

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Dissertação de mestrado

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO
SEQUENCIAL DE METAIS EM VINHOS POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA
RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA POR CHAMA**

Mestrando: Wiliam Boschetti

Orientadora: Profa. Dra. Maria Goreti R. Vale

Porto Alegre, Julho de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

WILIAM BOSCHETTI

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO
SEQUENCIAL DE METAIS EM VINHOS POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA
RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA POR CHAMA**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale
Orientadora

Porto Alegre, Julho de 2012.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre Agosto de 2010 e Julho de 2012, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da Professora Doutora Maria Goreti Rodrigues Vale. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão

Profa. Dra. Rosângela Assis Jacques

Profa. Dra. Morgana Bazzan Dessuy

Profa. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale

Wiliam Boschetti

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que me ensinou conceitos e virtudes simples, mas que são a base para uma longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Ivete e Nestor Boschetti e à minha irmã Priscila Boschetti, por todo amor, dedicação, incentivo, apoio, paciência e compreensão demonstrados em toda minha vida. Com vocês aprendi que a base de tudo está na família.

À minha namorada Denise Bernardi, pelo companheirismo, paciência, compreensão e amor que compartilhamos nos últimos cinco anos.

Aos meus avós, pelo exemplo a ser seguido.

À professora Maria Goreti, pela amizade, orientação, confiança, incentivo e paciência demonstrados nestes dois anos de mestrado.

À doutora Morgana Dessuy, pela amizade, paciência e ajuda prestada durante o trabalho.

Aos colegas do Lanagro - RS, por todo incentivo, ajuda e dedicação prestados nesse período de trabalho em conjunto.

Aos colegas de laboratório por todo apoio e momentos de descontração compartilhados desde meu primeiro dia.

A todos os meus amigos que de alguma forma me incentivaram e me ajudaram ao longo destes anos.

Aos professores, funcionários e ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da UFRGS, pela oportunidade.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido através do Edital CNPq/MAPA/SDA 64/2008 Pesquisa, número 578560/2008-9.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Muito obrigado a todos

PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA DURANTE O PERÍODO

1. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

1.1 III Workshop de Quimiometria (2012)

Título: Avaliação da composição mineral de vinhos brasileiros empregando análise multivariada.

Sessão: Pôster

Local: Arembepe - Camaçari - Brasil

1.2 35th World Congress of Vine and Wine (2012)

Título: Evaluation of physico-chemical and mineral characteristics red wines produced by *délestage* and reassembly.

Sessão: Pôster

Local: Izmir - Turquia

1.3 5º Congreso Iberoamericano de Química Analítica; 2º Congreso Uruguayo de Química Analítica (CiaQa - 2012)

Título: Determinação sequencial rápida de metais em vinhos brasileiros utilizando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua por chama.

Sessão: Oral

Local: Montevideú - Uruguai

2. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

2.1 Development of an analytical method for the determination of arsenic in gasoline samples by HG-GF AAS.

Autoria: Emilene Becker, Morgana B. Dessuy, Wiliam Boschetti, Maria Goreti R. Vale, Sérgio L. C. Ferreira, Bernhard Welz.

Spectrochimica Acta Part B, In press, 2012

2.2 Method development for determination of metals in Brazilian wines using high-resolution continuum source fast-sequential atomic absorption spectrometry.

Autoria: Wiliam Boschetti, Morgana B. Dessuy, Roger Rampazzo, Alessandro Rios, Plinho Hertz, Vitor Manfroi, Paulo G. Celso, Maria Goreti R. Vale.

Em fase de redação

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas.....	XI
Lista de abreviaturas.....	XII
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XIV
1. Introdução.....	1
1.1 O vinho.....	1
1.2 Metais em vinhos.....	3
1.3 Determinação de metais.....	5
1.4 Determinação de metais em vinhos.....	9
1.5 Reconhecimento de padrões a partir do perfil mineral de vinhos.....	11
2. Objetivos.....	15
3. Parte experimental.....	16
3.1 Instrumentação.....	16
3.2 Reagentes e soluções.....	17
3.3 Amostras e preparo das amostras.....	18
3.4 Procedimentos para as medidas das amostras de vinho.....	20
3.5 Parâmetros de méritos.....	22
4. Resultados e discussões.....	23
4.1 Parâmetros instrumentais.....	23
4.2 Otimização dos parâmetros operacionais para injeção em fluxo.....	25

4.3 Preparo das amostras.....	28
4.4 Parâmetros de méritos.....	32
4.5 Determinação de metais em amostras de vinhos do Brasil.....	35
4.6 Análise multivariada dos dados.....	44
5. Conclusões.....	50
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	51
7. Referências	52
Anexos.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema básico de processos de vinificação utilizados para vinhos: branco, rosé e tinto.....	1
Figura 2: Regiões produtoras de uva e vinho no Brasil.....	3
Figura 3: Esquema do funcionamento de um equipamento de HR-CS AAS.....	9
Figura 4: Perfil de absorção do sinal analítico do K, para amostra SGa, em diferentes modos de injeção.....	25
Figura 5: Avaliação do perfil de absorvância para manganês, rubídio, potássio e cálcio na amostra SGa, para diferentes tempos de injeção.....	27
Figura 6: Avaliação do sinal analítico de Ca, K, Mn e Rb mediante diferentes pré tratamentos.....	29
Figura 7: Avaliação do sinal analítico dos metais Ca, K, Mn e Rb para diferentes concentrações de cério.....	31
Figuras 8: Dendograma referente à comparação dos resultados encontrados para HR-CS FS-FAAS e ICP OES, em termos dos metais avaliados.....	43
Figura 9: Avaliação dos escores para PC1 e PC2, verificando a formação de 5 grupos diferentes.....	46
Figura 10: Avaliação dos pesos para PC1 e PC2, verificando que 4 elementos K, Mn, Rb e Sr discriminam os cinco grupos formados.....	46
Figura 11: Avaliação dos escores para PC1 e PC3, verificando a formação de 3 novos grupos diferentes PBa, CGa e SGa.....	47
Figura 12: Avaliação dos pesos para PC1 e PC3, verificando que os 4 elementos K, Mn, Rb e Sr discriminam os 3 novos grupos formados.....	47
Figura 13: Distribuição das variáveis originais (K, Mn, Rb e Sr) sobre os eixos representados pelas componentes principais (PC1, PC2 e PC3).....	48
Figura 14: Dendograma da Análise de Agrupamento Hierárquico.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Limites máximos de metais em vinho estabelecidos pelo governo brasileiro (Anvisa), <i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i> (OIV), e Mercosul (MSul).....	10
Tabela II: Parâmetros instrumentais usados nas medidas por HR-CS FS-FAAS.....	16
Tabela III: Siglas das 32 amostras de vinho <i>cabernet sauvignon</i> conforme a localidade de coleta de matéria prima.....	18
Tabela IV: Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para a digestão das amostras de vinho.....	19
Tabela V: Concentrações dos diferentes padrões utilizados para a construção das curvas de calibração.....	21
Tabela VI: Parâmetros de mérito para a determinação de Cu, Li, Rb, Na K, Mn, Co, Ca, Sr e Be por HR-CS FS-FAAS.....	32
Tabela VII: Determinação de Ca, K e Na, em mg L ⁻¹ , por HR-CS FS-FAAS na amostra Interlaboratorial 2012.....	34
Tabela VIII: Recuperações obtidas pelo método de HR-CS FS-FAAS para amostras de vinhos. Valores dados em percentagem (%).....	34
Tabela IX: Resultados das regiões avaliadas para concentração de cobre por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES.....	36
Tabela X: Resultados das regiões avaliadas para concentração de manganês por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES.....	37
Tabela XI: Resultados das regiões avaliadas para concentração de rubídio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES.....	38
Tabela XII: Resultados das regiões avaliadas para concentração de estrôncio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES.....	39
Tabela XIII: Resultados das regiões avaliadas para concentração de cálcio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES.....	40
Tabela XIV: Resultados das regiões avaliadas para concentração de sódio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES.....	41
Tabela XV: Resultados das regiões avaliadas para concentração de potássio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES.....	42
Tabela XVI: Coeficientes de correlação (R) encontrados para cada elemento, comparando os resultados obtidos para as duas técnicas de análise ICP OES e HR-CS FS-FAAS.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS – Espectrometria de absorção atômica (do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*).
- CCD – Dispositivo de carga acoplada.
- Co – Concentração característica.
- FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*).
- GF AAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*).
- HCA – Análise de agrupamento hierárquico (do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*).
- HG AAS – Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*).
- HR-CS FS-FAAS – Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua por chama via determinação sequencial rápida (do inglês *High-Resolution Fast Sequential-Flame Atomic Absorption Spectrometry*).
- ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*).
- ICP OES – Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*).
- LOD – Limite de detecção (do inglês *Limit of Detection*).
- LOQ – Limite de quantificação (do inglês *Limit of Quantification*).
- LS AAS – Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (do inglês *Line Source Atomic Absorption Spectrometry*).
- OIV – Organização Internacional do Vinho.
- PCA – Análise por componentes principais (do inglês *Principal Component Analysis*).
- PC – Componente principal (do inglês *Principal Component*).
- R – Fator de correlação.
- RSD – Desvio padrão relativo (do inglês *Relative Standard Deviation*).

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado um método para determinação sequencial rápida por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua por chama (HR-CS FS-FAAS) de metais em amostras de vinhos, produzidos em diferentes regiões do Brasil. As amostras foram obtidas de 8 regiões brasileiras diferentes: Serra Gaúcha, Vale dos Vinhedos, Pinto Bandeira, Campos de Cima da Serra, Campanha Gaúcha, Serra Catarinense, Oeste do Paraná e Vale do São Francisco. Os elementos avaliados foram: Be, Ca, Co, Cu, K, Li, Mn, Na, Rb e Sr. Estes metais têm grande importância nas propriedades organolépticas do vinho, assim como para produção de uvas de qualidade. A validação do método foi feita pelo estabelecimento de curvas de calibração, realização de ensaios de recuperação e comparação dos resultados encontrados por HR-CS FS-FAAS com aqueles obtidos por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Padrões aquosos foram utilizados para a calibração e o coeficiente de correlação encontrado, para todos os analitos avaliados, foi maior que 0,9994. A partir das curvas de calibração os limites de detecção foram calculados para cada elemento: 44 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu, 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Li, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Rb, 42 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Mn, 58 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Co, 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Sr, 23 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Be, 0,90 mg L^{-1} para Na, 4,4 mg L^{-1} para K e 0,92 mg L^{-1} para Ca. Ensaios de recuperação para cada analito foram realizados, encontrando recuperações entre 91 e 111%. A partir dos resultados encontrados, fazendo-se uso das técnicas de reconhecimento de padrões Análise por Componentes Principais (PCA) e Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA) foi observada a formação de 7 grupos distintos, quando empregados os teores de K, Mn, Rb e Sr, dentre os 8 grupos (regiões do Brasil) avaliados. Com este conjunto de informações, portanto, é possível o monitoramento de fraudes e da qualidade do vinho produzido em cada região produtora.

ABSTRACT

In this work a method has been developed for the determination of metals in wine samples, produced in different regions of Brazil, using high-resolution continuum source fast-sequential flame atomic absorption spectrometry (HR-CS FS-FAAS). The samples were obtained from eight different regions: Serra Gaúcha, Vale dos Vinhedos, Pinto Bandeira, Campos de Cima da Serra, Campanha Gaúcha, Serra Catarinense, Oeste do Paraná e Vale do São Francisco. The investigated elements were: Be, Ca, Co, Cu, K, Li, Mn, Na, Rb and Sr. These metals are important for the organoleptic properties of wine and for the production of grapes. The method was validated by recovery tests and comparison between the results obtained by HR-CS FS-FAAS and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). Aqueous standards were used for calibration and the correlation coefficient found was higher than 0.9994 for all investigated elements. The detection limits were calculated from the calibration curves for each analyte: $44 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cu, $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ for Li, $20 \mu\text{g L}^{-1}$ for Rb, $42 \mu\text{g L}^{-1}$ for Mn, $58 \mu\text{g L}^{-1}$ for Co, $15 \mu\text{g L}^{-1}$ for Sr, $23 \mu\text{g L}^{-1}$ for Be, 0.90 mg L^{-1} for Na, 4.4 mg L^{-1} for K and 0.92 mg L^{-1} for Ca. The recovery tests showed results between 91 and 111%. After method validation the samples were evaluated. With the results obtained and using pattern recognition techniques Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) was possible to find seven different groups, evaluating K, Mn, Rb and Sr concentration values, among the eight original groups (Brazilian regions) evaluated. Finally, using all the information obtained in this work, it's possible to control frauds and the wine produced quality.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O VINHO

Segundo a legislação brasileira do Ministério da Agricultura, lei nº 7678 de 1988, o vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. O mosto simples de uva é o produto obtido pelo esmagamento ou prensagem da uva sã, fresca e madura, com a presença ou não de suas partes sólidas¹. Para obtenção de vinhos de boa qualidade é necessário, portanto, fazer uso de uvas de boa qualidade e seguir uma sequência básica para o processo de vinificação, conforme a Figura 1.

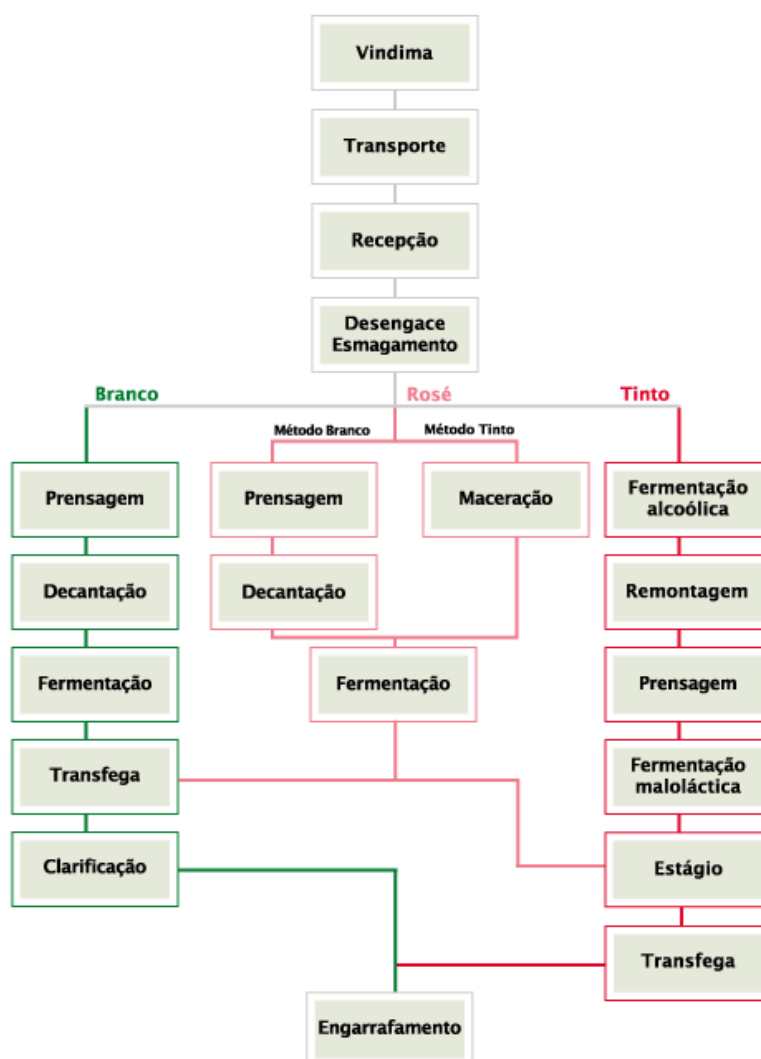


Figura 1: Esquema básico de processos de vinificação utilizados para vinhos: branco, rosé e tinto (adaptado de Embrapa Uva e Vinho).

O vinho pode ser dividido em três categorias quanto à coloração: tinto, branco ou rosé. Quanto às quantidades de açúcares, dividindo-se em: seco, com teor de açúcar menor do que 5 g L⁻¹; *demi-sec*, com 5 - 20 g L⁻¹ de açúcares; e suave, que possui teor de açúcar maior do que 20 g L⁻¹. Quanto à classe, o vinho possui duas predominantes: vinhos de mesa e vinhos finos. O vinho de mesa é um vinho inferior, elaborado a partir de variedades de uvas americanas (*Concord*, *Herbemont*, *Isabel*, *Seyve Willard*, *Niágara*, etc.) de espécies americanas (*Vitis labrusca*, *Vitis bourquina*, etc.). Os vinhos finos são elaborados a partir de variedades de uvas nobres (*Cabernet Sauvignon*, *Cabernet Franc*, *Pinot Noir*, *Merlot*, *Chardonnay*, *Riesling*, *Sauvignon Blanc*, etc.) da espécie europeia (*Vitis vinifera*). Os vinhos finos e de mesa possuem entre 10-14% de álcool^{1,2}.

O vinho é uma bebida de significância histórica, social e econômica. Esta bebida ganhou destaque devido a sua participação em cerimônias religiosas nos tempos antigos^{2, 3}. Com a evolução da viticultura e da enologia, o vinho passou a ganhar mais qualidade, aumentando seu volume produzido e consumido mundialmente. Segundo dados da OIV (Organização Internacional do Vinho), mais de 26 bilhões de litros de vinho foram produzidos e consumidos apenas em 2010⁴. No Brasil o volume chegou a mais de 250 milhões de litros neste mesmo ano. Deste total, 10%, isto é, cerca de 25 milhões de litros, foram obtidos a partir de uvas de origem europeia como *merlot* e *cabernet sauvignon*⁵. Esta casta de uva (*cabernet sauvignon*) é originária da França, gera vinhos tintos finos e tem a maior área, dentre as uvas “viníferas”, plantada no Brasil, mostrando a importância deste produto^{2,6}.

A produção de vinhos no Brasil teve início no século XVI, com os colonizadores portugueses. Os vinhos eram produzidos artesanalmente, em baixa escala, através de castas *Vitis vinifera*. Posteriormente, com a chegada dos imigrantes italianos, por volta de 1875, e com a implantação de uvas de origem americana, do tipo *Vitis labrusca*, houve um crescimento na produção de vinhos, principalmente na região sul^{2, 6}. O Rio Grande do Sul, hoje, destaca-se com aproximadamente 90% do total de vinhos produzidos no país. Os 10% restantes estão divididos entre os estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco⁵.

As principais regiões produtoras podem ser classificadas em: Vale do São Francisco (VSF), Serra Catarinense (SCa), Oeste do Paraná (OPR), Campanha Gaúcha (CGa), Campos de Cima da Serra (CCS) e Serra Gaúcha (SGa), Figura 2. Esta última pode ser subdividida ainda, devido ao selo de Indicação de Procedência, em Vale dos Vinhedos (VVi) e Pinto

Bandeira (PBa)⁶. Estas regiões representam zonas produtoras de matéria-prima, uva, responsáveis pela maior parte da produção de vinhos do Brasil. Cada área cultivada recebe uma caracterização específica de acordo com a variedade de uva, clima, solo, mecanismos de manejo e produção de uvas, parâmetros estes fundamentais para obtenção de vinhos com características específicas em sua composição^{2, 6, 7}.

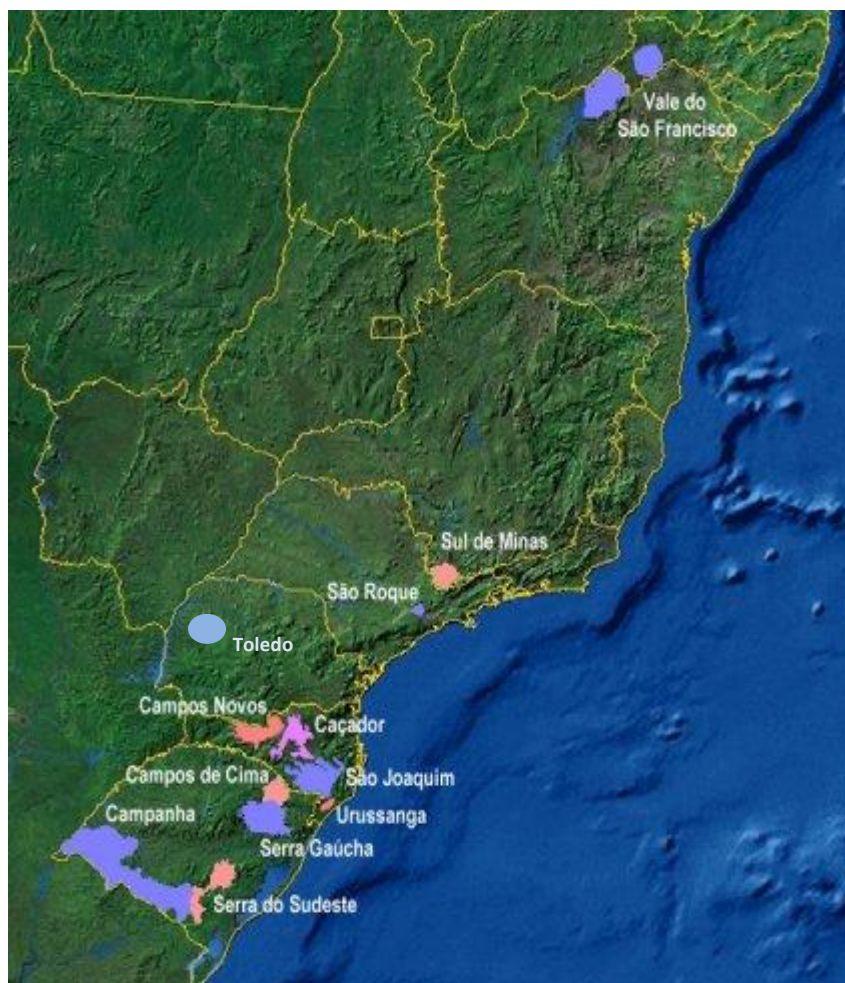


Figura 2: Regiões produtoras de uva e vinho no Brasil (adaptada de Ibravin).

1.2 METAIS EM VINHOS

Do ponto de vista químico, o vinho é uma mistura complexa de água, etanol e uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. As principais espécies dissolvidas são os íons metálicos (tais como sódio, potássio, cálcio, entre outros), ácidos orgânicos,

polifenóis, alcoóis, proteínas, aminoácidos e polissacarídeos. A composição mineral do vinho está diretamente ligada aos processos utilizados na sua produção e sua matéria-prima, a uva^{2, 6-8}.

Os componentes inorgânicos das uvas influenciam, de forma significativa, a produção e qualidade de vinhos e possuem um papel importante na nutrição humana. A determinação de minerais no vinho é fundamental também devido à natureza tóxica de alguns metais, ao efeito nas propriedades organolépticas e à contribuição que o conteúdo mineral pode trazer para a caracterização de vinhos de acordo com a região de produção. A presença de metais também influencia no processo de envelhecimento do produto final, auxiliando em etapas de oxi-redução durante a maturação⁷⁻⁹.

Os elementos indispensáveis para obtenção de uvas com boa qualidade como cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e sódio (Na) apresentam-se em concentrações abundantes no vinho. Estes analitos dependem do tipo de uva utilizado no processo de produção, tipo de solo e condições climáticas para o cultivo das uvas^{2, 3}. Já os elementos como berílio (Be), cobre (Cu), cobalto (Co), lítio (Li), manganês (Mn), rubídio (Rb) e estrôncio (Sr) não se apresentam, usualmente, em altas concentrações e influenciam significativamente nas propriedades organolépticas do vinho. Eles podem ter origem no solo, nos equipamentos, nos fertilizantes, nos pesticidas e fungicidas, entre outros^{2, 3, 10}.

Já foi demonstrado que o consumo diário, mas moderado de vinho, contribui para reposição de elementos essenciais para nosso organismo como Be, Ca, Co, Cu, K, Li, Mg, Mn, Na, Rb e Sr^{12, 13}. No entanto, alguns elementos citados, se consumidos em quantidades excessivas, podem causar malefícios a saúde humana. O lítio, por exemplo, em quantidade traço, não representa risco a saúde humana, porém pode levar a intoxicação em concentrações mais elevadas^{14, 15}. O cobre e o cobalto auxiliam na formação de hemoglobina e vitamina B₁₂, respectivamente, mas se ingeridos em grande quantidade, também levam a problemas graves de saúde^{16, 17}. Para prevenir qualquer tipo de dano no organismo, portanto, a determinação da composição mineral de vinhos passa a ganhar mais importância.

Com base na regulamentação européia, a legislação brasileira tem por definição que denominações de origem (DO) são indicações geográficas específicas que protegem os produtos de determinada localidade. A Lei 9.279 de Maio de 1996 do Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo certifica que apenas os produtos genuinamente originados em determinada região podem ser por eles comercializados e assim denominados. Na sua

essência, a denominação de origem consiste na utilização do nome de uma região ou localidade, ou, em casos excepcionais, de um país, com a finalidade de designar um produto dela originado, cujas características são devidas ao meio geográfico específico, onde se compreendem fatores naturais e humanos. O uso de tal denominação confere aos seus detentores um direito específico de propriedade industrial, sobrepondo-se e eliminando qualquer marca que utilize ou evoque a mesma designação¹⁸.

Outro aspecto que vale ressaltar, é que pela análise elementar do vinho a caracterização, a tipificação e a detecção de fraudes também podem ser determinadas¹⁹. Em trabalho desenvolvido por Moreno et al.²⁰ foram analisadas 54 amostras de vinhos elaborados em regiões controladas da Espanha. Elementos minerais têm sido frequentemente utilizados na diferenciação de vinhos espanhóis, por exemplo, de acordo com a origem geográfica. Os resultados mostraram que, pela análise multivariada dos resultados, as amostras investigadas apresentaram 95% de discriminação entre as regiões avaliadas²⁰.

Bentlin et al.¹⁰ avaliaram 53 amostras de vinho tinto, provenientes de 4 países da América do Sul: Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. Foram determinados 45 elementos, sendo que apenas 5 destes foram responsáveis por 100% de discriminação entre os países avaliados. Assim, a avaliação mineral de amostras de vinho produzidos em diferentes regiões do Brasil pode, também, mapear e controlar adulterações e a qualidade dos vinhos.

1.3 DETERMINAÇÃO DE METAIS

A determinação de metais na maioria das matrizes é comumente realizada por técnicas de espectrometria atômica. Dentre as mais utilizadas estão a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS), a espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor (CVG AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP - MS). Estas técnicas são amplamente discutidas na literatura, para determinação de metais nos mais diferentes tipos de substâncias, cada uma com suas vantagens e/ou desvantagens^{21 - 24}.

O princípio da técnica multielementar de ICP OES se baseia na detecção da radiação (fótons) emitida pelos átomos excitados pelo plasma, ao retornarem ao seu estado

fundamental. O plasma é composto de um gás inerte (argônio) energizado, formado pela passagem deste por uma bobina de indução, alimentada por um gerador de radiofrequência. O aquecimento gerado pode elevar a temperatura do plasma a 10.000 K, o que garante a completa atomização e/ou ionização da maioria dos elementos presentes e, também, possibilita a determinação de modo extremamente sensível de alguns elementos. O sistema de introdução de amostra se baseia em um nebulizador, para produzir o aerossol. Este é conduzido pelo gás de arraste (argônio) até o plasma, onde ocorrem os processos de dessorvatação, vaporização, dissociação, atomização, excitação e ionização^{21, 23}.

Na técnica de ICP - MS, íons formados no ICP são introduzidos no analisador de massas, no qual são selecionados de acordo com sua razão massa-carga e detectados. Esta técnica tem como vantagem as análises multielementares simultâneas com elevada sensibilidade. A técnica ICP - MS e a ICP OES possuem o mesmo sistema de introdução da amostra e atomizadores de plasma, com isso possuem também os mesmos problemas relacionados à composição das amostras: efeitos de matriz. É uma técnica sofisticada de alta sensibilidade, porém de alto custo^{21, 23}.

As desvantagens das técnicas que utilizam o plasma como atomizador / fonte de excitação são: relativa intolerância a matrizes complexas, isto é, a presença de sólidos dissolvidos e/ou compostos orgânicos; a amostra precisa estar no estado líquido, levando a necessidade de uma preparação prévia da amostra, o que, no final, acarreta diluições, comprometendo a precisão e os limites de detecção da análise; outro ponto fraco importante a ser destacado, é que na otimização das condições instrumentais é necessário o estabelecimento de uma condição compromisso para todos os analitos envolvidos, isto é, uma condição que nem sempre é a ótima^{21 - 24}.

Nas técnicas de AAS, destaca-se a atomização eletrotérmica, onde baixos limites de detecção são alcançados, com a possibilidade de se trabalhar com amostras sólidas, líquidas ou em suspensão. Neste caso, os elementos são atomizados e em seu estado fundamental e absorvem quantidades de energia específicas, de acordo com a fonte de emissão de radiação (fonte de linha - LS). A diferença na intensidade da fonte de emissão, entre uma medida de referência (sem analito) e no instante da atomização, corresponde à quantificação do analito naquela amostra. As fontes de linha mais utilizadas são as lâmpadas de cátodo oco, específicas para cada elemento. A utilização destas lâmpadas mais a modulação do sinal tornam a técnica altamente seletiva^{22, 25}. Contudo, quando a amostra é muito complexa,

problemas de radiação de fundo podem ocorrer devido à absorção de espécies químicas interferentes. A interferência, na maioria das vezes, pode ser corrigida usando uma lâmpada de deutério ou efeito Zeeman ou otimizando as condições do programa de temperatura (etapas de secagem, pirólise e atomização) ou ainda pela utilização de modificadores químicos. A principal desvantagem é com relação às análises de rotina, já que apenas um elemento pode ser determinado por medida, para uma mesma amostra^{21, 25}.

A atomização com chama é a técnica mais antiga de AAS. Para esta técnica, são válidos os mesmo conceitos básicos de AAS, uma lâmpada específica para cada analito, com a atomização ocorrendo na chama. A quantificação dos analitos se dá pela diferença na intensidade da radiação oriunda da fonte de emissão e a radiação que chega ao detector, após passar pelo atomizador, onde os átomos, em seu estado fundamental, absorvem energias específicas. Comumente são empregadas chamas compostas por ar - acetileno ou óxido nitroso - acetileno, dependendo das características do elemento. A injeção da amostra no atomizador é via formação de aerossol na câmara de nebulização, porém, apenas 5% da solução chegam ao atomizador. Dependendo da complexidade da amostra, ela necessitará de pré-tratamento e/ou diluição^{24, 25}.

Alguns problemas podem surgir na determinação de metais alcalinos já que os mesmos são facilmente ionizáveis. A interferência de ionização ocorre quando a temperatura da chama é muito alta para o analito e, por isso, tem energia suficiente para levá-lo além do seu estado atômico fundamental e produzir íons, reduzindo a população de átomos, no estado fundamental, presente no caminho óptico. Uma estratégia para resolver este problema é adicionar um supressor de ionização às amostras, padrões e branco. O mais conhecido é o Cs, metal alcalino que se ioniza facilmente (energia de ionização igual a 3,9 eV) e torna a chama rica em elétrons, reduzindo a interferência de ionização. Assim, os analitos presentes nas amostras permanecerão no estado fundamental. Altas concentrações de fosfato (300-800 mg L⁻¹) também podem dificultar a determinação de Be, Ba, Ca, Mg, Sr e Al pois estes metais formam fosfatos refratários na chama ar/acetileno. O problema pode ser contornado usando-se um agente liberador como o cloreto de lantânio ou pela utilização de temperaturas mais elevadas através da chama óxido nitroso/acetileno. Uma vantagem importante desta técnica é o baixo custo para determinação de alguns elementos traço e os ditos essenciais^{21, 22, 25}.

A partir do desenvolvimento de um equipamento com fonte contínua (CS), em 1996, pelo grupo de Becker-Ross, uma nova linha de estudos foi iniciada, possibilitando a determinação de todos os elementos, para uma mesma amostra, sem a necessidade de trocar a lâmpada. A fonte de radiação consiste em uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão (17 bar quando fria) operando em modo *hot spot*, que é caracterizado pelo aparecimento de um plasma extremamente pequeno, emite radiação numa faixa contínua de 190 a 900 nm. A alta resolução (HR) do sistema é devida ao monocromador (Figura 3), formado por um conjunto de espelhos, um prisma e uma rede de difração *echelle*, aliada ao sistema de detecção de carga acoplada, CCD. O comprimento de onda de interesse é selecionado, ajustando-se os motores de passo, de maneira que o prisma e a rede de difração alcancem as posições adequadas. Estas posições são obtidas pelo ajuste de linhas emitidas por uma lâmpada de neônio, com *pixels* específicos do detector. Este ajuste é realizado pelo *software* do equipamento automaticamente²⁶.

O detector é constituído por um arranjo de dispositivos de carga acoplada (CCD) com 576 *pixels*. Enquanto em LS AAS só a absorvância (com chama como atomizador) ou absorvância *versus* tempo (como atomizador eletrotérmico) é medida, o detector CCD empregado no HR-CS AAS acrescenta o comprimento de onda como terceira dimensão, fornecendo informações indisponíveis em instrumentos convencionais de AAS. Outra vantagem da HR-CS AAS é a possibilidade do uso de linhas secundárias, não há linhas fracas. Como a intensidade de emissão fornecida pela lâmpada de xenônio é praticamente constante ao longo de toda faixa espectral, ocorre uma melhora na precisão e no limite de detecção (melhor razão sinal/ruído) para estas linhas^{22, 26}.

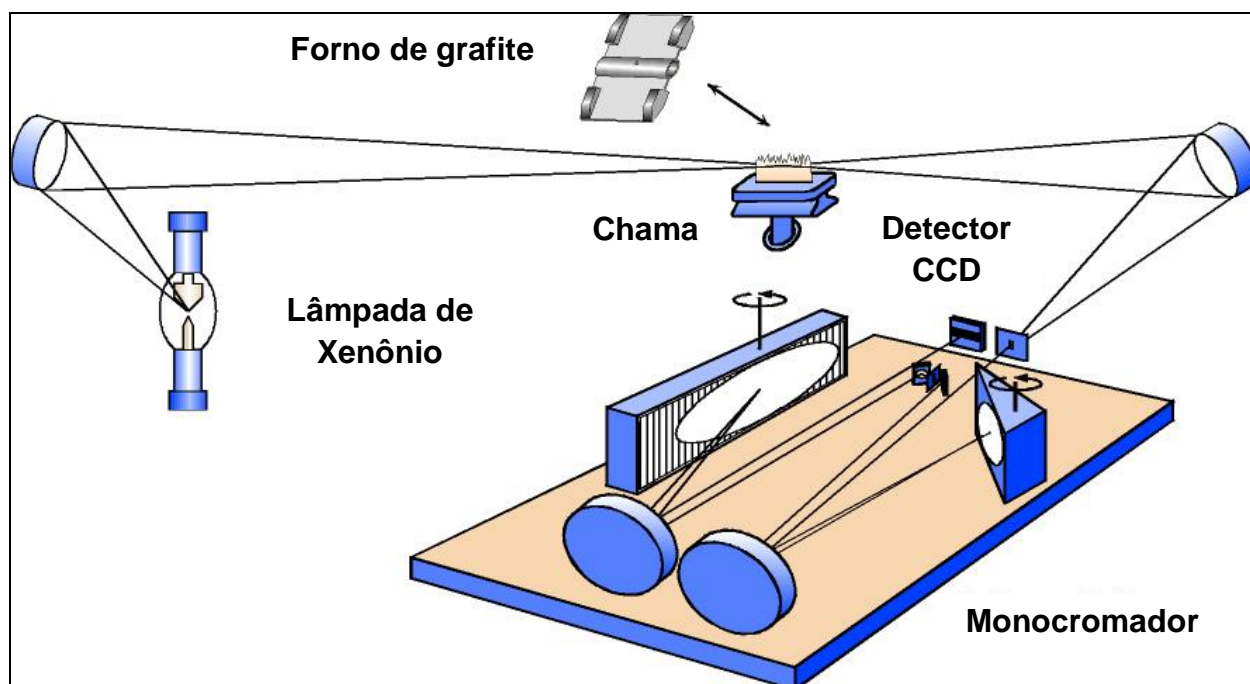


Figura 3: Esquema do funcionamento de um equipamento de HR-CS AAS (adaptado da referência 24).

1.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM VINHOS

A determinação de metais em vinhos é de grande importância para o controle da qualidade e da autenticidade dos vinhos, e para conhecer o grau de biodisponibilidade e toxicidade dos metais. A presença desses elementos pode influenciar o processo de fabricação ou pode mudar o sabor e a qualidade do produto final²⁷.

Os metais também têm um efeito positivo sobre a saúde. O consumo moderado de vinho contribui diariamente para suprir as exigências diárias de muitos elementos essenciais, como cálcio, cobalto, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, molibdênio, níquel e zinco. Para prevenir a ingestão excessiva de metais e conseqüentemente uma possível intoxicação, a concentração de metais em vinho precisa ser regulada. Níveis aceitáveis devem ser respeitados e controlados durante a vinificação e no produto final. Os níveis máximos de metais em vinho são estabelecidos por órgãos fiscalizadores, Tabela I. No Brasil a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) regulamenta, pela Portaria nº 685 de agosto de 1998, os limites máximos permitidos de contaminantes inorgânicos em bebidas fermentadas. Um dos mais importantes órgãos fiscalizadores de vinhos no mundo, a *Organisation*

Internationale de la Vigne et du Vin - OIV, regula a produção e comercialização de vinho no mundo^{28, 29}. O mercado comum do sul - MERCOSUL, importante grupo econômico dos países da América do sul, também estabelece limites para concentrações de metais em vinhos comercializados entre os países que pertencem ao grupo³⁰. No Brasil, no entanto, não há um monitoramento adequando da presença de metais pesados em vinhos (especificação nos rótulos), recomenda-se apenas as condições fornecidas pela OIV e MERCOSUL, mas estes metais não são avaliados, pelos órgãos competentes, durante o processo de aprovação para consumo.

Tabela I: Limites máximos de metais em vinho estabelecidos pelo governo brasileiro (Anvisa), *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV), e Mercosul (MSul).

Metais Teor máx. em mg L⁻¹			
	Anvisa ^a	OIV ^b	MSul ^c
Arsênio (As)	0,1	0,2	0,2
Cádmio (Cd)	NEst*	0,01	0,01
Cálcio (Ca)	NEst*	NEst*	300
Chumbo (Pb)	NEst*	0,15	0,3
Cobre (Cu)	10	1	1
Sódio (Na)	NEst*	NEst*	230
Zinco (Zn)	NEst*	5	5

Fontes: (a) Portaria da Anvisa nº 685 de 27 de agosto de 1998. (b) *Recueil International des Methods d'analyses OIV*. (c) Resolução 45/96 do GMC de 21/IV/96. (*) NEst: valores não estabelecidos.

Os métodos para determinação de metais em vinhos recomendados pela OIV são essencialmente baseados na técnica de espectrometria de absorção atômica, dado a sua seletividade, alta sensibilidade e capacidade para determinações diretas. As diferentes técnicas de AAS empregadas para determinação de metais em vinhos são GF AAS^{31 - 33} e FAAS^{34, 35}. Contudo, as técnicas mais extensivamente reportadas na literatura para caracterização mineral de vinhos são ICP – MS^{10, 36, 37} e ICP OES^{10, 38 - 41}. As técnicas de ICP são mais aplicadas pela possibilidade da determinação multielementar simultânea dos elementos. Porém, dependendo da concentração do analito, da composição da matriz (quantidade de açúcares) e do tempo disponível para análise a escolha da técnica mais adequada é fundamental. A relação custo/benefício precisa ser avaliada, dependendo da amostra, analitos de interesse, tempo e custo de análise.

Com a chegada da técnica de HR-CS AAS, um novo horizonte de possibilidades pode ser explorado para a análise de vinhos. Uma rotina de trabalho com determinação sequencial

rápida por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua por chama (HR-CS FS-FAAS) pode ser implantada. Não há necessidade de troca de lâmpada, ou de otimizar as condições do equipamento manualmente para cada analito, o *software* ajusta estes parâmetros (previamente otimizados) automaticamente. As amostras podem ser analisadas sem a necessidade de diluição, já que linhas menos sensíveis podem ser escolhidas, sem prejuízos na razão sinal/ruído. A possibilidade de melhorias na sensibilidade, aumentando o número de *pixels* a serem avaliados, o *pixel* central (no centro da linha analítica) e os *pixels* +1 e -1 (*pixels* laterais), ou ainda mais *pixels* (+2 e -2, +3 e -3, +4 e -4), também é significativa^{22, 26}. Finalmente deve-se ressaltar que diferentemente das técnicas que usam ICP, as condições instrumentais neste caso são estabelecidas/otimizadas individualmente para cada analito, o que permite trabalhar sempre nas condições ótimas de análise.

Esta técnica vem sendo explorada na determinação de metais em diversas matrizes, como reportado por Gomes Neto et al.^{42, 43} na determinação de Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn e Zn em folhas de plantas e na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em solos, ou por Ferreira et al.⁴⁴ na determinação de Ca e Mg em leite e derivados, ou ainda Moraes et al.⁴⁵ na determinação de Ca, Mg, K, Na, P, Fe, Mn, Cr e Ni em amostras de café. Porém, não há trabalhos reportados na literatura, até o presente momento, sobre análise de vinhos por HR-CS FS-FAAS, sendo este o principal foco deste estudo.

1.5 RECONHECIMENTO DE PADRÕES A PARTIR DO PERFIL MINERAL DE VINHOS

Técnicas de reconhecimento de padrão que traçam o perfil de amostras baseadas na composição química e análise estatística multivariada dos dados analíticos podem ser usadas para identificação e classificação de um produto específico de acordo a sua origem geográfica. Assume-se que a composição química de um produto, tal como o vinho, pode refletir a composição do solo de onde é proveniente. Alguns estudos combinam diferentes tipos de parâmetros físico-químicos: concentração de compostos voláteis, fenóis, metais, antocianinas e ácidos orgânicos⁴⁶. Contudo, são os componentes minerais que melhor indicam

a origem geográfica dos vinhos devido à relação direta da composição do solo com os componentes minerais encontrados nas amostras⁴⁷.

O sucesso da aplicação das técnicas de reconhecimento de padrões é devido a seleção adequada dos elementos que reflitam a composição do solo e dessa forma possuam potencial para discriminação de um produto particular. Apenas um número limitado de elementos pode ser considerado qualificado para este propósito^{10, 20, 48}. Neste trabalho, portanto, optou-se pelos elementos que melhor poderiam discriminar a composição do solo de uma dada região geográfica: Be, Ca, Co, Cu, K, Li, Mn, Na, Rb e Sr.

A aplicação das técnicas de reconhecimento de padrões não é muito simples, pois muitos fatores podem alterar a composição dos macro e micros elementos de um vinho, diferenciando-o da composição elementar do solo. Estes fatores incluem práticas agrícolas tais como o uso de fertilizantes, fatores climáticos e agrotóxicos. O processo de vinificação também pode contribuir para alterar a composição de macro e micro elementos do vinho⁴⁹.

Além de poder determinar a origem geográfica, por reconhecimento de padrões, comparando vinhos produzidos em diferentes regiões, é importante avaliar a qualidade do vinho, evitar possíveis adulterações, garantir a qualidade no mercado de importação e exportação e controlar os processos de produção de bebidas. O primeiro país a estabelecer um conselho regulador, conhecido como denominação de origem (DO) foi a Espanha. O principal objetivo dos conselhos reguladores é garantir a qualidade e a fonte do vinho²⁰.

Para determinar a origem geográfica dos vinhos são usadas técnicas de reconhecimento de padrões e classificação, tais como: Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*), que são técnicas não supervisionadas; Análise pelo K-ésimo vizinho mais próximo (KNN, do inglês *K- Nearest Neighbours*) e SIMCA, acrônimo da expressão inglesa *Soft Independent Modeling of Class Analogy*, que são técnicas supervisionadas, entre outros. Sendo que métodos não supervisionados são aqueles onde não há necessidade de conhecimento prévio das amostras e métodos supervisionados aqueles que exigem um conhecimento prévio das amostras (informações sobre a que classe pertencem, por exemplo)⁵⁰⁻⁵³.

A Análise por Componentes Principais é comumente utilizada quando os dados obtidos apresentam uma grande quantidade de variáveis, de forma que é difícil a identificação das informações relevantes. Assim, a PCA é um procedimento matemático que tem por

finalidade básica a redução do tamanho de um conjunto de dados com um grande número de variáveis inter-relacionadas. Para efetuar tal redução, sem perda de informações, a matriz de dados original passa a ser representada por novas variáveis, ortogonais entre si e direcionadas em função da distribuição espacial dos dados, essas variáveis são chamadas de Componentes Principais (PC, do inglês *Principal Components*). Tais componentes são ordenadas de forma que as primeiras guardam a maior parte da variância presente nas variáveis originais. A matriz de dados ($X_{n \times p}$, onde n é o número de amostras e p o número de variáveis) é decomposta numa soma de matrizes que não podem mais ser reduzidas como mostra a Equação 1, onde F é o número de PC's e E são os resíduos⁵⁰⁻⁵³.

$$X = M_1 + M_2 + M_3 + \dots + M_F + E \quad \text{Equação 1}$$

Cada uma dessas matrizes (M) podem ser expressas como o produto de dois vetores: escore (T) e pesos (P):

$$M_F = T_F P_F^T \quad \text{Equação 2}$$

Logo,

$$X = T_1 P_1^T + T_2 P_2^T + T_3 P_3^T + \dots + T_F P_F^T + E \quad \text{Equação 3}$$

Os escores correspondem às coordenadas de cada amostra e os pesos a contribuição de cada variável original, projetadas no espaço definido pelas PC's.

A HCA relaciona amostras de acordo com suas similaridades que são baseadas na distância entre amostras. Existem várias maneiras de calcular a distância de um objeto i ao agrupamento k , tais como a distância Euclidiana, a de Mahalanobis, etc. Neste trabalho a HCA foi construída utilizando a distância Euclidiana (D_E), conforme Equação 4, que calcula a distância entre dois pontos, $P = (p_x, p_y)$ e $Q = (q_x, q_y)$ ⁵⁰⁻⁵³.

$$D_E = \sqrt{(p_x - q_x)^2 + (p_y - q_y)^2} \quad \text{Equação 4}$$

Um resultado típico desta abordagem é uma árvore hierárquica, denominada dendograma. Os dendogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras, onde pela representação de gráficos convencionais seria inviável. Fica possível mostrar a melhor separação existente entre as amostras e ainda, mostra todos os possíveis agrupamentos de amostras, ou seja, todas as classes que podem ser formadas. Assim, quanto mais longos forem os ramos que distinguem uma classe da outra, melhor será a separação entre essas classes⁵⁰⁻⁵³.

Forina e Grava⁵⁴ publicaram um trabalho onde relatam os meios como a quimiometria pode ser usada em todas as etapas da análise de vinhos desde amostragem até a análise dos dados. Kwan e Kowalski^{55, 56} foram os pioneiros na classificação dos vinhos de *vitis vinifera* (*Pinot Noir*) da França e dos Estados Unidos. Baxter et. al.⁵⁷ determinaram 48 elementos por ICP OES em vinhos ingleses e espanhóis e por análises quimiométricas diferenciaram ambas as origens.

Peña et. al.⁵⁸ aplicaram as técnicas de padrão de reconhecimento para classificar vinhos da Ribeira Sacra, Galícia e diferenciá-los dos vinhos de outras duas regiões da Galícia, Ribeiro e Valdeorras. Para tanto, elementos como Li, K, Na, Rb, Zn, Fe, Mn, Ni e Co foram determinados por AAS e os resultados foram avaliados usando as ferramentas de reconhecimento padrão como PCA, LDA e K-NN. Coetzee et. al.⁴⁹ classificaram de acordo com a origem geográfica vinhos de três regiões diferentes da África do Sul. Eles observaram que dos 40 elementos usados para classificação apenas os elementos Al, Ba, Mn, Rb, Tl e W são adequados para a função após a análise discriminante.

Jos et. al.⁵⁹ também aplicaram as técnicas estatísticas de reconhecimento para verificar a autenticidade de dois vinhos espumantes classificados como *Cava Espanhol* e *Champagne Francês* de acordo a sua composição mineral. Os autores optaram em realizar a análise dos dados usando as técnicas LDA e SIMCA. Šperková e Suchánek⁶⁰ usaram a concentração de 27 elementos presentes no vinho como parâmetros para classificar e verificar a autenticidade dos vinhos da região da Bohemia na República Tcheca. Os elementos foram determinados por ICP-MS e ICP OES e os resultados foram avaliados pelas técnicas multivariadas PCA e LDA.

Bentlin et al.¹⁰ avaliaram a composição de elementos majoritários, minoritários e traço em 53 amostras de vinhos tintos comerciais, provenientes de países da América do Sul (Argentina, Brasil, Chile e Uruguai). A determinação de 45 elementos foi realizada por ICP - MS e ICP OES, no entanto, apenas cinco analitos (Tl, U, Li, Rb e Mn) foram responsáveis pela diferenciação quanto à origem das amostras estudadas. Pela análise multivariada dos resultados foi possível discriminar os vinhos de acordo com o país de origem, independentemente do tipo de uva.

Vale ressaltar que a maioria dos trabalhos reportados na literatura utiliza amostras de vinhos comerciais, isto é, adquiridas em mercados, assim a origem apresentada no rótulo do vinho (região produtora), não dá a garantia de que a matéria-prima, as uvas, são da região mencionada. Neste trabalho as amostras de vinho são diferenciadas, pois foram obtidas

diretamente com os fornecedores e com a garantia de que as uvas utilizadas na produção do vinho foram colhidas na região.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo principal o desenvolvimento e otimização de um método para determinação rápida e confiável de Be, Ca, Co, Cu, K, Li, Mn, Na, Rb e Sr em amostras de vinho utilizando a técnica de HR-CS FS-FAAS com a finalidade de auxiliar o estabelecimento da composição mineral de vinhos produzidos em diferentes regiões e localidades do Brasil.

Para validação do método foram avaliados os ensaios de recuperação dos analitos envolvidos no estudo e a comparação com os resultados obtidos por ICP OES. Para verificar a formação de grupos, com composição mineral semelhante, foram utilizadas como ferramentas estatísticas a PCA e a HCA. As metas foram organizadas de modo que o objetivo fosse alcançado:

- investigação de diferentes pré-tratamentos para as amostras entre eles a digestão usando aquecimento por microondas acoplado a processos fotoquímicos de oxidação;
- estudo da viabilidade do uso da técnica HR-CS FS-FAAS para determinação sequencial rápida de metais;
- escolha dos elementos a serem avaliados e os respectivos comprimentos de onda, observando o comportamento do sinal analítico;
- otimização dos parâmetros instrumentais e investigação de interferências;
- estabelecimento dos parâmetros de mérito. Neste item vale ressaltar que a calibração *versus* padrões aquosos foi foco de atenção;
- uso de ensaios de recuperação e comparação com os resultados obtidos por ICP OES para avaliar a exatidão do método;
- aplicação do método para determinação de metais em diferentes amostras de vinho produzidos no Brasil;
- uso de ferramentas quimiométricas para verificar possíveis formações de grupos de amostras com características minerais semelhantes.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para a realização das medidas foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Alemanha), equipado com uma lâmpada de xenônio operando em modo *hot-spot*. As determinações foram realizadas em dois tipos de chama, ar - acetileno e óxido nitroso - acetileno, com queimador de 50 mm em ângulo de 0° em relação ao feixe luminoso. Para a remoção dos particulados formados durante a combustão do acetileno com óxido nitroso, foi utilizado o *scraper*, acessório específico para este tipo de chama. Os dados relativos à altura de leitura, vazão de acetileno, comprimento de onda, sensibilidade relativa e número de *pixels* utilizados para avaliação do sinal para cada analito estão na Tabela II.

Tabela II: Parâmetros instrumentais usados nas medidas por HR-CS FS-FAAS.

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Sensibilidade relativa (%)	Tipo de chama	Vazão de C ₂ H ₂ (L h ⁻¹)	Altura de leitura (mm)	<i>Pixels</i> avaliados
Be	234,861	100	C ₂ H ₂ -N ₂ O	240	6	*CP±1
Ca	239,856	1,1	C ₂ H ₂ -N ₂ O	210	6	CP±1
Sr	460,733	100	C ₂ H ₂ -N ₂ O	210	6	CP
Co	240,725	100	C ₂ H ₂ -Ar	80	7	CP±1
Cu	324,754	100	C ₂ H ₂ -Ar	40	5	CP±1
K	404,720	0,24	C ₂ H ₂ -Ar	50	5	CP
Li	670,785	100	C ₂ H ₂ -Ar	45	4	CP±1
Mn	279,827	67	C ₂ H ₂ -Ar	60	6	CP±1
Na	330,237	0,48	C ₂ H ₂ -Ar	50	6	CP±1
Rb	780,027	100	C ₂ H ₂ -Ar	45	5	CP

*CP – *Pixel* central do sinal de absorção atômica.

A área do pico dos sinais de absorção atômica foi sempre empregada para a quantificação do sinal analítico (transiente), com um tempo de integração de 7,0 s, obtendo-se assim maior precisão nos resultados (menor desvio padrão relativo, RSD) se comparados com aqueles obtidos a partir da altura. A taxa de aspiração foi de aproximadamente 8,0 mL min⁻¹. As vazões de ar e de óxido nitroso foram constantes ao longo da análise, 460 e 370 L h⁻¹,

respectivamente. Uma válvula de injeção SFS6 (Analytik Jena AG, Alemanha) foi usada, com tempo de injeção e tempo de preenchimento do tubo de 1,5 e 15,0 s respectivamente.

Um forno de microondas modelo Microwave 3000 (Anton Paar AP, Áustria) foi utilizado para digestão das amostras de vinho envolvidas na avaliação do tipo de pré-tratamento (análise direta ou digestão). Foi usado um rotor com capacidade para oito tubos de quartzo, em sistema fechado. Nas digestões foram utilizados H₂O₂ 35% (Merck, Alemanha) e HNO₃ purificado em um destilador de quartzo (Kurner Analytenteknik, Rosenheim, Alemanha).

Para a comparação de resultados foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com determinação simultânea, modelo MPX-CCD da Varian (Milgrave, Australia), na configuração radial. O sistema é equipado com detector de estado sólido CCD e sistema Peltier refrigerado a -35 °C. O policromador *Echelle* quando estabilizado a 34 °C promove a cobertura das linhas de emissão compreendidas na faixa espectral de 167 a 785 nm.

Para a determinação dos microelementos foi utilizado um nebulizador ultra-sônico, modelo CETAC U-5000 AT⁺ da CETAC Technologies (Omaha, NE, USA) e para os macroelementos foi empregada uma câmara de nebulização, modelo Sturman-Masters da Varian (Milgrave, Australia).

Os parâmetros instrumentais e os procedimentos utilizados para as determinações de metais nas amostras de vinhos, pela técnica de ICP OES, estão apresentados no Anexo I.

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para todos os procedimentos foram utilizados somente reagentes de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), resultando em água com uma resistividade de 18 MΩ cm a 25 °C.

Toda a vidraria utilizada para preparação de soluções, assim como os frascos usados para armazenar as amostras e soluções padrão, foram lavados e descontaminados através da imersão destes em um banho de 10% (v/v) de ácido nítrico em água ultra pura, por pelo menos 24 horas. Após, os frascos foram enxaguados com água ultra pura em excesso.

As soluções de trabalho foram preparadas, diariamente, a partir de diluições adequadas das soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ Specsol (Quimlab, Brasil) para Be, Co, Cu, Li, Mn, Rb, Sr e de 10.000 mg L⁻¹ para Ca, K, Na, Mg. As soluções estoque de 10.000 mg L⁻¹ foram preparadas a partir dos sais cloreto de cálcio P.A. (Merck, Alemanha), cloreto de potássio P.A. (Merck, Alemanha), cloreto de sódio P.A. (Merck, Alemanha) e sulfato de magnésio P.A. (Merck, Alemanha). Em todas as soluções, padrões e brancos, adicionou-se um volume de HCl, purificado por destilação *sub-boiling* em um destilador de quartzo (Kurner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha), suficiente para que a concentração final fosse de 1,0% (v/v), 1,0% (m/v) de césio P.A. (Sigma - Aldrich, EUA) e 8,0% de Etanol (Merck, Alemanha).

3.3 AMOSTRAS E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de vinho foram obtidas de diferentes regiões do Brasil. Todas foram armazenadas em local adequado (geladeira) para preservação das propriedades do vinho e em frascos de plástico, previamente descontaminados. As amostras foram produzidas a partir de uvas *cabernet sauvignon* das regiões Nordeste e Sul (Tabela III). As amostras SGa representam toda região da Serra Gaúcha, menos a região do Vale dos Vinhedos (VVi) e Pinto Bandeira (PBa), que possuem amostras específicas, já que as mesmas possuem o certificado de Indicação de Procedência (IP).

Tabela III: Siglas das 32 amostras de vinho *cabernet sauvignon* conforme a localidade de coleta de matéria prima.

Sigla	Número de amostras	Região produtora
SGa	6	Serra Gaúcha (RS)
VVi	4	Vale dos Vinhedos (RS)
PBa	4	Pinto Bandeira (RS)
CCS	4	Campos de Cima da Serra (RS)
CGa	6	Campanha Gaúcha (RS)
SCa	4	Serra Catarinense (SC)
OPR	2	Oeste do Paraná (PR)
VSF	2	Vale do São Francisco (BA e PE)

O estudo foi baseado em amostras não comerciais, fornecidas por vinícolas localizadas em 8 regiões diferentes do Brasil. As amostras de vinho foram preparadas especificamente para este trabalho. As vinícolas produziram o vinho com uvas *cabernet sauvignon*, cultivadas em localidades específicas em cada região, no ano de 2009, conforme procedimento padrão de produção de cada empresa. Isso proporciona mais relevância ao presente trabalho, visto que existe uma garantia quanto à procedência das amostras (sua origem geográfica). Esta situação, porém, não pode ser garantida ao se avaliar amostras de vinho comerciais.

As amostras foram analisadas diretamente, diluídas na proporção 2 + 1, ou seja, duas partes de vinho e uma de água ultra pura, num total de 15,0 mL. Foi adicionado em todas as amostras uma quantidade suficiente de Cs e HCl (concentrado) para resultar em uma concentração final de 1,0% m/v e v/v, respectivamente. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Algumas amostras foram escolhidas, aleatoriamente, para a avaliação do pré-tratamento a ser utilizado. Essas amostras passaram pelo procedimento de digestão em microondas, com sistema fechado, pela adição de 5,0 mL de amostra, 2,0 mL de H₂O₂, 1,0 mL de HNO₃ e 3,0 mL de H₂O ultra pura em tubos de quartzo. Foram inseridas lâmpadas UV (Anton Paar AP, Áustria), em cada tubo de quartzo, para auxiliar na foto-oxidação. Para a preparação do branco 8,0 mL de H₂O ultra pura, 2,0 mL de H₂O₂ e 1,0 mL de HNO₃ foram adicionados em outro tubo de quartzo. Cada batelada completa era composta por 6 tubos de quartzo para amostras e 2 tubos de quartzo para os brancos.

Seguiu-se o programa de aquecimento para a digestão conforme Tabela IV, onde a temperatura e a pressão máximas definidas para o processo foram 250 °C e 80 bar, respectivamente. Após terminada a etapa de digestão, adicionou-se 1,0% de Cs e o volume das amostras foi aferido à 15,0mL. As amostras foram preparadas em triplicata.

Tabela IV: Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para a digestão das amostras de vinho.

Etapas	Potência (W)	Tempo (min)	Ventilação (m³/h)
Rampa	900	10	127
Patamar 1	900	20	127
Patamar 2	0	15	190

3.4 PROCEDIMENTOS PARA AS MEDIDAS DAS AMOSTRAS DE VINHO

Para as medidas de cada padrão e amostra por HR-CS FS-FAAS seguiu-se sempre a mesma ordem Cu, Li, Rb, Na, K, Mn e Co para chama ar - acetileno e Ca, Sr e Be para chama óxido nitroso - acetileno. As condições de chama foram selecionadas automaticamente pelo *software* para cada analito, conforme prévia otimização. Sendo que uma das etapas da otimização consiste na organização dos elementos, de acordo com a vazão de acetileno, iniciando pelo elemento com menor consumo de combustível.

A otimização dos parâmetros da chama foi realizada, separadamente para cada analito, com uma amostra enriquecida pela adição de cada elemento, seguindo as variações automáticas de altura do queimador e fluxo de acetileno realizadas pelo *software* do instrumento. As curvas de calibração, para cada analito, foram construídas a partir de padrões multielementares de Cu, Li, Rb, Na, K, Mn, Co, Ca, Sr e Be com as concentrações mostradas na Tabela V. Para monitorar as variações do equipamento durante o tempo de trabalho, uma solução controle, composta pela adição de água ultra pura, 1% (v/v) de HCl, 10% (v/v) de etanol, 1% (m/v) de Cs, 0,2 mg L⁻¹ de Be e Li, 2,0 mg L⁻¹ de Co, Cu, Mn, Rb e Sr, e 50 mg L⁻¹ de Ca, K e Na, foi avaliada.

Tabela V: Concentrações dos diferentes padrões utilizados para a construção das curvas de calibração.

	Cu (mg L⁻¹)	Li (mg L⁻¹)	Rb (mg L⁻¹)	Na (mg L⁻¹)	K (mg L⁻¹)	Mn (mg L⁻¹)	Co (mg L⁻¹)	Ca (mg L⁻¹)	Sr (mg L⁻¹)	Be (mg L⁻¹)
Branco	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
Padrão 1	0,2	0,02	0,2	5,0	100,0	0,2	0,2	5,0	0,2	0,02
Padrão 2	0,5	0,05	0,5	10,0	200,0	0,5	0,5	10,0	0,5	0,05
Padrão 3	1,0	0,10	1,0	20,0	400,0	1,0	1,0	20,0	1,0	0,10
Padrão 4	2,0	0,20	2,0	40,0	800,0	2,0	2,0	40,0	2,0	0,20
Padrão 5	4,0	0,40	4,0	60,0	1200,0	4,0	4,0	80,0	4,0	0,40
Padrão 6	6,0	0,80	6,0	80,0	1500,0	6,0	6,0	100,0	6,0	0,60

3.5 PARÂMETROS DE MÉRITO

Os resultados apresentados nas tabelas e figuras são representados pela média de, ao menos, três replicatas. A incerteza é apresentada como \pm desvio padrão.

O limite de detecção é a quantidade mínima detectável, com uma dada certeza analítica. É uma medida da concentração ou massa do analito que, quando excedida, permite o reconhecimento, com uma dada certeza estatística, que a quantidade de analito na amostra é maior que o branco da mesma. O limite de detecção, LOD, é normalmente, determinado através de 10 medidas do branco da amostra (mesmo branco da curva de calibração) pela Equação 5:

$$LOD = 3\sigma / s \quad \text{Equação 5}$$

onde σ é o desvio padrão das medidas do branco e s é o coeficiente angular da curva de calibração, também conhecido como sensibilidade^{22, 61}.

O limite de quantificação (LOQ) pode ser definido como a menor massa ou concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente com um risco de erro menor que 5% e é calculado pela Equação 6.

$$LOD = 10\sigma / s \quad \text{Equação 6}$$

onde σ é o desvio padrão da resposta (medidas da solução branco) e s é o coeficiente angular da curva analítica de calibração. A concentração característica, C_0 , é a concentração do analito correspondente a uma absorvância integrada de 0,0044 s (1% de absorção). A C_0 foi calculada proporcionalmente, utilizando-se um dos padrões da curva de calibração^{22, 61}.

A exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor verdadeiro. Os processos usualmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados (CRM), comparações interlaboratoriais, realização de ensaios de recuperação e comparação de métodos²¹. Para este trabalho, dada a ausência de um material de referência certificado de vinho, a exatidão foi avaliada pela comparação de métodos (HR-CS FS-FAAS *versus* ICP OES), ensaios de recuperação e comparação com uma amostra interlaboratorial.

Como não existe material de referência certificado (CRM) para este tipo de amostra, uma amostra interlaboratorial, obtida pelo Lanagro - RS e cedida para este estudo, foi avaliada. Esta amostra utilizada no ensaio interlaboratorial foi produzida na França, com uvas *cabernet sauvignon* no ano de 2011. Foram avaliadas algumas das propriedades físico-

químicas mais significativas em vinhos: açúcares, pH, graduação alcoólica, compostos orgânicos e inorgânicos, etc. Esta amostra interlaboratorial foi repassada para diversos laboratórios Europeus e os resultados avaliados de maneira independente para cada propriedade. Os resultados finais, de cada uma das propriedades, foram apresentados como a média de todos os laboratórios mais o desvio padrão.

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-las são por meio da repetitividade e reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão relativo (RSD). Como é dependente da concentração do analito deve ser determinada para diferentes concentrações do analito. No presente trabalho, portanto, a precisão foi avaliada observando valores de RSD, sendo considerados precisos aqueles resultados que apresentaram RSD inferior a 5%.

Ensaio de recuperação foram realizados pela adição de padrões aquosos em amostras de vinho, escolhidas aleatoriamente, de modo que a concentração final dos analitos fosse igual a: 0,1 mg L⁻¹ para Be e Li, 1,0 mg L⁻¹ para Co, Cu, Mn, Rb e Sr, 20 mg L⁻¹ para Ca e Na e 100 mg L⁻¹ para K.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PARÂMETROS INSTRUMENTAIS

Pela técnica de LS FAAS os elementos são determinados individualmente, ou seja, não é possível se determinar mais de um elemento em uma mesma amostra. Para se determinar mais de um elemento em uma mesma amostra é necessário ajustar as condições de operação do equipamento, como troca e condicionamento da lâmpada, para cada analito em questão²⁵.

Com o surgimento da técnica de HR-CS FAAS novas possibilidades de estudo surgiram, isto porque a técnica permite a determinação sequencial de diferentes elementos em uma mesma amostra. Isso se deve ao fato da existência de uma única lâmpada para todos os analitos e devido ao *software* trocar automaticamente as condições operacionais do equipamento, previamente otimizadas, de acordo com a sequência de analitos²⁶.

A otimização das condições de operação do equipamento foi realizada com uma amostra enriquecida com padrões de cada analito. O *software* realiza a otimização das condições de operação do equipamento, automaticamente, variando a vazão de acetileno e a altura do queimador. As condições selecionadas para os experimentos futuros foram as que apresentaram maior sinal analítico para cada elemento. Para determinar a taxa de aspiração, esta mesma amostra enriquecida com padrões foi utilizada. O ajuste da taxa foi realizado manualmente, observando-se a intensidade do sinal analítico de um único elemento. A taxa de aspiração foi ajustada de acordo com o comportamento do sinal analítico do Ca, visto que este elemento apresentava formação de compostos refratários, afetando sua absorvância final. A taxa de aspiração foi ajustada em aproximadamente $8,0 \text{ ml min}^{-1}$, sendo esta definida como a taxa para todos os analitos deste estudo.

Outra vantagem da técnica de HR-CS FAAS é a possibilidade do uso de linhas menos sensíveis sem perdas com relação à razão sinal/ruído²⁶. Para elementos como Be, Co, Cu, Li, Rb e Sr foram utilizadas as linhas mais sensíveis, já que através de algumas análises iniciais, estes metais foram encontrados em baixa concentração nas amostras. Já para os elementos Ca, K, Mn e Na foram utilizadas linhas menos sensíveis (Tabela II), devido as suas altas concentrações nas amostras. Se comprimentos de onda de maior sensibilidade fossem escolhidos para estes analitos, as amostras teriam que ser diluídas várias vezes para que os valores de absorvância ficassem dentro da faixa linear da curva, comprometendo a determinação de outros analitos.

A mesma estratégia foi utilizada para definir o número de *pixels* a serem avaliados (Tabela II). A relação entre sensibilidade, diluição e faixa linear da curva foi ajustada baseando-se no número de *pixels* utilizados para a avaliação do sinal de cada elemento. Para o cobre, por exemplo, foi selecionada a linha mais sensível 324,754 nm e a avaliação foi realizada em 3 *pixels* ($CP \pm 1$), aumentando sua sensibilidade. Já para o potássio foi selecionada uma linha com 0,24% de sensibilidade relativa (404,720 nm) e a avaliação foi realizada apenas no *pixel* central, respeitando a faixa linear do analito, evitando assim, a necessidade de diluição da amostra.

4.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS PARA INJEÇÃO EM FLUXO

A válvula SFS 6 é um diferencial deste trabalho. Com este acessório é possível manter a chama mais estável, isto é, a válvula controla a injeção de solução, variando entre amostra e água. Este sistema evita perdas em relação à temperatura da chama, injetando água entre uma amostra e outra. Outra característica fundamental da válvula é a injeção em fluxo, isto é, o consumo de amostra é reduzido significativamente se comparado aos métodos clássicos de FAAS.

Para que este sistema de injeção tenha funcionamento pleno (injeção em fluxo) é necessário que a válvula esteja habilitada e conectada ao equipamento e que o modo de integração do sinal analítico seja a área ou a altura. Com isso, as condições ideais de operação, com injeção em fluxo, da válvula SFS 6, foram avaliadas. O modo de integração escolhido para avaliação do sinal analítico foi a área, já que neste modo a sensibilidade é maior, assim como a precisão dos resultados (avaliando o RSD), comparando-se com o modo de integração por altura²⁵. A Figura 4 mostra o perfil do sinal analítico mediante a injeção em fluxo e o fluxo contínuo de uma amostra.

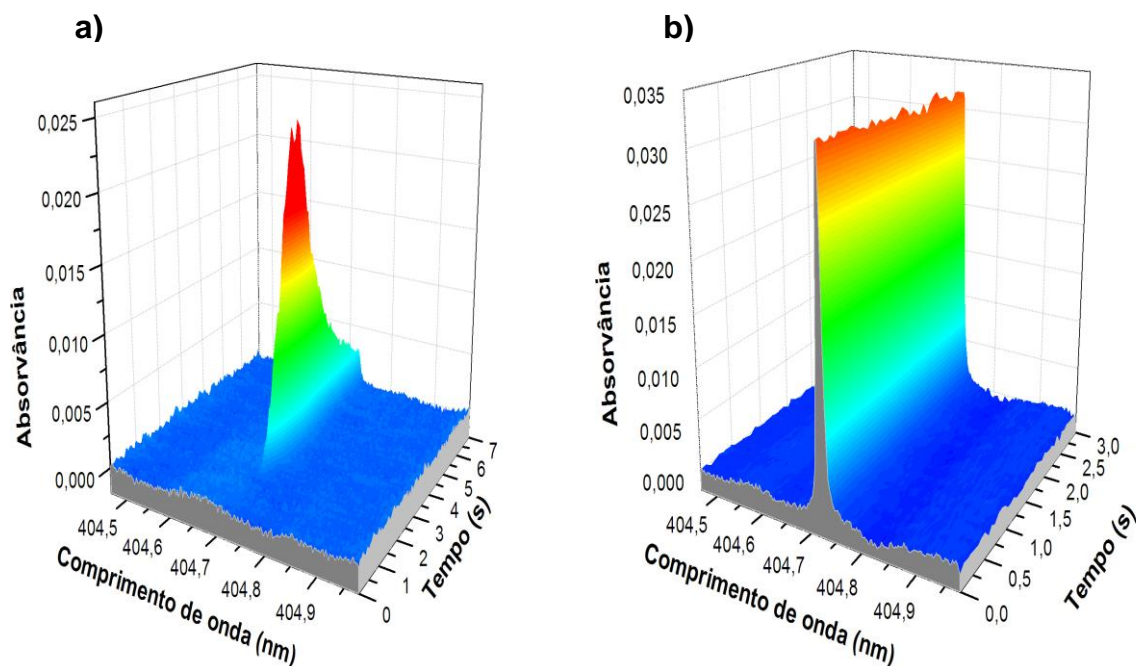


Figura 4: Perfil de absorção do sinal analítico do K, para amostra SGa, em diferentes modos de injeção: **a)** injeção em fluxo e **b)** fluxo contínuo de amostra.

Os parâmetros que definem o funcionamento adequado da válvula são o tempo de injeção e o tempo de preenchimento do tubo que leva amostra até a válvula. Estes parâmetros, juntamente com o tempo de integração, influenciam diretamente nas características dos picos formados, ou seja, obtenção de um pico simétrico com o menor tempo de análise possível.

O tempo de injeção está ligado à quantidade de amostra que é introduzida no atomizador, sendo que, quanto maior o tempo de injeção, maior deverá ser o tempo de integração do sinal analítico. Caso contrário o pico formado não será simétrico. Já o tempo de preenchimento do tubo que leva amostra até a válvula, influencia na homogeneidade da amostra na câmara de nebulização, visto que a amostra pode sofrer uma pequena diluição devido à presença de solução aquosa no tubo de transporte. O tempo, portanto, deve ser suficiente para que o tubo esteja totalmente preenchido, caso contrário, a repetitividade e a reprodutibilidade dos sinais analíticos serão prejudicadas.

Para otimização destes parâmetros, foi utilizada uma amostra de vinho, via análise direta (diluída 8 vezes, V_f de 40 mL) e o sinal analítico dos elementos Ca, K, Mn e Rb foi avaliado, levando em consideração o formato e a simetria dos picos obtidos. A Figura 5 mostra o perfil do sinal analítico, destes elementos, com tempos de injeção de 1,5 e 3,0 s, fixando os tempos de preenchimento do tubo e de integração do sinal em 15,0 e 7,0 s, respectivamente. Estes últimos foram obtidos após rápidos experimentos observando a precisão dos resultados, isto é, o desvio padrão relativo (RSD) e o perfil do pico dentro da janela espectral, respectivamente.

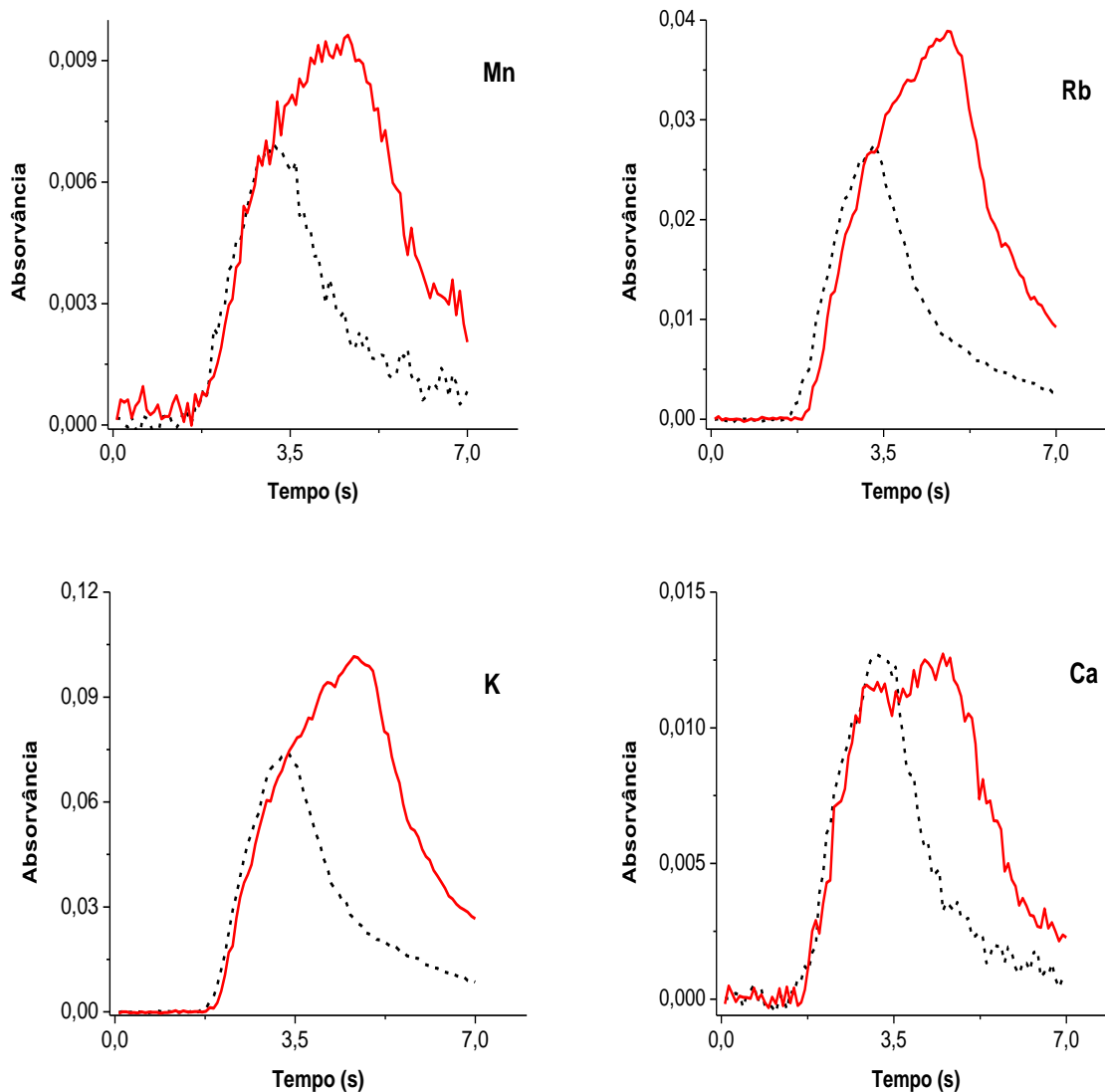


Figura 5: Avaliação do perfil de absorvância para manganês, rubídio, potássio e cálcio na amostra SGa, para diferentes tempos de injeção: — 3,0 s e 1,5 s.

Pela Figura 4, pode-se observar que o tempo de injeção que gerou o pico mais simétrico foi de 1,5 s. Para os experimentos futuros, portanto, ficaram definidos os parâmetros da válvula SFS 6, comuns para todos os analitos, aqueles obtidos pela otimização, isto é, 1,5 s para o tempo de injeção, 15,0 s para o tempo de preenchimento do tubo e 7,0 s para o tempo de integração.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram avaliadas em relação a diferentes pré-tratamentos, para tanto foram comparadas duas estratégias diferentes: via análise direta e via digestão assistida por microondas.

Inicialmente foram avaliadas as condições de digestão, volume de amostra, potência do microondas e tempo de digestão (sem contar o tempo de refrigeração). Volumes de 5, 7 e 10 mL de amostra foram testados. Para os volumes de 7 e 10 mL não houve digestão completa (coloração escura) e para o volume de 5 mL a digestão foi parcial (coloração amarelo claro), com 800 W de potência e tempo de 45 minutos de digestão.

Alterando os parâmetros do microondas, ou seja, aumentando o tempo de digestão para 60 minutos e a potência do microondas para 1000 W, não foram observadas mudanças significativas para os volumes de 7 e 10 mL, permanecendo a coloração escura. Já a amostra com 5 mL passou a apresentar coloração transparente (incolor). Foi investigado, também, a utilização de um processo fotoquímico de oxidação acoplado ao microondas, onde lâmpadas UV foram inseridas nos tubos de quartzo. Estes sistemas, operando simultaneamente, reduziram o tempo de digestão, de 5 mL de amostra, para 30 minutos com uma potência de 900 W. Já as amostras com 7 e 10 mL permaneceram sem digestão completa nestas condições. Para as próximas etapas, portanto, foram utilizadas as lâmpadas UV acopladas ao microondas, com tempo de digestão e potência de 30 minutos e 900 W, respectivamente. Após a digestão, as amostras foram quantitativamente transferidas para frascos de plástico (previamente descontaminados) e o volume aferido para 40 mL.

Posteriormente, as amostras submetidas à digestão assistida por microondas, foram comparadas quanto à diluição, assim como, quanto à possibilidade de avaliação via análise direta (com o mesmo fator de diluição). Para análise direta, 5 mL de amostra, foram transferidos diretamente para um frasco de plástico, previamente descontaminado, e o volume aferido em 15 mL. A Figura 6 expressa estas comparações, onde é possível observar as diluições de 15 e 40 mL (volume final, V_f) para as amostras que passaram pelo procedimento de digestão e a amostra analisada via análise direta, também com volume final de 15 mL.

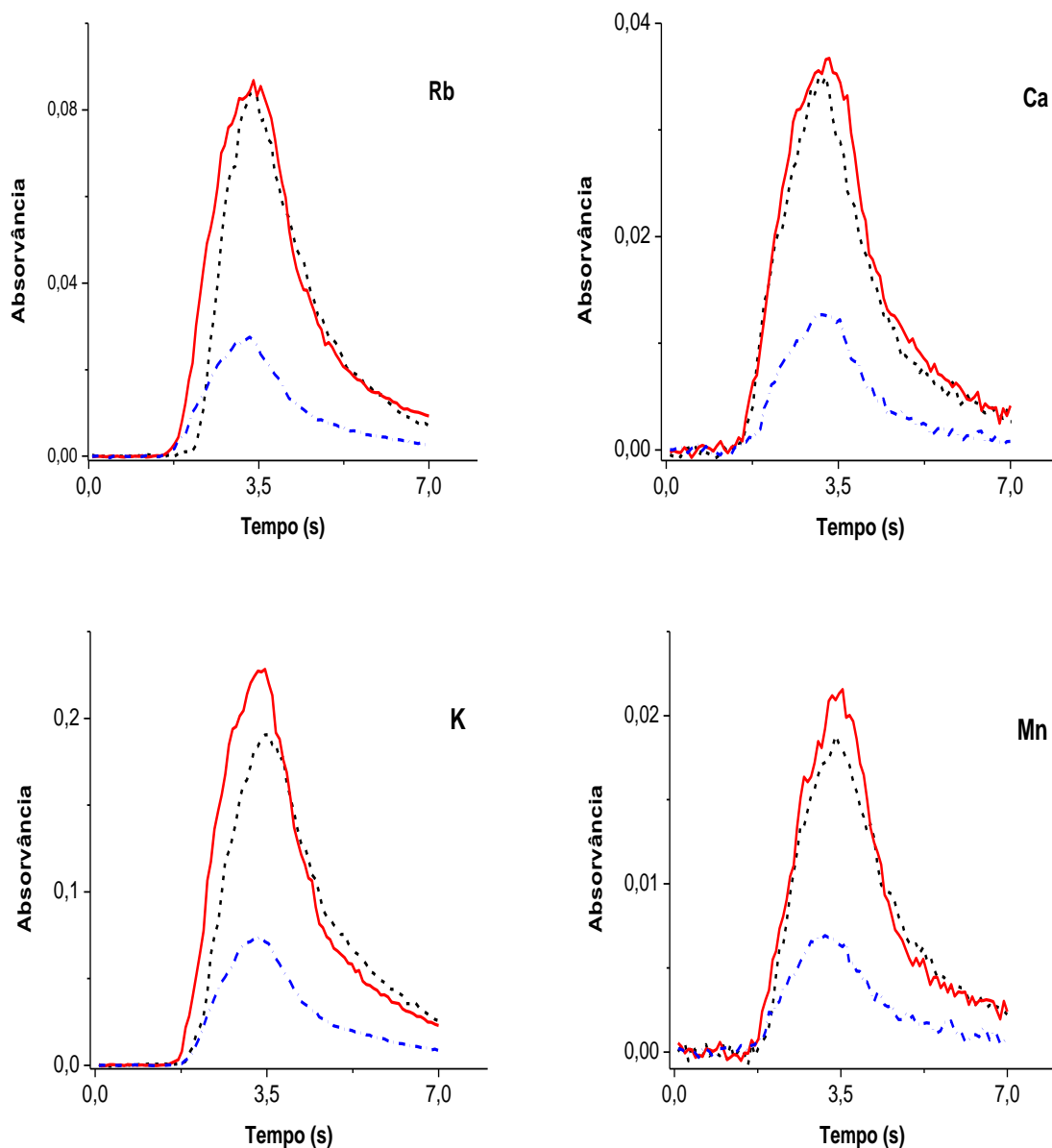


Figura 6: Avaliação do sinal analítico de Ca, K, Mn e Rb, para a amostra SGa, mediante diferentes pré-tratamentos: — análise direta (15 mL, V_f), amostra digerida (15 mL, V_f) e - - - amostra digerida (40 mL, V_f).

Avaliando a Figura 6, foi constatado que o sinal analítico, via análise direta, teve comportamento idêntico ao sinal obtido pelo procedimento de digestão (com mesmo fator de diluição). Analisando diretamente a amostra sabe-se que o consumo de reagentes é menor, a possibilidade de contaminação é menor e que o tempo do ciclo analítico fica bastante reduzido²⁴. Assim, foi definido o emprego da análise direta nas etapas futuras.

Como a absorvância integrada é diretamente proporcional a quantidade de amostra injetada no atomizador, foi utilizado um pequeno fator de diluição para adição de reagentes. As amostras, portanto, foram diluídas na proporção 2 + 1, ou seja, duas partes de amostra e uma de água ultra pura. Inicialmente foi adicionado apenas ácido clorídrico em concentração final de 1% (v/v).

Nas primeiras determinações, foi observado que o potássio estava presente em alta concentração nas amostras. Sendo o potássio conhecido por sua característica de supressor de ionização, foram realizados testes para avaliar se variações em sua concentração influenciariam o sinal dos outros analitos. A chama afeta diretamente a ionização dos elementos que possuem baixa energia de ionização como Rb (4,2 eV) na chama ar - acetileno e Ca (6,1 eV) e Sr (5,7 eV) na chama óxido nitroso - acetileno. Estes elementos são mais sensíveis às variações de concentração de K (4,3 eV), pois este poderá afetar o equilíbrio da ionização, isto é, a sensibilidade dos analitos. Já elementos como Cu (7,7 eV), Co (7,9 eV), Mn (7,4 eV), Na (5,1 eV) e Li (5,4 eV), com energias de ionização mais elevadas, não sofrem influência do potássio na chama ar - acetileno. Assim como o Be (9,3 eV) na chama óxido nitroso – acetileno²⁵.

Sabendo que o potássio também era alvo deste estudo, o elemento céσιο, foi incluído nos experimentos como supressor de ionização. O Cs é o principal supressor de ionização, pois sua baixa energia de ionização, de 3,9 eV, faz com que ele se ionize mais facilmente, aumentando a quantidade de elétrons na chama, evitando que outros elementos sejam ionizados²⁵.

Assim, o céσιο foi adicionado tanto em padrões como em amostras e brancos. A quantidade deste elemento a ser adicionada foi investigada. A absorvância integrada, de cada analito, foi avaliada para concentrações de 50, 250, 500, 1.000, 10.000 e 50.000 mg L⁻¹ de Cs. Os elementos Cu, Li, Rb, Na, K, Mn, Co, Ca, Sr e Be foram avaliados e, como esperado, aqueles com baixa energia de ionização Rb (chama ar - acetileno), Ca e Sr (chama óxido nitroso - acetileno) foram mais influenciados pela variação na concentração de Cs. Os outros analitos não foram significativamente afetados, mantendo uma variação do sinal analítico menor que 5% para o RSD.

Pela Figura 7, pode-se observar que para uma concentração de Cs entre 1.000 e 10.000 mg L⁻¹ o sinal dos elementos mais propensos a ionização (Rb, Ca e Sr) se manteve praticamente inalterado, formando um patamar, ou seja, a ionização destes elementos foi

suprimida pela presença de Cs. Para a concentração de césio de 50.000 mg L⁻¹ o sinal analítico de todos os elementos avaliados diminuiu significativamente, este fato ocorreu devido à interferência de transporte existente devido ao excesso de Cs, dificultando a formação do aerosol que chega no queimador²⁵. Sendo então, 10.000 mg L⁻¹ ou 1% (m/v) a concentração de Cs utilizada nos experimentos futuros.

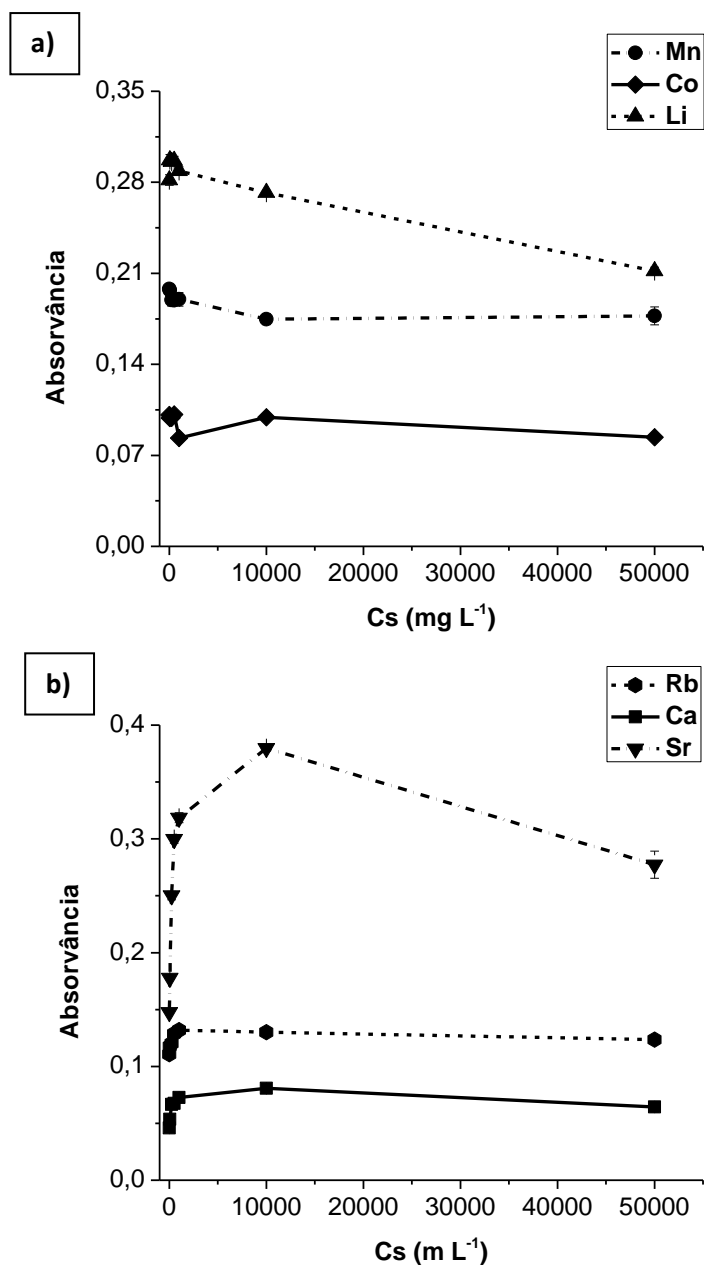


Figura 7: Avaliação do sinal analítico para diferentes concentrações de césio para a amostra SGa enriquecida com 1 mg L⁻¹ de Co, Li, Mn, Sr e Rb e 10 mg L⁻¹ de Ca. **a)** Elementos que não foram influenciados pelo Cs: Li, Mn, Co e **b)** elementos que sofreram influência no sinal: Rb, Ca, Sr.

4.4 PARÂMETROS DE MÉRITO

Concluídas as etapas de otimização, estabelecimento das condições operacionais do equipamento e preparo de amostras, as curvas de calibração para cada analito foram construídas. Os parâmetros de mérito encontrados estão na Tabela VI.

Tabela VI: Parâmetros de mérito para a determinação de Cu, Li, Rb, Na K, Mn, Co, Ca, Sr e Be por HR-CS FS-FAAS.

Elementos	$A_{int}=b+aC$ (mg L ⁻¹)	R	C ₀ (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Cu	$A_{int}=0,0070+0,1825C$	0,9995	0,02	0,04	0,15
Li	$A_{int}=0,0053+0,7907C$	0,9997	0,006	0,005	0,02
Rb	$A_{int}=0,0074+0,1492C$	0,9997	0,03	0,02	0,06
Na	$A_{int}=0,0050+0,0087C$	0,9997	0,51	0,90	3,0
K	$A_{int}=0,0052+0,0006C$	0,9997	7,3	4,4	14,5
Mn	$A_{int}=0,0162+0,1622C$	0,9995	0,02	0,04	0,14
Co	$A_{int}=0,0050+0,1070C$	0,9996	0,04	0,06	0,20
Ca	$A_{int}=0,0077+0,0074C$	0,9995	0,55	0,92	3,1
Sr	$A_{int}=0,0098+0,1155C$	0,9994	0,04	0,02	0,05
Be	$A_{int}=0,0033+1,089C$	0,9995	0,005	0,02	0,08

Para todos os analitos investigados observam-se valores de coeficientes de correlação próximos a 1,000, ou seja, evidenciando uma boa correlação linear e absorvância e concentração. Os valores de LOD e LOQ encontrados foram relativamente maiores, para Cu (324,754 nm) e Ca (239,856 nm), se comparados a outros trabalhos realizados com HR-CS FAAS, como reportado por Oliveira et al.⁴² em amostras de folhas de plantas, com LOD em torno de 0,008 mg L⁻¹ para Cu e 0,60 mg L⁻¹ para Ca. Esta diferença é devido à quantidade de solução que chega ao atomizador, ou seja, pela injeção em fluxo o volume injetado no queimador é menor que o volume injetado por um fluxo de aspiração contínuo, diminuindo a população de átomos livres no caminho ótico. A literatura não reporta estudos com os elementos Be (234,861 nm), Co (240,725 nm), Li (670,785 nm), Rb (780,027 nm) e Sr (460,733 nm) por HR-CS FAAS, assim como não reporta o uso das linhas de 404,720 nm para o K, de 330,237 nm para o Na e de 789,827 nm para Mn.

No trabalho de Oliveira et al.⁴², avaliando amostras de folhas de plantas por HR-CS FAAS, a linha de 404,414 nm para o K (0,5% de sensibilidade relativa, CP±1) foi utilizada e o LOD encontrado foi de 0,40 mg L⁻¹. Com base neste valor, foi realizada uma estimativa do valor do LOD. Para tanto foi feito um cálculo proporcional considerando a sensibilidade de 0,24% para linha de 404,720 nm do K (CP) e encontrado um valor de 0,83 mg L⁻¹ para o LOD estimado. Porém, no presente trabalho, o valor determinado para o LOD na linha 404,720 nm foi 4,4 mg L⁻¹. Este fato também pode ser atribuído ao volume de amostra injetado no atomizador, assim como pelo número de *pixels* avaliados. Ainda que os valores de LOD e LOQ encontrados sejam superiores aos reportados na literatura, os mesmos podem ser considerados adequados para os fins que se destinam, já que os valores recomendados pela legislação são bem superiores, conforme Tabela I.

No trabalho de Ieggli et al.⁶², avaliando Ca, K e Na em amostras de ovos por LS FAAS os LOD's reportados foram de 0,11 mg L⁻¹ para Ca, 0,04 mg L⁻¹ para K e 0,02 mg L⁻¹ para Na. Os elementos foram avaliados em suas linhas com 100% de sensibilidade. Novamente foi realizada uma estimativa dos valores de LOD's. Para tanto foi realizado o cálculo proporcional com base nos valores reportados, considerando as linhas utilizadas neste trabalho e suas respectivas sensibilidades: 1,1% para Ca (239,856 nm), 0,24% para K (404,720 nm) e 0,48% para Na (330,237 nm). O valores estimados foram de 10 mg L⁻¹ para Ca, 16,7 mg L⁻¹ para K e 4,1 mg L⁻¹ para Na. Comparando estes valores estimados de LOD's com os obtidos no presente estudo (Tabela VI), para cada um dos elementos (Ca, K e Na), observa-se que a técnica HR-CS FS-FAAS apresenta melhor sensibilidade que a técnica LS FAAS. Isto ocorre como esperado, pois a intensidade da fonte de emissão de radiação é constante, mesmo para as linhas secundárias, ou seja, não há perdas na razão sinal/ruído.

Ao longo dos dias um fator de correção foi utilizado para ajustar a curva de calibração. O fator de correção foi obtido analisando-se uma solução padrão (preparada diariamente) e comparado com o valor obtido, para aquela concentração, na curva de calibração. Os valores dessa solução padrão tiveram pequena variação ao longo dos dias de trabalho, com RSD < 5%, apenas Cu, Li e Be apresentaram RSD entre 5 e 10%, indicando que o fator de correção pode ser utilizado para ajustar a curva de calibração. As triplicatas determinadas para cada elemento, pelo método desenvolvido, também apresentaram RSD menor que 5%. Pela observação do RSD encontrado para a solução padrão, avaliada

diariamente e dos desvios padrões relativos (RSD's) das triplicatas, para as 32 amostras estudadas, o método foi comprovado como preciso.

Uma amostra de um ensaio interlaboratorial⁶³ foi analisada, onde as concentrações de Ca, K e Na foram determinadas por laboratórios nacionais e internacionais, usando diferentes técnicas de análise. Os resultados encontrados para esta amostra usando-se HR-CS FS-FAAS estão de acordo com os obtidos pelos outros laboratórios, como pode ser observado na Tabela VII. Os valores foram confirmados (conforme Anexo II) serem estatisticamente idênticos, com 95% de confiança, através do teste *t - Student*, usando como ferramenta o *software Statistica*. Pode-se, portanto, afirmar que para determinação de Ca, K e Na em amostras de vinho, o método desenvolvido é exato e adequado.

Tabela VII: Determinação de Ca, K e Na, em mg L⁻¹, por HR-CS FS-FAAS na amostra Interlaboratorial 2012.

	Na	K	Ca
Valores encontrados	18,3 ± 0,1	968 ± 11	63 ± 1
Valores de referência	18 ± 2	907 ± 60	68 ± 5

Como uma das etapas de validação do método desenvolvido, ensaios de recuperação foram realizados, os resultados são mostrados na Tabela VIII. As recuperações foram realizadas através de fortificações, em 3 amostras de vinho. A concentração final de cada fortificação adicionada foi de 0,1 mg L⁻¹ para Li e Be, 1,0 mg L⁻¹ para Co, Cu, Mn, Rb e Sr, 20 mg L⁻¹ para Ca e Na e 100 mg L⁻¹ para K. Os resultados das recuperações foram muito satisfatórios, mostrando não haver nenhuma interferência significativa da amostra sobre os analitos estudados bem como entre os analitos.

Tabela VIII: Recuperações obtidas pelo método de HR-CS FS-FAAS para amostras de vinhos. Valores dados em percentagem (%).

	Cu	Li	Rb	Na	K	Mn	Co	Ca	Sr	Be
Pinto Bandeira 2	100	103	103	110	103	104	109	110	96	102
Campanha Gaúcha 5	95	101	91	109	91	106	102	110	98	110
Pinto Bandeira 3	105	99	95	108	107	103	110	95	91	94

4.5 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS DE VINHO DO BRASIL

As amostras de vinho provenientes das 8 regiões alvo deste estudo foram avaliadas pelo método de HR-CS FS-FAAS desenvolvido neste trabalho. As Tabelas IX, X, XI, XII, XIII, XIV e XV mostram a quantificação dos elementos Cu, Mn, Rb, Sr, Ca, Na e K em mg L^{-1} , respectivamente, para cada uma das regiões avaliadas. Os elementos Be, Co e Li não foram detectados nas amostras avaliadas, isto é, os valores encontrados ficaram abaixo do LOQ de cada analito, em todas as amostras.

Pelos resultados encontrados para cobre (Tabela IX), foi observado que a maioria das amostras apresentou valores de concentração abaixo do LOQ ($0,15 \text{ mg L}^{-1}$). Porém, alguns vinhos produzidos em determinadas regiões (Campos de Cima da Serra 2, Campos de Cima da Serra 4, Pinto Bandeira 3, Serra Gaúcha 4 e Serra Gaúcha 6), apresentam concentração de cobre acima do limite recomendado pela legislação brasileira ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$, Tabela I). Esta contaminação poder ser decorrente do uso de CuSO_4 , como fungicida, sobre a uva, ou ainda devido a contaminação por equipamentos (válvulas, pipas, tubulações, etc.) utilizados na produção do vinho^{6,7}.

Os teores dos elementos Mn (Tabela X), Rb (Tabela XI) e Sr (Tabela XII) têm importância significativa sobre as propriedades organolépticas do vinho, assim como para diferenciação da origem do vinho produzido (denominação de origem, DO)^{10, 20, 48}. A quantificação destes elementos, portanto, foi fundamental neste trabalho. Nas amostras analisadas os valores encontrados para Mn, Rb e Sr variaram entre $1,6$ e $8,6 \text{ mg L}^{-1}$, $2,0$ e $9,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,10$ e $2,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Em todas as amostras analisadas os limites de Ca (300 mg L^{-1}) e Na (230 mg L^{-1}) ficaram abaixo das limites estabelecidos pela resolução 45/96 do MERCOSUL (Tabela I), ou seja, todos os vinhos estudados estão dentro do limite recomendado para Ca e Na. Estes elementos, no entanto, apresentaram grande variação dentro das regiões avaliadas e mesmo entre as regiões observadas, variando de $8,8$ a 54 mg L^{-1} para Na (Tabela XIII) e $5,1$ a 96 mg L^{-1} para Ca (Tabela XIV) dentro de uma mesma região. O sódio pode ser adicionado na forma de estabilizante/conservante ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, metabissulfito de sódio) e o cálcio pode ser inserido no vinho pela filtragem (filtro de terra diatomácea) ou pela adição na forma de CaCO_3 para corrigir o pH^{6,7}.

Os valores encontrados para potássio (Tabela XV) variaram de 628 a 2457 mg L⁻¹ e sua determinação também teve influência na discriminação das regiões produtoras. O potássio é conhecido como elemento essencial para saúde humana, e a quantidade encontrada nas amostras de vinho mostra como essa bebida pode contribuir significativamente, se consumida moderadamente, para nossa saúde.

Tabela IX: Resultados das regiões avaliadas para concentração de cobre por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES (n = 3).

Região	Concentração em mg L ⁻¹	
	HR-CS FS-FAAS*	ICP OES**
Campanha Gaúcha 1	< LOQ	0,09±0,02
Campanha Gaúcha 2	< LOQ	0,15±0,02
Campanha Gaúcha 3	< LOQ	0,020±0,005
Campanha Gaúcha 4	0,20±0,01	0,21±0,01
Campanha Gaúcha 5	< LOQ	0,12±0,01
Campanha Gaúcha 6	< LOQ	<LOQ
Campos de Cima da Serra 1	< LOQ	0,12±0,004
Campos de Cima da Serra 2	1,4±0,01	1,2±0,1
Campos de Cima da Serra 3	< LOQ	0,035±0,005
Campos de Cima da Serra 4	1,5±0,03	1,2±0,2
Oeste do Paraná 1	< LOQ	<LOQ
Oeste do Paraná 2	< LOQ	0,081±0,003
Pinto Bandeira 2	< LOQ	<LOQ
Pinto Bandeira 1	< LOQ	<LOQ
Pinto Bandeira 3	1,27±0,02	0,97±0,01
Pinto Bandeira 4	< LOQ	<LOQ
Serra Catarinense 2	< LOQ	0,16±0,01
Serra Catarinense 3	< LOQ	<LOQ
Serra Catarinense 4	< LOQ	0,074±0,002
Serra Gaúcha 1	< LOQ	0,058±0,003
Serra Gaúcha 2	< LOQ	0,17±0,01
Serra Gaúcha 3	< LOQ	<LOQ
Serra Gaúcha 4	3,2±0,02	3,3±0,2
Serra Gaúcha 5	< LOQ	0,14±0,01
Serra Gaúcha 6	3,29±0,04	3,1±0,2
Vale do São Francisco 1	0,48±0,01	0,30±0,02
Vale do São Francisco 2	0,34±0,01	0,18±0,01
Vale dos Vinhedos 1	< LOQ	0,111±0,005
Vale dos Vinhedos 2	< LOQ	0,050±0,003
Vale dos Vinhedos 3	< LOQ	0,110±0,002
Vale dos Vinhedos 4	0,42±0,01	0,39±0,02

(*) LOQ = 0,15 mg L⁻¹, (**) LOQ = 0,01 mg L⁻¹

Tabela X: Resultados das regiões avaliadas para concentração de manganês por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES (n = 3).

Região	Concentração em mg L ⁻¹	
	HR-CS FS-FAAS	ICP OES
Campanha Gaúcha 1	8,56±0,06	8,2±0,3
Campanha Gaúcha 2	6,52±0,05	6,3±0,3
Campanha Gaúcha 3	2,33±0,02	2,5±0,1
Campanha Gaúcha 4	4,12±0,04	4,0±0,1
Campanha Gaúcha 5	4,63±0,06	4,9±0,2
Campanha Gaúcha 6	1,83±0,02	1,9±0,1
Campos de Cima da Serra 1	5,98±0,04	6,0±0,3
Campos de Cima da Serra 2	2,88±0,02	2,8±0,1
Campos de Cima da Serra 3	6,12±0,09	5,8±0,3
Campos de Cima da Serra 4	4,03±0,04	4,2±0,1
Oeste do Paraná 1	6,13±0,07	7,0±0,3
Oeste do Paraná 2	3,35±0,05	3,2±0,1
Pinto Bandeira 1	1,56±0,03	1,7±0,1
Pinto Bandeira 2	1,76±0,01	1,8±0,1
Pinto Bandeira 3	2,09±0,02	2,4±0,1
Pinto Bandeira 4	2,64±0,04	2,5±0,1
Serra Catarinense 1	4,63±0,02	4,8±0,2
Serra Catarinense 2	4,97±0,04	5,4±0,2
Serra Catarinense 3	4,17±0,01	4,5±0,2
Serra Catarinense 4	2,63±0,02	2,6±0,1
Serra Gaúcha 1	4,10±0,04	3,8±0,1
Serra Gaúcha 2	3,09±0,03	2,9±0,1
Serra Gaúcha 3	3,10±0,01	3,0±0,1
Serra Gaúcha 4	7,20±0,09	7,8±0,3
Serra Gaúcha 5	3,48±0,01	3,3±0,1
Serra Gaúcha 6	7,42±0,10	6,7±0,3
Vale do São Francisco 1	1,74±0,03	1,5±0,1
Vale do São Francisco 2	1,58±0,02	1,8±0,1
Vale dos Vinhedos 1	6,36±0,12	5,9±0,3
Vale dos Vinhedos 2	2,60±0,02	2,4±0,1
Vale dos Vinhedos 3	5,07±0,04	5,2±0,1
Vale dos Vinhedos 4	6,06±0,06	6,0±0,1

Tabela XI: Resultados das regiões avaliadas para concentração de rubídio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES (n = 3).

Região	Concentração em mg L ⁻¹	
	HR-CS FS-FAAS	ICP OES
Campanha Gaúcha 1	4,45±0,02	4,2±0,3
Campanha Gaúcha 2	4,39±0,04	4,4±0,4
Campanha Gaúcha 3	4,79±0,05	4,5±0,3
Campanha Gaúcha 4	3,73±0,04	3,5±0,2
Campanha Gaúcha 5	6,66±0,12	6,1±0,5
Campanha Gaúcha 6	2,29±0,03	2,1±0,2
Campos de Cima da Serra 1	2,81±0,02	2,9±0,1
Campos de Cima da Serra 2	2,17±0,01	2,2±0,1
Campos de Cima da Serra 3	3,57±0,03	3,4±0,2
Campos de Cima da Serra 4	3,29±0,03	3,3±0,1
Oeste do Paraná 1	4,35±0,03	4,2±0,1
Oeste do Paraná 2	4,77±0,09	4,7±0,2
Pinto Bandeira 1	7,55±0,04	7,7±0,6
Pinto Bandeira 2	4,01±0,02	3,6±0,2
Pinto Bandeira 3	6,94±0,06	6,2±0,5
Pinto Bandeira 4	7,80±0,05	7,7±0,1
Serra Catarinense 1	5,84±0,04	5,6±0,3
Serra Catarinense 2	3,95±0,03	3,7±0,2
Serra Catarinense 3	6,12±0,04	6,0±0,1
Serra Catarinense 4	4,05±0,03	3,8±0,3
Serra Gaúcha 1	6,38±0,04	6,3±0,2
Serra Gaúcha 2	5,90±0,06	6,1±0,2
Serra Gaúcha 3	4,08±0,05	3,6±0,3
Serra Gaúcha 4	6,39±0,06	6,2±0,2
Serra Gaúcha 5	4,63±0,04	4,7±0,2
Serra Gaúcha 6	6,17±0,05	6,3±0,3
Vale do São Francisco 1	2,71±0,02	2,6±0,1
Vale do São Francisco 2	1,99±0,01	2,0±0,1
Vale dos Vinhedos 1	8,98±0,12	9,1±0,5
Vale dos Vinhedos 2	5,60±0,06	5,2±0,3
Vale dos Vinhedos 3	4,43±0,05	4,7±0,3
Vale dos Vinhedos 4	7,60±0,07	7,4±0,2

Tabela XII: Resultados das regiões avaliadas para concentração de estrôncio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES (n = 3).

Região	Concentração em mg L ⁻¹	
	HR-CS FS-FAAS*	ICP OES**
Campanha Gaúcha 1	0,72±0,01	0,74±0,04
Campanha Gaúcha 2	1,29±0,03	1,5±0,1
Campanha Gaúcha 3	0,52±0,01	0,59±0,02
Campanha Gaúcha 4	0,79±0,02	0,86±0,04
Campanha Gaúcha 5	0,89±0,01	1,03±0,05
Campanha Gaúcha 6	2,05±0,02	1,9±0,1
Campos de Cima da Serra 1	0,118±0,004	0,12±0,01
Campos de Cima da Serra 2	0,54±0,01	0,53±0,03
Campos de Cima da Serra 3	<LOQ	<LOQ
Campos de Cima da Serra 4	0,28±0,01	0,33±0,02
Oeste do Paraná 1	0,33±0,01	0,35±0,02
Oeste do Paraná 2	0,29±0,01	0,28±0,01
Pinto Bandeira 1	0,44±0,01	0,50±0,03
Pinto Bandeira 2	0,102±0,004	0,12±0,01
Pinto Bandeira 3	0,55±0,01	0,50±0,02
Pinto Bandeira 4	0,44±0,01	0,48±0,01
Serra Catarinense 1	0,59±0,01	0,61±0,02
Serra Catarinense 2	0,25±0,01	0,22±0,01
Serra Catarinense 3	0,51±0,01	0,56±0,03
Serra Catarinense 4	0,24±0,01	0,29±0,02
Serra Gaúcha 1	0,83±0,01	0,82±0,01
Serra Gaúcha 2	0,62±0,02	0,68±0,01
Serra Gaúcha 3	0,50±0,01	0,55±0,02
Serra Gaúcha 4	0,33±0,01	0,36±0,03
Serra Gaúcha 5	0,84±0,02	0,86±0,05
Serra Gaúcha 6	0,37±0,01	0,45±0,03
Vale do São Francisco 1	0,79±0,01	0,77±0,03
Vale do São Francisco 2	0,46±0,01	0,55±0,03
Vale dos Vinhedos 1	0,63±0,01	0,63±0,01
Vale dos Vinhedos 2	1,23±0,01	1,3±0,1
Vale dos Vinhedos 3	0,282±0,004	0,31±0,01
Vale dos Vinhedos 4	0,81±0,02	0,75±0,03

(*) LOQ = 0,05 mg L⁻¹, (**) LOQ = 0,02 mg L⁻¹

Tabela XIII: Resultados das regiões avaliadas para concentração de cálcio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES (n = 3).

Região	Concentração em mg L ⁻¹	
	HR-CS FS-FAAS	ICP OES
Campanha Gaúcha 1	58,9±0,3	53±2
Campanha Gaúcha 2	74±1	70±2
Campanha Gaúcha 3	61±1	58±2
Campanha Gaúcha 4	84±1	87±4
Campanha Gaúcha 5	51±1	47±2
Campanha Gaúcha 6	83±1	81±2
Campos de Cima da Serra 1	58±1	58±1
Campos de Cima da Serra 2	121±2	119±2
Campos de Cima da Serra 3	47±1	43±2
Campos de Cima da Serra 4	86±1	79±5
Oeste do Paraná 1	90±2	95±3
Oeste do Paraná 2	62±1	63±2
Pinto Bandeira 1	72±1	70±2
Pinto Bandeira 2	65±1	64±2
Pinto Bandeira 3	64±1	61±2
Pinto Bandeira 4	83,4±0,3	80±2
Serra Catarinense 1	46±1	44±1
Serra Catarinense 2	57±1	53±2
Serra Catarinense 3	73±1	71±1
Serra Catarinense 4	44,4±0,5	44±1
Serra Gaúcha 1	43±1	41±1
Serra Gaúcha 2	65±1	67±1
Serra Gaúcha 3	50±1	52±2
Serra Gaúcha 4	75±1	73±3
Serra Gaúcha 5	54±1	53±1
Serra Gaúcha 6	93±1	90±2
Vale do São Francisco 1	96±1	93±4
Vale do São Francisco 2	5,1±0,3	5,6±0,3
Vale dos Vinhedos 1	81±1	83±3
Vale dos Vinhedos 2	78±2	79±2
Vale dos Vinhedos 3	47,8±0,6	47±2
Vale dos Vinhedos 4	75±1	75±2

Tabela XIV: Resultados das regiões avaliadas para concentração de sódio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES (n = 3).

Região	Concentração em mg L ⁻¹	
	HR-CS FS-FAAS	ICP OES
Campanha Gaúcha 1	34,6±0,5	34±2
Campanha Gaúcha 2	7,9±0,3	7,7±0,5
Campanha Gaúcha 3	4,2±0,2	4,2±0,2
Campanha Gaúcha 4	23,2±0,4	25±1
Campanha Gaúcha 5	45,6±0,7	43±2
Campanha Gaúcha 6	20,3±0,5	21±1
Campos de Cima da Serra 1	44,2±0,5	46±2
Campos de Cima da Serra 2	13,6±0,1	14±1
Campos de Cima da Serra 3	57,5±0,7	56±2
Campos de Cima da Serra 4	19,5±0,3	20±1
Oeste do Paraná 1	25,9±0,4	25±1
Oeste do Paraná 2	35,5±0,5	34±2
Pinto Bandeira 1	27,1±0,3	26±2
Pinto Bandeira 2	5,3±0,1	4,5±0,3
Pinto Bandeira 3	8,0±0,2	7,4±0,5
Pinto Bandeira 4	26,7±0,3	26±1
Serra Catarinense 1	20,4±0,2	21±1
Serra Catarinense 2	33,0±0,3	35±1
Serra Catarinense 3	48,6±0,5	51±2
Serra Catarinense 4	28,2±0,4	24±1
Serra Gaúcha 1	44,5±0,3	46,5±0,3
Serra Gaúcha 2	23,2±0,4	25±1
Serra Gaúcha 3	12,2±0,5	16±1
Serra Gaúcha 4	13,5±0,4	16±1
Serra Gaúcha 5	13,2±0,2	15±1
Serra Gaúcha 6	13,1±0,3	17±1
Vale do São Francisco 1	10,3±0,3	12,5±0,5
Vale do São Francisco 2	9,0±0,2	10,8±0,5
Vale dos Vinhedos 1	20,8±0,5	22±1
Vale dos Vinhedos 2	8,8±0,3	9,8±0,5
Vale dos Vinhedos 3	53,9±0,4	50±2
Vale dos Vinhedos 4	21,3±0,5	23±1

Tabela XV: Resultados das regiões avaliadas para concentração de potássio por HR-CS FS-FAAS e por ICP OES (n = 3).

Região	Concentração em mg L ⁻¹	
	HR-CS FS-FAAS	ICP OES
Campanha Gaúcha 1	1351±12	1330±15
Campanha Gaúcha 2	886±6	896±6
Campanha Gaúcha 3	890±7	875±10
Campanha Gaúcha 4	841±7	860±12
Campanha Gaúcha 5	1613±9	1640±18
Campanha Gaúcha 6	628±6	610±10
Campos de Cima da Serra 1	1361±10	1356±17
Campos de Cima da Serra 2	1028±4	1050±18
Campos de Cima da Serra 3	1562±18	1551±16
Campos de Cima da Serra 4	1311±10	1337±15
Oeste do Paraná 1	1541±7	1560±20
Oeste do Paraná 2	2457±24	2482±21
Pinto Bandeira 1	1024±8	1029±10
Pinto Bandeira 2	1542±10	1552±16
Pinto Bandeira 3	1449±12	1440±16
Pinto Bandeira 4	1141±13	1121±14
Serra Catarinense 1	1015±7	998±14
Serra Catarinense 2	1935±20	1962±15
Serra Catarinense 3	1361±9	1344±17
Serra Catarinense 4	1629±13	1636±10
Serra Gaúcha 1	1452±11	1432±10
Serra Gaúcha 2	1361±23	1350±15
Serra Gaúcha 3	1312±20	1322±16
Serra Gaúcha 4	1863±15	1844±13
Serra Gaúcha 5	1272±8	1296±18
Serra Gaúcha 6	1557±16	1533±10
Vale do São Francisco 1	1901±19	1955±20
Vale do São Francisco 2	1774±25	1770±25
Vale dos Vinhedos 1	1848±22	1840±17
Vale dos Vinhedos 2	1313±10	1344±16
Vale dos Vinhedos 3	1353±10	1373±14
Vale dos Vinhedos 4	1326±17	1353±18

Como etapa de validação do método de HR-CS FS-FAAS desenvolvido, os resultados encontrados foram comparados com aqueles obtidos por ICP OES, para as mesmas amostras. Os resultados obtidos por ICP OES para Cu, Mn, Rb, Sr, Na, Ca e K também estão apresentados nas Tabelas IX, X, XI, XII, XIII, XIV e XV, respectivamente. Para verificar a

similaridade dos resultados encontrados entre ambos os métodos HR-CS FS-FAAS *versus* ICP OES, um dendograma foi construído (Figura 8). A construção de um dendograma é feita com base na proximidade existente entre as amostras no espaço. Isso é feito calculando-se a distância entre todas as amostras (agrupamentos) do conjunto, em pares, e então definindo uma matriz de similaridade cujos elementos são os chamados índices de similaridade que variam entre zero e um. Um índice baixo indica uma distância pequena entre dois agrupamentos e, portanto, uma alta similaridade.

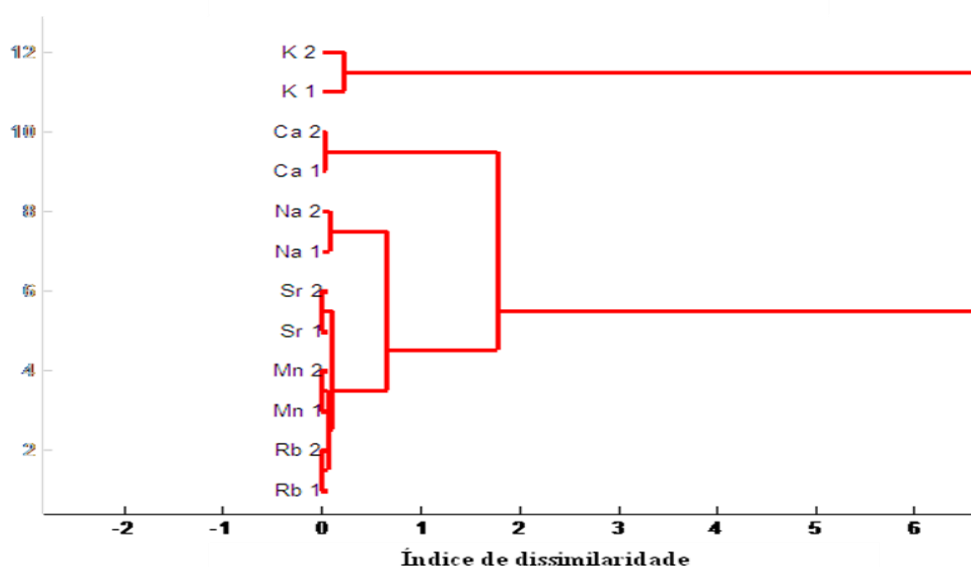


Figura 8: Dendograma referente à comparação dos resultados encontrados para duas técnicas analíticas, em termos dos metais avaliados: 1) HR-CS FS-FAAS e 2) ICP OES.

Pelo dendograma da Figura 8 é possível observar os valores de concentração encontrados por HR-CS FS-FAAS (método 1) e ICP OES (método 2), para cada analito, em cada região, comparados quanto ao índice de similaridade. Como resultado desta comparação, avaliando todas as amostras como um único conjunto, para cada elemento, observa-se uma alta similaridade entre os métodos (1 e 2), mesmo para o potássio que apresentou o maior índice de similaridade. Realizando uma análise estatística, teste *t-Student*, comparando duas médias experimentais (conforme Anexo II), verifica-se que, com 99% de confiança, todos os resultados encontrados de cada metal, em ambos os métodos, são estatisticamente idênticos. Isso demonstra mais uma vez que o método desenvolvido apresenta resultados com boa exatidão.

Visando ainda comparar os resultados de concentração obtidos pelas duas técnicas, ICP OES e HR-CS FS-FAAS, foram construídos gráficos de correlação para cada elemento, Anexo III. Em teoria da probabilidade e estatística, o coeficiente de correlação indica a força e a direção do relacionamento entre duas variáveis⁶⁴. A partir dos gráficos de correlação construídos, foram avaliados os seus respectivos coeficientes de correlação, representados pela letra “R”, para cada elemento (Tabela XVI). Os valores de R demonstram que os resultados de concentração de cada elemento, para cada amostra, estão correlacionados. Pode-se, portanto, concluir que pela Tabela XVI, pelos gráficos de correlação (Anexo III), pelo dendograma de comparação (Figura 8) e pelo teste de comparação de duas médias experimentais (Anexo II) os resultados encontrados para Ca, K, Mn, Na, Rb e Sr são exatos, comprovando a eficácia do método desenvolvido.

Tabela XVI: Coeficientes de correlação (R) encontrados para cada elemento, comparando os resultados obtidos para as duas técnicas de análise ICP OES e HR-CS FS-FAAS.

	Ca	K	Mn	Na	Rb	Sr
R	0,9975	0,9976	0,9781	0,9929	0,9945	0,9797

4.6 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS

Com o intuito de verificar o reconhecimento de padrões nas amostras de vinho avaliadas, as ferramentas quimiométricas de reconhecimento de padrões, PCA e HCA, foram aplicadas. Estas ferramentas têm como função principal proporcionar a visualização de informações, em um conjunto de dados complexo (avaliação multivariada), que não seriam observadas se avaliadas univariavelmente.

A Análise por Componentes Principais (PCA) foi aplicada com o intuito de realizar uma análise exploratória de 32 amostras de vinho, de 8 regiões diferentes do Brasil, envolvendo 10 variáveis (concentração de Be, Ca, Co, Cu, K, Li, Mn, Na, Rb e Sr) com os dados auto-escalados. Antes de visualizar os gráficos de escores e pesos foi necessário avaliar quais variáveis, dentre as 10 existentes, realmente poderiam diferenciar as amostras estudadas. Como as amostras de vinho não apresentaram valores de concentrações para berílio, lítio e cobalto, acima dos seus respectivos LOQ's, estes elementos foram

desconsiderados na análise multivariada. O mesmo ocorreu para os analitos cálcio, cobre e sódio, estes elementos não foram utilizados na análise multivariada pois apresentaram grandes variações dentro de cada região avaliada. Portanto, a análise multivariada dos dados foi baseada em quatro variáveis: manganês, potássio, rubídio e estrôncio.

Para escolher o número de Componentes Principais (PC's) que caracterizam os dados originais, a variância explicada acumulada foi utilizada. Neste trabalho a variância explicada necessária para resumir a variação amostral total foi resumida por 3 PC's, ou seja, ao se aplicar a PCA, foi possível reduzir a dimensão original dos dados de 4 (4 variáveis/dimensões) para 3 (3 PC's). Verifica-se que as três componentes principais representam 85,76% da variância acumulada dos dados.

Analisando o gráfico dos escores, Figura 9, definido pelos componentes PC1 *versus* PC2, observa-se uma separação dos cinco grupos dentre os oito avaliados. Houve uma separação clara dos grupos: Vale dos Vinhedos (VVi), Oeste do Paraná (OPR) e Vale do São Francisco (VSF). As regiões Campos de Cima da Serra (CCS) e Serra Catarinense (SCa), e as regiões Campanha Gaúcha (CGa), Serra Gaúcha (SGa) e Pinto Bandeira (PBa) não apresentaram separação observando PC1 *versus* PC2, formando, no entanto, dois grandes grupos. Pela Figura 10 fica possível observar que as variáveis K, Mn, Rb e Sr são realmente responsáveis pela separação dos grupos, promovendo a distribuição dos grupos com uma conformação específica.

Observando o gráfico de escores PC1 *versus* PC3 (Figura 11), ou seja, adicionando-se mais uma dimensão ao sistema de componentes principais, fica possível de se visualizar a separação de mais grupos. Pela análise de PC1 *versus* PC3 formam-se os grupos Campanha Gaúcha (CGa), Pinto Bandeira (PBa) e Serra Gaúcha (SGa). Porém, mesmo neste caso, com acréscimo de uma dimensão, as regiões Campos de Cima da Serra (CCS) e Serra Catarinense (SCa) não se separaram. A Figura 12 mostra quais variáveis foram mais significativas para separação dos grupos avaliando PC1 *versus* PC3.

Pela Análise por Componentes Principais (PCA), portanto, é possível observar a formação de 7 grupos dentre os 8 avaliados, apenas duas regiões se mostraram semelhantes quanto ao perfil mineral, CCS e SCa. As outras 6 regiões PBa, VVi, SGa, CGa, VFS e OPR apresentaram perfis minerais distintos, quanto aos elementos avaliados. Esta distribuição final, obtida avaliando as 3 componentes principais, PC1, PC2 e PC3, foi caracterizada pelas

variáveis K, Mn, Rb e Sr. Os gráficos de escores e pesos foram obtidos através do *software Matlab/PLStoolbox* (Natick, Massachusetts, EUA).

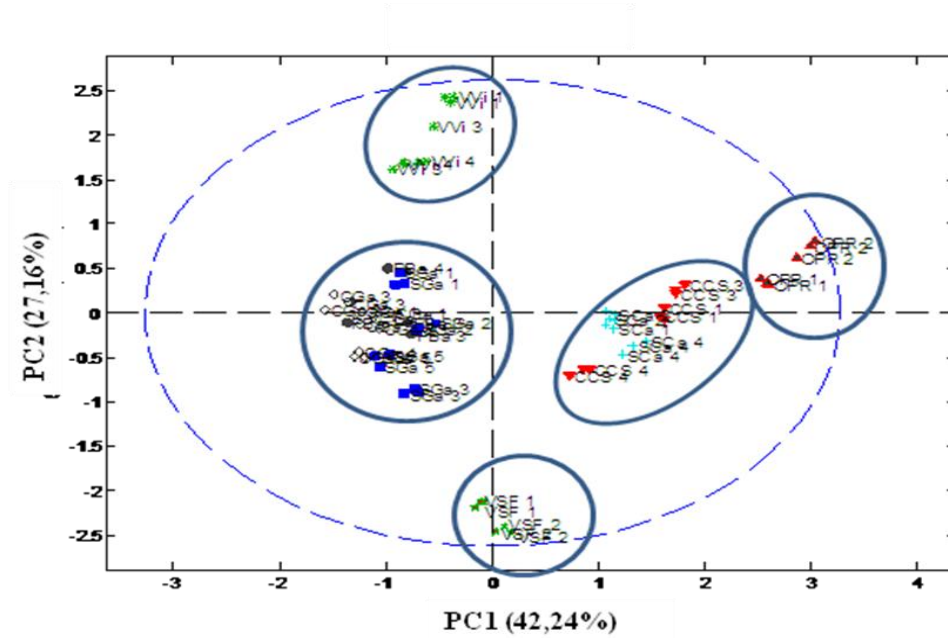


Figura 9: Avaliação dos escores para PC1 e PC2, verificando a formação de 5 grupos diferentes.

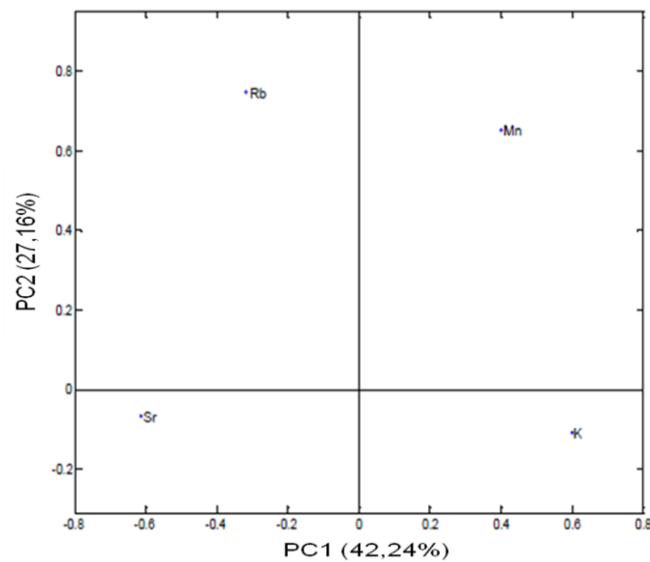


Figura 10: Avaliação dos pesos para PC1 e PC2, verificando que 4 elementos K, Mn, Rb e Sr discriminam os cinco grupos formados.

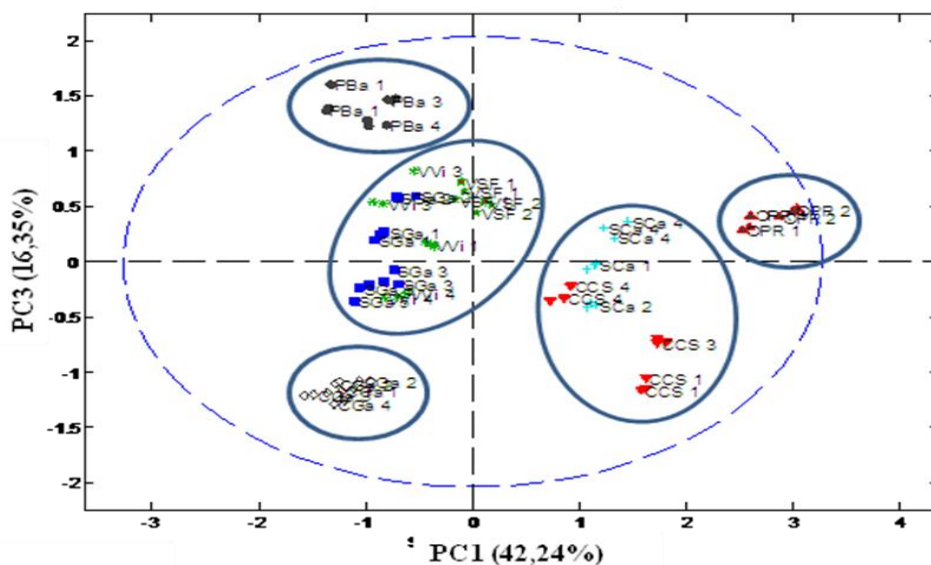


Figura 11: Avaliação dos escores para PC1 e PC3, verificando a formação de 3 novos grupos diferentes PBa, CGa e SGA.

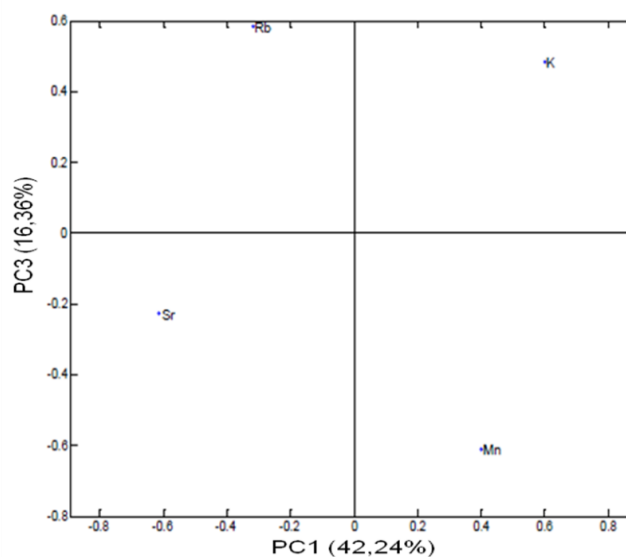


Figura 12: Avaliação dos pesos para PC1 e PC3, verificando que os 4 elementos K, Mn, Rb e Sr discriminam os 3 novos grupos formados.

A conformação observada pela junção dos gráficos de pesos PC1 x PC2 e PC1 x PC3 foi de um tetraedro conforme Figura 13. A partir desta Figura 13 fica possível observar qual variável original teve mais “peso” para separação de cada grupo. A presença de Mn e Rb em maior concentração, juntamente com a baixa concentração de K e Sr nas amostras do VVi,

proporcionou a diferenciação desta região. A baixa concentração de Rb e Sr e alta concentração de Mn e K nas amostras do OPR, levaram a separação deste grupo. As amostras do VSF se caracterizaram pela maior presença de K e Sr e pequena presença de Rb e Mn. Assim como a região de PBa se diferenciou das demais pela maior presença de Rb e K e pequena presença de Mn e Sr, já a região da CGa foi o oposto, com altas concentrações de Mn e Sr e baixas concentrações de Rb e K. As amostras da SGa apresentaram níveis intermediários para as 4 variáveis (K, Mn, Rb e Sr) e por fim, as amostras dos grupos CCS e SCa, que não apresentaram separação entre si, foram caracterizadas por concentrações intermediárias de Mn e K e pequenas concentrações de Rb e Sr.

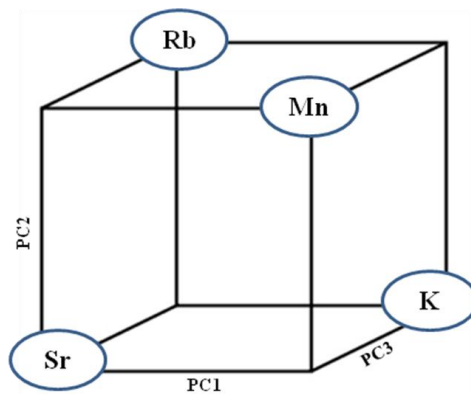


Figura 13: Distribuição das variáveis originais (K, Mn, Rb e Sr) sobre os eixos representados pelas componentes principais (PC1, PC2 e PC3).

A fim de avaliar os resultados obtidos pela PCA, foi realizada uma Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA) através do *software Matlab/PLStoolbox (Natick, Massachusetts, EUA)*. A análise foi aplicada aos dados auto-escalonados e a distância Euclidiana foi usada para calcular o grau de similaridade entre as amostras. O dendograma obtido está apresentado na Figura 14, mostrado em função crescente do índice de dissimilaridade. A partir da análise do dendograma fica possível observar a formação de 7 grupos, que apresentaram pequena distância entre as amostras, ou seja, um baixo índice de dissimilaridade e portanto um alto índice de similaridade. Novamente as regiões CCS e SCa não apresentaram grande diferenciação. A Análise por Agrupamento Hierárquico, portanto, confirma as informações extraídas pela PCA, onde houve a formação de 7 grupos distintos quanto ao perfil mineral estudado. Apenas as regiões CCS e SCa não apresentaram diferenciação significativa, frente os analitos avaliados.

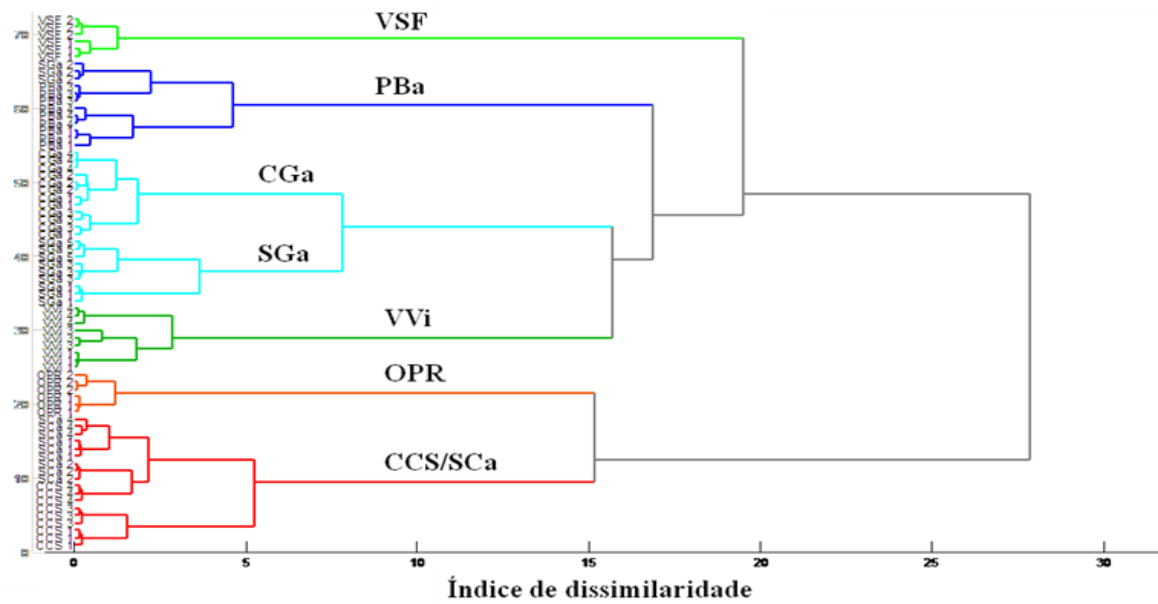


Figura 14: Dendrograma da Análise de Agrupamento Hierárquico.

5. CONCLUSÕES

O método desenvolvido para determinação sequencial rápida por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS FS-FAAS) para determinação de berílio, cálcio, cobalto, cobre, estrôncio, lítio, manganês, potássio, sódio e rubídio em amostras de vinhos, via análise direta, mostrou-se simples, preciso e exato. A possibilidade de se determinar mais de um elemento, sequencialmente, sempre trabalhando nas condições ótimas de cada analito são vantagens proporcionadas por este método. Outra vantagem do método é a possibilidade de análise direta das amostras sem a necessidade de um pré-tratamento, apenas uma pequena diluição da amostra, ou seja, a determinação pode ser feita via análise direta. Além disto, o consumo de amostra é significativamente menor se comparado com outros métodos clássicos de análise por AAS com chama.

O método foi aplicado na quantificação de Be, Ca, Co, Cu, Sr, Li, Mn, K, Na e Rb em 32 amostras de vinho produzidas em diferentes regiões do Brasil, com a garantia da procedência das uvas utilizadas como matéria-prima. Os elementos berílio, cobalto e lítio não foram detectados nas amostras avaliadas, isto é, os valores encontrados ficaram abaixo dos limites de quantificação de cada analito. Os analitos cálcio e sódio foram quantificados e apresentaram grandes variações de concentração para as amostras avaliadas, no entanto nenhuma amostra ficou acima do limite máximo determinado pela resolução 45/96 do MERCOSUL para estes analitos. A faixa de concentração obtida foi de 5,1 a 121 mg L⁻¹ para Ca e 4,2 a 57 mg L⁻¹ para Na. O cobre não foi quantificado na maioria das amostras, apresentando resultados abaixo do seu limite de quantificação. Em cinco amostras avaliadas, entretanto, o cobre se apresentou acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira (1,0 mg L⁻¹). Os demais elementos estrôncio, manganês, potássio e rubídio apresentaram faixa de concentração entre 0,10 e 2,1 mg L⁻¹ para Sr, 1,6 e 8,6 mg L⁻¹ para Mn, 2,0 e 9,0 mg L⁻¹ para Rb e 628 a 2457 mg L⁻¹ para K.

Pela análise multivariada dos resultados de concentração de K, Rb, Sr e Mn, foi possível verificar a formação de 7 grupos distintos, dentre os 8 conhecidos, avaliando os perfis minerais de cada região. As técnicas de reconhecimento de padrões, PCA e HCA, foram aplicadas neste contexto. Com as informações obtidas neste trabalho, portanto, torna-se possível realizar análises de vinho como rotina de trabalho e ainda observar possíveis adulterações e fraudes destas amostras.

6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- A. Desenvolver e otimizar métodos para a determinação de outros metais traço, como molibdênio e níquel, em amostras de vinho. Após validação desses métodos, os mesmos serão aplicados para determinação de metais nas mesmas amostras utilizadas no presente trabalho.
- B. Realizar um estudo quimiométrico, a partir de trabalhos já concluídos ou em conclusão, envolvendo as mesmas amostras de vinho utilizadas neste estudo, ampliando o número de amostras, produzidas em outras safras e o número de variáveis, propriedades físico-química, e assim montar um perfil mais completo do vinho produzido no Brasil.

7. REFERÊNCIAS

1. <http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/Leis/Ant2001/lei767888.htm>. Acessado em Maio de 2012.
2. Rizzon, L. A.; *Metodologia para Análise de Vinho*; 1ª Ed. Embrapa: Bento Gonçalves, 2010.
3. Grindlay, G.; Mora, J.; Gras, L.; Loos-Vollebregtb, M. T. C.; *Anal. Chim. Acta.* **2011** *691*, 18.
4. <http://www.oiv.int/oiv/info/enoivbilan2010>. Acessado em 08/03/2012.
5. <http://www.ibravin.org.br/cadastroviticola.php?secao=2&m2=true>. Acessado em Março de 2012.
6. Giovannini, E.; Manfroi, V.; *Viticultura e Enologia: Elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros*; 1º ed. UFRGS Gráfica: Porto Alegre, 2009.
7. Zoecklein, B.; Fugelsang, K. C.; Gump, B. H.; Nury, F. S.; *Wine Analysis & Production*; 1st Ed. Chapman and Hall: New York, 1995.
8. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; *Handbook of enology*; 2ª ed., v. 2, França: John Wiley e Sons Ltd, 2006.
9. Almeida, C. M. R.; Vasconcelos, M. T. S. D.; *J. Agricultural and Food Chem.* **2003**, *51*, 4788.
10. Bentlin, F. R. S.; Pulgati, F. H.; Dressler, V. L.; Pozebon, D.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*(2), 327.
11. Lara, R.; Cerutti, S.; Salonia, J.A.; Olsina, R.A.; Martinez, L.D.; *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 293.
12. Pyrzynska, k.; *Critical Rev. in Anal. Chem.*; **2004**, *34*, 69.
13. Stange, A. W.; Hilmas, D. E.; Furman, F. J.; *Toxicology.* **1996**, *111*, 213.
14. Aral, H.; Vecchio-Sadus, A.; *Ecotoxic. and Environm. Safety.* **2008**, *70*, 349.
15. Dowdy, R. P.; Burt, J; *Fed. Proc.* **1980**, *39*, 786.
16. Evans, E. J.; Thomas, I. T.; *Biomaterials.* **1986**, *7*, 25.
17. Santos, C. E. I.; Silva, L. R. M.; Bouffleur, L. A.; Debastiani, R.; Stefenon, C. A.; Amaral, L.; Yoneama, M. L.; Dias, J. F.; *Food Chem.* **2010**, *121*, 244.
18. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19279.htm. Acessado em Maio de 2012.

19. Miele, A.; Rizzon, L.A.; Zanús, M.C.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2010**, *30(1)*, 268.
20. Moreno, I. M.; Gonzáles-Weller, D.; Gutierrez, V.; Marino, M.; Cameán, A. M.; Gonzáles, A. G.; Hardisson, A.; *Talanta*, **2007**, *72*, 263.
21. Souza A. S.; Desenvolvimento de estratégias analíticas visando determinação e especiação de metais em vinhos: análise de amostras do vale do sub-médio Rio São Francisco. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.
22. Dessuy M.B.; Desenvolvimento de estratégias analíticas usando espectrometria de absorção atômica para avaliar a composição de copos de liga peltre e lixiviação de cádmio, chumbo e antimônio. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
23. Nölte, J.; *ICP Emission Spectrometry: A Practical Guide*; Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
24. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R.; *Fundamentos de Química Analítica*; 8ª Ed., Cengage Learning: São Paulo, 2008.
25. Welz, B.; Sperling, M.; *Atomic Absorption Spectrometry*; 3rd ed., Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
26. Welz, B.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; *High-Resolution Continuum Source AAS*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
27. Aceto, M.; Abolino, O.; Bruzzoniti, M. C.; Mentasti, E.; Sarzanini, C.; Malandrino, M.; *Food Additives and Contaminants* **2002**, *12*, 126.
28. http://www.uvibra.com.br/legislacao_portaria229.htm. Acessado em Maio de 2012.
29. Organisation internationale de la vigne et du vin. Recueil International des Methodes d'analyses - Limites Maximales acceptable de divers éléments dans le vin, Edite official, Paris, France.
30. <http://www.uvibra.com.br/legislacao.htm>. Acessado em Março de 2012.
31. Kristl, J.; Veber, M.; Slekovec, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 200.
32. Dessuy, M.B.; Vale, M.G.R.; Souza, A.; Ferreria, S.L.C.; Welz, B.; Katskov, D.; *Talanta*. **2008**, *74*, 1321.
33. Ajtony, Z.; Szoboszlai, N.; Susko, E.; Mezei, P.; Gyorgy, K.; Bencs, L.; *Talanta*. **2008**, *76*, 627.
34. Huang, M.D.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; Okruss, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382.

35. Ferreira, S.L.C.; Souza, A.S.; Brandao, G.; Ferreira, H.S.; dos Santos, W.N.L.; Pimentel, M.F.; Vale, M.G.R.; *Talanta*. **2008**, *74*, 699.
36. Almeida, C.M.R.; Vasconcelos, M.T.S.D.; *Anal. Chim. Acta*. **2002**, *463*, 165.
37. Castiñeira, M.M.; Brandt, R.; Von-Bohlen, A.; Jakubowski, N.; *J. Anal. Chem.* **2001**, *370*, 553.
38. Grindlay, G.; Mora, J.; Maestre, S.; Gras, L.; *Anal. Chim. Acta*. **2008**, *629*, 24.
39. Lara, R.; Cerruti, S.; Salonia, J. A.; Olsina, R. A., Martinez, L. D.; *Food and Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 293.
40. Kment, P.; Mihaljevič, M.; Ettler, V.; Šebek, O.; Strnad, L.; Rohlová, L; *Food Chem.* **2005**, *91*, 157.
41. Galani-Nikolakaki, S.; Nallithrakas-Kontos, N.; Katsanos, A. A.; *Scie. Total Envir.* **2002**, *285*, 155.
42. Oliveira, S. R.; Raposo, J. L. Jr.; Gomes, J. A. N.; *Spectro. Acta Part B*, **2009**, *64*, 593.
43. Júnior, J. L. R.; Oliveira, S. R.; Caldas, N. M.; Gomes, J. A. N.; *Anal. Chim. Acta*. **2008**, *627*, 198.
44. Brandão, G. C.; Matos, G. D.; Ferreira, S. L. C.; *Microchem. J.* **2011**, *98*, 231.
45. Oliveira, M.; Casal, S.; Morais, S.; Alves, C.; Dias, F.; Ramos, S.; Mendes, E.; Delerue-Matos, E.; Oliveira, M. B. P. P.; *Food Chem.*, **2012**, *130*, 702.
46. Diaz-Plaza, E. M.; Reyero, J. R.; Pardo, F.; Salinas, M. R.; *Anal. Chim. Acta*. **2002**, *458*, 139.
47. Frías, S.; Conde, J. E.; Rodríguez-Bencomo, J. J.; Garcia-Montelongo, F.; Pérez-Trujillo, J. P.; *Talanta*. **2003**, *59*, 335.
48. Pawel, P; *Trends in Anal. Chem.* **2007**, *26*, 941-949.
49. Coetzee, P. P.; Stefeens, F. E.; Eiselen, R. J.; Augustyn, O. P.; Balcaen, L.; Vanhaecke, F.; *J. of Agricul. and Food Chem.* **2005**, *53*, 5060-5066.
50. Brereton, R. G. *Chemometrics: applications of mathematics and statistics to laboratory systems*. London: Ellis Horwood, 1990.
51. Brereton, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Weinheim: Wiley, 2003.
52. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L. *Data Handling in science and technology. Chemometrics: a textbook*. V.2. New York, 1988.

53. Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; de Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J.; *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*; Ed. Elsevier, 3^a Ed., 2003.
54. Forina, M.; Drava, G.; *Appli. Analys.* **1997**, 25, 38.
55. Kwan, W. O.; Kowalski, B. R.; *J. Food Scie.* **1978**, 43, 1320.
56. Kwan, W. O.; Kowalski, B. R.; *J. of Agricul. and Food Chem.* **1980**, 28, 356.
57. Baxter, M. J.; Crews, H. M.; Dennis, M. J.; Goodall, I.; Anderson, D.; *Food Chem.* **1997**, 60, 443.
58. Peña, R. M.; Latorre, M. J.; Garcia, S.; Botana, A. M.; Herrero, C.; *J. of the scie. food and Agricul.* **1999**, 79, 2052.
59. Jos, A; Moreno I.; Gonzalez, A. G.; Repetto, G.; Carneán, A. M.; *Talanta.* **2004**, 63, 377.
60. Šperková, J.; Suchánek, M.; *Food Chemi.* **2005**, 93, 659.
61. http://old.iupac.org/publications/analytical_compndium/. Acessado em Março de 2012.
62. Ieggli, C. V. S.; Bohrer, D.; Nascimento, P. C.; Carvalho, L. M.; Garcia, S. C.; *Talanta.* **2010**, 80, 1282.
63. Bipea; *Interlaboratory Comparisons Report: Red Wine*; França, 2011.
64. Bisquerra, R.; Sarriera, J. C.; Martínez, F.; *Introdução à estatística. Enfoque informático com o pacote estatístico SPSS*. Artmed: Porto Alegre, 2004.

ANEXO I

PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE Be, Ca, Co, Cu, K, Li, Mn, Na, Rb e Sr EM AMOSTRAS DE VINHO POR ICP OES

(Utilizado no laboratório do Lanagro – RS)

1. Para a abertura das amostras foram retiradas alíquotas de 5 mL de vinho e adicionadas aos tubos de quartzo (acessórios do forno microondas), a seguir foram adicionados 3 mL de água ultra pura, 1 mL de ácido nítrico bidestilado e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). As amostras foram digeridas em um forno microondas, modelo Multiwave 3000 (Anton Paar AP, Áustria), equipado com: rotor para oito tubos (sistema 8XQ80), oito tubos de quartzo (XQ80) e lâmpadas de radiação MUV (*microwave-assisted UV digestion*).
2. As lâmpadas UV foram acopladas aos tubos de quartzo para auxiliar no processo de degradação da matéria orgânica presente na composição do vinho. A mistura foi aquecida de acordo com o programa do forno microondas, Tabela XIV, durante 30 minutos. Após o processo de resfriamento (15 minutos) a solução foi transferida e aferida com água ultra pura a 30 mL.
3. Para a determinação de minerais em vinho foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado simultâneo, modelo MPX-CCD da Varian (Milgrave, Australia), com configuração radial. O sistema é equipado com um detector de estado sólido com arranjo CCD (Charge Coupled Device) e sistema Peltier refrigerado a -35 °C. O policromador Echelle promove a cobertura das linhas de emissão compreendidas na faixa espectral entre 167 a 785 nm.
4. Para a determinação dos microelementos Be, Co, Cu, Li, Mn, Rb e Sr foi utilizado um nebulizador ultra-sônico, modelo CETAC U-5000 AT⁺ da CETAC Technologies (Omaha, NE USA) e para os macroelementos Ca, K e Na foi empregada uma câmara de nebulização, modelo Sturman-Masters da Varian (Milgrave, Australia).
5. As condições de operação do equipamento estão na Tabela I, e foram obtidas através de uma prévia otimização usando-se como ferramenta o algoritmo Simplex Modificado.

Tabela I: Parâmetros operacionais para as determinações de metais em vinhos por ICP OES.

Condição de operação do ICP-OES	
Potência (W)	1300
Fluxo de gás auxiliar (L/min)	2,25
Fluxo de plasma (L/min)	15
Altura de leitura (mm)	15
Rotação da bomba (rpm)	35
Pressão do nebulizador (kPa)	240

6. Para a determinação dos microelementos foi necessário a utilização de ítrio (Y) como padrão interno, devido à supressão do sinal analítico dos analitos de interesse, ocasionado pela alta concentração dos macroelementos.

7. As curvas analíticas foram construídas a partir de soluções padrões estoque, com adequadas diluições. As curvas analíticas, para os microelementos, têm faixa de concentração entre $25\mu\text{g L}^{-1}$ a $2000\mu\text{g L}^{-1}$. As curvas analíticas, para os macroelementos, têm faixa de concentração entre $0,5\text{ mg L}^{-1}$ a 20 mg L^{-1} .

8. As amostras seguiram sempre esta mesma sequência e os resultados foram utilizados para comparação com o método desenvolvido no presente trabalho.

ANEXO II

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS ANALÍTICAS ESTATISTICAMENTE

1. Comparação de uma Média Experimental com um valor conhecido

1.1 Utilização de um teste de hipótese estatística para tirar conclusões sobre a média obtida (μ) e sua proximidade com um valor conhecido (μ_0).²³

1.2 Formação de duas hipóteses que representam resultados contrários:

- Hipótese nula H_0 : afirma que $\mu = \mu_0$;
- Hipótese alternativa H_a : afirma que podemos rejeitar a hipótese nula ($\mu \neq \mu_0$, $\mu < \mu_0$, $\mu > \mu_0$).²³

1.3 O procedimento adotado neste trabalho para comparar médias experimentais de metais com valores de referência foi, portanto, o teste t - *Student*, seguindo os passos a seguir.

1.4 Utilizando a média mais o desvio padrão da triplicata obtida na determinação de Ca, Cu, K e Na na amostra interlaboratorial.

1.5 Comparando com a média fornecida pelo ensaio interlaboratorial para Ca, Cu, K e Na através do teste de hipótese.

- Hipótese nula H_0 : $\mu = \mu_0$;
- Teste estatístico: $t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{N}}$ onde: N é o número de medidas; s é o desvio padrão e \bar{x} é a média experimental;
- Hipótese alternativa H_a : $\mu \neq \mu_0$, $\mu < \mu_0$, $\mu > \mu_0$, rejeitar H_0 se $t \geq t_{crit}$ ou se $t \leq -t_{crit}$.

1.6 Calcular t pelo teste estatístico.

1.7 Escolher o nível de confiança e verificar em tabelas o t_{crit} , para determinado número de graus de liberdade ($N - 1$). Para 2 graus de liberdade ($3 - 1$) e 95% de confiança, o valor de t_{crit} é 4,3.²³

1.8 Se os resultados de t_{calc} (t calculado) forem maiores que t_{crit} ou menores que $-t_{crit}$, descartar a hipótese nula, ou seja, a média determinada não é igual ao valor de referência, com 95% de confiança.

1.9 Se os resultados de t_{calc} estiverem entre os valores de t_{crit} e $-t_{\text{crit}}$, a hipótese nula é aceita e pode-se afirmar com 95% de confiança que as médias, experimental e de referência, são idênticas.

2. Comparação de duas Médias Experimentais

2.1 São comparadas estatisticamente duas médias experimentais, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 , e seus respectivos desvios padrões, s_1 e s_2 .²³

2.2 Por se tratar de um número pequeno de medidas utiliza-se o teste t - *Student*.

2.3 Montando o procedimento estatístico:

- Hipótese nula H_0 : afirma que $\mu_1 = \mu_2$;
- Hipótese alternativa H_a : afirma que podemos rejeitar a hipótese nula ($\mu_1 \neq \mu_2$, $\mu_1 < \mu_2$, $\mu_1 > \mu_2$).²³

2.4 Este procedimento foi adotado ao se comparar resultados obtidos por duas técnicas diferentes HR-CS FS-FAAS e ICP OES.

2.5 Comparando as médias encontradas pelas duas técnicas através do teste de hipótese.

- Hipótese nula H_0 : $\mu_1 = \mu_2$;
- Teste estatístico: $t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{\text{comb}} \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}}$ onde: N_1 e N_2 são os números de replicatas de cada técnica; s é o desvio padrão combinado e \bar{x}_1 e \bar{x}_2 são as médias experimentais;
- Hipótese alternativa H_a : $\mu_1 \neq \mu_2$, $\mu_1 < \mu_2$, $\mu_1 > \mu_2$, rejeitar H_0 se $t \geq t_{\text{crit}}$ ou se $t \leq -t_{\text{crit}}$.

2.6 Calcular t pelo teste estatístico.

2.7 Escolher o nível de confiança e verificar em tabelas o t_{crit} , para determinado número de graus de liberdade ($N_1 + N_2 - 2$). Para 4 graus de liberdade ($3 + 3 - 2$) e 99% de confiança, o valor de t_{crit} é 4,6.²³

2.8 Se os resultados de t_{calc} (t calculado) forem maiores que t_{crit} ou menores que $-t_{\text{crit}}$, descartar a hipótese nula, ou seja, as médias determinadas não são iguais, com 99% de confiança.

2.9 Se os resultados de t_{calc} estiverem entre os valores de t_{crit} e $-t_{\text{crit}}$, a hipótese nula é aceita e pode-se afirmar com 99% de confiança que as médias experimentais são idênticas.

ANEXO III

GRÁFICOS DE CORRELAÇÃO

A exatidão do método desenvolvido de HR-CS FS-FAAS pode ser avaliada ao se comparar seus resultados de concentração com aqueles obtidos por ICP OES. Para visualização deste fato foram construídos gráficos de correlação, para cada elemento, e os seus respectivos coeficientes de correlação foram calculados, conforme este Anexo.

Tabela XVI: Coeficientes de correlação (R) encontrados para cada elemento, comparando os resultados obtidos para as duas técnicas de análise ICP OES e HR-CS FS-FAAS.

	Ca	K	Mn	Na	Rb	Sr
R	0,9975	0,9976	0,9781	0,9929	0,9945	0,9797

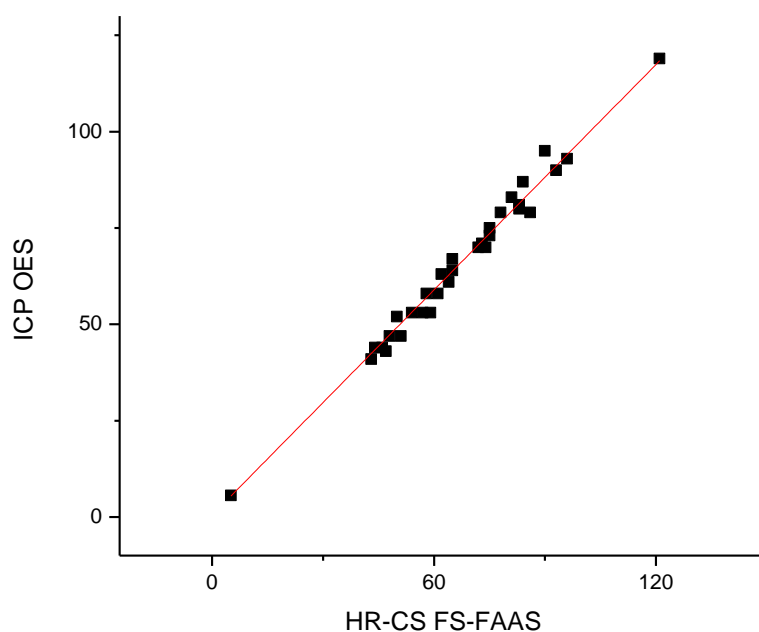


Figura 1: Gráfico de correlação para os resultados de concentração, em mg L^{-1} , de cálcio obtidos por ICP OES e HR-CS FS-FAAS.

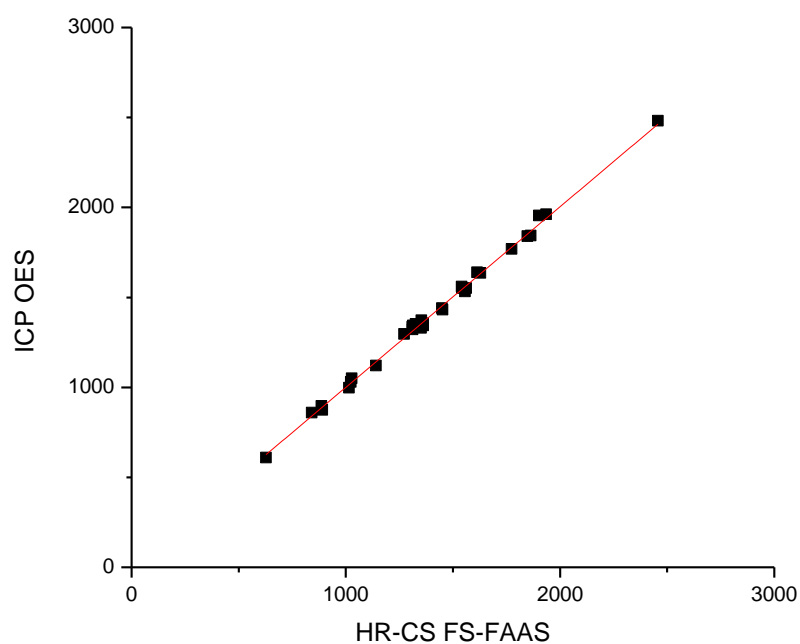


Figura 2: Gráfico de correlação para os resultados de concentração, em mg L^{-1} , de potássio obtidos por ICP OES e HR-CS FS-FAAS.

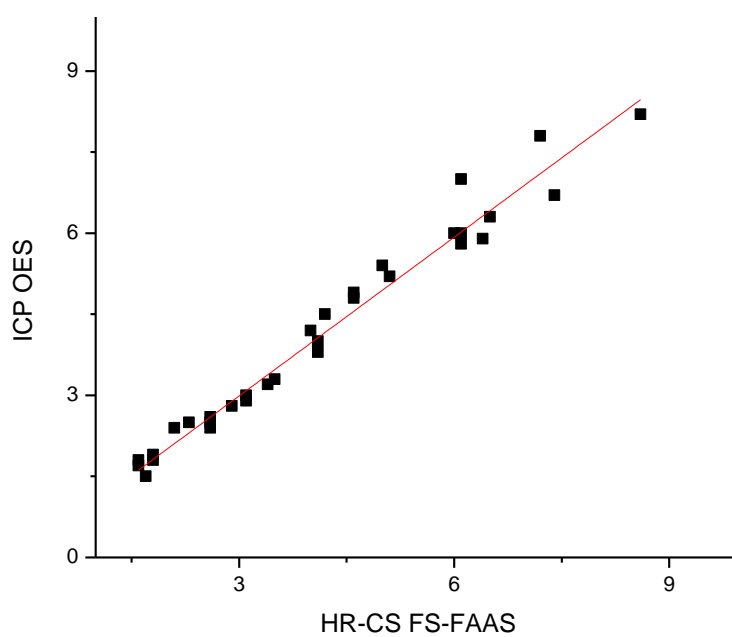


Figura 3: Gráfico de correlação para os resultados de concentração, em mg L^{-1} , de manganês obtidos por ICP OES e HR-CS FS-FAAS.

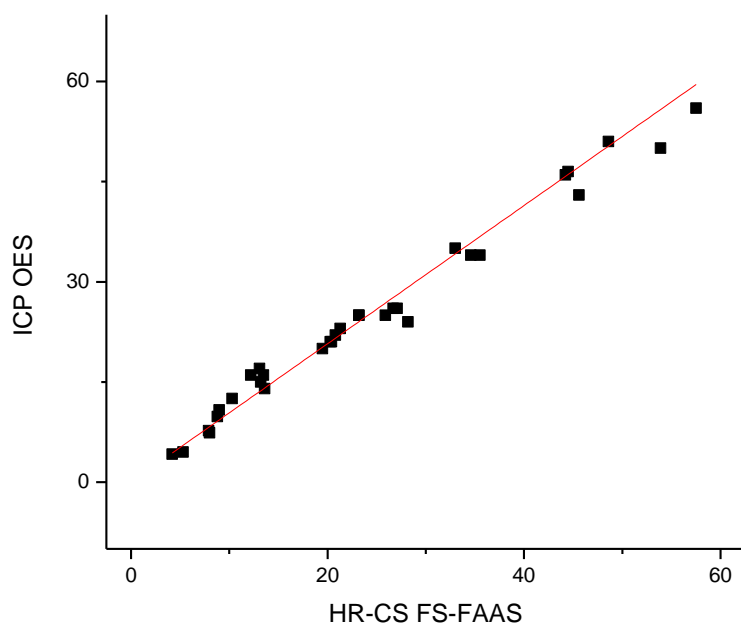


Figura 4: Gráfico de correlação para os resultados de concentração, em mg L^{-1} , de sódio obtidos por ICP OES e HR-CS FS-FAAS.

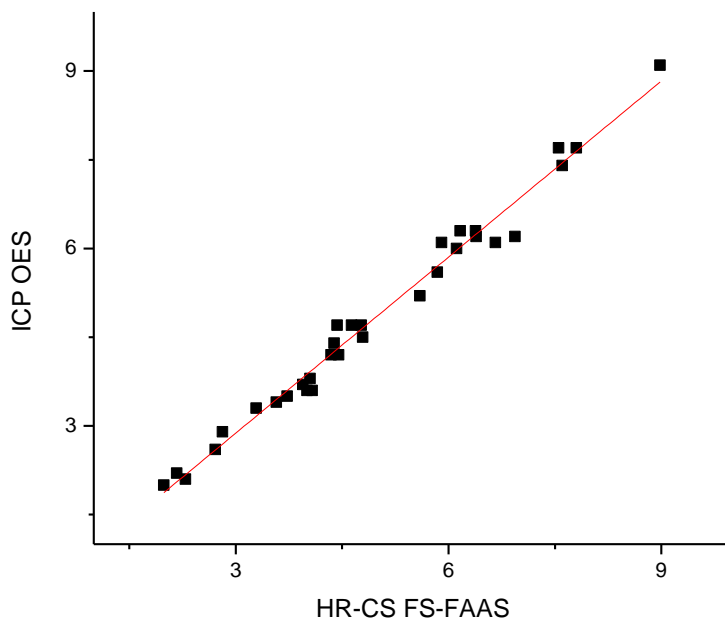


Figura 5: Gráfico de correlação para os resultados de concentração, em mg L^{-1} , de rubídio obtidos por ICP OES e HR-CS FS-FAAS.

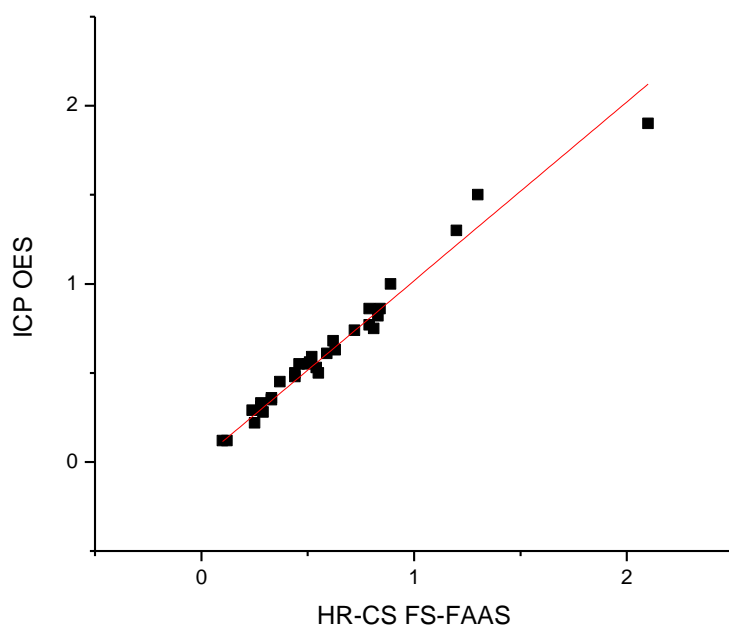


Figura 6: Gráfico de correlação para os resultados de concentração, em mg L^{-1} , de estrôncio obtidos por ICP OES e HR-CS FS-FAAS.