



**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS ESSENCIAIS EM
VINHOS POR ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS**

ANNA PAULA DANIELE

**Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear –
Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Vera Akiko Maihara**

**São Paulo
2016**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de vida, por acompanhar os meus passos e sempre renovar a minha fé.

À Dra. Vera Akiko Maihara, pela oportunidade, orientação, dedicação, interesse, disponibilidade, amizade, compreensão e paciência para realizarmos este trabalho. Agradeço por valorizar cada uma das minhas dúvidas, permitir o meu grande aprendizado e acreditar em meu potencial para a realização de um sonho.

À Dra. Mitiko Saiki, pela disponibilidade e interesse em meu trabalho, sempre sugerindo modificações, ideias e críticas construtivas.

Ao Dr. Rubens Cesar Lopes Figueira do Instituto de Oceanografia da USP pelas análises feitas no ICP-OES.

À CNEN pela bolsa de estudos concedida.

Aos meus pais, Fábio Daniele e Claudia Yesca Daniele, cuja aprovação, confiança e apoio são essenciais para a persistência em meus sonhos.

Aos meus colegas do IPEN, pela cumplicidade, por estarem sempre prontos a tirar minhas dúvidas mais simples e urgentes, e pelo companheirismo nas horas de trabalho e lazer.

“A sociedade lhe ensina: "Opte pelo conveniente, pelo confortável. Opte pelo caminho batido no qual seus antepassados e os antepassados de seus antepassados, desde Adão e Eva, já caminhavam. Essa é a prova — tantos milhões de pessoas já o percorreram, não pode ser o caminho errado." Mas a multidão nunca passou pela experiência da verdade. A verdade só aconteceu a indivíduos. Sempre que houver alternativas, não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte pelo que faz o seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as consequências”.

OSHO

DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS ESSENCIAIS EM VINHOS POR ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS

Anna Paula Daniele

RESUMO

Muitos estudos têm sido realizados para determinar elementos essenciais nos alimentos, dentre eles o vinho, devido aos seus importantes papéis nutricionais em funções do corpo humano. Estudos apontam que o consumo diário e moderado de vinho contribui de forma significativa para as necessidades dos elementos essenciais para o corpo humano, tais como Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Zn, V, entre outros, bem como traz benefícios para a saúde como a prevenção de inúmeras doenças e maior expectativa de vida, relacionados em particular com a ingestão de antioxidantes como os compostos polifenólicos. Por outro lado, outros elementos são bons indicadores da origem do vinho e as suas concentrações podem ser utilizadas como critério para garantir a autenticidade e a qualidade do vinho, bem como avaliar se os limites de tolerância estabelecidos pela lei foram respeitados durante todo o processo de produção. Todavia, embora a indústria do vinho no Brasil esteja entre as 15 maiores do mundo, ainda são poucos os estudos analíticos dos elementos no vinho se comparado a outros grandes produtores. Neste sentido este estudo teve como objetivo avaliar alguns procedimentos para preparação de amostras de vinho para determinar elementos essenciais por Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA) e comparar os resultados com a técnica de Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma de Argônio Acoplado Indutivamente (ICP OES). Três procedimentos de preparação da amostra foram estudados: liofilização, evaporação e calcinação. Os parâmetros estudados foram precisão, exatidão e limite de detecção. Foram aplicados testes estatísticos de ANOVA e Tukey Kramer para verificar as diferenças estatísticas entre as médias obtidas pelos três procedimentos de preparação do vinho para INAA com as médias obtidas por ICP OES. Foi observado que cerca de 60% dos resultados obtidos por liofilização foram concordantes com aqueles obtidos por ICP OES.

DETERMINATION OF ESSENTIAL TRACE ELEMENTS IN WINE BY NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS

Anna Paula Daniele

ABSTRACT

Several studies have been carried out for determining essential elements in foodstuffs, including wine, due to its important nutritional role in human body functions. It was shown that daily consumption of wine in moderation contributes significantly to the needs of essential elements in human body such as Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Zn, V, among others, and has health benefits in the prevention of numerous diseases and longer life expectancy, related in particular to the intake of antioxidants such as polyphenolic compounds. Trace elements are good indicators of origin of wines and their concentrations can be used as criteria to ensure authenticity, quality and show that the tolerance limits established by law were respected throughout the production process. However, although Brazilian wine industry is among the 15 largest in the world, analytical studies for organic and inorganic compounds of wine content are still small when compared to other major producers. In this sense, this study aimed to evaluate some procedures of wine sample preparation to determine essential elements by Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA) and compare the results with those determined by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP OES). Three sample preparation procedures were studied: freeze-drying, evaporation and dry ashing. The parameters studied were precision, accuracy and detection limit. ANOVA and Tukey-Kramer tests were applied to verify the statistical differences between the mean values obtained by the three wine preparation procedures for INAA with those means obtained by ICP OES. It was noticed that about 60% of results obtained by freeze-drying agreed with those obtained by ICP OES.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1.	Vinho e composição	13
1.2.	Origem e classificação dos vinhos	19
1.2.1.	Vinho no Brasil	20
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.	OBJETIVOS	31
3.1.	Objetivo geral	31
3.2.	Objetivos específicos	31
4.	MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS	32
4.1.	Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA)	32
4.2.	Espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES)	35
4.3.	Definições e considerações sobre os processos de pré-concentração das amostras de vinho tinto	36
4.3.1.	Liofilização	36
4.3.2.	Evaporação	37
4.3.3.	Calcinação	37
4.4.	Testes estatísticos aplicados	38
5.	PARTE EXPERIMENTAL	39
5.1.	Seleção da amostra de vinho	39
5.2.	Aplicação da Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA)..	40
5.2.1.	Procedimentos empregados na pré-concentração das amostras de vinho..	40
5.2.1.1	Procedimento de Liofilização	40
5.2.1.2.	Procedimento de evaporação	42
5.2.1.3.	Procedimento de Calcinação	43
5.2.2.	Preparação dos padrões sintéticos	45
5.2.2.1.	Preparação dos padrões sintéticos para os procedimentos de liofilização e calcinação.....	46
5.2.2.2.	Preparação dos padrões sintéticos para o procedimento de evaporação	46

5.2.3.	Análise do material de referência.....	46
5.2.3.1.	Preparação do material de referência para os procedimentos de liofilização e calcinação.....	47
5.2.3.2.	Preparação do material de referência para o procedimento de evaporação.....	47
5.2.4.	Irradiações	48
5.2.4.1.	Irradiações de curta duração (20 segundos) das amostras, padrões e materiais de referência.....	48
5.2.4.2.	Irradiações de longa duração (8 horas) das amostras, padrões e materiais de referência	48
5.2.5.	Medição das atividades induzidas.....	49
5.2.6.	Identificação dos radionuclídeos	49
5.2.7.	Estudo do branco analítico realizado pela técnica de INAA	50
5.2.8.	Cálculo da concentração dos elementos determinados no vinho tinto in natura	53
5.2.9.	Limites de detecção e quantificação	54
5.3.	Aplicação da técnica de Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma de argônio Acoplado Indutivamente (ICP OES)	55
5.3.1.	Preparo das amostras para ICP OES	55
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
6.1.	Resultados de concentração dos elementos determinadas para critério de escolha da amostra a ser analisada.....	56
6.2.	Resultados dos elementos determinados no estudo de branco analítico obtidos pela técnica de INAA, nos diferentes métodos de pré-concentração da amostra.....	56
6.2.1.	Resultados dos elementos determinados no branco analítico pelo procedimento de liofilização	57
6.2.2.	Resultados dos elementos determinados no branco analítico pelo procedimento de evaporação	58
6.2.3.	Resultados dos elementos determinados no branco analítico pelo método de calcinação	59
6.3.	Resultados de concentração dos elementos determinados no estudo de branco analítico obtidos pela técnica de ICP OES.....	59

6.4.	Resultados de concentração dos elementos no material de referência obtidos pelas técnicas de INAA.....	60
6.4.1.	Resultados dos elementos determinados no material de referência obtidos por INAA, pelos métodos de liofilização e calcinação	60
6.4.2.	Resultados dos elementos determinados no material de referência obtidos por INAA pelo método de evaporação	61
6.4.	Concentração dos elementos determinados por INAA na amostra de vinho tinto analisada pelos diferentes métodos de pré-concentração e <i>in natura</i>	62
6.4.1.	Concentração dos elementos determinados na amostra de vinho pré-concentrada por liofilização e <i>in natura</i>	63
6.4.2.	Concentração dos elementos determinados na amostra de vinho pré-concentrada por evaporação e <i>in natura</i>	64
6.4.3.	Concentração dos elementos determinados na amostra de vinho pré-concentrada por calcinação e <i>in natura</i>	66
6.4.4.	Limites de detecção e quantificação da técnica de INAA utilizada, obtidos para os diferentes métodos de pré-concentração da amostra de vinho tinto estudados.....	67
6.5.	Concentração dos elementos em vinho <i>in natura</i> determinados pela técnica de ICP OES	68
6.6.	Comparação entre as médias de concentração dos elementos de interesse determinadas pelas técnicas de INAA e ICP OES.....	69
6.7.	Análise estatística dos resultados obtidos por INAA e ICP OES.....	74
7.	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE TABELAS

	PÁGINAS
TABELA 1: Produção de uvas no Brasil, em toneladas.....	22
TABELA 2: Descrição, classificação e origem dos vinhos analisados.....	39
TABELA 3: Tempo de meia vida e energia dos radionuclídeos de interesse.....	50
TABELA 4: Concentrações dos elementos K, Mg, Mn, Na e V, em mg L ⁻¹ , em amostras de vinho tinto nacional determinadas pelo método de INAA – liofilização.....	56
TABELA 5: Massas e concentrações dos elementos presentes no branco analítico obtidas pelo método de liofilização.....	57
TABELA 6: Massas e concentrações dos elementos presentes no branco analítico obtidas pelo método de evaporação.....	58
TABELA 7: Concentração dos elementos presentes nas determinações individuais dos brancos analíticos, obtidas pela técnica de ICP OES (em mg kg ⁻¹).....	59
TABELA 8: Concentrações (em mg kg ⁻¹) dos elementos no MRC Mixed Polish Herb determinados pelo método de liofilização e calcinação.....	61
TABELA 9: Concentrações (em mg kg ⁻¹) dos elementos no MRC Mixed Polish Herb determinados pelo método de evaporação.....	62
TABELA 10: Concentrações dos elementos nas amostras de vinho tinto liofilizadas (mg kg ⁻¹) e <i>in natura</i> (mg L ⁻¹).....	64
TABELA 11: Concentrações dos elementos na amostra de vinho tinto pré-concentrada por evaporação (mg kg ⁻¹) e <i>in natura</i> (mg L ⁻¹).....	65
TABELA 12: Concentrações dos elementos na amostra de vinho tinto pré-concentrada por calcinação (mg kg ⁻¹) e <i>in natura</i> (mg L ⁻¹).....	67

TABELA 13:	Limites de detecção e quantificação dos elementos nas amostras de vinho tinto in natura, para o método de liofilização, evaporação e calcinação, em mg L ⁻¹	68
TABELA 14:	Concentrações dos elementos obtidas pela técnica de ICP OES, em mg L ⁻¹	69
TABELA 15:	Concentrações dos elementos nas amostras de vinho tinto in natura, obtidos pela técnica de INAA através dos diferentes métodos de pré-concentração e por ICP OES, em mg L ⁻¹	70
TABELA 16:	Comparação das médias obtidas para a amostra de vinho tinto determinadas por ICP OES, INAA por liofilização, INAA por evaporação e INAA por calcinação, através do teste estatístico de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.....	75

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINAS
FIGURA 1: Fontes endógenas (linha sólida) e exógenas (linha tracejada) de elementos no vinho.....	15
FIGURA 2: Princípio da Análise por Ativação com Nêutrons.....	34
FIGURA 3: Amostra de vinho liofilizada.....	41
FIGURA 4: Amostra de vinho pipetada em papel filtro Whatman 41.....	42
FIGURA 5: Esquema do processo de liofilização das amostras de vinho.....	42
FIGURA 6: Esquema do processo de evaporação das amostras de vinho.....	43
FIGURA 7: Esquema do processo de calcinação das amostras de vinho.....	44
FIGURA 8: Cinzas da amostra de vinho calcinada, pesadas e seladas em envelopes de polietileno para análise.....	45
FIGURA 9: Amostra pré-concentrada por liofilização ou calcinação, padrão pipetado e material de referência cobertos com papel alumínio para irradiação de longa duração.....	48
FIGURA 10: Amostra pré-concentrada por evaporação, padrão pipetado e material de referência cobertos com papel alumínio para irradiação de longa duração.....	49
FIGURA 11: Variação das médias de concentração dos elementos Ca, K, Mg e Na, em mg L ⁻¹ , pelos diferentes métodos de pré-concentração da amostra analisada pela técnica de INAA.....	72

FIGURA 12:	Variação das médias de concentração dos elementos Co, Cr e V, em mg L ⁻¹ , pelos diferentes métodos de pré-concentração da amostra analisada pela técnica de INAA.....	72
FIGURA 13:	Variação das médias de concentração dos elementos Fe, Mn e Zn, em mg L ⁻¹ , pelos diferentes métodos de pré-concentração da amostra analisada pela técnica de INAA.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vinho e composição

O vinho, inicialmente consumido apenas em cerimônias religiosas, tornou-se ao longo dos anos um item essencial na dieta humana e está entre as bebidas alcoólicas mais consumidas mundialmente (GRINDLAY e col., 2011). De acordo com os últimos dados obtidos pela Organização Internacional do Vinho (OIV), estimou-se um consumo mundial de aproximadamente 24 bilhões de litros de vinho em 2015, sendo os Estados Unidos considerado o maior consumidor do mundo. A produção mundial de vinho aumentou em 580 milhões de litros em relação ao ano anterior e atingiu 27,4 bilhões de litros de vinho em 2015, sendo liderada pela Itália, França e Espanha, nessa ordem (AURAND, 2016).

De acordo com dados de 2015 publicados pela OIV, a comercialização do vinho no mundo em relação ao ano anterior, continuou a crescer em volume e especialmente em valor, com um aumento de 1,8% e 10,8%, respectivamente, (AURAND, 2016). Economicamente, produções de alta qualidade trazem grandes rendimentos e surge um crescente interesse na certificação da origem geográfica dos vinhos (RODRIGUES e col., 2011; SELIH e col., 2014). No mundo, a área total de vinhedos foi estimada em 7.534.000 hectares, sendo a China o segundo maior país em área de produção, apresentando um crescimento de 34.000 hectares em relação ao ano anterior (AURAND, 2016). Dessa forma, a determinação analítica do vinho atrai a atenção de produtores e consumidores (BIMPILAS e col., 2015), tornando-se muito importante caracterizá-lo pela variedade, origem geográfica, teor de elementos e parâmetros físico-químicos (SANTOS e col., 2010).

A determinação analítica de elementos no vinho é dividida em qualitativa, normativa e nutricional. Os objetivos das análises dos elementos compreendem avaliar a autenticidade do vinho, a biodisponibilidade dos elementos essenciais, verificar se os limites de tolerância estabelecidos pela legislação foram respeitados em todo o processo de produção, garantir a qualidade, certificar geograficamente,

e finalmente, ser utilizado como amostra-teste em laboratórios de pesquisa para o desenvolvimento de novos métodos espectroscópicos para a química analítica em vista da complexidade da matriz (GRINDLAY e col., 2011; VOLPE e col., 2009).

Em relação à biodisponibilidade das substâncias, portanto os efeitos nutricionais dos elementos no vinho, estão associados à forma físico-química na qual estão em solução (POHL, 2007). Já as propriedades organolépticas do vinho são função das interações entre todos os elementos presentes e, então influenciadas por compostos fenólicos específicos e por elementos traço (ACETO e col., 2001; BIMPILAS e col., 2015; LARSEN e col., 2006; VOLPE e col., 2009). O 2,4,6-tricloroanisol, por exemplo, presente em baixas concentrações, confere a certos vinhos um sabor desagradável de cortiça e a antiocianina, é uma das substâncias mais responsáveis pela coloração (BIMPILAS e col., 2015; POHL, 2007; THIEL e col., 2004). As concentrações dos elementos traço, devido à sua relação direta com a composição do solo (MORENO e col., 2008) também são indicadoras da origem do vinho e podem ser usadas como critério (POHL, 2007). A composição do solo fornece informações sobre possíveis fraudes ou adulterações pela mistura de vinhos (TRUJILLO e col., 2011; GRINDLAY e col., 2011). A autenticidade do vinho deve então ser garantida por diretrizes rígidas, emitidas pelas autoridades competentes (MARENGO & ACETO, 2003). Nesse sentido, os elementos Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Si, Sr, Zn e Ti são os que mais refletem as peculiaridades do solo ou da uva (MARENGO & ACETO., 2003; MORENO e col., 2008).

Do ponto de vista analítico, podemos dizer que o vinho é uma bebida alcoólica, produto da fermentação de açúcares naturais presentes na uva (POHL, 2007). Forma-se então um complexo de água e etanol, no qual está contida uma grande variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas. A composição final do vinho depende de uma somatória de fatores que muitas vezes podem não ser discriminados ou estarem fora de controle (MARENGO & ACETO, 2003).

Admitindo-se que as espécies de uva utilizadas para a fermentação são quimicamente balanceadas para fermentarem sem adição de açúcar, ácidos, enzimas e nutrientes, a composição final do vinho depende de vários fatores conhecidos, representados na Figura 1 (POHL, 2007). A concentração dos elementos em sua maioria é característica e de origem natural, relacionada com a maturidade e variedade das uvas, o tipo do solo na região de cultivo e as condições

climáticas durante o seu crescimento (FIKET e col., 2011), classificadas como de origem endógena (POHL, 2007). A presença de alguns elementos no vinho também pode estar associada a impurezas externas que atingem o vinho em diferentes estágios de produção, classificadas como exógenas (POHL, 2007). Durante o crescimento das uvas, podem ser provenientes da poluição ambiental ou do solo pelo uso de aditivos para tratamento e práticas de cultivo das plantas, como pesticidas fungicidas e fertilizantes. No processo que compreende a colheita até o engarrafamento e armazenagem, os equipamentos utilizados na produção de vinho e o seu manuseio são fontes de elementos ou substâncias devido ao contato prolongado de vinho com as máquinas, barris e tubos (FIKET e col., 2011). Elementos em maior concentração estão menos dispersos enquanto elementos traço estão mais dispersos em solução (POHL, 2007)

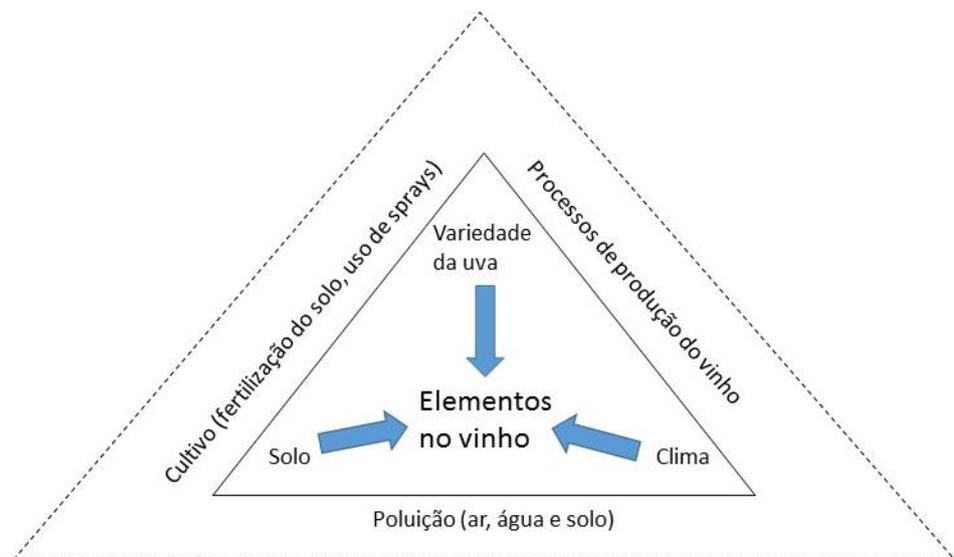


FIGURA 1: Fontes endógenas (linha sólida) e exógenas (linha tracejada) de elementos no vinho.

Em relação à fração inorgânica, o vinho é rico em sais de Cl^{-1} , PO_4^{-3} , SO_3^{-2} e SO_4^{-2} , presentes em concentração maior que 10 mg L^{-1} . Já as substâncias orgânicas estão subdivididas em voláteis e não-voláteis.

Dentre os voláteis como o etanol, metanol, ésteres e terpenos, o etanol apresenta maior abundância (de 8-19 % v/v). Os não-voláteis compreendem: açúcares (glucose, frutose, galactose e manose) de concentração entre 1 e 200 g L^{-1} ; álcoois (glicerol e acetato de butil glicol) de concentração entre 1 e 10 g L^{-1} ; ácidos orgânicos e seus sais conjugados (ácidos tartárico, málico, cítrico

e acético) de concentração entre 1 e 8 g L⁻¹; e polifenóis e flavonóides, presentes em concentração abaixo de 1 g L⁻¹. Os íons presentes em sais orgânicos e inorgânicos de maior abundância são Ca, K, Mg e Na e são responsáveis por regular o metabolismo celular das leveduras, pois mantêm o pH e o equilíbrio iônico (POHL, 2007). Normalmente são encontrados também elementos em concentração menor ou igual a 0,1 mg L⁻¹, que são chamados de traço, como Al, B, Cu, Fe, Mn, Rb, Sr e Zn, dentre outros; e ultratraço como Ag, As, Cd, Cr, Co, Hg, Li, Mo, Ni, Pb, Sc, Se, Sn, Sb, Ti, Tl, terras raras, V, etc (GRINDLAY e col., 2011).

Dentre os cátions presentes no vinho, o Ca²⁺, presente em concentrações entre 10 e 300 mg L⁻¹, (RIBEREAU-GAYON e col., 2000), é conhecido por ser responsável pela turbidez do vinho e pela formação de muitos sais. Dentre os sais formados, o mais insolúvel é o oxalato de cálcio (CaC₂O₄). O tartarato de cálcio (CaC₄H₄O₆), produzido na fermentação, também é um sal relativamente insolúvel, especialmente quando em presença de etanol. O Ca encontra-se em menor concentração em vinhos tintos em comparação aos vinhos brancos, e sua concentração Ca é advinda em sua maioria do solo de cultivo das uvas; naturalmente de mostos; do uso de fertilizantes; da adição de CaCO₃ para desacidificação (RIBEREAU-GAYON e col., 2000); ou de flocculantes (POHL, 2007).

O K apresenta-se em maior concentração, como na maioria dos vegetais, entre 500 e 1500 mg L⁻¹ (GRINDLAY e col., 2011). Especialmente em vinhos feitos a partir da fermentação de uvas nobres ou com adição de metabissulfito ou carbonato durante o processo de vinificação, o K tem concentração ainda maior (MARENCO & ACETO, 2003). Em comparação à vinhos brancos, o vinho tinto tem maior disponibilidade de K pois os fenóis inibem a precipitação do bitartarato de potássio (RIBEREAU-GAYON e col., 2000).

A concentração de Mg, presente entre 1 e 750 mg L⁻¹ (POHL, 2007), está diretamente relacionada com a quantidade de Mg presente no solo de cultivo das uvas ou naturalmente em mostos (MARENCO & ACETO, 2003). Técnicas de produção do vinho também podem favorecer o aumento de concentração do Mg (RIBEREAU-GAYON e col., 2000).

O Na encontra-se em concentrações entre 1 e 300 mg L⁻¹ e pode ser um constituinte natural do solo. Também pode ter sua origem em flocculantes e substâncias adicionadas no refinamento, para eliminação de sólidos suspensos

após a fermentação e diminuição da turbidez do vinho. Vinhos produzidos próximos a regiões litorâneas estão propensos a terem maior concentração de Na (POHL, 2007).

A presença de Cr tem origem mais provável no longo contato do vinho com os equipamentos durante o seu carregamento e armazenamento (POHL, 2007). A faixa de concentração do Cr encontrada na literatura é de até $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (POHL, 2007).

O V está presente em concentrações entre $0,01$ e $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ (POHL, 2007) e está mais associado ao contato do vinho com os equipamentos metálicos de produção do que com o solo de origem (MARENGO & ACETO, 2003).

Os elementos Fe, Mn, Zn e os outros elementos traço são favoráveis ao metabolismo das leveduras por ativar metaloenzimas e estão presentes em baixas concentrações na natureza (POHL, 2007). Maiores concentrações de Fe e Zn encontradas devem-se às práticas de vinificação (RIBEREAU-GAYON e col., 2000) ou ao contato do vinho com os equipamentos de produção (MARENGO & ACETO, 2003), respectivamente. O aumento da concentração de Mn pode ocorrer devido à aplicação de fertilizantes, pesticidas e fungicidas durante o cultivo das uvas. A presença de elementos como Mn é influenciada não apenas pelo ciclo de produção do vinho, mas também pela capacidade de absorção de elementos pela uva e pelo solo de cultivo na qual são cultivadas, o que pode ser alterado pela prática de enxertia, muito aplicada nas videiras (MARENGO & ACETO, 2003). As concentrações encontradas na literatura estão entre $0,1$ e 10 mg L^{-1} de Mn, $0,02$ e 5 mg L^{-1} de Zn e entre $0,6$ e 25 mg L^{-1} de Fe (POHL, 2007). Os elementos Fe e Mn também são responsáveis pela formação de substâncias estáveis alguns com aminoácidos, polifenóis e melanoidinas (aminoácidos associados a açúcares) que apresentam função antioxidante, prevenindo a deterioração e o sabor rançoso dos vinhos.

Durante a produção do vinho, as concentrações dos elementos sofrem alteração natural o que conseqüentemente, modifica o seu caráter organoléptico (POHL, 2007). As concentrações de Ca, Fe, K, Mg e Zn podem diminuir durante a fermentação, uma vez que são consumidos pelas leveduras e o equilíbrio iônico influencia diretamente a conservação do vinho. Elementos como o Ca, K, Mg e Na regulam o metabolismo celular de leveduras mantendo o pH adequado para a

fermentação e, portanto, o rendimento da fermentação alcoólica e o equilíbrio iônico (POHL, 2007). A alteração do pH por conta da fermentação e as baixas temperaturas empregadas para estabilização do vinho favorecem a precipitação de insolúveis como tartaratos de Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb e Zn e a oxidação do Fe. Por isso, na fermentação das uvas, as concentrações de alguns elementos, a disponibilidade e o tempo de conservação do vinho são menores quando comparados a outros derivados da uva. Os elementos Cu, Fe, Mn e Zn, atuam como catalisadores de reações de oxidação ou como promotores de algumas enzimas, desempenhando também por este motivo um papel importante na estabilidade, cor e clareza de vinhos, ou ainda em seu sabor, frescor e aroma (POHL, 2007). Um fenômeno chamado de “browning”, provocado por sais de Fe e Mn, caracteriza-se por uma série de reações de oxidação de compostos orgânicos do vinho e formação de acetaldeídos, levando à modificação na estabilidade e qualidade dos vinhos ao longo do tempo após o engarrafamento, como a perda do frescor e aroma. Por fim, a presença de íons de Fe (III) pode conferir sabor férrico e ser responsável pela formação de complexos metálicos, especialmente quando o pH ou a quantidade de taninos é mais alta (POHL, 2007). A concentração de Mg durante a produção do vinho não sofre alteração natural, uma vez que todos os sais de magnésio são solúveis (RIBEREAU-GAYON e col., 2000). A concentração de Na também é constante durante toda a produção do vinho, pois não sofre influência do crescimento das leveduras (POHL, 2007).

O processo de purificação dos vinhos também culmina na diminuição da concentração de alguns cátions presentes em solução, pela sedimentação de proteínas e aminoácidos sulfatados. Durante o armazenamento, a reação com H₂S proveniente de SO₃ livre, também favorece a precipitação dos cátions na forma de sulfetos (POHL, 2007). Boa parte do Fe é eliminada ao se adicionar substâncias para evitar o “browning”, como o fitato de cálcio ou ferrocianeto de potássio ao vinho tinto (POHL, 2007; RIBEREAU-GAYON e col., 2000). Nestes processos, uma série de sais insolúveis de ferro ou um sal insolúvel conhecido como Calcifos composto por 20% de Ca, dependendo do tratamento escolhido, são precipitados (RIBEREAU-GAYON e col., 2000). Parte do Zn também é eliminada no tratamento do vinho com ferrocianeto (POHL, 2007).

Alguns dos elementos são prejudiciais para a saúde humana, em caso de ingestão excessiva. Espécies como Al, As, Cd, Hg, Pb, Sb, S, Tl e diferentes

compostos organometálicos de Pb são tóxicas e devem ser quantificadas. Portanto, há um interesse crescente na análise de especificação do vinho para avaliar a toxicidade, biodisponibilidade, bioacumulação e transporte de elementos específicos (GRINDLAY e col., 2011).

Foi demonstrado que o consumo diário de vinhos em quantidades moderadas contribui de forma significativa para as necessidades de elementos essenciais no organismo humano, tais como Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Zn, V, entre outros (GRINDLAY e col., 2011). Quando combinado com uma dieta balanceada, o consumo de vinho tem apresentado benefícios à saúde por prevenir inúmeras doenças, como as degenerativas (doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes e osteoporose), e favorecer o aumento da longevidade, relacionado em particular pela ingestão de substâncias antioxidantes como os compostos polifenólicos. A tradicional dieta dos países mediterrâneos, que tem o vinho como um dos alimentos principais, pode contribuir para explicar os benefícios cardiovasculares à saúde dessa população (IRITI & VARONI, 2014). Estudos apontam ser inferior a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares na França quando comparada a outros países com semelhante ingestão de gorduras saturadas e menor ingestão de vinhos tintos – fenômeno denominado “paradoxo francês” (ARTERO e col., 2015). Tais evidências em humanos ainda são debatidas e também podem ser justificadas pela presença de polifenóis, melatonina e fitoesteróis, que são novas moléculas bioativas em estudo (IRITI & VARONI, 2014).

1.2. Origem e classificação dos vinhos

A família de uvas denominada Vitaceae, compreende aproximadamente 14 gêneros e 900 espécies (SOEJIMA & WEN, 2006). O gênero *Vitis*, que tem grande importância agrônômica dentro da família de uvas Vitaceae, está presente quase exclusivamente no hemisfério norte (THIS e col., 2006) e é composto por cerca de 70 espécies capazes de serem hibridizados com a espécie da Eurásia *Vitis vinifera* para ficarem mais resistentes às diferenças climáticas, resultando em muitos híbridos mais adaptados aos ambientes locais para além do seu habitat natural (SHIRAISHI e col., 2010).

Enquanto 30 espécies são nativas da China e o restante das Américas do Norte e Central, sugere-se que a espécie *Vitis Vinifera* tenha surgido pela primeira vez na Eurásia há 65 milhões de anos atrás (THIS e col., 2006) e é amplamente utilizada na indústria de vinhos finos em todo o mundo (VIVIER & PRETORIUS, 2002). A forma cultivada, *V. vinifera* subsp. *vinifera* (ou *sativa*) e a forma selvagem *V. vinifera* subsp. *silvestris* (ou *sylvestris*) coexistem na Eurásia e na África do Norte, sendo essa última geralmente referida como uma subespécie separada, por suas diferenças morfológicas (THIS e col., 2006). As outras espécies não hibridizadas com a espécie *Vitis vinifera*, são designadas como “de mesa”, possuem características desejadas como sabor agradável e boa aparência e são destinadas não só ao consumo *in natura*, mas também são capazes de produzir vinho (SHIRAISHI e col., 2010).

O registro científico compreende aproximadamente 5000 cultivares de videira, aplicadas para a produção de vinho, uvas de mesa (fruta fresca) e indústrias de uvas secas do mundo (VIVIER & PRETORIUS, 2002). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), uma cultivar é resultado de melhoramento em uma variedade de planta, que a torne diferente das demais em sua coloração, porte, resistência a doenças e às condições climáticas, não podendo ser considerada geneticamente modificada, mas sim uma nova combinação do seu próprio material genético.

1.2.1. Vinho no Brasil

De acordo com dados da IBRAVIN, as primeiras videiras originárias de mudas de *Vitis vinifera* foram trazidas ao Brasil em 1532 por Martin Afonso de Souza para a Capitania de São Vicente no sudeste do país. Porém, as condições desfavoráveis de clima e solo impediram que a experiência fosse adiante. Já em 1626, na chegada dos jesuítas no Brasil à região das Missões no Rio Grande do Sul, a vitivinicultura no país foi impulsionada, uma vez que videiras foram introduzidas por padres e a elaboração dos vinhos realizada pelos índios como elemento das celebrações religiosas. Percebendo multiplicação das iniciativas em torno da vinicultura a corte portuguesa proibiu o cultivo da uva no Brasil, o que foi derrubado em 1808 com a vinda da família real. Ganharam maior importância os hábitos em torno do vinho e a bebida foi incorporada às refeições, reuniões sociais

e festividades religiosas. A história do vinho brasileiro remete à colonização portuguesa no século XVI, porém seu desenvolvimento atual deve-se principalmente à chegada de imigrantes italianos, a partir de 1875 à região de Serra Gaúcha, no Rio Grande do Sul. Os imigrantes trouxeram de sua terra natal o conhecimento técnico de elaboração e a cultura do consumo, o que conferiu elevação da qualidade e importância econômica à bebida, bem como impulsionou um grande salto na produção. De modo a se organizar o setor, foi então criado o Sindicato do Vinho e o associativismo foi adotado pelos agricultores. Tais fatos atraíram a atenção de empresas estrangeiras, que aportaram novas técnicas nos vinhedos e as áreas de cultivo foram ampliadas. Já em 1990, a abertura econômica do Brasil e a conseqüente concorrência com os vinhos importados levou os produtores nacionais a aumentarem a qualidade do vinho, resultando na conquista do selo de Indicação de Procedência pela região do Vale dos Vinhedos. No atual estágio de desenvolvimento da indústria vitivinícola brasileira e tendo em vista os agressivos esforços estabelecidos de exportação dos países produtores, ser capaz de entrar no mercado internacional é um imperativo de sobrevivência em seu próprio mercado interno (FENSTERSEIFERT, 2011; IBRAVIN, 2016).

Atualmente, a produção de uvas no Brasil tem aumentado consideravelmente na última década e a produção está 90% concentrada no Rio Grande do Sul, sendo o restante distribuído entre os estados de Ceará, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Santa Catarina e São Paulo, conforme apresentado na Tabela 1. (MELLO, 2016).

A produção de vinhos no Brasil, com exceção de mostos e sucos, atingiu 280 milhões de litros em 2015, confirmando o 15º lugar no ranking mundial de produtores, ocupado pelos últimos dois anos. Em relação à área de produção vitivinícola nacional, houve uma erosão do solo que resultou em diminuição de 4 mil hectares e o Brasil procede com significativa reestruturação (OIV, 2016). Conforme apresentado na Tabela 1, das 1.499.353 toneladas de uvas produzidas no Brasil, as uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) totalizou em 781.412 milhões de quilos de uvas em 2015, representando 52,12% da produção nacional. (MELLO, 2016). Na América do Sul, o consumo de vinho em 2015 registrou aumento em relação ao ano anterior, especialmente na Argentina, seguida do Chile e do Brasil, nessa ordem. O aumento no consumo de vinho no Brasil foi contabilizado em 360 milhões de litros (OIV, 2016).

TABELA 1: Produção de uvas no Brasil, em toneladas

Estado	2013*	2014**	2015***
Ceará	664	573	940
Pernambuco	228.727	236.767	237.367
Bahia	52.808	77.504	77.401
Minas Gerais	12.734	11.557	12.615
São Paulo	172.868	146.790	142.063
Paraná	79.052	80.910	80.000
Santa Catarina	53.153	66.106	69.189
Rio Grande do Sul	808.267	812.537	876.286
Goiás	4.581	3.330	3.492
Brasil	1.412.854	1.436.074	1.499.353

Fonte: Embrapa -Uva e Vinho

De acordo com a Lei nº 10.970/2004 os vinhos no Brasil devem ser classificados quanto à sua classe, cor e teor de açúcar, conforme descrito a seguir (BRASIL, 2004):

a) Classe

A espécie da uva utilizada para a produção do vinho, bem como seu teor alcoólico determinam a classe do vinho, que pode ser: fino, de mesa, leve, espumante, frisante, gaseificado, licoroso ou composto. No Brasil, segundo ao artigo 9º da lei nº 10.970/2004, vinho de mesa é o vinho com teor alcoólico de 8,6% a 14% em volume, podendo conter até uma atmosfera de pressão a 20°C. Vinho fino é o vinho de teor alcoólico de 8,6% a 14% em volume, elaborado mediante processos tecnológicos adequados que assegurem a otimização de suas características sensoriais, sendo originários exclusivamente de variedades da *Vitis vinífera* (BRASIL, 2004). Ou seja, os vinhos finos referem-se a vinhos de uvas viníferas de todos os níveis de qualidade, enquanto vinhos de mesa referem-se à vinhos de uvas de outras espécies (FENSTERSEIFERT, 2007).

Vinhos leves apresentam teor alcoólico de 7% a 8,5% em volume, sendo sua elaboração a partir de vinho de mesa e obtido exclusivamente da fermentação dos açúcares naturais da uva. Vinhos espumantes apresentam anidrido carbônico,

proveniente de uma segunda fermentação alcoólica em garrafa ou em grandes recipientes, chamados de "método Champenoise" e "método Chaussepied". Vinhos leves e espumantes apresentam teor alcoólico de 10% a 13% em volume. Há ainda os vinhos gaseificados, cujo processo de elaboração inclui a adição de anidrido carbônico puro e apresentam um teor alcoólico de 7% a 14%; os licorosos, que apresentam teor alcoólico de 14% a 18% em volume, sendo permitida a adição de álcool vínico de origem agrícola, mosto concentrado, caramelo, mistela simples (mosto não fermentado adicionado de álcool para impedir a fermentação), açúcar e caramelo de uva; e os compostos, cujo teor alcoólico varia de 14% a 20% em volume, produzidos a partir do vinho de mesa e adicionados de macerados ou concentrados de plantas amargas ou aromáticas, substâncias de origem animal ou mineral, álcool vínico, açúcar, caramelo e mistela simples. Entende-se por álcool vínico, o álcool etílico potável de origem agrícola, com teor alcoólico superior a 95% em volume, a 20°C, o qual é obtido exclusivamente por destilação e retificação de vinho, de produtos ou subprodutos derivados da fermentação da uva (Brasil, 2004).

b) Cor

Em relação à coloração, os vinhos podem ser tinto, rosé ou branco, o que é dependente do tipo de uva utilizada para a sua produção.

c) Teor de açúcar

A partir do teor de açúcar é possível classificar o vinho em seco, meio seco ou suave. Vinhos secos apresentam um máximo de 4,0 g L⁻¹ de açúcar, enquanto vinhos semi secos devem apresentar de 4,0 g L⁻¹ a 25,0 g L⁻¹ de açúcar em sua composição. Por fim, vinhos doces ou suaves, devem conter um mínimo de 25,0 g L⁻¹ de açúcar (BRUCH, 2014).

Embora o conteúdo de alguns elementos presentes no vinho represente uma pequena porcentagem de sua composição total, desempenham um papel importante no processo de produção de vinho e, portanto, na qualidade final do produto. Além disso, por ser uma bebida consumida mundialmente, o vinho torna-se uma importante fonte de macro elementos e elementos traço que são essenciais para os seres humanos, pois os íons metálicos também participam do processo de stress oxidativo em células, relacionando-se indiretamente com o envelhecimento

(SANTOS e col., 2010). O número de pesquisas nacionais relacionadas à determinação analítica dos vinhos é baixo se comparado com outros países produtores como a Espanha, Portugal, França e Austrália (SANTOS e col., 2010). Este fato, atrelado ao crescimento considerável do consumo nacional de vinho (BOSCHETTI e col., 2013; AVEGLIANO e col., 2015), despertou o interesse em aplicar a metodologia de Análise por Ativação com Nêutrons para avaliar os teores de elementos traço essenciais em vinhos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em alimentos e bebidas, as análises empregadas para o controle da qualidade e autenticidade são fundamentais. Em relação aos vinhos, uma parte importante do valor comercial corresponde a parâmetros relacionados com sua história e origem. Portanto, um conjunto de diretrizes legais e rigorosas e uma forte cultura organizacional em torno do vinho para a garantia da qualidade, o que difere de um país para o outro, se fazem necessárias para garantir sua excelência. Nesse sentido, tanto a avaliação sensorial quanto a química são fundamentais. Possíveis fraudes incluem a diluição de vinhos com água, adição de álcool e substâncias para coloração e sabor, mistura de vinhos de menor qualidade e falsas representações de cultivares e origens geográficas. Infelizmente as regulamentações, as boas práticas de fabricação e os procedimentos para determinação da rastreabilidade não são suficientes para garantir a autenticidade de um produto. Portanto, um dos maiores desafios neste âmbito é a necessidade de materiais de referência e padrões que possam ser utilizados para assegurar a identificação de prova de vinhos (VERSARI e col., 2014).

Geralmente, compostos voláteis são determinados para a caracterização da variedade dos vinhos e os elementos traço são para a discriminação geográfica, enquanto que a determinação de compostos fenólicos é realizada com ambas finalidades. A combinação de análises instrumentais e estatísticas tem permitido o sucesso na classificação de vinhos de acordo com a sua variedade, origem geográfica e certos aspectos dos processos de vinificação (VERSARI e col., 2014). A determinação de elementos traço e ultratraço através de técnicas de espectrometria atômica aplicadas para a análise de vinhos é rotineiramente realizada em muitos laboratórios de análise, com estudos sendo publicados anualmente (GRINDLAY e col., 2011). Quase 10% da análise de elementos em vinho estão relacionadas à essas técnicas. Segundo Grindlay e col. (2011) um estudo de recentes aplicações demonstrou que a partir do ano 2000, 40% de todas as referências corresponderam à análise através da técnica de espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP MS), seguida

da ICP OES com 18%, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) com 16% e espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS) com 15%. Dentre as técnicas menos aplicadas, 7% das referências representaram a aplicação da Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (XRF) na análise de elementos em vinhos e 4% as técnicas de espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos HGAAS e HGFAS. Dentre as duas técnicas mais empregadas na análise de elementos em vinho, o ICP MS é mais sensível, mas limitado a amostras com baixo teor de conteúdo de sólidos totais dissolvidos (TDS), enquanto que a técnica de ICP OES é mais robusta, com possibilidade de analisar amostras de matriz com alta TDS. Muitos autores utilizam as duas técnicas de forma complementar por conta das faixas de concentração dos elementos de interesse (SELIH e col., 2014).

A escolha da melhor técnica a ser empregada na determinação de elementos em vinhos depende da concentração dos elementos de interesse, número de elementos a serem analisados e interferentes. A complexidade da matriz traz interferências espectrais e não espectrais, que afetam precisão, exatidão, LOD, etc (GRINDLAY e col., 2011). As substâncias adicionadas ao vinho durante o pré-tratamento das amostras para análise (principalmente ácidos) devem também ser consideradas, a fim de evitar fontes de erros potenciais durante a determinação (TODOLI & MERMET, 1999).

A Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA) é uma técnica não destrutiva que não requer grandes quantidades, tampouco tratamento químico das amostras, e tem capacidade de determinação multielementar com alta sensibilidade, podendo fornecer resultados na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ a ng g^{-1} . A técnica é baseada em processos que ocorrem nos núcleos dos elementos, portanto os estados químicos e físicos dos elementos não influenciam no resultado final (PARRY, 2003; SKOOG & LEARY, 1992).

Praticamente não existem trabalhos que apliquem a Análise por Ativação com Nêutrons (NAA) à análise de vinhos. Apenas alguns poucos estudos foram realizados nas décadas de 80 e 90, como o de May e col. em 1982, que demonstrou a viabilidade da técnica para determinação de Al, As, Ca, Cl, Co, Cr, Cs, K, Fe, Mg, Mn, Na, Rb, V e Zn em vinhos franceses. O estudo, que incluiu uma prévia separação radioquímica de elementos de meia vida longa, pode ser utilizado para

verificar a autenticidade da bebida se combinado com dados complementares (MAY e col., 1982).

Já em 1994, no Laboratorio di Igiene Industriale da Itália, MINOIA e col. utilizaram, entre outras, a técnica de NAA para avaliar a importância da determinação de elementos traço presentes em diversas bebidas, como o vinho tinto, uma vez que tais elementos poderiam estar presentes em fluídos corporais da população consumidora. No estudo, para as análises realizadas utilizando a técnica de NAA, as amostras e vinho foram irradiadas em tempos de 5 minutos a 48 horas, sob um fluxo de nêutrons térmicos de $4,0 \cdot 10^{12}$ a $2,0 \cdot 10^{14}$ n.cm⁻².s⁻¹. Para as irradiações consideradas de curta duração, as amostras foram analisadas sem prévio tratamento em ampolas de polietileno, enquanto que para as irradiações de longa duração, as amostras foram previamente liofilizadas e seladas em ampolas de quartzo de alta pureza. Foram utilizados os materiais de referência SRM 1577 (Bovine Liver), SRM 571 (Orchard Leaves) da National Institute of Standards and Technology (NIST) e soluções padrão sintéticas liofilizadas. Os elementos nas amostras, padrões e nos materiais de referência após a irradiação foram diretamente determinados em detectores de HPGe ou dissolvidos por um sistema de dissolução-destilação semi-automático para a separação radioquímica dos radionuclídeos com atividade induzida antes da medição. Os elementos B, Rb e Zn apresentaram maior concentração nas amostras de vinho, na ordem de 1 mg L⁻¹; os elementos Al, Cu, Mn e Sr apresentaram concentração entre 149 µg L⁻¹ (Cu) e 784 µg L⁻¹ (Mn); os elementos Ba, Co, Cr, Li, Mo, Ni, Pb, Sc, Se, Sn, Ti, V, W e Zr concentração entre 1 e 79,6 µg L⁻¹; os elementos As, Cd, Ce, Eu, Ge, Hg, In, La, Nb, Sb e Tl variaram entre 0.08 µg L⁻¹ e 0.96 µg L⁻¹.

PÉREZ-JORDAN e col. (1998), na Espanha, utilizaram a técnica de ICP-MS para avaliar a sensibilidade na determinação de diversos elementos presentes no vinho e otimizar o tempo de análise. Nesse estudo, a técnica de NAA também foi aplicada para validar a técnica de ICP-MS através da comparação dos resultados obtidos na determinação dos elementos Al, Cs, Cr, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb, Se, Zn, V e Zn. Os elementos Al, K, Mg, Mn, Na e V foram determinados após irradiações de curta duração, enquanto os elementos Cs, Cr, Co, Fe, Sc, Rb, Se e Zn, após irradiações de longa duração. Para as irradiações de longa duração, pesou-se aproximadamente 100 µL da amostra de vinho em ampolas de quartzo e as mesmas foram colocadas em estufa a 50 °C por 24h. O procedimento foi repetido

até a obtenção de aproximadamente 20 mg de amostra seca, a partir de 1000 µL de amostra. Para as irradiações de curta duração, as amostras foram previamente liofilizadas, pesadas em cápsulas de polietileno e então colocadas em estufa a 50 °C por 24h. Após a irradiação, a determinação dos elementos nas amostras foi realizada em detectores de HPGe após tempos de decaimento apropriados. O material de referência utilizado foi o Seronorm Second Generation da Nycomed Pharma Sero e as soluções padrão multielementares foram preparadas por diluição dos elementos em HNO₃, HCl e/ou água.

O estudo mais recente da aplicação da técnica de INAA na análise de vinhos foi publicado em 2002 e consistiu na determinação dos elementos traço Ag, As, Ba, Br, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Hf, Hg, K, La, Mg, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, Sr, Ta, Tb, Th, Tl, U, Yb, Zn e Zr em vinhos da República da Macedônia utilizando o método do k_0 , bem como a comparação de alguns resultados com àqueles obtidos pelas técnicas de espectrometria de absorção atômica ETAAS e FAAS (CVETKOVIC e col., 2002). Para a análise, 100 mL de cinco amostras de vinho diferentes (tinto, branco e rosé) foram digeridas com 5 mL de HNO₃ concentrado e 10 mL de H₂O₂ 30% v/v sob aquecimento a 100 °C, em banho de água, até a completa secura. O resíduo foi então diluído com água destilada e avolumado até 10 mL. Foram utilizadas cápsulas de polietileno de alta pureza e as amostras foram irradiadas juntamente com os padrões por 20 horas no reator TRIGA Mark II do Instituto Jožef Stefan (IJS) sob um fluxo de nêutrons térmicos de $1,1 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após a irradiação, a amostra e o padrão foram transferidos para pequenos frascos de cintilação previamente limpos para a medição. Cada amostra foi medida três vezes em um detector HPGe com 40% de eficiência relativa após 2-3-8-10 e 30-40 dias de resfriamento. As medições foram feitas de modo a se manter o tempo morto do detector abaixo de 10%. Foram obtidos resultados similares de concentração dos elementos Ca, Co, Cr, K e Na no vinho pelas técnicas de INAA e AAS (Espectrometria de Absorção Atômica). Algumas diferenças foram encontradas para os elementos As, Fe e Zn. Os elementos Cu, Mg, Ni, Pb, Se e Tl não puderam ser determinados por INAA e foram analisados apenas por AAS. Todos os outros elementos traço apresentaram concentrações na ordem de µg L⁻¹. Os resultados de concentração dos elementos traço obtidos ficaram abaixo do conteúdo máximo estabelecido pela OIV.

Muitos estudos para avaliação da autenticidade do vinho e confirmação possíveis fraudes ou adulterações ainda precisam ser realizados (VERSARI e col., 2014). Em estudos que envolvem a determinação de até 38 elementos em vinhos por ICP OES e ICP MS, por exemplo, apenas os resultados de 8 a 17 elementos são considerados. Este grupo de elementos (Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Si, Sr, Zn e Ti) compreende aqueles que normalmente não são afetados pelo processo de vinificação e originam naturalmente do solo de cultivo (MARENGO e col., 2003; MORENO e col., 2008; SELIH e col., 2014). O principal interesse do emprego de ambas as técnicas consiste na classificação de vinhos de acordo com a sua origem geográfica (SELIH e col., 2014; VERSARI e col., 2014). Portanto, pode-se dizer que de todos os elementos normalmente determinados pelas técnicas de ICP OES e de ICP MS, apenas aproximadamente 40% são determinados para esta finalidade. Ainda assim, apesar de a técnica de ICP OES ser amplamente empregada (HORII e col., 2011), depende da concentração dos elementos de interesse e os resultados podem sofrer interferências pela complexidade da matriz, como relatam Grindlay e col. (2011). Por este motivo, caso haja interesse na certificação da origem dos elementos, a técnica de ICP MS normalmente é utilizada de forma complementar. Apesar da técnica de ICP MS sofrer maior interferência pela complexidade da matriz em relação ao ICP OES, apresenta maior sensibilidade para a análise de vinhos (SELIH e col., 2014).

Há muitos anos, vários estudos nacionais têm se voltado para a determinação de elementos traço presentes nos alimentos utilizando a técnica de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA) no Laboratório de Análise por Ativação (LAN) do IPEN/CNEN-SP, por conta de seu importante papel nutricional e funções no organismo humano (MAIHARA e col., 2001, 2004, AVEGLIANO e col., 2011, 2014; AMBRÓGI e col., 2016). Tais informações são fundamentais para eventuais intervenções na dieta de uma determinada população, tornando-se assim representativas no âmbito da saúde pública (AVEGLIANO e col., 2011). Atualmente, um importante estudo está sendo desenvolvido no LAN-IPEN-CNEN/SP, cujo objetivo é avaliar as ingestões de elementos essenciais e tóxicos em alimentos mais consumidos que constituem a dieta da população do Estado de São Paulo, segundo a mais recente Pesquisa de Orçamentos Familiar (POF 2008-2009) do IBGE. Dentre os alimentos analisados

na dieta, estão presentes os vinhos e as bebidas alcoólicas. Nesse sentido, o estudo do presente trabalho será de importância para a avaliação dos teores presentes em bebidas alcólicas pela técnica de Análise por Ativação com Nêutrons no Estudo da Dieta Total.

As análises do presente trabalho foram realizadas pela técnica de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA). Na ausência de material de referência certificado (MRC) relativo à amostra analisada disponível no mercado, a precisão e a exatidão da técnica de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA) para cada elemento foi verificada pela comparação dos resultados obtidos por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma de Argônio Acoplado Indutivamente (ICP OES). Da mesma forma, Minoia e col. (1994), com o objetivo de avaliar a relevância de diversas bebidas como o vinho no estabelecimento de valores de referência de elementos traço presentes nos fluidos corporais e tecidos da população em geral, aplicaram a técnica de ICP MS. No entanto, uma vez que os materiais de referência certificados (CRM) relativos às matrizes analisadas estavam disponíveis apenas para água doce, a precisão da técnica de ICP MS na determinação de cada elemento foi verificada por pelo menos outra técnica analítica. Foram então utilizadas as técnicas de GFAAS, HGAAS, ICP OES e NAA.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinação de Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, V e Zn em vinho tinto nacional pelo Método de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA).

3.2. Objetivos específicos

a) Comparação entre os procedimentos de calcinação, evaporação e liofilização para pré-concentração de amostras de vinho tinto nacional.

b) Comparação dos resultados das concentrações dos elementos obtidas pelos métodos de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA) e de Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma de Argônio Acoplado Indutivamente (ICP OES).

c) Análise estatística dos resultados obtidos, através dos testes de comparação múltipla ANOVA e Tukey-Kramer.

4. MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS

4.1. Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA)

A Análise por Ativação com Nêutrons (NAA) baseia-se em reações nucleares que ocorrem com núcleos atômicos e nêutrons, as partículas ativadoras. Os nêutrons interagem com os núcleos presentes em uma amostra ocorrendo a formação de radionuclídeos. A radiação emitida por estes núcleos é então medida (PARRY, 2003). Dentre os vários tipos de radiação que podem ser emitidos, a radiação gama oferece as melhores características para a determinação seletiva e simultânea das concentrações dos elementos (BODE, 1996).

A análise por ativação com nêutrons (AAN) pode ser realizada com separação radioquímica, na qual a amostra após a irradiação é decomposta quimicamente por procedimentos de separação (dissolução); ou instrumental (INAA), método no qual os radionuclídeos são determinados em função das energias dos raios gama e do tempo de meia-vida. É um método não-destrutivo e não necessita de prévia dissolução da amostra. O método comparativo é bastante utilizado na Análise por Ativação com Nêutrons, porque alguns parâmetros da análise podem ser descartados, já que as amostras e os padrões são irradiados simultaneamente, sob as mesmas condições de fluxo de nêutrons, tempo e posição de irradiação.

Além do método comparativo, há o método de análise absoluta e o método k_0 . O método absoluto consiste na determinação da concentração dos elementos com base no conhecimento do fluxo dos nêutrons incidentes, da calibração de eficiência do detector e a utilização de algumas constantes físicas dos elementos a serem analisados, como abundância isotópica, seção de choque e porcentagem de emissão gama por decaimento. O método k_0 consiste na substituição destas constantes físicas por uma constante k_0 obtida experimentalmente. Esta técnica é bastante útil em análises rotineiras de elementos com k_0 pré-determinado, além de garantir maior precisão e exatidão para alguns

elementos, quando comparada à análise por método comparativo. O método k_0 pode ser bastante vantajoso para a certificação de materiais de referência e quando as medições são diretas e não necessitam de prévia separação radioquímica. Porém, o método k_0 possui implantação complexa, já que necessita de um grande esforço para a determinação das constantes e necessita de uma caracterização precisa da posição de irradiação e do sistema de contagem, além de boa infraestrutura computacional. (CORTE, 1986; CVETKOVIC e col., 2002).

Para uma análise instrumental completa, as amostras podem ser irradiadas em tempos de 20 segundos a 5 minutos (irradiações curtas), onde radionuclídeos de meias-vidas curtas são determinados; e de 8 a 16 horas, onde os radionuclídeos de meias-vidas de horas a dias são analisados (irradiações longas). As mesmas amostras usadas para a irradiação curta podem ser utilizadas para irradiações longas, ou novas amostras podem ser preparadas (PARRY, 2003).

No presente trabalho foi utilizada a técnica de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA) e aplicado o método comparativo, onde as amostras são irradiadas simultaneamente com padrões contendo quantidades conhecidas dos elementos de interesse. Após a irradiação, as atividades dos radionuclídeos presentes nas amostras e padrões são medidas em espectrômetros de raios gama sob a mesma geometria de contagem. A concentração é obtida pela comparação das atividades induzidas após tempos de irradiação (t_i) e decaimento (t_d), da amostra e do padrão, utilizando-se a seguinte expressão:

$$C_s = \frac{(m_e A_s) e^{\lambda(tds - tde)}}{M_s A_e} \quad (1)$$

Onde:

C_s = concentração do elemento na amostra ($\mu\text{g g}^{-1}$)

m_e = massa do elemento no padrão (g)

A_s = atividade do radionuclídeo na amostra (cps)

λ = constante de desintegração (s^{-1})

tds = tempo de decaimento do radionuclídeo na amostra (s)

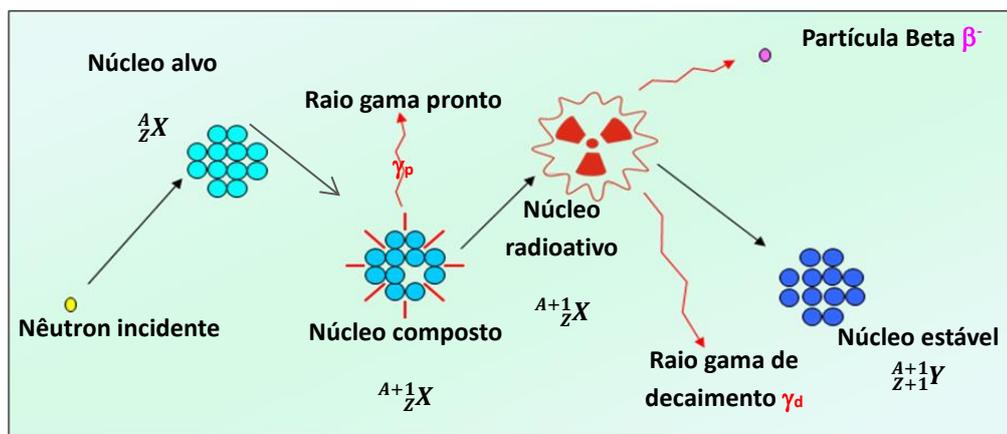
tde = tempo de decaimento do radionuclídeo no padrão (s)

M_s = massa total da amostra (g)

A_e = atividade do radionuclídeo no padrão pipetado (cps)

Uma vez que os nêutrons são eletricamente neutros por natureza, não sentem a presença dos campos eletromagnéticos do átomo e do núcleo, atingindo diretamente o núcleo do elemento (GAIKWAD, 2011). A Figura 2 ilustra a sequência de eventos que ocorrem no tipo mais comum de reação nuclear em INAA, a captura de nêutrons térmicos, ou reação (n, γ).

FIGURA 2: Princípio da Análise por Ativação com Nêutrons



A INAA apresenta alta especificidade, sensibilidade e aplicabilidade na determinação de elementos traço, na ordem de mg kg^{-1} a $\mu\text{g kg}^{-1}$, em uma ampla gama de matrizes. Além disso, há muitos parâmetros experimentais que podem ser ajustados para se obter um melhor limite de detecção. Por exemplo:

- a) A energia e o fluxo de nêutrons podem ser variados para permitir uma ativação seletiva.
- b) O tempo de irradiação pode ser variado, resultando numa ativação intensificada dos radionuclídeos com tempos de meia-vida curtos.
- c) A diferença das meias-vidas entre os vários radionuclídeos é uma ferramenta para distingui-los e as interferências espectrais podem ser superadas usando-se linhas múltiplas de raios-gama e radionuclídeos múltiplos para identificar os elementos.

A preparação da amostra para a INAA é relativamente simples e elimina possíveis riscos de introdução de contaminantes, já que não necessita de dissolução (PARRY, 2003). As desvantagens do método abrangem: não fornecer a forma química do elemento; o tempo necessário para a análise de alguns

elementos é longo (semanas); não é possível a determinação de elementos como O, N, Pb; há a necessidade de reator nuclear; o custo de manutenção da instalação é alto; e há a exposição do analista à radiação (GAIKWAD, 2011).

4.2. Espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES) (SKOOG & LEARY, 1992)

A espectroscopia de emissão atômica é um processo no qual a luz emitida por átomos excitados ou íons é medida. A energia térmica ou elétrica excita um átomo livre ou íon a ponto de levá-lo a um estado energético mais alto, sendo este estado instável. No retorno à condição mais estável ou ao estado fundamental dos mesmos, a luz é emitida com comprimentos de onda específicos para os elementos que estão presentes na amostra.

Na técnica de ICP OES o plasma é usado como fonte de excitação para análise quantitativa de amostras líquidas e de amostras sólidas. O plasma pode ser definido como um gás parcialmente ionizado, formado eletromagneticamente por indução de radiofrequência (tipicamente 700-1500 W) acoplado ao gás argônio. A descarga de plasma possui uma forma de gota branca brilhante muito intensa.

A amostra é injetada no ICP e nebulizada como um aerossol através do centro do plasma, formando uma névoa muito fina de gotas de amostra. Uma vez que o aerossol da amostra foi dessolvatado, vaporizado e atomizado, ele é excitado e ionizado para que o átomo ou íon possa emitir sua radiação característica. O argônio também é utilizado para transportar a amostra.

A literatura relata que a temperatura no ICP varia de 6000 K a 10000 K. Estas temperaturas permitem a completa atomização dos elementos, minimizando os efeitos de interferência química.

Na técnica de ICP OES podem ocorrer os seguintes tipos de interferências: espectrais, de background e matriz.

a) As interferências espectrais ocorrem quando outras espécies presentes apresentam linhas espectrais próximas, aumentando a intensidade medida e a concentração real.

b) As interferências de radiação consistem quando o sinal de “background” é representativo. Isso ocorre quando a concentração do elemento em determinação está próxima do limite de detecção. O sinal de “background” ou de

fundo estará presente devido à presença de gases do plasma, vapor de água e outros elementos presentes na solução da amostra. Espectrômetros comerciais apresentam a possibilidade de correção desse interferente

c) Interferências de matriz: associada aos processos de nebulização, dessolvatação, vaporização, ionização e excitação da amostra, são responsáveis pela mudança na velocidade com que é transportada para a fonte de excitação e pela formação do aerossol. Padrões com composição semelhante à das amostras devem contornar esse tipo de interferência.

4.3. Definições e considerações sobre os processos de pré-concentração das amostras de vinho tinto

Os elementos determinados no presente trabalho estavam presentes em concentrações muito próximas ao limite de detecção. Portanto, foi necessário adotar procedimentos de pré-concentração das amostras de vinho tinto. Considerando-se que:

Para a técnica de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA) utilizada em amostras de vinho tinto, foram adotados os procedimentos de liofilização, evaporação e calcinação para a pré-concentração da amostra de vinho analisada.

4.3.1. Liofilização

De um modo geral, “secagem” significa remoção de umidade de uma mistura e consiste no processo mais comum de preservação de alimentos. Com inúmeras variações, o procedimento permite aplicação em diversas operações para a manipulação de alimentos como partículas sólidas, lamas, soluções e materiais pastosos e contínuos. Dentre eles, a liofilização é baseada na desidratação por sublimação da água de um produto congelado, quando submetido à vácuo. A liofilização é o método de remoção de água cujos produtos finais são de melhor qualidade quando comparados aos outros métodos de secagem. Isso ocorre porque a ausência de água líquida e as temperaturas baixas utilizadas no processo interrompem a maioria das reações microbiológicas, resultando em um produto de excelente qualidade. O estado sólido da amostra da água durante a liofilização

protege a estrutura primária e a forma dos produtos com uma redução mínima de volume (RATTI,2001). Além disso, vários estudos nacionais empregaram a liofilização como método de pré-concentração de amostras de diversos alimentos para a determinação de elementos traço no Laboratório de Análise por Ativação (LAN) do IPEN/CNEN-SP. Para obtenção dos resultados, foi utilizada a técnica de Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA). Os estudos contribuíram para o Estudo de Dieta Total da população do Estado de São Paulo, metodologia que possibilita estimar a ingestão diária de elementos (AMBRÓGI e col., 2016; AVEGLIANO & MAIHARA, 2011; AVEGLIANO e col., 2014).

4.3.2. Evaporação

Neste procedimento de pré-concentração, utiliza-se uma estufa para a preparação de material mais concentrado da amostra, obtido por evaporação parcial de água e voláteis presentes. Para as análises por espectrometria de emissão atômica aplicadas na determinação de elementos traço em amostras de vinho, que corresponde às técnicas mais empregadas, a matéria orgânica das amostras deve ser destruída de modo a serem evitados efeitos importantes da matriz durante a medição. A calcinação (ou a digestão ácida com reagentes oxidantes) são os métodos mais aplicados, porém a evaporação alcoólica também é considerada (MORENO e col., 2008). Tais procedimentos também levam à pré-concentração das amostras de vinho.

4.3.3. Calcinação

A calcinação é o processo de decomposição térmica e mudança de estrutura cristalina de uma amostra, a altas temperaturas, para a obtenção de cinzas. Ao final do processo, obtêm-se um produto calcinado (cinzas) com características bem homogêneas. A calcinação também é usada em análises químicas de substâncias complexas ou na quantificação de metais, pois a maior parte dos óxidos metálicos se mantém estável nessa temperatura (SOUZA, 2016).

O controle da temperatura é necessário, pois caso contrário, os sais de metais formados podem se volatilizar. A oxidação incompleta na mufla também pode ocorrer, como relata GOUVEIA et al (2001), levando à perda de analito devido

ao não desprendimento do analito do resíduo carbonáceo de alta estabilidade de alguns compostos orgânicos presentes na amostra, ou formados durante sua decomposição. Portanto, deve-se utilizar algum solvente para dissolução da amostra e então prevenir a volatilização dos analitos. O solvente escolhido para o estudo foi o ácido nítrico, cuja composição apresenta elementos que não são ativados na técnica de INAA.

A maior vantagem do procedimento de calcinação está na possibilidade de pré-concentração quando concentrações muito baixas precisam ser determinadas. A cinza obtida é completamente livre de matéria orgânica e altamente concentrada. Além disso, o tempo que o procedimento demanda é de dois dias e não se faz necessária monitoração contínua por parte do analista.

4.4. Testes estatísticos aplicados

Aplicando-se a análise de variância ANOVA-one way analysis é possível verificar se há a igualdade entre as médias dos resultados, porém não indica quais médias são significativamente diferentes (TRIOLA, 1998). Para esta finalidade, deve ser aplicado o teste de Tukey-Kramer, através do qual é possível comparar três ou mais médias.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Seleção da amostra de vinho

Sete amostras de vinho tinto nacionais originárias do estado do Rio Grande do Sul, descritas na Tabela 2, foram adquiridas nos mercados de São Paulo.

TABELA 2: Descrição, classificação e origem dos vinhos analisados.

Amostra	Coloração	Tipo de uva	Graduação de açúcar	Graduação Alcoólica (% Vol.)	Região
A	Tinto	Mesa	Seco	10,5	Flores da Cunha
B	Tinto	Mesa	Seco	10,5	Bento Gonçalves
C	Tinto	Mesa	Seco	10,5	Flores da Cunha
D	Tinto	Fino	Seco	13	Bento Gonçalves
E	Tinto	Mesa	Suave	10,7	Flores da Cunha
F	Tinto	Mesa	Seco	10,8	Flores da Cunha
G	Tinto	Fino	Suave	12,5	Bento Gonçalves

Sabe-se que os processos de produção, armazenamento e distribuição podem afetar parcial ou completamente a qualidade de um produto. De fato, várias alterações nas características físicas, químicas e/ou biológicas em alimentos são observadas durante essas práticas. Os processos podem também favorecer reações bioquímicas indesejadas, levando a mudanças nos compostos aromáticos ou degradação de nutrientes. Os métodos de preservação de alimentos que envolvem a remoção da água são os mais comumente utilizados e a liofilização, dentre eles, é o que resulta em produtos finais de melhor qualidade (RATTI, 2001). Portanto, o procedimento de liofilização aplicado à técnica de INAA foram utilizados para a escolha da amostra a ser estudada. Nesse sentido, o vinho A apresentou maiores níveis de concentração dos elementos de interesse, sendo assim

esperados menores os erros estatísticos das análises. Desse modo, a amostra do vinho A foi escolhida para as análises do presente estudo.

5.2. Aplicação da Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA)

A técnica de INAA foi empregada para análise dos elementos de interesse Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn e V na amostra do vinho tinto nacional Quinta do Carvalho. Três métodos de pré-concentração da amostra de vinho foram estudados: liofilização, evaporação e calcinação.

5.2.1. Procedimentos empregados na pré - concentração das amostras de vinho

5.2.1.1 Procedimento de Liofilização

Antes do processo de liofilização, a amostra de vinho foi pesada em três recipientes de polietileno previamente desmineralizados com solução de HNO₃ concentrada e lavados com H₂O Milli Q. Os recipientes foram então tampados e armazenados à temperatura de -4^oC por 24 horas para o prévio congelamento.

Posteriormente, com o auxílio de uma bandeja, os recipientes foram colocados em banho de nitrogênio líquido – o que favorece a redução de temperatura, pois por ter baixo ponto de fusão, a amostra quando retirada do congelador se liquidifica em poucos instantes. Dessa forma, a amostra foi congelada e então parcialmente liofilizada em um ciclo de 8 horas à temperatura de - 50 °C e pressão de 49 µbar no equipamento Modulyo D Freeze Dryer da Thermo Electron Corporation.

A amostra de vinho, após a pré-concentração por liofilização que teve duração de 8 horas, apresentou aspecto viscoso, não sendo possível a solidificação pela sublimação da água incompleta, conforme mostra a Figura 3. De fato, o alto teor de açúcar leva a uma menor perda de água durante a liofilização, como foi observado por Vallinoto (2013). No estudo foram determinados elementos

essenciais e tóxicos em alimentos comerciais infantis por Análise por Ativação com Nêutrons e Espectrometria de Absorção Atômica. O processo de liofilização teve de ser interrompido após 8 horas porque bolhas poderiam levar a perdas de analito.



FIGURA 3: Amostra de vinho liofilizada.

Para a preparação da amostra de vinho para a irradiação, inicialmente foram pesadas seis tiras de papel de filtro Whatman 41 vazias em placa de Petri. Como a amostra liofilizada, quando na temperatura ambiente não apresentou aspecto sólido, porém muito viscoso, foi necessário pipetar o volume da amostra liofilizada vagarosamente nos papéis filtro com o auxílio de uma pipeta Eppendorf. Dentre os três recipientes que continham amostra liofilizada, o escolhido para serem retiradas as alíquotas da amostra de vinho para serem pipetadas nos papéis filtro foi o recipiente que apresentou maior perda de água, ou seja, no qual a amostra apresentou maior concentração. Foram então pipetados 200 μL da amostra de vinho liofilizada em cada uma das tiras de papel filtro. As tiras de papel filtro contendo as amostras foram secas sob lâmpada de infravermelho, conforme apresentado na Figura 4.

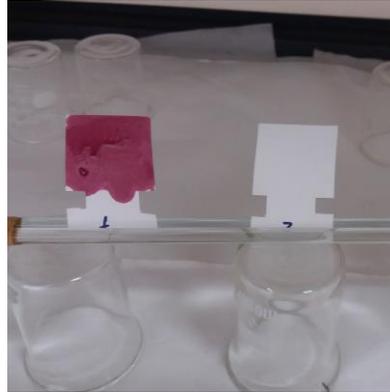


FIGURA 4: Amostra de vinho pipetada em papel filtro Whatman 41.

Após a secagem, as tiras de papel foram pesadas novamente e acondicionadas, com o auxílio de uma pinça, em envelopes de polietileno previamente desmineralizados. O esquema do processo de liofilização da amostra de vinho está apresentado na Figura 5.

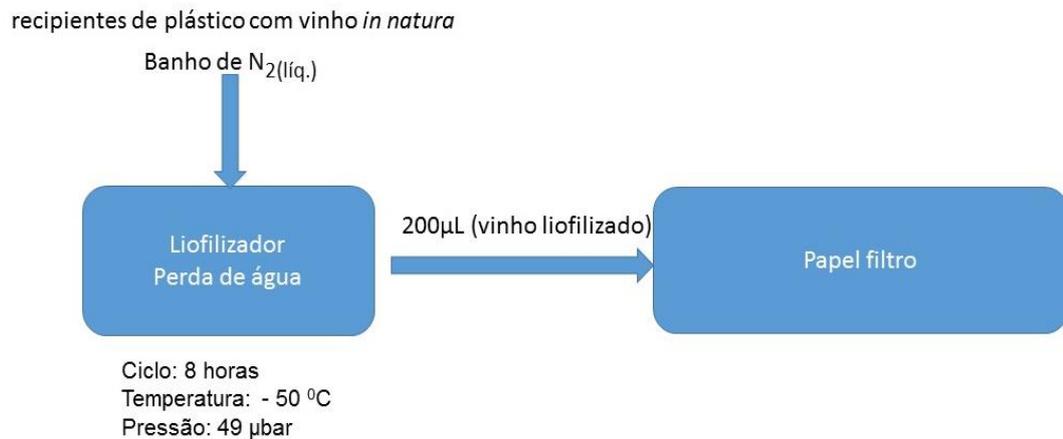


FIGURA 5: Esquema do processo de liofilização das amostras de vinho.

5.2.1.2. Procedimento de evaporação

Para este procedimento, seis cápsulas de polietileno de alta densidade e pureza, marca Posthumus Plastic, de 12,1 mm de altura e 9,3 mm de diâmetro (modelo W), originárias da Holanda, específicas para utilização em INAA, foram

pesadas vazias. O vinho foi homogeneizado por agitação e, com o auxílio de uma pipeta volumétrica Eppendorf previamente calibrada, foram transferidos 200 μL de vinho para cada uma das cápsulas. As cápsulas foram novamente pesadas e, sobre uma placa de Petri, colocadas em estufa a 70 $^{\circ}\text{C}$.

Após 24 horas, as cápsulas foram retiradas da estufa, armazenadas por uma hora em dessecador para que atingissem a temperatura ambiente e pesadas novamente. Acrescentou-se mais uma alíquota de 200 μL de vinho às cápsulas com o auxílio de uma pipeta volumétrica e as mesmas, sobre uma placa de Petri, foram novamente colocadas em estufa a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

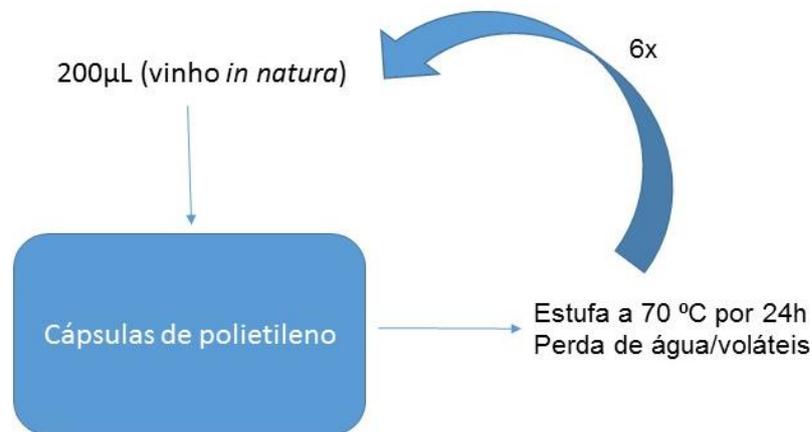


FIGURA 6: Esquema do processo de evaporação das amostras de vinho

Este procedimento, esquematizado na Figura 6, foi repetido por seis vezes (ou seis dias), totalizando 1,200 μL do vinho in natura pipetados para obtenção de massa seca similar à do material de referência, de modo a se manter a mesma geometria de análise. As cápsulas de polietileno contendo o extrato seco, devidamente limpas com acetona PA em suas superfícies e então armazenadas em dessecador para irradiação.

5.2.1.3. Procedimento de Calcinação

Para o preparo das alíquotas da amostra para irradiação das cinzas, foram utilizados estufa com temperatura regulável e estável, cadinhos cerâmicos,

ácido nítrico concentrado, peróxido de hidrogênio 30% v/v, mufla e chapa de aquecimento.

Um cadinho desmineralizado foi pesado vazio e a ele adicionados aproximadamente 65 mL da amostra de vinho. O cadinho foi novamente pesado e então colocado em estufa à 70 °C por 60 horas. O cadinho foi retirado da estufa, armazenado em dessecador por uma hora para que atingisse a temperatura ambiente e pesado novamente.

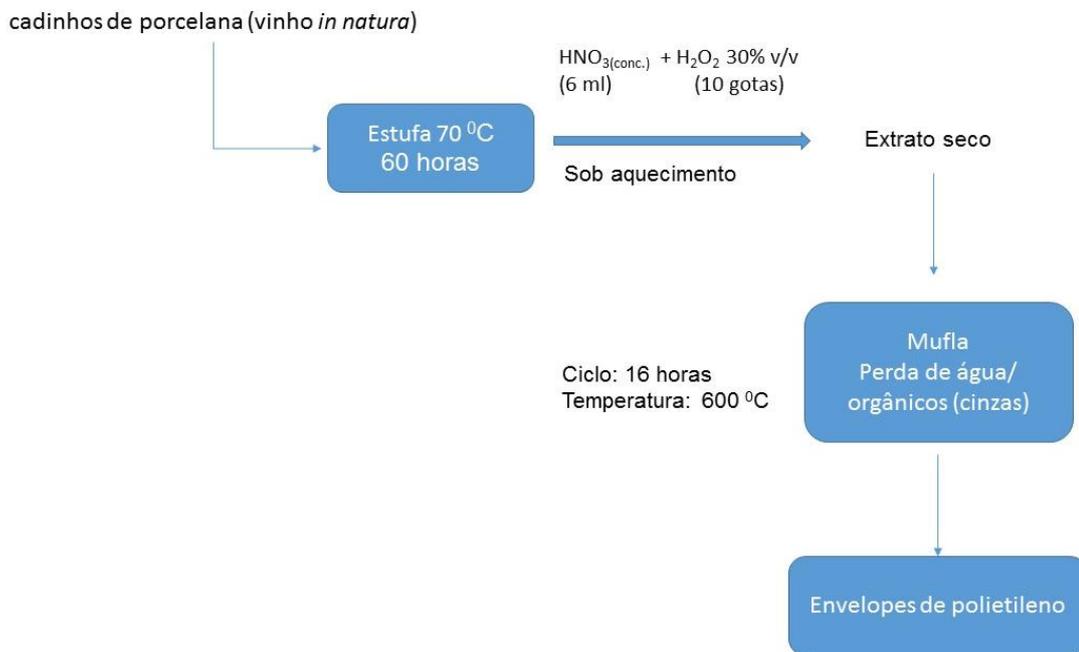


FIGURA 7: Esquema do processo de calcinação das amostras de vinho

Conforme apresentado na Figura 7, sob aquecimento de 80 °C, a amostra foi dissolvida com aproximadamente 6 mL de ácido nítrico concentrado PA e 10 gotas de peróxido de hidrogênio 30% v/v. A solução foi mantida sob aquecimento até evaporação completa do solvente e então colocada em estufa à 600 °C por 16 horas. Após este período, o cadinho foi retirado da mufla e resfriado em dessecador por 6 horas. Posteriormente, alíquotas de 0,020 g foram cuidadosamente pesadas diretamente em envelopes de polietileno previamente desmineralizados e então selados para irradiação, conforme apresentado na Figura 8.

Normalmente, a destruição da matéria orgânica por via seca consiste na dissolução da cinza resultante da calcinação em um pequeno volume de ácido e a

solução obtida é então pipetada em papel filtro. Como as concentrações dos elementos de interesse na amostra de vinho são muito baixas e seria necessário um balão volumétrico calibrado de volume muito pequeno para comportar a solução a ser pipetada no papel filtro, decidiu-se pesar as cinzas diretamente em envelopes de polietileno.



FIGURA 8: Cinzas da amostra de vinho calcinada, pesadas e seladas em envelopes de polietileno para análise.

5.2.2. Preparação dos padrões sintéticos

Os padrões dos elementos foram preparados a partir de soluções padrão da marca SPEX CERTIPREP, diluídas a concentrações apropriadas. As soluções foram pipetadas com o auxílio de pipetas Eppendorf e secas sob lâmpada de infravermelho.

As seguintes soluções certificadas da SPEX Certif foram utilizadas: $10012 \pm 50 \text{ mg L}^{-1}$ de Ca, $990 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$ de Co, $996 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$ de Cr, $1008 \pm 30 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe, $10018 \pm 50 \text{ mg L}^{-1}$ de K, $9997 \pm 50 \text{ mg L}^{-1}$ de Mg, $5058 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ de Mn, $204 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ de Na, $1001 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ de V e $991 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn. Os padrões foram utilizados para os métodos de liofilização, calcinação e evaporação e foram agrupados em cada papel filtro da seguinte forma: Ca, Fe e Zn; Co e Cr; K, Mn e Na; Mg; e V.

5.2.2.1. Preparação dos padrões sintéticos para os procedimentos de liofilização e calcinação

Cerca de 25 a 100 μL das soluções padrão foram pipetadas sobre tiras de papel de filtro Whatman 41. Os padrões foram secos sob lâmpada de infravermelho por uma hora. Quando secas, as tiras de papel filtro foram acondicionadas e seladas em envelopes de polietileno previamente desmineralizados.

5.2.2.2. Preparação dos padrões sintéticos para o procedimento de evaporação

Cápsulas de polietileno de alta densidade e pureza, marca Posthumus Plastic, de 9,0 mm de altura e 9,3 mm de diâmetro (modelo T), originárias da Holanda, específicas para utilização em INAA, foram preenchidas por papel de filtro Whatman 41 cortados em tamanho pequeno até uma altura similar ao do extrato seco da amostra, de modo a se garantir a mesma geometria de análise para a irradiação. Cerca de 25 a 100 μL das soluções padrão foram pipetadas com o auxílio de pipetas Eppendorf nas cápsulas. Os padrões foram secos sob lâmpada de infravermelho por uma hora. Quando secas, as cápsulas contendo os padrões pipetados foram tampadas e armazenadas em dessecador até as análises.

5.2.3. Análise do material de referência

Segundo a definição dada pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012), um material de referência certificado (MRC) é um material suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas. Deve ser acompanhado de uma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos. Pode ser usado na calibração de um aparelho de medição, na avaliação de um método de medição ou atribuição de

valores a materiais. Não há MRC de vinho disponível para a análise de vinhos (MORENO e col., 2008). Portanto, além da determinação analítica dos elementos através de ICP OES, o material de referência certificado Mixed Polish Herb (INCT-MPH-2) do Institute of Nuclear Chemistry and Technology da Polônia foi analisado pela técnica de INAA para verificar a precisão e exatidão dos padrões pipetados utilizados.

O teor de umidade do material de referência foi considerado para fazer a correção da massa do MRC utilizado na INAA. A determinação de umidade foi feita da seguinte forma: a massa do pesa-filtro vazio foi medida, e posteriormente o mesmo foi colocado em estufa por 24 horas à 85 °C, retirado, resfriado em dessecador e pesado novamente. O procedimento foi repetido até que o pesa-filtro atingisse massa constante. Pesou-se então no pesa-filtro aproximadamente 1 g do material de referência certificado MPH-2 e colocou-se em estufa por 24h à 85 °C. A massa do pesa-filtro com o MPH-2 foi medida novamente e a perda de massa obtida correspondeu à perda de umidade.

5.2.3.1. Preparação do material de referência para os procedimentos de liofilização e calcinação

Na análise do material de referência, para o procedimento de liofilização e de calcinação, foram pesados os envelopes de polietileno previamente desmineralizados e a eles adicionados aproximadamente 0,100 g do material de referência com o auxílio de uma espátula. Os envelopes foram pesados novamente e então selados.

5.2.3.2. Preparação do material de referência para o procedimento de evaporação

Na análise do material de referência para o procedimento de evaporação, pesou-se aproximadamente 0,100 g do material de referência com o auxílio de uma espátula, em seis cápsulas de polietileno de alta densidade e pureza tipo W, previamente desmineralizadas.

5.2.4. Irradiações

5.2.4.1. Irradiações de curta duração (20 segundos) das amostras, padrões e materiais de referência.

As amostras de vinho, os padrões pipetados dos elementos e os materiais de referência foram irradiados juntos, por 20 segundos em fluxos de nêutrons térmicos da ordem de $10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no sistema pneumático do reator nuclear IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP. Após tempos de decaimento que variaram de alguns segundos a 1,5 hora foram determinados os seguintes radionuclídeos: ^{42}K , ^{56}Mn , ^{27}Mg , ^{24}Na e ^{52}V .

5.2.4.2. Irradiações de longa duração (8 horas) das amostras, padrões e materiais de referência

As amostras de vinho, os padrões pipetados dos elementos e os materiais de referência foram irradiados juntos, por 8 horas em fluxos de nêutrons térmicos entre $3,5$ e $4,0 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no núcleo do reator nuclear IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP. Após tempos de decaimento que variam de 2 horas a 20 dias foram determinados os seguintes radionuclídeos: ^{47}Ca , ^{60}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe e ^{65}Zn .

Para as irradiações de longa duração, as amostras, os padrões e os materiais de referência foram cobertos com papel alumínio para os procedimentos de liofilização, calcinação e evaporação, conforme apresentado nas Figuras 9 e 10.



FIGURA 9: Amostra pré-concentrada por liofilização ou calcinação, padrão pipetado e material de referência cobertos com papel alumínio para irradiação de longa duração



FIGURA 10. Amostra pré-concentrada por evaporação, padrão pipetado e material de referência cobertos com papel alumínio para irradiação de longa duração

5.2.5. Medição das atividades induzidas

A detecção das radiações gama emitidas pelos radionuclídeos foi obtida em um espectrômetro de raios gama da Canberra constituído de detector de Ge Hiperpuro (HPGe) Modelo GX3018, com resolução de 1,64 keV para o pico de 1332 keV do ^{60}Co . Esse detector está acoplado ao analisador multicanal e a um microcomputador para aquisição e processamentos dos dados. A análise dos espectros foi feita pelo programa GENIE 2000. Por meio dessas análises, as concentrações dos elementos foram calculadas. A concentração foi obtida pela comparação das atividades induzidas após tempos de irradiação e decaimento da amostra e do padrão, utilizando a equação 1 do item 4.1.

5.2.6. Identificação dos radionuclídeos

Nos espectros originários da medição das radiações gama emitidas, foram identificados os fotopicos característicos de cada radionuclídeo e suas respectivas atividades, em contagens por segundo, foram obtidas. Na Tabela 3 estão apresentados o tempo de meia vida e a energia do fotopico utilizados para identificar cada radionuclídeo determinado no presente trabalho.

TABELA 3: Tempo de meia vida e energia dos radionuclídeos de interesse

Radionuclídeo	Tempo de meia vida	Energia (keV)
⁴⁷ Ca	4,54 dias	1297,09
⁶⁰ Co	5,27 anos	1332,50
⁵¹ Cr	27,7 dias	320,08
⁵⁹ Fe	44,5 dias	1099,25
⁴² K	12,36 horas	1524,48
²⁷ Mg	9,46 minutos	843,76
⁵⁶ Mn	2,58 horas	846,76
²⁴ Na	14,96 horas	1368,60
⁶⁵ Zn	243,9 dias	115,55
⁵² V	3,75 minutos	1434,08

Fonte: NNDC (2016)

5.2.7. Estudo do branco analítico realizado pela técnica de INAA

A consideração do branco analítico possibilita erros menos significativos para as determinações de baixas concentrações. Na determinação de elementos traço, por exemplo, deverá se levar em consideração o valor de concentração dos elementos no “branco”. O estudo do “branco” é indispensável para obtenção de resultados com confiabilidade metrológica (VITTI e col., 2012).

O branco analítico consistiu em recipientes utilizados de cada procedimento de pré-concentração empregado, submetido aos mesmos pré-tratamentos da amostra antes de analisá-la. Assim foi possível obter a interferência dos reagentes e dos recipientes de polietileno utilizados no sinal medido. Para maior exatidão das concentrações em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ seca dos elementos de interesse no vinho, foram consideradas as massas dos elementos nos brancos analíticos idênticos em massa e geometria, submetidos às mesmas condições de preparo da amostra.

As massas dos elementos nos brancos analíticos foram calculadas considerando-se que:

a) A concentração do elemento (C_s) na amostra é calculada comparando-se os picos dos espectros obtidos na AAN aplicando-se a equação:

$$C_s = \frac{(m_e A_s) e^{\lambda(tds-tde)}}{M_s A_e} \quad (1)$$

b) A concentração do elemento na amostra (C_s) também é expressa pela razão da massa do radionuclídeo na amostra pela massa total da amostra

$$C_s = \frac{M_r}{M_s} \quad (2)$$

Onde:

M_r = massa do radionuclídeo na amostra

M_s = massa total da amostra

Substituindo (2) em (1), pode-se dizer que:

$$\frac{M_r}{M_s} = \frac{(m_e A_s) e^{\lambda(tds-tde)}}{M_s A_e} \quad (3)$$

Se multiplicarmos a equação por M_s , obteremos a massa M_r do elemento na amostra analisada.

$$M_r = \frac{(m_e A_s) e^{\lambda(tds-tde)}}{A_e} \quad (4)$$

Analogamente, o cálculo foi aplicado para determinar a massa do elemento no branco analítico. Subtraindo-se a massa do elemento determinada no branco analítico, foi obtida a massa do elemento na amostra.

Utilizamos como exemplo o desconto do branco analítico para o cálculo da nova concentração de Na na amostra de vinho tinto pré-concentrada por liofilização. A concentração de Na (C_{Na}) em uma das alíquotas da amostra de vinho

obtida, foi de $88,72 \mu\text{g g}^{-1}$. Esta concentração corresponde à massa de Na, em μg , presente em 1g do conjunto amostra-recipiente.

$$C_{\text{Na}} = 88,71 \frac{\mu\text{g Na}}{\text{g (amostra+recipiente)}}$$

Ao multiplicarmos C_{Na} pela massa total do conjunto irradiado (M_s), obteve-se a massa de Na presente (M_r) no conjunto amostra-recipiente irradiado, conforme o seguinte:

$$M_r = C_{\text{Na}} \times M_s$$

$$M_r = 12,31 \mu\text{g}$$

De M_r foi subtraída a massa de Na presente no branco analítico (B_{Na}), de modo a se obter a massa de Na presente somente na amostra (A_{Na}):

$$A_{\text{Na}} = M_r - B_{\text{Na}}$$

$$A_{\text{Na}} = 8,80 \mu\text{g Na}$$

A massa de Na presente somente na amostra (A_{Na}) foi então dividida pela massa da amostra de vinho irradiada (m_{Na}), em g, obtendo-se assim a concentração de Na somente na amostra de vinho pré-concentrada ($C_{\text{Na}'}$), em $\mu\text{g g}^{-1}$.

$$C_{\text{Na}'} = \frac{A_{\text{Na}}}{m_{\text{Na}}} = \frac{8,80}{0.1388}$$

$$C_{\text{Na}'} = 63,37 \mu\text{g g}^{-1}$$

5.2.8. Cálculo da concentração dos elementos determinados no vinho tinto *in natura*

Após o desconto do branco e o cálculo das concentrações dos elementos no vinho pré-concentrado, fez-se necessário converter a massa seca em massa úmida para o cálculo da concentração dos elementos no vinho *in natura*. Foi calculada então a massa de vinho *in natura* necessária para produzir 1 g de massa de vinho pré-concentrada. Para o cálculo, foram consideradas as perdas de água e outros compostos após os métodos de pré-concentração da amostra. A partir do cálculo da massa úmida considerou-se a densidade do vinho analisado, e obteve-se o volume (V) de vinho *in natura*, de modo a se obter a concentração dos elementos no vinho em mg L⁻¹.

Supondo-se que m_1 corresponde à massa anterior ao processo de pré-concentração, em gramas; m_2 corresponde à massa resultante após o processo de pré-concentração, em gramas; e P a perda de água durante o processo de pré-concentração pelo método estudado, em porcentagem, temos que:

$$m_2 = m_1 - P_i \cdot m_1 \quad (5)$$

$$m_2 = (1 - P_i) \cdot m_1 \quad (6)$$

Para calcular a massa de vinho *in natura* necessária para produzir 1 g de massa seca, admitiu-se que :

$$m_2 = 1g$$

Substituindo em (6), temos que:

$$m_1 = \frac{1}{1 - P_i} \quad (7)$$

Onde m_1 corresponde à massa úmida do vinho *in natura*, em gramas, antes do processo de pré-concentração. Assim temos a relação de qual a massa de vinho *in natura* necessária para a obtenção de 1g de massa seca.

Dividindo-se m_1 pela densidade (D) do vinho, obtém-se o volume de vinho *in natura* (V), conforme a seguir:

$$D = \frac{m_1}{V}$$

$$V_i = \frac{m_1}{D}$$

Assim, é necessário um volume V_i de vinho *in natura* para produzir 1g de massa amostra pré-concentrada por cada método estudado. Ou ainda, todos os resultados m_1 de cada procedimento foram divididos pelo valor de V para cada procedimento de pré-concentração, de modo a se obter as concentrações dos elementos em mg L^{-1} . A densidade medida do vinho analisado medida foi de $0,9959 \text{ mg L}^{-1}$.

5.2.9. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de acordo com a IUPAC (CURRIE, 1999), sendo:

$$LD = \frac{3 \times \sqrt{BG}}{LT} \text{ e } LQ = \frac{10 \times \sqrt{BG}}{LT}, \text{ onde:}$$

BG = background ou atividade de fundo em cps

LT = live time ou tempo de contagem em segundos.

O valor da atividade de fundo (BG) foi obtido diretamente de dados emitidos pelo programa GENIE 2000 para o fotopico do elemento de interesse.

O valor de LD representa a taxa de contagem correspondente à concentração mínima detectável do tipo de amostra analisado, submetida às condições específicas de preparo, obtida pela técnica de análise. Já o valor de LQ representa a taxa de contagem correspondente à concentração mínima quantificável da amostra.

Na determinação de LD e LQ para Mg e V pela técnica de INAA foram utilizadas as seguintes condições: irradiação de 2 minutos, tempo de resfriamento de 2 minutos e tempo de contagem (LT) de 300 segundos. Na determinação de LD e LQ para K, Mn e Na pela técnica de INAA foram utilizadas as seguintes condições: irradiação de 2 minutos, tempo de resfriamento de 90 minutos e tempo de contagem (LT) de 1800 segundos. Para a determinação dos limites de detecção e quantificação para Ca, Co, Cr, Fe e Zn, utilizaram-se as seguintes condições: tempo de irradiação de 8 horas, tempo de resfriamento de cerca de 15 dias e tempo de contagem de cerca de 50000 segundos.

5.3. Aplicação da técnica de Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma de argônio Acoplado Indutivamente (ICP OES)

De acordo com a resolução OENO 477/2013 do Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts, publicado pela Office International de la Vigne et du Vin (OIV) em 2015, o método validado de preparo da amostra para análise de multielementar no vinho por ICP OES consiste na adição de 1 mL ácido nítrico de concentração maior ou igual a 60% à 10 mL da amostra de vinho em tubo digestor de 50 mL. Deve-se então completar o volume com água desmineralizada. Finalmente a diluição se faz necessária para elementos de concentração muito alta (OIV, 2015). Para este estudo, um procedimento similar foi realizado para o preparo das amostras de vinho analisadas por ICP OES. Uma diluição foi realizada para determinar as concentrações dos elementos Ca, Mg e K.

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Química Inorgânica Marinha (LaQIMar) do Instituto Oceanográfico (IO) da USP e analisadas no ICP OES de marca Varian, modelo 710- ES.

5.3.1. Preparo das amostras para ICP OES

Para a análise por ICP OES foram preparadas quatro alíquotas da amostra de vinho. A cada tubo de digestão previamente desmineralizado e pesado, foram adicionados 10 mL da amostra de vinho. Os tubos foram pesados e então foram adicionados 4 mL de ácido nítrico concentrado. A solução permaneceu em repouso por 24 horas. Foi então acrescido 1 mL de H₂O₂ 30% (v/v) a cada recipiente, os quais foram colocados no bloco digestor por 3 horas a 90 °C. Resfriadas, as soluções foram avolumadas com água MilliQ para 25 mL. O branco analítico foi preparado com os mesmos reagentes e submetido às mesmas condições de preparo das alíquotas da amostra de vinho.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Resultados de concentração dos elementos determinadas para critério de escolha da amostra a ser analisada

O método de liofilização foi utilizado para a aplicação técnica de INAA em sete amostras de vinho tinto adquiridas, de modo a ser escolhida a amostra de vinho tinto a ser analisada. Dentre elas, o vinho A apresentou maiores níveis de concentração dos elementos K, Mg, Mn, Na e V, sendo assim esperados menores os erros estatísticos das análises. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: Concentrações dos elementos K, Mg, Mn, Na e V, em mg L⁻¹, em amostras de vinho tinto nacional determinadas pelo método de INAA – liofilização

	K	Mg	Mn	Na	V
A	25446 ± 1182	2940 ± 218	56 ± 5	534 ± 6	3.6 ± 0.3
B	32149 ± 5478	2775 ± 302	66 ± 14	621 ± 144	1.2 ± 0.4
C	14896 ± 6309	2413 ± 274	28 ± 5	265 ± 133	1.3 ± 0.2
D	25238 ± 1346	1936 ± 255	67 ± 2	523 ± 28	0.24 ± 0.01
E	3187 ± 191	370 ± 185	6.9 ± 0.6	33 ± 5	0.166 ± 0.002
F	15994 ± 1520	1896 ± 74	35 ± 3	334 ± 32	1.39 ± 0.04
G	4533 ± 416	475 ± 32	11 ± 1	158 ± 11	0.25 ± 0.02

6.2. Resultados dos elementos determinados no estudo de branco analítico obtidos pela técnica de INAA, nos diferentes métodos de pré-concentração da amostra

Inicialmente foi feito o estudo do branco analítico para os diferentes procedimentos de pré-concentração da amostra. O estudo consistiu em três replicatas idênticas em tamanho, forma e massa. Ao considerar igual a 1 a massa

total das concentrações obtidas dos elementos, conforme descrito no item 5.2.7, obteve-se as massas dos elementos presentes em cada alíquota do branco analítico, em μg . A média das massas foi calculada, sendo assim possível descontá-las das massas dos elementos na amostra de vinho obtidas pela técnica de INAA.

6.2.1. Resultados dos elementos determinados no branco analítico pelo procedimento de liofilização

O branco analítico para o procedimento de liofilização consistiu em papéis de filtro considerados idênticos em tamanho, forma e massa, selados em envelope de polietileno previamente desmineralizado. Foram realizadas 3 determinações individuais do branco analítico. Os elementos identificados e os respectivos valores de massa estão apresentados na Tabela 5.

Posteriormente, os valores de massa dos elementos no branco analítico foram reduzidos das massas dos elementos determinados nas análises de vinho pré-concentrada pelo procedimento de liofilização, conforme descrito no item 5.2.7 do presente trabalho.

TABELA 5: Massas e concentrações dos elementos presentes no branco analítico obtidas pelo procedimento de liofilização

Elemento	Massas (μg) ($\bar{x} \pm \text{DP}$) ^a	Concentrações (mg kg^{-1})	DPR ^b (%)
Ca	2,64 \pm 0,54	36,3 \pm 7,4	20
Co	0,0023 \pm 0,0005	0,031 \pm 0,007	23
Cr	0,011 \pm 0,004	0,15 \pm 0,05	37
Fe	0,292 \pm 0,005	4,01 \pm 0,06	1,6
Mg	7,8 \pm 0,6	106,5 \pm 7,6	7,2
Mn	0,005 \pm 0,001	0,06 \pm 0,01	22
Na	2,8 \pm 0,2	38,7 \pm 2,8	7,3
Zn	0,33 \pm 0,02	4,6 \pm 0,2	4,7

a: Média aritmética e desvio padrão (n = 3); b: Desvio padrão relativo

De um modo geral, os valores de concentração dos elementos no branco analítico obtidos pelo método de liofilização apresentaram precisão satisfatória com desvio padrão relativo abaixo de 10%, com exceção dos elementos Ca, Co, Cr e Mn que apresentaram 20%, 23%, 37% e 22%, respectivamente. Devido às baixas taxas de contagem e conseqüentemente aos baixos teores desses elementos presentes no branco analítico, os valores de desvio padrão relativo foram elevados. Os elementos que apresentaram menor desvio padrão relativo foram Fe, Zn e Mg, em ordem crescente.

6.2.2. Resultados dos elementos determinados no branco analítico pelo procedimento de evaporação

O branco analítico para o procedimento de evaporação consistiu em cápsulas de polietileno de alta densidade e pureza, do tipo W, consideradas idênticas em tamanho, forma e massa em relação às utilizadas com as amostras. Foram realizadas 3 determinações individuais do branco analítico. Os elementos identificados e os respectivos valores de massa e concentração estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6: Massas e concentrações dos elementos presentes no branco analítico obtidas pelo método de evaporação

Elemento	Massa (μg) ($\bar{X} \pm \text{DP}$) ^a	Concentração (mg kg^{-1})	DPR ^b (%)
Co	0,0030 \pm 0,0001	0,0114 \pm 0,0004	4,1
Cr	0,44 \pm 0,02	1,72 \pm 0,09	5,3
Zn	0,09 \pm 0,01	0,34 \pm 0,04	12

a: Média aritmética e desvio padrão (n = 3); b: Desvio padrão relativo

Posteriormente, os valores de massa dos elementos no branco analítico foram reduzidos das massas desses elementos determinadas nas análises da amostra de vinho pré-concentrada pelo procedimento de evaporação, conforme descrito no item 5.2.7 do presente trabalho.

Nos brancos analíticos das cápsulas de polietileno de alta densidade e pureza foram determinadas as concentrações de Co, Cr e Zn. O Zn foi o elemento que apresentou menor precisão, apresentando 12% de desvio padrão relativo. O Zn apresentou desvio padrão relativo mais alto quando analisado pelo método de evaporação em comparação ao método de liofilização, devido à menor concentração. O contrário ocorreu para o elemento Cr.

6.2.3. Resultados dos elementos determinados no branco analítico pelo método de calcinação

Não foram obtidas concentrações dos elementos no branco analítico analisado pelo método de calcinação.

6.3. Resultados de concentração dos elementos determinados no estudo de branco analítico obtidos pela técnica de ICP OES

Foi realizada análise do branco analítico pela técnica de ICP OES e os resultados são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7: Concentrações dos elementos presentes na determinação do branco analítico, obtidas pela técnica de ICP OES (em mg kg⁻¹)

Elemento	BRANCO (mg kg ⁻¹)
Ca	3,6
Co	0,00007
Cr	0,022
Fe	0,31
K	0,063
Mg	0,196
Mn	0,0021
Na	0,28
V	0,00020
Zn	0,0026

6.4. Resultados de concentração dos elementos no material de referência obtidos pelas técnicas de INAA

O material de referência certificado Mixed Polish Herb (INCT-MPH-2) do Institute of Nuclear Chemistry and Technology da Polônia foi analisado para a verificação da precisão e exatidão da técnica de INAA. O MRC Mixed Polish Herb apresentou 8,12% de umidade residual e os erros relativos foram calculados a partir da comparação dos resultados obtidos com valores de referência certificados.

As concentrações, como mencionado anteriormente, são obtidas pela comparação das atividades induzidas após tempos de irradiação e decaimento da amostra e do padrão. Para o estudo considerou-se o MRC como amostra. Tanto para a liofilização quanto para a calcinação pesou-se aproximadamente 0,100g do material de referência direto nos envelopes de polietileno previamente desmineralizados e foram utilizados padrões pipetados em papel filtro, permitindo ser o mesmo estudo de precisão e exatidão do material de referência para ambos os métodos. Já para o método de evaporação foram utilizadas cápsulas de polietileno de alta densidade e pureza, fazendo-se necessário o desconto do branco analítico das cápsulas em termos de massa, antes do cálculo da concentração em mg kg^{-1} .

6.4.1. Resultados dos elementos determinados no material de referência obtidos por INAA, pelos métodos de liofilização e calcinação

Os valores de concentração do material de referência certificado Mixed Polish Herb (INCT-MPH-2) do Institute of Nuclear Chemistry and Technology da Polônia obtidos pelo método de liofilização e calcinação são apresentados na Tabela 8.

Pelos resultados obtidos, observa-se que a precisão foi satisfatória pois todos os elementos apresentaram valores de desvio padrão relativo abaixo de 10%. A exatidão das concentrações, em relação aos valores certificados, também se apresentou concordante para todos os elementos com exceção do Fe, cujo valor do erro relativo foi de 13,5%, porém o seu valor é apenas informativo. Apesar da baixa concentração no material de referência e da expectativa de um maior erro

estatístico por este motivo, observou-se também precisão e exatidão bastante satisfatórias para o Co.

TABELA 8: Concentrações (em mg kg⁻¹) dos elementos no MRC Mixed Polish Herb determinados pelos métodos de liofilização e calcinação

Elemento	($\bar{X} \pm DP$)^a	DPR^b (%)	ER^d (%)	Valores Certificados
Ca	11192 ± 670 (6) ^c	6,0	3,6	10800 ± 700
Co	0,222 ± 0,011 (6) ^c	5,1	5,8	0,210 ± 0,025
Cr	1,57 ± 0,17 (6) ^c	5,2	6,1	1,69 ± 0,13
Fe	522 ± 17 (6) ^c	3,3	13,5	(460) ^e
K	19285 ± 1119 (6) ^c	5,8	1,0	19100 ± 1200
Mg	2852 ± 228 (6) ^c	8,0	2,3	2920 ± 180
Mn	193 ± 16 (6) ^c	8,1	1,0	191 ± 12
Na	371 ± 31 (6) ^c	8,2	6,1	(350) ^e
V	0,873 ± 0,069 (6) ^c	7,9	8,1	0,952 ± 0,163
Zn	35,4 ± 2,3 (6) ^c	6,5	5,8	33,5 ± 2,1

a: Média aritmética e desvio padrão; b: Desvio padrão relativo; c: Número de determinações individuais. d: Erro relativo; e: Valor informativo

6.4.2. Resultados dos elementos determinados no material de referência obtidos por INAA pelo método de evaporação

Pode-se observar pelos resultados apresentados na Tabela 9, que a precisão obtida não foi satisfatória para o método de evaporação no geral, uma vez que para todos os elementos o desvio padrão relativo ficou acima de 10%, com exceção do Mn. Uma possível explicação para tal variação entre as determinações individuais é o preparo dos padrões pipetados para o método de evaporação. Como mencionado no item 5.2.2.2 deste trabalho, cápsulas de polietileno de alta densidade e pureza tipo T foram preenchidas por papel de filtro Whatman 41 cortados em tamanho pequeno e então, cerca de 25 a 100 µL das soluções padrão foram pipetadas com o auxílio de pipetas Eppendorf nas cápsulas. Este procedimento pode não garantir uma distribuição uniforme da solução padrão por toda extensão da cápsula e assim uma não conformidade com a geometria da amostra analisada.

Os brancos foram descontados para os resultados dos elementos Zn, Co e Cr, uma vez que o material de referência foi irradiado juntamente com a cápsula de polietileno.

TABELA 9: Concentrações (em mg kg⁻¹) dos elementos no MRC Mixed Polish Herb determinados pelo método de evaporação

Elemento	($\bar{X} \pm DP$) ^a	DPR ^b (%)	ER ^d (%)	Valores Certificados
Ca	11114 ± 1415 (6) ^c	13	3	10800 ± 700
Co	0,200 ± 0,023 (6) ^c	12	5	0,210 ± 0,025
Cr	1,34 ± 0,68 (6) ^c	51	21	1,69 ± 0,13
Fe	526 ± 63 (6) ^c	12	14	(460) ^e
K	18583 ± 2079 (6) ^c	11	3	19100 ± 1200
Mg	3354 ± 431 (6) ^c	13	15	2920 ± 180
Mn	191 ± 20 (6) ^c	10	0,2	191 ± 12
Na	340 ± 37 (6) ^c	11	2,8	(350) ^e
V	0,95 ± 0,18 (6) ^c	18	0,05	0,952 ± 0,163
Zn	33,5 ± 6,8 (6) ^c	20	0,05	33,5 ± 2,1

a: Média aritmética e desvio padrão; b: Desvio padrão relativo; c: Número de determinações individuais; d: Erro relativo; e: Valor informativo

Para o Cr, apesar do desconto do branco analítico, os resultados individuais do material de referência apresentaram grande variação, culminando em um desvio padrão relativo de 51%. A concentração de Cr no MRC Mixed Polish Herb é muito próxima da concentração na cápsula de Holanda, o que dificulta sua determinação.

Em relação à exatidão, os valores considerados não satisfatórios foram para os erros relativos dos elementos Cr, Fe e Mg, que se apresentaram acima de 10%. Os elementos que apresentaram maior exatidão foram os elementos V e Zn, ambos com erro relativo de 0,05%.

6.4. Concentração dos elementos determinados por INAA na amostra de vinho tinto analisada pelos diferentes métodos de pré-concentração e *in natura*

Uma vez descontados os brancos analíticos, os resultados obtidos apresentaram a massa do elemento de interesse presentes na massa da amostra do vinho pré-concentrada, expressos em µg g⁻¹. Para a obtenção da concentração

dos elementos determinados na amostra de vinho *in natura*, fez-se necessária para cada método a conversão da massa pré-concentrada em volume de vinho, a partir da densidade calculada do vinho.

6.4.1. Concentração dos elementos determinados na amostra de vinho pré-concentrada por liofilização e *in natura*

Para determinar os teores dos elementos presentes em volume da amostra de vinho tinto *in natura*, foram considerados o valor da densidade do vinho (D) e a perda de água durante o processo de liofilização (P). A perda de água na liofilização foi de 78% e a densidade do vinho medida, de 0,9959 g.mL⁻¹.

De acordo com o descrito no item 5.2.8 do presente trabalho, temos que:

$$m_1 = \frac{1}{1-0,78} = 4,5455 \text{ g}$$

$$V_i = \frac{m_1}{D} = \frac{4,5455}{0,9959} = 4,5642 \text{ mL}$$

Todos os resultados foram individualmente divididos por V_i , de modo a se obter a média das concentrações dos elementos em mg L⁻¹.

Na Tabela 10 são apresentados os resultados de concentração dos elementos determinados na amostra de vinho pré-concentrada por liofilização e *in natura*, já descontadas das massas dos elementos determinados no branco analítico.

As concentrações dos elementos Ca, Co, Fe, K, Mn, Na e V no vinho *in natura* pré-concentrado pelo método de liofilização apresentaram precisão satisfatória, com desvio padrão relativo próximas a 10%. O K e o Mn foram os elementos que apresentaram menor desvio padrão relativo quando analisados pelo método de liofilização. O elemento Mg foi o que apresentou maior valor de desvio padrão relativo, com 18%, seguido por Zn, e Cr, nessa ordem. A dificuldade na homogeneização do vinho pela presença de precipitados como os de tartaratos de Zn e de Cr (Pohl, 2007), bem como a baixa concentração do Cr observada, podem justificar o desvio padrão relativo mais alto para ambos os elementos.

TABELA 10: Concentrações dos elementos nas amostras de vinho tinto liofilizadas (mg kg^{-1}) e *in natura* (mg L^{-1})

	VINHO LIOFILIZADO (mg kg^{-1})	VINHO <i>IN NATURA</i> (mg L^{-1})	
Elemento	$(\bar{X} \pm \text{DP})^a$	$(\bar{X} \pm \text{DP})^a$	DPR ^b (%)
Ca	$646 \pm 51 (6)^c$	141 ± 11	7,9
Co	$0,029 \pm 0,003 (6)^c$	$0,0062 \pm 0,0007$	11
Cr	$0,072 \pm 0,009 (5)^c$	$0,016 \pm 0,002$	13
Fe	$13,5 \pm 1,4 (3)^c$	$2,97 \pm 0,30$	10
K	$2909 \pm 184 (5)^c$	637 ± 40	6,3
Mg	$507 \pm 90 (5)^c$	111 ± 20	18
Mn	$14,4 \pm 0,8 (6)^c$	$3,2 \pm 0,2$	5,2
Na	$60,2 \pm 5,0 (7)^c$	$13,2 \pm 1,1$	8,3
V	$0,26 \pm 0,03 (8)^c$	$0,057 \pm 0,005$	10
Zn	$3,80 \pm 0,6 (5)^c$	$0,83 \pm 0,12$	15

a: Média aritmética e desvio padrão; b. Desvio padrão relativo; c. Número de determinações individuais

6.4.2. Concentração dos elementos determinados na amostra de vinho pré-concentrada por evaporação e *in natura*

Para determinar os teores dos elementos presentes em volume da amostra de vinho tinto *in natura*, foram considerados o valor da densidade do vinho (D) e a perda de água e compostos voláteis no processo de evaporação (P). A perda de água e compostos voláteis no processo de evaporação foi de 87% e a densidade do vinho medida, de $0,9959 \text{ g mL}^{-1}$.

De acordo com o descrito no item 5.2.8 do presente trabalho, temos que:

$$m_1 = \frac{1}{1-0,87} = 7,6923 \text{ g}$$

$$V_i = \frac{m_1}{D} = \frac{7,6923}{0,9959} = 7,7239 \text{ mL}$$

Todos os resultados obtidos foram individualmente divididos por V_i , de modo a se obter a média das concentrações dos elementos em mg L^{-1} . Na Tabela 11 são apresentados os resultados de concentração dos elementos

determinados na amostra de vinho pré-concentrada por evaporação e *in natura*, já descontadas das massas dos elementos determinados no branco analítico.

TABELA 11: Concentrações dos elementos na amostra de vinho tinto pré-concentrada por evaporação (mg kg^{-1}) e *in natura* (mg L^{-1})

	VINHO EVAPORADO (mg kg^{-1})	VINHO <i>IN NATURA</i> (mg L^{-1})	
Elemento	($\bar{X} \pm \text{DP}$) ^a	($\bar{X} \pm \text{DP}$) ^a	DPR ^b (%)
Ca	786 \pm 56 (5) ^c	101,8 \pm 7,3	7,2
Co	0,034 \pm 0,004 (4) ^c	0,0043 \pm 0,0005	10
Cr	ND	ND	-
Fe	24,1 \pm 0,5 (4) ^c	3,12 \pm 0,06	2,1
K	6571 \pm 658 (6) ^c	851 \pm 85	10
Mg	843 \pm 34 (6) ^c	109,2 \pm 4,4	4,1
Mn	14,3 \pm 1,0 (6) ^c	1,9 \pm 0,1	7,0
Na	80,6 \pm 6,1 (6) ^c	10,4 \pm 0,8	7,6
V	0,31 \pm 0,05 (5) ^c	0,041 \pm 0,006	17
Zn	5,3 \pm 0,4 (5) ^c	0,68 \pm 0,06	8,1

a: Média aritmética e desvio padrão; b. Desvio padrão relativo; c. Número de determinações individuais; ND. Não determinado

Pode-se observar pelos resultados de concentração da Tabela 11, que, pelo procedimento de evaporação, a precisão obtida foi satisfatória para todos os elementos determinados uma vez que todos os valores de desvio padrão relativo estiveram abaixo ou próximos de 10%, com exceção do V que apresentou desvio padrão de 17%. Ao contrário do resultado obtido pelo método de liofilização, o Fe foi o elemento que apresentou menor desvio padrão relativo quando analisado pelo método de evaporação, seguido do Mg e do Mn, nessa ordem.

A concentração média de K apresentou desvio padrão relativo de 10%, ao passo que pelo método de liofilização, a precisão foi considerada maior, com desvio padrão relativo de 6,3%.

A concentração do Cr foi potencialmente reduzida após a consideração do branco analítico, pois o elemento Cr está presente em grande quantidade no branco analítico do método de evaporação, que consistiu em cápsulas de polietileno de alta densidade e alta pureza. Dessa forma, não foi possível determiná-lo.

6.4.3. Concentração dos elementos determinados na amostra de vinho pré-concentrada por calcinação e *in natura*

Para determinar os teores dos elementos presentes em volume da amostra de vinho tinto *in natura*, foram considerados o valor da densidade do vinho (D) e a perda de água e compostos orgânicos no processo de calcinação (P). O valor de P foi de 99,8% e a densidade do vinho medida, de 0,9959 g mL⁻¹. A temperatura medida na mufla após 16 horas da amostra inserida, foi de 542 °C.

De acordo com o descrito no item 5.2.8 do presente trabalho, temos que:

$$m_1 = \frac{1}{1-0,998} = \frac{1}{0,002} = 500 \text{ g}$$

$$V_i = \frac{m_1}{D} = \frac{500}{0,9959} = 502,0584 \text{ mL}$$

Todos os resultados obtidos foram individualmente divididos por V_i , de modo a se obter a média das concentrações dos elementos em mg L⁻¹. Na Tabela 12 são apresentados os resultados de concentração dos elementos na amostra de vinho tinto pré-concentrada pelo método de calcinação e *in natura*.

TABELA 12: Concentrações dos elementos na amostra de vinho tinto pré-concentrada por calcinação (mg kg⁻¹) e *in natura* (mg L⁻¹)

Elemento	VINHO CALCINADO	VINHO <i>IN NATURA</i>	DPR ^b (%)
	(mg kg ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	
	($\bar{X} \pm DP$) ^a	($\bar{X} \pm DP$) ^a	
Ca	43590 ± 2620 (9) ^c	86,8 ± 5,2	6,0
Co	2169 ± 223 (8) ^c	0,0043 ± 0,0004	10
Cr	5683 ± 440 (9) ^c	0,0113 ± 0,0009	7,7
Fe	1050 ± 106 (3) ^c	2,1 ± 0,2	10
K	285883 ± 37197 (9) ^c	569 ± 74	13
Mg	37314 ± 3823 (8) ^c	74,3 ± 7,6	10
Mn	806 ± 134 (6) ^c	1,6 ± 0,2	17
Na	14497 ± 1875 (7) ^c	28,9 ± 3,7	13
V	18,7 ± 0,9 (3) ^c	0,037 ± 0,002	4,6
Zn	345 ± 27 (6) ^c	0,69 ± 0,05	7,8

a: Média aritmética e desvio padrão. b: Desvio padrão relativo. c: Número de determinações individuais.

Ao contrário do obtido pelo método de liofilização, a concentração média de V quando determinada pelo método de calcinação, foi a que apresentou maior precisão, com desvio padrão relativo de 4,6%. Os elementos Ca, Cr e Zn também apresentaram precisão satisfatória com desvio padrão relativo abaixo de 10%. O desvio padrão relativo para o Cr, diferentemente dos outros métodos de análise, apresentou-se satisfatório em relação à precisão. A ausência de cápsula de Holanda e de papel filtro, bem como as altas concentrações obtidas pelo método de calcinação favorecem a determinação do Cr e de outros elementos.

6.4.4. Limites de detecção e quantificação da técnica de INAA utilizada, obtidos para os diferentes métodos de pré-concentração da amostra de vinho tinto estudados

Os limites de detecção e quantificação foram calculados para os três diferentes métodos de pré-concentração da amostra de vinho. A Tabela 13 mostra os valores de LD e LQ para os diferentes métodos de pré-concentração da amostra.

TABELA 13: -Limites de detecção e quantificação dos elementos nas amostras de vinho tinto *in natura*, para o método de liofilização, evaporação e calcinação, em mg L⁻¹

Elemento	Liofilização		Evaporação		Calcinação	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
Ca	32	107	35	119	4,2	14
Co	(0,29) ^b	(0,95) ^b	(0,18) ^b	6,2	(0,03) ^b	(0,12) ^b
Cr	(4,99) ^b	(16,64) ^b	(2,46) ^b	8,2	(0,98) ^b	(3,3) ^b
Fe	0,19	0,64	0,11	0,38	0,026	0,086
K	12	40	8,4	28	2,4	8,1
Mg	2,7	9,0	2,6	7,5	0,45	1,5
Mn	0,005	0,018	0,0039	0,013	0,0012	0,0040
Na	3,2	10,9	0,22	0,73	0,059	0,20
V	0,0035	0,012	0,0017	0,0055	0,00049	0,0016
Zn	0,009	0,029	0,0061	0,020	0,0012	0,0038

a: Média aritmética e desvio padrão; b: valores em ng L⁻¹

Pode-se observar que a concentração média de Cr na amostra de vinho *in natura* para o método de liofilização (15,7 ng L⁻¹) ficou abaixo do limite de

quantificação obtido para o método ($16,64 \text{ ng L}^{-1}$). Observou-se também que o limite de quantificação do Cr para o método de evaporação é de $8,2 \text{ ng kg}^{-1}$.

O restante dos resultados de de LD e LQ obtidos para os diferentes métodos de pré-concentração da amostra de vinho estiveram bem abaixo dos valores de concentração determinados na amostra de vinho, demonstrando a sensibilidade do método de INAA pelos três procedimentos adotados no presente trabalho.

6.5. Concentração dos elementos em vinho in natura determinados pela técnica de ICP OES

Para a análise da amostra de vinho pela técnica de ICP OES foram feitas 4 determinações individuais, sendo as médias das concentrações dos elementos de interesse apresentadas na Tabela 14.

Os valores dos brancos analíticos não foram significativos em relação aos resultados dos elementos determinados na amostra, portanto não foram considerados. Para todos os elementos, o desvio padrão relativo ficou abaixo de 10%, apresentando precisão satisfatória. Para o Co, a concentração determinada pela técnica de ICP OES ficou abaixo do limite de detecção.

TABELA 14: Concentrações dos elementos obtidas pela técnica de ICP OES, em mg L^{-1}

Elemento	$(\bar{X} \pm \text{DP})^a$	DPR ^b (%)
Ca	$131,7 \pm 6,9$	5,3
Co	$< 0,0034$	-
Cr	$0,057 \pm 0,002$	3,3
Fe	$2,46 \pm 0,09$	3,6
K	734 ± 45	6,1
Mg	$92,0 \pm 5,4$	5,9
Mn	$1,75 \pm 0,03$	1,7
Na	$9,74 \pm 0,18$	1,8
V	$0,037 \pm 0,001$	3,7
Zn	$0,80 \pm 0,002$	3,1

a: Média aritmética e desvio padrão. b: Desvio padrão relativo

6.6. Comparação entre as médias de concentração dos elementos de interesse determinadas pelas técnicas de INAA e ICP OES

Para melhor visualização dos resultados obtidos, os resultados das concentrações dos elementos determinados por INAA e ICP OES nas amostras de vinho tinto *in natura* foram agrupados na Tabela 15.

TABELA 15: -Concentrações dos elementos nas amostras de vinho tinto *in natura*, obtidos pela técnica de INAA através dos diferentes métodos de pré-concentração e por ICP OES, em mg L⁻¹

	ICP OES		INAA-Liofilização		INAA-Evaporação		INAA-Calcinação	
	($\bar{X} \pm DP$) ^a	DPR ^b (%)	($\bar{X} \pm DP$) ^a	DPR ^b (%)	($\bar{X} \pm DP$) ^a	DPR ^b (%)	($\bar{X} \pm DP$) ^a	DPR ^b (%)
Ca	131,7 ± 6,9	5,3	141 ± 11	7,9	101,8 ± 7,3	7,2	86,8 ± 5,2	6,0
Co	(3,37 ± 0,74) ^c	22	(6,24 ± 0,68) ^c	11	(4,34 ± 0,45) ^c	10	(4,32 ± 0,44) ^c	10
Cr	(56,4 ± 1,8) ^c	3,3	(15,7 ± 2,0) ^c	13	-	-	(11,32 ± 0,88) ^c	7,7
Fe	2,46 ± 0,09	3,6	2,97 ± 0,30	10	3,12 ± 0,06	2,1	2,1 ± 0,2	10
K	734 ± 45	6,1	637 ± 40	6,3	851 ± 85	10	569 ± 74	13
Mg	92,0 ± 5,4	5,9	111 ± 20	18	109,2 ± 4,4	4,1	74,3 ± 7,6	10
Mn	1,75 ± 0,03	1,7	3,2 ± 0,2	5,2	1,9 ± 0,1	7,0	1,6 ± 0,2	17
Na	9,74 ± 0,18	1,8	13,2 ± 1,1	8,3	10,4 ± 0,8	7,6	28,9 ± 3,7	13
V	0,037 ± 0,001	3,7	0,057 ± 0,005	10	0,041 ± 0,006	17	0,037 ± 0,001	4,6
Zn	0,80 ± 0,02	3,1	0,83 ± 0,12	15	0,68 ± 0,06	8,1	0,69 ± 0,05	7,8

a:Média aritmética e desvio padrão; b:Desvio padrão relativo;

c:Valores em µg.L⁻¹

Pode-se observar que, dentre os diferentes métodos que abrangem a técnica de INAA, os resultados obtidos pelo método de liofilização apresentaram resultados superiores em sua maioria quando comparados aos demais. A discrepância dos valores é ainda maior ao comparar os métodos de liofilização e calcinação. Para o Mn, por exemplo, a média dos valores de concentração obtida pelo método de liofilização é duas vezes maior quando comparada à média dos valores de concentração obtida pelo método de calcinação; e quase duas vezes maior quando comparada ao procedimento de evaporação. Isso ocorre pois, no processo de liofilização somente água é retirada da matriz à temperaturas baixas, enquanto que na calcinação a composição orgânica é completamente destruída sob altas temperaturas e no processo de evaporação é retirado água e outros compostos voláteis sob temperatura de 70 °C. Apesar da pré-concentração por

calcinação possibilitar a destruição total da matéria orgânica e a obtenção de um produto mais concentrado diminuir os erros estatísticos de contagem da amostra, a alta temperatura empregada no método da calcinação favorece as perdas de elementos de interesse que estejam associados às substâncias orgânicas. Além disso, no método de calcinação, a dissolução aberta da amostra sob aquecimento em capela com exaustão até a completa secura e as altas temperaturas utilizadas na mufla, bem como a pesagem das cinzas diretamente do cadinho de porcelana nos envelopes de polietileno, favorecem maiores perdas de analito e expõem a amostra à contaminação ambiental. Comparando-se os métodos de evaporação e calcinação, as concentrações dos elementos Co, V e Zn mantiveram-se praticamente constantes, não apresentando influência por conta da diferença na pesagem das amostras e de temperatura empregadas.

Comparando-se as médias de concentração obtidas apenas entre os métodos de liofilização e evaporação, nota-se que os elementos Fe e Mg apresentaram valores bem próximos, indicando quase ou nenhuma perda dos analitos devido à temperatura de 70 °C empregada no método de evaporação.

A baixa variação entre as médias de concentração obtidas entre os métodos de liofilização e evaporação pode ser explicada pela homogeneização e dissolução da amostra. Embora no procedimento de evaporação tenha sido aplicada a temperatura de 70 °C, favorecendo a evaporação de elementos associadas às moléculas de compostos voláteis, em ambos os métodos a homogeneização do vinho foi realizada por simples agitação da garrafa de vinho. Assim, os precipitados da amostra de vinho permaneceram na solução quando pré-concentrada por liofilização e evaporação, ao passo que o procedimento de calcinação garantiu uma solução mais homogênea ao ser utilizado ácido nítrico como reagente para a dissolução da amostra.

Ainda ao comparar os métodos de liofilização e evaporação, o K apresentou uma média de concentração maior quando determinado pelo método de evaporação. A concentração do elemento K foi menor quando determinado pelo método de liofilização, pois a baixa temperatura empregada favorece a precipitação de substâncias insolúveis, como tartaratos de K (POHL, 2007).

Na Figura 11 ilustramos a variação das médias de concentração discutida dos elementos Ca, K, Mg e Na obtidas pelos métodos de liofilização, evaporação e calcinação; na Figura 12, a variação das médias de concentração

dos elementos Co, Cr e V; e na Figura 13 a variação das médias de concentração dos elementos Fe, Mn e Zn. As comparações foram segregadas em 3 ilustrações por conta da escala de valores de concentração.

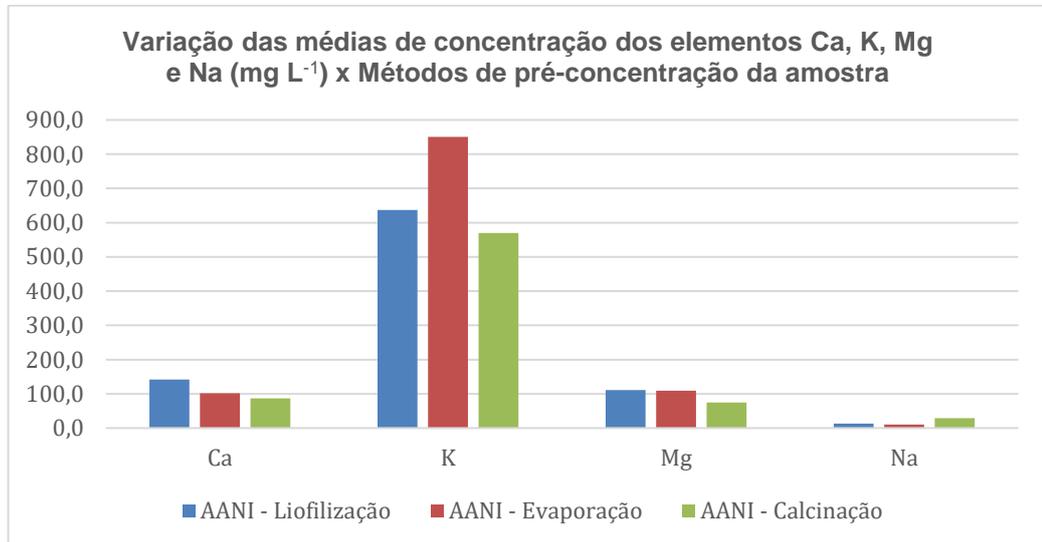


FIGURA 11: Variação das médias de concentração dos elementos Ca, K, Mg e Na, em mg L⁻¹, pelos diferentes métodos de pré-concentração da amostra analisada pela técnica de INAA.

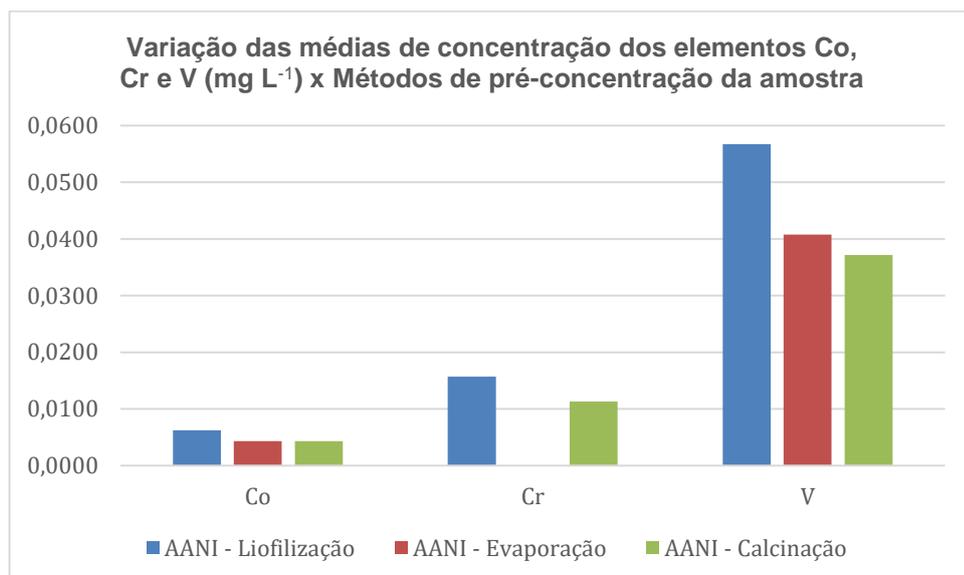


FIGURA 12: Variação das médias de concentração dos elementos Co, Cr e V, em mg L⁻¹, pelos diferentes métodos de pré-concentração da amostra analisada pela técnica de INAA.

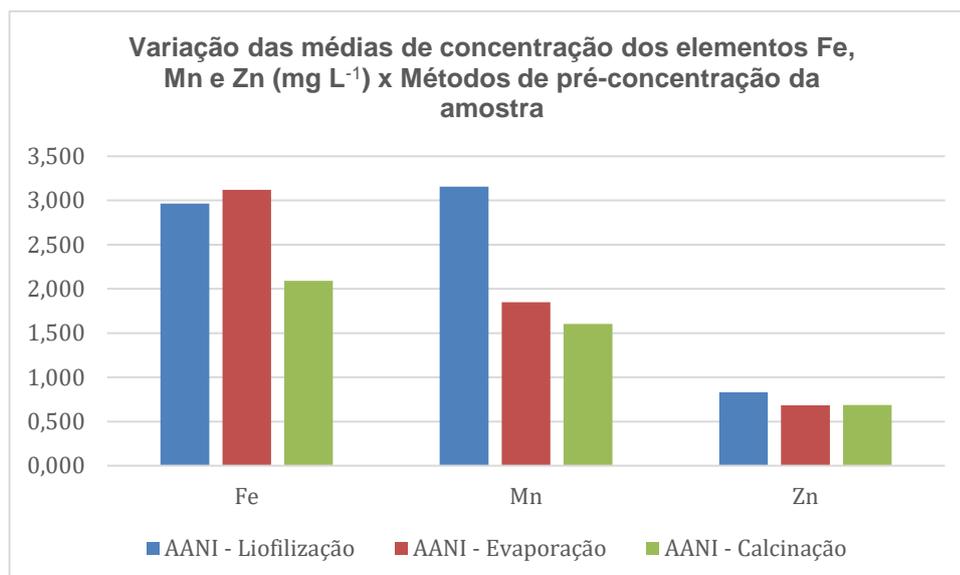


FIGURA 13: Variação das médias de concentração dos elementos Fe, Mn e Zn, em mg L⁻¹, pelos diferentes métodos de pré-concentração da amostra analisada pela técnica de INAA.

Os elementos Ca, K, Mg e Na foram os elementos que apresentaram valores de concentração mais abundante, entre 86,8 e 141,6 mg L⁻¹, 637 e 734 mg L⁻¹, 74,3 e 111,0 mg L⁻¹ e 13,19 e 28,9 mg L⁻¹, respectivamente. Os elementos Fe, Mn e Zn foram os que apresentaram valores de concentração intermediária, entre 2,1 e 3,0 mg L⁻¹, 1,6 e 3,2 mg L⁻¹ e 0,69 e 0,83 mg L⁻¹, respectivamente. Os elementos Co, Cr e V foram os que apresentaram os menores valores de concentração. As faixas de concentração encontradas estão em concordância com as encontradas na literatura (POHL, 2007).

Os tempos e a facilidade de preparo da amostra nos diferentes métodos de pré-tratamento da amostra de vinho antes da irradiação pela técnica de INAA também foram considerados. Os métodos de preparo da amostra para a irradiação na análise por INAA puderam ser comparados, uma vez que levaram a irradiações sob condições idênticas de análise.

No método de INAA por liofilização, o tempo para a pesagem da amostra nos recipientes de polietileno antes da liofilização, a transferência das alíquotas da amostra liofilizada para os papéis filtro e a selagem dos mesmos nos envelopes de polietileno é de no máximo 2 dias. Além disso, há auxílio de um equipamento, o liofilizador, que não exige manipulação da amostra - embora precise ser esporadicamente monitorado durante o processo, que tem duração de 8 horas,

para verificar se são formadas bolhas. No procedimento de calcinação, o tempo total que compreende a pesagem da amostra de vinho *in natura*; a pré-concentração por 60 horas na estufa a 70 °C; a dissolução da amostra com ácido nítrico sob aquecimento até a secura; a calcinação em mufla; e finalmente a pesagem das cinzas obtidas diretamente nos envelopes de polietileno, tem duração de 5 dias. O método conta com o auxílio de um equipamento, a mufla, que opera sem necessidade de monitoramento do analista.

Apesar da vantagem do tempo de preparo das amostras do método de liofilização sobre o método de calcinação, os preparos dos padrões e materiais de referência são iguais e têm duração de dois dias. As soluções padrão são pipetadas em papel filtro de igual tamanho, massa e forma, separados pela duração da irradiação a qual serão submetidos e os materiais de referência, pesados diretamente em envelopes de polietileno. Este procedimento é pouco trabalhoso quando comparado ao preparo dos padrões para irradiação nas cápsulas de polietileno do método de evaporação, que consistem no preenchimento das cápsulas com papel filtro cortado em pedaços bem pequenos. Além disso, os padrões e materiais de referência preparados para o método de liofilização e utilizados nas irradiações de curta duração, podem ser reutilizados no método de calcinação e vice-versa.

Para o procedimento de evaporação, apesar de ser um processo considerado simples, a amostra é pipetada e pesada diariamente nas cápsulas de polietileno em alíquotas de 200µL antes de serem tampadas para irradiação, resultando em uma duração de 7 dias. Os padrões pipetados, como mencionado anteriormente, demandam um período maior para preparo das cápsulas em relação aos outros procedimentos. A única vantagem do método em relação aos demais é a pesagem da amostra e do material de referência nas cápsulas de polietileno. A manipulação dos envelopes de polietileno para pesagem do material de referência e para inserção da amostra e padrões pipetados em papel filtro com auxílio da pinça, requerem um mínimo contato da com pinças e espátulas que, embora previamente limpas, podem favorecer a contaminação.

6.7. Análise estatística dos resultados obtidos por INAA e ICP OES

Os testes estatísticos de ANOVA- one way analysis e Tukey-Kramer foram aplicados para a comparação múltipla das concentrações de vinho *in natura* obtidas pelos diferentes métodos de análise da amostra: ICP OES, INAA por liofilização, INAA por evaporação e INAA por calcinação.

Pelo teste de ANOVA, foi observado que para todos os elementos há diferença entre as médias concentração obtidas pelos diferentes métodos de análise. Portanto, o teste de Tukey-Kramer foi aplicado para a comparação múltipla das concentrações de todos os elementos determinados na amostra de vinho (Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na V, Zn). Para aplicação do teste de Tukey-Kramer, levou-se em consideração o nível de significância pré-determinado de 95% e o número de determinações. O software utilizado foi o ActionStat, e o download realizado pelo site do Portal Action, mantido pelo Estatcamp - Consultoria Estatística e Qualidade e pelo Desenvolvimento de Sistemas e Consultoria Estatística – DIGUP. Para avaliar os métodos de análise propostos para a amostra de vinho, os resultados das comparações entre as médias obtidas estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 Comparação das médias obtidas para a amostra de vinho tinto determinadas por ICP OES, INAA pelo método de liofilização, INAA pelo método de evaporação e INAA pelo método de calcinação, através do teste estatístico de comparações múltiplas de Tukey-Kramer

	Método A x B	Método A x C	Método A x D	Método B x C	Método B x D	Método C x D
Ca	-	-	+	-	-	-
Co	-	-	-	+	-	+
Cr	-	-	-	-	-	-
Fe	+	-	+	-	-	+
K	-	+	+	-	+	-
Mg	+	-	+	-	+	+
Mn	-	-	-	+	+	+
Na	+	-	+	-	+	-
V	-	-	-	+	+	+
Zn	-	-	+	+	+	+

A. INAA por liofilização; B. INAA por evaporação; C. INAA por calcinação; D. ICP OES

+: aceita (as médias podem ser consideradas iguais ao nível de significância de 95%)

- : rejeita (as médias não são consideradas iguais ao nível de significância de 95%)

Primeiramente, avaliou-se o método de INAA entre dos diferentes métodos de pré-concentração da amostra de vinho.

Verificou-se, ao comparar-se os métodos de INAA por liofilização e de INAA por evaporação, apenas as médias dos resultados obtidos para os elementos Fe, Mg e Na foram consideradas significativamente iguais ao nível de significância de 95% pré-estabelecido. As médias dos resultados obtidos pelos métodos de INAA por liofilização e de INAA por calcinação foram consideradas significativamente iguais ao nível de significância de 95% pré-estabelecido apenas para o K. Finalmente, as médias dos resultados obtidos para os elementos Co, Mn, V e Zn obtidas pelo método de INAA por evaporação, em relação ao método de INAA por calcinação, foram consideradas significativamente iguais ao nível de significância de 95%.

Posteriormente, foram comparados os resultados obtidos pelos métodos de ICP OES e de INAA pelos diferentes métodos de pré-concentração da amostra. Pelos resultados obtidos, verificou-se que:

a) Para o elemento Ca, somente as médias dos resultados obtidos pelos métodos de INAA por liofilização e de ICP OES foram consideradas significativamente iguais ao nível de significância de 95%. No Compendium of International Methods da OIV, foi apresentado um estudo de validação da técnica de ICP OES para a análise multielementar em amostras de vinho digeridas com HNO_3 , que inclui o Ca, dentre outros elementos.

b) A avaliação dos resultados através do teste de Tukey-Kramer mostrou que os resultados obtidos pela técnica de ICP OES em relação à técnica de INAA pelos três diferentes métodos de pré-concentração da amostra de vinho, apresentaram concordância para 6 dos 10 elementos determinados, porém para diferentes grupos de elementos, sendo : o grupo dos elementos Ca, Fe, K, Mg, Na e Zn, quando comparadas os métodos de ICP OES e INAA por liofilização; o grupo dos elementos K, Mg, Mn, Na, V e Zn, quando comparadas os métodos de ICP OES e INAA por evaporação; e o grupo dos elementos Co, Fe, Mg, Mn, V e Zn, quando comparados os métodos de ICP OES e INAA por calcinação.

c) O Cr apresentou médias consideradas estatisticamente diferentes entre os métodos de ICP OES e de INAA por todos os métodos de pré-concentração da amostra de vinho estudados (liofilização e calcinação). O Co, quando analisado pelo método de ICP OES, não pôde ser determinado, uma vez que os resultados

de concentração se apresentaram abaixo do limite de detecção. Para o V, a média dos resultados de concentração obtida pela técnica de INAA por liofilização, quando comparadas com a técnica de ICP OES não foram consideradas estatisticamente iguais.

d) A média dos resultados obtidos na determinação dos elementos Mg e Zn apresentaram-se estatisticamente iguais àquelas obtidas por ICP OES quando analisadas por INAA pelos três diferentes métodos de pré-concentração da amostra de vinho.

7. CONCLUSÃO

Os métodos de liofilização, evaporação e calcinação para pré-concentração da amostra de vinho permitiu a determinação dos elementos de interesse (Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, V e Zn) em amostras de vinho tinto pelo método de INAA, sendo alguns dos resultados comparáveis aos obtidos pela análise multielementar por ICP OES. A análise por ICP OES é uma das técnicas mais empregadas para a determinação multielementar em amostras de vinho e um estudo de validação do método, que inclui digestão da amostra com HNO_3 , foi publicado pela Office Internacional de la Vigne et du Vin (OIV) em 2015.

De um modo geral, os desvios padrão relativos das médias de concentração dos elementos no MRC obtidas pela técnica de INAA para o método de evaporação se apresentaram acima de 10% para todos os elementos. Os erros relativos também se apresentaram acima de 10% para os elementos Cr, Fe e Mg, indicando baixas exatidão e precisão para o método de evaporação. Por outro lado, as médias de concentração dos elementos no MRC obtidas pelos métodos de liofilização e calcinação, apresentaram precisão e exatidão satisfatórias para todos os elementos com exceção do Fe. Porém, o erro relativo deste elemento (13,5%) corresponde a um valor certificado informativo no material de referência analisado.

Considerando-se que:

a) As concentrações dos elementos presentes no vinho podem apresentar grande variabilidade por conta de suas origens (endógenas ou exógenas), porém as faixas de concentração encontradas na literatura estão em concordância com os resultados obtidos pela técnica de INAA pelos diferentes métodos de pré-concentração da amostra de vinho.

b) As médias dos resultados de concentração obtidos pela técnica de INAA por liofilização e por calcinação para 60% dos elementos, incluindo aqueles constantes no que recomenda a OIV, são consideradas estatisticamente iguais à técnica de ICP OES.

c) Os limites de detecção e quantificação para INAA pelos os três diferentes métodos de pré-concentração da amostra de vinho tinto ficaram bem abaixo dos resultados de concentração obtidos, exceto para o elemento Cr, indicando alta sensibilidade da técnica a análise para a maioria dos elementos determinados: Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, V e Zn.

d) Apesar da dissolução da amostra de vinho com HNO_3 ; da ausência de cápsula de Holanda ou papel filtro para a determinação dos elementos; da destruição da matéria orgânica e dos altos teores dos elementos obtidos pelo método de calcinação de pré-concentração da amostra de vinho tinto – o que diminui os erros estatísticos de contagem -, a alta temperatura empregada resultou em concentrações dos elementos menores em relação aos outros métodos de pré-concentração, devido à perda de analitos. Dentre os métodos de pré-concentração, a liofilização é o que há menos perda de substâncias voláteis.

e) O método de liofilização para a pré-concentração das amostras de vinho tem vantagem de tempo e facilidade sobre os outros métodos de preparo das amostras.

Pode-se concluir que o método de INAA após o procedimento de liofilização, mostrou-se satisfatório para a determinação de elementos nutricionalmente importantes como o Ca, Fe, K, Mg, Na, e Zn em amostras de vinho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACETO, M; ABOLLINO, O.; BRUZZONITI, M.C.; E., MENTASTI; SARZANINI, C.; MALANDRINO, M. Determination of metals in wine with atomic spectrometry (Flame-AAS; GF-AAS and ICP-AES): a review. **Food Additive and Contaminants**, Italy, v. 19, n. 2, p.126-133, 2001

AMBRÓGI, J.B.; AVEGLIANO, R. P., MAIHARA, V.A. Essential element contents in food groups from the second Brazilian total diet study. **Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry**, Brasil, v. 307, p. 2209-2216, 2016.

ARTERO, A.; ARTERO, A.; TARÍN, J.J.; CANO, A. The impact of the moderate wine consumption on health. **Maturitas**, Spain, v. 80, p.13-30, 2015.

AURAND, J. Global state of conditions report: developments and trends. In: THE POTENTIAL WINE PRODUCTION, ASSESSMENT OF THE HARVEST, AND STATE OF THE MARKET AND INTERNATIONAL TRADE IN 2015, 2016. Paris. Paris: Headquarter of Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), 18 de abr. 2016

AVEGLIANO, R.P.; MAIHARA, V.A.; SILVA, F.F. A Brazilian Total Diet Study: Evaluation of essential elements. **Journal of Food Composition and Analysis**, Brasil, v. 24, p. 1009-1016, 2011.

AVEGLIANO, R. P.; MAIHARA, V. A. Total diet study: Mg and Mn content estimation of a Market Basket of São Paulo state (Brazil) by Instrumental Neutron Activation. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Brasil, v. 299, p.781-785, 2014.

AVEGLIANO, R. P.; MAIHARA, V. A.; SILVA, F. F. Development of the Food List for a Brazilian Total Diet Study. **Food Science Technology**, Campinas, v. 35, n. 1, p. 207-212, 2015

BIMPILAS, A.; TSIMOGIANNIS, D.; BALTA-BROUMA, K.; LYMPEROPULOU, T.; OEROPOULOU, V. Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. **Food Chemistry**, Greece, v. 178, p. 164-171, 2015.

BODE, P. **Instrumental and organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory**. Holanda: Delft University of Technology, J.B. Delft, 1996.

BOSCHETTI, W.; RAMPAZZO, R. T; DESSUY, M. B.; VALE, M. G. R.; RIOS, A. O. R.; HERTZ, P.; MANFROI, V.; CELSO, P. G.; FERRÃO, M. F. Detection of the origin of Brazilian wines based on the determination of only four elements using high-resolution continuum source flame AAS. **Talanta**, v. 111, p. 147-155, 2013.

BRASIL. Decreto – Lei nº10.970, de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 nov. 2004.

BRUCH, K. L. **Avaliação preliminar das principais modificações no Novo Decreto do Vinho**. Rio Grande do Sul: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): IBRAVIN. 2014. 7p. Informe técnico 02/2014.

CORTE, F. **The k_0 -Standardization Method: A Move to the Optimisation of Neutron Activation Analysis**. Ryksuniversiteit Gent: Faculteit Van de Wetenschappen, 1986, 464 p.

CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 127-134, 1999

CVETKOVIC, J.; JACIMOVIC, R.; STAFILOV, T.; ARPADJAN, S.; KARADJOVA, I. Determination of major and trace elements in wine by k_0 - Instrumental Neutron Activation Analysis. **Bulletin Chemists Technologists of Macedonia**, v. 21, n. 2, p. 187-192, 2002.

FENSTERSEIFER, J. E. "The emerging Brazilian wine industry: Challenges and prospects for the Serra Gaúcha wine cluster". **International journal of wine business research**, Montpellier, v. 19, n. 3, p. 6-8, 2007.

FIKET, Z.; MILAC, N.; KNIEWALD, G. Arsenic and other trace elements in wines of eastern Croatia. **Food Chemistry**, Croatia, v. 126, p.941-947, 2011.

GAIKWAD, R. H. Neutron Activation Analysis. **A Periodical of Indian Research Scholar's Association for Promoting Science**, v.1, Issue 1, p. 26-34. 2011.

GOUVEIA, S. T.; SILVA, F.V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Determination of residual carbon by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. **Anal. Chim. Acta**, v .455, p. 269-275, 2001.

GRINDLAY, G.; MORA, J.; GRAS, L.; LOOS-VOLLEBREGT, T. C. Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications. **Analitica Chimica Acta**, v. 691, p.18-32, 2011.

HORII, S.; HASHIGUCHI, T.; IZU, H.; SUDO, S. Analysis of Element Composition of Japanese and Other Wine and Their Classification. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kagamiyama, v. 80, n. 4, p. 506-511, 2011.

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/historia-do-vinho-no-brasil>>. Acesso em: 28 de nov. de 2016.

IRITI, M.; VARONI, E. M. Cardioprotective effects of moderated wine consumption: Polyphenols vs. Ethanol. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, p. 193-202, 2014.

LARSEN, F. H.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. An exploratory chemometric study of HNMR spectra. **Journal of Chemometrics**, v. 20, p. 198-208, 2006.

MAIHARA, V. A.; FÁVARO D. T.; SILVA V. N.; GONZAGA, I. B.; SILVA, V. L.; CUNHA I. L.; VASCONCELLOS, M. B. A.; COZZOLINO, S. M. F. Analysis of mineral constituents in duplicate portion diets of two university student groups by instrumental neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry**, Articles, v. 249, n. 1, p. 21-24, 2001.

MAIHARA, V. A.; Gonzaga I. B.; Silva V. L.; Fávoro D. I. T.; Vasconcellos M. B. A.; Cozzolino, S. M. F. Daily dietary selenium intake of selected Brazilian population groups. **Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry**, v. 259, p. 465-468, 2004.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecao-cultivares/cultivares-protegidas>> . Acesso em: 26 de Abril de 2015.

MARENGO, E.; ACETO, M. Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines. **Food Chemistry**, v. 81, p. 621-630, 2003.

MAY, S.; LEROY J.; PICCOT, D.; PINTE, G. Application de l'analyse par activation neutronique a la determination des vins provenant de diferentes crus. Possibilite de identification du vignoble par la determination des oligo-elements. **Journal of Radioanalytical Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 305-318, 1982.

MELLO, L. M. R. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA): Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF: 16 fev., 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>>. Acesso em: 01 set. 2016.

MINOIA, C.; SABBIONI, E.; RONCHI, A.; GATTI, A.; PIETRA, R.; NICOLOTTI, A.; FORTANER, S.; BALDUCCI, C.; FONTE, A.; ROGGI, C. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. IV. Influence of dietary factors. **The Science of the Total Environment**, v. 141, p.181-195, 1994.

MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G.M. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v. 82, p.409-416, 2003.

MORENO, I. M.; GONZÁLEZ-WELLER, D.; GUTIERREZ, V.; MARINO, M.; CAMEÁN, A. M.; GONZÁLEZ, G.; HARDISSON, A. Determination of Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn in red wine samples by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy: Evaluation of preliminary sample treatments. **Microchemical Journal**, v. 88, p. 56-61, 2008.

NNDC. National Nuclear Data Center. Banco de dados fornecida por Brookhaven National Laboratory. Upton, NY. Disponível em: <<http://www.nndc.bnl.gov>>. Acesso em 07 Nov. 2016.

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV). In: **Compendium of international methods of wine and must analysis**: Analysis of mineral elements in wines using ICP-AES (inductively coupled plasma / atomic emission spectrometry). 2016 ed. Paris, 2015. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/2575/oiv-ma-as322-13-en.pdf>> . Acesso em: 17 de agosto de 2016.

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV). **State of the Vitiviniculture World Market**, Paris, 2016, p. 1-14. Abr. 2016. Disponível em:<<http://www.oiv.int/public/medias/4710/oiv-noteconjmars2016-en.pdf>>. Acesso em 02 de setembro de 2016.

PARRY, S. J. **Handbook of Neutron Activation Analysis**. Viridian Publishing, UK, 243 p., 2003.

PÉREZ-JORDÁN, M.Y.; SOLDEVILA, S.; SALVADOR, A.; PASTOR, A. ; GUARDIA, M. Inductively coupled plasma mass spectrometry analysis of wines. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 33-39, 1999.

POHL, P. What do metal tell us about wine? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 941-949, 2007.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 311-319, 2001.

RIBEREAU-GAYON, P. GLORIES, P. MAUJEA, A. DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments**. 2 ed. England, U.K: John Wiley & Sons, 2000. 451 p.

RODRIGUES, S. M.; OTERO, M.; ALVES, A.; COIMBRA, M. A.; PEREIRA, E.; DUARTE, A. C. Elemental analysis for categorization of wines and authentication of their certified brand of origin. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 548-562, 2011.

SANTOS, C. E. I.; SILVA, L. R. M.; BOUFLEUR, L. A.; DEBASTIANI, R.; STEFENON, C. A.; AMARAL, L.; YONEAMA, M. L.; DIAS, J. F. Elemental characterisation of Cabernet Sauvignon wines using Particle-induced X-ray Emission (PIXE). **Food Chemistry**, v. 121, p. 244-250, 2010.

SELIH, V. S.; SALA, M.; DRGAN, V. Multi-element of wines by ICP-MS and ICP-OES and their classification according to geographical origin in Slovenia. **Food Chemistry**, v. 153, p. 414-423, 2014

SHIRAISHI, M.; FUJISHIMA, H.; CHIJIWA, H. Evaluation of table grape genetic resources for sugar, organic acid, and amino acid composition of berries. **Euphytica**, v. 74, p. 1-13, 2010.

SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. **Principles of Instrumental Analysis**. 4th Edition, Harcourt Brace College Publishers, 1992.

SOEJIMA, A.; WEN, J. Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on three chloroplast markers. **American Journal of Botany**, v. 93, p. 278-287, 2006.

SOUZA, M. I. A. V. **Incorporação de nanopartículas de óxido de zinco a um cimento de ionômero de vidro por meio da calcinação: Avaliação de propriedades mecânicas e físicas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2016.

THIEL G.; GLEISTER, G.; BLECHSCHMIDT, I. Determination of trace elements in wines and classification according to their provenance. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 1630-1636, 2004.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in genetics**, v. 22, p. 511 – 519, 2006.

TODOLI, J.; MERMET, J. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 54, p. 895-929, 1999.

TRIOLA, M. F. Introdução à estatística. Rio de Janeiro. LTC – Livros Técnicos e Científicos, 1998. Cap. 11, Análise de variância. p.280-289.

TRUJILLO, J. P. P.; CONDE, J. E.; PONT, M. I. P.; CÂMARA, J.; MARQUES, J. C. Content in metallic ions wine from Madeira and Azores archipelagos. **Food Chemistry**, v. 124, p. 533-537, 2011.

VALLINOTO, P. **Determinação de elementos essenciais e tóxicos em alimentos comerciais infantis por Análise por Ativação com Nêutrons e Espectrometria de Absorção Atômica**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

VERSARI, A.; LAURIE, V. F.; RICCI, A.; LAGHI, L.; PARPINELLO, G.P. Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. **Food Research International**, Itália, Chile : v. 60, p. 2-18, 2014.

VIM - VOCABULÁRIO INTERNACIONAL DE METROLOGIA: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), 1 ed., p.51, 2012. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf>. Acesso em: 22 de ago., 2016.

VITTI, G. C.; MENDES, F. L.; LOPES, C. M. Simpósio sobre procedimentos analíticos e a rastreabilidade dos resultados na agropecuária, 4., 2012, Pirassununga, SP. **Qualidade analítica e rastreabilidade dos resultados em tecido vegetal**. Pirassununga: USP/FZEA - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2012. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/Palestras/cap4.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2016.

VIVIER, A. M.; PRETORIUS, I. S. Genetically tailored grapevines for the wine industry. **Trends in biotechnology**, v. 20, p. 472-478, 2002.

VOLPE, M. G.; LA CARA, F.; VOLPE, F.; DE MATTIA, A.; SERINO, V.; PETITTO, F.; ZAVALLINI, C.; LIMONE, F.; PELLECHIA, R.; DE PRISCO, P.; DI STASIO, M. Heavy metal uptake in the enological food chain. **Food Chemistry**, v. 117, p. 553-560, 2009.

ANEXO A

- Análise estatística utilizada na avaliação dos resultados

Os resultados obtidos para os elementos determinados (Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, V e Zn) na amostra de vinho tinto nacional utilizando as técnicas de INAA e ICP OES foram submetidos ao teste de análise de variância, ANOVA – one way analysis e subsequentemente ao teste de Tukey-Kramer. Para aplicação dos testes estatísticos foi utilizado o programa ActionStat, cujo download foi realizado através do site do Portal Action, mantido pela Estatcamp - Consultoria Estatística e Qualidade e pelo Desenvolvimento de Sistemas e Consultoria Estatística – DIGUP.

A análise de variância ANOVA é utilizada como procedimento para testar a igualdade entre médias. Porém caso as médias não sejam consideradas estatisticamente iguais, não indica quais são diferentes entre si. No presente trabalho, nenhuma das médias de resultados foram consideradas estatisticamente iguais quando aplicado o teste estatístico de ANOVA. Portanto, fez-se necessária a aplicação de outro teste de comparação múltipla. O teste aplicado foi o de Tukey Kramer, o qual tem sido confirmado analiticamente que, para dados não balanceados, fornece intervalos uniformemente mais curtos que qualquer um dos outros testes de comparação múltipla em todas as comparações duas a duas. Compara-se então o valor de Q_{tabelado} (chamado de q crítico), que leva em conta o nível de significância e o número de graus de liberdade, com o valor de q calculado (Q_{calc}). O valor de q calculado (Q_{calc}) é obtido através da seguinte expressão:

$$Q_{\text{calc}} = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{MSE}{2} \left(\frac{1}{Na} + \frac{1}{Nb} \right)}}$$

Onde,

MSE: média quadrática do erro no resíduo

X: média dentro de um tratamento

N: número de réplicas

Quando o valor de Q_{calc} é maior que o valor de Q_{tabelado} , considera-se a diferença estatisticamente significativa entre as médias comparadas.

Para exemplificar, utilizamos os dados da comparação das médias de Mg obtidas pelos métodos de liofilização-INAA e ICP OES. Na tabela abaixo são apresentadas as médias de Mg obtidas para os diferentes métodos testados.

Método	Número de replicatas	Concentração média de Mg (mg L ⁻¹)
Liofilização – INAA	5	111,0238
ICP OES	4	91,9776

Primeiramente os dados foram submetidos à análise de variância, que forneceu o valor de 1980,56, correspondente à média quadrática no resíduo (MSE). Sendo X_1 e X_2 as concentrações médias de Mg obtidas para os métodos testados, temos:

$$Q_{\text{calc}} = \frac{111,02 - 91,98}{\sqrt{\frac{1980,56}{2} \left(\frac{1}{5} + \frac{1}{4} \right)}}$$

$$Q_{\text{calc}} = 1,3$$

O valor de $Q_{\text{crítico}}$ definido em relação ao número de graus de liberdade e ao nível de significância considerado, neste caso é de 4,6. Como o valor de Q_{calc} é menor que o valor de $Q_{\text{crítico}}$, considera-se que as médias obtidas para cálcio pelos métodos de Liofilização – INAA e ICP OES são estatisticamente iguais ao nível de significância de 95% considerado.