.; Ho, N.; Santos, C.; Dubois, P.; Mamo, J.; Croft, K.; Allister, E. Red wine polyphenolic increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *Journal of Nutrition* 133 (2003) 700-706.

17. Associação Brasileira de Enologia – ABE, disponível em: <http://www.enologia.org.br/component/kd2/item/47->. Acesso em 29/04/2013.

18. Associação Brasileira de Enologia – ABE, disponível em: <http://www.enologia.org.br/component/kd2/item/42->. Acesso em 29/04/2013.

19. Wines of Brazil, disponível em: <http://www.winesofbrasil.com/Conteudo.aspx?id=4>. Acesso em 29/04/2013.

20. Instituto Brasileiro do Vinho – IBV, disponível em: <http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>. Acesso em 29/04/2013.

21. Organisation Internationale da la Vigne et du Vin – OIV, disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/info/esbasededonneesIG>. Acesso em 23/04/2013.

22. Vin & Plaisir, disponível em: <http://vinplaisir.blogspot.com.br/2012/10/vinhos-de-bordeaux-civb-divulga-as.html>. Acesso em 17/04/13.

23. Office de Tourisme de Bordeaux. Comunicado de Prensa. Disponível em: <http://www.bordeaux-tourisme.com/images/pdf/Dossier%20presse%20espagnol%202012.pdf>. Acesso em 17/04/13.

24. Mello, L. M. R.; Vitivinicultura Brasileira: panorama 2011; *Comunicado Técnico Embrapa*, 115 (2012) 1-4. ISSN 1 808-6802.

25. Instituto Brasileiro do Vinho, disponível em: <http://www.ibravin.org.br/admin/UPLarquivos/160520121103332.pdf>. Acesso em 29/04/2013.

26. Associação dos Produtores de vinhos finos do Vale dos Vinhedos – Aprovale, disponível em: <http://www.valedosvinhedos.com.br/vale/viewdestaque.php?view=293&cnid=1#null>. Acesso em 23/04/2013.

27. Secretaria de turismo do Rio Grande de Sul, disponível em: <http://www.turismo.rs.gov.br/portal/index.php?q=estabelecimento&mun=&cod=36&te=&opt=&id=5204&fg=3&ts=10>. Acesso em 23/04/2013.

28. Vinícola Miolo, disponível em: [http://www.miolo.com.br/enoturismo/complexo\\_enoturistico\\_vinicola\\_miolo/](http://www.miolo.com.br/enoturismo/complexo_enoturistico_vinicola_miolo/). Acesso em 23/04/2013.

29. OIV. **Recueil des Methodes Internationales D´analyse des Vins et des Mouts**. Vol. 1, OIV: Paris, 2005.

30. Brasil, portaria MAPA nº 229, de 25/10/1988, disponível em: [www.uvibra.com.br/legislacao\\_portaria229.htm](http://www.uvibra.com.br/legislacao_portaria229.htm). Acesso em 30/04/2013.
31. Cheynier, V.; Em **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications**; Eds. Andersen, O. M.; Markham, K. R.; CRC Press: Boca Raton, 2006. Cap. 5.
32. Curvelo-Garcia, A. S. **Controlo de qualidade dos vinhos. Química Enológica: métodos analíticos**. Instituto da Vinha e do Vinho: Lisboa, 1988.
33. Catarino, S.; Curvelo-Garcia, A. S.; Sousa, R. B.; Revisão: elementos contaminantes nos vinhos. *Ciência e Tecnologia Vitivinícola* 23 (2008) 3-19.
34. Volp, A. C. P.; Renhe, I. R. T.; Barra, K.; Stringueta, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica* 53 (2008) 141-148; [34b]. Coutinho, M. A. S.; Muzitano, M. F.; Costa, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química* 1 (2009) 241-256; [34c]. Faller, A. L. K.; Fialho, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Revista Saúde Pública* 43 (2009) 211-218.
35. Dreosti, I. E.; Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine; *Nutrition* 16 (2000) 692 – 694; [35b]. Cabrita, M. J.; Ricardo-da-Silva, J.; Laureano, O.; Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos; *In I Seminário Internacional de Vitivinicultura*, 23 e 24/09/2003, México.
36. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D.; **Handbook of Enology. The chemistry of wine. Stabilization and treatments**. 2<sup>th</sup> Ed., vol. 2; John Wiley & Sons: Chichester, 2006; [36b]. Arribas, A. S.; Martínez-Fernández, M.; Chicharro, M. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *Trends in Analytical Chemistry* 34 (2012) 78 – 96. [36c]. Março, P. H.; Poppi, R. J.; Scarmínio, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova* 31 (2008) 1218 – 1223.
37. Miller, N. J.; Rice-Evan, C. A.; The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry* 60 (1997) 331-337.
38. Slawinska, D.; Slawinski, J.; Chemiluminescent flow method for determination of formaldehyde. *Analytical Chemistry* 47 (1975) 2101-2109; [38b]. Mochizuki, M.; Yamazaki, S.; Kano, K.; Ikeda, T.; Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1569 (2002) 35-44; [38c]. Akagawa, M.; Shigemitsu, T.; Suyama, K.; Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenols-rich beverages under *Quasi*-physiological conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67 (2003) 2632-2640.
39. Minarghi, F. S.; Mousavi, F.; Rocha, S. M.; Pawliszyn, J. Automated determination of phenolic compounds in wine, berry, and grape samples using 96-blade solid phase

microextraction system coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1276 (2013) 12-19.

40. Fanzone, M.; Zamora, F.; Jofré, V.; Assof, M.; Gómez-Cordovés, C.; Peña-Neira, A. Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *Journal of Science Food and Agricultural* 92 (2012) 704-718.

41. Cetó, X.; Céspedes, F.; del Valle, M. BioElectronic Tongue for the quantification of total polyphenol content in wine. *Talanta* 99 (2012) 544-551.

42. Burin, V. M.; Falcão, L. D.; Chaves, E. S.; Gris, E. F.; Preti, L. F.; Bordignon-Luiz, M. T. Phenolic composition, colour, antioxidant activity and mineral profile of Cabernet Sauvignon wines. *International Journal of Food Science and Technology* 45 (2010) 1505-1512.

43. Espinoza, M.; Olea-Azar, C.; Speisky, H.; Rodríguez, J. Determination of reactions between free radicals and selected Chilean wines and transition metals by ESR and UV-vis technique. *Spectrochimica Acta Part A* 71 (2009) 1638-1643.

44. Girotti, S.; Fini, F.; Bolelli, L.; Savini, L.; Sartini, E.; Arfelli, G. Chemiluminescent determination of total antioxidant capacity during winemaking. *Luminescence* 21 (2006) 233-238.

45. Manfróí, L.; Miele, A.; Rizzon, L. A.; Barradas, C. I. N. Composição físico-química do vinho Cabernet Franc proveniente de videiras conduzidas no sistema lira aberta. *Ciência e Tecnologia de alimentos* 26 (2006) 290-296.

46. Miele, A.; Rizzon, L. A. Efeito de elevadas produtividades do vinhedo nas características físico-químicas e sensoriais do vinho Merlot. *Ciência Rural* 36 (2006) 271-278.

47. Rizzon, L. A.; Miele, A. Efeito da safra vitícola na composição da uva, do mosto e do vinho Isabel da Serra gaúcha, Brasil. *Ciência Rural* 36 (2006) 959-964.

48. Rizzon, L. A.; Miele, A.; Meneguzzo, J.; Zanuz, M. C. Efeito de três processos de vinificação sobre a composição química e a qualidade do vinho Cabernet Franc. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 7 (1999) 1285-1293.

49. Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J. M.; Martínez, A. Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminating variables of its ageing status. *Food Research International* 32 (1999) 503-507; [49b]. Recamales, A. F.; Sayago, A.; González-Miret, M. L.; Hernanz, D. The effect of the time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wines. *Food Research International* 39 (2006) 220-229.

50. Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J. M.; Martínez-Cutillas, A.; Fernández-Fernández, J. I. Maintenance of colour composition of a red wine during storage.

Influence of prefermentative practices, maceration time and storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology* 35 (2002) 46–53; [50b]. Bautista-Ortín, A. B.; Fernández-Fernández, J. I.; López-Roca, J. M.; Gómez-Plaza, E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (2007) 546-552.

51. Atanackovic, M.; Petrovic, A.; Jovic, S.; Gojkovic-Bukarica, L.; Bursac, M.; Cvejic, J. Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potencial of red wines. *Food Chemistry* 131 (2012) 513-518.

52. Ivanova, V.; Dörnyei, A.; Márk, L.; Vojnoski, B.; Stafilov, T.; Stefova, M.; Kilár, F. Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chemistry* 124 (2011) 316-325.

53. Nixdorf, S. L.; Hermosin-Gutiérrez, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta* 659 (2010) 208-215.

54. Nikfardjam, M. S. P.; Márk, L.; Avar, P.; Figler, M.; Ohmacht, R. Polyphenols, anthocyanins and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region. *Food Chemistry* 98 (2006) 453-462.

55. Mazza, G.; Fukumoto, L.; Delaquis, P.; Girard, B.; Ewert, B. Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet Franc, Merlot and Pinor Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 4009-4017.

56. Mason, W. B. Some alternative paths to simplification of clinical chemistry. *Annals of the New York Academy of Sciences* 102 (1963) 171-180.

57. Skeggs, L. T. An automatic method for colorimetric analysis. *American Journal of Clinical Pathology* 28 (1957) 311-322; [57b]. Skeggs, L. T.; Hochstrasser, H. Multiple automatic sequential analysis. *Clinical Chemistry* 10 (1964) 918-936.

58. Reis, B. F.; Giné, M. F.; Kronka, A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. *Química Nova* 12 (1989) 82-91; [58b]. Reis, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. *Química Nova* 19 (1996) 51-58; [58c]. Araújo, A. N.; Lima, J. L. F. C.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G. Multicommutation in flow analysis. Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach. *Analytica Chimica Acta* 310 (1995) 447-452; [58d]. Martelli, P. B.; Reis, B. F.; Kronka, E. A. M.; Bergamin Filho, H.; Korn, M.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Araújo, A. N. Multicommutation in flow analysis. Part 2. Binary sampling for spectrophotometric determination of nickel, iron and chromium in steel alloys. *Analytica Chimica Acta* 308 (1995) 397-405; [58e]. Cerdà, V.; Estela, J. M.; Forteza, R. Cladera, A.;

Becerra, E.; Altimira, P.; Sitjar, P. Flow techniques in water analysis. *Talanta* 50 (1999) 695-705.

59. Trojanowicz, M. **Flow injection analysis: Instrumentation and applications**. World Scientific: Singapore, 2000; [59b]. Karlberg, B.; Pacey, G. E. **Flow injection analysis: A practical guide**. Elsevier: Amsterdam, 1989.

60. Ruzicka, J.; Hansen, E. H. Flow injection analyses. Part 1: A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta* 78 (1975) 145-157.

61. Pasquini, C.; de Oliveira, W. A. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia and phosphorus. *Analytical Chemistry* 57 (1985) 2575-2579.

62. Ruzicka, J.; Marshall, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assay. *Analytica Chimica Acta* 237 (1990) 329-343.

63. Reis, B. F.; Giné, M. F.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Lapa, R. A. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Analytica Chimica Acta* 293 (1994) 129-138.

64. Albertús, F.; Horstkotte, B.; Cladera, A.; Cerda, V. A robust multisyringe system for process flow analysis. Part 1. On-line dilution and single point titration of protolytes. *Analyst* 124 (1999) 1373-1381.

65. Lapa, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Reis, B. F.; Santos, J. L. M.; Zagatto, E. A. G. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. *Analytica Chimica Acta* 466 (2002) 125-132.

66. Rocha, F. R. P.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Santos, J. L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta* 468 (2002) 119-131; [66b]. Icardo, M. C.; Mateo, J. V. G.; Calatayud, J. M. Multicommutation as a powerful new analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry* 51 (2002) 366-378; [66c]. Lima, J. L. F. C.; Santos, J. L. M.; Dias, A. C. B.; Ribeiro, M. F. T.; Zagatto, E. A. G. Multi-pumping flow systems: an automation tool. *Talanta* 64 (2004) 1091-1098; [66d]. Cerdà, V.; Pons, C. Multicommutated flow techniques for developing analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006) 236-242; [66e]. Segundo, M. A.; Magalhães, L. M. Multisyringe Flow Injection Analysis: State-of-the-Art and perspectives. *Analytical Sciences* 22 (2006) 3-8; [66f]. Santos, J. L. M.; Ribeiro, M. F. T.; Dias, A. C. B.; Lima, J. L. F. C.; Zagatto, E. A. G. Multi-pumping flow systems: The potential of simplicity. *Analytica Chimica Acta* 600 (2007) 21-28; [66g]. Feres, M. A.; Fortes, P. R.; Zagatto, E. A. G.; Santos, J. L. M.; Lima, J. L. F. C. Multi-commutation in flow analysis: Recent developments and applications. *Analytica Chimica Acta* 618 (2008) 1-17; [66h]. Cerda, V.; Cerdà, A. **An Introduction to flow analysis**. Sciware: Palma de Mallorca, 2009.

67. Dias, A. C. B.; Santos, J. L. M.; Lima, J. L. F. C.; Quintella, C. M.; Lima, A. M. V.; Zagatto, E. A. G. A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 1303-1310; [67b]. Fortes, P. R.; Feres, M. A.; Sasaki, M. K.; Alves, E. R.; Zagatto, E. A. G.; Prior, J. A. V.; Santos, J. L. M.; Lima, J. L. F. C. Evidences of turbulent mixing in multi-pumping flow systems. *Talanta* 79 (2009) 978-983; [67c]. Farias, L. A.; Fávaro, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. *Química Nova* 34 (2011) 1089-1093; [67d]. Melchert, W. R.; Reis, B. F.; Rocha, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. *Analytica Chimica Acta* 714 (2012) 8-19.

68. Weeks, D. A.; Johnson, K. S. Solenoid pumps for flow injection analysis. *Analytical Chemistry* 68 (1996) 2717-2719.

69. DeGrandpre, M. D.; Hammar, T. R.; Smith, S. P.; Sayles, F. L. In situ measurements of seawater pCO<sub>2</sub>. *Limnology and Oceanography* 40 (1995) 969-975.

70. Rocha, F. R. P.; Ródenas-Torralba, E.; Reis, B. F.; Morales-Rubio, A.; de la Guardia, M. A portable and low cost equipment for flow injection chemiluminescence measurements. *Talanta* 67 (2005) 673-677.

71. Magalhães, L. M.; Almeida, M. I. G. S.; Barreiros, L.; Reis, S.; Segundo, M. A. Automatic Aluminum chloride method for routine estimation of total flavonoids in red wines and teas. *Food Analyticals Method* 5 (2012) 530 – 539.

72. Claudineia, C. R.; Gomes, T. F.; Barros, V. A. F.; Zagatto, E. A. G. A multi-purpose flow manifold for the spectrophotometric determination of sulphide, sulphite and ethanol involving gas diffusion: application to wine and molasses analysis. *Talanta* 113 (2013) 118-122.

73. Vahl, K.; Kahlert, H.; Von Mühlen, L.; Albrecht, A.; Meyer, G.; Behnert, J. Determination of the titratable acidity, and the pH of wine based on potentiometric flow injection analysis. *Talanta* 111 (2013) 134 – 139.

74. Vieira, J. A.; Raimundo Jr, I. M.; Reis, B. F.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Araújo, A. N. Monosegmented flow potentiometric titration for the determination of chloride in milk and wine. *Journal of Brazilian Chemical Society* 14 (2003) 259-264.

75. Costa, R. C. C.; Araújo, A. N. Determination of Fe(III) and total Fe in wines by sequential injection analysis and flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 438 (2001) 227-233.

76. Pais, T. F. M.; Vidigal, S. S. M. P.; Tóth, I. V.; Rangel, A. O. S. S. Sequential injection system for the enzymatic determination of ethanol in alcohol beverages with in-line dilution. *Food Control* 30 (2013) 613-620.

77. Fernandes, E. N.; Reis, B. F. Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process. *Analytica Chimica Acta* 557 (2006) 380-386.
78. Oliveira, S. M.; Lopes, T. I. M. S.; Tóth, I. V.; Rangel, A.O.S.S. Simultaneous determination of tartaric acid and potassium in wines using a multicommutated flow system with dialysis. *Talanta* 81 (2010) 1735-1741.
79. Garcia, A. J. C.; Reis, B. F. Instrumentation and automated photometric titration procedure for total acidity determination in red wine employing a multicommutated flow system. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry* 2006 (2006) 1-8.
80. Molina-García, L.; Ruiz-Medina, A.; Fernández-de Córdoba, M. L. Na automatic optosensing device for the simultâneos determination of resveratrol and piceid in wines. *Analytica Chimica Acta* 689 (2011) 226 – 233.
81. Magalhães, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Analytica Chimica Acta* 558 (2006) 310-318.
82. Magalhães, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C.; Rangel, A. O. S. S. Automatic Method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 5241-5246.
83. Infante, C. M. C.; Soares, V. R. B.; Korn, M.; Rocha, F. R. P. An improved flow-based procedure for microdetermination of total tannins in beverages with minimized reagent consumption. *Microchimica Acta* 161 (2008) 279-283.
84. Ródenas-Torralba, E.; Ventura-Gayete, J.; Morales-Rubio, A.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Multicommutation Fourier transform infrared determination of benzene in gasoline. *Analytica Chimica Acta* 512 (2004) 215 – 221.
85. Miranda, C. E. S.; Reis, B. F.; Baccan, N.; Packer, A. P.; Giné, M. F. Automated flow analysis system based on multicommutation for Cd, Ni and Pb on-line pre-concentration in a cationic exchange resin with determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 453 (2002) 301 – 310.
86. Granero, A. M.; Fernández, H.; Agostini, E.; Zón, M. A. Na amperometric biosensor based on peroxidases from *Brassica napus* for the determination of the total polyphenolic content in wine and tea samples. *Talanta* 83 (2010) 249 – 255.
87. Ródenas-Torralba, E.; Cava-Montesinos, P.; Morales-Rubio, A.; Cervera, M. L.; de la Guardia, M. Multicommutation as an environmentally friendly analytical tool in the hydride generation atomic fluorescence determination of tellurium in milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379 (2004) 83 – 89.

88. Stepanov, B. I.; Gribkovskii, V. P. **Theory of luminescence**. ILIFFE Books LTD: London, 1968; [88b]. Schulman, S. G. **Molecular luminescence spectroscopy. Methods and applications**: Part 1. John Wiley & Sons: New York, 1985.
89. Oliveira, H. P. M. de; Cossello, R. F.; Atvars, T. D. Z.; Akcelrud, L. Dispositivos poliméricos eletroluminescentes. *Química Nova* 29 (2006) 277-286; [89b]. Park, Y. W.; Kim, Y. M.; Choi, J. H.; Park, T. H.; Jeong, J.; Choi, H. J.; Ju, B. K. Enhanced electroluminescence efficiency of phosphorescent organic light-emitting diodes by controlling the triplet energy of the hole-blocking layer. *IEEE Electron Device Letters* 31 (2010) 452-454.
90. Silva, R. S. da. Caracterização de cerâmicas de germanato de bismuto para aplicação como cintiladores. São Cristóvão: UFS, 2006. 150 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão; [90b]. Santos, D. A. A.; Junior, E. A. S.; Macedo, M. A. Radioluminescence in ZnO. *Radiation Physics and Chemistry* 79 (2010) 612-614.
91. Dellavale, D.; Urteaga, R.; Bonetto, F. J. Analytical study of the acoustic field in a spherical resonator for single bubble sonoluminescence. *Journal of Acoustical Society of America* 127 (2010) 186-197.
92. Kinoshita, A.; Figueiredo, A. M. G.; Felice, G. D.; Lage, M. C. S. M.; Guidon, N.; Baffa, O. Electron spin resonance dating of human teeth from Toca da Santa shelter of São Raimundo Nonato, Piauí, Brazil. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 266 (2008) 635-639; [92b]. Farias, T. M. B.; Gennari, R. F.; Etchevarne, C.; Watanabe, S. Thermoluminescence dating of Brazilian indigenous ceramics. *Radiation Protection Dosimetry* 136 (2009) 45-49.
93. Chandra, B. P.; Xu, C. N.; Yamada, H.; Zheng, X. G. Luminescence induced by elastic deformation of ZnS:Mn nanoparticles. *Journal of Luminescence* 130 (2010) 442-450.
94. Kuijt, J.; Ariese, F.; Brinkman, U. A. Th.; Gooijer, C. Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta* 488 (2003) 135-171.
95. Skoog, D.A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. **Princípios de análise instrumental**, 6<sup>a</sup> ed. Bookman: Porto Alegre, 2009.
96. Navas, M. J.; Jiménez, A. M. Chemiluminescent methods in alcoholic beverage analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 183-189; [96b]. Widder, E. A. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical and ecological diversity. *Science* 328 (2010) 704-708.
97. Su, Y.; Chen, H.; Wang, Z.; Lv, Y. Recent Advances in chemiluminescence. *Applied Spectroscopy Reviews* 42 (2007) 139-176.

98. Ferreira, E. C.; Rossi, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Química Nova* 25 (2002) 1003-1011; [98b]. Leite, O. D.; Fatibello-Filho, O.; Rocha, F. R. P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. *Química Nova* 27 (2004) 337-341.

99. Lind, J.; Merényi, G.; Eriksen, T. E. Chemiluminescence mechanism of cycle hydrazides such as luminol in aqueous solutions. *Journal of American Chemical Society* 105 (1983) 7655-7661; [99b]. Merényi, G.; Lind, J.; Eriksen, T. E. The equilibrium reaction of the luminol radical with oxygen and the one-electron-reduction potential of 5-aminophthalazine-1,4-dione. *Journal of Physical Chemistry* 88 (1984) 2320-2323; [99c]. Dodeigne, C.; Thumus, L.; Lejeune, R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta* 51 (2000) 415-439; [99d]. Ferreira, E. C. Aplicações analíticas do estudo da reação quimiluminescente de luminol. Campinas: UNICAMP, 2001. 169 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

100. Seitz, W. R.; Neary, M. P. Chemiluminescence and bioluminescence in chemical analysis. *Analyticaql Chemistry* 46 (1974) 188-202; [100b]. Lau, C.; Qin, X.; Liang, J.; Lu, J. Determination os cysteine in a pharmaceutical formulation by flow injection analysis with a chemiluminescence detector. *Analytica Chimica Acta* 514 (2004) 45-49; [100c]. Nalewajko-Sieliwoniuk, E.; Nazaruk, J.; Antypiuk, E.; Kojlo, A. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in *Erigeron acris* L. extracts and pharmaceutical formulation by flow injection analysis with inhibited chemiluminescent detection. *Journal of Phamaceutuical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 579-586.

101. Marino, D. F.; Ingle Jr., J. D. Determination of Chlorine in water by luminol chemiluminescence. *Analytical Chemistry* 53 (1981) 455-458; [101b]. Hayashi, K.; Sasaki, S.; Ikebukuro, K.; Karube, I. Highly sensitive chemiluminescence flow injection analysis system using microbial peroxidase and a photodiode detector. *Analytica Chimica Acta* 329 (1996) 127-134; [101c]. Xiao, C.; King, D. W.; Palmer, D. A.; Wesolowski, D. J. Study o enhancement effects in the chemiluminescence method for Cr(III) in the ng L<sup>-1</sup> range. *Analytica Chimica Acta* 415 (2000) 209 – 219; [101d]. Francis, P. S.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W.; Lim, K. F. Hypohalites and related oxidants as chemiluminescence reagents: a review. *Luminescence* 19 (2004) 94-115.

102. Fletcher, P.; Andrew, K. N.; Calokerinos, A. C.; Forbes, S.; Worsfold, P. J. Analytical applications of flow injection with chemiluminescence detection—a review. *Luminescence* 16 (2001) 1-23; [102b]. Sotomayor, M. D. P. T.; Dias, I. L. T.; Lanza, M. R. V.; Moreira, A. B.; Kubota, L. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova* 31 (2008) 1755-1774; [102c]. Lowry, M.; ; Fakayode, S. O.; Geng, M. L.; Baker, G. A.; Wang, L.; McCarroll, M. E.; Patonay, G.; Warner, I. M. Molecular Fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 4551-4574; [102d]. Powe, A. M.; Das, S.; Lowry, M.; El-Zahab, B.;

Fakayode, S. O.; Geng, M. L.; Baker, G. A.; Wang, L.; McCarroll, M. E.; Patonay, G.; Li, M.; Aljarrah, M.; Neal, S.; Warner, I. M. Molecular Fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry. *Analytical Chemistry* 82 (2010) 4865-4894; [102e]. Liu, M.; Lin, Z.; Lin, J.M. A review of applications of chemiluminescence detection in food analysis. *Analytica Chimica Acta* 670 (2010) 1 – 10.

103. Nalewajko, E.; Ramirez, R. B.; Kojlo, A. Determination of dopamine by flow-injection analysis coupled with luminol-hexacyanoferrate(III) chemiluminescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004) 219-223.

104. Sun, H. W.; Li, L. Q. Flow-injection-enhanced chemiluminescence method for the determination of four anticancer drugs. *Journal of Analytical Chemistry* 63 (2008) 485-491.

105. Borges, E. P.; Reis, B. F. Automatic flow analysis procedure for the determination of bromide in L-alanine by chemiluminescence detection. *Journal of Brazilian Chemical Society* 18 (2007) 1336-1341.

106. Pires, C. K.; Lavorante, A. F.; Marconi, L. M. T.; Meneses, S. R. P.; Zagatto, E. A. G. A multi-pumping flow system for chemiluminometric determination of ascorbic acid in powdered materials for preparation of fruit juices. *Microchemical Journal* 83 (2006) 70-74.

107. Meneses, S. R. P.; Marques, K. L.; Pires, C. K.; Santos, J. L. M.; Fernandes, E.; Lima, J. L. F. C.; Zagatto, E. A. G. Evaluation of the total antioxidant capacity by using a multipumping flow system with chemiluminescent detection. *Analytical Biochemistry* 345 (2005) 90-95.

108. Lee, J. M.; Karim, M. M.; Lee, S. H. Determination of Catechin in aqueous solution by chemiluminescence method. *Journal of Fluorescence* 15 (2005) 735-739.

109. Lau, C.; Lu, J.; Kai, M. Chemiluminescence determination of tetracycline based on radical production in a basic acetonitrile-hydrogen peroxide reaction. *Analytica Chimica Acta* 503 (2004) 235-239.

110. Lu, J.; Lau, C.; Lee, M. K.; Kai, M. Simple and convenient chemiluminescence method for the determination of melatonin. *Analytica Chimica Acta* 455 (2002) 193-198.

111. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Fenoll, J. Chemiluminescence determination of citrate and pyruvate and their mixtures by the stopped-flow mixing technique, *Analytica Chimica Acta* 485 (2003) 63-72.

112. Pires, C. K.; Marques, K. L.; Santos, J. L. M.; Lapa, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Zagatto, E. A. G. Chemiluminometric determination of carvedilol in a multi-pumping flow system. *Talanta* 68 (2005) 239-244.

113. Manera, M.; Miró, M.; Ribeiro, M. F. T.; Estela, J. M.; Cerdà, V.; Santos, J. L. M.; Lima, J. L. F. C. Rapid chemiluminometric determination of gabapentin in pharmaceutical formulations exploiting pulsed-flow analysis. *Luminescence* 24 (2009) 10-14.

114. Oliveira, G. G.; Janegitz, B. C.; Batistão, M. B.; Salami, F. H.; Fatibello-Filho, O.; Leite, O. D. Determinação de paracetamol pela inibição da reação quimiluminescente do luminol-hipoclorito de sódio em um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação. *Química Nova* 32 (2009) 1755-1759.
115. Magalhães, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C.; Estela, J. M.; Cerdá, V. Automatic in vitro determination of hypochlorous acid scavenging capacity exploiting multisyringe flow injection analysis and chemiluminescence. *Analytical Chemistry* 79 (2007) 3933 – 3939.
116. Zhang, Q.; Cui, H.; Myint, A.; Lian, M.; Liu, L. Sensitive determination of phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with cerium(IV)-rhodamine 6G-phenolic compound chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A* 1095 (2005) 94-101.
117. Costin, J. W.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W. Determination of proline in wine using flow injection analysis with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection. *Talanta* 64 (2004) 894-898.
118. Bonifácio, R. L.; Coichev, N. Chemiluminescent determination of sulfite traces based on the induced oxidation of Ni(II)/tetraglycine complex by oxygen in the presence of luminol: mechanistic considerations. *Analytica Chimica Acta* 517 (2004) 125-130.
119. Bellomarino, S. A.; Conlan, X. A.; Parker, R. M.; Barnett, N. W.; Adams, M. J. Geographical classification of some Australian wines by discriminant analysis using HPLC with UV and chemiluminescence detection. *Talanta* 80 (2009) 833-838.
120. Fernandes, E. N.; Reis, B. F. Automatic flow procedure for the determination of ethanol in wine exploiting multicommutation and enzymatic reaction with detection by chemiluminescence. *Journal of AOAC International* 87 (2004) 920-926.
121. Mataix, E.; de Castro, M. D. L. Simultaneous (or sequential) determination of the total polyphenol index (or I<sub>280</sub>) and density in wines by flow injection. *Analyst* 126 (2001) 251-255.
122. Nalewajko-Sieliwoniuk, E.; Tarasewicz, I.; Kojlo, A. Flow injection chemiluminescence determination of the total phenolics levels in plant-derived beverages using soluble manganese (IV). *Analytica Chimica Acta* 668 (2010) 19-25.
123. Francis, P. S.; Costin, J. W.; Conlan, S. A.; Barnett, J. A.; Narnett, N. W. A rapid antioxidant assay based on acidic potassium permanganate chemiluminescence. *Food Chemistry* 122 (2010) 926 – 929.
124. Pulgarín, J. A. M.; Bermejo, L. F. G.; Durán, A. C. Use of the attenuation of luminol-perborate chemiluminescence with flow injection analysis for the total antioxidant activity in tea infusions, wines and grape seeds. *Food Analytical Methods* 5 (2012) 366 – 372.

125. Fassoula, E.; Economou, A.; Calokerinos, A. Development and validation of a sequential-injection method with chemiluminescence detection for the high throughput assay of the total antioxidant capacity of wines. *Talanta* 85 (2011) 1412-1418
126. Magalhães, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C.; Tóth, I. V.; Rangel, A. O. S. S. Automatic flow system for sequential determination of ABTS<sup>\*+</sup> scavenging capacity and Folin-Ciocalteu index: A comparative study in food products. *Analytica Chimica Acta* 592 (2007) 193 – 201.
127. de Azevedo, L. C.; Reis, M. M.; Pereira, G. E.; da Rocha, G. O.; Silva, L. A. A liquid chromatographic method optimization for the assessment of low and high molar mass carbonyl compounds in wines. *Journal of Separation Sciences* 32 (2009) 3432-3440.
128. Neto, H. G. S.; Silva, J. B. P.; Pereira, G. E.; Hallwass, F. Determination of metabolite profiles in tropical wines by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometrics. *Magnetic Resonance in Chemistry* 47 (2009) S127-S129.
129. Andrade, M. F.; Souza, D. J. P.; Silva, J. B. P.; Paim, A. P. S. Análise multivariada de parâmetros físico-químicos em amostras de vinhos tintos comercializados na região metropolitana de Recife. *Química Nova* 31 (2008) 296-300.
130. Dias, F. S.; Lovillo, M. P.; Barroso, C. G.; David, J. M. Optimization and validation of a method for the direct determination of catechin and epicatechin in red wines by HPLC/fluorescence. *Microchemical Journal* 96 (2010) 17-20.
131. Dean, J. A. **Lange's Handbook of Chemistry**. 30<sup>th</sup> ed. McGraw Hill Book Company: New York, 1985.
132. Honorato, F. A.; Honorato, R. S.; Pimentel, M. F.; Araújo, M. C. U. Analytical curve or standard addition method: how to elect and design – a strategy applied to copper determination in sugarcane spirits using AAS. *Analyst* 127 (2002) 1520 – 1525.
133. Girotti, S.; Bolelli, L.; Fini, F.; Budini, R.; Arfelli, G. Chemiluminescent determination of antioxidant capacity of beverage. *Italian Journal of Food Science* 14 (2002) 113 – 122.
134. Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A. The phenolic composition of Sauvignon blanc juice profiled by cyclic voltammetry. *Electrochimica Acta* 83 (2012) 188 – 195.
135. Naczk, M.; Shahidi, F. Extration and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054 (2004) 95 – 111. [135b] Dejmekova, H.; Scampicchio, M.; Zima, J.; Barek, J.; Mannino, S. Determination of total phenols in foods by boron doped diamond electrode. *Electroanalysis* 21 (2009) 1014 – 1018. [135c] Papoti, V. T.; Xystouris, S.; Papagianni, G.; Tsimidou, M. Z. Total flavonoid content assessment via aluminum [Al(III)] complexation reactions. What we really measure? *Italian Journal of Food Science* 23 (2011) 252 – 259.

136. Cimino, F.; Sulfaro, V.; Trombetta, D.; Saija, A.; Tomaino, A. Radical-scavenging capacity of several Italian red wines. *Food Chemistry* 103 (2007) 75 – 81. [136b] Lee, G.; Rossi, M. V.; Coichev, N.; Moya, H. D. The reduction of Cu(II)/neocuproine complexes by some polyphenols: Total polyphenols determination in wine samples. *Food Chemistry* 126 (2011) 679 – 686.

137. Rizzon, L. A.; Salvador, M. B. G. Teores de cátions dos vinhos da microrregião homogênea vinicultora de Caxias do Sul (MRH 311). *Comunicado Técnico, CNPUV – EMBRAPA* 4 (1987) 1 – 4. ISSN: 0102-9975.

138. Pohl, P. What do metals tell us about wine? *Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 941 – 949; [138b] Ibanez, J. G.; Carreon-Alvarez, A.; Barcena-Soto, M.; Casillas, N. Metals in alcoholic beverages: a review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (2008) 672 – 683.

139. Grindlay, G.; Mora, J.; Gras, L.; Loos-Vollebregt, M. T. C. Atomic spectrometry methods for wine analysis: a critical evaluation and discussion of recent applications. *Analytica Chimica Acta* 691 (2011) 18 – 32.

140. Arvanitoyannis, I. S.; Katsota, M. N.; Psarra, E. P.; Soufleros, E. H.; Kallithraka, S. Application of quality control methods for assessing wine authenticity: use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends in Food Science & Technology* 10 (1999) 321 – 336. [140b]. Savchuk, S. A.; Vlasov, V. N.; Appolonova, S. A.; Arbuzov, V. N.; Vedenin, A. N.; Mezinov, A. B.; Grigor'yan, B. R. Application of chromatography and spectrometry to the authentication of alcoholic beverages. *Journal of Analytical Chemistry* 56 (2001) 214 – 231; [140c]. Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A.C.; Sbirrazzuoli, N.; Lizzani-Cuvelier, L. Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002) 1751 – 1764; [140d] Reid, L. M.; O'Donnell, C. P.; Downey, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 344 – 353; [140e] Gonzalez, A.; Armenta, S.; de la Guardia, M. Trace-element composition and stable-isotope ratio for discrimination of food with protected designation of origin. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 1295 – 1311. [140f] Dion m.a.m. Food chemistry 107 2008 897-911.

141. Boss, C. B.; Fredeen, K. J. **Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry.** 3<sup>th</sup> ed. PerkinElmer: Shelton, 2004.

142. Luque de Castro, M. D.; Capote, F. P. **Analytical applications of ultrasound.** Elsevier: Amsterdam, 2007.

143. Tormen, Luciano. Utilização do nebulizador microconcêntrico para a introdução de solventes orgânicos em um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado. Determinação de metais traço em álcool combustível. Dissertação de mestrado. UFSC, 2008.

144. Fiket, Z.; Mikac, N.; Kniewald, G. Arsenic and other elements in wines of eastern Croatia. *Food Chemistry* 126 (2011) 941 – 947.
145. Álvarez, M.; Moreno, I. M.; Pichardo, S.; Cameán, A. M.; González, A. G. Mineral profile of “fino” wines using inductively coupled plasma optical emission spectrometry methods. *Food Chemistry* 135 (2012) 309 – 313.
146. Almeida, C. M. R.; Vasconcelos, M. T. S. D. Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 4788 – 4798.
147. Mihucz, V. G.; Done, C. J.; Tatár, E.; Virág, I.; Zárny, G.; Baiulescu, E. G. Influence of different bentonites on the rare earth element concentrations of clarified Romanian wines. *Talanta* 70 (2006) 984 – 990.
148. Catarino, S.; Madeira, M.; Monteiro, F.; Rocha, F.; Curvelo-Garcia, A. S.; Sousa, R. B. Effect of Bentonite characteristics on the elemental composition of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 158 – 165.
149. Moreno, I. M.; González-Weller, D.; Gutierrez, V.; Marino, M.; Cameán, A. M.; González, A. G.; Hardisson, A. Determination of Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn in red wine samples by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy: evaluation of preliminary sample treatments. *Microchemical Journal* 88 (2008) 56 – 61.
150. Cheng, J.; Liang, C. The variation of mineral profiles from grape juice to monovarietal Cabernet Sauvignon wine in the vinification process. *Journal of Food Processing and Preservation* 36 (2012) 262 – 266.
151. Mutic, J.; Manojlovic, D.; Kovacevic, R.; Trifunovic, J.; Amaizah, N. R.; Ignjatovic, L. Feasibility of the internal standardization in direct determination of arsenic in wine samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal* 98 (2011) 11 – 14.
152. Grindlay, G.; Mora, J.; Maestre, S.; Gras, L. Application of a microwave-based desolvation system for multi-elemental analysis of wine by inductively coupled plasma based techniques. *Analytica Chimica Acta* 629 (2008) 24 – 37.
153. Galli, P.; Oddo, N. Ultrasonic nebulization in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal* 46 (1992) 327 – 334.
154. Lara, R.; Cerutti, S.; Salonia, J. A.; Olsina, R. A.; Martinez, L. D. Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology* 43 (2005) 293 – 297.
155. Lara, R. F.; Wuilloud, R. G.; Salonia, J. A.; Olsina, R. A.; Martinez, L. D. Determination of low cadmium concentrations in wine by on-line preconcentration in a

knotted reactor coupled to an inductively coupled plasma optical emission spectrometer with ultrasonic nebulization. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371 (2001) 989 – 993.

156. Wuilloud, R. G.; Gonzalez, A. H.; Marchevsky, E. J.; Olsina, R. A.; Martinez, L. D. On-line complexation/preconcentration system for the determination of lead in wine by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry with ultrasonic nebulization. *Journal of AOAC International* 84 (2001) 1555 – 1560.

157. Neto, B. B.; Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Ed Unicamp: Campinas, 1995; [157b]. Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nyström, A.; Pettersen, J.; Bergman, R. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42 (1998) 3 – 40.

158. Prasad, K. S.; Rao, C. S.; Rao, D. N. Application of design of experiments to plasma arc welding process: a review. *J. Braz. Soc. Mech. Sci. & Eng.* 34 (2012) 75 – 81.

159. Anderson, M. Design of Experiments. *The Industrial Physicist* (1997) 24 – 26.

160. Brereton, R. G. **Applied chemometrics for scientists**. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, 2007; [160b]. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L. **Chemometrics: a textbook**. Elsevier: Amsterdam, 1988.

161. Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1998; [161b]. Otto, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**. Wiley-VCH: Weinheim, 1999.

162. Leardi, R. Experimental design in chemistry: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* 652 (2009) 161 – 172; [162b] Dejaegher, B.; Heyden, Y. V. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56 (2011) 141 – 158; [162c] Mostert, M. M. R.; Ayoko, G. A.; Kokot, S. Application of chemometrics to analysis of soil pollutants. *Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 430 – 445.

163. Sadat-Shojai, M.; Atai, M.; Nodehi, A. Design of experiments (DOE) for the optimization of hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles. *Journal of Brazilian Chemical Society* 22 (2011) 571 – 582.

164. Noriega, P.; Mafud, D. F.; Souza, B.; Soares-Scott, M.; Rivelli, D. P.; Barros, S. B. M.; Bacchi, E. M. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22 (2012) 1119 – 1129.

165. Székely, G.; Henriques, B.; Gil, M.; Ramos, A.; Alvarez, C. Design of experiments as a tool for LC-MS/MS method development for the trace analysis of the potentially genotoxic 4-dimethylaminopyridine impurity in glucocorticoids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 70 (2012) 251 – 258.

166. Passeport, E.; Guenne, A.; Culhaoglu, T.; Moreau, S.; Bouyé, J.M.; Tournebize, J. Design of experiments and detailed uncertainty analysis to develop and validate a solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 16 pesticides in water. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 5317 – 5327.
167. Al-Jowder, O.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H. Mid-infrared spectroscopy and authenticity problems in selected meats: a feasibility study. *Food Chemistry* 59 (1997) 195 – 201.
168. Sola-Larrañaga, C.; Navarro-Blasco, I. Chemometric analysis of minerals and trace elements in raw cow milk from the community of Navarra, Spain. *Food Chemistry* 112 (2009) 189 – 196.
169. Harvey, S. D.; Jarman, K. H.; Moran, J. J.; Sorensen, C. M.; Wright, B. W. Characterization of diesel fuel by chemical separation combined with capillary gas chromatography (GC) isotope ratio mass spectrometry (IRMS). *Talanta* 99 (2012) 262 – 269.
170. Puskas, V.; Miljic, U. The application of D-optimal for modeling the red wine ageing process. *Food Control* 28 (2012) 362 – 367.
171. Rabesiaka, M.; Rakotondramasy-Rabesiaka, L.; Mabile, I.; Porte, C.; Havet, J.L. Extraction of trans-resveratrol from red wine and optimization by surface methodology. *Separation and Purification Technology* 81 (2011) 56 – 61.
172. Bisetty, K.; Sabela, M. I.; Khulu, S.; Xhakaza, M.; Ramsarup, L. Multivariate optimization of voltametric parameters for the determination of total polyphenolic content in wine samples using an immobilized biosensor. *International Journal of Electrochemical Science* 6 (2011) 3631 – 3643.
173. Urbano-Cuadrado, M.; Castro, M. D. L.; Pérez-Juan, P. M.; García-Olmo, J.; Gómez-Nieto, M. A. Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis in enology: determination or screening of fifteen parameters in different types of wines. *Analytica Chimica Acta* 527 (2004) 81 – 88.
174. Urbano, M.; Castro, M. D. L.; Pérez, P. M.; García-Olmo, J.; Gómez-Nieto, M. A. Ultraviolet-visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines. *Food Chemistry* 97 (2006) 166 – 175.
175. Pereira, G. E.; Gaudillere, J.P.; Leeuwen, C. V.; Hilbert, G.; Laviolle, O.; Maucourt, M.; Deborde, C.; Moing, A.; Rolin, D. <sup>1</sup>H-NMR and chemometrics to characterize mature grape berries in four wine-growing areas in Bordeaux, France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 6382 – 6389.
176. Anastasiadi, M., Zira, A.; Magiatis, P.; Haroutounian, S. A.; Skaltsounis, A. L.; Mikros, E. <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics for the classification of Greek wines according to

variety, region, and vintage. Comparison with HPLC data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 11067 – 11074.

177. Salvatore, E.; Cocchi, M.; Marchetti, A.; Marini, F.; Juan, A. Determination of phenolic compounds and authentication of PDO Lambrusco wines by HPLC-DAD and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta* 761 (2013) 34 – 45.

178. Ferreira-Lima, N. E.; Burin, V. M.; Bordignon-Luiz, M. T. Characterization of Goethe white wines: influence of different storage conditions on the wine evolution during bottle aging. *European Food Research Technology* 237 (2013) 509 – 520.

179. Hopfer, H.; Nelson, J.; Mitchell, A. E.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. Profiling the trace metal composition of wine as a function of storage temperature and packaging type. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28 (2013) 1288 – 1291.

180. Serrano-Laurido, D.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Checa, A. Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis. *Food Chemistry* 135 (2012) 1425 – 1431.

181. Welke, J. E.; Manfrói, V.; Zanus, M.; Lazzarotto, M.; Zini, C. A. Differentiation of wine according to grape variety using multivariate analysis of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection data. *Food Chemistry* 141 (2013) 3897 – 3905.

182. Taylor, V. F.; Longerich, H. P.; Greenough, J. D. Multielement analysis of Canadian wines by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and multivariate statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 856 – 860.

183. Coetzee, P. P.; Steffens, F. E.; Eiselen, R. J.; Augusyn, O. P.; Balcaen, L.; Vanhaecke, F. Multi-element analysis of South African wines by ICP-MS and their classification according to geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 5060 – 5066.

184. González, A.; Llorens, A.; Cervera, M. L.; Armenta, S.; de la Guardia, M. Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. *Food Chemistry* 112 (2009) 26 – 34.

185. Bentlin, F. R. S.; Pulgati, F. H.; Dressler, V. L.; Pozebon, D. Elemental analysis of wines from South America and their classification according to country. *Journal of Brazilian Chemical Society* 22 (2011) 327 – 336.

186. Frías, S.; Conde, J. E.; Rodríguez-Bencomo, J. J.; García Montelongo, F.; Pérez-Trujillo, J. P. Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *Talanta* 59 (2003) 335 – 344.

187. Bentlin, F. R. S.; Santos, C. M. M.; Flores, E. M. M.; Pozebon, D. Lanthanides determination in red wine using ultrasound assisted extraction, flow injection, aerosol desolvation and ICP-MS. *Analytica Chimica Acta* 710 (2012) 33 – 39.
188. Poerner, N.; Rodrigues, E.; Celso, P. G.; Manfrói, V.; Hertz, P. F. Diferenciação analítica de vinhos-base para espumantes de duas regiões vitícolas do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural* 40 (2010) 1186 – 1192.
189. Kaunova, A. A.; Petrov, V. I.; Tsyupko, T. G.; Temerdashev, Z. A.; Perekotii, V. V.; Luk'yanov, A. A. Identification of wine provenance by ICP-AES multielement analysis. *Journal of Analytical Chemistry* 68 (2013) 831 – 836.
190. Álvarez, M.; Moreno, I. M.; Jos, A. M.; Cameán, A. M.; Gonzalez, A. G. Study of mineral profile of Montilla-Moriles “fino” wines using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (2007) 391 – 395.
191. Saurina, J. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. *Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 234 – 245.
192. Grotti, M.; Magi, E.; Leardi, R. Selection of internal standards in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry by principal components analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003) 274 – 281; [192b] Stepan, M.; Musil, P.; Poussel, E.; Mermet, J. M. Matrix-induced shift effects in axially viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta B* 56 (2001) 443 – 453.
193. Kment, P.; Mihaljevic, M.; Ettlet, V.; Sebek, O.; Strnad, L.; Rohlova, L. Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chemistry* 91 (2005) 157-165.
194. Rodrigues, S. M.; Otero, M.; Alves, A. A.; Coimbra, J.; Coimbra, M. A.; Pereira, E.; Duarte, A. C. Elemental analysis for categorization of wines and authentication of their certified brand of origin. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011) 548-562.
195. Horii, S.; Hashiguchi, T.; Izu, H.; Sudo, S. Analysis of element composition of Japanese and other wine and their classification. *Journal of Japanese of Soc. Hort. Sci.* 80 (2011) 506-511.
196. Ajtony, Z.; Szoboszlai, N.; Suskó, E. K.; Mesei, P.; György, K.; Bencs, L. Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content. *Talanta* 76 (2008) 627 – 634.
197. Barciela, J.; Vilar, M.; García-Martín, S.; Peña, R. M.; Herrero, C. Study on different pre-treatment procedures for metal determination in *Orujo* spirit samples by ICP-AES. *Analytica Chimica Acta* 628 (2008) 33-40.

198. Catarino, S.; Curvelo-Garcia, A. S.; de Sousa, R. B.; Measurements of contaminants elements of wine by inductively coupled plasma-mass spectrometry: a comparison of two calibration approaches. *Talanta* 70 (2006) 1073-1080.
199. González, A.; Armenta, S.; Pastor, A.; de la Guardia, M. Searching the most appropriate simple pretreatment for the elemental analysis of wines by inductively coupled plasma-based techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 4943 – 4954.
200. Farias, L. A.; Fávaro, D. I. T. Vinte anos de Química Verde: conquistas e desafios. *Química Nova* 34 (2011) 1089 – 1093; [200b] Machado, A. A. S. C. Dos primeiros aos segundos doze princípios da Química Verde. *Química Nova* 35 (2012) 1250 – 1259.
201. Brenner, I. B.; Mermet, J. M.; Segal, I.; Long, G. L. Effect of nitric and hydrochloric acids on rare earth element (REE) intensities in inductively coupled plasma emission spectrometry. *Spectrochimica Acta* 50B (1995) 323 – 331; [201b] Todoli, J.L.; Mermet, J.M. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. *Spectrochimica Acta* 54B (1999) 895 – 929.
202. Jakubowski, N.; Brandt, R.; Stuewer, D.; Eschnauer, H. R.; Görtges, S. Analysis of wines by ICP-MS: is the pattern of the rare earth elements a reliable fingerprint for the provenance? *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 364 (1999) 424 – 428.
203. Wuilloud, R. G.; Wuilloud, J. C.; Olsina, R. A.; Martinez, L. D. Speciation and preconcentration of vanadium(V) and vanadium(IV) in water samples by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry and ultrasonic nebulization. *Analyst* 126 (2001) 715 – 719.
204. Marchisio, P. F.; Sales, A.; Cerutti, S.; Marchevski, E.; Martinez, L. D. On-line preconcentration/determination of lead in *Ilex paraguariensis* samples (mate tea) using polyurethane foam as filter and USN-ICP-OES. *Journal of Hazardous Materials* 124B (2005) 113 – 118.
205. Gomez, M. R.; Cerutti, S.; Sombra, L. L.; Silva, M. F.; Martínez, L. D. Determination of heavy metals for the quality control in argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007) 1060 – 1064.
206. Brasil, lei 10.970 de 12 de novembro de 2004. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/lei/110.970.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/lei/110.970.htm). Acesso em julho de 2013.

## 5 Apêndices

*Por que cometer erros antigos  
se há tantos erros novos a escolher?  
(Bertrand Russel)*

5.1 Apêndice A - Artigo publicado referente à determinação de polifenóis totais em vinhos.

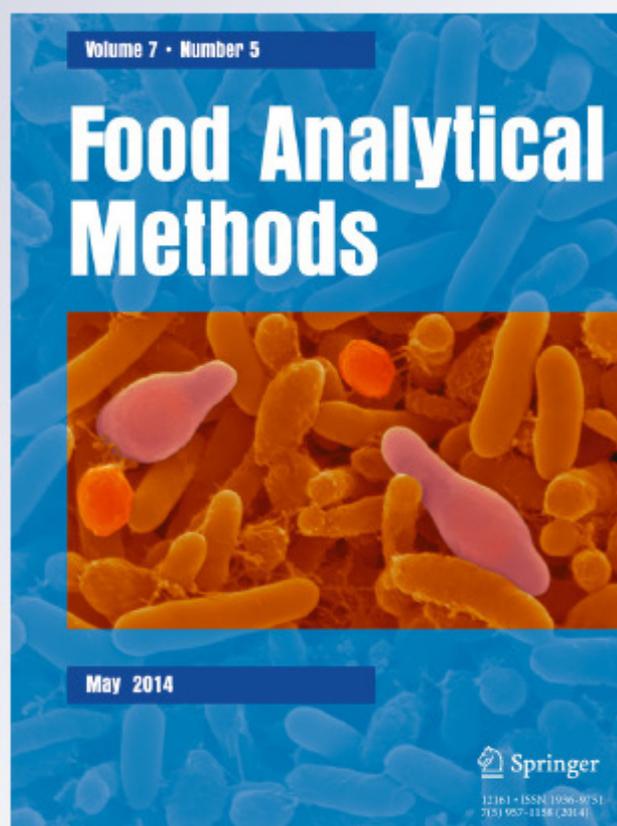
*Multicommuted Flow Analysis Procedure  
for Total Polyphenols Determination in  
Wines Employing Chemiluminescence  
Detection*

**Marcelo Farias de Andrade, Suelle Gisian  
Farias de Assis, Ana Paula Silveira Paim  
& Boaventura Freire dos Reis**

**Food Analytical Methods**

ISSN 1936-9751  
Volume 7  
Number 5

Food Anal. Methods (2014) 7:967-976  
DOI 10.1007/s12161-013-9699-0



## Multicommuted Flow Analysis Procedure for Total Polyphenols Determination in Wines Employing Chemiluminescence Detection

Marcelo Farias de Andrade · Suelle Gisian Farias de Assis · Ana Paula Silveira Paim · Boaventura Freire dos Reis

Received: 11 April 2013 / Accepted: 13 August 2013 / Published online: 31 August 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** A flow procedure based on a multicommuted flow analysis process for the determination of polyphenolic compounds in wine employing chemiluminescence as detection technique is described. The method was based on the reaction of hypochlorite with gallic acid, the remaining hypochlorite reacted with luminol in an alkaline medium generating electromagnetic radiation with maximum emission at 425 nm. The luminescence intensity presented an inverse relationship to the concentration of polyphenol compounds, which was monitored employing a homemade luminometer. The flow system manifold was designed to use solenoid mini-pumps for propelling fluids in order to obtain a setup of downsized dimension. After setting the variables control of the flow system and the concentrations of the reagent, the following features were achieved: a linear response ranging from 10 to 100 mg L<sup>-1</sup> gallic acid ( $R^2=0.997$ ), a relative standard deviation of 3.4 ( $n=11$ ) for a 50 mg L<sup>-1</sup> gallic acid solution, a detection limit of 6.6 mg L<sup>-1</sup>, a sampling throughput of 180 determination h<sup>-1</sup>, and a waste generation of 1.1 mL per determination.

**Keywords** MCFA · FIA · Gallicacid · Wines · Luminol · Chemiluminescence

### Introduction

Nowadays, there is a consensus concerning the potential benefits for human health afforded by the phenolic compound present in wine (Pal et al. 2003; Ivanova et al. 2010; Raczkowska et al. 2011). Polyphenolic compounds are considered strong antioxidants and radical scavengers (Rigo et al. 2000), thereby protecting body tissues against free radicals and lipid peroxidation (Rigo et al. 2000; Arnous et al. 2001; Doka and Bicanic 2002; Granero et al. 2010; Raczkowska et al. 2011). Furthermore, flavor, color, and bitterness which form the quality of red wine are linked to phenolic compounds. Therefore, it is essential to check and control the phenolic composition during wine preparation and aging (Doka and Bicanic 2002; Ivanova et al. 2011a; Raczkowska et al. 2011).

Polyphenol composition in wine has been achieved employing mainly analytical techniques such as high-performance liquid chromatography (Rodríguez-Delgado et al. 2002; Recamalez et al. 2006), ultra-performance liquid chromatography (Raczkowska et al. 2011), and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (Ivanova et al. 2011a; Ivanova et al. 2011b; Fanzone et al. 2012). For the determination of the total polyphenol content enzymatic reaction with detection by amperometry (Rigo et al. 2000; Shleev et al. 2004; Granero et al. 2010), spectrometry based on the Folin–Ciocalteu method (Rigo et al. 2000; Amous et al. 2001; Doka and Bicanic 2002; Pal et al. 2003; Ivanova et al. 2010; Ivanova et al. 2011a) and chemiluminescence (Costin et al. 2003; Nalewajko-Sieliwoniuk et al. 2010; Fassoula et al. 2011; Araujo et al. 2011) have been employed. Spectrophotometric

M. F. de Andrade · S. G. F. de Assis · A. P. S. Paim (✉)  
Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco—Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Av. Jornalista Anibal Fernandes, s/n—Cidade Universitária, 50740-560 Recife, PE, Brazil  
e-mail: anaspaim@ufpe.br

B. F. dos Reis  
Universidade de São Paulo - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, PO Box 96, 13400-970 Piracicaba, SP, Brazil

determination based on Folin–Ciocalteu method is by far the most used for the determination of total phenolic compounds in wines (Rigo et al. 2000; Arnous et al. 2001; Doka and Bicanic 2002; Pal et al. 2003; Granero et al. 2010; Ivanova et al. 2010; Raczkowska et al. 2011). Nevertheless, at room temperature, the analytical procedures based on the Folin–Ciocalteu method require a long incubation time for reaction development, so that time intervals varying from 60 to 120 min have to be employed (Rigo et al. 2000; Arnous et al. 2001; Raczkowska et al. 2011). This time interval can be abbreviated to 15 min using a warming step at 50 °C (Pal et al. 2003; Ivanova et al. 2010). This long incubation time results in a low throughput, which becomes a drawback when there are a large number of samples to be analyzed. Therefore, the availability of a more expeditious analytical procedure is welcomed by wine producers.

Analytical procedures based on chemiluminescence have been also proposed for polyphenol determination in wine employing sequential injection analysis (SIA) (Fassoula et al. 2011), SIA combined with multisyringe flow injection analysis (SIA-MSFIA) (Araujo et al. 2011), and flow injection analysis (FIA) (Costin et al. 2003; Nalewajko-Sieliwonniuk et al. 2010). Taking the facilities afforded by these flow analysis approaches, the procedures offer as advantages ease of operational conditions, wide analytical range and a high throughput, which retains the useful features such as sensitivity, accuracy, and precision of results.

The analytical procedures referred above were implemented employing three modes of the flow analysis process, which are named as FIA, SIA, and SIA-MSFIA which employed a peristaltic pump (Costin et al. 2003; Nalewajko-Sieliwonniuk et al. 2010) or syringes (Araujo et al. 2011; Fassoula et al. 2011) for fluid propelling. The solenoid mini-pump was introduced 16 years ago as a new device for fluid propelling in a flow analysis system (Weeks and Johnson 1996), presenting a fluid pumping pattern different from the syringe (pulse less stream) and peristaltic pump (pulsed continuous stream). The solenoid mini-pump works based on an ON/OFF switching pattern, delivering an aliquot solution at a constant volume when it is switched ON/OFF (Weeks and Johnson 1996; Lapa et al. 2002). This feature has been exploited to develop analytical procedures, replacing the peristaltic pump (Lima et al. 2004; Santos et al. 2007). Flow analysis modules based on multicommutated flow analysis (MCFA) (Reis et al. 1994) have also been designed employing a set of solenoid mini-pumps instead of both a peristaltic pump and three-way solenoid valves (Lavorante et al. 2006; Infante et al. 2008; Fernandes et al. 2009). The replacement is possible because this device performs the commutation action as a solenoid valve and fluid propelling as a mono channel pump.

In this work, we intended to develop a chemiluminescence procedure for the total polyphenol determination in wine

employing a flow analysis module based on a multi-commutation process (Reis et al. 1994), designed to use solenoid mini-pumps as fluid-propelling devices. The method is based on reaction between 5-amino-phthalhydrazide (luminol) and hypochlorite (Marino and Ingle, Jr 1981). Initially, the existing polyphenols in wine (or standard gallic acid) are oxidized by hypochlorite. The excess of oxidizing reagent reacts with luminol in an alkaline medium, generating electromagnetic radiation (chemiluminescence), which can be monitored using a homemade luminometer.

## Experimental

### Reagents and Solutions

All chemical used were of analytical grade, except hypochlorite, which was a bleach solution purchased from a local market. All solutions were prepared with purified water with electric conductivity less than 0.1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

A sodium carbonate solution (0.25 mol L<sup>-1</sup>) was prepared by dissolving 6.663 g of solid (Sigma, Germany) in water and the pH was adjusted to 11.0 using a 2.0 mol L<sup>-1</sup> HCl solution. This solution could be used for a month. A 10.0 mmol L<sup>-1</sup> 5-amino-phthalhydrazide (luminol) stock solution was prepared by dissolving 46.0 mg of solid (Sigma, Germany) in 25 mL of the 0.25 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution. This solution was prepared 48 h before use and maintained in a freezer at 8 °C. Its use was valid for 2 weeks (Marino and Ingle, Jr 1981; Rocha et al. 2005).

A 1,000 mg L<sup>-1</sup> gallic acid stock solution was prepared daily by dissolving 0.0276 g of solid monohydrated (Sigma, Germany) in 25 mL water. Working standard solutions of gallic acid with concentrations between 10 and 100 mg L<sup>-1</sup> were prepared prior to use by dilution from the stock solution with water. A 20.5 mmol L<sup>-1</sup> hypochlorite solution was prepared by dilution with water from the bleach solution that had been previously standardized according to the Standard Methods procedure (APHA 1998).

### Wine Samples

Samples of Brazilian 02 white (01 Chenin Blanc and 01 Chardonnay) and 10 red (02 Syrah/Shiraz and 08 Cabernet Sauvignon) wines, produced in the year 2009/2010 were purchased from local market. Prior to analysis, the white and red wines were diluted 15 and 100 times with water, respectively. When they were not in use, the samples were stored in a freezer at 8 °C.

### Apparatus and Accessories

The equipment setup comprised a microcomputer furnished with a PCL-711S electronic interface card (Advantech), which

was employed to control the flow system and to perform data acquisition running software written in Quick Basic 4.5; two solenoid mini-pumps (Bio-Chem. 090SP) and two solenoid mini-pumps (Bio-Chem. 130SP) with nominal volumes per stroke of 8 and 12  $\mu\text{L}$ , respectively, used for sample and solution propelling; polyethylene tubing (0.8 mm i.d.) used for flow lines and reaction coil (40 cm long); two flow lines jointing device machined in acrylic; two photodiodes with a 100-mm<sup>2</sup> active surface (1337-1010BR Hamamatsu); three OP07 operational amplifiers (Burr Brown, Lake Forest, CA); a stabilized power supply 12 V DC, current intensity of 1 A to feed the solenoid mini-pumps; a stabilized power supply of +12 and -12 V (0.5 A) used to feed the luminometer, a power digital interface based on the integrated circuit ULN2803 to drive the solenoid mini-pumps (Ródenas-Torralba et al. 2006); a printed circuit board (surface of 10×20 cm) made of fiber glass to assemble the electronic components that comprised the luminometer; resistors and capacitors as described in the caption of Fig. 1; a metallic box presenting a front surface 20 cm long, 10 cm high, and 10 cm deep, used for the luminometer housing; and a flow cell for chemiluminescence detection machined from a piece of fiber glass as described below.

### The Flow System and the Luminometer

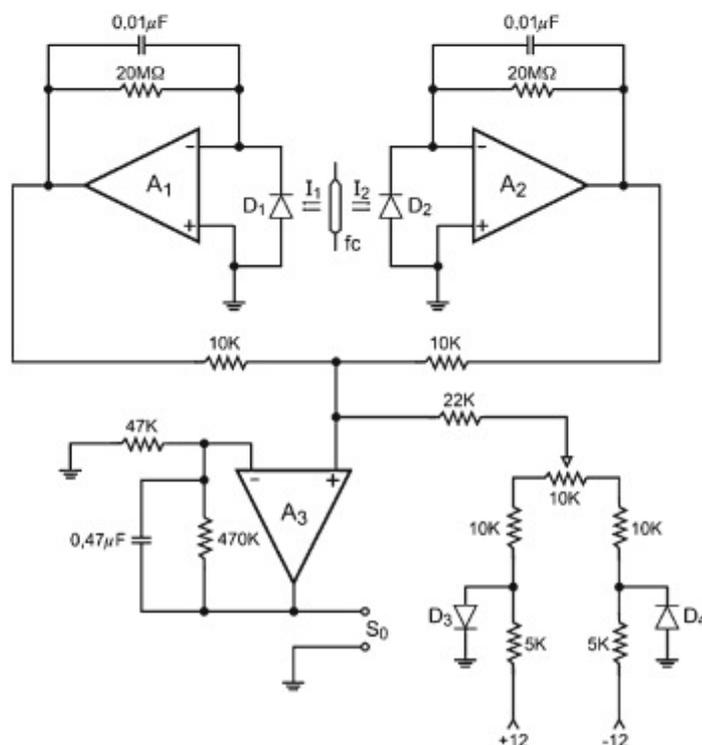
The electronic diagram of the chemiluminescence detector (luminometer) designed to be used to develop the current procedure is shown in Fig. 1.

The photodiodes ( $D_1$  and  $D_2$ ) presented a 100-mm<sup>2</sup> active surface, and the flow cell shown in Fig. 2 was tailored to be sandwiched between them in order to improve the capturing of the light beams  $I_1$  and  $I_2$ .

The three pieces that comprised the flow cell shown in Fig. 2 were attached with screws, which were not shown to simplify visualization. Between plate a-c and c-b sheets (Ps) of transparent PVC were placed, in order to prevent fluid leakage and to allow the light transmission towards the photodiodes, which were clamped in the Pd holes.

The luminometer and flow cell were housed in a metallic box in order to prevent external light, which would impair the performance of the luminometer. When light was generated within the flow cell most of it was captured by the photodiodes ( $D_1$  and  $D_2$ ). The signal transducer networks constituted by the operational amplifiers  $A_1$  and  $A_2$  and the diodes, converted the radiant energy to differentiate the electric potential. The signals generated by these two networks were sent to the input

**Fig. 1** Electronic diagram of the luminometer.  $A_1$ ,  $A_2$ , and  $A_3$  – OP07 operational amplifiers;  $D_1$  and  $D_2$  – photodiodes, 1337-1010BR;  $f_c$  – flow cell;  $I_1$  and  $I_2$  – electromagnetic radiation beams emanating from the flow cell;  $S_0$  – generated signal in mV;  $D_3$  and  $D_4$  – rectifier diodes 1N4007



of the operational amplifier  $A_3$ , which was configured to work as a signal summing. Under this condition, the signals ( $S_0$ ) were equal the summation of the previous ones multiplied by 4.7. The network constituted of diodes  $D_3$  and  $D_4$  and the resistors was wired to the input of operational amplifier  $A_3$ , thus allowing the signal related to the dark current to be adjusted to 0 V by means of the variable resistor (10 k $\Omega$ ). This task was done prior to starting the analytical run, when the luminometer was powered.

The diagram of the flow system was arranged as shown in Fig. 3, including the solenoid mini-pumps working pattern  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ , and  $P_4$ .

When the control software was run, the mini-pumps  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ , and  $P_4$  were switched ON/OFF following the switching pattern depicted in Fig. 3. When this happened, in the first step (step<sub>1</sub>), slugs of sample ( $P_1$ , 27.5  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) with slugs of hypochlorite ( $P_2$ , 31.5  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) solution were simultaneously inserted into the reaction (B). A switching event maintaining this pattern, named here as a sampling cycle, could be repeated several times. In the second step (step<sub>2</sub>), the switching mini-pump  $P_3$  (66.5  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) generated a stream of the carrier solution (Cs) to displaced sample zone towards the flow cell. In the third step (step<sub>3</sub>), the carrier stream was maintained by switching mini-pump  $P_3$  together with  $P_4$  (27.5  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) to insert the luminol solution ( $R_2$ ) into the sample zone. While this step proceeded, the luminol reacted with the remaining hypochlorite ions within the flow cell, generating electromagnetic radiation that was detected by the photodiodes. The luminometer converted the radiation to an electric potential difference and sent them to the analog input of the PCL711 interface card, which converted to a digital. This measurement was saved as an ASCII file to allow later processing in order to achieve the gallic acid concentration.

In the fourth step (step<sub>4</sub>), only mini-pump  $P_3$  was activated to maintain the carrier stream in order to wash the flow cell. While this signal reading step was in course, a signal plot was displayed on the screen of the microcomputer to allow its visualization in real time.

#### System Optimization

The stability of reagents and the variables that could affect the chemiluminescent reaction among polyphenolic compounds and luminol in the alkaline medium were studied. The stability of the solutions was studied, comparing solutions prepared on different days. The pH, luminol, and hypochlorite concentration and sampling cycles were optimized by a univariety method.

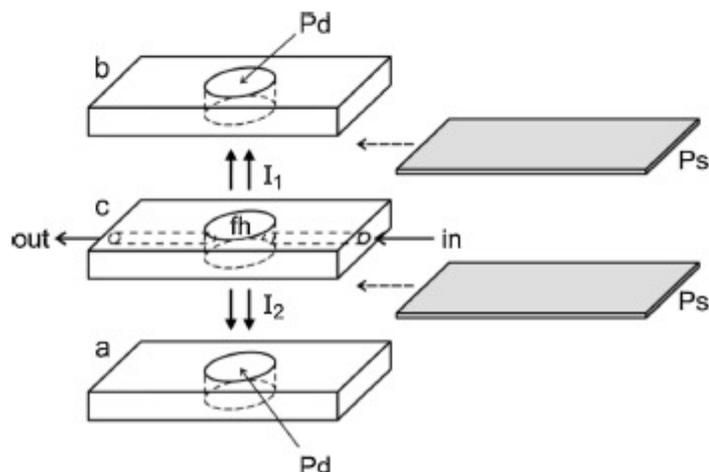
## Results and Discussion

#### General Comments

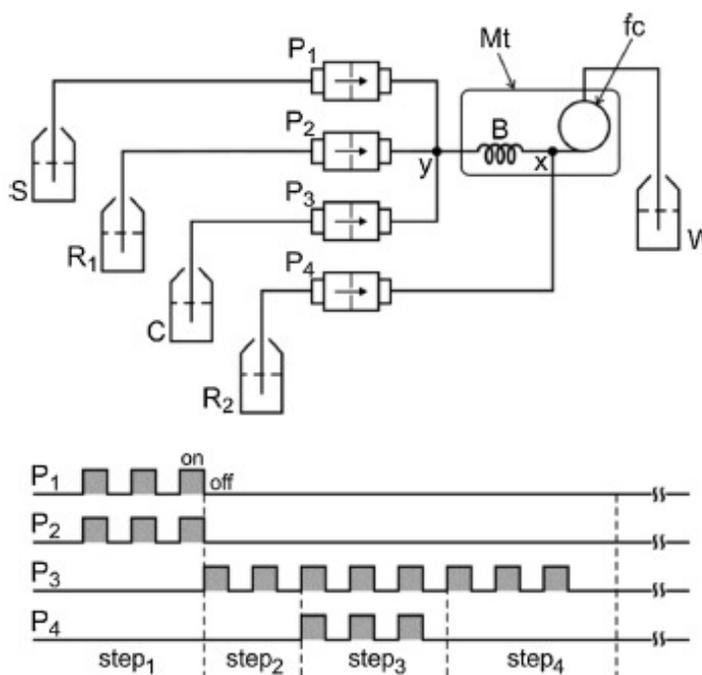
Because the nominal volume of solution delivered by the mini-pump per stroke could differ from that indicated on the data sheet, assays were implemented in order to find the correct values. The software was instructed to switch ON/OFF for each mini-pump after a sequence of 10 times. The amount of solution delivered was collected and weighed in order to ascertain the solution volume delivered by stroke. After conversion to volume using water density at 25 $^\circ$  C, the following volumes were found: 5.5 $\pm$ 0.2, 6.3 $\pm$ 0.2, 13.3 $\pm$ 0.3, and 5.5 $\pm$ 0.2  $\mu\text{L}$ , for mini-pumps  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ , and  $P_4$ , respectively.

After standardization of the hypochlorite solution it was diluted with water in order to obtain a 0.35 mol L $^{-1}$  of ClO $^-$  solution. This solution concentration was used throughout.

**Fig. 2** Schematic expanded view of the flow cell. *a* and *b* = acrylic plates, width thickness of 5 mm; *Pd* = holes to clamp the photodiodes; *c* = fiber glass plate, width thickness of 1.5 mm; *fh* = flow cell core with a 5 mm diameter; *I*<sub>1</sub> and *I*<sub>2</sub> = radiation beams; *in* and *out* = input and output of solution, respectively; *Ps* = transparent PVC sheets, 0.2 mm thickness



**Fig. 3** Flow diagram of the flow system. *S* – sample or standard solution; *C* – carrier solution (water); *R*<sub>1</sub> – Hypochlorite solution; *R*<sub>2</sub> – Luminol solution; *W* – waste; *x* and *y* – flow line joints; *B* – reaction coil, 40 cm long; *Mt* – metallic box; *fc* – luminometer. Lines *P*<sub>1</sub>, *P*<sub>2</sub>, *P*<sub>3</sub>, and *P*<sub>4</sub> – solenoid mini-pumps and time switching pattern for the mini-pumps, respectively. *Shadow surfaces beneath of lines indicate that the corresponding mini-pump was switched ON. Step 1, step 2, step 3, and step 4* – events defined as insertion of sample and *R*<sub>1</sub> solution, sample zone displacement to attain the flow cell, sample displacement with addition of luminol solution and signal reading, and washing step. The signal reading was carried out while the steps 3 and 4 proceeded



The mini-pump switching pattern shown in Fig. 2 was maintained throughout, thus the number of strokes applied per sampling cycles was equal for mini-pumps *P*<sub>1</sub>, *P*<sub>2</sub>, and *P*<sub>4</sub>. In this work, we defined as a sampling cycle a set of strokes applied sequentially to the mini-pumps that can be repeated several times.

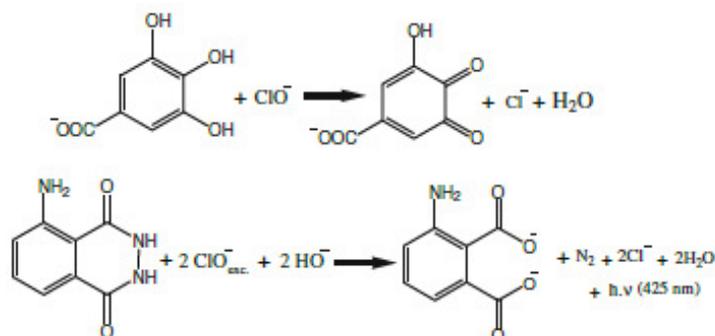
Reagent stability was ascertained by comparison results achieved using the solutions on several days. Analyzing the results, we observed that when maintained under refrigeration, the carbonate buffer solution and luminol stock solutions could be used for 45 and 28 days, respectively, albeit previous papers indicated that the luminol lifetime was 2 weeks (Marino and Ingle, Jr 1981; Rocha et al. 2005). In contrast, the gallic acid solution could be used for only 1 day. In these

assays, we considered that a reagent solution could be used as long as the signal variation was less than 5 %, taking as reference the results achieved when the reagent solution was used for the first time.

Electronic noise and signal drift can impair the performance of the luminometer, thus assays were performed in order to verify these, by maintaining the device powered for 4 h and reading the generated signal. We observed that the noise was less than 10 mV (0.5 % of the full scale) and drift was lower than 7 mV h<sup>-1</sup>. This test was repeated several times, while the assays to develop the analytical procedure were in process, yielding identical results.

In the proposed procedure, the reaction occurred in two steps, as depicted in Fig. 4, producing luminescence with

**Fig. 4** Luminescence reaction between luminol, hypochlorite, and gallic acid



maximum of emission at 425 nm. In the first one, hypochlorite oxidizes the polyphenolic compounds of wine or gallic acid used as standard solutions. Subsequently, the remaining hypochlorite reacted with the luminol in an alkaline medium. Under this condition, the amount of remaining hypochlorite decreased as the concentration of polyphenol compounds increased. Thereby, the luminescence intensity decreased maintaining an inverse relationship to the concentration of polyphenol compounds; thus the blank signal was higher than those obtained when processing gallic acid solutions or wine samples.

The studies concerning the parameters that could influence the system performance were accomplished employing the univariate method and using a blank solution as a reference. The results are commented on below.

#### Effect of the pH on Reaction

It is known that a luminol reaction with an oxidizing compound occurs in an alkaline medium. Intending to find the better condition for luminescent reaction development, a set of assays was carried out, varying the pH of the carbonate buffer solution used to prepare luminol solution. The pH was varied within range of 9.5 to 12.0, yielding the results shown in Fig. 5. As we can see, the pH of the reacting medium exerts notable effect on the signal magnitude, tending to have a constant value for pH between 11.5 and 12.0. For this reason, a pH value of 11.8 was selected.

#### Effect of the Hypochlorite Solution Medium

Aiming to verify the effect of the hypochlorite solution medium on the luminescence signal, the oxidizing solution was

prepared using water, sodium hydroxide, and carbonate solutions (pH=11.8), resulting in the following signals: 1,950, 1,890, and 2,046 mV, respectively. Taking the signal related to water as a reference, we can deduce that for the hydroxide solution, the signal presented a decrease of 9 %, while for carbonate solutions an increase of 4 % occurred. These results indicated that water could be used to prepare the hypochlorite solution without causing a significant decrease in signal. So, hypochlorite solution prepared in water was selected for the next assays.

#### Effect of the Luminol Concentration

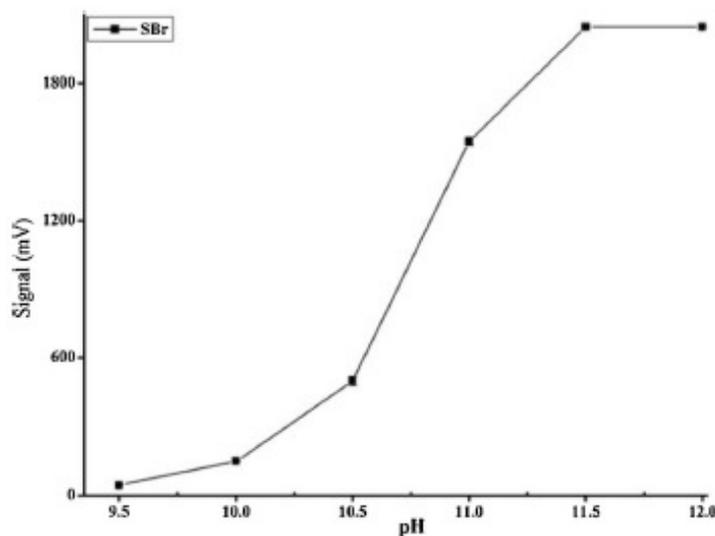
Luminol concentration plays a critical role in the chemiluminescence (CL) reaction, (Yinhuan et al. 2011) thus a set of assays was carried out in order to verify the effect of luminol concentration, using a hypochlorite solution  $26.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ ClO}^-$ , a luminol solution with a pH 11.8, and maintaining five sampling cycles. The results are shown in Fig. 6.

Analyzing these results, we can deduce that within the luminol concentration ranging from  $0.66$  up to  $0.96 \text{ mmol L}^{-1}$ , there is a signal increase of 38 %, but for the luminol concentration at  $1.06 \text{ mmol L}^{-1}$ , the gain in signal was approximately 0.5 %, which would be considered not significant. So the  $0.96 \text{ mmol L}^{-1}$  luminol solution was chosen to perform the rest of the assays.

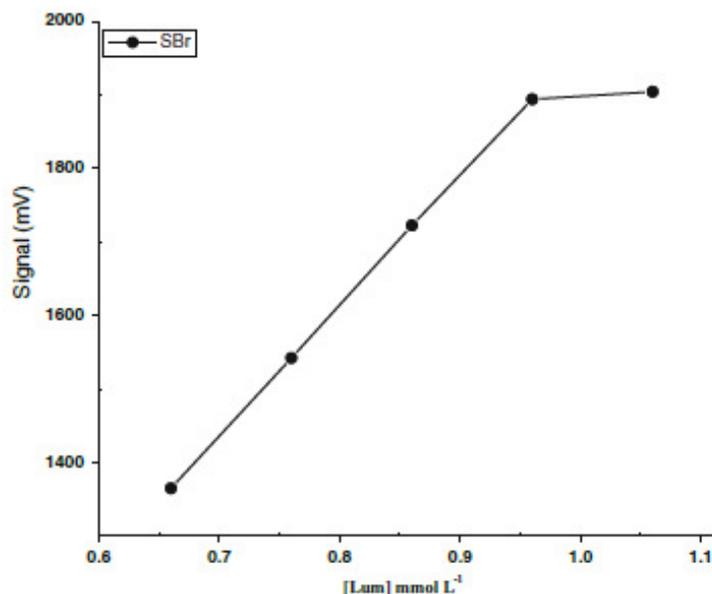
#### Effect of the Hypochlorite Concentration

The effect of the  $\text{ClO}^-$  concentration on the signal was studied, varying its concentration (19.5, 20.5, 23.0, 26.5, 30.0, and  $33.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ ClO}^-$ ) and maintaining the other parameters

**Fig. 5** The pH effect on the blank signal. The luminol ( $0.86 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and  $\text{ClO}^-$  ( $26.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) concentration, the use of water as dissolvent for the bleach and five pulses (cycles) were maintained



**Fig. 6** The luminol concentration effect on the blank signal. The pH (11.8),  $\text{ClO}^-$  ( $26.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) concentration, use of water as dissolvent for the bleach and five pulses (cycles) were maintained



aforementioned. The results indicate that a signal increase occurred up to a hypochlorite concentration of  $23.0 \text{ mmol L}^{-1}$ , while for the higher concentration, the signal presented a decrease, around 4%. Considering these results, a  $23.0 \text{ mmol L}^{-1}$  hypochlorite solution was selected.

#### Effect of the Sampling Cycle Numbers

It is known that in a flow analysis system, the sample volume affects the analytical signal, thereby it is a parameter to be investigated in order to improve sensitivity. The solenoid mini-pump employed to insert the sample in the work under study delivered a volume of  $5.5 \mu\text{L}$  per stroke. As is depicted in Fig. 3, the mini-pumps switching pattern demonstrate that mini-pumps  $P_1$  and  $P_2$  were switched ON/OFF at the same time. As was defined previously (see "The Flow System and the Luminometer" section), a switching event maintaining this pattern is named a sampling cycle, which can be repeated several times. Given this condition, the sample volume could be controlled by varying the number of sampling cycles applied to the mini-pumps  $P_1$  and  $P_2$ , by programming the microcomputer to vary the sampling cycles from three to seven, yielding the results shown in Table 1. In this case, the number of ON/OFF switching applied to the mini-pumps  $P_3$  and  $P_4$  (steps Fig. 3) were equal to those applied to the mini-pumps  $P_1$  and  $P_2$  (step<sub>1</sub>).

Analyzing these results, we observe that the effect of sample volume on the signal magnitude is very significant, so that when sample volume was increased by 33 %, signal magnitude was increased by 41 %. When the sample volume

was increased from  $15.5$  to  $33.0 \mu\text{L}$  the analytical signal was two-fold. Nevertheless, when the volume was increased to  $38.5 \mu\text{L}$ , the signal reached the full scale limit of the PCL711 interface card ( $2,047 \text{ mV}$ ). Considering these results, 6 sampling cycles were selected to maintain a suitable relationship between the sample signals and the analytical signal.

The main parameters of the proposed procedure commented in the previous section are summarized in Table 2 in order to allow a global view.

#### System Performance

After optimizing the operational conditions and aiming to verify the matrix effect, three sets of gallic acid standard solutions were prepared, using water, white and red wines as media and were processed, yielding the results shown in Fig. 7. To carry out these assays, the red and white wines were diluted 100 and 15 times, respectively.

**Table 1** Effect of the sampling cycles

Sampling cycles	Volume ( $\mu\text{L}$ ) <sup>a</sup>	Signal (mV)	Volume variation (%)	Signal variation (%)
3	16.5	972	–	–
4	22.0	1,379	33	41
5	27.5	1,745	25	25
6	33.0	1,976	20	13
7	38.5	>2,047	17	–

<sup>a</sup>Sample volume per run

**Table 2** Selected system parameters

Parameter	Studied values	Selected values
pH	9.5–12.0	11.8
Dissolvent for ClO <sup>-</sup>	W, SH, CB	W
Luminol concentration (mmol L <sup>-1</sup> )	0.66–1.06	0.96
ClO <sup>-</sup> concentration (mmol L <sup>-1</sup> )	19.5–33.5	23.0
Sampling cycles number	3–7	6

W water, SH sodium hydroxide solution, CB carbonate buffer solutions

The curves shown in this figure are represented by the following linear equations: Signal (mV) = (1,991 ± 11) - (1.96 ± 0.09)C ( $R^2=0.997$ ); Signal (mV) = (1,691 ± 11) - (1.85 ± 0.03)C ( $R^2=0.999$ ); and Signal (mV) = (1,763 ± 10) - (1.75 ± 0.03)C ( $R^2=0.998$ ); for water, white and red wines, respectively. Comparing the analytical curves achieved for water and red wine, we found that they are parallel. The Student's *t* test was used at a 95 % confidence level ( $t_{crit}=2.23$  and  $t_{calc}=2.22$ ) indicating that there was no significant matrix effect.

The analytical figures of merit are summarized in Table 3, where we can see that the analytical curve was linear [Signal (mV) = (2023.9 ± 34.8) - (17.29 ± 0.57) C,  $R^2=0.997$ ] for the gallic acid concentration, ranging from 10 up to 100 mg L<sup>-1</sup>. Aiming for repeatability assessment, a set of experiments was carried out using a 50 mg L<sup>-1</sup> gallic acid solution, and white and red wine samples. As we can see in Table 3, the relative standard deviations calculated using these measurements could be considered as an effective indication of the system

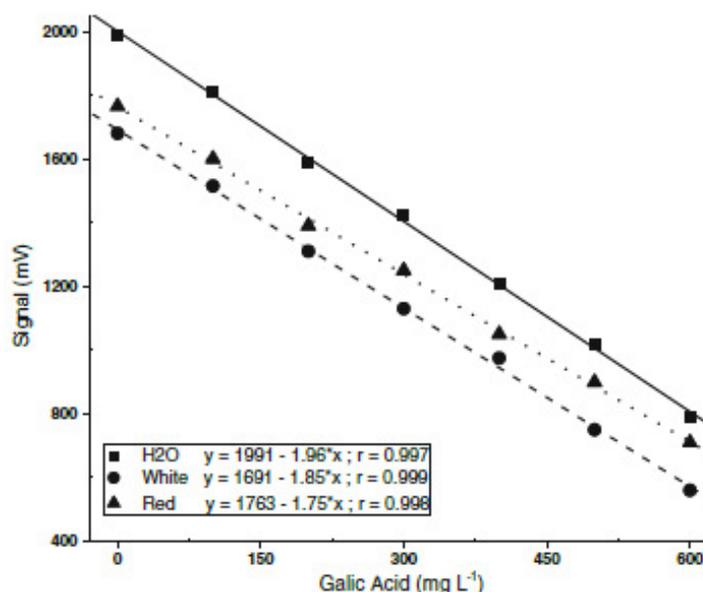
stability, which was able to generate results with a standard deviation lower than 4 %.

### Interferences

Since chemical species such as ethanol, tartaric acid, sulphate, chlorite, iron (II), magnesium, copper, and sulfite are able to cause interference, a set of assays were carried out in order to ascertain to what extent this was true in the proposed system. The solutions containing a fixed amount of 200 mg L<sup>-1</sup> gallic acid and different concentrations of species under evaluation yielded the results shown in Table 4. Chemical species were considered as interfering, when signals obtained using standard solutions with and without the interfering materials presented a variation exceeding ±5 %.

Analyzing the results shown in Table 4, we can see that among the potential interfering chemical species studied, copper and SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> presented signal variations higher than 5 %. Copper is widely known as a catalyst for chemiluminescence luminol reactions, thus it may interfere in some analyses (Kment et al. 2005) and bisulfite is added to wines to prevent oxidation. The maximum limit for copper and bisulfite in wines is 1 and 50 mg L<sup>-1</sup> (OIV 2005), respectively. Considering that the samples were diluted 100-fold, the concentrations would have been 1 μg L<sup>-1</sup> and 0.25 mg L<sup>-1</sup> for copper and bisulfite, respectively. Since the assayed amounts for both chemical species were higher than accepted values, we supposed that the effects caused by these species would be negligible. Ethanol, tartaric acid, sulphate, chlorite, iron (II),

**Fig. 7** Study of the matrix effect using a gallic acid standard solution. Curves labeled as black square, black circle, and black triangle are related to standard solutions prepared in water, white and red wine media, respectively



**Table 3** Analytical figures of merit

Parameter	Value
Linearity ( $\text{mg L}^{-1}$ )	10–100
Relative standard deviation (%) <sup>a</sup>	3.4
Relative standard deviation (%) <sup>b</sup>	2.2
Relative standard deviation (%) <sup>c</sup>	2.8
Limit of detection ( $\text{mg L}^{-1}$ )	6.6
Sampling throughput (determination $\text{h}^{-1}$ )	180
Waste generation per determination (mL)	1.1
Luminol consumption per determination ( $\mu\text{g}$ )	5.8
Hypochlorite consumption per determination ( $\mu\text{g}$ )	51

Limit of detection were estimated employing the  $3\sigma/a$  criterion (Analytical Methods Committee 1987) for  $n=11$

<sup>a</sup>Relative standard deviations achieved by processing consecutively 11 times a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  acid gallic solution

<sup>b</sup>Relative standard deviations achieved by processing consecutively 11 times a white wine sample

<sup>c</sup>Relative standard deviations achieved by processing consecutively 11 times a red wine sample

and magnesium revealed that under the settled operational conditions, no interfering effect was found.

#### Results Comparison and System Performance

After optimization, the performance of the MCFA-proposed system was evaluated. The recovery studies were performed for accuracy assessment of this method by spiking  $20.0 \text{ mg L}^{-1}$  of gallic acid in diluted wines (equivalent to  $2.0 \text{ g L}^{-1}$  of gallic acid in nature wine). The method developed was applied to 12 wine samples (red and white dry). Analyzing the results reported in Table 5, we can see that recovery values are within the range of 82 to 128 % of gallic acid from the spiked samples, which would be considered acceptable.

**Table 4** Tolerance for potential interfering substances

Substance	Amount	Signal variation (%)
Ethanol	2 % <sup>a</sup>	+1.4
Tartaric acid	$0.10 \text{ g L}^{-1}$	-1.5
$\text{SO}_4^{2-}$	$115 \text{ mg L}^{-1}$	-2.2
$\text{Cl}^-$	$42 \text{ mg L}^{-1}$	-0.4
$\text{SO}_3^{2-}$	$5.0 \text{ mg L}^{-1}$	+7.6
$\text{Cu}^{2+}$	$30 \mu\text{g L}^{-1}$	+6.7
$\text{Fe}^{2+}$	$2.0 \text{ mg L}^{-1}$	+1.6
$\text{Mg}^{2+}$	$30 \text{ mg L}^{-1}$	+1.5

The assays were carried out using a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  gallic acid solution

<sup>a</sup>Maximum concentration studied

**Table 5** Recovery results expressed as gallic acid

Cultivar	Concentration as gallic acid ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Recovery (%)
	Initial value	Total found	
Cabemet Sauvignon	$4,777 \pm 149$	$6,997 \pm 253$	111
Cabemet Sauvignon	$4,389 \pm 127$	$6,016 \pm 110$	82
Cabemet Sauvignon	$4,543 \pm 253$	$6,894 \pm 408$	117
Cabemet Sauvignon	$4,042 \pm 169$	$5,869 \pm 318$	91
Cabemet Sauvignon	$5,352 \pm 164$	$7,521 \pm 316$	108
Cabemet Sauvignon	$6,390 \pm 251$	$8,819 \pm 762$	121
Cabemet Sauvignon	$5,163 \pm 70$	$7,077 \pm 274$	96
Cabemet Sauvignon	$4,994 \pm 95$	$7,075 \pm 145$	104
SynthShiraz	$3,693 \pm 101$	$6,254 \pm 252$	128
SynthShiraz	$4,194 \pm 113$	$6,479 \pm 573$	114
Chenin Blanc <sup>a</sup>	$738.6 \pm 27.4$	$1,069 \pm 61$	110
Chardonnay <sup>a</sup>	$1,073 \pm 67$	$1,357 \pm 83$	94

<sup>a</sup>Dry white wines. These results, expressed as gallic acid concentrations, correspond to the values found in wine samples diluted with water prior to analyses. Dry red and white wines were diluted 100 and 15 times, respectively. Gallic acid in the amount of  $2.0 \text{ g L}^{-1}$  was added to all samples

The main parameters usually employed to compare the performances of the analytical procedures are summarized in Table 6. As we can see, the linear range of the proposed procedure (10 and  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of gallic acid) is enough to allow the determination of total polyphenols in red and white wines without any modification of the flow system parameters. The proposed procedure affords the advantages of lower sample consumption ( $33 \mu\text{L}$ ) and waste generation ( $1.1 \text{ mL}$ ) per determination than those observed in the references cited (Araujo et al. 2011; Fassoula et al. 2011). Analyzing the values related to throughput ( $180 \text{ h}^{-1}$ ), we observed that the comparison is very favorable to the proposed procedure.

**Table 6** Analytical performance comparison

Parameters	Proposed procedure	Fassoula et al. 2011	Gamela et al. 2006	Araujo et al. 2011
Linear range ( $\text{mg L}^{-1}$ )	10–100	0.17–34	0.2–1.0	1–100
Limit of detection ( $\text{mg L}^{-1}$ )	6.6	0.17	0.04	–
Relative standard deviation (%)	3.4	5.3	7.3	5.2
Waste generation (mL)	1.1	1.9	0.6	6.7
Sample volume ( $\mu\text{L}$ )	33	75	150	50
Reagent consumption (mg)	0.006	0.002	–	18
Throughput ( $\text{h}^{-1}$ )	180	60	30	12

## Conclusion

The proposed multicommutated flow system with chemiluminescence detection was successfully applied to the determination of polyphenols in red and white wine samples. The calibration graph is linear over the range 10–100 mg L<sup>-1</sup> gallic acid with a detection limit of 6.6 mg L<sup>-1</sup>. Both a sampling rate of 180 determinations per hour and a relative standard deviation of 3.4 % ( $n=11$ ) for a typical solution containing 50 mg L<sup>-1</sup> gallic acid solution were also achieved.

The proposed system makes use of sample and reagent low consumption resulting in low waste generation, the samples can be analyzed without previous treatment, the linear range is wide enough to allow the determination of total polyphenols in red and white wines without any modification of the flow system and, the detector system (luminometer) can be constructed in the laboratory at a low cost. These advantages may be considered as an indication that the instrument setup associated with the proposed procedure is a viable alternative for polyphenols determination in wines.

**Acknowledgments** The authors acknowledge the financial support from CAPES, CNPq, and FACEPE. MF Andrade thanks CNPq for the fellowship.

**Conflict of Interest** Marcelo Farias de Andrade declares that he has no conflict of interest. Suelle Gisian Farias de Assis declares that she has no conflict of interest. Ana Paula Silveira Paim declares that she has no conflict of interest. Boaventura Freire dos Reis declares that he has no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects.

## References

- Analytical Methods Committee (1987) *Analyst* 112:199–204
- APHA (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington
- Araujo ARTS, Maya F, Saraiva MLMFS, Lima JLFC, Estela JM, Cerdà V (2011) *Luminescence* 26:571–578
- Amous A, Makris DP, Kefalas P (2001) *J Agr Food Chem* 49:5736–5742
- Costin JW, Bamett NW, Lewis SW, McGillivray DJ (2003) *Anal Chim Acta* 499:47–56
- Doka O, Bicanic D (2002) *Anal Chem* 74:2157–2161
- Fanzone M, Zamora F, Jofré V, Assof M, Gómez-Cordovés C, Peña-Neira A (2012) *J Sci Food Agr* 92:704–718
- Fassoula E, Economou A, Calokerinos A (2011) *Talanta* 85:1412–1418
- Fernandes RN, Reis BF, Morales-Rubio A, de la Guardia M (2009) *J Braz Chem Soc* 20:1242–1248
- Gamella M, Campuzano S, Reviejo AJ, Pingarrón JM (2006) *J Agr Food Chem* 54:7960–7967
- Granero AM, Fernández H, Agostini E, Zón MA (2010) *Talanta* 83:249–255
- Infante CMC, Morales-Rubio A, de la Guardia M, Rocha FRP (2008) *Talanta* 75:1376–1381
- Ivanova V, Stefova M, Chinnici F (2010) *J Serb Chem Soc* 75:45–59
- Ivanova V, Domyei A, Márk L, Vojnoski B, Stafilov T, Stefova M, Kilar F (2011a) *Food Chem* 124:316–325
- Ivanova V, Stefova M, Domyei A, Márk L, Vojnoski B, Dimovska V, Stafilov T, Kilar F (2011b) *Food Res Int* 44:2851–2860
- Kment P, Mihaljevic M, Ettler V, Sebek O, Strnad L, Rohlova L (2005) *Food Chem* 91:157–165
- Lapa RAS, Lima JLFC, Reis BF, Santos JLM, Zagatto EAG (2002) *Anal Chim Acta* 466:125–132
- Lavorante AF, Pires CK, Reis BF (2006) *J Pharm Biomed* 42:423–429
- Lima JLFC, Santos JLM, Dias ACB, Ribeiro MFT, Zagatto EAG (2004) *Talanta* 64:1091–1098
- Marino DF, Ingle JD Jr (1981) *Anal Chem* 53:455–458
- Nalewajko-Sielwoniuk E, Tarasiewicz I, Kojlo A (2010) *Anal Chim Acta* 668:19–25
- OIV (2005) Organisation Internationale de la Vigne et du Vin - OIV. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Paris vol.1. 597p
- Pal S, Ho N, Santos C, Dubois C, Mamo J, Croft K, Allister E (2003) *J Nutr* 133:700–706
- Raczkowska J, Mielcarz G, Howard A, Raczkowski M (2011) *Int J Food Prop* 14:514–522
- Recamalez AF, Sayago A, González-Miret ML, Hernanz D (2006) *Food Res Int* 39:220–229
- Reis BF, Giné MF, Zagatto EAG, Lima JLFC, Lapa RA (1994) *Anal Chim Acta* 293:129–138
- Rigo A, Vianello F, Clementi G, Rossetto M, Scarpa M, Vrhovsek U, Mattivi F (2000) *J Agr Food Chem* 48:1996–2002
- Rocha FRP, Ródenas-Torralba E, Reis BF, Morales-Rubio A, de la Guardia M (2005) *Talanta* 67:673–677
- Ródenas-Torralba E, Rocha FRP, Reis BF, Morales-Rubio A, de la Guardia M (2006) *J Autom Method Manag* 2006:1–9
- Rodríguez-Delgado MA, González-Hernández G, Conde-González JE, Pérez-Trujillo JP (2002) *Food Chem* 78:523–532
- Santos JLM, Ribeiro MFT, Dias ACB, Lima JLFC, Zagatto EAG (2007) *Anal Chim Acta* 600:21–28
- Shleev SV, Chekanov SA, Koroleva OV, Stepanova EV, Telegin YA, Sen'Kina ZE (2004) *Appl Biochem Microbiol* 40:304–309
- Weeks DA, Johnson KS (1996) *Anal Chem* 68:2717–2719
- Yinhuan L, Yankun L, Yang Y (2011) *Appl Spectrosc* 65:376–381

5.2 Apêndice B - Resultados obtidos na determinação de pH e elementos minerais nos vinhos analisados.

Tabela B 1: Teores, e respectivos desvios-padrão (n = 3), de pH e elementos majoritários nas amostras de vinhos varietais, tintos e brancos, elaborados no Vale do São Francisco.

Amostra	pH <sup>a</sup>	B 249,677 <sup>b</sup>	Na 589,592 <sup>b</sup>	Mg 280,271 <sup>b</sup>	K 766,490 <sup>c</sup>	Ca 317,933 <sup>b</sup>
T1	4,20	1542 ± 401	8,1 ± 0,3	176 ± 2	0,693 ± 0,008	69 ± 3
T2	4,05	1869 ± 198	1,33 ± 0,04	132 ± 2	0,69 ± 0,01	133 ± 3
T3	4,13	2618 ± 210	6,7 ± 0,1	159,7 ± 0,1	0,605 ± 0,001	112,4 ± 0,4
T4	4,09	2050 ± 18	1,30 ± 0,07	119 ± 1	0,71 ± 0,02	143 ± 2
T5	4,12	379 ± 20	32,4 ± 0,5	85,3 ± 0,7	2,39 ± 0,03	47,5 ± 0,3
T6	4,04	403 ± 21	3,8 ± 0,1	80 ± 2	1,63 ± 0,03	121 ± 2
T7	4,28	469 ± 25	20,8 ± 0,7	103 ± 3	1,58 ± 0,06	61 ± 1
T8	4,24	436 ± 19	4,2 ± 0,2	84 ± 2	1,73 ± 0,02	115 ± 3
S1	3,95	1938 ± 50	1,6 ± 0,2	101,4 ± 0,1	0,896 ± 0,008	70,9 ± 0,3
S2	3,96	2139 ± 58	1,9 ± 0,1	80,2 ± 0,8	1,09 ± 0,03	66 ± 2
S3	3,97	1698 ± 42	1,93 ± 0,09	71,6 ± 0,8	1,15 ± 0,02	58,8 ± 0,9
S4	3,78	1481 ± 21	2,0 ± 0,1	61,5 ± 0,8	0,76 ± 0,02	66 ± 1
S5	3,94	466 ± 14	2,98 ± 0,02	86 ± 1	1,60 ± 0,01	99 ± 2
S6	3,73	353 ± 21	3,4 ± 0,3	82 ± 3	1,01 ± 0,03	72 ± 2
S7	3,77	374 ± 9	3,4 ± 0,2	81 ± 2	1,08 ± 0,03	94,0 ± 0,3
S8	3,77	363 ± 22	3,4 ± 0,1	78,4 ± 0,9	1,06 ± 0,03	73 ± 2
Vd1	3,41	5175 ± 396	22,9 ± 0,2	54 ± 1	0,552 ± 0,001	57 ± 5
Vd2	3,56	3207 ± 329	24,6 ± 0,2	59 ± 1	0,579 ± 0,008	83,9 ± 0,8
Vd3	3,39	3977 ± 215	23,2 ± 0,9	56 ± 2	0,55 ± 0,01	66 ± 1
Vd4	3,61	496 ± 39	19,2 ± 0,1	56 ± 2	0,634 ± 0,009	52,8 ± 0,5
Vd5	3,42	598 ± 7	24,25 ± 0,08	46,3 ± 0,3	0,655 ± 0,001	48,0 ± 0,5
Vd6	3,61	697 ± 9	21 ± 7	35 ± 16	0,6 ± 0,2	47 ± 7
Vd7	3,40	201 ± 3	31,3 ± 0,4	41,1 ± 0,4	0,676 ± 0,002	47,2 ± 0,1
Vg1	3,75	4705 ± 435	17,3 ± 0,2	83 ± 2	0,699 ± 0,009	58,9 ± 0,1
Vg2	3,40	501 ± 30	19,9 ± 0,6	57 ± 2	0,62 ± 0,01	53,0 ± 0,2
Vg3	3,77	584 ± 16	19,80 ± 0,08	64,5 ± 0,9	0,92 ± 0,01	36,5 ± 0,2
Vg4	3,40	408 ± 25	29,2 ± 0,2	46,6 ± 0,2	0,770 ± 0,004	59 ± 1
Vg5	3,77	212 ± 6	26,3 ± 0,6	59,5 ± 0,9	0,98 ± 0,01	36,9 ± 0,5
Vg6	3,38	200 ± 5	25 ± 1	54 ± 2	0,65 ± 0,02	55 ± 1
Vg7	3,77	210 ± 3	26,0 ± 0,4	59,0 ± 0,7	0,984 ± 0,007	36,1 ± 0,1
Vg8	3,39	173 ± 5	22,3 ± 0,3	49,7 ± 0,6	0,603 ± 0,004	50,8 ± 0,3

a: valor ± 0,02; b: mg L<sup>-1</sup>; c: g L<sup>-1</sup>.

Tabela B 2: Teores e respectivos desvios-padrão, de pH e elementos majoritários em amostras de vinhos tintos comerciais do Vale do São Francisco.

	pH <sup>a</sup>	B 249,677 <sup>b</sup>	Na 589,592 <sup>b</sup>	Mg 280,271 <sup>b</sup>	K 766,490 <sup>c</sup>	Ca 317,933 <sup>b</sup>
V1	3,91	43 ± 2	15,1 ± 0,4	72 ± 1	1,65 ± 0,04	77 ± 4
V2	3,87	693 ± 45	13,4 ± 0,3	110 ± 3	2,14 ± 0,03	118 ± 2
V3	3,81	703 ± 6	21,0 ± 0,1	141 ± 1	1,909 ± 0,003	86,9 ± 0,3
V4	3,81	732 ± 12	20,9 ± 0,1	141 ± 2	1,914 ± 0,004	85,7 ± 0,3
V5	3,73	933 ± 31	19,6 ± 0,3	102 ± 3	1,38 ± 0,03	77,7 ± 0,6
V6	3,83	1347 ± 10	11,78 ± 0,02	104,0 ± 0,1	1,697 ± 0,009	112,8 ± 0,5
V7	3,73	8,9 ± 0,5	21,7 ± 0,6	106 ± 5	1,69 ± 0,05	92 ± 1
V8	3,72	8,8 ± 0,2	22,24 ± 0,09	101 ± 1	1,77 ± 0,02	88,8 ± 0,5
V9	3,79	11,1 ± 0,4	23,0 ± 0,8	136 ± 2	2,41 ± 0,03	68,8 ± 0,7
V10	3,80	10,60 ± 0,05	23,7 ± 0,2	131 ± 4	2,36 ± 0,03	68,5 ± 0,3
V11	3,79	9,2 ± 0,5	66 ± 3	395 ± 24	1,6 ± 0,1	20,4 ± 0,8
V12	3,79	8,2 ± 0,2	69 ± 2	395 ± 28	1,62 ± 0,02	21,3 ± 0,4
V13	3,72	11,2 ± 0,1	72 ± 4	260 ± 8	1,68 ± 0,07	62 ± 2
V14	3,72	7,3 ± 0,4	57 ± 5	249 ± 12	1,2 ± 0,1	29 ± 3

a: valor ± 0,02; b: mg L<sup>-1</sup>; c: g L<sup>-1</sup>.

Tabela B 3: Teores e respectivos desvios-padrão de pH e elementos majoritários (n = 3) em amostras de vinhos tintos espanhóis com denominação de origem.

	pH <sup>a</sup>	B 249,677 <sup>b</sup>	Na 589,592 <sup>b</sup>	Mg 280,271 <sup>b</sup>	K 766,490 <sup>c</sup>	Ca 317,933 <sup>b</sup>
E6	3,49	357 ± 28	30,0 ± 0,3	97,5 ± 0,9	0,851 ± 0,008	49,3 ± 0,4
E7	3,50	288 ± 3	30,8 ± 0,5	98 ± 1	0,876 ± 0,005	49,4 ± 0,5
E8	3,50	290 ± 2	32,2 ± 0,6	96,0 ± 0,9	0,898 ± 0,002	49,5 ± 0,8
E9	3,51	138 ± 20	28 ± 1	96 ± 5	0,74 ± 0,03	44 ± 3
E10	3,50	105 ± 2	30 ± 1	98 ± 3	0,77 ± 0,02	45 ± 2
E11	3,51	104 ± 9	29,3 ± 0,6	96 ± 2	0,78 ± 0,02	43 ± 1
E12	3,65	98 ± 4	20,8 ± 0,4	89 ± 2	0,95 ± 0,03	48 ± 1
E13	3,64	105 ± 5	18,6 ± 0,7	87,2 ± 0,6	0,936 ± 0,002	48 ± 2
E14	3,64	90 ± 3	18,7 ± 0,2	89,7 ± 0,7	0,952 ± 0,001	49 ± 1
E15	3,66	96 ± 7	19 ± 1	91 ± 5	0,96 ± 0,04	51,3 ± 0,6
E16	3,65	81 ± 1	20,1 ± 0,8	94 ± 1	0,991 ± 0,005	52,7 ± 0,6
E17	3,66	92 ± 8	17,78 ± 0,03	88,3 ± 0,8	0,941 ± 0,008	51,1 ± 0,8
E18	3,61	0,77 ± 0,02	35,3 ± 0,4	173 ± 2	1,382 ± 0,005	131 ± 2
E19	3,61	12,2 ± 0,2	36,4 ± 0,6	151 ± 2	1,69 ± 0,03	103,2 ± 0,4

a: valor ± 0,02; b: mg L<sup>-1</sup>; c: g L<sup>-1</sup>.

Tabela B 4: Teores e respectivos desvios-padrão (em mg L<sup>-1</sup>, n = 3) dos elementos minoritários nas amostras de vinhos varietais, tintos e brancos, elaborados no Vale do São Francisco.

	Al 396,153	Mn 259,372	Fe 238,204	Ni 221,648	Sr 421,552	Zn 213,857
T1	0,267 ± 0,005	1,04 ± 0,09	2,5 ± 0,2	0,27 ± 0,01	1,26 ± 0,01	1,12 ± 0,02
T2	0,19 ± 0,01	1,20 ± 0,06	3,2 ± 0,1	0,152 ± 0,005	1,17 ± 0,01	0,65 ± 0,02
T3	0,273 ± 0,008	2,98 ± 0,04	3,134 ± 0,008	0,325 ± 0,002	0,96 ± 0,01	1,05 ± 0,03
T4	0,167 ± 0,004	1,22 ± 0,02	3,19 ± 0,06	0,129 ± 0,001	1,022 ± 0,005	0,599 ± 0,003
T5	0,226 ± 0,007	0,560 ± 0,007	0,98 ± 0,02	0,161 ± 0,008	0,435 ± 0,006	1,286 ± 0,004
T6	0,16 ± 0,01	1,14 ± 0,02	2,48 ± 0,06	0,14 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,77 ± 0,03
T7	0,220 ± 0,002	1,02 ± 0,03	2,1 ± 0,2	0,27 ± 0,01	0,399 ± 0,006	1,292 ± 0,008
T8	0,16 ± 0,01	1,17 ± 0,03	2,53 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,46 ± 0,01	0,76 ± 0,02
S1	0,184 ± 0,005	0,55 ± 0,01	1,63 ± 0,04	0,251 ± 0,001	0,84 ± 0,02	0,535 ± 0,007
S2	0,229 ± 0,006	0,53 ± 0,03	2,10 ± 0,06	0,250 ± 0,007	0,705 ± 0,009	0,69 ± 0,03
S3	0,189 ± 0,002	0,47 ± 0,01	1,76 ± 0,02	0,228 ± 0,005	0,636 ± 0,002	0,640 ± 0,008
S4	0,127 ± 0,002	1,42 ± 0,05	1,51 ± 0,02	0,274 ± 0,006	0,603 ± 0,004	0,587 ± 0,009
S5	0,137 ± 0,002	0,75 ± 0,01	2,1 ± 0,1	0,36 ± 0,01	0,383 ± 0,007	3,767 ± 0,002
S6	0,102 ± 0,003	2,28 ± 0,05	2,51 ± 0,04	0,33 ± 0,02	0,383 ± 0,004	1,48 ± 0,04
S7	0,121 ± 0,001	2,274 ± 0,005	2,44 ± 0,02	0,450 ± 0,007	0,38 ± 0,01	4,2 ± 0,1
S8	0,105 ± 0,009	2,22 ± 0,06	2,40 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,363 ± 0,008	1,47 ± 0,02
Vd1	0,44 ± 0,01	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,312 ± 0,004	0,518 ± 0,008	0,54 ± 0,01
Vd2	0,443 ± 0,006	2,45 ± 0,03	1,39 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,624 ± 0,007	0,219 ± 0,005
Vd3	0,45 ± 0,02	2,33 ± 0,04	1,79 ± 0,03	0,316 ± 0,004	0,54 ± 0,01	0,58 ± 0,05
Vd4	0,303 ± 0,002	0,77 ± 0,02	0,417 ± 0,007	0,121 ± 0,007	0,374 ± 0,004	0,372 ± 0,004
Vd5	0,462 ± 0,006	1,34 ± 0,01	0,793 ± 0,005	0,204 ± 0,003	0,394 ± 0,002	0,507 ± 0,002
Vd6	0,473 ± 0,004	1,1 ± 0,2	0,46 ± 0,06	0,110 ± 0,008	0,47 ± 0,02	0,172 ± 0,002
Vd7	0,484 ± 0,005	1,565 ± 0,002	0,866 ± 0,003	0,155 ± 0,009	0,384 ± 0,006	0,415 ± 0,008
Vg1	0,590 ± 0,008	1,282 ± 0,002	1,354 ± 0,009	0,353 ± 0,003	0,369 ± 0,004	0,16 ± 0,01
Vg2	0,35 ± 0,02	0,789 ± 0,003	0,450 ± 0,001	0,134 ± 0,001	0,383 ± 0,008	0,41 ± 0,01
Vg3	0,56 ± 0,05	0,599 ± 0,001	0,56 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,287 ± 0,005	0,14 ± 0,01
Vg4	0,472 ± 0,004	1,28 ± 0,03	0,512 ± 0,008	0,126 ± 0,001	0,498 ± 0,006	0,161 ± 0,001
Vg5	0,661 ± 0,008	0,737 ± 0,009	0,551 ± 0,009	0,155 ± 0,007	0,290 ± 0,008	0,121 ± 0,005
Vg6	0,359 ± 0,009	0,99 ± 0,03	0,53 ± 0,02	0,084 ± 0,007	0,39 ± 0,01	0,358 ± 0,006
Vg7	0,676 ± 0,005	0,709 ± 0,003	0,630 ± 0,001	0,155 ± 0,008	0,289 ± 0,003	0,108 ± 0,003
Vg8	0,345 ± 0,008	0,94 ± 0,01	0,504 ± 0,001	0,079 ± 0,009	0,366 ± 0,009	0,326 ± 0,004

Tabela B 5: Teores e respectivos desvios-padrão (em mg L<sup>-1</sup>, n = 3) dos elementos minoritários nas amostras de vinhos comerciais elaborados no Vale do São Francisco.

	Al 396,153	Mn 259,372	Fe 238,204	Ni 221,648	Sr 421,552	Zn 213,857
V1	0,288 ± 0,006	0,893 ± 0,001	0,503 ± 0,002	0,211 ± 0,003	0,929 ± 0,008	0,95 ± 0,01
V2	0,19 ± 0,01	2,47 ± 0,03	2,05 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,72 ± 0,02
V3	0,315 ± 0,004	1,032 ± 0,004	4,20 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,584 ± 0,008	0,21 ± 0,02
V4	0,318 ± 0,003	1,009 ± 0,005	4,10 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,596 ± 0,007	0,181 ± 0,003
V5	0,302 ± 0,008	1,266 ± 0,009	1,68 ± 0,06	0,188 ± 0,004	0,43 ± 0,01	0,247 ± 0,007
V6	0,60 ± 0,01	1,193 ± 0,007	2,90 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,47 ± 0,01	0,305 ± 0,002
V7	0,342 ± 0,002	1,18 ± 0,06	1,521 ± 0,006	0,267 ± 0,009	0,515 ± 0,008	0,284 ± 0,001
V8	0,342 ± 0,009	1,09 ± 0,01	1,419 ± 0,008	0,259 ± 0,007	0,522 ± 0,008	0,276 ± 0,006
V9	0,38 ± 0,01	0,95 ± 0,03	3,32 ± 0,01	0,370 ± 0,006	0,694 ± 0,004	0,196 ± 0,002
V10	0,40 ± 0,01	0,83 ± 0,09	3,24 ± 0,01	0,363 ± 0,004	0,688 ± 0,007	0,210 ± 0,005
V11	0,373 ± 0,008	0,43 ± 0,02	1,27 ± 0,03	1,6 ± 0,2	1,82 ± 0,06	0,93 ± 0,01
V12	0,38 ± 0,02	0,46 ± 0,02	1,27 ± 0,04	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,023 ± 0,009
V13	0,45 ± 0,02	0,80 ± 0,03	1,34 ± 0,03	1,12 ± 0,05	1,31 ± 0,02	0,451 ± 0,009
V14	0,32 ± 0,01	0,521 ± 0,008	0,50 ± 0,05	1,2 ± 0,3	1,65 ± 0,07	0,90 ± 0,08

Tabela B 6: Teores e respectivos desvios-padrão (em mg L<sup>-1</sup>, n = 3) dos elementos minoritários em amostras de vinhos tintos espanhóis com denominação de origem.

	Al 396,153	Mn 259,372	Fe 238,204	Ni 221,648	Sr 421,552	Zn 213,857
E6	0,44 ± 0,02	0,92 ± 0,01	1,82 ± 0,01	0,190 ± 0,009	1,05 ± 0,04	0,38 ± 0,01
E7	0,450 ± 0,004	0,931 ± 0,007	1,80 ± 0,02	0,190 ± 0,003	1,09 ± 0,01	0,389 ± 0,005
E8	0,46 ± 0,01	0,95 ± 0,01	1,79 ± 0,02	0,205 ± 0,003	1,11 ± 0,02	0,399 ± 0,007
E9	0,490 ± 0,004	0,717 ± 0,008	1,34 ± 0,02	0,335 ± 0,004	1,53 ± 0,03	0,500 ± 0,006
E10	0,562 ± 0,005	0,793 ± 0,005	1,21 ± 0,02	0,355 ± 0,004	1,65 ± 0,09	0,502 ± 0,002
E11	0,522 ± 0,001	0,67 ± 0,04	1,22 ± 0,06	0,33 ± 0,01	1,61 ± 0,06	0,509 ± 0,005
E12	0,560 ± 0,005	0,57 ± 0,03	2,25 ± 0,02	0,154 ± 0,001	1,053 ± 0,008	0,31 ± 0,02
E13	0,484 ± 0,006	0,54 ± 0,01	2,29 ± 0,05	0,156 ± 0,001	1,01 ± 0,01	0,36 ± 0,05
E14	0,50 ± 0,01	0,52 ± 0,02	2,037 ± 0,002	0,19 ± 0,03	0,99 ± 0,01	0,296 ± 0,007
E15	0,49 ± 0,03	0,48 ± 0,02	2,04 ± 0,08	0,146 ± 0,006	0,97 ± 0,01	0,33 ± 0,03
E16	0,50 ± 0,02	0,42 ± 0,02	1,77 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,98 ± 0,02	0,306 ± 0,002
E17	0,492 ± 0,005	0,43 ± 0,03	1,8 ± 0,1	0,142 ± 0,003	0,98 ± 0,04	0,316 ± 0,006
E18	0,73 ± 0,01	1,91 ± 0,03	3,36 ± 0,04	0,192 ± 0,008	1,36 ± 0,02	0,41 ± 0,02
E19	0,848 ± 0,002	1,70 ± 0,03	2,50 ± 0,04	0,265 ± 0,006	1,480 ± 0,005	0,431 ± 0,003

Tabela B 7: Teores e respectivos desvios-padrão (em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) dos elementos traços nas amostras de vinhos varietais, tintos e brancos, elaborados na região do Vale do São Francisco.

	Li 610,362	Ti 334,940	V 292,402	Cr 267,716	Co 238,892	Cu 324,752	Cd 228,802	Mo 202,031	Sb 206,836	Ba 493,408	Pb 220,353	Bi 223,061
T1	161 ± 26	5,2 ± 0,5	17,7 ± 0,5	385 ± 18	10,2 ± 0,2	102 ± 9	6,9 ± 0,3	38 ± 2	17 ± 1	77,1 ± 0,6	17,2 ± 0,5	91 ± 5
T2	88 ± 5	5,5 ± 0,2	15,5 ± 0,2	353 ± 10	15,8 ± 0,2	79 ± 3	6,5 ± 0,2	31,7 ± 0,5	13,2 ± 0,2	131,3 ± 0,6	ND	79 ± 1
T3	162 ± 10	11,4 ± 0,5	19 ± 2	449 ± 19	12,2 ± 0,3	161 ± 5	6,0 ± 0,3	41 ± 1	17,7 ± 0,4	84,6 ± 0,6	30 ± 1	89 ± 3
T4	7 ± 4	4,6 ± 0,5	10,6 ± 0,8	253 ± 16	15,7 ± 0,5	52 ± 4	8,7 ± 0,1	29,4 ± 0,7	ND	137,2 ± 0,8	ND	68 ± 1
T5	52,7 ± 0,6	3,8 ± 0,2	0,52 ± 0,09	48 ± 1	13,5 ± 0,1	17 ± 2	1,7 ± 0,5	7 ± 2	ND	127,5 ± 0,4	29,4 ± 0,4	10,1 ± 0,8
T6	30,0 ± 0,4	3,5 ± 0,3	4,5 ± 0,4	60 ± 3	17,4 ± 0,8	29 ± 6	3,2 ± 0,5	17,9 ± 0,8	ND	250 ± 4	ND	15,5 ± 0,8
T7	33 ± 1	2,6 ± 0,1	3,49 ± 0,03	74 ± 1	11,5 ± 0,3	16,2 ± 0,5	2,1 ± 0,2	13 ± 1	ND	150 ± 3	12 ± 2	18 ± 4
T8	29,7 ± 0,4	3,03 ± 0,05	3,8 ± 0,4	72,2 ± 0,1	18,1 ± 0,4	66 ± 4	2,2 ± 0,1	15,9 ± 0,9	ND	259 ± 5	ND	15 ± 2
S1	ND	1,80 ± 0,09	2,2 ± 0,6	148 ± 10	10,1 ± 0,3	394 ± 5	3,0 ± 0,4	18 ± 1	ND	127 ± 2	5,4 ± 0,5	43 ± 6
S2	ND	2,5 ± 0,3	1,7 ± 0,5	138 ± 13	13,9 ± 0,4	443 ± 11	1,97 ± 0,06	9,70 ± 0,07	ND	132 ± 4	6,5 ± 0,7	26,6 ± 0,6
S3	ND	1,13 ± 0,04	0,7 ± 0,1	87 ± 1	13,8 ± 0,1	373 ± 1	1,37 ± 0,06	9 ± 1	ND	130 ± 3	9,2 ± 0,4	26 ± 5
S4	ND	1,80 ± 0,02	0,7 ± 0,4	127,5 ± 0,4	14,8 ± 0,3	1805 ± 7	3,20 ± 0,03	7,43 ± 0,09	ND	124 ± 2	72 ± 1	13 ± 1
S5	22 ± 10	2,6 ± 0,3	4,2 ± 0,8	62 ± 2	12,0 ± 0,4	224 ± 19	2,50 ± 0,05	18 ± 2	ND	221 ± 3	ND	15,4 ± 0,9
S6	23,2 ± 0,6	3,1 ± 0,7	3,2 ± 0,1	83 ± 2	14,7 ± 0,6	61 ± 2	3,2 ± 0,5	16 ± 1	ND	213 ± 6	16,9 ± 0,6	14,3 ± 0,9
S7	29,1 ± 0,7	3,4 ± 0,3	2,8 ± 0,3	86,4 ± 0,4	14,7 ± 0,4	1422 ± 14	6,1 ± 0,3	24 ± 3	ND	221 ± 1	41,4 ± 0,1	37 ± 1
S8	24,3 ± 0,1	2,59 ± 0,09	3,0 ± 0,2	83 ± 1	13,7 ± 0,3	147 ± 6	3,3 ± 0,2	16,9 ± 0,4	ND	215 ± 4	14 ± 2	12 ± 2
Vd1	39 ± 1	2,64 ± 0,05	12,5 ± 0,9	5 ± 1	12,1 ± 0,2	10,2 ± 0,5	1,5 ± 0,3	8,9 ± 0,5	3 ± 1	157 ± 10	ND	22 ± 3
Vd2	46,0 ± 0,2	3,4 ± 0,2	12,1 ± 0,2	ND	9,0 ± 0,4	ND	0,86 ± 0,01	27 ± 3	3 ± 1	230 ± 5	ND	143 ± 30
Vd3	39,8 ± 0,6	3,1 ± 0,4	13,0 ± 0,3	3,1 ± 0,9	12,9 ± 0,2	ND	1,3 ± 0,1	4,9 ± 0,9	3 ± 1	165 ± 2	ND	7,9 ± 0,9
Vd4	37,9 ± 0,4	0,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1	10,62 ± 0,06	8,3 ± 0,1	4,47 ± 0,04	1,2 ± 0,5	12 ± 2	ND	101,9 ± 0,7	ND	46 ± 5
Vd5	31 ± 1	1,3 ± 0,1	2,51 ± 0,03	7,4 ± 0,2	8,9 ± 0,4	21 ± 1	1,6 ± 0,3	5,4 ± 0,2	ND	94,7 ± 0,3	ND	24 ± 2
Vd6	39,79 ± 0,05	0,6 ± 0,1	3 ± 1	12 ± 4	6,1 ± 0,4	10 ± 1	ND	17 ± 5	ND	125 ± 14	14 ± 2	30 ± 6
Vd7	77 ± 2	5,8 ± 0,2	3,1 ± 0,6	12,7 ± 0,1	4,4 ± 0,2	9 ± 1	2,0 ± 0,2	14 ± 3	ND	102,9 ± 0,3	17 ± 3	37 ± 12
Vg1	29,3 ± 0,3	5,0 ± 0,3	17,4 ± 0,5	18,6 ± 0,4	9,43 ± 0,05	ND	1,1 ± 0,1	22 ± 6	ND	244 ± 1	ND	74 ± 15
Vg2	37,5 ± 0,5	0,56 ± 0,09	1,92 ± 0,09	10,4 ± 0,2	8,2 ± 0,7	3,0 ± 0,6	0,9 ± 0,1	9 ± 1	ND	100,3 ± 0,4	ND	35 ± 1
Vg3	27,8 ± 0,5	1,7 ± 0,5	4,0 ± 0,3	19,7 ± 0,6	8 ± 2	ND	0,8 ± 0,1	7,5 ± 0,2	ND	136,0 ± 0,1	5 ± 2	25 ± 1
Vg4	39 ± 1	0,63 ± 0,02	2,1 ± 0,2	18 ± 1	5,3 ± 0,4	ND	0,87 ± 0,02	6,0 ± 0,5	ND	137 ± 2	11 ± 3	25 ± 1
Vg5	69 ± 3	5,64 ± 0,08	3,9 ± 0,1	17,2 ± 0,5	1,2 ± 0,3	17,6 ± 0,3	0,91 ± 0,03	6,74 ± 0,03	ND	143 ± 2	11 ± 1	14 ± 2
Vg6	93 ± 2	5,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1	10,5 ± 0,4	4,6 ± 0,2	ND	1,1 ± 0,1	10 ± 2	ND	107 ± 3	6 ± 1	26 ± 9
Vg7	70,1 ± 0,5	5,61 ± 0,09	5,0 ± 0,3	18,13 ± 0,06	1,5 ± 0,2	ND	ND	5,0 ± 0,3	ND	135,0 ± 0,8	7,6 ± 0,1	15 ± 5
Vg8	92 ± 3	4,9 ± 0,1	1,52 ± 0,06	10,1 ± 0,3	4,0 ± 0,1	ND	ND	4,1 ± 0,3	ND	96 ± 1	ND	12 ± 3

Concentrações de amostras marcadas em azul indicam que o valor se encontra entre o LOD e o LOQ ( $\text{LOD} < X < \text{LOQ}$ ).

Tabela B 8: Teores e respectivos desvios-padrão (em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) dos elementos traços nas amostras de vinhos comerciais elaborados na região do Vale do São Francisco.

	Li 610,362	Ti 334,940	V 292,402	Cr 267,716	Co 238,892	Cu 324,752	Cd 228,802	Mo 202,031	Sb 206,836	Ba 493,408	Pb 220,353	Bi 223,061
V1	74,1 ± 0,4	5,6 ± 0,2	8,3 ± 0,5	152,1 ± 0,7	25 ± 1	45 ± 2	1,8 ± 0,3	27,5 ± 0,4	64 ± 5	266 ± 3	31 ± 1	12 ± 1
V2	8 ± 2	9,1 ± 0,2	45,9 ± 0,2	9,7 ± 0,6	6,1 ± 0,3	37 ± 1	2,4 ± 0,3	22,6 ± 0,8	ND	460 ± 7	10,2 ± 0,9	49 ± 4
V3	ND	46,3 ± 0,3	266 ± 2	9,4 ± 0,2	8,8 ± 0,4	42 ± 1	2,0 ± 0,3	37,4 ± 0,8	ND	497 ± 1	12 ± 1	42 ± 5
V4	ND	50 ± 2	264 ± 2	8,8 ± 0,2	8,9 ± 0,1	45 ± 5	4,0 ± 0,2	58 ± 4	ND	490 ± 5	13,7 ± 0,6	106 ± 23
V5	ND	13,7 ± 0,4	12,6 ± 0,3	8,3 ± 0,2	6,6 ± 0,3	73 ± 1	2,1 ± 0,4	22 ± 2	ND	293 ± 3	9 ± 2	32 ± 3
V6	ND	14 ± 1	50,1 ± 0,3	10,7 ± 0,2	9,4 ± 0,3	118 ± 3	1,51 ± 0,02	29 ± 1	ND	340 ± 2	11,6 ± 0,2	42 ± 1
V7	69,5 ± 0,4	2,89 ± 0,07	11,3 ± 0,6	19 ± 3	7,5 ± 0,2	81 ± 1	3,3 ± 0,4	24 ± 1	33 ± 2	452 ± 13	12 ± 6	91 ± 40
V8	70,3 ± 0,6	3,4 ± 0,1	11,1 ± 0,7	15 ± 1	8,55 ± 0,05	83,5 ± 0,3	3,3 ± 0,5	16,6 ± 0,5	17 ± 2	364 ± 17	6 ± 1	29 ± 3
V9	59 ± 1	37,7 ± 0,4	255 ± 1	21,6 ± 0,6	9,7 ± 0,2	45,1 ± 0,8	4,0 ± 0,2	27 ± 1	13,1 ± 0,3	500 ± 5	12 ± 4	34 ± 8
V10	58,0 ± 0,4	37,6 ± 0,1	250,9 ± 0,8	22,9 ± 0,3	9,2 ± 0,4	46,7 ± 0,6	4,0 ± 0,4	30 ± 2	17 ± 3	496 ± 2	4,8 ± 0,2	22 ± 5
V11	93 ± 1	11 ± 2	209 ± 28	341 ± 41	276 ± 21	54 ± 10	37 ± 6	214 ± 13	891 ± 356	415 ± 49	2954 ± 162	182 ± 17
V12	88 ± 2	7,8 ± 0,5	282 ± 7	147 ± 12	166,5 ± 0,2	61 ± 13	36 ± 9	497 ± 66	1469 ± 596	433 ± 60	2670 ± 1021	362 ± 24
V13	76,0 ± 0,9	ND	161 ± 8	273 ± 20	77 ± 4	137 ± 8	21,5 ± 0,6	536 ± 66	259 ± 84	510 ± 18	799 ± 305	519 ± 5
V14	86 ± 3	ND	109 ± 17	410 ± 203	128 ± 38	93 ± 6	39 ± 3	545 ± 120	1011 ± 441	275 ± 25	3027 ± 709	244 ± 29

Concentrações de amostras marcadas em azul indicam que o valor se encontra entre o LOD e o LOQ ( $\text{LOD} < X < \text{LOQ}$ ).Tabela B 9: Teores e respectivos desvios-padrão (em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) dos elementos traços em amostras de vinhos tintos espanhóis com denominação de origem.

	Li 610,362	Ti 334,940	V 292,402	Cr 267,716	Co 238,892	Cu 324,752	Cd 228,802	Mo 202,031	Sb 206,836	Ba 493,708	Pb 220,353	Bi 223,061
E6	169 ± 5	35 ± 1	73 ± 1	21,7 ± 0,6	ND	21 ± 1	0,9 ± 0,4	14 ± 2	12 ± 1	63,3 ± 0,8	4,5 ± 0,5	29 ± 6
E7	177,8 ± 0,4	35,3 ± 0,1	76,1 ± 0,5	21,7 ± 0,5	1,32 ± 0,04	23,4 ± 0,6	ND	10,5 ± 0,4	15 ± 1	64,3 ± 0,6	12 ± 1	18 ± 3
E8	177 ± 2	36,1 ± 0,5	78,0 ± 0,7	22,7 ± 0,4	1,1 ± 0,2	32 ± 3	1,5 ± 0,2	18 ± 2	15,0 ± 0,8	65 ± 1	30,6 ± 0,9	23 ± 9
E9	151 ± 2	28,0 ± 0,1	64,1 ± 0,8	8,5 ± 0,1	13,7 ± 0,5	27,6 ± 0,8	4,3 ± 0,4	38 ± 4	33 ± 3	70,0 ± 0,6	14 ± 1	26 ± 2
E10	146 ± 1	26,62 ± 0,09	59,2 ± 0,2	8,6 ± 0,2	13,6 ± 0,1	27,9 ± 0,5	2,5 ± 0,1	29,9 ± 0,8	42 ± 5	70,6 ± 0,3	16,7 ± 0,9	15 ± 2
E11	144 ± 3	27,1 ± 0,9	60 ± 2	8,7 ± 0,1	15,6 ± 0,5	27,6 ± 0,9	3,1 ± 0,5	38 ± 5	39 ± 11	67 ± 2	4 ± 2	26 ± 2
E12	77,3 ± 0,4	8,2 ± 0,1	32,6 ± 0,2	8,8 ± 0,3	16,6 ± 0,4	56 ± 5	0,9 ± 0,1	31 ± 3	43,7 ± 0,7	83 ± 1	11,6 ± 0,9	16 ± 2
E13	77 ± 1	8,6 ± 0,2	33 ± 1	8,5 ± 0,2	18,1 ± 0,5	60 ± 5	1,8 ± 0,2	32 ± 3	44 ± 9	79 ± 2	8,6 ± 0,2	25 ± 5
E14	76,2 ± 0,8	7,9 ± 0,1	30,1 ± 0,4	8,5 ± 0,3	21 ± 1	51 ± 2	1,5 ± 0,2	31,7 ± 0,2	48 ± 4	76 ± 2	6 ± 1	12 ± 2
E15	77,6 ± 0,6	8,2 ± 0,3	29 ± 2	8,7 ± 0,1	17 ± 1	61 ± 7	1,2 ± 0,3	28 ± 1	43 ± 4	74 ± 3	14,9 ± 0,5	21 ± 4
E16	75,3 ± 0,7	7,2 ± 0,2	25,2 ± 0,5	9,0 ± 0,2	22,1 ± 0,3	53 ± 2	0,8 ± 0,2	25 ± 3	50 ± 7	68 ± 3	22 ± 1	14,0 ± 0,7
E17	76,5 ± 0,7	7,3 ± 0,4	24 ± 2	9,0 ± 0,3	18 ± 1	56 ± 1	1,7 ± 0,5	28 ± 1	53 ± 21	70 ± 4	7 ± 1	25 ± 4
E18	22 ± 5	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	8,0 ± 0,2	22 ± 3	1,8 ± 0,4	16,6 ± 0,8	ND	189 ± 5	26 ± 3	37 ± 8
E19	94,1 ± 0,9	ND	2,5 ± 0,2	24,6 ± 0,7	6,4 ± 0,7	36,9 ± 0,3	3,6 ± 0,1	14 ± 2	17 ± 4	195,2 ± 0,6	16,9 ± 0,9	40 ± 13

Concentrações de amostras marcadas em azul indicam que o valor se encontra entre o LOD e o LOQ ( $\text{LOD} < X < \text{LOQ}$ ).

Tabela B 10: Teores e respectivos desvios-padrão (em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) dos lantanídeos nas amostras de vinhos varietais, tintos e brancos, elaborados na região do Vale do São Francisco.

	Sc 361,383	Y 371,099	La 408,672	Ce 413,764	Pr 390,844	Nd 401,225	Sm 442,434	Eu 381,967	Gd 342,247	Tb 350,917	Dy 353,170	Ho 345,600	Er 337,271	Tm 346,220	Yb 328,937	Lu 261,542
T1	0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1	6 ± 2	96 ± 4	49 ± 7	23 ± 3	149 ± 32	3,2 ± 0,3	24 ± 3	12 ± 2	2,58 ± 0,02	<b>1,09 ± 0,04</b>	21 ± 3	<b>0,56 ± 0,02</b>	0,22 ± 0,01	1,36 ± 0,02
T2	<b>0,35 ± 0,04</b>	1,74 ± 0,08	5,2 ± 0,2	77 ± 1	52 ± 2	18,3 ± 0,5	146 ± 3	3,6 ± 0,1	20,0 ± 0,6	7,5 ± 0,8	3,18 ± 0,03	1,42 ± 0,05	17 ± 1	ND	0,9 ± 0,1	1,09 ± 0,04
T3	0,7 ± 0,2	2,4 ± 0,2	5,8 ± 0,7	106 ± 4	71 ± 5	26 ± 1	206 ± 16	7,2 ± 0,3	25,1 ± 0,1	13,7 ± 0,5	5,1 ± 0,2	1,03 ± 0,07	32 ± 2	ND	0,82 ± 0,03	1,0 ± 0,5
T4	<b>0,3 ± 0,1</b>	1,15 ± 0,03	1,1 ± 0,2	50 ± 2	31 ± 3	9 ± 2	62 ± 3	3,6 ± 0,2	16 ± 3	4,8 ± 0,4	2,7 ± 0,2	1,47 ± 0,01	12 ± 1	ND	1,37 ± 0,03	0,94 ± 0,04
T5	0,75 ± 0,5	ND	<b>1,33 ± 0,05</b>	ND	ND	8,2 ± 0,3	1,3 ± 0,3	0,73 ± 0,04	ND	<b>1,1 ± 0,1</b>	3,32 ± 0,06	<b>0,91 ± 0,02</b>	ND	<b>0,57 ± 0,05</b>	ND	<b>0,33 ± 0,03</b>
T6	1,0 ± 0,1	2,61 ± 0,03	3,5 ± 0,2	ND	7 ± 1	44 ± 1	26,1 ± 0,6	<b>0,34 ± 0,07</b>	2,2 ± 0,2	ND	5,2 ± 0,1	<b>0,4 ± 0,2</b>	<b>2,6 ± 0,4</b>	2,5 ± 0,2	0,90 ± 0,05	<b>0,40 ± 0,07</b>
T7	1,2 ± 0,2	2,31 ± 0,08	3,6 ± 0,2	2,4 ± 0,5	1,9 ± 0,2	38,1 ± 0,8	20,0 ± 0,4	<b>0,247 ± 0,004</b>	1,7 ± 0,2	<b>1,08 ± 0,04</b>	4,6 ± 0,1	ND	<b>1,3 ± 0,1</b>	2,6 ± 0,1	0,46 ± 0,02	<b>0,41 ± 0,05</b>
T8	0,7 ± 0,1	2,5 ± 0,01	5,7 ± 0,5	4,1 ± 0,4	5,9 ± 0,8	42,1 ± 0,2	25,1 ± 0,8	<b>0,318 ± 0,002</b>	1,5 ± 0,2	ND	5,32 ± 0,08	ND	<b>1,6 ± 0,3</b>	2,6 ± 0,1	0,81 ± 0,03	<b>0,44 ± 0,02</b>
S1	<b>0,46 ± 0,03</b>	0,284 ± 0,01	ND	10,2 ± 0,8	7 ± 2	2,8 ± 0,6	ND	0,8 ± 0,1	7,0 ± 0,7	ND	<b>1,09 ± 0,01</b>	1,49 ± 0,03	3,6 ± 0,8	ND	0,82 ± 0,02	<b>0,62 ± 0,03</b>
S2	0,6 ± 0,2	0,201 ± 0,006	ND	7,9 ± 0,4	5,3 ± 0,2	<b>1,38 ± 0,06</b>	ND	<b>0,20 ± 0,05</b>	6,4 ± 0,5	ND	<b>0,94 ± 0,01</b>	1,30 ± 0,04	3,3 ± 0,7	ND	0,66 ± 0,02	<b>0,44 ± 0,01</b>
S3	<b>0,52 ± 0,07</b>	ND	ND	<b>5,01 ± 0,07</b>	<b>2,3 ± 0,4</b>	<b>0,9 ± 0,2</b>	ND	ND	4,7 ± 0,2	ND	<b>0,81 ± 0,04</b>	1,36 ± 0,04	ND	ND	0,46 ± 0,01	<b>0,35 ± 0,04</b>
S4	0,91 ± 0,04	ND	ND	<b>4,8 ± 0,2</b>	4,0 ± 0,2	<b>0,79 ± 0,05</b>	ND	ND	5,5 ± 0,3	ND	2,06 ± 0,03	1,32 ± 0,01	ND	ND	0,51 ± 0,02	<b>0,21 ± 0,01</b>
S5	1,2 ± 0,3	2,25 ± 0,08	3,1 ± 0,2	<b>2,0 ± 0,9</b>	3,15 ± 0,07	41 ± 1	23,8 ± 0,3	<b>0,24 ± 0,01</b>	1,3 ± 0,5	ND	3,3 ± 0,1	<b>0,44 ± 0,01</b>	<b>0,92 ± 0,06</b>	2,67 ± 0,08	0,66 ± 0,02	<b>0,49 ± 0,03</b>
S6	0,96 ± 0,08	2,39 ± 0,04	3,2 ± 0,4	5,37 ± 0,02	3,4 ± 0,6	41,6 ± 0,4	22 ± 2	<b>0,32 ± 0,07</b>	1,8 ± 0,2	<b>0,92 ± 0,01</b>	10,1 ± 0,3	ND	<b>1,6 ± 0,4</b>	2,71 ± 0,09	0,558 ± 0,009	<b>0,4 ± 0,1</b>
S7	2,8 ± 0,4	2,3 ± 0,01	3,5 ± 0,4	<b>2,4 ± 0,4</b>	5,7 ± 0,2	41,9 ± 0,6	24 ± 1	<b>0,24 ± 0,03</b>	1,4 ± 0,3	ND	10,34 ± 0,09	ND	ND	2,87 ± 0,09	0,62 ± 0,03	<b>0,34 ± 0,02</b>
S8	1,2 ± 0,3	2,17 ± 0,07	3,2 ± 0,2	5,0 ± 0,2	<b>2,5 ± 0,7</b>	39,8 ± 0,5	22,3 ± 0,8	<b>0,31 ± 0,03</b>	0,89 ± 0,05	<b>0,81 ± 0,04</b>	10,2 ± 0,2	ND	ND	2,63 ± 0,06	0,46 ± 0,02	<b>0,40 ± 0,01</b>
Vd1	1,6 ± 0,3	0,78 ± 0,04	1,9 ± 0,2	31,0 ± 0,3	<b>0,8 ± 0,3</b>	<b>1,20 ± 0,06</b>	4,7 ± 0,6	ND	ND	ND	8,2 ± 0,5	<b>0,39 ± 0,06</b>	ND	1,9 ± 0,1	0,482 ± 0,004	ND
Vd2	3,7 ± 0,9	0,89 ± 0,04	3,45 ± 0,09	39,9 ± 0,7	2,8 ± 0,7	<b>1,83 ± 0,04</b>	6,9 ± 0,6	ND	ND	ND	9,0 ± 0,1	<b>0,39 ± 0,05</b>	ND	2,4 ± 0,1	0,60 ± 0,01	ND
Vd3	0,8 ± 0,1	1,05 ± 0,02	4,1 ± 0,5	32,7 ± 0,5	<b>2,1 ± 0,6</b>	<b>0,96 ± 0,02</b>	5,6 ± 0,6	ND	ND	ND	8,64 ± 0,07	ND	ND	2,3 ± 0,2	0,538 ± 0,008	ND
Vd4	0,9 ± 0,2	0,06 ± 0,01	<b>1,1 ± 0,1</b>	<b>2,1 ± 0,2</b>	<b>0,8 ± 0,1</b>	ND	ND	ND	ND	1,0 ± 0,2	3,3 ± 0,1	ND	ND	<b>0,22 ± 0,02</b>	<b>0,11 ± 0,01</b>	1,25 ± 0,02
Vd5	<b>0,52 ± 0,02</b>	0,44 ± 0,02	<b>1,2 ± 0,1</b>	<b>3,2 ± 0,3</b>	<b>1,4 ± 0,2</b>	<b>1,2 ± 0,1</b>	ND	ND	ND	1,2 ± 0,1	5,50 ± 0,07	ND	ND	<b>0,24 ± 0,02</b>	<b>0,19 ± 0,02</b>	1,46 ± 0,02
Vd6	1,0 ± 0,3	0,16 ± 0,08	<b>1,6 ± 0,7</b>	<b>3,8 ± 0,3</b>	4 ± 2	5,2 ± 0,1	3,7 ± 0,1	ND	<b>1,1 ± 0,8</b>	0,9 ± 0,4	4,8 ± 0,4	<b>0,6 ± 0,3</b>	10 ± 6	<b>0,5 ± 0,3</b>	0,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Vd7	0,9 ± 0,2	0,793 ± 0,008	ND	8,4 ± 0,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,89 ± 0,07	<b>0,79 ± 0,04</b>	<b>0,86 ± 0,08</b>	1,1 ± 0,1	ND	ND
Vg1	2,3 ± 0,7	4,33 ± 0,03	5,3 ± 0,2	40,7 ± 0,7	5,8 ± 0,8	2,9 ± 0,3	9,1 ± 0,6	ND	ND	ND	5,49 ± 0,06	ND	ND	2,49 ± 0,07	0,86 ± 0,02	ND
Vg2	0,8 ± 0,2	0,07 ± 0,02	<b>1,1 ± 0,1</b>	<b>3,7 ± 0,3</b>	<b>1,0 ± 0,2</b>	<b>0,8 ± 0,1</b>	ND	ND	ND	1,0 ± 0,2	3,32 ± 0,04	ND	ND	<b>0,289 ± 0,001</b>	<b>0,12 ± 0,01</b>	1,27 ± 0,04
Vg3	0,74 ± 0,07	1,75 ± 0,07	<b>0,84 ± 0,02</b>	<b>2 ± 1</b>	<b>1,50 ± 0,03</b>	3 ± 1	3,5 ± 0,3	ND	ND	1,65 ± 0,04	2,84 ± 0,02	ND	ND	<b>0,26 ± 0,01</b>	0,454 ± 0,006	1,4 ± 0,1
Vg4	<b>0,52 ± 0,01</b>	0,15 ± 0,07	<b>0,96 ± 0,05</b>	<b>2,9 ± 0,4</b>	7 ± 1	<b>2 ± 1</b>	2,1 ± 0,1	ND	ND	0,57 ± 0,07	5,36 ± 0,08	ND	ND	<b>0,28 ± 0,02</b>	<b>0,209 ± 0,007</b>	1,46 ± 0,09
Vg5	<b>0,474 ± 0,007</b>	2,225 ± 0,008	ND	<b>5,9 ± 0,6</b>	ND	ND	ND	<b>0,22 ± 0,02</b>	ND	ND	2,36 ± 0,07	1,47 ± 0,09	2,9 ± 0,3	0,40 ± 0,02	0,354 ± 0,006	ND
Vg6	0,8 ± 0,2	<b>0,602 ± 0,003</b>	ND	8,5 ± 0,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,9 ± 0,1	<b>0,88 ± 0,02</b>	2,6 ± 0,1	ND	ND	ND
Vg7	<b>0,40 ± 0,06</b>	2,40 ± 0,03	ND	<b>2,5 ± 0,2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,45 ± 0,04	<b>1,16 ± 0,02</b>	3,6 ± 0,1	ND	0,45 ± 0,02	<b>0,202 ± 0,003</b>
Vg8	<b>0,26 ± 0,01</b>	<b>0,60 ± 0,02</b>	ND	<b>4 ± 1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,77 ± 0,03	<b>0,92 ± 0,01</b>	<b>2,0 ± 0,2</b>	ND	0,272 ± 0,008	ND

Concentrações de amostras marcadas em azul indicam que o valor se encontra entre o LOD e o LOQ ( $\text{LOD} < X < \text{LOQ}$ ).

Tabela B 11: Teores e respectivos desvios-padrão (em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) dos lantanídeos em amostras de vinhos tintos espanhóis com denominação de origem.

	Sc 361,383	Y 371,099	La 408,672	Ce 413,764	Pr 390,844	Nd 401,225	Sm 442,434	Eu 381,967	Gd 342,247	Tb 350,917	Dy 353,170	Ho 345,600	Er 337,271	Tm 346,220	Yb 328,937	Lu 261,542
E6	0,7 ± 0,2	<b>0,60 ± 0,01</b>	2,84 ± 0,07	1,7 ± 0,6	ND	0,15 ± 0,02	ND	<b>0,24 ± 0,04</b>	ND	ND	1,70 ± 0,09	ND	27,8 ± 0,5	0,61 ± 0,08	0,157 ± 0,009	ND
E7	<b>0,37 ± 0,05</b>	0,62 ± 0,02	<b>1,9 ± 0,3</b>	0,8 ± 0,2	ND	0,4 ± 0,1	ND	<b>0,17 ± 0,01</b>	ND	ND	1,81 ± 0,08	ND	28,5 ± 0,3	0,69 ± 0,02	0,167 ± 0,009	ND
E8	0,8 ± 0,2	0,67 ± 0,01	<b>0,84 ± 0,09</b>	1,7 ± 0,4	ND	0,26 ± 0,02	ND	ND	ND	ND	2,09 ± 0,09	ND	28,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,171 ± 0,009	<b>0,195 ± 0,03</b>
E9	0,70 ± 0,05	1,07 ± 0,02	2,7 ± 0,1	<b>2,24 ± 0,06</b>	ND	6,3 ± 0,7	1,4 ± 0,2	<b>0,52 ± 0,02</b>	<b>1,2 ± 0,1</b>	4,6 ± 0,7	<b>1,13 ± 0,07</b>	0,82 ± 0,07	21,9 ± 0,1	<b>0,489 ± 0,003</b>	0,68 ± 0,08	<b>0,613 ± 0,003</b>
E10	<b>0,45 ± 0,05</b>	1,08 ± 0,02	<b>1,9 ± 0,1</b>	<b>2,1 ± 0,4</b>	ND	3,6 ± 0,4	1,5 ± 0,1	<b>0,53 ± 0,02</b>	<b>1,4 ± 0,2</b>	3,9 ± 0,2	<b>1,14 ± 0,06</b>	0,67 ± 0,03	22,8 ± 0,2	<b>0,56 ± 0,03</b>	0,71 ± 0,02	<b>0,50 ± 0,04</b>
E11	0,64 ± 0,05	1,05 ± 0,08	<b>1,1 ± 0,1</b>	<b>5,6 ± 0,9</b>	ND	4,0 ± 0,6	1,7 ± 0,1	<b>0,47 ± 0,01</b>	<b>1,07 ± 0,03</b>	5,2 ± 0,7	<b>0,84 ± 0,05</b>	0,70 ± 0,02	22,9 ± 0,3	<b>0,46 ± 0,08</b>	0,66 ± 0,03	<b>0,42 ± 0,03</b>
E12	<b>0,39 ± 0,01</b>	0,88 ± 0,04	ND	<b>6,5 ± 0,4</b>	ND	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,2	<b>0,41 ± 0,01</b>	<b>2,2 ± 0,1</b>	3,88 ± 0,06	<b>0,8 ± 0,1</b>	0,77 ± 0,03	6,7 ± 0,2	<b>0,42 ± 0,03</b>	0,64 ± 0,02	<b>0,420 ± 0,003</b>
E13	0,8 ± 0,2	0,75 ± 0,02	ND	10,1 ± 0,8	ND	2,8 ± 0,3	1,90 ± 0,03	<b>0,33 ± 0,06</b>	<b>2,2 ± 0,3</b>	4,7 ± 0,6	<b>0,56 ± 0,01</b>	0,72 ± 0,04	6,3 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,58 ± 0,05	<b>0,41 ± 0,02</b>
E14	<b>0,36 ± 0,05</b>	0,61 ± 0,02	ND	8,0 ± 0,5	ND	<b>1,3 ± 0,3</b>	2,0 ± 0,1	<b>0,43 ± 0,04</b>	<b>2,7 ± 0,2</b>	3,8 ± 0,1	<b>0,59 ± 0,04</b>	0,75 ± 0,05	6,7 ± 0,2	<b>0,61 ± 0,08</b>	0,60 ± 0,03	<b>0,47 ± 0,01</b>
E15	0,8 ± 0,2	0,61 ± 0,03	ND	8 ± 2	ND	2,32 ± 0,04	1,8 ± 0,3	<b>0,3 ± 0,1</b>	<b>2,4 ± 0,4</b>	5 ± 1	<b>0,47 ± 0,03</b>	0,76 ± 0,01	6,6 ± 0,2	<b>0,60 ± 0,06</b>	0,49 ± 0,04	<b>0,41 ± 0,02</b>
E16	<b>0,33 ± 0,03</b>	0,62 ± 0,02	ND	<b>4,7 ± 0,2</b>	ND	ND	1,7 ± 0,2	<b>0,51 ± 0,09</b>	<b>2,0 ± 0,3</b>	3,3 ± 0,2	<b>0,53 ± 0,07</b>	0,77 ± 0,04	7,3 ± 0,3	<b>0,44 ± 0,04</b>	0,58 ± 0,04	<b>0,42 ± 0,01</b>
E17	0,7 ± 0,1	<b>0,34 ± 0,03</b>	ND	7 ± 1	ND	<b>0,9 ± 0,3</b>	1,5 ± 0,1	<b>0,32 ± 0,07</b>	<b>2,83 ± 0,08</b>	4,2 ± 0,6	ND	1,11 ± 0,05	7,5 ± 0,1	<b>0,55 ± 0,06</b>	0,45 ± 0,03	<b>0,45 ± 0,02</b>
E18	<b>0,41 ± 0,29</b>	1,07 ± 0,01	ND	<b>3,1 ± 0,6</b>	<b>1,1 ± 0,5</b>	ND	ND	ND	ND	ND	4,33 ± 0,07	1,29 ± 0,02	<b>1,64 ± 0,01</b>	0,88 ± 0,01	0,662 ± 0,004	<b>0,20 ± 0,01</b>
E19	<b>0,53 ± 0,02</b>	1,03 ± 0,02	ND	ND	ND	ND	42 ± 2	ND	ND	ND	2,93 ± 0,07	ND	<b>1,76 ± 0,06</b>	ND	0,58 ± 0,01	<b>0,44 ± 0,01</b>

Concentrações de amostras marcadas **em azul** indicam que o valor se encontra entre o LOD e o LOQ ( $\text{LOD} < X < \text{LOQ}$ ).

Tabela B 12: Teores e respectivos desvios-padrão (em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) dos lantanídeos em amostras de vinhos tintos comerciais do Vale do São Francisco.

	Sc 361,383	Y 371,099	La 408,672	Ce 413,764	Pr 390,844	Nd 401,225	Sm 442,434	Eu 381,967	Gd 342,247	Tb 350,917	Dy 353,170	Ho 345,600	Er 337,271	Tm 346,220	Yb 328,937	Lu 261,542
V1	<b>0,40 ± 0,03</b>	<b>0,46 ± 0,02</b>	ND	<b>4,6 ± 0,1</b>	ND	ND	2,92 ± 0,07	0,98 ± 0,04	0,67 ± 0,08	2,6 ± 0,2	2,2 ± 0,1	1,04 ± 0,04	7,3 ± 0,3	<b>0,22 ± 0,02</b>	0,56 ± 0,03	<b>0,31 ± 0,04</b>
V2	0,73 ± 0,40	0,51 ± 0,05	<b>1,42 ± 0,04</b>	ND	ND	<b>1,7 ± 0,2</b>	ND	ND	ND	ND	5,99 ± 0,08	<b>1,10 ± 0,09</b>	5,90 ± 0,07	0,9 ± 0,2	0,580 ± 0,007	<b>0,20 ± 0,01</b>
V3	1,3 ± 0,5	1,82 ± 0,01	<b>1,7 ± 0,1</b>	<b>4,8 ± 0,8</b>	<b>1,2 ± 0,1</b>	<b>1,19 ± 0,08</b>	ND	ND	ND	ND	2,31 ± 0,01	<b>1,09 ± 0,09</b>	24,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,708 ± 0,008	<b>0,28 ± 0,01</b>
V4	1,6 ± 0,6	1,82 ± 0,02	<b>1,4 ± 0,1</b>	<b>4,5 ± 0,5</b>	<b>1,4 ± 0,6</b>	<b>1,38 ± 0,06</b>	ND	ND	ND	ND	2,29 ± 0,01	<b>1,00 ± 0,06</b>	25,5 ± 0,3	0,9 ± 0,1	0,731 ± 0,004	<b>0,30 ± 0,02</b>
V5	<b>0,22 ± 0,08</b>	<b>0,22 ± 0,05</b>	ND	<b>4,3 ± 0,3</b>	<b>2,23 ± 0,02</b>	ND	ND	ND	ND	ND	2,6 ± 0,1	<b>0,99 ± 0,04</b>	7,8 ± 0,1	0,78 ± 0,05	0,452 ± 0,002	ND
V6	1,6 ± 0,5	1,34 ± 0,01	<b>1,5 ± 0,1</b>	<b>2,3 ± 0,4</b>	<b>2,4 ± 1,4</b>	<b>0,8 ± 0,2</b>	ND	ND	ND	ND	2,70 ± 0,06	<b>1,00 ± 0,04</b>	8,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,611 ± 0,001	<b>0,21 ± 0,01</b>
V7	<b>0,6 ± 0,2</b>	0,84 ± 0,02	3,19 ± 0,07	ND	ND	ND	37 ± 1	<b>0,30 ± 0,04</b>	<b>1,1 ± 0,1</b>	ND	1,49 ± 0,01	<b>1,10 ± 0,09</b>	6,58 ± 0,09	<b>0,25 ± 0,05</b>	0,474 ± 0,006	<b>0,34 ± 0,01</b>
V8	<b>0,20 ± 0,03</b>	0,85 ± 0,05	2,79 ± 0,01	ND	ND	0,6 ± 0,2	36,5 ± 0,5	<b>0,24 ± 0,02</b>	<b>1,06 ± 0,08</b>	ND	1,51 ± 0,04	<b>0,73 ± 0,07</b>	6,66 ± 0,05	0,71 ± 0,06	0,46 ± 0,03	<b>0,35 ± 0,02</b>
V9	0,7 ± 0,2	1,63 ± 0,09	<b>0,95 ± 0,06</b>	ND	ND	3,5 ± 0,3	30 ± 2	<b>0,18 ± 0,02</b>	ND	ND	<b>1,32 ± 0,06</b>	ND	18,6 ± 0,2	<b>0,22 ± 0,03</b>	0,63 ± 0,03	<b>0,60 ± 0,01</b>
V10	<b>0,38 ± 0,04</b>	1,57 ± 0,03	ND	ND	ND	3,5 ± 0,4	32 ± 2	ND	ND	ND	<b>1,16 ± 0,03</b>	ND	18,8 ± 0,1	ND	0,68 ± 0,01	<b>0,61 ± 0,03</b>
V11	2,0 ± 0,3	26 ± 2	5,3 ± 0,3	117 ± 27	59 ± 16	4,4 ± 0,5	ND	10 ± 6	5 ± 3	ND	ND	10 ± 1	2,8 ± 0,3	10 ± 3	13 ± 2	4 ± 1
V12	4,1 ± 0,8	24 ± 6	<b>1,8 ± 0,6</b>	114 ± 33	46 ± 9	4 ± 1	ND	10 ± 7	ND	ND	<b>1,1 ± 0,4</b>	9 ± 3	<b>2,1 ± 0,5</b>	5,3 ± 0,1	11 ± 2	3,4 ± 0,8
V13	4,7 ± 0,6	20,9 ± 0,5	6 ± 2	116 ± 5	31 ± 4	6 ± 3	ND	14 ± 2	9,0 ± 0,5	ND	ND	5,7 ± 0,9	4,0 ± 0,3	12 ± 5	8,0 ± 0,5	6,6 ± 0,1
V14	7,8 ± 0,4	25 ± 3	4 ± 1	49 ± 12	97 ± 1	11 ± 2	ND	9 ± 2	1,4 ± 0,2	ND	1,4 ± 0,3	12 ± 2	2,7 ± 0,4	4,7 ± 0,7	11,7 ± 0,5	3,3 ± 0,8

*Nunca se ache demais,  
pois tudo o que é demais sobra,  
tudo o que sobra é resto  
e tudo o que é resto vai para o lixo.  
(autor desconhecido)*