



ELAINE MARRA DE AZEVEDO MAZON

**“VINHOS BRASILEIROS: TEORES TOTAIS E
BIOACCESSIBILIDADE DE As, Cd, Cu e Pb, TEORES DE
POLIFENÓIS TOTAIS E AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM”**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ELAINE MARRA DE AZEVEDO MAZON

**“VINHOS BRASILEIROS: TEORES TOTAIS E
BIOACCESSIBILIDADE DE As, Cd, Cu e Pb, TEORES DE
POLIFENÓIS TOTAIS E AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM”**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA ELAINE MARRA DE AZEVEDO MAZON
E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO ALEXANDRE PRADO**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M458v Mazon, Elaine Marra de Azevedo
Vinhos brasileiros: teores totais e bioacessibilidade de
As, Cd, Cu e Pb, teores de polifenóis totais e avaliação da
rotulagem / Elaine Marra de Azevedo Mazon. -- Campinas,
SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Vinho e vinificação - Brasil. 2. Vinho e vinificação -
Bioacessibilidade. 3. Espectrometria de absorção
atômica com forno de grafite. 4. Polifenóis. I. Prado,
Marcelo Alexandre. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Brazilian wine: total contents and bioaccessibility of As, Cd, Cu and Pb, total polyphenols contents and labeling assesement

Palavras-chave em inglês:

Wine and wine making - Brazil

Wine and wine making - Bioaccessibility

GFAAS (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

Polyphenols

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Alexandre Prado

Andrea Pinto Oliveira

Edenir Rodrigues Pereira Filho

Juliana Azevedo Lima Pallone

Marcelo Antonio Morgano

Data da defesa: 26-02-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

Dra. Andrea Pinto de Oliveira

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone

Dr. Marcelo Antonio Morgano

Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes

Profa. Dra. Helena Teixeira de Godoy

Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

*O vinho molha e tempera os espíritos e
acalma as preocupações da mente... ele
reaviva nossas alegrias e é o óleo para a
chama da vida que se apaga -
SÓCRATES (470-399 a. C.)*

**A toda minha família, em especial aos meus pais
pelo incentivo e carinho .**

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Solange Cadore pela oportunidade, dedicação, acolhimento, carinho e pelo amplo aprendizado que me proporcionou.

Ao Instituto de Química e à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp pela oportunidade.

Ao Professor Dr. Marcelo Alexandre Prado pela confiança e compreensão.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões apresentadas e atenção dispensada.

Ao professor e amigo Dr. Rafael Arromba de Sousa pelas ótimas sugestões, paciência, pelos imensos conhecimentos compartilhados e amizade.

Ao professor Reinaldo F. Teófilo da Universidade Federal de Viçosa, pelo suporte na realização das análises quimiométricas.

Ao GEAtom (Grupo de Espectrometria Atômica) pela oportunidade de pesquisa com vocês. Muito obrigada a todas pelo companheirismo no laboratório e nos congressos que participamos e pelos conhecimentos compartilhados, Rafaella, Emanueli, Mirla, e Andrea.

Aos amigos e colegas do Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo Lutz de Campinas que me incentivaram e colaboraram de forma excepcional para que este trabalho fosse concluído. Muito obrigada à Marise Simões, Christina Leopoldo, Beatriz Pisani, Maria Helena Martini, Valéria Pereira da Silva Freitas, Berenice Mandel Brígido, Maria Angela Garnica Prandi e Paulo Flávio Chiarini.

A Diretoria Geral do Instituto Adolfo Lutz pela oportunidade.

Ao meu marido Dillard, ao meu querido filho Pedro pelo incentivo, paciência e pelos momentos de ausência.

A minha querida avó Francisca Godoy Marra (Vó Chiquinha) por seu exemplo de fortaleza num coração repleto de amor, pelos ensinamentos de perseverança que sempre nos inspiraram e que ficarão para sempre em nossas vidas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
LISTA DE FIGURAS.....	XX
LISTA DE TABELAS.....	XXII
RESUMO GERAL	XXV
GENERAL SUMMARY	XXVI
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
VINHO.....	7
CLASSIFICAÇÃO DOS VINHOS	8
COR	9
PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DE VINHO NO BRASIL.....	9
RIO GRANDE DO SUL	12
SANTA CATARINA	13
PARANÁ	14
MINAS GERAIS	14
SÃO PAULO.....	15
BAHIA E PERNAMBUCO	16
O VINHO E OS ELEMENTOS INORGÂNICOS POTENCIALMENTE TÓXICOS... 16	
ARSÊNIO	20
CHUMBO.....	22
CÁDMIO	23

COBRE	25
DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS ELEMENTOS INORGÂNICOS	28
POLIFENÓIS E pH	37
VALIDAÇÃO DO MÉTODO	39
ESTIMATIVA DA BIODISPONIBILIDADE	39
TÉCNICAS <i>IN VITRO</i>:	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO 2	56
INTRODUÇÃO	56
MODIFICADORES QUÍMICOS	57
VALIDAÇÃO DO MÉTODO	58
MATERIAL E MÉTODOS	58
AMOSTRAS	58
REAGENTES	59
EQUIPAMENTOS	60
AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PREPARO DA AMOSTRA	60
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DILUÍDAS	62
ESTUDO DOS MODIFICADORES QUÍMICOS	63
AVALIAÇÃO DO USO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	63
MODIFICADORES QUÍMICOS	63
COBRE	64
CHUMBO	64
CÁDMIO	65

ARSÊNIO	66
AVALIAÇÃO DO PROGRAMA TÉRMICO	66
CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO/LINEARIDADE	67
SELETIVIDADE	68
LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	69
EXATIDÃO	69
COMPARAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS APÓS DIGESTÃO POR VIA ÚMIDA E DILUIÇÃO DIRETA	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
AVALIAÇÃO DO USO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	71
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DILUÍDAS	72
MODIFICADORES QUÍMICOS	72
COBRE	72
CHUMBO	75
CÁDMIO	76
ARSÊNIO	79
AVALIAÇÃO DO PROGRAMA TÉRMICO	83
COBRE	84
CHUMBO	85
CÁDMIO	87
ARSÊNIO	90
VALIDAÇÃO DO MÉTODO	93
CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO/LINEARIDADE	93

SELETIVIDADE	95
LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	99
EXATIDÃO	100
COMPARAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS APÓS DIGESTÃO POR VIA ÚMIDA E DILUIÇÃO DIRETA	104
CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CAPÍTULO 3	114
INTRODUÇÃO	114
pH NO VINHO	116
POLIFENÓIS NOS VINHOS	117
ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS EMPREGANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	118
MATERIAL E MÉTODOS	121
AMOSTRAS	121
REAGENTES E PADRÕES	121
MODIFICADORES QUÍMICOS	122
EQUIPAMENTOS	124
DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Cu e Pb	125
DETERMINAÇÃO DE pH E DE POLIFENÓIS TOTAIS	126
DETERMINAÇÃO DO pH	126
DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS	126
ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS EMPREGANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	129

RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS INORGÂNICOS NOS VINHOS	130
CONTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE VINHO ESTUDADAS NA INGESTA DE As, Cd, Cu e Pb	137
VALORES DE pH.....	141
DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS	144
ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS EMPREGANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	148
CONCLUSÃO.....	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
CAPÍTULO 4	162
INTRODUÇÃO	162
METODOLOGIAS APLICADAS PARA A DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE.....	165
MATERIAL E MÉTODOS	168
AMOSTRAS	168
REAGENTES E PADRÕES.....	169
EQUIPAMENTOS	171
MÉTODO.....	172
PROCEDIMENTO PARA DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	172
PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO BIOACESSÍVEL (SOLÚVEL)	172
PROCEDIMENTO PARA A MINERALIZAÇÃO ÁCIDA DO QUIMO (FRAÇÃO BIOACESSÍVEL) POR MICRO-ONDAS.....	173

PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO DIALISÁVEL.....	174
RESULTADOS E DISCUSSÃO	178
CONCLUSÃO.....	192
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
CAPÍTULO 5	200
INTRODUÇÃO	200
MATERIAIS E MÉTODOS.....	201
RESULTADOS E DISCUSSÃO	203
CONCLUSÃO.....	206
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	207
CONCLUSÕES GERAIS	209
ANEXO 1.....	212
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	214
ANEXO 2.....	215
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	215

LISTA DE ABREVIATURAS

AI: Absorbância integrada;

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

EDL: do inglês *Electrodeless Discharge Lamp* (Lâmpada de descarga sem eletrodo);

IARC: do inglês *International Agency for Cancer Research*;

IUPAC: do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada);

GF AAS: do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite);

JECFA: do inglês *Joint Expert Committee on Food Additives*

LOD: do inglês *Limit of Detection* (limite de detecção);

LOQ: do inglês *limit of Quantification* (limite de quantificação);

MOD: modificador químico;

m_o: massa característica

OIV: Organização Internacional da Uva e do Vinho

RSD: do inglês *Relative Standard Deviation* (Desvio padrão relativo);

SBR: do inglês *Signal to Background Ratio* (Razão/ruído);

Tat: temperatura de atomização

THGA: do inglês *Transversely Heated Graphite Atomizer* (Atomizador de grafite aquecido transversalmente);

T_{pir}: temperatura de pirólise;

As: arsênio

Cd: cádmio

Pb: chumbo

Cu: cobre

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Principais regiões produtoras de vinhos do Brasil - Fonte: IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho 11
- Figura 2. :** Etapa de secagem em GF AAS, onde a evaporação do solvente forma um filme sólido sobre a superfície de grafite do tubo – Fonte: Perkin Elmer 32
- Figura 3.** Etapa de pirólise em GF AAS, com um aumento da temperatura para remover os componentes da matriz (250 – 1600 °C) – Fonte: Perkin Elmer. 32
- Figura 4.** Etapa de atomização em GF AAS, onde o resíduo contendo o analito é vaporizado e forma-se uma nuvem de átomos no estado fundamental (1600–3000°C) 33

Capítulo 2

- Figura 1.** Absorbância integrada normalizada em função da concentração de H₂O₂.....72
- Figura 2.** Sinal analítico e sinal de background obtidos com diferentes massas de modificadores82
- Figura 3.** Gráficos de pirólise (a) e de atomização (b) dos vinhos tinto e branco, obtidos para a determinação de cobre. 85
- Figura 4.** Gráficos de pirólise e de atomização dos vinhos tinto e branco, obtidos para a determinação de chumbo. 86
- Figura 5.** Gráficos de pirólise e de atomização dos vinhos tinto e branco, obtidos para a determinação de cádmio. 89
- Figura 6.** Gráficos de pirólise e de atomização dos vinhos tinto e branco, obtidos para a determinação de arsênio. 91
- Figura 7.** Curva analítica para cobre..... 93
- Figura 8.** Curva analítica para chumbo..... 93
- Figura 9.** Curva analítica para cádmio..... 93
- Figura 10.** Curva analítica para arsênio..... 93

Figura 11. Determinação gráfica das curvas de linearidade através do gráfico da razão sinal/concentração versus concentração, em escala logarítmica, para o cobre (a), chumbo (b), cádmio (c) e arsênio (d).....**94**

Figura 12. Curvas aquosa e com adição de padrão nas matrizes de vinho branco e tinto para os elementos cobre (a), chumbo (b), cádmio (c) e arsênio (d).....**95**

Capítulo 3

Figura 1. Curva analítica para determinação de polifenóis totais. **128**

Figura 2. Tipos de vinho: verde (Fino), azul (Espumante) e mesa (Vermelho)..... **148**

Figura 3. Quanto a cor dos vinhos: verde (Branco), azul (Rosado) e vermelho (Tinto). .. **150**

Figura 4. Quanto ao estado de origem: verde (MG), azul (SP), vermelho (RS), amarelo (BA), rosa (PE), preto (PR). **151**

Figura 5. Quanto à variedade: verde (Carbnet), azul (Outras Uvas), vermelho (híbrida americana). **152**

Capítulo 4

Figura 1. Representação esquemática do modelo de digestão *in vitro*.....**176**

Figura 2. Fração bioacessível (solúvel) e dialisável do cobre nas amostras de vinho tinto, branco e espumante. **181**

Figura 3. Fração bioacessível (solúvel) e dialisável do chumbo nas amostras de vinho tinto, branco e espumante. **185**

Figura 4. Fração bioacessível (solúvel) e dialisável do cádmio nas amostras de vinho tinto, branco e espumante. **188**

Figura 5. Fração bioacessível (solúvel) e dialisável do chumbo nas amostras de vinho tinto, branco e espumante. **190**

Capítulo 5

Figura 1. Percentual de rotulagem de vinhos em conformidade segundo Lei nº 8.918/94.....**203**

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos.28

Capítulo 2

Tabela 1. Desvio padrão relativo (RSD), porcentagem de recuperação e massa característica para o cobre em vinhos tinto e branco obtidos no estudo de modificadores..73

Tabela 2. Temperatura de pirólise, atomização, porcentagem de recuperação e massa característica para o chumbo, em vinhos tinto e branco, obtidos no estudo dos modificadores químicos.....75

Tabela 3. Temperaturas de pirólise e atomização, sinal analítico do elemento, sinal de fundo (BG) e desvio padrão relativo (RSD) para o cádmio em vinhos tinto e branco obtidos no estudo de modificadores químicos77

Tabela 4. Temperatura de pirólise, atomização, massa característica e desvio padrão relativo para o arsênio em vinhos tinto e branco obtidos no estudo dos modificadores.80

Tabela 5. Modificadores químicos selecionados para a análise de vinhos.....83

Tabela 6. Programa de aquecimento otimizado para os elementos cobre, chumbo, cádmio e arsênio, para a análise de vinhos.92

Tabela 7. Comparação dos *slopes* das curvas aquosas com os das curvas com adição de padrão para o elemento cobre.97

Tabela 8. Comparação dos *slopes* das curvas aquosas com aqueles das curvas com adição de padrão para o elemento chumbo.....97

Tabela 9. Comparação dos *slopes* das curvas aquosas com os das curvas com adição de padrão para o elemento cádmio.98

Tabela 10. Comparação dos *slopes* das curvas aquosas com os *slopes* das curvas com adição de padrão para o elemento arsênio.98

Tabela 11. Figuras de mérito obtidas após validação dos métodos para a análise de vinhos.	98
Tabela 12. Comparação entre os limites de detecção dos métodos obtidos no presente trabalho com os publicados na literatura.	100
Tabela 13. Recuperação estimada dos vinhos em 5 níveis de concentração para o elemento cobre.	101
Tabela 14. Recuperação estimada dos vinhos em 5 níveis de concentração para o elemento chumbo.	101
Tabela 15. Recuperação estimada dos vinhos em 5 níveis de concentração para o elemento cádmio.	102
Tabela 16. Recuperação estimada de arsênio nos vinhos em 5 níveis de concentração para o elemento arsênio.	102
Tabela 17. Recuperação em 5 níveis de concentração dos vinhos tinto e branco e coeficientes de variação.....	103
Tabela 18. Critérios de aceitação da Recuperação segundo AOAC.....	104
Tabela 19. Determinação de Cu, Pb, As e Cd através da diluição direta e após digestão via úmida.	105

Capítulo 3

Tabela 1. Modificadores químicos utilizados para a determinação de As, Cd, Cu e Pb por GF AAS.	123
Tabela 2. Programa de aquecimento otimizado para os elementos cobre, chumbo, cádmio e arsênio.....	126
Tabela 3. Teores de cobre, chumbo, cádmio e arsênio em vinhos de mesa	131
Tabela 4. Teores de cobre chumbo, cádmio e arsênio em vinhos Finos.	133
Tabela 5. Teores de cobre chumbo, cádmio e arsênio em espumantes	135

Tabela 6. Resultados médios, estimativa de desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo obtido para contaminantes inorgânicos em vinhos nacionais.....	136
Tabela 7. Comparação dos valores obtidos em $\mu\text{g L}^{-1}$ em vinhos brasileiros com os da literatura.....	137
Tabela 8. Consumo de vinhos no Brasil (consumo por Estado, em litros per capita/ano).	138
Tabela 9. Valores de pH e porcentagem alcoólica das amostras de vinho de mesa, finos e espumantes.	142
Tabela 10. Teores de polifenóis totais em vinhos de mesa, vinho fino e espumantes ...	145/6
Tabela 11. Resultados médios, estimativa de desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo obtido para os teores de polifenóis nos vinhos nacionais.....	147
Tabela 12. Porcentagem da variância acumulada pelo modelo PCA	148

Capítulo 4

Tabela 1. Programa de aquecimento utilizado no forno micro-ondas para o tratamento do quimo de vinho obtido no ensaio de digestão <i>in vitro</i>	174
Tabela 2. Fluidos sintéticos para o modelo <i>in vitro</i> , composição e concentração.....	177
Tabela 3. Teor total, fração solúvel e fração dialisável do cobre nos vinhos tinto, branco e espumante.	180
Tabela 4. Teor total, fração solúvel e fração dialisável de chumbo nos vinhos tinto, branco e espumante.	183
Tabela 5. Teor total, fração solúvel e fração bioacessível de cádmio nos vinhos tinto, branco e espumante.	186
Tabela 6. Teor total, fração solúvel e fração bioacessível de arsênio nos vinhos tinto, branco e espumante.	189

RESUMO GERAL

O consumo de vinhos no Brasil aumentou cerca de 20% na última década, e sua comercialização vem se difundindo, principalmente, pelo aumento da oferta, aumento do poder aquisitivo da população brasileira, aumento da produção e pelos benefícios à saúde que lhe são atribuídos. A análise de elementos traço nos vinhos é de grande importância para o controle da qualidade, autenticidade, biodisponibilidade de metais e estudo da toxicidade, visando garantir a segurança alimentar para os consumidores. Este trabalho descreve o desenvolvimento de um método empregando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite para a determinação de arsênio (As), cádmio (Cd), cobre (Cu) e chumbo (Pb) em amostras de vinhos brasileiros. A digestão ácida preliminar não foi necessária no preparo de amostra. O programa de aquecimento, empregado no forno de grafite foi otimizado para os diferentes tipos de vinhos e as amostras foram diluídas na proporção de 1:3 com ácido nítrico (65% v/v) e peróxido de hidrogênio (30% m/m). A curva analítica foi preparada em meio aquoso e alguns modificadores foram investigados para cada elemento. As determinações foram realizadas nas seguintes faixas lineares 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu; 5,0 - 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb; 0,5 - 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd; 10 - 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ As. Os limites de quantificação obtidos foram 11,5; 2,5; 0,22 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As recuperações obtidas variaram de 92-103% (vinho tinto) e 99-106% (vinho branco) para o Cu, 97-107% (vinho tinto) e 95-101% (vinho branco) para o Pb, 89-102% (vinho tinto) e 98-106% (vinho branco) para o Cd, e 103-106% (vinho tinto) e 99-107% (vinho branco) para o As. Foram analisadas 45 amostras de vinhos nacionais adquiridos no comércio de Campinas/SP de diversas regiões do Brasil. Foram determinados os teores de As, Cd, Cu e Pb nas amostras de vinho e os valores encontrados estavam abaixo dos teores estabelecidos pela legislação brasileira. Foram calculadas as contribuições dos vinhos estudados na dieta de um adulto, com relação a ingesta destes elementos e os valores demonstraram que os vinhos estudados apresentaram baixa contribuição. Também foram determinados os valores de pH e os teores de polifenóis totais nos vinhos, as amostras apresentaram valores compatíveis com os relatados na literatura com valores médios para polifenóis em vinhos de mesa de 2046,0 mg L^{-1} , vinhos tinto 1443,0 mg L^{-1} e espumantes 1606,0 mg L^{-1} . Os valores de pH variaram de 2,8 a 3,8 entre os vinhos. Foi feito o estudo da acessibilidade e da fração dialisável pelo método *in vitro* dos elementos As, Cd, Cu e Pb nos vinhos e os resultados demonstraram para todos os elementos que a fração solúvel foi maior que 37% e a dialisável, maior que 43%, indicando alta capacidade de acessibilidade. Quanto aos dizeres de rotulagem foi observada uma necessidade de complementação da atual legislação específica para vinhos, com a finalidade de melhorar a qualidade das informações oferecidas ao consumidor através dos rótulos dos vinhos.

Palavras Chave: vinho brasileiro, GF AAS, As, Cd, Cu, Pb, bioacessibilidade.

Brazilian Wine: Total contents and bioaccessibility of As, Cd, Cu and Pb, Total polyphenols contents and labeling assesement

GENERAL SUMMARY

Wine consumption in Brazil has been increasing in 20% in the last decade, and its sales have been disseminating mainly due to offer and production increase, and to health benefits attributed to it. The analysis of trace elements in wine is of great importance for quality control, authenticity, metal bioavailability and toxicity study, aiming at granting safety to consumers. This paper describes the development of a method which employs atomic absorption spectrometry with graphite oven in order to determine arsenic, cadmium, copper and lead in Brazilian wines samples. A preliminary acid digestion has not been necessary in the sample preparation. The heating program employed to the graphite oven has been optimized for the different types of wine and the samples have been diluted in proportion of 1:3 with nitric acid (65% v/v) and hydrogen peroxide (30% m/m). The analytical curve has been prepared in aqueous medium and some modifiers have been investigated for each element. The determinations have been performed in the following linear ranges 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu; 5,0 - 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb; 0,5 - 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd; 10 - 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ As. The qualification limits obtained were 11,5; 2,5; 0,22 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The recoveries obtained ranged from 92-103% (red wine) and 99-106% (white wine) for Cu, 97-107% (red wine) and 95-101% (white wine) for Pb, 89-102% (red wine) and 98-106% (white wine) for Cd, and 103-106% (red wine) and 99-107% (white wine) for As. Brazilian wines, about 45 samples from Campinas/SP local market have been analyzed at several Brazilian regions. The contents of As, Cd, Cu and Pb have been determined in the samples and the amounts found out were below the contents established by the Brazilian legislation. The contribution of those elements on the diet of an adult have been calculated, and the amounts have shown that the studied wines presented low contribution. The pH levels and the total polyphenols contents have also been determined, the samples presented compatible rates according to the literature, with average rates for polyphenol in table wines at 2046,0 mg L^{-1} , red wines 1443,0 mg L^{-1} and sparkling 1606,0 mg L^{-1} . The pH rates varied from 2,8 to 3,8 among the wines. The accessibility and the dialysis fraction through the *in vitro* method have also been studied for the elements As, Cd, Cu and Pb in the wines. The results show that for all elements soluble fractions greater than 37% and higher than 43% dialyzable indicating high capacity accessibility. As for labeling was observed a need complement the current legislation for wine in order to improve the quality of information offered to consumers through wine labels.

Key words: Brazilian wine, GF AAS, As, Cd, Cu, Pb, bioaccessibility.

INTRODUÇÃO GERAL

Toda a história da humanidade está permeada pelo consumo de vinhos. Registros arqueológicos revelam que os primeiros indícios sobre o consumo de bebidas pelo ser humano datam de aproximadamente 6000 a.C. sendo, portanto, um costume extremamente antigo e que tem persistido por milhares de anos. Relatos sobre as primeiras videiras apontam para a Ásia Ocidental e a Europa, onde, em cavernas pré-históricas foram encontradas folhas e sementes de uva. Posteriormente, a vinha se expandiu para outras regiões, tais como Portugal, Espanha, França e Itália (PACHECO, 1999).

Somente no século XIX, com as descobertas de Louis Pasteur sobre fermentação, pôde-se entender de forma científica o processo de elaboração do vinho. Surge, então, a enologia científica, baseada em conhecimentos adquiridos sobre as origens e mecanismos desse processo (MIOLO, 1999).

Nos cinco continentes, o “mundo” da uva e do vinho compreende mais de 40 países e segundo os dados da OIV (Organização Internacional da Vinha e do Vinho) os maiores produtores de vinho são a França, a Itália, a Espanha, os Estados Unidos e a Argentina (IBRAVIN, 2011).

No Brasil, a vitivinicultura iniciou-se em 1532, porém esta atividade somente ganhou impulso e tornou-se atividade de importância socioeconômica a partir do final do século XIX com a chegada dos imigrantes italianos, sobretudo no Estado do Rio Grande do Sul. Atualmente, o Brasil é o 16º produtor mundial de vinho, com regiões produtoras situadas nos paralelos clássicos da viticultura mundial do Hemisfério Sul, como é o caso da

Campanha Gaúcha e também com vinhedos destinados à elaboração de vinhos na zona intertropical.

A vitivinicultura brasileira tem apresentado crescimento significativo nas últimas décadas, decorrente da vigorosa expansão da área cultivada e da tecnologia de produção de uvas e de elaboração de vinhos. Merece destaque a difusão da produção de uvas e vinhos, além de outros derivados, para regiões emergentes em diversas regiões do Brasil, desde a metade sul do Rio Grande do Sul até a região Nordeste, passando por polos de importância crescente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Goiás (GUERRA, 2009).

A composição mineral do vinho reflete a sua origem. A presença de alguns constituintes inorgânicos pode originar fenômenos depreciativos na qualidade da bebida, tais como turvações, precipitações e oxidações. Dependendo da concentração e do tipo do elemento podem, também, caracterizar problemas toxicológicos.

Ainda hoje, são poucas as informações disponíveis sobre a presença de contaminantes inorgânicos em vinhos brasileiros. Considerando que alguns metais apresentam grande potencial tóxico para a saúde humana, é relevante conhecer a qualidade dos vinhos quanto aos teores desses contaminantes metálicos aos quais a população está exposta.

Das várias metodologias existentes para a determinação de metais, a espectrometria de absorção atômica (AAS do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*) é apontada como uma técnica bastante satisfatória. Os métodos oficiais para determinação de constituintes inorgânicos em vinhos indicados pela OIV e adotados pela União Européia baseiam-se

essencialmente na AAS, com chama (F AAS *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e com atomização eletrotérmica (ET AAS *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*). As técnicas multi-elementares de ICP OES (*Inductively Coupled Plasma optical Spectrometry*) e ICP MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) vêm sendo utilizadas com frequência na determinação da composição mineral dos vinhos, embora a técnica de ICP OES apresente algumas dificuldades com relação aos limites analíticos (CATARINO, 2006).

Além disso, a boa qualidade dos dados analíticos gerados é um fator primordial para a tomada de decisões visando a segurança alimentar.

Na avaliação de risco à saúde humana, a ingestão de alimentos é considerada a maior rota de exposição para muitos contaminantes, causados pela contaminação industrial, ambiental ou como resultado dos processos de produção.

A quantidade total de um contaminante ingerido (dose) nem sempre reflete a quantidade que está disponível para o corpo. Apenas uma porção do contaminante será disponível e, por isso, esta quantidade também pode ser chamada bioacessibilidade. Já a biodisponibilidade é um termo usado para descrever a proporção do contaminante ingerido através dos alimentos que de fato atinge a circulação sistêmica (VERSANTVOORT, 2004). É um processo dinâmico, influenciado por uma diversidade de fatores relacionados ao indivíduo, à dose e à dieta.

O monitoramento de metais em vinhos é relevante porque o vinho é umas das bebidas que tem seu consumo aumentado a cada ano, podendo se tornar um fator de risco

na contaminação por metais potencialmente tóxicos. O conhecimento dos níveis de metais tóxicos em bebidas brasileiras, bem como a estimativa de biodisponibilidade através da acessibilidade desses metais a que a população pode estar exposta ainda é pouco conhecido. Os resultados obtidos através desse tipo de estudo podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de programas de proteção à saúde e segurança alimentar, considerando fatores regionais e de sazonalidade. Conseqüentemente, os dados gerados através do estudo e do desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e com baixos limites de detecção podem contribuir como ferramenta para o controle de qualidade dos vinhos e de fiscalização.

Este trabalho de tese teve como objetivo geral desenvolver métodos analíticos para a determinação de arsênio, cádmio, chumbo e cobre, em vinhos, sem empregar etapa de mineralização (análise direta), utilizando a espectrometria de absorção atômica eletrotérmica com forno de grafite (GF AAS). Além disso, procurou-se estimar a biodisponibilidade de alguns contaminantes encontrados através de um método “*in vitro*” para determinar a acessibilidade dos elementos encontrados nos vinhos.

E como objetivos específicos, pode-se enumerar:

- 1) Determinar os teores de arsênio, cobre, chumbo e cádmio em amostras de vinhos nacionais, utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e comparar os resultados encontrados com a legislação vigente.
- 2) Validar os métodos estudados em relação aos parâmetros exatidão, precisão e linearidade, nas condições experimentais otimizadas.

- 3) Avaliar a incidência dos contaminantes, determinar os teores de polifenóis totais e pH e análise por componentes principais (PCA).
- 4) Calcular a contribuição do vinho nacional na ingestão de arsênio, cádmio, chumbo e cobre no consumo humano.
- 5) Conhecer a estimativa de biodisponibilidade (acessibilidade) dos possíveis contaminantes inorgânicos determinados em alguns vinhos através do método *in vitro*.
- 6) Avaliar os dizeres de rotulagens dos vinhos estudados.

Capítulo 1

Revisão bibliográfica

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Vinho

O vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1988). A denominação vinho é privativa ao produto obtido a partir da uva, quaisquer que sejam as espécies e cultivares, sendo vedada sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias primas.

O vinho é uma mistura complexa de compostos orgânicos, complementada naturalmente por alguns elementos inorgânicos presentes na uva e na água utilizada. As diferenças entre vinhos envolvem diversas famílias de compostos responsáveis pela cor, pelo aroma e pelo gosto. Os principais componentes do vinho são: água, álcoois, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, proteínas e outras substâncias nitrogenadas, polissacarídeos, açúcares simples, compostos voláteis, elementos minerais e algumas vitaminas (FELLOWS, 2006). Em destaque para os minerais, as cinzas representam a soma de todos os elementos minerais do vinho que provêm principalmente da casca da uva. Devido aos processos de elaboração, os vinhos tintos apresentam teores de cinzas mais elevados que os brancos. Os vinhos contêm de 2 a 4 g L⁻¹ de sais de ácidos orgânicos e minerais.

A vitivinicultura brasileira nasceu e cresceu com base em uvas americanas, as chamadas uvas comuns, variedades das espécies *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*, usadas para a elaboração de vinhos de mesa. Entretanto, a partir de meados do século XX,

começaram a ser elaborados vinhos finos, com uvas de variedades de *Vitis vinifera*, também conhecidas como uvas finas.

A elaboração de vinhos no Brasil divide-se basicamente em vinhos finos/viníferas e comuns. Na elaboração de vinhos finos são utilizadas uvas viníferas (de origem européia), enquanto em vinhos comuns utilizam-se uvas americanas ou híbridas na sua elaboração.

Classificação dos vinhos

De acordo com a Portaria nº 229 de 25/10/88, do Ministério da Agricultura, os vinhos são classificados como:

Vinho de mesa: é o vinho com graduação alcoólica de 10 a 13° GL (Gay Lussac), a 20 °C.

Vinho frisante ou vinho gaseificado: é o vinho de mesa de sabor seco ou adocicado, com uma gaseificação máxima de 1,5 atmosfera e mínima de 0,5 atmosfera, a 10 °C, e graduação alcoólica não superior a 12,5° GL.

Vinhos de mesa finos: são os vinhos provenientes de *Vitis vinifera* e que apresentam completo e harmônico conjunto de qualidades organolépticas próprias.

Vinhos de mesa especiais: são os vinhos que apresentam predominantemente características organolépticas de *Vitis Vinifera*, porém demonstrando a presença de uvas híbridas e/ou americanas.

Vinhos de mesa comum: são os vinhos elaborados com uvas híbridas, americanas e de outras variedades.

Quanto ao teor de açúcares totais, calculado em g L^{-1} de glicose, o vinho de mesa será designado de seco quando apresentar um teor máximo de $5,0 \text{ g L}^{-1}$, meio seco quando apresentar um teor mínimo de $5,1 \text{ g L}^{-1}$ e um teor máximo de $20,0 \text{ g L}^{-1}$, doce ou suave quando apresentar teor mínimo de $20,0 \text{ g L}^{-1}$ (BRASIL, 1988).

Cor

Quanto à cor os vinhos podem ser classificados como tinto, rosado ou rose, clarete e branco.

O vinho comum, um dos objetos principais deste estudo, é um produto pouco diferenciado que possui um público alvo que busca preços baixos e, portanto, pouco “sensível” à qualidade do vinho. O padrão tecnológico de produção de vinhos comuns pode ser considerado baixo e a uva utilizada na elaboração é a mesma variedade necessária para a fabricação de suco (concentrado ou não). Outro fator relevante que está associado ao vinho comum brasileiro é a prática de “alongamento” do vinho, ou seja, adição de água para aumentar a produtividade, embora esta prática seja proibida. Assim, a qualidade desta água tem influência sobre o produto final (SCHNEIDER, 2006).

Principais regiões produtoras de vinho no Brasil

A viticultura no Brasil ocupa uma área de, aproximadamente, 77 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do país, em latitude de $30^{\circ} 56' 15''\text{S}$, até regiões situadas muito próximas ao Equador, em latitude de $5^{\circ} 11' 15''\text{S}$. Em função da diversidade ambiental, existem pólos com viticultura característica de regiões temperadas,

com um período de repouso hibernar; pólos em áreas subtropicais, onde a videira é cultivada com dois ciclos anuais, definidos em função de um período de temperaturas mais baixas, no qual há risco de geadas; e pólos de viticultura tropical, onde é possível a realização de podas sucessivas, com a realização de dois e meio a três ciclos vegetativos por ano. A produção de uvas é da ordem de 1,2 milhões de toneladas/ano. Deste volume, cerca de 45% é destinado ao processamento, para a elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, e 55% é comercializado como uvas de mesa.

Do total de produtos industrializados, 77% são vinhos de mesa e 9% são sucos de uva, ambos elaborados a partir de uvas de origem americana, especialmente cultivares de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos interespecíficos diversos. Cerca de 13% são vinhos finos, elaborados com castas de *Vitis vinifera*; o restante dos produtos industrializados, 1% do total, são outros derivados da uva e do vinho. Grande parte da produção brasileira de uvas e derivados da uva e do vinho é destinada ao mercado interno. O principal produto de exportação, em volume, é o suco de uva, sendo cerca de 15% do total é destinado ao mercado externo; apenas 5% da produção de uvas de mesa é destinada à exportação.

O vinho brasileiro tem sido conhecido por diversos países, embora somente 1% dos vinhos produzidos é comercializado fora do país. O Brasil tem desenvolvido uma capacidade excepcional para a produção de vinhos de qualidade. Atualmente, o país é considerado uma das melhores regiões no mundo para o cultivo de uvas destinadas à produção de vinhos espumantes. Hoje, o Brasil exporta vinhos para 22 países, dentre os

quais destacam-se Estados Unidos, Alemanha, Inglaterra e República Tcheca (IBRAVIN, 2012).

As condições meteorológicas, principalmente a temperatura, umidade e a radiação solar, exercem grande influência sobre o desenvolvimento, produção e qualidade da uva destinada à elaboração de vinhos. Essa influência ocorre em todos os estágios fenológicos da videira, ou seja, desde o repouso vegetativo (inverno), à brotação, à floração, à frutificação, crescimento das bagas (primavera), à maturação (verão) e, até a queda das folhas (outono) (GUERRA, 2009).

As principais regiões produtoras de vinho no Brasil estão representadas na Figura 1. São elas: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Pernambuco.



Figura 1. Principais regiões produtoras de vinhos do Brasil - Fonte: IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho

Rio Grande do Sul

O Estado do Rio Grande do Sul, localizado na região Sul do Brasil, é o maior produtor, com 3 regiões vitivinícolas: a tradicional região produtora da Serra Gaúcha e as regiões emergentes – Campanha e Serra do Sudeste.

Na região tradicional da Serra Gaúcha, cujo cultivo de uvas data do final do século XIX, a principal área de cultivo de uvas para a elaboração de vinhos finos está localizada, sobretudo, na margem esquerda do Rio das Antas, em Bento Gonçalves, Monte Belo do Sul, Garibaldi, Farroupilha, Caxias do Sul e municípios vizinhos.

A atividade envolve milhares de produtores. Uma sub-região da Serra Gaúcha hoje representa a primeira Indicação Geográfica do Brasil: a Indicação de Procedência (IP) Vale dos Vinhedos. Os vinhos que obtêm o qualificativo de IP Vale dos Vinhedos possuem identificação no rótulo e ostentam um selo de controle numerado. Cabe referir que outras zonas específicas estão buscando qualificar-se como IP: Monte Belo do Sul, Pinto Bandeira e o Submédio São Francisco.

Os vinhedos comerciais da região de Campanha tiveram início na década de 1980. A topografia da região permite o estabelecimento de módulos de vinhedos extensos que podem ser amplamente mecanizados. O clima e o solo distintos conferem à região, que experimenta um período de expansão da área cultivada, um novo potencial na produção de vinhos finos brasileiros.

A viticultura da região da Serra do Sudeste teve igualmente início na década de 1980. Contudo, foi apenas nos últimos anos que diversos novos empreendimentos vitivinícolas foram estabelecidos. A paisagem permite a mecanização nos vinhedos

enquanto o clima e o solo são característicos e distintos dos encontrados na Serra Gaúcha e em Campanha, configurando uma região de produção emergente.

Principais regiões/município:

Serra Gaúcha: Bento Gonçalves, Caxias do Sul, Garibaldi, Farroupilha, Flores da Cunha, São Marcos, Monte Belo, Nova Pádua.

Destino da Produção: Quase que a totalidade das uvas é destinada à vinificação ou elaboração de suco de uva.

Principais Variedades: Isabel, Concord, Bordô, Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Moscato, Riesling.

Santa Catarina

O Estado de Santa Catarina também passou a implementar nos últimos anos um conjunto de vinhedos destinados à produção de vinhos finos na região de São Joaquim, junto ao Planalto Sul Catarinense. Com vinhedos de altitude, São Joaquim representa a região mais fria das regiões produtoras de vinhos do Brasil.

Regiões/município:

Vale do Rio do Peixe: Videira, Pinheiro Preto, Iomerê, Fraiburgo, Tangará, Caçador.
Planalto Serrano: São Joaquim, Água Doce, Bom Retiro, Campos Novos.

Destino da Produção: Uvas destinadas a vinificação e elaboração de suco de uva.

Principais Variedades: Isabel, Niágara Branca, Concord, Bordô, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Caberne Sauvignon, Merlot (GUERRA, 2009).

Conduzidas em sistema espaladeira ou lira; esta nova região tem grande aptidão para a elaboração de vinhos tintos (IBRAVIN, 2012)

Paraná

O Norte do Paraná se caracteriza por vinhedos em “sistema latada”, com cultivo de uvas para venda *in natura*; a colônia japonesa desta região é a grande motivadora desta produção. Na grande Curitiba e proximidades, estão instalados grandes engarrafadores de vinhos de mesa; grande parte do vinho envasado nesta região é trazido de outras zonas de produção do Brasil.

Principais regiões/município:

Região Metropolitana: Curitiba, Campo Largo.

Norte do Paraná: Marialva, Maringá.

Destino da Produção: Destaque para a produção de uvas de mesa. O estado é grande engarrafador de vinhos.

Principais Variedades: Niágara Branca, Niágara Rosada, Itália, Rubi, Benitaka.

Minas Gerais

A produção de vinhos em Minas Gerais está concentrada na região sul do estado, mais especificamente nos municípios de Andradas e Caldas. Nestas localidades predomina o cultivo das videiras americanas (95%) que, por serem rústicas adaptaram-se bem as condições de clima. Diversos projetos estão sendo desenvolvidos de produção de vinhedos

e vinhos de variedade viníferas, principalmente na região de Três Corações (Academia do vinho, 2012).

Principais regiões/município:

Região: Sul de Minas Gerais (Andradas, Caldas, Três Corações).

Destino da Produção: Destaque para a produção de uvas de mesa.

Principais Variedades: Seyve, Villard, Seibel, Couderc.

São Paulo

O Estado de São Paulo destaca-se pela produção de uvas para consumo *in natura*, com cultivo de vinhedos em sistema “latada” ou “lira”, empregando tecnologias, como: cobertura plástica e irrigação que possibilitam realizar duas safras por ano. O estado também é responsável por um grande volume de vinho de mesa engarrafado. Este vinho, na sua maior parte, é comprado a granel de outras regiões do país.

Principais regiões/município:

Leste de São Paulo: Jundiaí, Vinhedo, Campinas, Valinhos, São Miguel Arcanjo, Sorocaba e São Roque.

Norte de São Paulo: Jales.

Destino da Produção: Uvas destinadas ao consumo *in natura*. Parte destina-se a vinificação.

Principais Variedades: Niágara Branca e Niágara Rosada, Itália, Rubi, Benitaka, Clara, Linda, Morena.

Bahia e Pernambuco

No Nordeste do Brasil, junto aos Estados de Pernambuco e da Bahia, encontra-se a região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco. Ela está situada em zona de clima tropical semiárido, entre 09° e 10° de latitude Sul. O clima vitícola da região apresenta variabilidade intra-anual, o que possibilita a produção de uvas e de vinhos ao longo de todos os meses do ano. Esta região é uma das regiões emergentes que teve início nos anos de 1980 e que hoje experimenta um período de expansão da produção de vinhos finos, com uma tipicidade distinta das tradicionais regiões produtoras da viticultura mundial.

Principais regiões/município:

Vale do São Francisco: Petrolina, Juazeiro.

Destino da Produção: Uvas destinadas principalmente para o consumo *in natura*. Parte destina-se a vinificação e elaboração de suco.

Principais Variedades: Tompson, Crimson, Itália, Red Globe, Festival, Benitaka Shirah, Cabernet Sauvignon, Moscato Canelli, Cheni Blanc (IBRAVIN, 2012).

O vinho e os elementos inorgânicos potencialmente tóxicos

Ao longo de suas histórias, o vinho e a medicina têm vários pontos de ligação. Inúmeras publicações têm enaltecido o uso medicinal do vinho, desde os antigos egípcios, há mais de 4000 anos e, particularmente neste século, o avanço da ciência médica tem propiciado a descoberta de propriedades do vinho benéficas à saúde, como, por exemplo, a ação benéfica no aparelho cardiovascular (LORIMIER, 2000). Entretanto, desde o século XVIII já se sabia que há uma correlação entre a gota, consequência do acúmulo de ácido

úrico no organismo e o saturnismo, que é a intoxicação por chumbo. Sabe-se, hoje, que o saturnismo também leva à retenção de ácido úrico nos rins e há pesquisadores que consideram a gota como uma consequência da intoxicação subclínica por chumbo. A principal forma de contaminação era consequência da prática largamente utilizada pelos romanos de ferver lentamente o vinho em recipientes feitos ou revestidos com chumbo ou com uma liga metálica contendo este metal. Essa prática visava tornar o vinho adocicado (na época não se conhecia o açúcar) e reduzir sua acidez. Deste modo, após a fervura obtinha-se um xarope espesso, doce, de forte aroma e cor acentuada denominado "sapa" ou "defrutum" ou, ainda, "caroenum". Outro efeito do processo de fervura era aumentar o tempo de conservação do vinho, pois com a fervura ocorre a formação do acetato de chumbo (o "açúcar do chumbo") que ajuda na preservação graças à sua ação inibitória do crescimento de microrganismos (NETO, 1993).

O envenenamento coletivo por chumbo através do vinho não foi exclusividade dos romanos. No final do século XIII, na França, houve um surto de saturnismo na província de Poitou que ficou conhecido como a "Colica Pictonum". Todos os bebedores de vinho sofreram da moléstia devida à contaminação de vinhos tratados com litargírio, o óxido de Pb, para adoçá-los e mascarar sua acidez de modo a torná-los mais parecidos com os vinhos do Vale do Loire, mais caros e melhores (JOHNSON, 1989).

Também na Inglaterra, a classe nobre foi acometida por surtos de gota saturnina, nos séculos XVIII e XIX, devido ao consumo desmedido de vinhos fortificados, em especial de vinho do Porto, provavelmente contaminado. Nas décadas mais recentes, ainda ocorreram casos esporádicos de intoxicação por chumbo proveniente de vinhos

contaminados. Na França, durante os anos 50, ocorreu um famoso caso de envenenamento de toda a tripulação de um petroleiro por vinho contaminado com 4 mg L^{-1} de Pb e, na década de 70, foi descrita a intoxicação de 23 pessoas por cidra contaminada. Em uma revisão da literatura, no período de 15 anos entre 1978 e 1992, foram relatados 8 artigos (NETO, 1993) abordando casos individuais ou de pessoas de uma mesma família que sofreram intoxicação, tendo como fontes de contaminação, na maioria dos casos, a presença de chumbo no revestimento dos recipientes onde se armazenava vinho de fabricação caseira (cerâmica esmaltada, tintas, tubulação, etc.).

Nas décadas de 80 e 90, várias pesquisas foram realizadas com o objetivo de determinar os níveis de chumbo nos vinhos e no sangue de seus consumidores. Um estudo feito em 1981 em 8 grandes cidades da França revelou que, entre vários fatores que aumentam os níveis sanguíneos de Pb, está o consumo de vinhos, que afeta mais homens do que mulheres. Numa pesquisa de 1983, na Itália, verificou-se que os bebedores de grandes quantidades de vinho têm níveis sanguíneos de chumbo mais altos do que os bebedores moderados e abstêmios (NETO, 1993). Um estudo feito na Inglaterra revelou que 20% dos vinhos contendo cápsula de chumbo sobre a rolha, analisados entre os anos de 1985 e 1986, apresentavam conteúdo de Pb superior ao limite legalmente permitido pela OIV ($0,15 \text{ mg L}^{-1}$) (SMART, 1990).

Nesse sentido, vale ressaltar que existem cerca de vinte elementos considerados potencialmente tóxicos para a saúde dos humanos incluindo As, Be, Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, Te, Ti, V e W. Tais elementos reagem com ligantes difusores com macromoléculas e com ligantes presentes em membranas o que, muitas vezes, lhes

conferem as propriedades de bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar, persistência no ambiente e distúrbios nos processos metabólicos dos seres vivos (TAVARES, 1992).

Na literatura, encontram-se inúmeras definições para o termo “metal pesado”. Algumas delas baseiam-se na densidade atômica, nas propriedades químicas, sendo que, para muitas, este termo é empregado a um grupo de elementos como cádmio, cromo, cobre, mercúrio, zinco, níquel, chumbo entre outros, que estão normalmente associados a problemas de poluição e toxicidade (TOMAZELLI, 2003). Em uma das definições descritas por Alloway e Ayres (1993) o termo refere-se ao grupo de metais e de metalóides com densidades atômicas maiores que 6 g cm^3 .

Uma das importantes propriedades que distinguem os metais pesados dos outros elementos é sua tendência em formar ligações reversíveis com um grande número de compostos. A bioacumulação e a biomagnificação são responsáveis pela transformação de concentrações consideradas normais em concentrações tóxicas para diferentes espécies da biota e também para o ser humano (OLIVEIRA, 2005).

Os metais podem entrar na cadeia alimentar através da poluição ambiental causada pelas atividades antrópicas, ou naturalmente, pela ocorrência em solos, águas e plantas, ou ainda pela migração desses metais presentes nos materiais de embalagem que podem conter pigmentos, estabilizantes e cerâmicas (HARRISON, 1993). Os principais alimentos que contribuem como veículo dos metais contaminantes são os vegetais, cereais, alimentos do mar e água (MURATA, 1999).

Os elementos minerais presentes no vinho provêm, em grande parte da uva e, portanto, estão relacionados à absorção radicular da videira, verificando-se um constante enriquecimento durante a formação e maturação da fruta. Como grande parte das plantas, a videira também tem a capacidade de absorver quantidades relativamente elevadas de elementos tóxicos, sem que se verifique manifestação de toxicidade nelas próprias, uma vez que os metais são complexados e integrados em moléculas biológicas num mecanismo de autodefesa da planta (CATARINO, 2006).

Arsênio

O arsênio existe na natureza numa variedade de formas químicas, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas, como resultado de sua participação em complexos biológicos, processos químicos e algumas aplicações industriais, como a manufatura de vidros, materiais semicondutores e fotocondutores (STUMMEYER *et al.* 1996). Além disso, compostos contendo arsênio são utilizados no tratamento de determinadas doenças e, na agricultura. Assim, o arsênio encontrava-se nos herbicidas e fungicidas que foram usados em vinhedos, principalmente como arsenato de sódio, podendo se tornar um composto contaminante na produção de vinhos caso esse tipo de agroquímica ainda seja utilizado (BURGUERA *et al.*, 1997; HERCE-PAGLIAI, 2002).

O uso de pesticidas à base de arsênio é proibido em todos os países produtores de vinho, porém mesmo após a proibição destes compostos, a absorção de grandes quantidades

de arsênio pelos vinhedos a partir do resíduo no solo ainda representa um sério problema para um longo período de tempo (NRIAGU, 2006).

O arsênio é classificado como grupo 1A dos carcinogênicos pela IARC (International Agency Research Cancer). As formas inorgânicas do arsênio são as espécies responsáveis pelo efeito carcinogênico do elemento. Os altos níveis de toxicidade de arsênio são muito bem conhecidos, pois compostos de arsênio são facilmente absorvidos, tanto oralmente quanto por inalação, sendo a extensão da absorção dependente da solubilidade do composto. Por inalação, o arsênio inorgânico produz câncer de pulmão e por ingestão pode produzir câncer de pele, pulmão, rim, fígado e bexiga (HERCE-PAGLIAI, 2002).

O arsênio encontra-se nas formas trivalente e pentavalente nos alimentos, na água e no meio ambiente, e é amplamente distribuído geologicamente como um componente de aproximadamente 245 minerais diferentes. Logo, a contínua liberação de arsênio no ambiente leva a um acúmulo do elemento na cadeia alimentar.

O arsênio está presente em quase todos os sulfetos metálicos naturais, em particular com o cobre, estanho e níquel. O arsênio presente nos vinhos pode ter origem no solo, ou em herbicidas e fungicidas utilizados na vinha, no equipamento para o processamento e no método de vinificação (GALANI-NIKOLAKAKI, 2002, CATARINO, 2006).

Chumbo

O chumbo é um elemento que vem sendo usado desde os tempos mais remotos, e foi um dos primeiros metais a ser explorado pelo homem, sendo conhecido desde 3500 a.C.

As condições geológicas e do solo e a extensão nas quais estas são modificadas por atividades humanas, tais como a disposição de minas, perdas industriais ou urbanas, irrigação e práticas de agricultura, podem ter uma influência significativa sobre o conteúdo de chumbo e, também, de cádmio e mercúrio dos alimentos. A utilização do Pb nos diversos setores da indústria foi responsável pela introdução de grande quantidade desse metal no ambiente. Encontra-se nos solos majoritariamente sob a forma de sulfetos, carbonatos e sulfatos, apresentando quatro isótopos naturais: ^{204}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb (CATARINO, 2008).

As principais fontes de exposição ao chumbo para o homem são o ar, a água e os alimentos. Cerca de 30–50% das partículas inaladas são retidas no sistema respiratório. A concentração de chumbo em água potável e em lençóis freáticos varia de 1 a 60 $\mu\text{g/L}$. Ainda assim, esta exposição é considerada baixa quando comparada com a exposição através dos alimentos. Muitos estudos mostraram que a ingestão de chumbo pelo homem através dos alimentos varia entre 100 - 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para um adulto. A principal forma onde o chumbo atmosférico entra na cadeia alimentar é através de contaminação foliar das plantas (deposição) (OLIVEIRA, 2005).

O pão, os cereais e as bebidas são responsáveis por, aproximadamente, 35% da ingestão diária de chumbo, sendo o restante derivado de uma variedade de tipos de alimentos (OMS, 1998).

Muitos estudos têm mostrado que vinhos podem conter quantidades significativas de chumbo, provenientes do uso de herbicidas ou de fertilizantes nos vinhedos, ou do uso da cápsula metálica que sela a garrafa; alguns artigos relatam sua influência na contaminação (ALBERTINI *et al.* 1997; KIM, 2005; MENA *et al.* 1997). Entretanto, apenas a partir de 1995, o uso da cápsula metálica com folhas de chumbo foi proibido pela OIV.

Durante a fermentação alcoólica e nas etapas seguintes de vinificação, parte do metal é removida, por precipitação sob a forma de sulfetos, por adsorção e absorção das leveduras e por precipitação com macromoléculas do vinho (CATARINO, 2008).

Muitos efeitos adversos à saúde são atribuídos às altas concentrações de Pb no organismo, incluindo toxicidade nervosa, hematopoiética, renal, endócrina e no sistema esquelético, sendo o sistema nervoso central, o primeiro a ser afetado (MOREIRA, 2004).

Cádmio

O cádmio é um dos mais tóxicos elementos introduzidos e largamente espalhados no meio ambiente pela população humana (BARTON, 2005). É um metal que apresenta efeitos tóxicos nos organismos vivos, mesmo em baixas concentrações.

Apresenta-se naturalmente sob a forma de sulfeto e associado a minério de Zn e, por isso, pode ser absorvido pelas raízes da videira. A sua origem, como outros metais, encontra-se fortemente relacionada com a atividade industrial. A sua presença exógena está, sobretudo, associada à poluição industrial. Já a sua presença endógena é associada à poluição atmosférica, a produtos fitossanitários, ao contato com materiais com Zn, e com aço inoxidável (CATARINO, 2008).

Alguns órgãos vitais são alvos da toxicidade do cádmio, entre eles, o fígado e os rins. É um elemento de vida biológica longa (cerca de 20 anos) e de lenta excreção pelo organismo, sendo bioacumulado, principalmente, pelos rins. A alta afinidade do Cd por grupos-SH e a habilidade de realizar ligações covalentes resulta no aumento da solubilidade lipídica, bioacumulação e toxicidade. Os efeitos tóxicos provocados por ele compreendem principalmente distúrbios gastrointestinais, após a ingestão do agente químico (MC LAUGHLIN *et al.*, 1999).

A contaminação em seres humanos pode ocorrer por meio de via oral ou inalação. Por via oral, ocorre por meio da ingestão de alimentos contaminados oriundos de solos ou água de irrigação contaminada (FERGUSON, 1990).

Em 1993, a IARC classificou o cádmio e seus compostos como grupo 1 de carcinógenos, tendo concluído que existiam evidências suficientes de que o cádmio é cancerígeno para humanos e outros animais (OLIVEIRA, 2005).

Na agricultura, uma fonte direta de contaminação é a sua utilização em fertilizantes fosfatados. A água é outra fonte de contaminação e deve ser considerada não somente pelo

seu consumo como água potável, mas também pelo seu uso na fabricação de bebidas e no preparo de alimentos (MATOS, 2007). A dieta é a maior rota da exposição humana ao cádmio, resultante da presença deste nos solos e em água (NABRZYKI, 2006).

A contaminação de cádmio em cervejas e em outras bebidas alcoólicas pode estar relacionada à matéria prima e/ ou ao processo tecnológico. Quanto ao vinho, esta contaminação pode ser atribuída principalmente a resíduos de produtos agroquímicos que contêm cádmio (KIM, 2005).

Cobre

O cobre é um dos principais micronutrientes presentes no corpo humano. Encontra-se distribuído praticamente em todo o organismo, mas em diferentes concentrações, o que indica seu papel funcional. As atividades proteicas exercidas pelas enzimas tirosinase, citocromo oxidase e ceruloplasmina são, basicamente, regidas pelo cobre. Apesar da grande importância no corpo humano, seu excesso no organismo é nocivo por interferir nas atividades catalíticas normais de outras enzimas (AZEVEDO *et al.*, 2003).

A mais conhecida enfermidade decorrente dos distúrbios do metabolismo do cobre é a degeneração hepato-lenticular ou doença de Wilson, causada por uma mutação no gene responsável pela codificação do metabolismo do cobre. Essa mutação ocasiona um aumento gradativo de cobre no organismo que se caracteriza pela precipitação do metal nas córneas e pela destruição do fígado e do tecido nervoso (LEAL, 2012). O excesso de cobre nos alimentos pode ser considerado como um fator de risco para os portadores dessa doença.

Segundo Wanggoner *et al.*, (1999), o cobre está associado à doenças neurodegenerativas como a doença de Menkes, a própria doença de Wilson, aceruloplasmina, esclerose e a doença de Alzheimer.

A origem do cobre nos vinhos deve-se à própria constituição das uvas, particularmente das enzimas, especialmente das oxidases, as quais são encontradas em abundância nas uvas frescas. Porém, tratamentos com compostos cúpricos refletem a predominância do elemento na forma iônica, que caracteriza a elevada capacidade deste ser assimilado (CATARINO, 2008; NRIAGU, 2006).

A fim de controlar doenças nas videiras, principalmente nas *Vitis vinifera*, tais como míldio, causada por *Plasmopara viticola*, os fungicidas, especialmente à base de cobre, são aplicados extensivamente nas vinhas. A composição destes pesticidas incluem a combinação de diferentes compostos como: $\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$; $\text{CuSO}_4 + 3\text{Cu}(\text{OH})_2$; Cu_2O ; $\text{Cu}(\text{OH})_2$; $\text{Cu Cl}_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$, entre outros, resultando num aumento da concentração de cobre nos solos dos vinhedos.

Concentrações extremamente altas, da ordem de 3000 mg kg^{-1} de Cu, foram relatadas por MIRLEAN *et al.* (2007) em solos de vinhedos brasileiros. Este valor muito alto indica o uso mais intensivo de pesticidas à base de cobre em áreas subtropicais.

Embora muito do cobre dissolvido possa ser convertido em precipitados insolúveis, como sulfeto de cobre durante a fermentação, o residual de cobre remanescente tem papel importante na química do vinho (NRIAGU, 2006).

Traços de metais, como cobre, podem alterar cor, aroma e sabor de bebidas alcoólicas (NEVES, 2007). Elementos metálicos em bebidas alcoólicas podem vir da matéria prima, do tratamento na colheita ou do processo de manufatura. Nos vinhos, a presença de cobre acima de 1 mg/L, na presença de proteínas e em ambiente redutor, podem causar a “casca cúprica” que, por sua vez, causa turvação ou precipitação nos vinhos, comprometendo suas características organolépticas (CATARINO, 2008).

A OIV é uma organização intergovernamental que trata dos aspectos técnicos e científicos de viticultura e enologia e que tem como um dos seus objetivos contribuir para a harmonização internacional das práticas e normas existentes. Assim, sempre que necessário, para a elaboração de novas normas internacionais, a fim de melhorar as condições de produção e de comercialização dos produtos vitivinícolas, assegura os interesses dos consumidores. O Brasil é membro desta organização e segue suas diretrizes para exportação.

No Brasil, o órgão que regulamenta este segmento é o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), porém quando consideramos os contaminantes, os limites permitidos são regulamentados pelo Ministério da Saúde (ANVISA).

Na Tabela 1, estão os valores máximos de tolerância determinados pela legislação brasileira / Mercosul e pela Organização Internacional da Uva e do Vinho (Paris). Observamos que os limites considerados são os mesmos para todos os elementos com exceção para o cobre, onde a padronização com a OIV favorece a exportação.

Tabela 1. Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos em vinhos.

Elemento	Resolução GMC N° 12/11 do Mercosul	Recomendação da OIV
Cu	5 mg L ^{-1**}	1 mg L ⁻¹
Pb	0,15 mg L ⁻¹	0,15 mg L ^{-1*}
Cd	0,01 mg L ⁻¹	0,01 mg L ⁻¹
As	0,2 mg L ⁻¹	0,2 mg L ⁻¹

*A partir da safra de 2007

Determinação analítica dos elementos inorgânicos

Das várias técnicas analíticas disponíveis para a determinação de elementos-traço, como, por exemplo, espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS), espectrometria de emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de fluorescência atômica (AFS), polarografia e voltametria, a espectrometria de absorção atômica (AAS), seja em chama (F AAS) ou em atomizador eletrotérmico é amplamente utilizada em análises de rotina em função de vários fatores: alta especificidade, sensibilidade, robustez, baixos limites de detecção instrumental e baixo custo relativo (FRESCHI, 2000).

A técnica de ICP-MS apresenta como grandes vantagens a análise multi-elementar e limites analíticos baixos, sendo aplicada cada vez com mais frequência no estudo da composição mineral dos vinhos (MOREIRA *et al.* 2011; MARTIN *et al.* 2012). Também a aplicação da técnica multi-elementar de ICP OES é bastante referida na literatura

apresentando, contudo, limitação com relação aos limites analíticos para alguns dos elementos de interesse e que se apresentam em concentrações muito baixas.

Apesar do custo analítico relativamente alto, ambas as técnicas de ICP OES e ICP-MS têm sido aplicadas em vários campos, tanto na determinação nutricional, como na determinação de elementos tóxicos.

O ICP MS tem sido uma ferramenta eficiente para se obter algumas informações essenciais sobre a composição elementar de vinhos. O princípio fundamental do espectrômetro de massa é a ionização de partículas de uma dada amostra e a medição da razão da massa para carga elétrica do íon (m / z) correspondente ao analito. O plasma é utilizado apenas para a ionização do analito. O fluxo heterogêneo de íons (positivo ou negativo) é transferido para um sistema de vácuo contendo um filtro de massa (na maioria das vezes um analisador de massa quadrupolar) e os íons são separados de acordo com a proporção massa/carga (m/z). Os íons com as razões massa/carga específicas são transmitidos para um detector e a razão massa carga é utilizada para identificar os isótopos dos elementos, enquanto a concentração é determinada com base na intensidade de um sinal específico no espectro de massa, que é proporcional à quantidade de um dado isótopo (KUCZYNSKA, 2006)

A espectrometria de fluorescência atômica (AFS) é uma técnica adequada para análise de traços por sua elevada sensibilidade, sua extensa faixa linear de 4-6 ordens de magnitude e por necessitar equipamento relativamente simples e barato. No entanto, a interferência de matriz limita consideravelmente a sua aplicação prática (SEGURA, 1998).

As técnicas eletroquímicas são pouco utilizadas, porém podem fornecer, além do teor total dos elementos, informações sobre a distribuição das suas formas químicas (especação) (AZENHA & VASCONCELOS, 2000, BRAININA *et al.*, 2004). Duas técnicas eletroquímicas importantes que são utilizados para a análise elementar são a voltametria e a potenciometria (empregando eletrodos íon seletivos). Ambas podem ser usadas somente em soluções aquosas, porém para a análise de alimentos é necessário a mineralização e a dissolução prévia da amostra.

A espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) é uma das mais importantes modalidades da técnica de absorção atômica com atomização eletrotérmica. Sua destacada vantagem sobre outras técnicas analíticas reside nos pré-tratamentos químicos e térmicos da amostra, que podem ser realizados durante uma ou mais etapas do programa de aquecimento do forno, ou seja *in situ*. A espectrometria de absorção atômica teve início em 1955, com Alan Walsh, que mostrou que os íons metálicos poderiam ser atomizados em uma chama e que a sua concentração poderia ser determinada pela absorção de radiação monocromática incidente (WELZ, 1999).

Essa descoberta foi confirmada e complementada por Boris L'vov, em 1959, quando apresentou o conceito de atomização eletrotérmica em absorção atômica utilizando um tubo de grafite como atomizador (L'VOV, 1961). Neste trabalho, L'vov mostrou que a atomização da amostra dentro de um forno de grafite aquecido eletricamente possibilitava um significativo aumento na sensibilidade da técnica de absorção atômica, além de exigir um menor consumo da amostra.

Na técnica de GF AAS a atomização ocorre no interior de um tubo de grafite, que é aquecido pela passagem de uma corrente elétrica, capaz de produzir cinco estágios distintos de temperatura. Inicialmente, ocorre a “secagem”, que consiste na evaporação do solvente, e é feita a cerca de 110 °C durante 10 a 20 segundos (Figura 2). Após isso, a temperatura é, então, elevada para cerca de até 1600 °C ou mais, durante um tempo otimizado, para a eliminação da matriz; esta etapa é chamada de “pirólise” (Figura 3). Constitui-se em etapa de grande importância analítica, por se tratar de etapa de pré-tratamento da amostra dentro do próprio tubo. Uma boa etapa de pirólise proporciona condições de baixo sinal de fundo causado por processos de absorção molecular e espalhamento de radiação. Quanto maior a temperatura de pirólise, melhor a separação de concomitantes indesejados e menor o sinal de fundo. Assim, pode-se dizer que a etapa de pirólise é uma etapa de separação térmica entre o analito e concomitantes, sendo que a temperatura empregada é criticamente dependente do comportamento termoquímico das espécies químicas envolvidas (KRUG, 2007). Em seguida, a temperatura sobe a valores entre 1600 e 3000 °C para a atomização do elemento de interesse (Figura 4). Nesta etapa, os átomos ficam confinados dentro do tubo por um tempo de 2 a 5 segundos, sem fluxo de gás interno. Esta etapa é chamada de atomização. Nestas condições de pouca ou nenhuma interferência da matriz e formação de um vapor atômico concentrado, no caminho óptico do espectrômetro, obtém-se uma detectabilidade bastante superior àquele obtida com a F AAS e, para muitos elementos, com o ICP OES (ANJOS, 1997).

Outras duas etapas incorporadas que fazem parte dos programas de aquecimento, e realizadas após a atomização, são uma etapa de limpeza com temperaturas maiores que a

atomização e uma etapa de resfriamento. Neste caso, espera-se que a temperatura do forno esteja próxima de 40-50 °C para que a próxima amostra seja introduzida no atomizador.

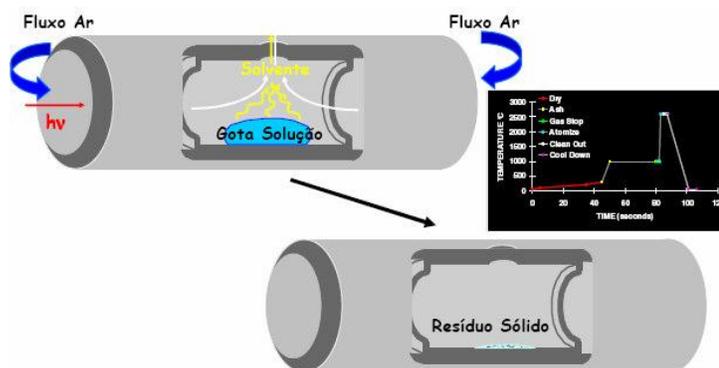


Figura 2. : Etapa de secagem em GF AAS, onde a evaporação do solvente forma um filme sólido sobre a superfície de grafite do tubo – Fonte: Perkin Elmer

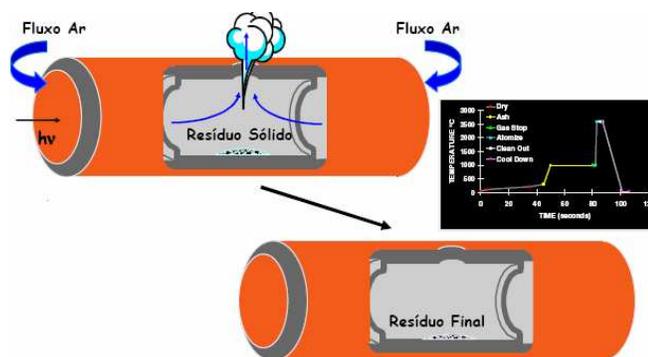


Figura 3. Etapa de pirólise em GF AAS, com um aumento da temperatura para remover os componentes da matriz (250 – 1600 °C) – Fonte: Perkin Elmer.

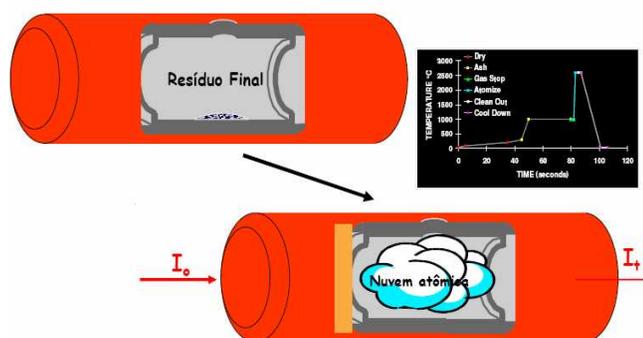


Figura 4. Etapa de atomização em GF AAS, onde o resíduo contendo o analito é vaporizado e forma-se uma nuvem de átomos no estado fundamental (1600–3000°C).

Fonte: Perkin Elmer – Figuras autorizadas pela Perkin Elmer Brasil em 20/12/2012.

A grande sensibilidade dos atomizadores eletrotérmicos em AAS resulta de sua facilidade em reter uma porção substancial da espécie de interesse atomizada no volume de observação por um período finito de tempo. O requisito básico para conseguir essa condição foi postulado primeiramente por L'vov: “A taxa de formação de átomos livres pode ser igual ou muito maior que sua remoção do caminho óptico” (ANJOS, 1997).

A partir dessa constatação, muitos trabalhos envolvendo a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica têm sido efetuados, principalmente para a determinação de espécies tóxicas em baixas concentrações (MENA, *et al.* 1996, CVETKOVIC *et al.* 2002; KIM, 2004, CATARINO, 2006)

Por outro lado, a técnica de GF AAS, assim como as demais técnicas analíticas baseadas no fenômeno da absorção atômica, está sujeita a interferências que, neste caso, podem ocorrer tanto na fase condensada quanto na fase de vapor (WELZ, 1999).

As interferências espectrais, causadas pela absorção molecular e espalhamento de luz têm sido eliminadas com sucesso na maioria dos casos com o uso de sistemas de

correção de fundo. Interferências físicas tendem a alterar o perfil do pico de absorção por mudanças no tempo de aparecimento do sinal de absorção atômica e, dessa forma, a temperatura aparente do analito. Isso resulta numa mudança no perfil do sinal e, por conseguinte, na resposta do analito.

As interferências físicas podem ser explicadas pelos mecanismos de covolatilização do analito com a matriz volátil e pela oclusão do analito nos cristais da matriz. As interferências químicas podem ser causadas pela reação entre o analito com as paredes quentes do grafite para formar carbetos refratários e pela formação de moléculas gasosas estáveis, as quais são perdidas antes de serem decompostas em átomos (ANJOS, 1997).

Buscando solucionar este problema, Ediger, em 1975, apresentou o primeiro trabalho que propunha o uso de um modificador de matriz (atualmente denominado modificador químico), que tinha como uma das finalidades volatilizar os interferentes durante a etapa de pirólise estabilizando o analito, possibilitando a separação térmica mais eficiente dos concomitantes da matriz antes da etapa de atomização (SCHLEMMER, 1986).

Considerando essas características, Schlemmer e Welz propuseram o uso de uma mistura de nitrato de paládio e nitrato de magnésio em um estudo com nove elementos. Os autores concluíram que a mistura possibilitava alcançar maiores temperaturas de pirólise que as obtidas com os modificadores estudados até então e que esse ganho permitia a remoção da maioria dos concomitantes inorgânicos da matriz, antes da volatilização dos analitos de interesse (SCHLEMMER & WELZ, 1986).

Logo, a modificação química tornou-se um item importante na técnica e passou a ser considerada principalmente nas etapas de desenvolvimento de novos métodos.

A escolha de um modificador mais eficiente para a estabilização do elemento traço, o programa de temperatura ótimo e os métodos de calibração mais adequados têm sido os temas mais investigados em GF AAS. Ferreira *et al.* 2009 descreveram a otimização e a validação de um método para a determinação de cádmio em vinhos brasileiros, estudando tempo e temperatura de pirólise e a massa de modificador. Em 2002, Pereira-Filho estudou a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. Karadjova *et al.* (2007) determinaram o teor de chumbo em 66 amostras de vinhos da Macedônia, otimizando a temperatura de pirólise com e sem o uso de modificadores. Em 2008, Ajtony *et al.* estudaram a introdução direta de amostras de vinhos da Hungria para a determinação simultânea de cádmio, cobre e chumbo. Também em 2008, Dessuy *et al.* desenvolveram um método para a determinação de chumbo em vinhos, comparando o uso de diferentes modificadores químicos, o uso da plataforma com aquecimento transversal tradicional e de um atomizador transversalmente aquecido com filtro.

Com o objetivo de reduzir substancialmente as interferências de matriz e tornar possível a determinação por simples calibração com soluções padrão, Slavin e colaboradores introduziram um conceito denominado de STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*). O requisito principal para obter uma temperatura estabilizada é que o tubo e a plataforma de grafite atinjam rapidamente a temperatura necessária para a atomização, antes que a espécie de interesse seja vaporizada ou participe de processos de recombinação.

Atualmente, quase todos os equipamentos já trazem na sua constituição condições para se aplicar os conceitos de STPF. Estes parâmetros são: Plataforma de L'vov, medida do sinal na forma de absorbância integrada, eletrônica rápida, potência máxima de aquecimento, correção de fundo baseada no efeito Zeeman, grafite revestido piroliticamente, uso de modificadores químicos e de amostrador automático, fluxo zero ou mini fluxo na etapa de atomização.

As principais vantagens das determinações em forno de grafite são a elevada detectabilidade, como já foi mencionado, e a possibilidade de se realizar a análise em condições isentas de interferências, levando à obtenção de boa exatidão e precisão, inclusive para matrizes complexas e até mesmo sem pré-tratamento.

Muitos estudos têm adotado a técnica de absorção atômica com forno de grafite para a determinação de metais em vinhos e em outras bebidas alcoólicas com resultados satisfatórios, enfatizando que o vinho é uma matriz complexa e com vários tipos de interferentes (ACETO *et al.*, 2002; OSHITA *et al.*, 2003; SOARES, 2003; HUGUEST, 2004; KIM, 2005; FROES, 2006; STAFILOV, 2009).

Assim, diante da necessidade analítica da determinação de baixos teores de arsênio, cádmio, chumbo e cobre, o maior desafio é encontrar as condições adequadas para as características das amostras de interesse e otimizar o método, que inclui a preparação da amostra, de modo que o desempenho analítico atenda, para os principais contaminantes, os requisitos exigidos pelas legislações regulamentadoras.

Nesse sentido, vale lembrar que a determinação de elementos traço e contaminantes em matrizes complexas como alimento requerem, muitas vezes, extensas preparações de amostra ou extrações complexas antes da análise instrumental. Consequentemente, a confiabilidade de um resultado analítico é fortemente dependente da etapa pré-analítica e da seleção adequada do procedimento de preparo de amostra. (KORN *et al.* 2008).

A etapa de preparo da amostra se faz necessária, muitas vezes, para transformar o elemento de interesse da matriz orgânica em uma forma inorgânica simples e, geralmente, dissolvido em uma solução de ácido diluído. É importante observar que, dentre todas as operações analíticas, a etapa de pré-tratamento das amostras é a mais crítica. Em geral, é nesta etapa que se cometem mais erros e que se gasta mais tempo. Por isso, os passos de um procedimento de pré-tratamento de amostra deverão ser sempre considerados cuidadosamente para implantação em rotina (KRUG, 2008). Considerando-se estes aspectos, e o objetivo de se ter um método adequado para monitoramento de metais em vinho, uma das vantagens mais importantes do uso da GF AAS neste trabalho é a possibilidade do desenvolvimento de métodos simples e exatos para a determinação de elementos-traço apenas utilizando diluição da amostra. Esta característica foi estudada para os diferentes tipos de vinhos analisados e está discutida posteriormente.

Polifenóis e pH

Os compostos fenólicos (polifenóis) estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Entre as frutas, a uva (*Vitis vinifera* L.) é uma das maiores fontes de compostos fenólicos.

O conteúdo destes compostos está principalmente nas partes sólidas da uva. A película e as sementes são as principais áreas de acumulação de compostos fenólicos. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos (VACARI, 2009).

Os compostos fenólicos são importantes em enologia, uma vez que participam da cor do vinho, das características gustativas de suavidade, da dureza, do sabor adstringente e, de alguma forma, do aroma que, por sua vez são influenciados pelo pH e acidez volátil (FREITAS, 2000).

O pH, a acidez total e o teor alcoólico são importantes na formação das antocianinas que são anfóteras e, conforme o pH, esses pigmentos se encontram em diferentes formas de oxônio e são geralmente de cor vermelha brilhante. Com o aumento do pH, as antocianinas passam a ter uma estrutura quinoidal, púrpura, e em meio alcalino a cor muda para azul (BOBBIO e BOBBIO, 2001).

O pH representa a concentração de íons de hidrogênio livres dissolvidos no vinho. Seu valor nos vinhos brasileiros é variável de 3,0 a 3,8, dependendo do tipo de vinho (branco ou tinto), da cultivar e da safra (RIZZON, 2010).

Validação do método

É a confirmação, por fornecimento de evidência objetiva, que os requisitos específicos para o uso pretendido foram satisfeitos. A validação confirma que o nível de medição é suficiente, os procedimentos de medição são corretos e a calibração foi feita adequadamente. Os principais parâmetros utilizados na validação de métodos são: aplicabilidade, seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, robustez e incerteza (EURACHEM, 1998).

Estimativa da Biodisponibilidade

Em geral, a estimativa do conteúdo total e a biodisponibilidade dos nutrientes minerais em alimentos e bebidas ainda são pouco conhecidas no Brasil. Por outro lado, o estudo da biodisponibilidade dos minerais, tanto do ponto de vista nutricional como toxicológico, está aumentando consideravelmente, especialmente em países europeus.

Em humanos, a avaliação de risco considera a ingestão de alimentos a maior rota de exposição para muitos contaminantes causados pela contaminação industrial, ambiental ou pelos processos de produção. A quantidade total de um contaminante ingerido (dose), nem sempre representa a quantidade que está disponível para o corpo. Somente certa quantidade de contaminante é biodisponível. Biodisponibilidade, então, é o termo usado para descrever a proporção de um contaminante ingerido no alimento que alcança a circulação sistêmica e pode, de fato, exercer seus efeitos tóxicos.

Por volta dos anos 80, o termo biodisponibilidade, que era utilizado apenas pela área farmacêutica, passou a ser utilizado também na área de nutrição, para indicar a proporção do nutriente que realmente seria utilizada pelo organismo. A biodisponibilidade é o resultado de um processo dinâmico, influenciado por uma diversidade de fatores relacionados tanto à dieta quanto ao indivíduo, não podendo ser considerada propriedade exclusiva do alimento ou da dieta (COZZOLINO, 2007).

A biodisponibilidade oral de um composto pode ser dividida em três processos, segundo Versantvoort, 2004:

- 1) Liberação do composto da matriz no lúmen intestinal (bioacessibilidade)
- 2) Transporte através do epitélio intestinal para o corpo (transporte intestinal)
- 3) Degradação do composto no fígado e intestino (metabolismo)

O termo bioacessibilidade é definido como a fração do composto que é liberado de sua matriz no trato gastrointestinal, tornando-se assim disponível para a efetiva absorção intestinal, sendo concomitantemente levado para a corrente sanguínea. Dessa forma, a bioacessibilidade engloba todos os processos que ocorrem durante a transformação digestiva do alimento em uma substância que possa ser assimilada pelo organismo. Em outras palavras, uma substância que possa ser absorvida/assimilada pelas células do intestino epitelial (bioacessível) e, posteriormente, pelo metabolismo pré-sistêmico (metabolismo intestinal e hepático) é uma substância biodisponível.

Na literatura, vários métodos têm sido utilizados para estimar a biodisponibilidade de nutrientes, entre eles: técnicas *in vitro*, técnica de balanço químico de massas, técnicas de depleção seguida de repleção do nutriente, além de medidas do aparecimento do nutriente no plasma ou ainda da atividade de enzimas, após a suplementação do nutriente (COZZOLINO, 2007).

A quantificação da biodisponibilidade e bioaccessibilidade é difícil e, muitas vezes, dificultada por processos complexos que compreendem a digestão. Experimentos precisos “*in vivo*” no homem ou em animais experimentais podem proporcionar a melhor informação sobre a biodisponibilidade (relativa) de compostos ingeridos (VERSANTVOORT *et al.*, 2005). No entanto, a técnica *in vitro* é eleita sobre estudos *in vivo*, porque reduz a necessidade de animais experimentais e simplifica a grande quantidade de diferentes produtos / matrizes e reagentes necessários ao teste *in vivo*, sendo mais reprodutível, permitindo que o procedimento seja padronizado.

Técnicas *in vitro*:

As técnicas *in vitro*, utilizadas desde meados de 1930, foram desenvolvidas na tentativa de estimar a disponibilidade de elementos inorgânicos considerados essenciais. Essa metodologia é capaz de quantificar a capacidade solúvel ou dialisável do nutriente, mas não a sua biodisponibilidade propriamente dita, uma vez que nem todo material solúvel ou dialisável é absorvido. Portanto, o método simula as condições fisiológicas, como também a sequência de eventos que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal. Embora não reproduza na totalidade os fatores envolvidos na absorção e na utilização de

nutrientes, estes métodos apresentam baixo custo relativo, rapidez e simplicidade na execução, tornando-se modelo importante no sentido de prever e sugerir estudos *in vivo*.

Esses métodos compreendem uma simulação de duas fases da fisiologia gastrointestinal, as fases estomacal e intestinal. A fase estomacal é essencialmente proteolítica pela ação da pepsina e HCl a 37 °C, e terá uma importância significativa, apenas se o alimento que está sendo digerido for rico em proteínas (que não é o caso do vinho). A fase intestinal, ocorrendo em pH levemente alcalino, e também a 37 °C, constitui um meio hidrolítico mais abrangente, ativando o suco pancreático, sais biliares e a enzima amilase. A este nível, proteínas e peptídeos hidrolisam em aminoácidos, polímeros de amido para maltose, maltotriose e dextrinas que futuramente serão hidrolisadas à glicose, gorduras para micelas mistas, constituídas de monoacilgliceróis, ácidos graxos de cadeia longa, sais biliares e fosfoacilgliceróis e resíduos de carboidratos (como pectinase e β -glucanos) em monossacarídeos. A fração solúvel de um elemento ao final desta fase é um dado útil, mas insuficiente para a estimativa da fração assimilável do elemento, a qual pode ultrapassar a membrana intestinal. Tem sido demonstrado que a fração de íons metálicos que penetra as membranas de diálise (12-15 mol Kda, *Wt cut-off*), sob condições fisiológicas simuladas (ajuste de pH gástrico para nível intestinal, alcançado gradualmente com a adição de NaHCO_3), simula os eventos ocorridos quando o alimento sai do estômago e entra no duodeno. O uso deste dispositivo demonstrou dar uma boa estimativa para o método *in vivo* da fração assimilável de minerais e de elementos traço de diversos produtos alimentícios, como por exemplo, o Fe “adicionado” em refeições (Miller *et al.*, 1981). Estes autores conseguiram estudar a influência de vários fatores, como a adição de ácido ascórbico e a

presença de altos e baixos níveis de proteínas nas refeições, relacionando a maior ou menor disponibilidade do ferro pelo método *in vitro*. Concluíram que o método *in vitro* utilizando as membranas de diálise foi uma excelente ferramenta para indicar a disponibilidade do ferro nas refeições estudadas.

Considerando que no Brasil existem ainda poucas informações sobre a acessibilidade de elementos potencialmente tóxicos em diversos alimentos, e que as bebidas como o vinho, podem contribuir para a dose diária total desses elementos, é importante estudar e adequar os métodos relativamente baratos, rápidos e eficazes como o método *in vitro*, sem as dificuldades que envolvem os métodos *in vivo*, como um método preliminar para futuras pesquisas de avaliação de risco.

Referências bibliográficas

Academia do Vinho. Disponível em <<http://www.academiadovinho.com.br>>. Acesso em 17/12/2012.

ACETO, M; ABOLLINO, O.; BRUZZONITI, M. C.; MENTASTI, E.; CORRADO. S.; MELANDRINO, M. Determination of metals in wine atomic spectroscopy (Flame -AAS, GF- AAS and ICP-AES); a review. **Food Additives and Contaminants**. v.19; n° 2, p.126-133, 2002.

ANJOS, A. P. **Estudo de modificadores químicos e superfícies modificadas para a determinação de estanho por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 106 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1997.

AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; SUSKÓ, E. K; MEZEI, P.; GYÖRGY, K.; BENCS, L. Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content. **Talanta**. , v.76, p.627-634, 2008.

ALBERTINI, S.; OETTERER, M.; PRADO, F. L. G. Fontes de contaminação e toxicologia por chumbo. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n° 2, p.137-147, 1997.

ALLOWAY, B. J.; AYRES, D. C. **Chemical principles of environmental pollution**. London: Blackie Academic & Professional, 1993, 291 p.

AZENHA, M. A. G. O; VASCONCELOS, M. T. S. D. Assessment of the Pb and Cu *in vitro* availability in wines by means of speciation procedures. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 899-912, 2000.

AZEVEDO, S. M.; CARDOSO, M. G.; PEREIRA, N. C. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana de açúcar produzidas em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**. v. 27, n° 3, p. 618-624, 2003.

BARTON, H. Predicted intake of trace elements and minerals via household drinking water by 6 year-old children from Krakow, Poland. Part 2: Cadmium, 1997-2001. **Food Additives and Contaminants**. v. 22, nº 9, p. 816-828, 2005.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela 2001, 143 p.

BRASIL, 1988. **Portaria nº. 229 de 25 de outubro de 1988**. Aprova as Normas referentes à “Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho”. **Diário Oficial da União** em 25 de outubro de 1988.

BRASIL.1998. **Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998**. Aprova o regulamento técnico “Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos e seus anexos”: limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos. **Diário Oficial da União** em 24 de setembro de 1988.

BRAININA, K. H. Z.; STOZHKO, N. Y.; BELYSHEVA, G. M.; INZHEISVATOVA, O. V.; KOLYADINA, L. I.; CREMISINI, C.; GALLETI, M. Determination of heavy metal in wine by anodic stripping voltammetry with thick-film modified electrode. **Analytica Chimica Acta**.v. 514, p. 227-234, 2004.

BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples. **Talanta**, v. 44, p.1581-1604, 1997.

CATARINO, S. C. G. **Metais contaminantes nos vinhos. Ocorrência por influência das bentonites**. 2006. 158 f. Tese (doutorado), Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia. Lisboa, 2006.

CATARINO, S. C. G.; CURVELO-GARCIA, A. S; SOUZA. B. R. Revisão: Elementos Contaminantes em Vinhos. **Ciência Técnica Vitivinícola**. v. 23(1), p. 3-19, 2008.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2. ed. Barueri : Manole, 2007 p. 952.

CVETKOVIC', J. ; ARPADJAN, S. ; KARADJOVA, I. ; STAFILOV, T. Determination of thallium in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction preconcentration. **Spectrochimica Acta Part B**.v. 57, p. 1101-1106, 2002.

DESSUY, M. B ; VALE, M. G. R ; SOUZA, A. S ; FERREIRA, S. L. C ; WELZ, B ; KATSKOV, D. A. Method development for the determination of lead in wine using electrothermal atomic absorption spectrometry comparing platform and filter furnace atomizers and different chemical modifiers. **Talanta**. v. 74, p. 1321-1329, 2008.

EURACHEM GUIDE: The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, 1ST edition, **Eurachem**, Dec, 1998.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 610p.

FERGUSON, J. E. **The heavy elements: Chemistry, impact and health effects**. London: Pergamon Press, 1990. 614 p

FERREIRA, S. L. C.; JESUS, R. M.; MATOS, G. D; ANDRADE, J. B, BRUNS, R. E.; SANTOS, W. W. L.; CAVALCANTE, D. D.; VALE, M. G. R.; DESSUY, M. B. Multivariate optimization and validation of analytical method for the determination of cadmium in wines employing ET AAs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n° 4, p 788-794, 2009.

FRESCHI, G. P. G.; DAKUZAKU, C. S.; GOMES NETO, J. A.; MORAES, M. Espectrometria de absorção atômica multielementar simultânea com atomização eletrotérmica em forno de grafite. Uma revisão da técnica e aplicações. **Eclética Química**. v. p. 25, 213-226, 2000.

FROES, R. E. S.; WINDMÖLLER. C. C.; SILVA, J. B. B. Emprego da modificação química permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. **Revista Analytica**. v. 23, p. 32-43, 2006.

GALANI-NIKOLAKAKI, S.; KALLITHRAKAS-KONTO, N.; KATSANOS, A. A. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. **The Science of the Total Environment**. v. 285, p. 155-163, 2002.

GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TORNIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. 2. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. 69 p. (Documentos / Embrapa Uva e Vinho, ISSN 1516-8107; 48).

HARRISON, N. **Metals**. In Watson, D. A. Safety of chemicals in foods: chemical contaminants. New York: Ellis Horwood. 1993. Cap.7, 109-139.

HERCE-PAGLIAI, C.; MORENO, I.; GONZÁLEZ, G.; REPETTO, M.; CAMEÁN, A. M. Determination of total arsenic, inorganic and organic arsenic species in wine. **Food Additives and Contaminants**. v. 19, nº 6, p. 542-546, 2002.

HUGUEST, M. E. R. Monitoring of Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in fine Uruguayan wines by atomic absorption spectroscopy. **Atomic Spectroscopy**. v. 25, p.177-184, 2004.

JOHNSON, H. **The story of wine**. London: Mitchel Beazly, 1989, 480 p.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho. Disponível em <[http://www ibravin.org.br/regioesprodutoras](http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras)>. Acesso em 15/07/2012.

KARADJOVA, I.; STAFILOV, T. Atomic absorption spectrometry in wine analysis – A Review – **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**. v. 28, nº 1, p.17-31, 2009.

KIM, MEEHYE. Determination of lead and cadmium in wines by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Additives and Contaminants**. v. 21, nº 2, p. 347-360, 2005.

KOMÁREK, M.; SZÁKOVÁ, J.; ROOSKOVA, M.; JAVORSKÁ, H.; CHRASTNY, V.; BALÍK, J. Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: A case study from the Czech Republic. **Geoderma**. v. 147, p. 16-22, 2008.

KORN, M. G. A.; MORTE, E. S. B.; SANTOS, D. C. M.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C.; SANTOS, E. B. G. N.; KORN, M. Sample preparation for the determination of metals in food sample using spectroanalytical methods – A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**. v. 43, p.67-92, 2008.

KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras**. 1. ed, Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008.

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de Absorção atômica - Atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Apostila**, parte 2, p.1-33, CENA/USP, 2007.

KUCZYNSKA, J.; BIZIUK, M. **Mineral components in food – Analytical implications. In Mineral components in food**. New York, London: CRC Press. 2006, 466p.

LEAL, C.B.; MOURÃO, J.T.T.; JUNIOR, P.S. Relato de caso: Doença de Wilson, *NewsLab*, ed.111, p. 96-100, 2012.

LORIMIER, A. A. Alcohol: Wine; and health. **The American Journal of Surgery**. v. 180, nº 5, p. 357-361, 2000.

L'VOV, B. V.; The analytical use of atomic absorption spectra, **Spectrochimica. Acta, Part B**. v.17, p. 761-770, 1961.

MARTIN, A. E.; WAITING, R. J.; GARRY, S. L. ICP-MS – The multi-element determination and regional discrimination of Australian wines. **Food Chemistry**. v. 133, p. 1081-1089, 2012.

MATOS, G. D. **Ampliação das potencialidades da espectrometria de absorção atômica baseada em spray térmico (TS-FF-AAS)**. 2006. 106 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

MCLAUGHLIN, M. J; PARKER, D. R; CLARKE, J. M. Metals and micronutrients food safety issues. **Field Crops Research**. v. 60, p.143-163, 1999.

MENA, M; CABRERA, C; LORENZO, M. L; LOPEZ, M. C. Determination of lead contamination in Spanish wines and other alcoholic beverage by flow injection Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.45, p. 1812-1815, 1997.

MIOLO. **Manual do vinho**. Bento Gonçalves: Miolo; 1999.

MIRLEAN, N.; ROISENBERG, A.; CHIES, J.O. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (Southern Brazil). **Environmental Pollution**. v. 149, p.10-17, 2007.

MOREIRA, F. R; MOREIRA, J. A importância da análise de especiação de chumbo em plasma para avaliação dos riscos à saúde. **Química Nova**. v. 27, nº. 2, p. 251-260, 2004.

MOREIRA, C. M.; DUARTE, F. A.; LEBHERZ, J.; POZEBON, D.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Arsenic speciation in White wine by LC-ICP-MS. **Food Chemistry**. v. 126, p. 1406-1411, 2011.

MILLER, D. D.; SCHRICKER, B. R.; RASMUSSEN, R. R.; CAMPEN, D. V. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 34, p. 2248-2256, 1981.

MURATA, L. T. F; PASCUET, N. S; NUNES, M. C. D *et al.* Importância do controle de metais pesados em alimentos. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**. v. 9, nº.1, p. 10-12, 1999.

NETO, J. A. S; CONSENZA, R. M. A “Gota de chumbo” no vinho. **Revista Médica de Minas Gerais**. v.3, nº. 2, p.115-117, 1993.

NEVES, E. A; OLIVEIRA, A; FERNANDES, A. P; NOBREGA, J. A. Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**. v.101, p. 33-36, 2007.

NRIAGU, J. O; SZEFER, P. **Mineral components in foods**. London: CRC Press. 2007, 466p.

OLIVEIRA, A.Q. **Otimização de metodologia analítica e avaliação da incidência de cádmio e chumbo em leite humano e alimentos infantis**. 2006. 112 f. Tese (doutorado),

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1 p. Campinas, 2005.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Elemento Traço na Nutrição e Saúde Humanas**. São Paulo: Roca, 1998, p.175.

OSHITA, D; OLIVEIRA, P; GOMES NETO, J. A; MORAES, M. Determinação direta e simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em cachaça por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, **Eclética Química**. v. 28, nº 1, p. 91-96, 2003.

PACHECO, A.O. **Iniciação à Enologia**. 2. Ed. São Paulo: SENAC, 1999.

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**. v. 25, p. 246-253, 2002.

Regulamento Técnico MERCOSUL: **Limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos** (Revogação da Res. GMC nº 102/2011) MERCOSUL/GMC/RES nº12/2011.

SCHLEMMER, G.; WELZ, B. "Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry". **Spectrochimica Acta, Part B**. v. 41, p.1157-1165, 1986.

SCHNEIDER, L. **Dinâmica locacional da vitivinicultura: novas regiões do Rio Grande do Sul e Vale do São Francisco**. 2006. 117 f. Dissertação (mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 26 p. Piracicaba, 2006.

SEGURA, M.; MADRID, Y.; CÁMARA, CARMEN. Evaluation of atomic fluorescence and atomic absorption spectrometric techniques for determination of arsenic in wine and beer by direct hydride generation sample introduction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 14, p. 131-135, 1998.

SMART, G. A; PICKFORD, C. J; SHERLOCK, J.C. Lead in alcoholic beverage: a second study. **Food Additives and Contaminants**. v. 7, p. 93-99, 1990.

SOARES, L. M. V; MORAES, A. M. M. Lead and cadmium content of Brazilian beers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, nº. 2, p. 285-289, 2003.

STAFILOV, T; KARADJOVA, I, Atomic Absorption Spectrometry in wine analysis – A Review – **Macedonian Journal of Chemistry Engineering**. v. 28, nº 1, p.17 – 31, 2009.

STUMMEYER,J; HARAZIN,B; WIPPERMANN,T; **FRESENIUS Journal of Analytical Chemistry**. p. 344-354, 1996.

TAVARES, T. M; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplo do Recôncavo Baiano. **Química Nova**. v. 15 nº 2, p. 147-155, 1992.

TOMAZELLI, A. C. **Estudo comparativo das concentrações de cádmio, chumbo e mercúrio em seis bacias hidrográficas do Estado de São Paulo. 2003. 124 f.** Tese (doutorado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. 04 p. Ribeirão Preto, 2003.

VERSANTVOORT, C. H. M, OOMEN A. G. ; KAMP, E.V ; ROMPELBERG,C. J. M ; SIPS, A. J. A. M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43, p. 31-40, 2005.

VERSANTVOORT, C. H. M,KAMP, E. V ; ROMPELBERG, C. J. M . **Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food**. Holanda , RIVM report 320102002/2004.

WALSH, A.; The application of atomic absorption spectra to chemical analysis”. **Spectrochimica Acta, Part B**. v.7, p. 108-117, 1955.

WANGGONER, D. J.; BARTNIKAS, T. B.; GETLIN, J. D. The role of copper in neurodegenerative disease. **Neurobiology of Disease**. v.6, p. 221-230, 1999.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3th ed., Weinheim: Wiley-VCH, 1999. 941p.

Capítulo 2

Desenvolvimento de método para determinação de As, Cd, Cu e Pb em vinhos por GF AAS

Desenvolvimento de método para determinação de As, Cd, Cu e Pb em vinhos por GF AAS

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um método empregando a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite para a determinação de arsênio (As), cádmio (Cd), cobre (Cu) e chumbo (Pb) em amostras de vinhos brasileiros. A digestão ácida preliminar não foi necessária no preparo das amostras. O programa de aquecimento empregado no forno de grafite foi otimizado para os diferentes tipos de vinhos e as amostras foram diluídas na proporção de 1:3 com ácido nítrico (65% v/v) e peróxido de hidrogênio (30% m/m). A curva analítica foi preparada em meio aquoso e alguns modificadores químicos foram investigados para cada elemento. Os modificadores selecionados na otimização foram: Cu (327,4 nm): 10 $\mu\text{g Pd}(\text{NO}_3)_2$ + 6 $\mu\text{g Mg}(\text{NO}_3)_2$; Pb (283,3 nm): 2,5 $\mu\text{g Pd}(\text{NO}_3)_2$ + 1,5 $\mu\text{g Mg}(\text{NO}_3)_2$; Cd (228,8 nm): 50 $\mu\text{g NH}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ + 3 $\mu\text{g Mg}(\text{NO}_3)_2$; As (197,3 nm): 20 $\mu\text{g Pd}(\text{NO}_3)_2$ + 12 $\mu\text{g Mg}(\text{NO}_3)_2$. Em todos os casos os modificadores foram co-injetados com 5 μL de peróxido de hidrogênio a 30% m/m. As determinações foram realizadas nas seguintes faixas lineares 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu; 5,0 - 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb; 0,5 - 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd; 10-60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As. Os limites de quantificação obtidos foram 11,5; 2,5; 0,22 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A exatidão do método foi avaliada através de experimentos de adição e recuperação, considerando concentrações baixas, altas e intermediárias dentro da faixa linear. As recuperações obtidas variaram de 92-103% (vinho tinto) e 99-106% (vinho branco) para o Cu, 97-107% (vinho tinto) e 95-101% (vinho branco) para o Pb, 89-102% (vinho tinto) e 98-106% (vinho branco) para o Cd, e 103-106% (vinho tinto) e 99-107% (vinho branco) para o As. Os resultados obtidos para as amostras em estudo foram comparados com aqueles obtidos após digestão por via úmida em bloco digestor, à 90°C, por 90 minutos. O valor de *t-Student* (calculado) para cada elemento estudado indicou que não houve diferença significativa nas médias das amostras que foram submetidas ao processo de digestão por via úmida e as que foram somente diluídas. Os métodos estudados apresentaram-se adequados quanto à sensibilidade, precisão e exatidão para determinação de baixas concentrações de cobre, chumbo, cádmio e arsênio em vinhos.

Palavras chave: vinhos, GF AAS, desenvolvimento de método, elementos inorgânicos potencialmente tóxicos.

Method development for the determination of As, Cd, Cu and Pb in wines by GF AAS

ABSTRACT

This work describes a method employing Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF AAS) for the determination of copper, lead, cadmium and arsenic in various Brazilian wines. The developed procedure does not require preliminary acidic digestion of the samples. The graphite furnace program was optimized and samples were diluted 1:3 with 65% v/v nitric acid and 30% m/m hydrogen peroxide. Calibration curves were prepared in aqueous medium and some modifiers were investigated for each element. The modifiers selected for the analytes were: Cu (327.4 nm) 10 μg $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ + 6 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Pb (283.3 nm) 2.5 μg $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ + 1.5 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Cd (228.8 nm), 50 μg $\text{NH}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ + 3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, As (197.3 nm) 20 μg $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ + 12 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. In all cases the chemical modifiers were co-injected with 5 μL of 30 % m/m hydrogen peroxide. The determination were performed in the following linear ranges: 10.0 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cu, 5.0-60 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb, 0.5 – 2.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cd and 10 – 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ for As. The limits of quantification were 11.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0.22 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cu, Pb, Cd and As, respectively. The accuracy of the methods was tested by addition and recovery experiments all over the linear working ranges. The recoveries obtained were in the ranges of 92-103% (red wine) and 99-106% (white wine) for Cu, 97-107% (red wine) and 95-101% (white wine) for Pb, 89-102% (red wine) and 98-106% (white wine) for Cd, and 103-106% (red wine) and 99-107% (white wine) for As. The results herein obtained were validated by comparing them with the ones obtained after an acidic digestion, carried out in a digestion block at 90°C, for 90 min. The value of *t-Student* for each element studied showed no significant difference in the averages between the sample subjected to wet digestion process and those that were only diluted. The methods studied were suitable for sensitivity, precision and accuracy for the determination of low concentration of copper, lead, cadmium and arsenic in wines.

Keywords: wine, GF AAS, method development, potentially toxic inorganic elements

Capítulo 2

Introdução

O vinho é uma bebida tradicional, largamente consumida em todo mundo, há milhares de anos. O consumo moderado, especialmente do vinho tinto, tem sido investigado quanto a sua capacidade de melhorar a saúde e a longevidade quando combinado com uma dieta balanceada (BERTELLI, 2007), porém, vários dados recentes sugerem que bebidas podem contribuir de forma significativa para a dose diária total de alguns elementos traço, com a possibilidade de seus níveis influenciarem tecidos e fluidos corporais. O vinho é uma dessas bebidas que contribui aumentando cerca de 10% ou mais da dose diária total da ingestão de elementos traço (STAFILOV, 2009).

Dentre os elementos traço estão alguns elementos metálicos e sua presença no vinho pode originar fenômenos depreciativos da sua qualidade, tais como turvações, precipitações e oxidações. Além disso, dependendo da concentração do elemento pode gerar, também, problemas de ordem toxicológica e legal (CATARINO, 2008).

A origem do cobre no vinho pode estar associada ao uso de fungicidas utilizados na vitivinicultura à base de cobre, entretanto, a presença de arsênio, cádmio e chumbo reflete as diferenças nas variedades das uvas, nos fatores de exposição ambiental e nos processos de vinificação (AJTONY, 2008).

Alguns elementos contaminantes adquiriram uma prioridade de estudo superior à de outros, eventualmente por estes se encontrarem em quantidades extremamente reduzidas (considerando a importância toxicológica dessa presença) ou ainda à dificuldade de sua determinação (CATARINO, 2008).

A determinação dos elementos potencialmente tóxicos como o Cd, Pb e As e do elemento essencial Cu é importante e requer métodos seletivos, sensíveis e robustos para o seu monitoramento. A técnica da espectrometria de absorção atômica em forno de grafite é bastante apropriada e têm sido amplamente usada devido a sua seletividade, sensibilidade e capacidade de analisar com o mínimo de preparo de amostras (FROES, 2006).

Modificadores Químicos

A modificação química é uma prática comum em determinações por GF AAS e uma das suas funções é aumentar a estabilidade térmica do analito e/ou a eficiência da etapa de pirólise por aumento na volatilização da matriz, eliminando, assim, interferências provocadas pela matriz ou concomitantes presentes na amostra (KRUG, 2007).

Modificadores químicos são substâncias adicionadas às amostras e padrões com o objetivo de diminuir ou eliminar interferências e um dos principais objetivos de seu uso é a estabilização térmica eficiente de analitos voláteis para aumentar as temperaturas de pirólise e atomização (TSALEV & SLAVEYKOVA, 1992).

O desempenho de um procedimento analítico em GF AAS, com relação à seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão e tempo de vida útil do atomizador, depende principalmente da amostra, do programa de aquecimento e do modificador químico empregado (KRUG, 2007).

Validação do método

Vários órgãos internacionais como: Association of Official Analytical Chemist (AOAC); International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); International Conference on Harmonisation (ICH); Codex Alimentarius (Committee on Methods of Analysis and Sampling); publicaram os parâmetros que devem ser utilizados para a validação de métodos. No Brasil, dois órgãos governamentais publicaram normas de validação: o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2010) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2006, RE nº 899)

Considerando-se as recomendações dessas instituições, os objetivos desse trabalho foram desenvolver métodos analíticos para determinação de As, Cd, Cu e Pb utilizando a GF AAS, com o mínimo de preparação de amostra e validar os métodos com relação aos parâmetros seletividade, faixa de trabalho, linearidade, precisão e exatidão, sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação.

Material e métodos

Amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram uma amostra comercial de vinho tinto e uma de vinho branco, adquiridas no comércio de Campinas, ambas com teores de açúcar de aproximadamente 20 g L⁻¹ e teores alcoólicos de aproximadamente 10% v/v, considerando que estas amostras representavam as maiores concentrações de açúcar, o que podia dificultar o desenvolvimento do método.

Reagentes

Foram utilizados padrões Titrisol (Merck) ou Carlo Erba para absorção atômica, para os seguintes analitos: cádmio (CdCl_2), cobre (CuCl_2), arsênio (As_2O_5) e chumbo $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Esses padrões foram preparados em balões calibrados, em meio de ácido nítrico diluído a 1% v/v nas concentrações de 1000 mg L^{-1} . Diariamente eram preparadas soluções de trabalho de $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para cobre (Cu), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As), sendo o diluente dessas soluções HNO_3 0,2% v/v.

Assim, foi utilizado também o ácido nítrico (65%v/v) (Merck), previamente destilado em destilador *subboiling* (Marconi, Piracicaba, Brasil), peróxido de hidrogênio (30% m/m, Merck), além dos modificadores químicos nitrato de paládio 1000 g L^{-1} (Perkin Elmer), nitrato de magnésio 1000 g L^{-1} (Perkin Elmer) e dihidrogenofosfato de amônio em HNO_3 (Perkin Elmer).

Os balões utilizados para o preparo das curvas analíticas eram confeccionados com *pyrex* grau A. Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtidas do sistema MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Toda vidraria e frascos de polietileno foram lavados com detergente neutro e deixados em banhos com ácido nítrico 20% v/v por pelo menos 24 horas e, em seguida, enxaguados com água desionizada antes do uso.

Equipamentos

O instrumento utilizado foi um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, E.U.A; modelo AAnalyst 600), com corretor de fundo baseado no efeito Zeeman, amostrador automático (modelo AS-800), tubos de grafite com aquecimento transversal e plataforma de L'vov integrada. Como fontes de radiação foram utilizadas lâmpadas monoelementares de descarga sem eletrodo (EDL) para detecção de: As, operando a 400 mA, no comprimento de onda 197,3 nm e abertura de fenda de 0,7 nm; Pb, operando a 460 mA, no comprimento de onda de 283,3 nm e abertura de fenda de 0,7 nm; Cd, operando a 240 mA no comprimento de onda de 228,8 nm e com abertura de fenda de 0,7 nm. Também foi usada uma lâmpada de cátodo oco (HCL), operando a 15 mA para Cu, no comprimento de onda de 327,4 nm e abertura de fenda de 0,7 nm. A vazão de argônio como gás de purga foi, em todas as determinações, de 250 mL min⁻¹. Esse gás foi interrompido durante a etapa de atomização.

Também foi utilizado um bloco digestor (Marconi, Piracicaba, São Paulo; modelo MA4025/SCR).

Avaliação do procedimento de preparo da amostra

Para selecionar um procedimento (fator de preparo) mais apropriado foram realizados estudos baseados na avaliação dos sinais de absorbância (maior absorbância com picos simétricos e menor sinal de fundo) e menor formação de resíduos carbonáceos no tubo de grafite. Para tanto, foram utilizadas amostras de vinho tinto e branco e o programa de aquecimento recomendado pelo fabricante. As amostras de vinho tinto e de vinho branco

foram introduzidas diretamente no forno de grafite. Já nas primeiras determinações por GF AAS verificou-se a formação intensa de uma camada carbonácea na plataforma do tubo de grafite, resultado do alto teor de açúcar das amostras escolhidas para o estudo do método. Para contornar esse problema, foram preparadas soluções, em triplicata, nas diluições 1:2, 1:3 e 1:4 do vinho tinto e vinho branco utilizando como diluente a associação de ácido nítrico a 65% v/v, peróxido de hidrogênio a 30% m/m e água desionizada, obtendo-se na solução final 10% m/v de peróxido de hidrogênio e 2,6% v/v de ácido nítrico. Observou-se experimentalmente que quando eram usadas concentrações de ácido nítrico menores que 2% v/v para a diluição das amostras, havia a formação de maiores quantidades dos produtos de pirólise, que ficavam retidos na plataforma. Assim, para os vinhos tinto e branco, com variados teores de açúcar, uma concentração de 2,6% v/v de HNO₃ foi suficiente para a diminuição da interferência da matriz e preservação da plataforma de grafite. Por outro lado, o uso do peróxido de hidrogênio a 10% v/v, juntamente com a temperatura ótima de pirólise contribuíram de forma muito eficiente para uma melhor precisão das medidas e remoção da matriz, possibilitando a injeção das amostras sem a mineralização prévia. Portanto, para o preparo das amostras nas diluições de 1:2, 1:3 e 1:4, foram pipetados respectivamente 5,00 mL, 3,33 mL e 2,50 mL de amostra de vinho, aos quais foram adicionados 3,33 mL de peróxido de hidrogênio a 30 % m/m e 0,4 mL de ácido nítrico concentrado, em um balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com água desionizada.

Foram realizados testes comparativos, utilizando fornos de grafite novos e mesma condição analítica comparando-se os valores de absorvância e a menor formação de

resíduos carbonáceos na plataforma de grafite. O acúmulo de resíduos carbonáceos pode causar nos ciclos subsequentes efeito de memória e alto sinal de fundo (*background*), gerando baixa precisão e aumentando as incertezas. A melhor condição de diluição estudada foi a de 1:3. Esta condição de diluição proporcionou menor formação de resíduos carbonáceos no tubo de grafite e não afetou a detectabilidade, em razão da baixa diluição.

Portanto, para os estudos posteriores, o preparo da amostra utilizado está descrito abaixo:

Em balão volumétrico de 10,0 mL foram pipetados 3,33 mL de amostra de vinho homogeneizados, 3,33 mL de peróxido de hidrogênio a 30% m/m, 0,40 mL de ácido nítrico concentrado e o volume foi completado com água desionizada.

Avaliação da estabilidade das amostras diluídas

Nesta etapa também foi avaliado o efeito do tempo entre o preparo da amostra e o momento da análise. Foram preparadas sete replicatas das amostras de vinho tinto e de vinho branco, as quais foram diluídas e deixadas em repouso por 48 horas antes da análise. Outras sete replicatas das mesmas amostras foram preparadas imediatamente antes das leituras no equipamento

Estudo dos modificadores químicos:

Avaliação do uso de peróxido de hidrogênio:

Com o objetivo de melhorar a preservação do tubo de grafite, foi feito um estudo utilizando peróxido de hidrogênio co-injetado com os modificadores indicados pelo fabricante do equipamento de AAS. Foram realizados testes na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio nos teores de 15% v/v e 30% v/v por co-injeção com volumes injetados de 5 µL e 10 µL, juntamente com a mistura de modificadores 3 µg Mg(NO₃)₂, + 5 µg Pd(NO₃)₂.

Para essa comparação, foram utilizados fornos de grafite novos, em igual condição, avaliados antes e após as queimas de amostra de vinho tinto e vinho branco diluídos (1:3), utilizando para esse estudo o elemento cobre e as recomendações do fabricante para o programa de aquecimento.

Modificadores Químicos

O comportamento eletrotérmico dos quatro elementos (As, Cd, Cu e Pb) no vinho foram avaliados individualmente, quanto ao uso dos modificadores e também, quanto à otimização do programa térmico. Foram estudados vários modificadores utilizando-se diferentes concentrações dos mesmos, com base na recomendação do fabricante e preconizados pela literatura. Para este estudo foram avaliados vários aspectos como o valor do sinal analítico, o valor de RSD (desvio padrão relativo), a exatidão, a massa

característica do elemento, o perfil dos picos gerados através das curvas de pirólise e a atomização.

Cobre

Foram avaliadas duas diferentes massas dos modificadores de nitrato de paládio e nitrato de magnésio, tanto associados quanto separados: 5 $\mu\text{g Pd}(\text{NO}_3)_2$, 3 $\mu\text{g Mg}(\text{NO}_3)_2$, 5 $\mu\text{g Pd}(\text{NO}_3)_2 + 3 \mu\text{g Mg}(\text{NO}_3)_2$ e 10 $\mu\text{g Pd}(\text{NO}_3)_2 + 6 \mu\text{g Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Para este estudo foram utilizadas amostras de vinho branco e tinto diluídos a 1:3, conforme descrição anterior, fortificadas com 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão de cobre. Foram utilizados 20 μL de amostras de vinhos diluídas e 5 μL de solução de modificador(es), que foram co-injetados com 5 μL de H_2O_2 à 30% v/v.

Chumbo

Para seleção do modificador a ser utilizado nas análises para chumbo foram estudadas as seguintes misturas de modificadores, todos co-injetados com 5 μL de H_2O_2 à 30% v/v: 50 μg de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + 3\mu\text{g}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, os modificadores 2,5 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + 1,5 \mu\text{g}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e também 5 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + 3 \mu\text{g}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Para este estudo utilizou-se as mesmas amostras dos vinhos tinto e branco, que foram diluídas e acidificadas, conforme descrição anterior, e fortificadas com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo, antes

das análises. Foram utilizados 20 µL das soluções de amostras e 5 µL de cada mistura de modificadores co-injetados com 5 µL de H₂O₂ à 30% v/v.

Cádmio

A eliminação dos componentes orgânicos e inorgânicos da matriz durante a etapa de pirólise pode interferir na volatilidade do cádmio, causando perdas do elemento nessa etapa. Temperaturas de pirólise maiores que 200°C, sem o uso de modificadores químicos, podem causar perdas do cádmio no tubo de grafite.

Desta forma, foi feito um estudo para a escolha dos modificadores químicos com a finalidade de melhorar as etapas de pirólise e de atomização. Foram estudados os modificadores nitrato de paládio, 5 µg Pd(NO₃)₂, a mistura de paládio e nitrato de magnésio (5 µg Pd(NO₃)₂ + 3 µg Mg(NO₃)₂), dihidrogeno fosfato de amônio (50 µg NH₄H₂PO₄), a mistura dihidrogeno fosfato de amônio e nitrato de magnésio (50 µg + NH₄H₂PO₄ 3 µg Mg(NO₃)₂) e 250 µg de tungstênio como modificador permanente. Todos os modificadores estudados foram co-injetados com 5 µL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). Para este estudo utilizou-se amostras de vinho branco e tinto, após a diluição otimizada, fortificadas com 1 µg L⁻¹ de solução padrão de cádmio.

Arsênio

O uso de modificadores químicos para a determinação de arsênio em vinhos é uma prática necessária, uma vez que o elemento é volátil e a matriz vinho requer alta temperatura de pirólise para sua completa calcinação.

Foram estudados os modificadores 20 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e também as misturas $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, nas respectivas massas de 5 μg + 3 μg ; 10 μg + 6 μg ; 20 μg + 12 μg , todos co-injetados com 5 μL de H_2O_2 à 30% v/v. Para este estudo foram utilizadas amostras dos vinhos tinto e branco diluídos a 1:3 e acidificados, e fortificados com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme descrito no item 2.4.

Avaliação do Programa Térmico

Após o estudo e a seleção dos modificadores químicos mais apropriados para cada um dos analitos, foi feita a otimização do programa de aquecimento. Este estudo foi realizado com amostras diluídas dos vinhos, na proporção 1:3. O objetivo dessa etapa foi obter a melhor sensibilidade e repetibilidade do método, visando também a diminuição da quantidade de resíduos carbonáceos na plataforma do tubo de grafite, que foram observados e podem ser atribuídos à matriz complexa.

As etapas de secagem foram monitoradas visivelmente utilizando um acessório do equipamento (espelho de aumento), observando-se a evaporação da fase líquida, tempo

gasto para secagem total, indicando a volatilização do álcool, sem espalhamento da amostra.

Para cada elemento foram estudadas e comparadas as temperaturas de pirólise e atomização para os vinhos tinto e branco analisando o perfil dos picos gerados, os sinais analíticos, os sinais de fundo (BG), a precisão das medidas (RSD). Para o cobre a temperatura de pirólise foi estudada na faixa de 1000 °C a 1500 °C e a atomização na faixa de 1700 °C a 2300 °C; para o chumbo foi estudada a faixa de 750 °C a 1000 °C para pirólise e 1500 °C a 1700 °C para atomização. Para o cádmio foram estudadas temperaturas na faixa de 400 °C a 700°C com incrementos de 50 °C para pirólise e 1350 °C a 1700 °C para atomização, enquanto para o arsênio foram estudadas as faixas de temperatura de 1100 °C para pirólise e 1850 °C a 2200 °C para atomização com incrementos de 50 °C.

Validação do Método:

Foram estudados os seguintes parâmetros analíticos para a validação do método:

Curva analítica de calibração/Linearidade:

Antes de iniciar a construção da curva analítica foi necessário definir a menor e a maior concentração, isto é, a faixa de concentração de interesse, na qual a linearidade foi posteriormente estudada. Para essa decisão foram avaliados os valores máximos permitidos pela legislação e os valores reportados pela literatura para a concentração dos elementos nos vinhos.

A linearidade foi verificada pela construção de uma curva analítica com soluções cujas concentrações atendem a faixa de concentração esperada e os resultados foram avaliados por métodos estatísticos apropriados, como o cálculo da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados.

Os intervalos entre os níveis de concentrações foram equidistantes. A avaliação dos dados obtidos foi realizada pela análise estatística:

- Cálculo da regressão linear simples;
- Inspeção visual do gráfico da regressão;
- Inspeção visual dos picos do sinal analítico e do sinal de fundo
- Inspeção dos desvios padrão relativos

Para a construção das curvas analíticas as soluções padrão para cádmio (obtidas a partir de CdCl_2), cobre (obtidas a partir de CuCl_2), arsênio (obtidas a partir de As_2O_5) e chumbo (obtidas a partir de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) foram preparadas em balões calibrados, em meio de ácido nítrico diluído a 0,2% v/v, sendo que cada ponto da curva foi preparado em triplicatas independentes .

Seletividade:

Foi feita a adição do analito de interesse em cinco níveis de concentração, distribuídos uniformemente nas amostras de vinhos tinto e branco, e determinados em

triplicatas independentes. Os valores dos *slopes* (inclinação da curva analítica) preparados com a matriz foram comparados com aqueles obtidos com curvas aquosas em meio de HNO₃ 0,2% v/v, apenas (sem a presença da matriz). Este procedimento foi realizado, uma vez que não foi possível obter amostras de vinhos sem os analitos estudados.

Limite de detecção e limite de quantificação:

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados a partir das equações: $(3 \times s/\alpha)$ para LOD e $(10 \times s/\alpha)$ para LOQ, onde s é o desvio padrão de vinte leituras do branco do ensaio e α , o coeficiente angular da curva analítica de calibração. Para o cálculo do LOD e do LOQ do método, os valores obtidos na determinação instrumental foram multiplicados por três, considerando o fator de preparo da amostra.

Exatidão:

A recuperação dos elementos foi avaliada pelo método de adição e recuperação, uma vez que não existe amostra de referência ou amostra de referência certificada disponível com teores nas faixas estudadas. A recuperação foi feita em cinco níveis diferentes da curva analítica, ou seja, abrangendo concentrações baixas, altas e intermediárias.

Para este estudo, quantidades conhecidas dos padrões de cobre, chumbo, cádmio e arsênio foram adicionados em diferentes concentrações na matriz do vinho tinto e do vinho

branco, juntamente com o ácido nítrico e o peróxido de hidrogênio, e deixados em contato por 24 horas, antes de se completar o volume e realizar a leitura, com o objetivo de favorecer o equilíbrio do elemento com a matriz. A amostra original, sem adição de padrão, e cada uma das amostras contendo o padrão adicionado foram analisadas e as quantidades medidas relacionadas com as quantidades adicionadas. A recuperação foi calculada empregando-se a fórmula (THOMPSON *et al.*; 2002)

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{(\text{Concentração da amostra fortificada} - \text{Concentração da amostra}) \times 100}{\text{Concentração do padrão}}$$

Comparação da determinação dos elementos após digestão por via úmida e diluição direta

Foram determinadas as concentrações dos elementos cobre, chumbo, cádmio e arsênio nas amostras de vinhos tinto e branco, sem fortificação, após digestão por via úmida em bloco digestor. A digestão realizada foi baseada em Freschi *et al.*; 2001. As amostras foram preparadas em triplicata utilizando 8,33 mL de vinho, 3,33 mL de peróxido de hidrogênio a 30% (m/m) e 3,33 mL de ácido nítrico concentrado, colocados nos tubos de digestão e levados ao bloco digestor. A temperatura do bloco digestor foi aumentada gradualmente, até atingir 90 °C, por 90 minutos. As amostras esfriaram à temperatura ambiente e foram transferidas para balões volumétricos cujos volumes foram completados com água desionizada para 25 mL. O fator de preparo foi o mesmo utilizado para as

amostras diluídas (3). As amostras se apresentaram totalmente transparentes sem partículas em suspensão quando observadas visivelmente.

Resultados e Discussão

Avaliação do uso de peróxido de hidrogênio:

A presença de H_2O_2 co-injetado como modificador químico promoveu uma melhora significativa na preservação da plataforma de grafite. Por outro lado, a análise estatística mostrou que para o vinho tinto não houve diferença significativa na precisão das medidas (valor para $F_{(95\%; 6)}$, calculado de 1,53, sendo o tabelado igual a 5,82) e nas médias ($t_{(95\%; 6)}$, calculado de 0,03, enquanto o t tabelado foi de 2,45), para os sinais de cobre. Além disso, também não foi obtida nenhuma melhora significativa do sinal. Para o vinho branco, por sua vez, houve um aumento de 17% no valor do sinal analítico e melhora na precisão das medidas quando foi utilizado um volume de 5 μL do peróxido à 15% v/v (Figura 1).

Embora o sinal da absorvância para a concentração de 30% v/v de peróxido hidrogênio tenha sido um pouco menor do que a de 15% v/v, essa concentração foi mais efetiva na preservação da plataforma de grafite. Já o volume de 10 μL de peróxido a 15% v/v não favoreceu a preservação do tubo para nenhum dos dois tipos de vinhos estudados, indicando ser uma quantidade insuficiente.

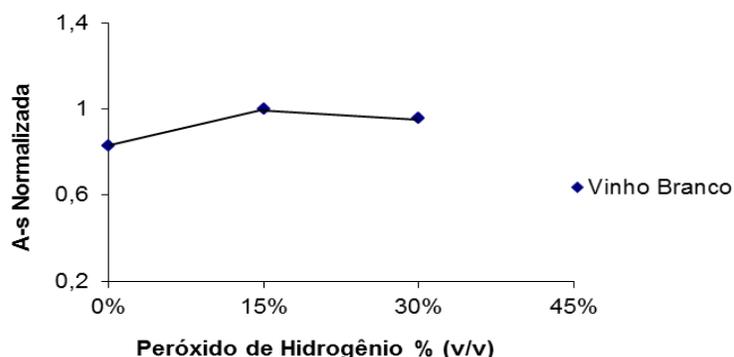


Figura 1. Absorbância integrada normalizada para o cobre em função da concentração de H_2O_2

Avaliação da estabilidade das amostras diluídas

Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas na precisão e na média dos sinais obtidos, tanto para o vinho tinto quanto para o vinho branco, em função do tempo de preparo. Os valores para $F_{(95\%, 6,6)}$ calculados, menores que 5,82 para as duas amostras, e os valores para $t_{Student}$, menores que $2,45_{(95\%, 6)}$ para 95 % de confiança, para as duas amostras, indicam que não existem diferenças significativas entre os tempos de preparo e análise, até um período de 48 horas.

Modificadores Químicos

Cobre

Observou-se um aumento de 39% no sinal analítico quando foi utilizada a massa de 10 μg de nitrato de paládio associada a 6 μg de nitrato de magnésio. Com a utilização

dessas massas foi obtida uma recuperação de 89% do Cu adicionado no vinho tinto, com desvio relativo de 2,1%, e recuperação de 99% do Cu adicionado no vinho branco, com desvio relativo de 5,6%, conforme Tabela 1. A presença do nitrato de paládio favoreceu a atomização do cobre para o vinho branco, que pode ser observado quando comparamos a recuperação do uso do nitrato de paládio (70%) com o uso do nitrato de magnésio (28%). As massas características obtidas, de 26 pg e 27 pg, respectivamente, são valores adequados para o objetivo deste trabalho.

Tabela 1. Desvio padrão relativo (RSD), porcentagem de recuperação e massa característica (m_o) para o cobre em vinhos tinto e branco obtidos no estudo de modificadores químicos.

Modificadores	Vinho Tinto			Vinho Branco		
	RSD (%)	Recup. (%)	m_o (pg)	RSD (%)	Recup. (%)	m_o (pg)
Pd(NO₃)₂ (5 µg)	1,5	169	61	2,47	70	26
Mg(NO₃)₂ (3 µg)	0,5	28	74	2,45	28	70
Pd(NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂ (5 µg + 3 µg)	3,2	145	19	9,4	61	33
Pd(NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂ (10 µg + 6 µg)	2,1	89	26	5,6	99	27

Foram co-injetados com os modificadores 5 µL de H₂O₂ à 30% .

Este estudo foi realizado utilizando os comprimentos de onda de 324,8 nm e 327,4 nm, porém, melhores resultados de recuperação foram obtidos quando foi utilizado o comprimento de 327,4 nm, que conferiu uma melhor exatidão das medidas.

O cobre possui 7 linhas de ressonância favoráveis, analiticamente. A mais importante linha de ressonância para baixas concentrações de cobre é a linha 324,8 nm. Porém, é um dos poucos elementos que sofre perda da sensibilidade (cerca de 50%) quando se usa o corretor de fundo pelo efeito Zeeman na linha principal de ressonância, a 324,8 nm. Por isso, ao “trocar” o comprimento de onda, a massa característica passa de 8 pg para 4 pg . A perda da sensibilidade devido ao efeito Zeeman é significativamente menor e por consequência a linearidade também é melhor, quando se usa a linha de 327,4 nm, apesar desta linha ser mais recomendada para a determinação de concentrações altas de cobre (WELZ, 1999).

Chumbo

Os dados obtidos para o uso dos modificadores químicos na análise de chumbo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Temperatura de pirólise e atomização, massa característica e desvio padrão relativo (RSD) para o chumbo, em vinhos tinto e branco, obtidos no estudo dos modificadores químicos.

Modificadores	Vinho Tinto			Vinho Branco		
	Temp. Pir/Atom (°C)	m_0 (pg)	RSD (%)	Temp. Pir/Atom (°C)	m_0 (pg)	RSD (%)
NH₄H₂PO₄ + Mg(NO₃)₂ (50 µg + 3 µg)	850/1500	40	0,5	900/1500	45	1,2
Pd(NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂ (2,5 µg + 1,5 µg)	950/1550	30	1,1	950/1550	33	1,1
Pd(NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂ (5 µg + 3µg)	950/1600	42	1,1	950/1600	44	1,3

Foram co-injetados com os modificadores (5µL de H₂O₂ a 30%) - Massa característica de referência $m_0 = 30$ pg (uso do NH₄H₂PO₄ +Mg(NO₃)₂ com variação de ± 20% e $m_0 = 50$ pg (uso do Pd(NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂).

Analisando a Tabela 2, é possível verificar que a menor temperatura para a pirólise foi obtida quando foram utilizados os modificadores dihidrogeno fosfato de amônio com nitrato de magnésio, o que desfavorece a eliminação da matriz. A massa característica

obtida para essa condição foi cerca de 20% maior do que o valor de referência, o que pode indicar uma perda da sensibilidade.

A utilização do modificador $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ associado a $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ nas massas de (5 μg + 3 μg) possibilitou o uso de uma temperatura maior de pirólise e a massa característica obtida foi um pouco maior que a dos outros modificadores (42 pg). Entretanto, o perfil dos picos gerados não foi satisfatório para essa condição. O modificador $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ + $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (2,5 μg + 1,5 μg) possibilitou o uso de uma temperatura maior de pirólise (950°C), com massa característica mais baixa que a do valor de referência (m_0 50 pg), porém com desvio padrão relativo (RSD 1,1) satisfatório e picos simétricos. O número de queimas no forno de grafite utilizando este modificador foi de aproximadamente de 350 queimas. Portanto, o modificador químico selecionado para a determinação de chumbo foi a mistura $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ + $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, usando as seguintes massas (2,5 μg + 1,5 μg).

Cádmio

Foram avaliadas as temperaturas de pirólise e atomização com os diferentes modificadores, além do desvio padrão relativo, da massa característica e do sinal analítico, que foram baseados nas medidas da área do pico.

Tabela 3. Temperaturas de pirólise e atomização, massa característica, desvio padrão relativo (RSD), sinal analítico para o vinho tinto e desvio padrão relativo (RSD) para o cádmio em vinhos tinto e branco obtidos no estudo de modificadores químicos.

Modificadores	Vinho Tinto			Sinal analítico vinho tinto	Vinho Branco		
	Temp. Pir/Atom (°C)	m_o (pg)	RSD (%)		Temp. Pir/Atom (°C)	m_o (pg)	RSD (%)
NH₂H₂PO₄ + Mg(NO₃)₂ (50 µg+ 3 µg)	550/1500	0,74	0,92	0,1200	550/1400	0,84	0,98
NH₂H₂PO₄ (50 µg)	450/1450	0,92	0,2	0,0624	450/1550	0,94	1,5
Pd(NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂ (5 µg+ 3 µg)	500/1450	1,02	8,3	0,1014	450/1400	1,04	2,2
Pd(NO₃)₂ (3 µg)	500/1450	1,01	0,87	0,0654	550/1450	1,01	3,8
W (250 µg)	400/1450	0,85	0,16	0,0899	Não estudado	Não estudado	Não estudado

* (5 µL de H₂O₂ á 30% foram co-injetados junto com os modificadores) m_o 1,3 pg

Analisando a Tabela 3, podemos observar que as temperaturas obtidas foram muito parecidas, independente dos modificadores estudados. A mais alta temperatura obtida neste estudo, que pode favorecer a pirólise, foi obtida quando utilizada a associação de 50 µg NH₄H₂PO₄ e 3 µg Mg(NO₃)₂. Esta temperatura (550 °C) pode propiciar a eliminação mais efetiva da matriz, sem danificar o tubo de grafite. Observa-se também um sinal analítico

maior para o vinho tinto quando foi utilizado o modificador 50 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, além dessa condição propiciar um perfil de pico mais simétrico entre todas as condições.

A precisão das medidas também foi satisfatória para todos os modificadores estudados, com valores abaixo de 10%.

Com o uso dos modificadores individuais, nitrato de paládio e dihidrogeno fosfato de amônio, obteve-se um sinal analítico e um sinal de fundo mais baixos, para o vinho tinto, porém a temperatura de pirólise foi inferior à outras condições e os picos gerados apresentaram-se assimétricos.

Além do uso de modificadores químicos, foi avaliada a modificação química permanente com a adição de 250 μg de tungstênio. A modificação da superfície da plataforma e das paredes do forno ocorreu por deposição térmica do metal introduzido no forno, segundo Oshita (2003), e a sequencia de etapas está descrita no Anexo 1.

Várias propostas foram descritas para explicar o mecanismo de ação dos modificadores permanentes. Para elementos formadores de carbeto refratários, como é o caso do tungstênio, uma cobertura deste carbeto é formada na superfície da plataforma. Com a adição da amostra e dos elementos formadores de oxoânions, além da elevação da temperatura, ocorre a formação de uma mistura de óxidos de elevada estabilidade térmica contendo o óxido do analito e o óxido do metal refratário. A elevação da temperatura na etapa de atomização provoca a quebra das ligações, promovendo a reconversão do óxido do metal refratário em carbeto, a evolução de CO e a atomização do analito livre (FROES, 2006).

Comparando as temperaturas de pirólise de todos os modificadores químicos utilizados, pode-se dizer que a menor temperatura foi alcançada com a utilização do W (400 °C), que pode ter ocorrido devido à falta de homogeneidade na deposição do metal na plataforma, fato já relatado por outros autores (LIMA *et al.*,1998). Outro fator observado com o uso deste modificador permanente foi o baixo número de ciclos de atomização, cerca de 140 queimas, quando comparado ao uso dos modificadores químicos convencionais para este estudo, com média de 350 queimas.

Levando em consideração os fatores analisados e a recomendação do fabricante, foi selecionado o uso de 50 µg NH₄H₂PO₄ e 3 µg Mg(NO₃)₂ como modificador químico para a determinação de Cd nos dois tipos de vinhos.

Arsênio

O vinho é uma matriz rica em fosfatos e muitas interferências químicas e espectrais são mencionadas na literatura na determinação de arsênio (WELZ, 1999). A interferência espectral ocorre pela absorção molecular das espécies P₂ e PO e, apesar do uso do corretor pelo efeito Zeeman, observa-se uma sobrecorreção porque o perfil de absorção das bandas de PO é afetado pelo campo magnético do corretor Zeeman (HUSÁKOVA, 2007).

Muitos modificadores químicos como, por exemplo, Pd, Pt, Ni e as suas misturas, têm sido reportados como eficientes estabilizadores térmicos de fosfatos, atrasando e diminuindo o sinal de fundo, reduzindo assim a interferência espectral causada por este na determinação de arsênio (HUSÁKOVA, 2007).

Foram estudados os modificadores 20 µg de Pd (NO₃)₂ e também as misturas Pd (NO₃)₂ + Mg (NO₃)₂, nas respectivas massas de 5 µg + 3 µg; 10 µg + 6 µg; 20 µg + 12 µg, todos co-injetados com 5 µL de H₂O₂ à 30% v/v (Tabela 4). Para este estudo foram utilizadas amostras dos vinhos tinto e branco diluídos a 1:3 e acidificados, e fortificados com 50 µg L⁻¹, conforme descrito no item 2.4.

Tabela 4. Temperatura de pirólise, atomização, massa característica e desvio padrão relativo para o arsênio em vinhos tinto e branco obtidos no estudo dos modificadores.

Modificadores	Vinho Tinto			Vinho Branco		
	Temp. Pir/Atom (°C)	<i>m</i> ₀ (pg)	RSD (%)	Temp. Pir/Atom (°C)	<i>m</i> ₀ (pg)	RSD (%)
Pd (NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂ (5 µg + 3 µg)	1250/2000	48	1,9	1300/1900	49	0,5
Pd (NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂ (10 µg + 6 µg)	1300/2050	42	3,5	1250/2200	45	4,9
Pd (NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂ (20 µg + 12 µg)	1300/2050	44	0,9	1350/2000	41	0,9
Pd (NO₃)₂ (20 µg)	1300/2050	47	0,4	1350/2000	53	2,4

Foram co-injetados com os modificadores 5µL de H₂O₂ à 30% ; *m*₀: Massa característica de referência 40 pg com variação de ± 20%.

É possível observar na Tabela 4 que as temperaturas obtidas no estudo do programa térmico foram bastante semelhantes, mesmo variando as massas dos modificadores, tanto para a etapa de pirólise quanto para a de atomização. Porém, utilizando-se a massa de 20 µg de Pd(NO₃)₂ associado a 12 µg de Mg(NO₃)₂ a temperatura de pirólise pode ser

aumentada para 1350°C, podendo ser utilizada como uma temperatura de compromisso tanto para o vinho tinto quanto para o branco, porém essa temperatura deverá ser confirmada através das curvas de pirólise e atomização. O sinal gerado pelo analito teve um aumento considerável de 17,5%, quando comparado com a utilização de 5 µg Pd(NO₃)₂ + 6 µg de Mg(NO₃)₂.

Avaliando as massas características pode-se observar, também, que os valores obtidos mais próximos da referência (40 pg) são alcançados com a utilização das massas de 10 µg e 20 µg de Pd(NO₃)₂ associados ao Mg(NO₃)₂. Nessas condições, o desvio padrão relativo é menor do que 10%, demonstrando também boa precisão entre as medidas.

O estudo do programa térmico para arsênio foi dificultado devido aos altos sinais de fundo (fundo estruturado), o que era esperado devido à presença de alguns possíveis concomitantes como sulfato e fosfato, entre outros. Estes componentes da matriz podem causar co-vaporização do elemento e de igual modo, podem bloquear os “locais ativos” do modificador paládio (AJTONY, 2008). Por isso, uma massa maior de modificador químico foi utilizada resultando em picos mais simétricos e possibilitando alcançar temperaturas mais favoráveis na etapa de pirólise.

Embora o sinal analítico para essas duas condições, 10 µg Pd(NO₃)₂ + 6 µg Mg(NO₃)₂ e 20 µg Pd(NO₃)₂ + 12 µg Mg(NO₃)₂ sejam próximos, o sinal de fundo (*background*) para a condição 20 µg Pd(NO₃)₂ + 12 µg Mg(NO₃)₂ foi maior, como é possível observar na Figura 2.

Avaliando a utilização de 20 µg Pd(NO₃)₂ como modificador químico, observam-se as mesmas temperaturas alcançadas quando este reagente está associado a 12 µg Mg(NO₃)₂

(Tabela 6), porém, a massa característica (40 pg) ficou mais próxima da referência (40 pg) com o uso da associação 20 μg $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ + 12 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Outro fator importante observado na utilização do modificador 20 μg $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ sem associações, foi um aumento substancial do sinal de fundo (BG), como pode ser observado na Figura 2.

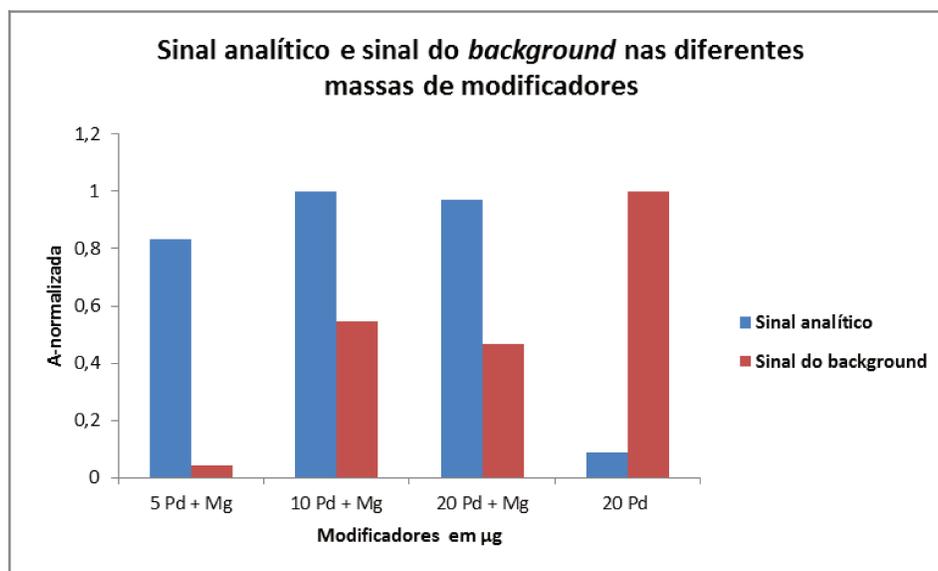


Figura 2. Sinal analítico e sinal do *background* obtidos com diferentes massas dos modificadores $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Na Tabela 5 estão descritos todos os modificadores avaliados neste estudo, comparados com aqueles sugeridos pelo fabricante do instrumento de AAS. Somente para o elemento cádmio o modificador químico selecionado foi o indicado pelo fabricante. Para os elementos Cu, Pb e As foram selecionadas massas diferentes das recomendadas, o que comprova a necessidade de um estudo mais criterioso para cada elemento com a matriz para a implantação dessas determinações na rotina de um laboratório analítico.

Tabela 5. Modificadores químicos selecionados para a análise de vinhos.

Elemento	Modificadores selecionados por este estudo	Modificadores recomendados pelo fabricante do equipamento
Cu 327,4 nm	10 µg Pd(NO ₃) ₂ + 6 µg Mg(NO ₃) ₂	5 µg Pd(NO ₃) ₂ + 3 µg Mg(NO ₃) ₂
Pb 283,3 nm	2,5 µg Pd(NO ₃) ₂ + 1,5 µg Mg(NO ₃) ₂	5 µg Pd(NO ₃) ₂ + 3 µg Mg(NO ₃) ₂
Cd 228,8 nm	50 µg NH ₂ H ₂ PO ₄ + 3 µg Mg(NO ₃) ₂	50 µg NH ₂ H ₂ PO ₄ + 3 µg Mg(NO ₃) ₂
As 197,3 nm	20 µg Pd(NO ₃) ₂ + 12 µg Mg(NO ₃) ₂	5 µg Pd(NO ₃) ₂ + 3 µg Mg(NO ₃) ₂

Avaliação do Programa Térmico

Foram necessárias duas etapas de secagem, a primeira a 110 °C, com um patamar de 50 segundos, necessário pelo aumento de volume gerado com o uso de dois modificadores co-injetados com o peróxido de hidrogênio e para a melhora da precisão das medidas, e uma segunda etapa, a 130 °C, para finalizar a secagem.

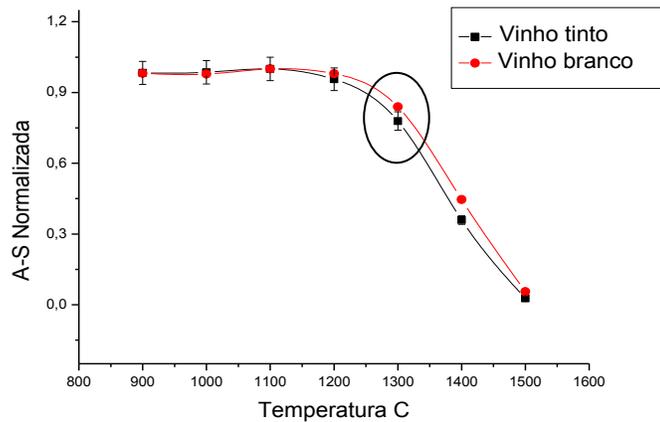
As etapas de secagem foram as mesmas para todos os elementos de interesse neste estudo. Para as etapas de pirólise e atomização foram desenvolvidos estudos individuais, que estão descritos a seguir.

Cobre

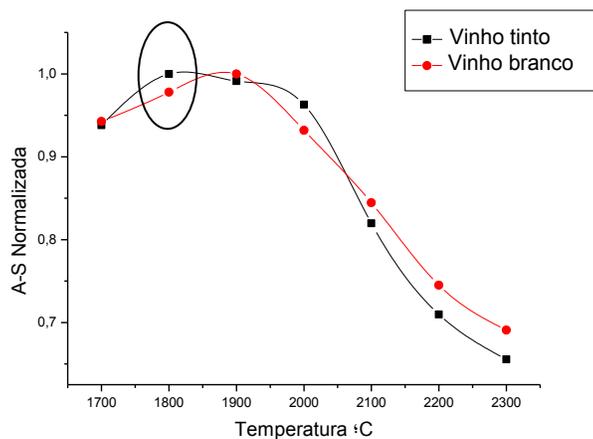
A temperatura de pirólise foi estudada na faixa de 1000 °C a 1500 °C e a de atomização, de 1700 °C a 2300 °C. O sinal do cobre manteve-se muito próximo e constante nas temperaturas de 1000 °C, 1200 °C e 1300 °C, como pode ser observado na Figura 3. Foi selecionada a temperatura de pirólise de 1300 °C, a qual favoreceu a decomposição mais eficiente da matriz e, conseqüentemente, a vida útil da plataforma. Nesse sentido, vale ressaltar que durante os testes observou-se que as grandes quantidades de resíduos carbonáceos afetam diretamente a precisão ($RSD > 10\%$) e a exatidão das determinações e diminuem também o tempo de vida do tubo de grafite.

A temperatura de atomização foi estudada no intervalo de 1700 °C à 2300 °C e os resultados foram avaliados em função da sensibilidade, do sinal analítico e do fundo e dos formatos dos picos. A temperatura de atomização maior que 1900 °C causou uma diminuição progressiva na absorbância, como pode ser observado na Figura 3. Embora os sinais para as temperaturas de 1800 °C e 1900 °C sejam semelhantes, os valores para os desvios padrão relativos e sinais de fundo foram menores para a temperatura de 1800 °C. Por esta razão, as temperaturas ótimas de pirólise e de atomização, quando associadas ao estudo dos modificadores selecionados, foram de 1300 °C e 1800 °C, respectivamente.

O comportamento térmico foi o mesmo, tanto para as amostras de vinho branco quanto para o vinho tinto como é possível observar na Figura 3.



(a)



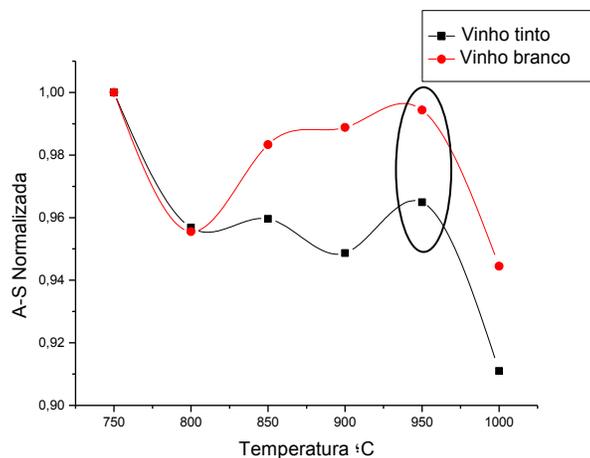
(b)

Figura 3. Gráficos de pirólise (a) e de atomização (b) dos vinhos tinto e branco, obtidos para a determinação de cobre.

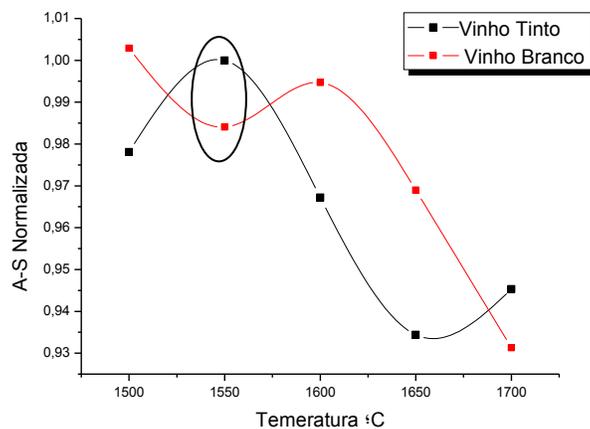
Chumbo

Foram estudadas as temperaturas de 750 °C a 1000 °C para a pirólise e de 1500 °C a 1700 °C para a atomização do chumbo. Os vinhos tinto e branco apresentaram comportamento térmico semelhante, para a pirólise, como é possível observar nas curvas de

pirólise (Figura 4). A temperatura selecionada foi de 950 °C para a etapa de pirólise, para os dois vinhos, e para a atomização foi selecionada a temperatura de 1550°C, considerando-se uma temperatura de compromisso entre os dois tipos de vinho analisados, empregando-se o modificador Pd + Mg(NO₃)₂, nas respectivas massas de 2,5 µg e 1,5 µg.



(a)



(b)

Figura 4. Gráficos de pirólise (a) e de atomização (b) dos vinhos tinto e branco, obtidos para a determinação de chumbo.

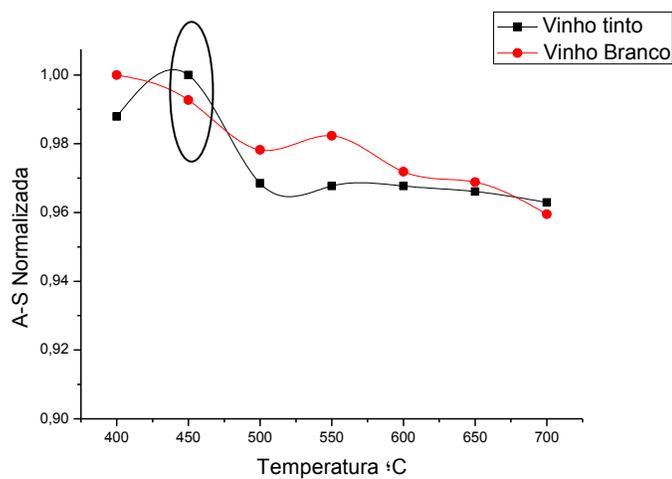
Em relação à temperatura de pirólise, observou-se que o emprego de temperaturas elevadas não necessariamente produz a eliminação completa de toda a matriz e suas interferências, mas traz alguns benefícios como foi verificado na literatura: permite a separação dos componentes voláteis da matriz; possibilita a hidrólise térmica de espécies interferentes originando outras espécies que não interferem, como por exemplo, a hidrólise de $MgCl_2$ (interferente na determinação de chumbo) a temperaturas superiores a $600^\circ C$, formando MgO (espécie que não interfere na determinação do analito); retarda a atomização do analito, até que condições mais isotérmicas possam ser alcançadas no tubo; permite uma melhor separação temporal entre o sinal analítico (AA) e o sinal de absorção de fundo (BG); minimiza as perdas convectivas dos vapores do analito durante a etapa de atomização (KRUG,2007).

Cádmio

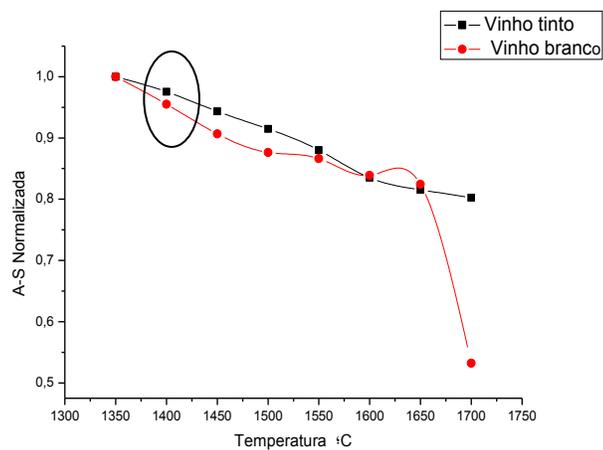
A temperatura de pirólise foi estudada na faixa de $400^\circ C$ a $700^\circ C$ e a de atomização, de $1350^\circ C$ a $1700^\circ C$, com incrementos de $50^\circ C$. Na temperatura de pirólise de $450^\circ C$, foi observado um maior sinal analítico (0,0956) e menor desvio padrão relativo (0,64%), favorecendo assim uma completa calcinação e a preservação da plataforma. O sinal analítico começou a diminuir a partir da temperatura de $550^\circ C$ (0,0936) com uma tendência a estabilização do sinal, como pode ser observado na Figura 5. Quanto à temperatura de atomização, a mesma foi estudada no intervalo de $1350^\circ C$ a $1700^\circ C$ e os resultados foram avaliados em função da sensibilidade, do sinal analítico, do sinal de fundo (*background*) e do perfil dos picos. A temperatura de atomização maior que $1450^\circ C$

causou uma diminuição progressiva no sinal analítico, como pode ser observada na Figura 5. Embora os sinais para as temperaturas de 1400 °C e 1450 °C apresentaram-se semelhantes, os valores para os desvios padrão relativos e os sinais de fundo foram menores para a temperatura de 1400 °C. Por esta razão, as temperaturas ótimas de pirólise e de atomização, quando associadas ao estudo dos modificadores selecionados, foram de 450 °C e 1400 °C, respectivamente. Essas temperaturas são mais baixas que as encontradas para os outros elementos, devido à volatilidade do cádmio.

O comportamento térmico foi o mesmo, tanto para as amostras de vinho branco quanto para o vinho tinto, como é possível observar na Figura 5.



(a)

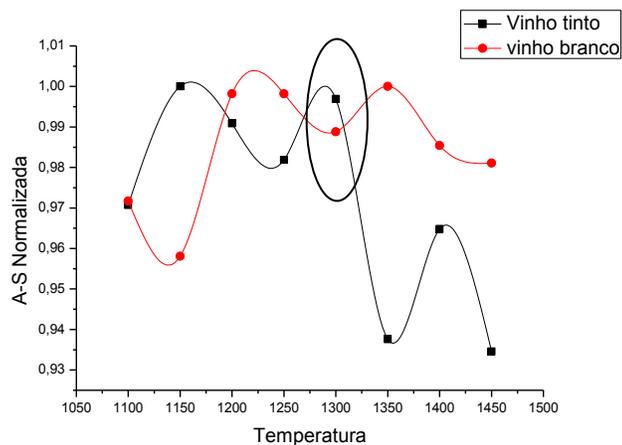


(b)

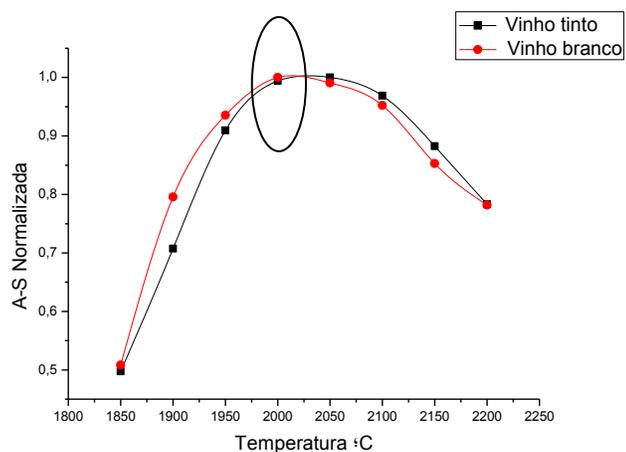
Figura 5. Gráficos de pirólise (a) e de atomização (b) dos vinhos tinto e branco, obtidos para a determinação de cádmio.

Arsênio

Foram estudadas as temperaturas de 1100 °C a 1400 °C, para a etapa de pirólise, e de 1850 °C a 2200 °C para a atomização, com incrementos de 50 °C. Os vinhos tinto e branco apresentaram um comportamento térmico diferente, como é possível observar nas curvas de pirólise e um perfil de atomização bem parecidos (Figura 6). A temperatura de escolha para pirólise foi 1300 °C considerando ser uma temperatura de compromisso que atende os dois tipos de vinho e a de atomização foi de 2000 °C, para os dois vinhos.



(a)



(b)

Figura 6. Gráficos de pirólise (a) e de atomização (b) dos vinhos tinto e branco, obtidos para a determinação de arsênio.

Os programas térmicos otimizados para cada elemento estão dispostos na Tabela 6, apresentada a seguir:

Tabela 6. Programa de aquecimento otimizado para os elementos cobre, chumbo, cádmio e arsênio, para a análise de vinhos.

Etapa	Temperatura (°C)				Rampa (s)	Sustentação (s)	Vazão de Ar (mL min ⁻¹)
	Cu	Pb	Cd	As			
Secagem 1	110	110	110	110	10	50	250
Secagem 2	130	130	130	130	15	20	250
Pirólise	1300	950	450	1300	10	30	250
Atomização	1800	1550	1400	2000	0	4	0
Limpeza	2450	2450	2450	2450	1	4	250

O principal objetivo do processo de validação é demonstrar que o método analítico é adequado para os seus propósitos, sendo muito importante principalmente quando o método é utilizado para a quantificação de analitos ao nível de traços. A validação é expressa em parâmetros analíticos e é comprovada por ensaio de laboratório e tratamento estatístico dos dados (EURACHEM, 1998). A seguir, cada um desses parâmetros estão discutidos, separadamente.

Validação do método

Curva analítica de calibração/Linearidade

Foram realizadas avaliações visuais do comportamento dos resultados do gráfico da concentração do analito versus as respostas medidas (absorbância integrada). As curvas analíticas apresentaram-se lineares com os R^2 (coeficientes lineares) próximos a 0,999 como pode ser observado nas Figuras de 7 a 10.

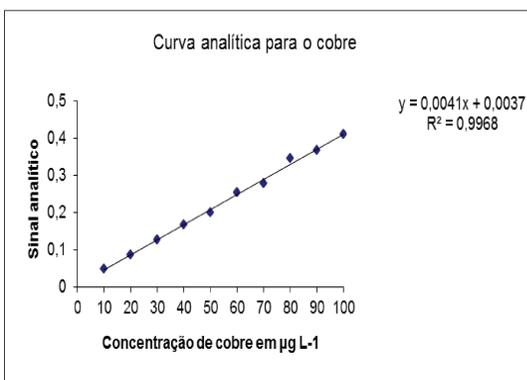


Figura 7. Curva analítica para cobre.

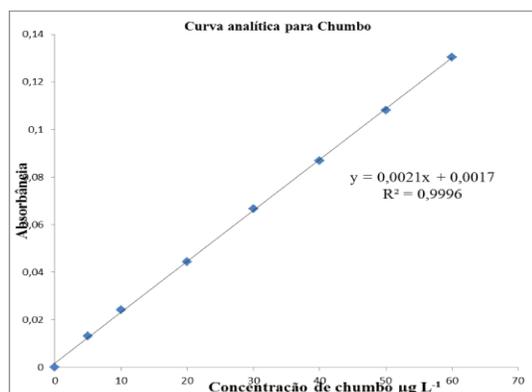


Figura 8. Curva analítica para chumbo.

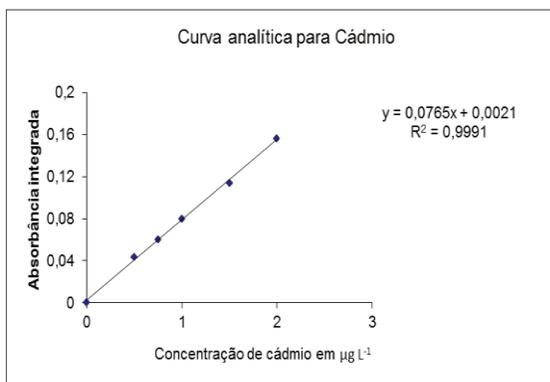


Figura 9. Curva analítica para cádmio.

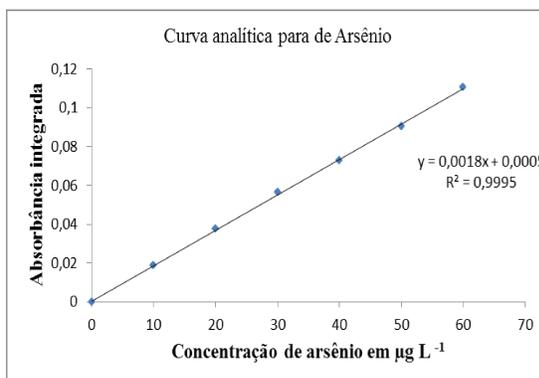


Figura 10. Curva analítica para arsênio.

Para o estudo da linearidade também foram obtidos gráficos, dividindo o sinal analítico de cada elemento pelas suas respectivas concentrações obtendo as respostas relativas, eixo y, enquanto as concentrações correspondentes em escala logarítmica foram plotadas no eixo x (Figura 11). A linha obtida apresentou-se linear sobre toda a faixa, portanto, é possível concluir que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha 95% e 105% (RIBANI, 2004).

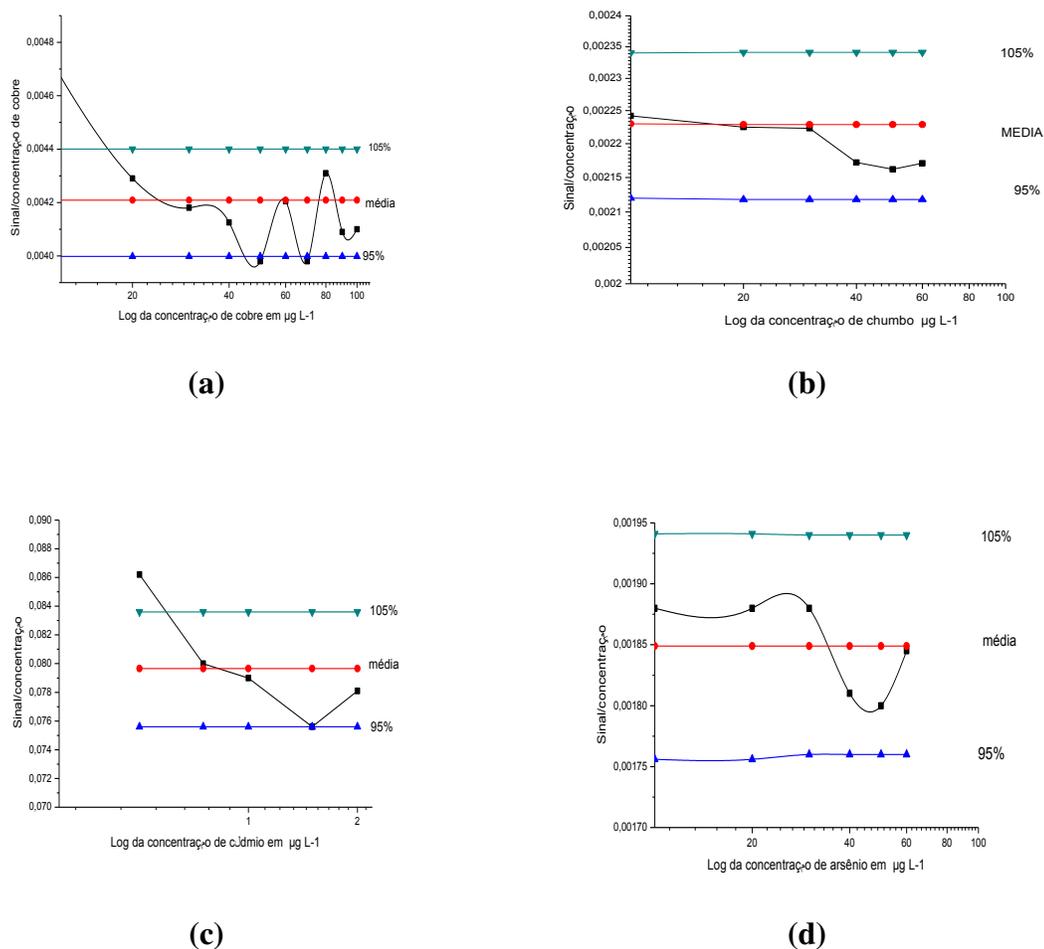


Figura 11. Determinação gráfica das curvas de linearidade através do gráfico da razão sinal/concentração versus Concentração, em escala logarítmica, para cobre (a), chumbo (b), cádmio (c) e arsênio (d).

Seletividade

As curvas com adição de analito nos vinhos tinto e branco e a curva aquosa foram então comparadas quanto a sua inclinação e se apresentaram paralelas, indicando que a matriz não estava interferindo na determinação do elemento, conforme figuras abaixo (Figura 12).

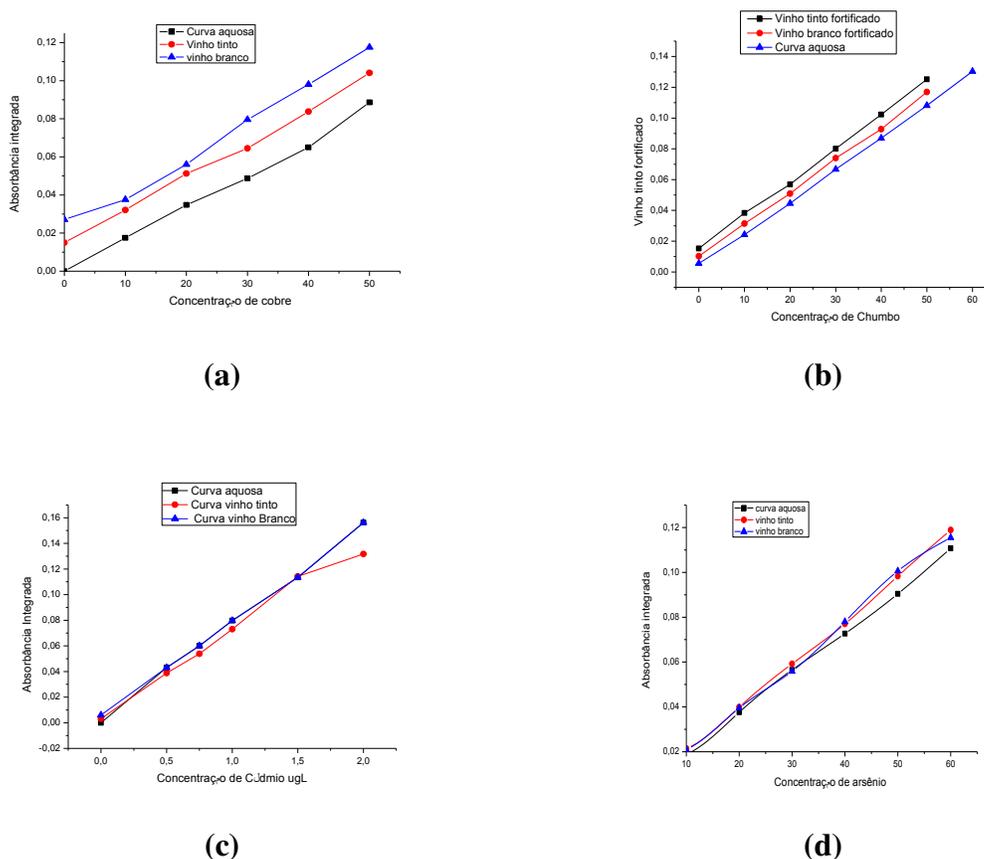


Figura 12. Curvas aquosa e com adição de padrão nas matrizes de vinho branco e tinto para os elementos cobre (a), chumbo (b), cádmio (c) e arsênio (d).

Avaliando estatisticamente os valores obtidos para a inclinação das curvas aquosas e das curvas com a matriz de vinhos tinto e branco, podemos dizer que não houve diferença

significativa entre a precisão dos valores de inclinação avaliados, sendo que os $F_{2,2}$ calculados foram de 6,0; 7,0; 4,9 e 1 e comparados com $F_{2,2}$ tabelado igual a 39 (Miller & Miller, 2005), indicando que não existem diferenças nas variâncias das medidas para 95% de confiança para os elementos Cu, Pb, Cd e As. Os valores de t calculado para cobre, chumbo, cádmio e arsênio foram respectivamente 0; 1; 1,20 e 1,22, portanto, com p-valores de (0,47, 0,25 0,29 e 0,28) maiores que 0,05, indicando que não existem diferenças significativas entre as médias dos grupos estudados. Todas as curvas estudadas apresentaram o coeficiente linear (R) > 0,99, indicando boa linearidade o que pode ser observado nas Tabelas (7 a 10) relacionadas abaixo.

Tabela 7. Comparação dos *slopes* das curvas aquosas com os das curvas com adição de padrão para o elemento cobre.

Curva de calibração em solução aquosa em HNO ₃ a 0,2%		Curva com adição de padrão nos vinhos tinto e branco	
<i>Slope</i>	R ²	<i>Slope</i>	R ²
0,0021	0,9998	0,0022 (Vinho tinto)	0,9992
0,0019	0,9999	0,0021 (Vinho tinto)	0,9991
0,0021	0,9988	0,0018 (Vinho branco)	0,9979

t tabelado $(0,05; 2) = 4,30$ * amostras diluídas 1:3 e adicionadas de padrão de cobre

Tabela 8. Comparação dos *slopes* das curvas aquosas com aqueles das curvas com adição de padrão para o elemento chumbo.

Curva de calibração em solução aquosa em HNO ₃ a 0,2%		Curva com adição de padrão nos vinhos tinto e branco	
<i>Slope</i>	R ²	<i>Slope</i>	R ²
0,0018	0,9998	0,0022 (Vinho tinto)	0,9992
0,0019	0,9999	0,0017(Vinho tinto)	0,9991
0,0017	0,9988	0,0018 (Vinho branco)	0,9979

t tabelado $(0,05; 2) = 4,30$ * amostras diluídas 1:3 adicionadas de padrão de chumbo.

Tabela 9. Comparação dos *slopes* das curvas aquosas com os das curvas com adição de padrão para o elemento cádmio.

Curva de calibração em solução aquosa em HNO ₃ a 0,2%		Curva com adição de padrão nos vinhos tinto e branco	
<i>Slope</i>	R ²	<i>Slope</i>	R ²
0,076	0,999	0,073 (Vinho tinto)	0,996
0,072	0,999	0,075 (Vinho tinto)	0,997
0,079	0,999	0,070 (Vinho branco)	0,991

t_(0,05; 2) = 4,30 * amostras diluídas 1:3 adicionadas de padrão de cádmio

Tabela 10. Comparação dos *slopes* das curvas aquosas com os *slopes* das curvas com adição de padrão para o elemento arsênio.

Curva de calibração em solução aquosa em HNO ₃ a 0,2%		Curva com adição de padrão nos vinhos tinto e branco	
<i>Slope</i>	R ²	<i>Slope</i>	R ²
0,0019	0,999	0,0018 (Vinho tinto)	0,997
0,0018	0,997	0,0019 (Vinho tinto)	0,999
0,0017	0,999	0,002 (Vinho branco)	0,997

t_(0,05; 2) = 4,30 * amostras diluídas 1:3 adicionadas de padrão de arsênio

Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores de LOD, LOQ e a faixa de linearidade estão representados na Tabela 11.

Tabela 11. Figuras de mérito obtidas após validação dos métodos para a análise de vinhos.

Elemento	LOD	LOQ	Linearidade
Cobre	3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	11,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	10 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$
Chumbo	0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	5 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$
Cádmio	0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$
Arsênio	1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	10 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$

LOD: limite de detecção do método; **LOQ:** limite de quantificação do método.

Comparando os valores obtidos para os LOD dos métodos desenvolvidos com alguns citados na literatura, podemos dizer que os valores determinados neste trabalho foram menores ou bem próximos daqueles obtidos por outros autores, evidenciando uma boa condição para a análise de traços (Tabela 12).

Tabela 12. Comparação entre os limites de detecção dos métodos obtidos no presente trabalho com os publicados na literatura.

Trabalhos da literatura				Presente trabalho		
Referências	Elemento	Modificador	LOD	Elemento	Modificador	LOD
Cvetkovic (2004)	As	Pd(NO ₃)	5 µg L⁻¹	As	20 µg Pd + 12 µg Mg(NO ₃) ₂	1,5 µg L⁻¹
Bruno (1994)	As	Pd(NO ₃)	6,6 µg L⁻¹			
Jaganathan (1997)	Cd	Pd (NO ₃) + HNO ₃	0,03 µg L⁻¹	Cd	50 µg NH ₂ H ₂ PO ₄ + 3 µg Mg(NO ₃) ₂	0,06 µg L⁻¹
Cvetkovic (2006)	Cd	Pd(NO ₃)	0,08 µg L⁻¹			
Almeida (1994)	Cu	Sem modificador	5,75 µg L⁻¹	Cu	10 µg Pd +6 µg Mg(NO ₃) ₂	3,5 µg L⁻¹
Catarino (2005)	Cu	Pd (NO ₃) + Mg(NO ₃)	5µg L⁻¹			
Fernandes (2002)	Pb	Pd (NO ₃) + Mg(NO ₃)	0,9 µg L⁻¹	Pb	2,5 µg Pd +1,5 µg Mg(NO ₃) ₂	0,8 µg L⁻¹
Matthews (1993)	Pb	NH ₄ H ₂ PO ₄ + Mg(NO ₃)	6,2 µg L⁻¹			

LOD: limite de detecção do método[]

Exatidão

Amostras de vinho tinto e de vinho branco, fortificadas com solução aquosa dos analitos, mostraram recuperações quantitativas para cobre (tinto 97%, branco 109 %, Tabela 13); chumbo (tinto 101%, branco 99%, Tabela 14), cádmio (tinto 102%, branco 103%, Tabela 15) e arsênio (tinto 106%, branco 107%, Tabela 16), respectivamente. A exatidão do método foi satisfatória para todos os elementos estudados (Tabela 17) e em acordo com a qualidade requerida dos resultados analíticos, conforme recomendação da AOAC (2002), representada na Tabela 18.

Tabela 13. Recuperação estimada dos vinhos em 5 níveis de concentração para o elemento cobre.

Vinho Tinto			Vinho Branco		
Concentração	Recup. %	CV %	Concentração	Recup. %	CV %
10 $\mu\text{g L}^{-1}$	96,7	2,8	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	106,0	9,8
20 $\mu\text{g L}^{-1}$	91,7	0,8	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	109,4	5,0
30 $\mu\text{g L}^{-1}$	99,3	12,2	30 $\mu\text{g L}^{-1}$	98,5	3,5
40 $\mu\text{g L}^{-1}$	93,7	11,7	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	102,7	1,7
50 $\mu\text{g L}^{-1}$	103,1	9,3	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	105,5	2,1

Tabela 14. Recuperação estimada dos vinhos em 5 níveis de concentração para o elemento chumbo.

Vinho Tinto			Vinho Branco		
Concentração	Recup.%	CV%	Concentração	Recup. %	CV%
5 $\mu\text{g L}^{-1}$	104	2,5	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	98	1,3
10 $\mu\text{g L}^{-1}$	107	4,6	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	99	2,1
20 $\mu\text{g L}^{-1}$	97	1,3	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	95	0,1
30 $\mu\text{g L}^{-1}$	100	0,3	30 $\mu\text{g L}^{-1}$	99	1,5
40 $\mu\text{g L}^{-1}$	101	1,3	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	96	1,1
50 $\mu\text{g L}^{-1}$	102	1,8	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	101	2,9

Tabela 15. Recuperação estimada dos vinhos em 5 níveis de concentração para o elemento cádmio.

Vinho Tinto			Vinho Branco		
Concentração	Recup. %	CV%	Concentração	Recup. %	CV%
0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	98	0,2	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	106	0,4
0,75 $\mu\text{g L}^{-1}$	93	4,0	0,75 $\mu\text{g L}^{-1}$	98	0,3
1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	96	2,6	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	103	0,7
1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	102	3,1	1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	100	1,4
2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	89	5,2	2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	99	2,4

Tabela 16. Recuperação estimada de arsênio nos vinhos em 5 níveis de concentração para o elemento arsênio.

Vinho Tinto			Vinho Branco		
Concentração	Recup. %	CV%	Concentração	Recup. %	CV%
10 $\mu\text{g L}^{-1}$	106	1,2	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	99	2,6
20 $\mu\text{g L}^{-1}$	103	0,7	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	103	0,4
30 $\mu\text{g L}^{-1}$	104	0,9	30 $\mu\text{g L}^{-1}$	99	3,7
40 $\mu\text{g L}^{-1}$	103	0,8	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	105	0,5
50 $\mu\text{g L}^{-1}$	105	1,3	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	107	0,7
60 $\mu\text{g L}^{-1}$	106	0,7	60 $\mu\text{g L}^{-1}$	104	3,7

Tabela 17. Recuperação em 5 níveis de concentração dos vinhos tinto e branco e coeficientes de variação.

Elemento	Recuperação		Coeficiente de variação	
	Vinho tinto %	Vinho branco %	Vinho tinto %	Vinho branco %
Cobre 10 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$	92 a 103	98 a 106	0,8 a 12	1,7 a 9,8
Chumbo 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$	97 a 107	95 a 101	0,3 a 4,6	0,1 a 2,9
Cádmio 0,5 a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	89 a 102	99 a 106	3,1 a 5,2	0,3 a 0,4
Arsênio 10 a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$	103 a 106	99 a 107	0,8 a 1,3	0,4 a 3,7

Considerando a recomendação da AOAC (2002, representada na Tabela 18), podemos observar através do resumo mostrado na Tabela 17, que todos os elementos apresentaram uma porcentagem de recuperação dentro do esperado e satisfatória para os métodos propostos.

Tabela 18. Critérios de aceitação da Recuperação segundo AOAC.

Concentração do analito	Recuperação (%)
100%	98-101
10%	95-102
1%	92-105
0,1%	90-108
0,01%	85-110
10 ppm	80-115
1ppm	75-120
10 ppb	70-125
1 ppb	65-125

Fonte: Modificado de AOAC (2002) – Guidelines for single laboratory

Comparação da determinação dos elementos após digestão por via úmida e diluição direta

Analisando estatisticamente os valores descritos na Tabela 19, é possível afirmar que não houve diferença significativa nas médias das medidas entre os grupos que foram tratados por digestão por via úmida em bloco digestor e as que foram somente diluídas. Os valores de t calculado obtidos foram menores que o $t_{(2,2)}$ tabelado (4,30) para um nível de confiança de 95%: para o cobre, nos vinhos tinto e branco (t calculado 0 e 2,31); para o chumbo nos vinhos tinto e branco (t calculado 0,64 e 0,80), para o cádmio nos vinhos tinto e branco (t calculado 0 e 1,35) e arsênio nos vinhos tinto e branco (t calculado 0,98 e 0,64). Todos os p-valores obtidos foram maiores que 0,05 (nível de confiança de 95%). É possível concluir também que não existe diferença significativa na precisão das medidas

para o cobre, chumbo, cádmio e arsênio, obtendo-se o $F_{2,2 (95\%)}$, calculado respectivamente para os vinhos tintos e brancos (7,45 e 4,84); (1,49 e 32,0); (22,7 e 1,74) e (4,02 e 2,71), quando comparados com $F_{2,2 (95\%)}$ tabelado igual a 39 (MILLER & MILLER, 2005), e valores de p-valores maiores que 0,05 em todos os casos. Observa-se, porém, que os valores encontrados para o cádmio estão abaixo do LOQ e muito próximos do LOD, representando, assim, apenas uma estimativa da concentração. Entretanto, os valores obtidos são semelhantes, considerando os dois procedimentos avaliados para o tratamento das amostras, tanto para o vinho tinto como para o branco.

Sendo assim, pode-se verificar uma boa concordância entre as medidas para os diferentes analitos determinados, sob diferentes condições de preparo da amostra, o que ressalta a exatidão da metodologia proposta.

Tabela 19. Determinação de Cu, Pb, As e Cd através da diluição direta e após digestão via úmida.

Elementos	Diluição ácida (1:3)		Digestão Via Úmida (bloco digestor)	
	Tinto ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Branco ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tinto ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Branco ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cu	48,4 ± 1,0	37,8 ± 0,6	44,83 ± 2,9	34,6 ± 1,4
Pb	14,8 ± 3,6	13,62 ± 0,9	14,43 ± 3,0	13,2 ± 0,01
As	5,18 ± 0,3	5,27 ± 0,4	4,82 ± 0,6	5,10 ± 0,3
Cd	0,20 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,08 ± 0,01

Conclusão

Os métodos estudados apresentaram-se adequados quanto à sensibilidade, precisão e exatidão para a determinação de baixas concentrações de cobre, chumbo, cádmio e arsênio em vinhos brasileiros.

O uso do peróxido de hidrogênio co-injetado com os modificadores químicos auxiliou na preservação da plataforma de L'vov, que em condições otimizadas pôde ser usada para aproximadamente 450 queimas, ou seja, levando a uma durabilidade de cada unidade do forno de grafite em torno de 450 leituras. O uso dos modificadores químicos foi necessário para garantir uma boa exatidão e contribuiu principalmente com o aumento e a qualidade do sinal analítico para todos os elementos estudados.

O preparo simples e rápido da amostra através da diluição ácida, juntamente com o peróxido de hidrogênio, foi adequado para preservar a plataforma e também contribuiu de forma significativa para diminuir os efeitos de matriz. Este estudo também mostrou que é possível preparar as amostras com até 48 horas de antecedência da leitura no equipamento de absorção atômica, sem alteração significativa dos resultados.

Referências bibliográficas

AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; SUSKÓ, E. K; MEZEI, P.; GYÖRGY, K.; BENCS, L. Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content. **Talanta**. v.76, p.627-634, 2008.

ALMEIDA, A.; CARDOSO, M.I.; LIMA, J.L.F.C. Determination of cooper in port-wine and Madeira wine by eletrothermal atomization, AAS. **Atomic Spectroscopy**. v. 15, p. 73-77, 1994.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Guia para Qualidade em Química Analítica**. v. 1, p. 42-50, 2006.

AOAC – Association of Official Agricultural Chemists. **Guidelines for Single Laboratory**, 2002 .

BERTELLI, A.E. Wine, research and cardiovascular disease: Instructions for use. **Atherosclerosis**. v.195, p.242-247, 2007.

BRUNO, S.N.F.; CAMPOS, R.C.; CURTIUS, A.J. Determination of lead and arsenic in wines by electrothermal atomic absorptions spectrometry. **Journal of Analitical Atomic Spectrometry**. v. 9, p. 341-344,1994.

CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S; BRUNO DE SOUSA, R. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. **Ciência Técnica e Vitivinícola**. v. 23, n.1, p.3-19, 2008.

CATARINO, S.; PIMENTEL, I.; CURVELO-GARCIA, A. S. Determination of copper in wine by ETAAS using conventional and fast thermal programs: Validation of analytical method. **Atomic Spectroscopy**. v. 26, p. 73-78, 2005.

CE – European Commission; Official **Journal of the European Communities**, D 657,12/08/2002.

CVETKOVIC, J.; ARPADJAN, S.; KARADJOVA, I.; STAFILOV, T. On the problems of the ETAAS determination of arsenic in wine. **Annual University of Sofia, Faculty of Chemistry**. v. 96, p.173-178, 2004.

CVETKOVIC, J.; ARPADJAN, S.; KARADJOVA, I.; STAFILOV, T. Determination of cadmium in Macedonian wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Acta Pharmaceutica**. v. 56, p. 69-77, 2006.

EURACHEM GUIDE: The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method Validation and related topics, 1st edition, **Eurachem**, Dec, 1998.

FERNANDES, K.G.; MORAES, M.; NETO, J.A.G.; NOBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. Evaluation and application of bismuth as an internal standard for the determination of lead in wines by simultaneous electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analyst**. v. 127, p. 157-162, 2002.

FRESCHI, G. P. G.; DAKUZAKU, C. S.; MORAES, M.; NOBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A. Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. Analytical note. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 56, p.1987-1993, 2001.

FROES, R.E.S.; WINDMÖLLER, C.C.; SILVA, J.B.B. Emprego da modificação química permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. **Revista Analytica**. v. 23, p. 32-43, 2006.

HUSÁKOVÁ, L.; CERNOHORSKÝ C.; SRÁMKOVÁ, J. Direct determination of arsenic in beer by electrothermal atomic absorption spectrometry with deuterium background correction (D₂-ET- AAS). **Food Chemistry**. v. 105, p.286-292, 2007.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGRE-008, 2010 – Revisão 3- **Orientação sobre Validação de Métodos de Analíticos**.

JAGANATHAN, J.; REISIG, A.L.; DUGAR, S.M. Determination of cadmium in wines using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman background correction. **Microchimical Journal**. v. 56, p.221-228, 1997.

JOHNSON, H. **The story of wine**. London: Mitchel Beazly, 1989, 480 p.

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de Absorção atômica - Atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Apostila**, parte 2, p.1-33, CENA/USP, 2007.

LIMA, E. C.; KRUG, F. J.; JACKSON, K. W. "Evaluation of tungsten-rhodium coating on an integrated platform as a permanent chemical modifier for cadmium, lead and selenium determination by electrothermal atomic absorption spectrometry". **Spectrochimica Acta, Part B**. v.53, p. 1791-1804, 1998.

MATTHEWS, M.R.; PARSONS, P.J. A simple method for the determination of lead in wine using Zeeman electrothermal atomization atomic-absorption spectrometry. **Atomic Spectroscopy**. v.14, p. 41-46, 1993.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Statistics and chemometric for analytical Chemistry. England: Perason Education Limited, 2005, 268p.

OSHITA, D; OLIVEIRA, P; GOMES NETO, J. A; MORAES, M. Determinação direta e simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em cachaça por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, **Eclética Química**. v. 28, nº 1, p. 91-96, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, nº 5. p. 771-780, 2004.

STAFILOV, T.; KARADJOVA, I. Atomic absorption spectrometry in wine analysis - review. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**. v.28, n.1, p.17-31, 2009.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**. V. 74, n.5, p. 835-855, 2002.

TSALEV, D.L.; SLAVEYKOVA, V.I. Chemical modification in electrothermal atomic absorption spectrometry. Organization and classification of data by multivariate methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v.7, p. 147-153, 1992.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption Spectrometry**, 3th ed., Weinheim: Wiley-VCH, 1999. 941p.

Capítulo 3

Determinação de As, Cd, Cu e Pb e polifenóis totais em vinhos brasileiros

Determinação de As, Cd, Cu e Pb e de polifenóis totais em vinhos brasileiros

RESUMO

A partir dos anos 90 o consumo de vinhos no Brasil aumentou cerca de 20% e sua comercialização vem se difundindo, principalmente, pelo aumento da oferta, da produção e pelos benefícios à saúde que lhe são atribuídos. O vinho é a bebida alcoólica mais antiga e tradicional produzida e consumida pela humanidade. É definida pela legislação brasileira como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. Essa denominação é privativa deste produto, sendo vedada a sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias primas. O consumo diário de vinhos em quantidades moderadas contribui significativamente para as exigências do organismo com relação a alguns elementos essenciais. Por outro lado, muitos elementos que são conhecidos pela sua potencialidade tóxica como Pb, Cd, e As, podem estar presentes nesses vinhos. Logo, a determinação de elementos traço nos vinhos é de grande importância para o controle da qualidade, autenticidade, biodisponibilidade de metais e estudo da toxicidade, visando garantir a segurança alimentar para os consumidores. A importância dos compostos fenólicos, no vinho, reside no fato de estes contribuírem para a cor, para a adstringência, e para o aroma. São também conhecidos por suas propriedades antioxidantes e de prevenção de doenças cardiovasculares. Neste trabalho, foram analisadas 45 amostras de vinhos nacionais adquiridos no comércio de Campinas/SP. Deste total, 18 (40%) eram vinhos finos, 18 (40%) vinhos de mesa e 9 (20%) espumantes. Quanto a região de produção, 25 (56 %) eram do Rio Grande do Sul, 8 (18%) de São Paulo, 6 (13%) de Minas Gerais, 3 (7%) do Pernambuco, 2 (4%) da Bahia e 1 (2%) do Paraná. Foram determinados os teores de As, Cd, Cu e Pb nas amostras de vinho por GF AAS e os valores encontrados estavam abaixo dos teores máximos estabelecidos pela legislação brasileira. Apenas uma amostra de vinho fino apresentou, para o cobre, teor acima do valor preconizado pela OIV, o que pode prejudicar as características sensoriais deste produto. Foram calculadas as contribuições dos vinhos estudados na dieta semanal de um adulto, com relação a ingesta dos elementos As, Cd, Cu e Pb e os valores demonstraram que os vinhos estudados apresentaram baixa contribuição: 0,93% para o cobre, 0,46% para o cádmio, 6,8 µg para o chumbo e 2,63% para o arsênio. Com relação aos valores de pH e aos teores de polifenóis totais as amostras apresentaram valores compatíveis com os relatados na literatura, em que os valores médios para polifenóis é de 2046,0 mg L⁻¹ para vinhos de mesa, 1443,0 mg L⁻¹ para vinhos finos e 1606,0 mg L⁻¹ para os espumantes. Os valores de pH variaram de 2,8 a 3,8 entre os vinhos. Os resultados obtidos com a análise de PCA, a variável mais importante que separou os vinhos de mesa foi os polifenóis totais, as variáveis (grau alcoólico) e pH foram as responsáveis pela separação dos vinhos finos. Os vinhos espumantes sofreram maior influência dos metais, que foram os responsáveis pela dispersão destas amostras. Também foi possível distinguir a variedade de uva híbrida americana das demais. Observamos, no entanto, que não foi possível distinguir um padrão de vinho em diferentes estados usando as variáveis estudadas.

Palavras chave: vinho, elementos inorgânicos, polifenóis totais, pH

Determination of As, Cd, Cu and Pb and total polyphenols in Brazilian wines

ABSTRACT

In the 90's wine consumption in Brazil increased in 20% and its sales have been disseminating mainly due to offer and production increase, and to health benefits attributed to it. Wine is the oldest and most traditional alcoholic beverage consumed by human beings. It is defined in legislation as a beverage resulted from alcoholic fermentation of a simple must of fresh ripe whole grape. This denomination is particular to this product, and its use is forbidden to any other product obtained from any different raw material. Daily consumption of wine in moderate amounts significantly contributes to body demands regarding some essential elements. On the other hand, many elements which are known for their toxic potential, such as Pb, Cd and As, may be present in wine. Therefore, the analysis of trace elements in wine is of great importance for quality control, authenticity, bioavailability of metal and toxicity study, aiming at granting safety to consumers. The importance of phenolic compounds in wine lies in the fact that they contribute to its color, astringency and scent. These compounds are also known for their antioxidant properties and cardiovascular diseases prevention. Brazilian wines, about 45 samples from Campinas/SP local market have been analyzed. Among them, 18 were fine wine, 18 were table wine and 9 were sparkling wine. Concerning the production area, 56% were from Rio Grande do Sul, 18% from São Paulo, 13% from Minas Gerais, 7% from Pernambuco, 4% from Bahia and 2% from Paraná. Contents of As, Cd, Cu and Pb have been determined in the wine samples through GF AAS and the analyte levels found were below the ones established by the Brazilian legislation. Only one sample of fine wine presented content above the one determined by OIV for copper, it this may harm the sensorial characteristics of the product. The studied wines contributions to the weekly diet of an adult have been accounted for, in relation to the ingestion of elements As, Cd, Cu and Pb and the amounts have shown that the studied wines present low contribution: 0,93% for Cu, 0,46% for Cd, 06,8 μg for Pb and 2,63% for As. Concerning pH amounts and total polyphenols contents, the samples presented compatible figures to the ones reported in the literature, with average rates for polyphenol in table wines at 2046,0 mg L^{-1} , fine wines 1443,0 mg L^{-1} and sparkling 1606,0 mg L^{-1} . The pH rates varied from 2,8 to 3,8 among wines. The results obtained with the PCA analysis, the most important variable that separated the table wine was the total polyphenol. The alcohol content and pH variables were responsible for the separation of fine wines. Sparkling wines have suffered great influence and metals were responsible for the dispersion of the samples. It was also possible to separate the American hybrid grape variety from the others. We note however, that it was not possible to separate a pattern of different wines using state variables .

Key words: wine, polyphenols, pH, inorganic elements

Capítulo 3

Introdução

A vitivinicultura brasileira tem apresentado crescimento significativo nos últimos anos, decorrente da vigorosa expansão da área cultivada e da tecnologia de produção de uvas e de elaboração de vinhos. Merece destaque a difusão da produção de uvas e vinhos, além de outros derivados, para regiões emergentes em diversas regiões do Brasil, desde a metade Sul do Rio Grande do Sul até a região Nordeste, passando por polos de importância crescente nos estados de Santa Catarina, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Goiás (GUERRA, 2009).

Na última década o consumo de vinhos no Brasil aumentou cerca de 20% e sua comercialização vem se difundindo principalmente pelo aumento da oferta, da produção e pelos benefícios à saúde que lhe são atribuídos.

O vinho é a bebida alcoólica mais antiga e tradicional produzida e consumida pela humanidade. É definida por legislação como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. Essa denominação é privativa deste produto, sendo vedada a sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias primas (BRASIL, 1988). A produção de vinhos no Brasil se divide em vinhos finos produzidos por uvas de origem *Vitis vinifera* e de vinhos comuns produzidos por uvas americanas ou híbridas. O consumo de vinhos comuns corresponde a 80% da produção do Brasil (GUERRA, 2003).

Quanto à elaboração, os vinhos podem ser classificados como vinho branco, tinto, rose e espumantes. Os vinhos brancos são geralmente elaborados a partir de uvas brancas,

mas também podem ser produzidos com uvas rosadas e tintas. Para isso, é necessário separar imediatamente a fase líquida da sólida, que contém os pigmentos responsáveis pela cor (MIOLO, 1999).

O vinho tinto é elaborado a partir de uvas tinta, pois é da película que, durante a maceração, são extraídas as antocianinas e os taninos. Estes compostos fenólicos conferem ao vinho cor, estrutura, “corpo” e originalidade.

O vinho rose propriamente dito é elaborado a partir de uva tinta, porém, alguns produtores utilizam-se da mistura de uvas tinta e branca, ou ainda do corte (assemblages) de vinhos tinto e branco após serem elaborados separadamente.

Para os espumantes existem três principais processos de elaboração: o método Champenoise, também chamado de tradicional ou clássico, onde a fermentação ocorre na garrafa; o método Charmat, caracterizado por uma segunda fermentação a ser realizada em tanques de inox, ao invés de na própria garrafa; o método Asti, que surgiu na Itália, e que no Brasil começa a ser denominado de moscatel espumante. Este produto, ao contrário de outros espumantes elaborados com duas fermentações, é submetido a uma fermentação parcial (MIOLO, 1999).

A composição do vinho é influenciada por muitos fatores relacionados à área de produção específica como o solo, os diversos tipos de variedades, o clima e as práticas de viticultura.

O consumo diário de vinhos em quantidades moderadas contribuem significativamente para as exigências do organismo com relação aos elementos essenciais, como K, Ca, Mg, Cr, Fe, I, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, Zn. Por outro lado, muitos elementos como

Pb, Cd e o As, são conhecidos pela sua potencialidade tóxica e também podem estar presentes nesses vinhos (LARA, *et al.*, 2005).

A determinação de elementos traço nos vinhos é de grande importância para o controle da qualidade, autenticidade, biodisponibilidade de metais e estudo da toxicidade, visando garantir a segurança alimentar para os consumidores.

pH no vinho

Os vinhos são constituídos por uma mistura de ácidos fracos (ácido tartárico, cítrico, malático, fosfórico, entre muitos outros) que, em maior ou menor extensão, dependendo do pKa, se encontram dissociados na forma de sais. A proporção de sais formados no vinho depende também da origem geográfica, da variedade da uva, da maneira como as vinhas são tratadas e, evidentemente, de todo o processo de fabricação do próprio vinho.

Devido à sua composição, tanto os mostos como os vinhos apresentam propriedades tampão. Esta propriedade explica as variações mínimas de pH no mosto durante a fermentação alcoólica e malolática. A solubilidade dos compostos responsáveis pelas casses cúpricas e férricas (fenômeno de turvação ou precipitação causado pela presença do excesso de cobre e proteínas em ambiente redutor) depende de valores de pH baixos mas, por outro lado, um valor baixo de pH diminui a dissociação dos complexos metálicos formados com os ácidos orgânicos. Deste modo, o pH tem influência direta tanto nas casses como na precipitação do bitartarato de potássio (REIS, 2007).

Quanto mais baixo for o pH maior é a fração de dióxido de enxofre livre dissolvido e volátil e, conseqüentemente, maior é o poder anti-séptico e o odor que este composto confere ao vinho (REIS,2007).

Polifenóis nos vinhos

Os polifenóis totais correspondem ao conjunto de todos os compostos fenólicos do vinho.

A composição de polifenóis em vinhos varia de acordo com vários fatores, como técnicas de vinificação, condições de armazenamento dos vinhos e reações que podem ocorrer entre as diferentes moléculas, como condensação, polimerização e oxidação (GONZÁLEZ-NEVES *et al.*, 2004). Maior exposição das videiras aos raios solares parece contribuir positivamente na biossíntese de polifenóis (RASTIJA *et al.*; 2009).

A importância dos compostos fenólicos, no vinho, reside no fato de estes contribuírem para a cor (contribuição para a pigmentação vermelha e formação de substratos acastanhados), para a adstringência (explica-se pelo fato dos taninos interagirem fortemente com as proteínas, em geral, e em particular com as proteínas salivares, provocando certa diminuição nas propriedades lubrificantes da saliva), e para o aroma (uvas e vinho), bem como o fato de ser uma reserva para a redução do oxigênio (propriedades antioxidantes). Pensa-se ainda que os compostos fenólicos estão relacionados aos odores picantes que os vinhos podem apresentar (REIS, 2007).

Deste modo, os compostos fenólicos desempenham um papel muito importante no vinho, uma vez que são os responsáveis pelas principais diferenças entre o vinho branco e o tinto e em especial na cor e no aroma dos vinhos tintos.

Em relação às propriedades que os polifenóis podem exercer sobre a saúde humana, podem-se destacar seus efeitos anti-inflamatórios, antivirais e anticarcinogênicos (RASTIJA *et al.*; 2009). Devido também às suas propriedades antioxidantes, os polifenóis são componentes importantes na dieta, atuando na neutralização de radicais livres. A ingestão de polifenóis tem sido associada com a diminuição dos níveis de peroxidação lipídica e com a menor incidência de certos tipos de câncer (LUCENA *et al.*, 2010). Estudos epidemiológicos têm evidenciado que os polifenóis podem modular as funções vasculares, induzindo a vasodilatação, como consequência da sua ação no aumento da produção de óxido nítrico. Esta ação pode estar associada à diminuição de algumas doenças, como as do coração (MUDNIC *et al.*, 2010).

Análise Exploratória de dados empregando Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de Componentes Principais (PCA) é, provavelmente, o método estatístico multivariado mais amplamente difundido e, devido à importância das medidas multivariadas, é considerada, por muitos, como o método mais significativo que muda o ponto de vista do usuário para a análise multivariada de dados (BRERETON, 2003).

A análise por componentes principais consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras, descritas em função das variáveis determinadas, em outro

sistema de eixos mais conveniente para a análise de dados, numa dimensão menor (GRANATO, 2011). Ocorre uma transformação da matriz de dados, constroem-se um novo sistema de eixos (denominados rotineiramente de fatores, componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores) para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões (MORGANO, 2005). Este método permite a redução da dimensão dos pontos representativos das amostras, pois, embora a informação estatística presente nas p-variáveis originais seja a mesma dos p-componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes mais que 70% desta informação, visto que as componentes principais (PC) são combinações lineares das variáveis originais. Como resultado da PCA são obtidos gráficos bi ou tridimensionais de escores ou pesos. O escore corresponde à coordenada de cada amostra nos PC (Componentes Principais); amostras com valores de escores semelhantes podem ser consideradas semelhantes entre si, pois possuem as mesmas coordenadas no espaço multivariado. Os valores dos pesos (*loadings*) indicam a contribuição da variável (ou peso da variável) no PC e, portanto, quanto maior o peso de uma variável, maior é a importância da variável para explicar a variabilidade das amostras (SOUZA, 2003). O gráfico da componente principal 1 *versus* a componente principal 2 fornece uma janela privilegiada estatisticamente para a observação dos pontos no espaço p-dimensional (GRANATO, 2011)

O presente trabalho teve como objetivos: determinar os teores de arsênio, cádmio, cobre e chumbo em amostras de vinhos brasileiros das diversas regiões de produção do Brasil, utilizando para isso a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite;

comparar os resultados obtidos com a legislação brasileira vigente e com os valores recomendados pela OIV; calcular a contribuição dos vinhos estudados na ingestão de As, Cd, Cu e Pb na dieta; determinar os teores de polifenóis totais e pH e avaliar se existe correlação entre os parâmetros estudados e os estados de origem dos vinhos.

Material e métodos

Amostras

Foram analisadas 45 amostras de vinhos nacionais adquiridos no comércio de Campinas/SP, no período de maio de 2010 a maio de 2012. Deste total, 18 (40%) eram referentes a vinhos finos, 18 (40%) vinhos de mesa e 9 (20%) espumantes. Quanto à região de produção, 25 (56 %) eram do Rio Grande do Sul, 8 (18%) de São Paulo, 6 (13%) de Minas Gerais, 3 (7%) do Pernambuco, 2 (4%) da Bahia e 1 (2%) do Paraná.

Reagentes e padrões

Para a determinação dos elementos As, Cd, Cu e Pb foram utilizados os seguintes reagentes e padrões:

Ácido nítrico (65% v/v) (Merck), previamente destilado em destilador sub-boiling, peróxido de hidrogênio (30% m/m, Merck), além de nitrato de paládio 1000 g L⁻¹ (Perkin Elmer), nitrato de magnésio 1000 g L⁻¹ (Perkin Elmer), dihidrogeno fosfato de amônio em HNO₃ (Perkin Elmer), usados como modificadores químicos nas análises por absorção atômica.

Padrões Titrisol (Merck ou Carlo Erba) para absorção atômica para cádmio (CdCl₂), cobre (CuCl₂) , arsênio (As₂O₅) e chumbo Pb(NO₃)₂ foram preparados nas concentrações de 1000 mg L⁻¹ em balões calibrados e usando ácido nítrico diluído a 1% v/v . Diariamente, eram preparadas soluções de trabalho de 100 µg L⁻¹ para cobre, chumbo, cádmio e arsênio. O diluente dessas soluções era HNO₃ 0,2% v/v.

Foi utilizada uma solução de lavagem para o amostrador automático com 1% v/v de HNO₃, contendo de 0,2% v/v de Triton X100 (Sigma/Aldrich).

Todas as soluções foram preparadas com água de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtidas pelo sistema MilliQ.

Os balões utilizados para o preparo das curvas analíticas eram de vidro *Pyrex*® (grau A) calibrados.

Toda a vidraria e frascos de polietileno foram lavados com detergente neutro e deixados em banho de ácido nítrico 20% v/v, por pelo menos 24 horas e, em seguida, enxaguados apenas com água desionizada antes do uso.

Modificadores químicos

Para a determinação de As, Cd, Cu e Pb foram utilizados 5 µL dos modificadores relacionados na Tabela 1, co-injetados com 5 µL de peróxido de hidrogênio 30% v/v, conforme estabelecido no capítulo 2.

Tabela 1. Modificadores químicos utilizados para a determinação de As, Cd, Cu e Pb por GF AAS.

Elemento	Modificadores Seleccionados
Cu - 327,4 nm	10 µg Pd + 6 µg Mg(NO ₃) ₂
Pb - 283,3 nm	2,5 µg Pd + 1,5 µg Mg(NO ₃) ₂
Cd - 228,8 nm	50 µg NH ₄ H ₂ PO ₄ + 3 µg Mg(NO ₃) ₂
As - 197,3 nm	20 µg Pd + 12 µg Mg(NO ₃) ₂

Para as medidas de pH foram utilizadas uma solução tampão pH 4,00 e pH 7,00 (Merck) .

Para a determinação de polifenóis totais foram utilizados: Carbonato de sódio 4% m/v (Merck), Reagente Folin- Ciocalteu 10% v/v (Dinâmica), padrão de ácido gálico em etanol a 99,9% v/v (Merck).

Equipamentos

O instrumento utilizado para a determinação dos elementos inorgânicos foi um espectrômetro de absorção atômica, com atomização eletrotérmica em forno de grafite (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA; modelo AAnalyst 600), com corretor de fundo baseado no efeito Zeeman, amostrador automático (modelo AS-800), tubos de grafite pirolítico com aquecimento transversal e plataforma de L'vov integrada.

Como fontes de radiação foram utilizadas: lâmpadas monoelementares de descarga sem eletrodo (EDL), para a detecção de As, operando a 400 mA e no comprimento de onda de 197,3 nm e abertura de fenda 0,7 nm; para Pb, operando a 460 mA no comprimento de onda de 283,3 nm e abertura de fenda de 0,7 nm; para Cd, operando 240 mA no comprimento de onda de 228,8 nm e abertura de fenda de 0,7 nm, e lâmpada de cátodo oco (HCL), operando a 15 mA, para Cu, no comprimento de onda de 327,4 nm e abertura de fenda de 0,7 nm. A vazão de argônio como gás de purga foi a mesma para todas as determinações, igual a 250 mL min⁻¹, sendo que esta vazão foi interrompida, durante a etapa de atomização.

Foram empregados também ultrapurificador de água sistema MilliQ, banho de Ultra-som – Unique, modelo USC 1400, 120 W, medidor de pH de leitura digital com precisão 0,01 unidades com eletrodo combinado.- Hanna, modelo 200, espectrofotômetro UV/VIS – HP, modelo 8453.

Determinação de As, Cd, Cu e Pb

As amostras de vinho foram homogeneizadas e as de espumantes foram submetidas ao banho de ultrassom para desgaseificação, por aproximadamente 5 minutos.

Todas as amostras foram diluídas da seguinte maneira: em balão volumétrico de 10 mL foram pipetados 3,330 mL de amostra de vinho, previamente homogeneizado, 3,33 mL de peróxido de hidrogênio a 30% m/m, 0,4 mL de ácido nítrico 65% v/v e completados com água desionizada. Foram preparadas triplicatas de cada amostra para a leitura contra uma curva analítica aquosa com 0,2% v/v de HNO₃ para cada elemento, como descrito no capítulo 2. O espectrofotômetro de absorção atômica foi programado para fazer um “*reslope*” a cada 10 leituras de amostras, ou seja, o equipamento refazia a leitura de um padrão (último ponto da curva analítica) e recalculava o coeficiente angular e linear, se necessário, garantindo dessa forma a calibração do equipamento durante toda rotina analítica.

Com o amostrador automático foram pipetados 20 µL de amostra, juntamente com 5 µL de peróxido de hidrogênio a 30% v/v e 5 µL de modificador químico específico para cada elemento, diretamente na plataforma de L’vov, e seguiu-se a programação do forno de grafite para conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de aquecimento otimizado para os elementos cobre, chumbo, cádmio e arsênio.

Etapa	Temperatura (°C)				Rampa (s)	Sustentação (s)	Vazão de Ar (mL min ⁻¹)
	Cu	Pb	Cd	As			
Secagem 1	110	110	110	110	10	50	250
Secagem 2	130	130	130	130	15	20	250
Pirólise	1300	950	450	1300	10	30	250
Atomização	1800	1550	1400	2000	0	4	0
Limpeza	2450	2450	2450	2450	1	4	250

Determinação de pH e de polifenóis totais

Determinação do pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, utilizando um potenciômetro calibrado com soluções tampão pH 4,00 e pH 7,00, à temperatura ambiente. A determinação foi efetuada diretamente sobre as amostras de vinho (RIZZON, 2010).

Determinação de polifenóis

Os polifenóis totais correspondem ao conjunto de todos os compostos fenólicos no vinho (RIZZON, 2010).

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada por meio de espectrometria na região do visível, utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu (WOISKY & SALANTINO, 1998). O método se fundamenta na redução do reagente de Folin-Ciocalteu, que contém uma mistura de ácidos fosfomolibidico e fosfotunguístico, com formação de um complexo de coloração azul intensa, com absorção máxima entre 620 e 725 nm. O método utiliza o ácido gálico como padrão e os resultados são expressos em mg de equivalente de ácido gálico por litro (EAG)/L. Este método permite a quantificação de espécies fenólicas, mas pode sofrer interferências de outras substâncias redutoras de natureza não fenólica.

Preparo da curva analítica:

Foram pesados 50 mg de ácido gálico e transferidos para um balão de 100 mL, adicionou-se 10 mL de álcool etílico 99,9% v/v e o balão foi completado com água desionizada para se obter uma solução padrão de ácido gálico de 500 mg L⁻¹.

A partir da solução padrão de 500 mg L⁻¹ de ácido gálico foram preparadas diluições com água desionizada, a fim de se obter soluções de 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹, 60 mg L⁻¹, 80 mg L⁻¹, e 100 mg L⁻¹.

Procedimento:

Em tubo de ensaio foram pipetados 0,25 mL da amostra de vinho e 0,25 mL de água desionizada, aos quais foram adicionados 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu diluída em água desionizada a 1:10. Os tubos de ensaios foram agitados e deixados em repouso

por cinco minutos. Foram acrescentados 2,0 mL da solução de Na₂CO₃ a 4% m/v e os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 2 horas, protegidos da luz.

Foi preparada em paralelo uma solução do branco analítico, usando 0,5 mL de água desionizada, utilizando os mesmos reagentes empregados na preparação da amostra.

Procedeu-se as leituras no espectrofotômetro em 720 nm, ajustando o equipamento com a solução branco. A Figura 1 mostra a curva analítica obtida para a determinação do teor de polifenóis totais nas amostras dos vinhos avaliados neste estudo.

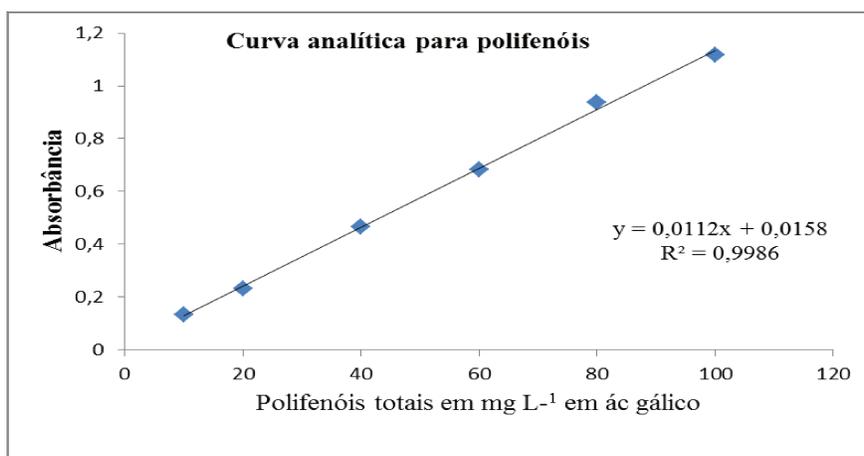


Figura1. Curva analítica para determinação de polifenóis totais.

Análise Exploratória de dados empregando Análise de Componentes Principais (PCA)

Foram analisadas 45 amostras de vinhos de 3 tipos (mesa, fino e espumante); de 3 cores (tinto, branco e rosado); de 6 estados (RS, MG, SP, BA, PR e PE) e de 3 variedades (*Cabernet*, híbrida americana e outras).

Os vinhos foram analisados quanto à suas concentrações de chumbo, cádmio, arsênio, pH e polifenóis totais (pF) . Os valores de grau alcoólico (GA) foram obtidos através da informação da rotulagem.

Dessa forma, uma matriz denominada de X foi construída, contendo seis variáveis, Pb, Cd, As, pH, PF e GA e 45 amostras. A análise exploratória foi analisada com 4 classes : tipo, cor, estado e variedade.

A matriz X foi autoescalada e o algoritmo da decomposição dos valores singulares (SVD) foi executado para encontrar os *scores* e os *loadings* da PCA.

Foi utilizado o *Software* : PLS - Toolbox 7.0 for Matlab.

Resultados e Discussão

Determinação de elementos inorgânicos nos vinhos

Os resultados obtidos para a concentração de cobre, cádmio, chumbo e arsênio nas determinações feitas em triplicata das amostras dos vinhos estudados estão descritos nas tabelas 3, 4 e 5 a seguir.

Vinhos de mesa:

Para os vinhos de mesa (Tabela 3) todos os valores encontrados estavam de acordo com a legislação em vigor para contaminantes inorgânicos (Cu 5 mg L⁻¹, Pb 0,15 mg L⁻¹, Cd 0,01 mg L⁻¹, As 0,2 mg L⁻¹ MERCOSUL/GMC/RES nº12/2011).

Tabela 3. Teores de cobre, chumbo, cádmio e arsênio em vinhos de mesa.

	Origem	Tipo	Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	RS	T	53,31 \pm 2,90	14,87 \pm 0,60	0,67 \pm 0,01	6,07 \pm 0,30
2	RS	B	33,94 \pm 1,30	13,62 \pm 0,90	0,31 \pm 0,01	5,46 \pm 0,50
3	RS	T	37,48 \pm 0,40	26,08 \pm 1,50	0,31 \pm 0,02	4,56 \pm 0,10*
4	RS	T	18,55 \pm 0,25	18,33 \pm 0,10	0,20 \pm 0,03**	2,59 \pm 0,30**
5	RS	R	21,14 \pm 1,80	13,08 \pm 0,2	0,27 \pm 0,01	3,17 \pm 0,10**
6	RS	B	25,65 \pm 0,10	21,60 \pm 0,30	0,28 \pm 0,05	3,57 \pm 0,10**
7	RS	T	49,93 \pm 2,66	6,28 \pm 0,60	0,25 \pm 0,03	4,18 \pm 0,15**
8	RS	B	24,26 \pm 0,90	8,62 \pm 0,20	0,25 \pm 0,05	3,15 \pm 0,10**
9	RS	B	90,79 \pm 2,24	2,24 \pm 0,40*	ND	2,56 \pm 0,11**
10	RS	T	37,41 \pm 1,13	12,72 \pm 0,99	0,22 \pm 0,15**	0,73 \pm 0,06**
11	MG	T	112,23 \pm 1,12	5,67 \pm 0,32	0,30 \pm 0,01	3,30 \pm 0,10**
12	MG	T	80,97 \pm 0,15	24,14 \pm 0,75	0,33 \pm 0,03	ND
13	MG	B	33,90 \pm 2,30	10,50 \pm 1,30	0,23 \pm 0,02	9,21 \pm 0,78
14	MG	T	38,6 \pm 1,36	7,68 \pm 0,80	0,04 \pm 0,01**	1,96 \pm 0,40**
15	SP	T	90,86 \pm 1,23	35,46 \pm 1,65	0,74 \pm 0,01	8,29 \pm 0,25
16	SP	B	102,24 \pm 1,70	16,13 \pm 0,88	0,35 \pm 0,05	4,08 \pm 0,63**
17	SP	T	21,14 \pm 1,8	13,49 \pm 0,60	0,37 \pm 0,02	6,67 \pm 1,9
18	PR	T	31,71 \pm 0,65	10,85 \pm 1,8	0,18 \pm 0,05**	8,95 \pm 0,11

T = tinto, B = branco, R = rose. * Estimativa da concentração, valores abaixo do LOQ (porém acima do LOD). ** Estimativa da concentração, valores abaixo do LOQ (cádmio $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$; arsênio $5 \mu\text{g L}^{-1}$); # ND não detectado.

Para o cobre, os resultados apresentaram uma grande variação de amostra para amostra, onde o valor máximo encontrado foi de $112,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para um vinho tinto do estado de Minas Gerais e o valor mínimo encontrado foi de $18,6 \mu\text{g L}^{-1}$ de um vinho do Rio Grande do Sul.

Quanto aos teores de chumbo, todas as amostras estavam acima do limite de quantificação do método LOQ ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$), com exceção o vinho 9. Os valores variaram de $2,24 \mu\text{g L}^{-1}$ a $35,46 \mu\text{g L}^{-1}$, referentes aos vinhos tinto e branco das regiões de São Paulo e Rio Grande do Sul, respectivamente.

Para os teores de cádmio e arsênio os valores encontrados também estavam abaixo do valor máximo permitido pela legislação (Resolução GMC N° 12/11 do Mercosul, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $200 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente). Quatro amostras apresentaram valores abaixo do LOQ do método, mas acima do LOD, portanto, representam uma estimativa da concentração. Além disso, apenas em duas amostra os analitos não foram detectados, sendo uma para cádmio e uma para arsênio (amostras n° 9 e n° 12).

Vinhos finos:

Para os vinhos finos (Tabela 4) os teores de cobre apresentaram uma variação de 197% entre as amostras. Comparando os valores com aqueles obtidos para os vinhos de mesa, a média dos valores foi maior, $189,06 \mu\text{g L}^{-1}$ contra $50,22 \mu\text{g L}^{-1}$ (média da

concentração de cobre nos vinhos de mesa). Essa variação pode ser explicada pelos tipos de solos de cada região, tipos de uva e dos diferentes processos de produção.

Tabela 4. Teores de cobre, chumbo, cádmio e arsênio em vinhos finos (n=3).

	Origem	Tipo	Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	RS	T	252,53 \pm 2,50	2,88 \pm 0,10	0,37 \pm 0,04	4,76 \pm 0,2*
2	RS	B	215,22 \pm 8,00	7,01 \pm 1,00	0,36 \pm 0,01	5,62 \pm 0,10
3	RS	R	30,45 \pm 1,30	3,16 \pm 0,40	0,20 \pm 0,01*	1,22 \pm 0,30*
4	RS	T	87,97 \pm 3,40	12,36 \pm 0,69	0,34 \pm 0,10	13,40 \pm 0,27
5	RS	T	39,09 \pm 2,50	12,33 \pm 0,50	0,21 \pm 0,10*	7,75 \pm 1,31
6	RS	T	429,3 \pm 1,1	7,32 \pm 0,18	0,23 \pm 0,03	6,75 \pm 0,81
7	RS	T	1629,0 \pm 14,0	12,22 \pm 0,10	0,10 \pm 0,01*	2,74 \pm 0,13*
8	RS	B	12,20 \pm 0,02	4,87 \pm 0,10	0,17 \pm 0,01*	9,02 \pm 0,34
9	RS	T	38,86 \pm 1,88	9,96 \pm 0,15	# ND	10,88 \pm 0,42
10	RS	T	43,81 \pm 1,47	12,57 \pm 1,22	0,18 \pm 0,03*	15,42 \pm 0,15
11	RS	T	57,06 \pm 0,13	13,35 \pm 2,15	0,56 \pm 0,05	2,11 \pm 0,25*
12	BA	T	155,64 \pm 2,0	3,28 \pm 0,10	0,50 \pm 0,01	5,78 \pm 0,20
13	PE	T	131,51 \pm 1,60	13,32 \pm 0,85	0,86 \pm 0,10	18,74 \pm 0,26
14	PE	B	55,9 \pm 0,80	12,33 \pm 1,14	1,40 \pm 0,01	17,04 \pm 0,42
15	PE	R	31,29 \pm 0,58	12,91 \pm 0,05	1,00 \pm 0,01	12,27 \pm 0,19
16	MG	B	90,79 \pm 2,24	27,17 \pm 0,80	0,33 \pm 0,15	8,29 \pm 0,25
17	MG	T	48,72 \pm 0,42	12,88 \pm 0,75	0,17 \pm 0,09*	4,71 \pm 0,25*
18	SP	T	53,91 \pm 0,84	4,38 \pm 0,10	0,11 \pm 0,01*	7,92 \pm 0,28

T = tinto, B = branco, R = rose. * Estimativa da concentração, valores abaixo do LOQ (cádmio 0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$; arsênio 5 $\mu\text{g L}^{-1}$); # ND não detectado

É possível observar na Tabela 4 que a amostra nº 7, um vinho tinto do Rio Grande do Sul, apresentou um teor de cobre de 1629,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, acima do valor preconizado pela OIV

(1 mg L⁻¹), porém, com relação à legislação brasileira esse valor é permitido e está abaixo do valor máximo correspondente de 5 mg L⁻¹ (MERCOSUL/GMC/RES n°12/2011). Com relação à exportação, este vinho poderia ser prejudicado, levando em consideração que a presença de teores maiores que 1 mg L⁻¹ de cobre na presença de proteínas e em um ambiente redutor favorece o fenômeno de casse cúprica (CATARINO, 2008). Não é desejável que um vinho de qualidade contenha um teor de cobre acima desse valor.

Com relação aos elementos cádmio e arsênio todas as amostras estavam com os teores abaixo dos valores máximos permitidos (MERCOSUL/GMC/RES n°12/2011, 10 µg L⁻¹ e 200 µg L⁻¹, respectivamente). Para o cádmio, sete amostras apresentaram teores abaixo do LOQ (amostras n° 3, 7, 8, 10 e 17) e uma amostra teve o teor não detectável (amostra n° 9). Para o arsênio, cinco amostras apresentaram-se abaixo do valor de LOQ (amostras n° 1, 3, 7, 11 e 17), conforme Tabela 4.

Espumantes:

Com relação aos espumantes (Tabela 5), os valores de cobre também apresentaram maior variação entre as amostras, de 91,5%. O valor máximo encontrado foi 175,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o valor mínimo foi 10,15 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Todos os valores dos teores dos elementos estudados estavam abaixo do valor máximo permitido pela legislação (MERCOSUL/GMC/RES n°12/2011). Para o cádmio, duas amostras apresentaram valores abaixo do LOQ (amostras n° 2 e 5), e com relação ao arsênio, quatro amostras apresentaram valores menores que o LOQ (amostras 1, 2, 5 e 9).

Tabela 5. Teores de cobre, chumbo, cádmio e arsênio em espumantes (n=3)

	Origem	Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	RS	17,03 \pm 1,01	11,43 \pm 0,23	0,44 \pm 0,01	2,98 \pm 0,60*
2	RS	52,68 \pm 0,42	10,39 \pm 1,32	0,18 \pm 0,01*	1,17 \pm 0,05*
3	RS	175,6 \pm 2,30	23,56 \pm 0,35	0,54 \pm 0,02	27,71 \pm 0,89
4	RS	46,08 \pm 0,26	8,84 \pm 0,42	1,01 \pm 0,01	6,80 \pm 0,28
5	SP	16,09 \pm 0,02	7,46 \pm 1,2	0,084 \pm 0,003*	1,97 \pm 0,10*
6	SP	27,45 \pm 1,18	13,08 \pm 0,57	0,67 \pm 0,06	11,65 \pm 0,03
7	SP	92,01 \pm 3,30	34,5 \pm 0,8	1,01 \pm 0,01	6,28 \pm 0,42
8	MG	10,15 \pm 0,25	19,56 \pm 0,21	0,54 \pm 0,02	18,31 \pm 0,33
9	BA	125,07 \pm 2,50	11,03 \pm 2,70	0,24 \pm 0,01	2,80 \pm 0,19*

*Estimativa da concentração, valores abaixo do LOQ (cádmio 0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$; arsênio 5 $\mu\text{g L}^{-1}$); # ND não detectado

É importante ressaltar que as amostras que apresentaram valores abaixo do LOQ foram analisadas novamente e, para algumas delas, foram utilizados os procedimentos de adição de analito para confirmar a concentração encontrada para o elemento.

A visualização geral dos resultados de todos os vinhos pode ser observada na Tabela 6, abaixo relacionada:

Tabela 6. Resultados médios, estimativa de desvio padrão, mediana, valor mínimo e valor máximo obtido para contaminantes inorgânicos em vinhos nacionais.

Elemento	Média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Desvio ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Mediana ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor Mínimo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor Máximo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostras de acordo com a Legislação % e com a OIV
Cu	68,25	58,20	49,38	10,15	1629,0	97,7
Pb	12,54	7,00	12,36	2,24	34,50	100
Cd	0,40	0,33	0,30	0,22	1,34	100
As	6,97	5,73	5,62	0,73	27,71	100

Os valores obtidos mostraram grande variação dos teores entre os diferentes tipos de vinho analisados. A maior variação encontrada foi para o elemento cobre (85 %), seguido pelo cádmio (82 %), arsênio (82 %) e chumbo (56 %).

A Tabela 7 mostra os valores para cobre, chumbo, cádmio e arsênio obtidos neste estudo, comparando-os com os valores obtidos por outros autores.

Tabela 7. Comparação dos valores obtidos em $\mu\text{g L}^{-1}$ em vinhos brasileiros com os da literatura.

Elemento	Presente Trabalho	Moreira (2011)	Schiavo (2008)	Dessuy (2008)	Spaziani (2006)	Freschi (2001)
Cu	10,1 a 1629,0	-----	56 a 764,4	-----	50 a 395,0	-----
Pb	2,5 a 34,5	-----	0,3 a 17,3	10,0 a 46,0	26 a 150	10,3 a 55
Cd	< 0,22 a 1,3	-----	1,7 a 8,6	-----	0,30 a 0,60	0,03 a 0,20
As	< 5,0 a 27,7	4,4 a 13	-----	-----	----	-----

Os valores apresentados na Tabela 7 são bastante variados, podendo-se atribuir tal variação à grande variedade de marcas existentes de vinhos nacionais e às diferentes técnicas utilizadas pelos autores para a determinação dos elementos inorgânicos, além dos diferentes tipos de uva, das condições de cultivo e processos de fabricação.

Contribuição das amostras de vinho estudadas na ingestão de As, Cd, Cu e Pb

O consumo de vinhos no Brasil ainda é baixo, com uma média de 2 litros per capita por ano, como é possível observar na Tabela 9, comparado aos países europeus (França 52 litros) e com a Argentina (28 litros) e Chile (18 litros). Porém, estima-se que até 2030 estes valores dobrem (UVIBRA, 2012).

Tabela 8. Consumo de vinhos no Brasil (consumo por Estado, em litros per capita/ano).

ESTADOS		Consumo (L)	ESTADOS		Consumo (L)
1.º	Rio Grande do Sul	4,80	13.º	Bahia	0,79
2.º	São Paulo	3,95	14.º	Rondônia	0,74
3.º	Paraná	3,20	15.º	Mato Grosso	0,60
4.º	Esp. Santo e Rio Janeiro	2,36	16.º	Amazonas	0,68
5.º	Santa Catarina	1,99	17.º	Pernambuco	0,61
6.º	Distrito Federal	1,21	18.º	Paraíba	0,43
7.º	Minas Gerais	1,17	19.º	Ceará	0,32
8.º	Amapá	1,06	20.º	Pará	0,27
9.º	Acre	1,09	21.º	Rio Grande Norte	0,14
10.º	Roraima	0,92	22.º	Sergipe	0,11
11.º	Goiás	0,90	23.º	Alagoas e Tocantins	0,10
12.º	Mato Grosso do Sul	0,82	24.º	Maranhão e Piauí	0,08

Fonte: UVIBRA (União dos Vitivinicultores do Brasil)

A Comissão do Codex Alimentarius publicou em março de 2011, baseada nos estudos de referências do JECFA, um guia com valores toxicológicos para os principais contaminantes. Para o arsênio é utilizada a referência de valor BMDL (*Benchmark Dose Lower Limit*), ou seja, a dose limite inferior de referência. Este valor foi determinado através de estudos de modelagem de dose-resposta de dados toxicológicos e se refere a 3,0 µg/kg de peso corpóreo por dia. Para o cádmio a referência usada é PTMI (*Provisional*

Tolerable Monthly Intake), a ingestão provisória tolerável por mês. Este critério é usado para contaminantes com propriedades acumulativas, com uma meia vida longa no corpo humano. Seu valor representa a exposição humana permitida mensal a um contaminante associado inevitavelmente ao alimento e seu valor é 25 µg/kg, por peso corpóreo, por mes. Para o cobre, a referência utilizada é o PMTDI (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*), ingestão diária máxima tolerável provisória, critério adotado para os contaminantes sem propriedades acumulativas. Seu valor representa a exposição humana admissível, como resultado da ocorrência natural da substância nos alimentos e na água. No caso dos elementos-traço, que são essenciais e são inevitáveis nos alimentos, o valor inferior representa o nível de essencialidade e o superior, a ingestão máxima tolerável. Para o cobre, esses valores são 0,05-0,5 mg/kg por peso corpóreo por dia. Em 2010, a PTWI (*Provisional Tolerable Weekly Intake*) de 25 µg/kg por peso corpóreo por semana, para o chumbo, foi retirada, conforme relatório da Comissão do *Codex Alimentarius*, após concluírem através de estudos de dose-resposta que este valor não representava um fator de proteção à saúde, mas a exposição humana permitida semanalmente para os contaminantes com propriedade acumulativas (WHO, 2011).

Considerando os critérios estabelecidos acima e o fato de que um adulto com peso aproximado de 70 kg pode ingerir cerca de 200 mL de vinho por dia, foi calculada a contribuição dos vinhos estudados na ingestão de arsênio, cádmio, cobre e chumbo, considerando o valor da mediana e também o valor máximo encontrado para os elementos, uma vez que todos os vinhos estudados apresentaram teores abaixo dos valores máximos permitidos pela legislação brasileira. Para o arsênio, um vinho com teor de 27,71 µg L⁻¹

(máximo encontrado), a ingestão semanal seria de 5,54 μg , cujo valor representaria 2,63% da BMDL. O teor representado pela mediana das amostras (5,62 $\mu\text{g L}^{-1}$) seria de 1,12 μg e a contribuição em relação à BMDL seria de 0,53%. É importante ressaltar que esse limite proposto para o arsênio, de 210 μg , considerando uma pessoa de 70 kg, seria para toda a dieta, e não só para o consumo do vinho. Outro fator importante a ser considerado também é a complexidade de todo o processo que envolve a digestão e que nem toda quantidade do elemento ingerida é absorvida pelo organismo.

Para o elemento cádmio, considerando que um adulto de 70 kg consumisse 200 mL de vinho por dia, com teores de 1,34 $\mu\text{g L}^{-1}$ (máximo) e 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (mediana), a sua contribuição com relação a PTMI seria de 0,46% e 0,10%.

Para os vinhos com teores de cobre de 1629 $\mu\text{g L}^{-1}$ (máximo) e 49,38 $\mu\text{g L}^{-1}$ (mediana) a contribuição seria de 0,93 % e 0,03% com relação à PMTDI.

Para os vinhos com teores de chumbo de 34 $\mu\text{g L}^{-1}$ (máximo) e 12,36 $\mu\text{g L}^{-1}$ (mediana) a contribuição seria de 6,8 μg e 2,5 μg por 200 mL de vinho.

De forma geral, estes valores demonstram que o consumo dos vinhos considerados neste estudo é uma estimativa, pois existe uma grande variabilidade de consumo entre os estados, e também entre os teores encontrados, porém considerando os resultados apresentados acima, concluímos que os vinhos estudados indicam pouca contribuição para a ingestão de elementos potencialmente tóxicos.

Valores de pH

Os valores de pH medidos nas amostras de vinhos estão discriminados na Tabela 9. Para os vinhos de mesa, os valores mínimos e máximos foram 3,00 e 3,58, já para os vinhos finos os valores mínimos e máximos foram 3,04 e 3,89, enquanto que para os espumantes esses valores foram 2,80 e 3,36.

Segundo Rizzon, 2010, o pH dos vinhos brasileiros varia de 3,00 a 3,80, dependendo do tipo de vinho (branco ou tinto), da cultivar e da safra.

Os valores de porcentagem de álcool foram obtidos através da informação da rotulagem de cada vinho e estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de pH e grau alcoólico das amostras de vinho de mesa, finos e espumantes.

Vinhos mesa	pH	% Álcool	Vinhos finos	pH	% Álcool	Espumante	% Álcool	pH
1M	3,18	9,50	1F	3,37	11,50	1E	7,50	2,80
2M	3,41	9,50	2F	3,04	12,50	2E	11,80	3,33
3M	3,21	10,50	3F	3,71	13,00	3E	11,50	3,03
4M	3,39	10,70	4F	3,17	11,50	4E	12,00	2,88
5M	3,10	10,50	5F	3,89	12,50	5E	7,50	3,27
6M	3,42	9,50	6F	3,74	13,60	6E	10,00	2,92
7M	3,10	10,10	7F	3,68	11,80	7E	11,50	3,36
8M	3,23	10,80	8F	3,54	13,00	8E	9,00	3,25
9M	3,33	10,70	9F	3,75	12,00	9E	10,00	3,15
10M	3,22	10,50	10F	3,21	12,00			
11M	3,14	10,60	11F	3,35	12,00			
12M	3,00	10,50	12F	3,52	11,50			
13M	3,13	10,80	13F	3,8	11,00			
14M	3,58	11,50	14F	3,52	12,00			
15M	3,38	10,60	15F	3,68	11,30			
16M	3,16	10,50	16F	3,41	12,10			
17M	3,37	10,50	17F	3,6	12,10			
18M	3,04	10,70	18F	3,81	12,50			

(vinhos de mesa M; vinhos finos F e espumantes E)

Em vinhos com pH inferior a 3,2, as bactérias lácticas (principais responsáveis pelas alterações dos mostos e dos vinhos) desenvolvem-se com dificuldade, razão porque as espécies ativas não podem atacar os açúcares e o vinho obtido é límpido, com poucos ácidos voláteis, o que contribui para a melhor conservação da cor típica. Por outro lado, vinhos com pH elevado (superior a 3,5) possuem fraca acidez total e a fermentação malolática desencadeia-se facilmente, tornando-os mais susceptíveis às alterações oxidativas e biológicas.

Quanto mais baixo for o pH maior é a fração de dióxido de enxofre livre dissolvido e volátil e, conseqüentemente, maior é o poder anti-séptico e o odor que este composto confere ao vinho (REIS,2007).

O composto mais abundante no vinho é a água, e em seguida o etanol. A “força” de um vinho é expressa em termos do conteúdo de etanol, ou de porcentagem de álcool por volume. O etanol desempenha um papel fundamental na percepção olfativa, tanto pela sua participação no odor como pela influência que exerce sobre outros compostos do aroma, ao fazer diminuir a polaridade do meio (GALLICE, 2010).

Através da Tabela 9, podemos observar que a porcentagem de álcool dos vinhos finos é maior, o que representa um fator de qualidade, pois significa vinhos com um poder maior de longevidade e conservação, tendo em vista que o álcool possui um efeito anti-septico em relação às leveduras e favorece as precipitações tartáricas (FREITAS, 2006).

Determinação de polifenóis totais

Os valores obtidos para os polifenóis totais, cuja análise foi feita em triplicata nos vinhos estudados, estão representados na Tabela 10.

Nos vinhos de mesa, os teores variaram em 8,7%, sendo o valor mínimo encontrado de 1464 mg L⁻¹ (amostra 9) para um vinho branco do Rio Grande do Sul, enquanto o valor máximo encontrado foi 2.313 mg L⁻¹ (amostras 3 e 11) para um vinho tinto também do Rio Grande do Sul e outro de Minas Gerais. Com relação aos vinhos finos, a variação entre os valores encontrados foi de 5,7% e os mínimos e máximos foram 1.342 mg L⁻¹ (amostra 20) e 1.609 mg L⁻¹ (amostra 31), para amostras do Rio Grande do Sul e Pernambuco. Para os espumantes, a variação foi de 8,8% e o teor máximo encontrado foi de 1.774 mg L⁻¹ (amostra 37) em um vinho do Rio Grande do Sul.

Tabela 10. Teores de polifenóis totais em vinhos de mesa, vinho fino e espumantes.

	Origem	Tipo	Polifenóis mg L⁻¹AG		Origem	Tipo	Polifenóis mg L⁻¹AG
1	RS	T/M americana	2098,2 ± 3,1	25	RS	T/F <i>Tannat, Merlot</i>	1444,7 ± 3,5
2	RS	B/M/ americana	2014,7 ± 18,0	26	RS	B/F <i>Chardonnay Viogner</i>	1378,7 ± 14,2
3	RS	T/M americana	2313,0 ± 39,2	27	RS	T/F <i>Cabernet Sauvignon</i>	1554,15 ± 14,7
4	RS	T/M americana	2094,1 ± 0,2	28	RS	T/F <i>Merlot</i>	1416,2 ± 48,0
5	RS	R/M americana	1972,8 ± 9,5	29	RS	T/F <i>Cabernet Sauvignon</i>	1566,4 ± 1,41
6	RS	B/M americana	2023,5 ± 16,3	30	BA	T/F Shiraz	1455,2 ± 17,18
7	RS	T/M americana	2105,4 ± 4,7	31	PE	T/F <i>Cabernet/Shiraz</i>	1609,1 ± 24,3
8	RS	B/M americana	2005,9 ± 22,6	32	PE	B/F <i>Chenin Blanck</i>	1364,0 ± 19,7
9	RS	B/M americana	1464,3 ± 38,6	33	PE	R/F <i>Vitiviníferas não especificada</i>	1359,7 ± 27,4
10	RS	T/M americana	2087,2 ± 1,6	34	MG	B/F <i>Chardonnay</i>	1401,8 ± 43,1
11	MG	T/M americana	2313,0 ± 2,4	35	MG	T/F <i>Merlot</i>	1501,3 ± 94,5
12	MG	T/M americana	2129,6 ± 8,5	36	SP	T/F <i>Cabernet Sauvignon</i>	1444,7 ± 10,1
13	MG	B/M	1879,8 ± 9,4	37	RS	E	1764,4 ± 6,5

		americana					
14	MG	T/M	2067,0 ± 29,9	38	RS	E	1611,8 ± 22,7
		americana					
15	SP	T/M	2095,3 ± 20,3	39	RS	E	1540,8 ± 3,11
		americana					
16	SP	B/M	2012 ± 8,5	40	RS	E	1774,65 ± 16,0
		americana					
17	SP	T/M	2103 ± 0,5	41	SP	E	1368,4 ± 24,4
		americana					
18	PR	T/M	2050,8 ± 7,5	42	SP	E	1694,4 ± 5,4
		americana					
19	RS	T/F		43	MG	E	1630,9 ± 11,7
		<i>Cabernet</i>	1412,6 ± 14,7				
20	RS	B/F	1342,0 ± 51,9	44	BA	E	1468,0 ± 21,9
		<i>Semillion/Malvacia</i>					
21	RS	R/F	1336,6 ± 34,2				
		<i>Gamay Rose</i>					
22	RS	<i>Cabernet Franck</i>	1560,8 ± 8,0				
		<i>Tannat</i>					
23	RS	T/F	1405,3 ± 9,4				
		<i>Merlot</i>					
24	RS	T/F	1421,4 ± 39,3				
		<i>Tannat</i>					

T(tinto), B(branco), F (fino), M (mesa), E (espumante).

Em alguns tipos de vinho tinto as uvas são esmagadas com o engaço, a casca e a semente, gerando maior quantidade de compostos fenólicos uma vez que, segundo Amerine & Joslyn (1987), o engaço contém de 1 a 4%, a casca cerca de 1 a 2% e as sementes, 5 a 8% de compostos fenólicos.

A diferença na quantidade de compostos fenólicos dos vinhos tintos e brancos não se deve apenas à presença das antocianinas, mas também aos processos de fabricação para a obtenção do vinho.

Um estudo realizado no Brasil por Freitas (2000), na região de Bento Gonçalves, RS, revelou que os vinhos tintos daquela região apresentaram concentração de polifenóis totais entre 491,4 e 1.722,3 mg L⁻¹ para vinhos da cultivar Cabernet, entre 430,3 e 1.992,6 mg L⁻¹ para vinhos da cultivar Merlot e 832,9 a 1.932,9 mg L⁻¹ para vinhos da cultivar Tannat.

Gallice (2010) demonstrou, analisando 47 amostras de vinhos de diversas nacionalidades, sendo que dessa amostragem 16 amostras eram de origem brasileira, que os teores de polifenóis totais variaram entre 970 mg L⁻¹ a 2.910 mg L⁻¹, com média em torno de 1.910 mg L⁻¹. Granato (2011) determinou os teores de polifenóis totais em vinhos tintos brasileiros e os valores encontrados variaram de 141,6 a 1.958,7 mg L⁻¹ em ácido gálico. Estes dados estão concordantes com os resultados encontrados pelo presente estudo, conforme as médias e medianas apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados médios, estimativa de desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo obtido para os teores de polifenóis nos vinhos nacionais.

Tipo de Vinho	Média (mg L⁻¹)	Desvio (mg L⁻¹)	Mediana (mg L⁻¹)	Valor Mínimo (mg L⁻¹)	Valor Máximo (mg L⁻¹)	Variação CV%
Mesa	2.046,0	178,5	2.077,1	1.464,0	2.313,0	8,7
Finos	1.443,0	82,8	1.418,8	1.342,0	1.609,0	5,7
Espumantes	1.606,6	142,3	1.549,4	142,3	1.774,65	8,8

Análise Exploratória de dados empregando Análise de Componentes Principais (PCA)

A Tabela 12 mostra que, após a decomposição, 86 % da variância acumulada foi explicada na quarta componente e 56,86% na segunda componente.

Tabela 12. Porcentagem da variância acumulada pelo modelo PCA

Número da PC	% de Variância acumulada
1	30,03
2	56,86
3	75,83
4	86,96

A Figura 2 mostra a separação encontrada para as amostras (*scores*) e a influência das variáveis (*loadings*) sobre a separação.

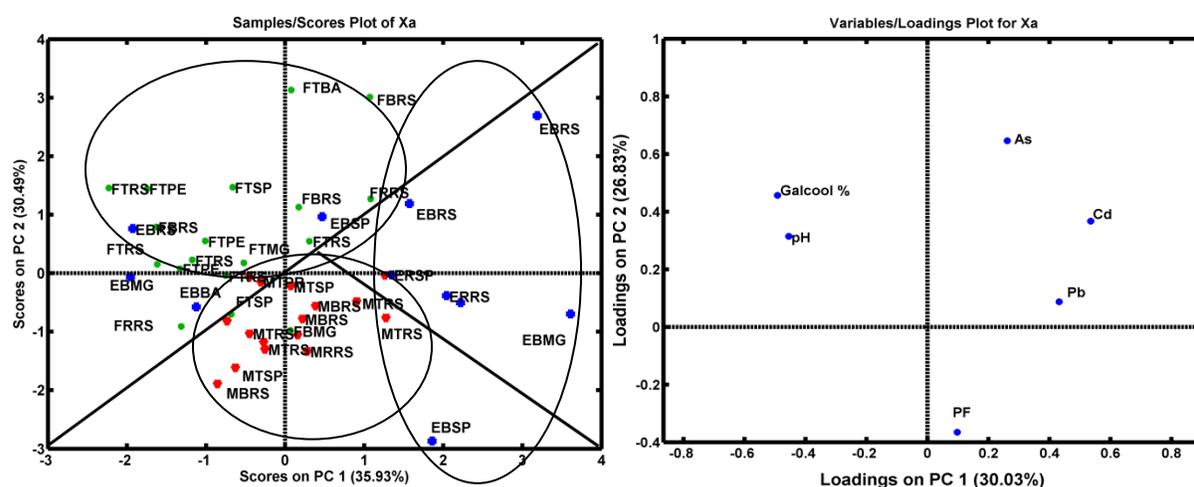


Figura 2. Tipos de vinho: verde (Fino), azul (Espumante) e mesa (Vermelho).

Legenda

Tipo:	Cor:	Estado:
Mesa (M)	Tinto (T)	RS, MG, SP, BA, PR, PE
Fino (F)	Branco (B)	
Espumante (E)	Rose (R)	

Nota-se pela análise dos scores que as amostras de vinho de mesa se separaram muito bem das restantes, porém, algumas amostras de espumante e de vinho fino se misturaram ao vinho de mesa. Nota-se, entretanto, que a maioria das amostras de vinho fino apresentou uma boa separação, na parte superior do gráfico.

A variável mais importante para separar os vinhos de mesa foi a PF (polifenóis totais), enquanto as variáveis GA (Grau alcoólico) e pH foram as responsáveis pela separação dos vinhos finos. Os vinhos espumantes sofreram maior influência dos elementos inorgânicos e, certamente, estas variáveis foram as responsáveis pela dispersão destas amostras.

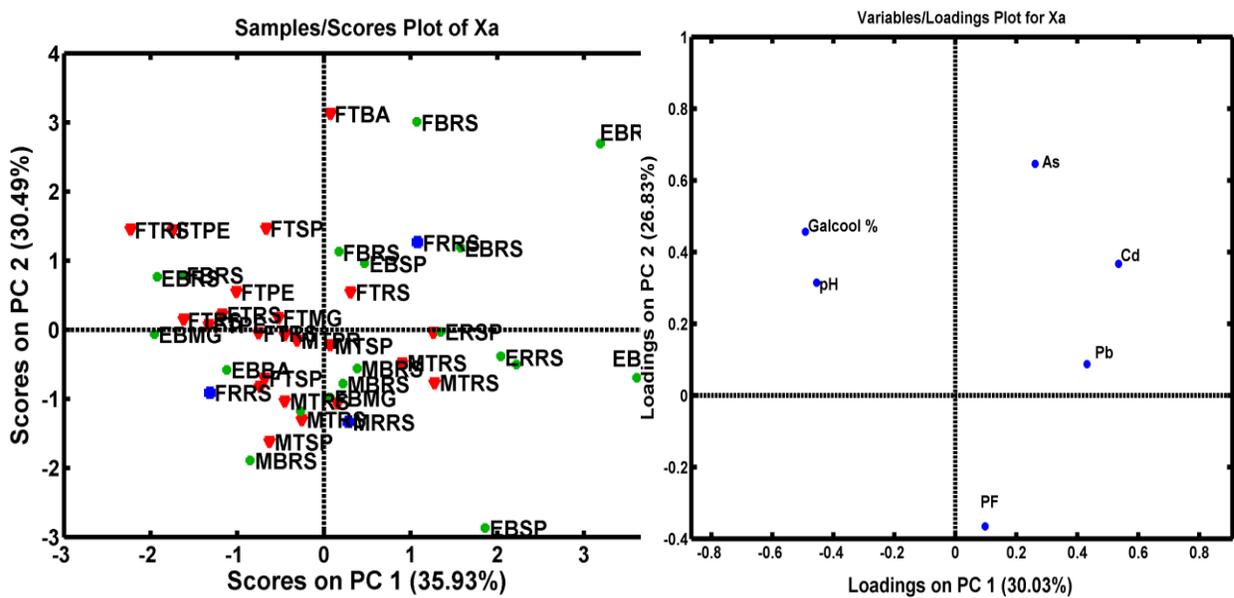


Figura 3. Quanto a cor dos vinhos: verde (Branco), azul (Rosado) e vermelho (Tinto).

De acordo com a Figura 3, os vinhos tintos se destacaram por estarem em maior quantidade, entretanto, nota-se que as variáveis estudadas não foram capazes de separar os vinhos pela cor.

O resultado apresentado na Figura 4 mostra que não é possível distinguir um padrão de vinhos de acordo com a procedência dos diferentes estados do Brasil, produtores de vinho, usando as variáveis estudadas.

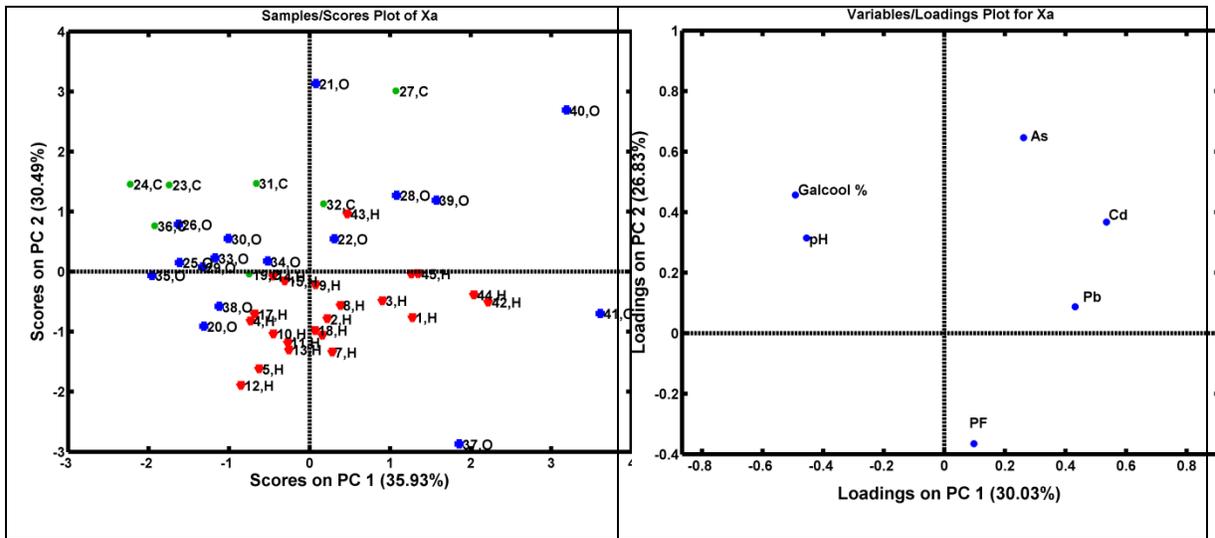


Figura 5. Quanto à variedade: verde (Cabernet), azul (Outras Uvas), vermelho (Híbrida Americana).

CONCLUSÃO

Das 47 amostras de vinho analisadas, todas apresentaram teores de As, Cd, Cu e Pb abaixo do valor máximo permitido pela legislação (MERCOSUL/GMC/RES nº12/2011). Apenas uma amostra de vinho tinto fino do Estado do Rio Grande do Sul apresentou teor de cobre acima do valor máximo preconizado pela OIV (1 mg L^{-1}), o qual pode alterar as características sensoriais deste vinho. Foi observada também uma grande variação dos teores entre os diferentes tipos de vinho analisados. A maior variação encontrada foi para o elemento cobre (85 %), seguido pelo cádmio (82 %), arsênio (82 %) e chumbo (56 %). Tal variação pode ser explicada pelas diferentes variedades utilizadas para fabricação dos vinhos, pelas particularidades de cada processo de fabricação e pela composição do solo de origem.

Por apresentarem teores relativamente baixos de As, Cd, Cu e Pb, a contribuição do consumo dos vinhos estudados para a dieta, é muito pequena.

Pelos resultados obtidos com a análise de PCA, a variável mais importante, que separou os vinhos de mesa, foi o teor de polifenóis totais, enquanto as variáveis GA (grau alcoólico) e pH foram as responsáveis pela separação dos vinhos finos. Os vinhos espumantes sofreram maior influência dos teores dos elementos inorgânicos estudados e foram os responsáveis pela dispersão destas amostras. Também foi possível distinguir a variedade de uva híbrida americana das demais. Observou-se, no entanto, que não foi possível distinguir um padrão de vinhos pela sua procedência geográfica, usando as variáveis estudadas.

Referências bibliográficas

AMERINE, A.; JOSLYN, M. A. Composition of grapes and distribution of phenolics from table wines, the technology of their production. Berkeley: University of California Press, 1987. p. 234-238, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei nº 7.678, de 08 de novembro de 1988**. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva de do vinho, e dá outras providências.

BRERETON, R.G. Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons Inc: Chinchester, 2003. p 407.

CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S; BRUNO DE SOUSA, R. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. **Ciência Técnica e Vitivinícola**. v. 23, n.1, p.3-19, 2008.

DESSUY, M. B ; VALE, M. G. R ; SOUZA, A. S ; FERREIRA, S. L. C ; WELZ, B ; KATSKOV, D. A. Method development for the determination of lead in wine using electrothermal atomic absorption spectrometry comparing platform and filter furnace atomizers and different chemical modifiers. **Talanta**. v. 74, p. 1321-1329, 2008.

FREITAS, D. M. **Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uva (Vitis vinífera) tintas em diferentes ambientes**. 2006. 41 f. Tese (Doutorado) Agronomia – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2006.

FRESCHI, G. P. G.; DAKUZAKU, C. S.; MORAES, M.; NOBREGA, J A.; GOMES NETO, J. A. Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. Analytical note. **Spectrochimica Acta, Part B**. v. 56, p.198-1993, 2001.

GALLICE, W.C.; **Caracterização do potencial antioxidante de vinhos e quantificação de fenóis totais e trans-resveratrol utilizando técnicas cromatográficas e**

espectroscópicas multivariadas. 2010. 73 f. Dissertação (mestrado) Química do setor de ciências exatas – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

GRANATO, D. **Associação entre atividade antioxidante *in vitro* e características químicas, sensoriais, cromáticas de vinhos tintos Sul-Americanos.** 2011. 140 f. Tese (doutorado) Ciências dos alimentos – Universidade de São Paulo, 2011.

GONZÁLES-NEVES, G. *et al.* Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. **Analytica Chimica Acta**, n. 513, p. 191-196, 2004.

GUERRA, C.C. Influência de parâmetros enológicos da maceração na vinificação em tinto sobre a evolução da cor e a qualidade do vinho. “In”: **Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia – Influência da Tecnologia Vitícola e Vinícola na Cor dos Vinhos: Anais do Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**; 2003; Bento Gonçalves.

GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TORNIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinho.** 2ª ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; 2009.

LARA, S.; CERRUTI, S.; SALONIA, J. A.; OLSINA, R.A.; MARTINEZ, L.D. Trace element determination of Argentine wines using ET AAS and USN-ICP OES. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43, p.293-297, 2005.

LUCENA, A. P. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; MACIEL, J. A. C.; TAVARES, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. Antioxidant activity and phenolics contents of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 30-36, 2010.

MIOLO. **Manual do vinho.** Bento Gonçalves: Miolo; 1999.

MOREIRA, C. M.; DUARTE, F. A.; LEBHERZ, J.; POZEBON, D.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Arsenic speciation in White wine by LC-ICP-MS. **Food Chemistry**. v. 126, p. 1406-1411, 2011.

MORGANO, M.A. **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos**. 2005. 110 f. Tese (Doutorado) Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MUDNIC, I. *et al.* Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. **Food Chemistry**. v. 119, p. 1205-1210, 2010.

RASTIJA, V.; SRECNIK, G.; SARIC, M. M. Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. **Food Chemistry**. v. 115, p. 54-60, 2009.

Regulamento Técnico MERCOSUL: **Limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos** (Revogação da Res. GMC nº 102/2011) MERCOSUL/GMC/RES nº12/2011.

REIS, L. I. P.; **Análise Quimiométrica dos Parâmetros que influenciam a Cor nos Vinhos Tintos**. 2007. 155f. Dissertação (mestrado), Departamento de Química, Universidade de Aveiro. P. Aveiro, 2007.

RIZZON, L. A. **Metodologia para análise de vinho**. Brasília, DF: Embrapa informações Tecnológicas, 2010, 120 p.

SCHIAVO, D.; NEIRA, J.Y.; NÓBREGA, J.A. Direct determination of Cd, Cu and Pb in wines and grape juices by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 76, p. 1113-1118, 2008.

SOUZA, R.A. **Uso da espectrometria de emissão óptica em plasma de argônio com acoplamento indutivo na determinação de nutrientes e contaminantes inorgânicos em água de coco natural e industrializada**. 2003.71f. Dissertação (mestrado) Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SPAZIANI, M.; OLIVEIRA, P.V.; CADORE, S.; OLIVEIRA, E. Determinação de alguns constituintes inorgânicos em amostras de vinhos por espectrometria atômica: ICP OES e ETAAS. **Revista Analytica**, nº 20, p. 48-54, 2006.

UVIBRA (União dos Vitivinicultores do Brasil), disponível em: <http://www.academiadovinho.com.br/geografia/producao.htm>. Acesso em 15/08/2012.

VACCARI, N. F. S.; SOCCOL, M. C. H.; MASSASHI, G. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v.8, n.1, p. 71-83, 2009.

WHO. World Health Organization. Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF. CF/5 INF/. Netherlands, March 2011.

WOISKY, R. G.; SALANTINO, A. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**. v. 37, n. 2, p.99-105, 1998.

Capítulo 4

**Estudo da fração bioacessível e da fração dialisável de As, Cd, Cu e Pb em
vinhos brasileiros pelo método *in vitro***

Estudo da fração bioacessível e da fração dialisável de As, Cd, Cu e Pb em vinhos brasileiros pelo método *in vitro*

RESUMO

A extensão dos efeitos tóxicos causados por elementos potencialmente tóxicos não é governada pela concentração total, mas sim, pelas formas dos metais que podem ser eficazes para interagir como ligantes nos sítios biológicos. A biodisponibilidade de um elemento depende da capacidade e das formas físico-químicas em que o mesmo está presente no local de absorção para ultrapassar a barreira intestinal e ser potencialmente biodisponível. A absorção intestinal requer que essas formas sejam solúveis, sendo uma condição necessária, mas não suficiente. As técnicas *in vitro*, utilizadas desde meados de 1930, foram desenvolvidas na tentativa de estimar a disponibilidade de elementos inorgânicos considerados essenciais. Essa metodologia é capaz de quantificar a capacidade solúvel ou dialisável do nutriente, mas não a sua biodisponibilidade propriamente dita, uma vez que nem todo material solúvel ou dialisável é absorvido. Portanto, o método simula as condições fisiológicas, como também a sequência de eventos que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal. Embora não reproduzam na totalidade os fatores envolvidos na absorção e na utilização de nutrientes, estes métodos apresentam baixo custo relativo, rapidez e simplicidade na execução, tornando-se modelo importante no sentido de prever e sugerir estudos *in vivo*. Neste trabalho, foram estimadas a porcentagem da fração acessível (solúvel) e dialisável dos elementos arsênio, cádmio, cobre e chumbo em amostras de vinho tinto, branco e espumante através da simulação gastrointestinal, utilizando para separação dos elementos a centrifugação e o saco de diálise. Os resultados mostraram que para todos os elementos estudados as frações solúveis foram maiores que 37% e que as frações dialisáveis foram maiores que 43%, indicando a possibilidade desses elementos terem a capacidade de atravessar a barreira intestinal e serem absorvidos.

Palavras chave: fração solúvel e dialisável, bioacessibilidade, vinho, As, Cu, Cd, Pb.

Study of the bioaccessible and dialyzable fraction of As, Cd, Cu and Pb in Brazilian wines through *in vitro* method

ABSTRACT

It is acknowledged that the extension of the toxic effects caused by potentially toxic elements is not governed by total concentration but the forms of metals that may be efficient to interact with the binders in the biological sites. The bioavailability of an element depends on the capacity and on the physical-chemical form that the element presents in the absorption site to go through the intestinal barrier and be potentially bioavailable. Intestinal absorption requires these forms to be soluble, this being a necessary condition but not a sufficient one. The *in vitro* techniques, used since middle 30's, have been developed as an attempt to estimate the availability of inorganic elements considered as essential. This method is able to quantify the nutrient soluble or dialyzable capacity, but not its bioavailability itself, since not all soluble or dialyzable material is absorbed. Therefore, the method simulates the physiological environment as well as the sequence of events that occur during digestion in the gastrointestinal tract. Although it does not totally reproduce the involved facts in the absorption and use of nutrients, these methods are of low cost, fast and simple to be performed, thus becoming an important model in the sense of predicting and suggesting studies *in vivo*. This paper has estimated the percentage of accessible (soluble) and dialyzable fractions in the elements arsenic, cadmium, copper and lead in samples of red, white and fizzy wines through gastrointestinal simulation, using centrifugation and dialysis sack to separate the elements. The results showed that, for all the studied elements, the soluble fraction was greater than 37% and the dialyzable fraction was greater than 43%, indicating the possibility of these elements have the ability to cross the intestinal barrier and be absorbed it.

Key words: soluble and dialyzable fractions, bioaccessibility, wine, As, Cd, Cu and Pb

Capítulo 4

Introdução

Na avaliação de risco à saúde, a ingestão de alimentos é considerada a maior rota de exposição para muitos contaminantes, causada, principalmente, pela contaminação ambiental, industrial e também pelos processos de produção dos alimentos (VERSANTVOORT, 2005).

A ingestão de certa porção de um contaminante nem sempre reflete a real quantidade disponível para o organismo. Reconhece-se que a extensão dos efeitos tóxicos causados por elementos não é governado pela sua concentração total e sim pelas formas como os elementos podem interagir eficientemente com os sítios dos ligantes biológicos (VERSANTVOORT, 2005).

O termo biodisponibilidade tem sido definido de muitas maneiras, de acordo com a área de pesquisa e aplicação. A biodisponibilidade inclui dois conceitos importantes: bioacessibilidade e bioatividade.

A bioacessibilidade é definida como a fração do composto que é liberado de sua matriz no trato gastrointestinal, tornando-se assim disponível para a efetiva absorção intestinal, sendo concomitantemente levado para a corrente sanguínea (FERNÁNDEZ-GARCIA, 2009).

A bioatividade inclui eventos relacionados com a forma como o composto bioativo é transportado e atinge o tecido alvo, como ele interage com as biomoléculas, o

metabolismo ou a biotransformação que pode sofrer e a formação de biomarcadores e as respostas fisiológicas que provoca. A partir de estudos de bioatividade, pode-se realmente avaliar quais os efeitos benéficos ou maléficos de um determinado alimento à saúde em nível celular (FERNÁNDEZ-GARCIA, 2009).

A biodisponibilidade de um nutriente ou de um micronutriente é um processo dinâmico, influenciado por uma diversidade de fatores relacionados tanto à dieta quanto ao indivíduo, não podendo ser considerada propriedade exclusiva do alimento ou da dieta. Então, avalia o real valor nutricional de um alimento, em relação aos seus componentes essenciais ou tóxicos que são efetivamente absorvidos pelo organismo (COZZOLINO, 2007).

Cerca de 90% de toda a absorção de nutrientes ocorre no intestino delgado. Os outros 10% no estômago e no intestino grosso. Qualquer material não digerido ou não absorvido, deixado no intestino delgado, passa para o intestino grosso. O intestino delgado possui uma extensão de 2-6 m. Seu diâmetro é de cerca de 4 cm e possui três segmentos histologicamente pouco distintos: o duodeno, com cerca de 25 a 30 cm; o jejuno, com 2 m; e o íleo, com 3 a 4 m. O intestino delgado humano possui uma área absorptiva de aproximadamente 100.000 cm^2 , sem considerar a área de microvilosidades (EKMEKCIOGLU, 2002). A absorção no intestino delgado ocorre, preferencialmente, no duodeno e na porção proximal do jejuno (nos 100 cm iniciais) de sua extensão. A alta taxa de absorção centralizada nessa região ocorre porque essa superfície intestinal apresenta certas peculiaridades como: dobras de Kercking, vilosidades e microvilosidades que facilitam o processo de absorção dos nutrientes (BRANDON *et al.*; 2006).

A massa semi-líquida e disforme de alimento parcialmente digerido que passa ao longo do trato digestivo é chamada quimo (*chymos*, suco) (JACOB, 1983).

O processo de digestão de um nutriente/mineral no interior do sistema digestivo inicia na boca, onde ocorre a trituração do alimento e, devido à ação da amilase salivar, tem-se a primeira degradação do amido, o qual é convertido em maltose. Posteriormente, o bolo alimentar segue em direção ao estômago e, em seguida, ao intestino. Devido à produção de ácido clorídrico (HCl) o estômago possui uma elevada acidez, facilitando a conversão do pepsinogênio em pepsina, sendo esta empregada na degradação de proteínas, levando à produção de aminoácidos, oligopeptídeos e polipeptídeos. Após uma parte do alimento acidificado ser digerido no estômago, este é direcionado para o intestino delgado, onde enzimas e fluídos são adicionados ao quimo através do pâncreas e do fígado. A ação do bicarbonato, secretado pelo pâncreas, neutraliza o quimo acidificado, prevenindo danos à mucosa intestinal. O epitélio do intestino, juntamente com o pâncreas, secreta fluídos contendo enzimas (amilase, lipase, protease, peptidase) que agem na digestão de amido, proteínas, carboidratos e gorduras. O fígado adiciona bile, que é uma mistura complexa de sais biliares, e agentes que auxiliam na digestão de gorduras. Ao final do processo tem-se a absorção no intestino delgado dos produtos gerados por esta sequência de quebras enzimáticas, bem como a absorção de vitaminas e sais minerais. A água é absorvida no intestino grosso e, logo após, tem-se a defecação. Após este processo complexo de digestão, o nutriente/elemento poderá ser absorvido, metabolizado e utilizado na manutenção do organismo (SILVERTHORN, *et al.* , 2003).

Metodologias aplicadas para a determinação da bioacessibilidade:

Na pesquisa, vários métodos têm sido utilizados para estimar a biodisponibilidade de nutrientes, entre eles: método *in vitro*, *in vivo* e método por balanço de massa, além de medidas do nutriente no plasma ou ainda da atividade de enzimas, após a suplementação do nutriente (COZZOLINO, 2006).

Os testes *in vivo* empregam cobaias (ratos, coelhos, porcos e macacos) e humanos, e são muito usados nas áreas biomédica e farmacêutica, para determinar a biodisponibilidade efetiva de medicamentos, drogas ou de materiais contaminados, ao serem administrados diretamente na dieta de cobaias (BOSSO& ENZWEILLER, 2008).

A técnica do balanço de massa consiste em determinar a quantidade absorvida através da medição da diferença entre as quantidades ingeridas e excretadas do composto nutriente ou bioativo. A técnica de bioensaios (bioatividade) consiste na monitorização do aumento no plasma / soro da concentração do composto nutriente ou bioativo. Estas abordagens têm sido aplicadas em animais de experimentação ou seres humanos para determinar a absorção de carboidratos, minerais, vitaminas, fitoquímicos e outros. Os estudos *in vivo* em humanos é a técnica padrão para determinar a biodisponibilidade de nutrientes alimentares ou compostos bioativos, apesar de algumas abordagens experimentais serem tecnicamente inviáveis (FERNANDES-GARCIA, 2009).

As técnicas *in vitro*, utilizadas desde meados de 1930, foram desenvolvidas na tentativa de estimar a disponibilidade de elementos inorgânicos considerados essenciais. Essa metodologia é capaz de quantificar a capacidade solúvel ou dialisável do nutriente, mas não a sua biodisponibilidade propriamente dita, uma vez que nem todo nutriente ou micronutriente solúvel ou dialisável é absorvido. Portanto, o método simula as condições fisiológicas, como também a sequência de eventos que ocorrem durante a digestão no trato gastrintestinal. Embora não reproduza na totalidade os fatores envolvidos na absorção e na utilização de nutrientes, estes métodos apresentam baixo custo relativo, rapidez e simplicidade na execução, tornando-se modelo importante no sentido de prever e sugerir estudos *in vivo*.

A simulação mais complexa e próxima da composição real do suco gastrintestinal humano é apresentada por Versantvoort *et al.* (2004), embora este modelo não considere a atividade dos micro-organismos presentes nas partes superior (boca + estômago) e inferior (duodeno + jejuno + íleo) do sistema digestivo humano (BOSSO, 2008).

Em modelos de digestão *in vitro* o processo de digestão no trato gastrintestinal é simulado de uma maneira simplificada pela aplicação das condições fisiológicas, ou seja, baseados em composição química, pH dos fluidos digestivos e períodos de tempo de residência típico para cada etapa. A bioacessibilidade do contaminante pode ser determinada em cada etapa, no entanto, a absorção dos nutrientes ocorrem em uma pequena área do intestino, por conseguinte, a bioacessibilidade é principalmente determinada apenas no quimo da fase do intestino delgado (FERNÁNDEZ-GARCIA, 2009).

O modelo *in vitro* de digestão descreve um procedimento de três etapas que simula os processos digestivos na boca, estômago e intestino delgado. Em cada uma das etapas, a matriz é incubada a 37 ° C, durante um tempo previamente estabelecido para cada etapa. A digestão é iniciada pela adição de saliva artificial e, posteriormente, por sucos gástricos e fluidos intestinais que são adicionados para simular os processos digestivos no estômago e no intestino delgado, respectivamente (VERSANTVOORT, 2005). A etapa do intestino delgado pode ser simulada por diversos modelos, entre eles o uso de um saco de diálise (membrana) com porosidade conhecida, ou uso de modelos baseados em cultura celular para a simulação da absorção do composto de interesse no epitélio intestinal, com destaque para a utilização das células Caco-2. As células Caco-2 são extraídas do adenocarcinoma de cólon humano, região do duodeno. Após sua cultura em filtros específicos (Transwell®) proporcionam uma barreira física e bioquímica para a passagem de íons e de pequenas moléculas (MAURER, 2010).

Foi reportado por Coles *et al.* (2005) o uso de uma única enzima purificada para a simulação do teste *in vitro*, o que facilitaria a padronização do método e a comparação de resultados entre laboratórios, porém a digestão de um nutriente é influenciada pela digestão de outros nutrientes, então, o uso da mistura de diversas enzimas nos diferentes fluidos torna o experimento mais realístico e mais reprodutível (HUR *et al.*; 2011).

O volume de fluidos disponíveis no trato gastrointestinal para um composto se dissolver é dependente do volume de fluidos ingeridos, secreções e fluxo de água através da parede do intestino. Cerca de 2-3 litros são ingeridos por dia, o que está de acordo com o consumo médio de um adulto. O volume ingerido é recebido, juntamente com as secreções

endógenas de saliva (\approx 1L), sucos gástricos (\approx 2L), sucos pancreáticos (\approx 2L) e bile (\approx 1L), pela primeira porção do duodeno. Estas secreções vão totalizar cerca de 6 litros por dia e são essenciais para a digestão normal luminal dos gêneros alimentícios. A maioria destes sumos é secretada pós-prandial. Além disso, o intestino segrega cerca de 1-2 litros por dia, para proteger as células epiteliais com muco e para melhorar o contato entre o conteúdo luminal e as células epiteliais. Este líquido é rapidamente reabsorvido e cerca de 7-8 litros já é absorvido no intestino delgado. Apenas 1,5 litros são apresentados para o cólon por dia, dos quais cerca de 1,3 litros são absorvidos, com o restante para a formação de um dos componentes das fezes (VERSANTVOORT, 2004).

Assim, contabilizando a absorção dos sucos digestivos durante o trânsito, uma proporção em volume de 1,5 (ingestão de alimentos): 1 (saliva): 2 (suco gástrico): 2 (suco pancreático): 1 (bile) foi proposto para o modelo *in vitro* de digestão (VERSANTVOORT, 2004).

O objetivo deste trabalho foi estudar a fração bioacessível e a fração dialisável dos elementos As, Cd, Cu e Pb em vinhos brasileiros, utilizando o método *in vitro*.

Material e métodos

Amostras

Foram estudadas amostras de vinhos brasileiros adquiridos no comércio. Foram selecionadas 01 amostra de vinho tinto, 01 de vinho branco e 01 de espumante. As amostras foram escolhidas considerando a concentração dos elementos estudados, de forma que não

fosse necessário adicionar os elementos nas amostras. Porém, não foi possível obter amostras dos diferentes tipos de vinho que tivessem a mesma proporção para todos os elementos.

Reagentes e padrões

Para a determinação dos elementos As, Cd, Cu e Pb foram utilizados os seguintes reagentes e padrões:

Ácido nítrico (65%) (Merck), previamente destilado em destilador *sub-boiling*, peróxido de hidrogênio (30% m/m, MERCK), modificadores químicos nitrato de paládio 1000 g L⁻¹ (Perkin Elmer), nitrato de magnésio 1000 g L⁻¹ (Perkin Elmer), dihidrogeno fosfato de amônio em HNO₃ (Perkin Elmer).

Padrões Titrisol (Merck ou Carlo Erba) para absorção atômica para cádmio (CdCl₂), cobre (CuCl₂), arsênio (As₂O₅) e chumbo Pb (NO₃)₂ preparados em balões calibrados em meio de ácido nítrico diluído a 1% v/v nas concentrações de 1000 mg L⁻¹. Diariamente, eram preparadas soluções de trabalho de 100 µg L⁻¹ para cobre, chumbo, cádmio e arsênio. O diluente dessas soluções era HNO₃ 0,2% v/v.

Foi utilizada uma solução de lavagem para o amostrador automático com 1% v/v de HNO₃ e 0,2% de Triton –X100 (Sigma/Aldrich).

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtidas pelo sistema MilliQ – (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Os balões utilizados para o preparo das curvas analíticas eram confeccionados com Pyrex[®] grau A.

Toda vidraria e frascos de polietileno foram lavados com detergente neutro e deixados em banhos com ácido nítrico 20% v/v por pelo menos 24 horas e, em seguida, enxaguados com água desionizada antes do uso.

Para a simulação do modelo de digestão *in vitro* foram utilizados os seguintes reagentes e bioativos:

Ácido úrico 99% - ref. U 2625 (Sigma, Zwijndrecht, Holanda), α -amilase de *Aspergillus oryzae* – ref. 86250 (Sigma, Zwijndrecht), Pepsina de mucosa gástrica de suínos – ref. P7000 (Sigma, Zwijndrecht), Albumina bovina fração V em pó – ref. (Sigma, Zwijndrecht, The Netherlands), Lipase tipo II em estado bruto obtida de pâncreas suíno – ref. L3126 (Sigma, Zwijndrecht), Mucina tipo II - ref. M 2378 (Sigma, Zwijndrecht), Pancreatina de pâncreas suíno – ref. P1625 (Sigma, Zwijndrecht), Extrato de bile suíno ref. B8631 (Sigma, Zwijndrecht), Ureia (Sigma, Zwijndrecht), Glicose (Sigma, Zwijndrecht), Ácido glicurônico (Sigma, Zwijndrecht), Cloreto de glicosamina (Sigma, Zwijndrecht).

Sais de KCl (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), KSCN (Synth, Diadema, Brasil), NaH₂PO₄ (Cinética Química), NaSO₄ (Synth, Diadema, Brasil), NaCl (Carlo Erba), NaHCO₃, (Merck, Darmstadt, Alemanha), CaCl₂ (Cinética Química), KH₂PO₄ (Cinética Química), MgCl₂ (Synth, Diadema, Brasil) HCl a 37% (g/g) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Saco para diálise, de 21 mm de diâmetro, 12 kDa - ref. D6066-25EA (Sigma, Holanda).

Equipamentos

O instrumento utilizado para a determinação dos elementos inorgânicos foi um espectrômetro de absorção atômica, com atomização eletrotérmica em forno de grafite (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA; modelo AAnalyst 600), com corretor de fundo baseado no efeito Zeeman, amostrador automático (modelo AS-800), tubos de grafite com aquecimento transversal e plataforma de L'vov integrada.

Como fontes de radiação foram utilizadas as seguintes lâmpadas: Lâmpada monoelementares de descarga sem eletrodo (EDL) para detecção de As, Pb e Cd e lâmpada de catodo oco (HCL) para a determinação de Cu. A vazão de argônio como gás de purga foi de 250 mL min⁻¹. Esse gás foi interrompido durante a etapa de atomização.

Foram também utilizados banho de Ultrassom – modelo USC 1400, 120 W (Unique), banho de água Dubnoff microprocessado – Modelo Q226 M - (Quimis Aparelhos Científicos Ltda.), São Paulo Brasil, centrífuga de tubos – Quimis - Modelo Q222 T/TM - (Quimis Aparelhos Científicos Ltda.), São Paulo Brasil, medidor de pH de leitura digital com precisão 0,01 unidades com eletrodo combinado.- Hanna , modelo 200, sistema de digestão por radiação micro-ondas - Modelo Milestone, Sorisole Ethos Milestone e sistema de ultrapurificação de água Milli Q – (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Método

Procedimento para digestão *in vitro*

Procedimento para determinação da fração bioacessível (solúvel)

No modelo de digestão *in vitro* utilizado, o processo de digestão no trato gastrointestinal em humanos é simulado de uma maneira simplificada pela aplicação de condições fisiologicamente determinadas, como a composição química dos fluídos digestivos, períodos de tempo de residência de incubação e pH para cada etapa de digestão. O método utilizado foi proposto por Versantvoort, 2004 com algumas modificações, como a adição de uma etapa de banho de gelo com a finalidade de diminuir a atividade enzimática.

Este modelo simula três etapas do processo de digestão, boca, estômago e intestino delgado.

Todo o experimento foi realizado em triplicata para as amostras e para o branco analítico (água desionizada).

Em tubo “falcon” de 50 mL foram pipetados 10,0 mL de vinho e, em seguida, foram adicionados 6,0 mL de fluido salival. A mistura foi homogeneizada e colocada no banho de água de Dubnoff, à 37°C, com agitação por 5 minutos. O pH medido nesta etapa encontrava-se em torno de 6,80.

Então, 12,0 mL de suco gástrico foram adicionados às amostras e brancos e colocados novamente no banho de água de Dubnoff por 2 horas, à 37°C. O pH medido estava entre 2,0 - 2,5.

Finalmente, foram adicionados 12,0 mL de suco duodenal, 6,0 mL de suco biliático e 2,0 mL de bicarbonato de sódio nas amostras e nos brancos. As amostras voltaram para o banho de água de Dubnoff à 37°C com uma velocidade de agitação de aproximadamente 80 ciclos por minuto, por mais 2 horas.

As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 2000 rpm e, em seguida, colocadas em um banho de gelo por 30 minutos, com a finalidade de paralisar a ação das enzimas e evitar a contínua sedimentação dos reagentes. O sobrenadante (quimo) foi separado da fase precipitada e transferido para outro tubo de “falcon” de 50 mL. O quimo então foi tratado através da mineralização ácida assistida por radiação micro-ondas.

Procedimento para a mineralização ácida do quimo (fração bioacessível) por micro-ondas:

Considerando que, após o procedimento de digestão e a separação por centrifugação, o sobrenadante obtido (quimo) apresentou-se bastante rico em matéria orgânica em função da adição dos reagentes da digestão, foi necessária uma etapa de pré-tratamento antes da determinação por GF AAS dos elementos de interesse. Devido às vantagens que a mineralização ácida assistida por radiação micro-ondas apresenta, a mesma foi selecionada para esta finalidade.

Num volume de 5 mL de amostra (quimo) foram adicionados 2 mL de HNO₃ a 65% v/v e 1,5 mL de peróxido de hidrogênio 30% m/m. Os frascos das amostras e do branco, em triplicata, foram fechados e submetidos ao seguinte programa térmico no sistema de mineralização por micro-ondas (Tabela 1).

Tabela 1. Programa de aquecimento utilizado no forno micro-ondas para o tratamento do quimo de vinho obtido no ensaio de digestão *in vitro*.

Etapa	Rampa (min)	Permanência (min)	Temperatura (°C)
1	6:00	4:00	80
2	3:00	5:00	130
3	5:00	10:00	200

Após o resfriamento do sistema, os frascos foram abertos dentro da capela, as amostras foram transferidas para balões de 10,0 mL e o volume completado com água desionizada.

Procedimento para determinação da fração dialisável:

Todo o experimento foi feito em triplicata para as amostras e para o branco analítico. O método utilizado foi proposto por Versantvoort, 2004 .

Em tubo “falcon” de 50 mL foram pipetados 10,0 mL de vinho e adicionados 6,0 mL de saliva. A mistura foi homogeneizada e colocada no banho de água de Dubnoff , à 37°C, com agitação constante por 5 minutos. O pH medido estava em torno de 6,8. Então, 12,0 mL de suco gástrico foram adicionados às amostras e aos brancos e colocados

novamente no banho Dubnoff por 2 horas, a 37°C. Nesta etapa, o pH medido estava compreendido entre 2-2,5.

Finalmente, foram adicionados 12,0 mL de suco duodenal, 6,0 mL de suco biliático e 2,0 mL de bicarbonato de sódio. As amostras voltaram para o banho de água de Dubnoff à 37°C, com agitação, por mais 30 minutos.

Após esse período todo o conteúdo da digestão (50 mL), foi colocado dentro de um saco de diálise de 12 kDa, previamente ativado (banho de água por 10 minutos), fechado nas extremidades e colocados em bequer de 250 mL, contendo água deionizada (205,5 mL) e bicarbonato de sódio (4,5 mL), volume suficiente para atingir pH 7,4 (pH fisiológico). As amostras voltaram para o banho de água de Dubnoff, à 37°C, com uma velocidade de agitação de aproximadamente 80 ciclos por minuto, por mais 2 horas.

Após este período, os sacos de diálise foram retirados dos bequeres e o dialisado (volume externo da membrana) foi recolhido em frasco apropriado para a determinação dos elementos.

Uma representação esquemática da digestão *in vitro* está apresentada na Figura 1. A saliva e os sucos digestivos foram preparados artificialmente.

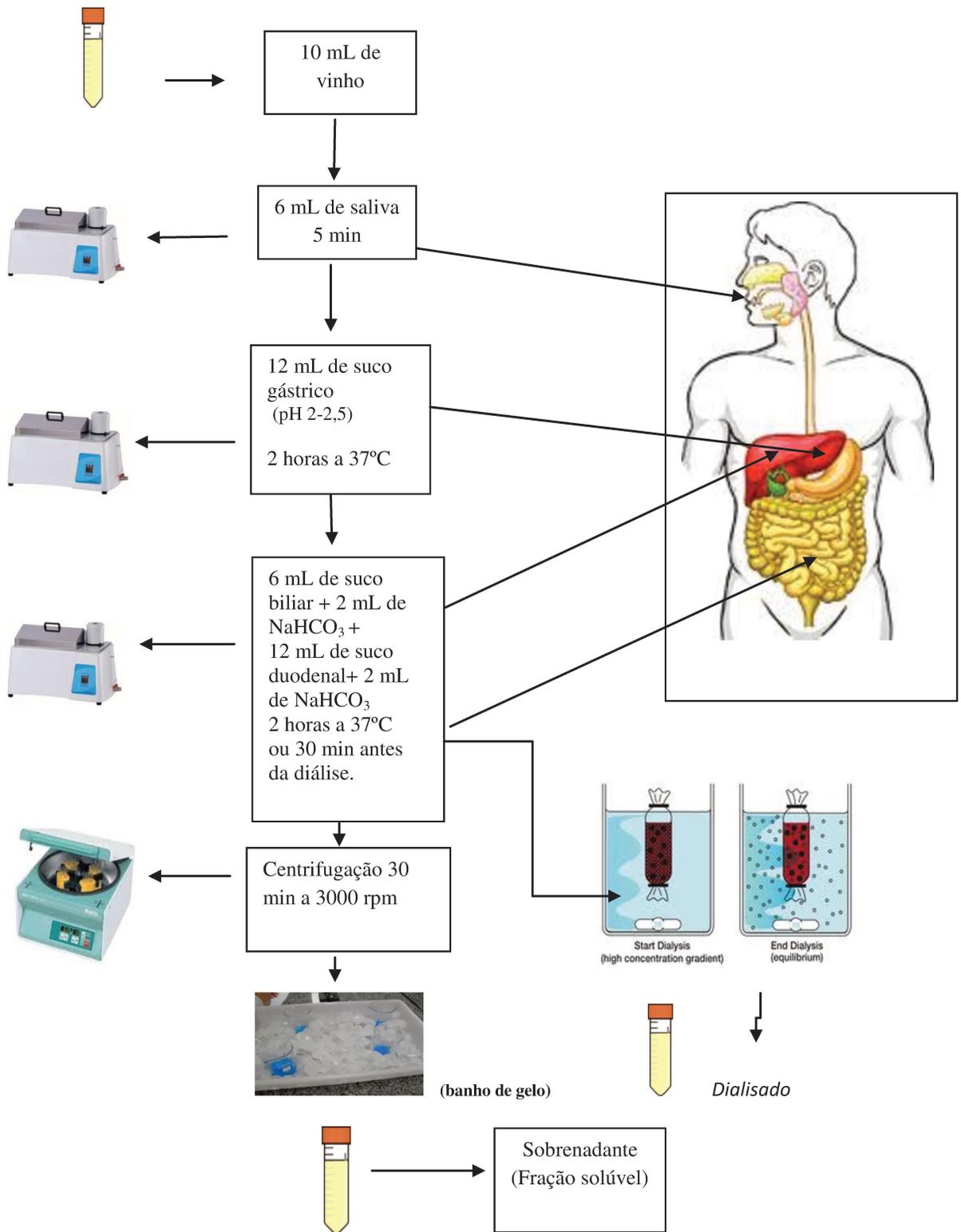


Figura1. Representação esquemática do modelo de digestão *in vitro*.

Tabela 2. Fluidos sintéticos para o modelo *in vitro*, composição e concentração.

	Fluido Salival	Fluido Gástrico	Fluido Duodenal	Fluido Biliático
Soluções inorgânicas	10 mL KCl 89,6 g L ⁻¹ 10 mL KSCN 20 g L ⁻¹ 10 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g L ⁻¹ 10 mL Na ₂ SO ₄ 57 g L ⁻¹ 1,7 mL NaCl 175,3 g L ⁻¹ 20 mL NaHCO ₃ 84,7 g L ⁻¹	15,7 mL NaCl 175,3 g L ⁻¹ 3,0 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g L ⁻¹ 9,2 mL KCl 89,6 g L ⁻¹ 18 mL CaCl ₂ .2 H ₂ O 22,2 g L ⁻¹ 10 mL NH ₄ Cl 30,6 g L ⁻¹ 6,5 mL HCl 37% g/g	40 mL NaCl 175,3 g L ⁻¹ 40 mL NaHCO ₃ 84,7 g L ⁻¹ 10 mL NaH ₂ PO ₄ 8 g L ⁻¹ 6,3 mL KCl 89,6 g L ⁻¹ 10 mL MgCl ₂ 5 g L ⁻¹ 180 µL HCl 37% g/g	30 mL NaCl 175,3 g L ⁻¹ 68,3 mL NaHCO ₃ 84,7 g L ⁻¹ 4,2 mL KCl 89,6 g L ⁻¹ 150 µL HCl 37% g/g
Soluções Orgânicas	8 mL uréia 25 g L ⁻¹	10 mL glicose 65 g L ⁻¹ 10 mL ácido glicurônico 2 g L ⁻¹ 3,4 mL uréia 25 g L ⁻¹ 10 mL cloreto de glucosamina 33 g L ⁻¹	4 mL uréia 25 g L ⁻¹	10 mL uréia 25 g L ⁻¹
Bioativos (adicionar a mistura de orgânicos e inorgânicos)	290 mg α-amilase 15 mg ácido úrico 25 mg mucina	1 g BSA 2,5 g pepsina 3g mucina	9 mL CaCl ₂ .2 H ₂ O 22,2 g L ⁻¹ 1 g BSA 9 g pancreatina 1,5 g lipase	9 mL CaCl ₂ .2 H ₂ O 22,2 g L ⁻¹ 1,8 g BSA 30 g bile
pH	6,8 ± 0,2	1,3 ± 0,2	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

A Tabela 2 descreve os fluidos sintéticos, bem como sua composição e concentração para o modelo *in vitro* usado neste trabalho.

As soluções orgânicas e inorgânicas foram completadas para 500 mL com água desionizada. Os reagentes bioativos de origem bovina, suína e fúngica foram adicionados após a mistura dos compostos orgânicos e inorgânicos. O pH de cada etapa foi medido e controlado. Todos os reagentes foram preparados no momento do uso.

Resultados e discussão

Foram determinadas as concentrações totais de As, Cd, Cu e Pb nos vinhos usando a técnica de GF AAS e, após a aplicação do modelo de digestão *in vitro*, foram determinadas as porcentagens das frações solúveis e também das frações dialisáveis destes elementos nas amostras de vinho tinto, branco e espumante. Neste trabalho consideramos a fração solúvel a porcentagem do elemento que é capaz de se separar da matriz (quimo). A fração dialisável corresponde a porcentagem do elemento que se separou da matriz e foi capaz de atravessar a membrana de diálise. Para avaliar a porcentagem de analito dialisável foi necessário utilizar um saco de diálise na última fase do modelo de digestão. Os sacos de diálise utilizados neste estudo, têm uma permeabilidade em particular definida pelo termo “*molecular cut-off*” (MCO), que corresponde à massa da maior proteína globular que pode passar através dos poros da membrana que constitui o saco de diálise. Em geral, as proteínas que possuem uma massa maior que valor-MCO (12 kDa) serão retidos pela membrana. O valor-MCO é aproximadamente proporcional ao raio do poro da membrana. As características de permeabilidade das membranas artificiais, principalmente determinadas pelos valores MCO, devem corresponder às condições *in vivo* (EKMEKCIOGLU, 2002). Este processo baseia-se no fato de que os compostos presentes no extrato gastrointestinal devem ser dialisados para atingir uma condição de equilíbrio entre a parte interna e externa do saco de diálise, simulando o processo de transporte do analito para o organismo.

A fração solúvel (bioacessível) e dialisável mássica dos elementos estudados foram calculadas de acordo com a equação (1):

Equação 1:

$$\text{Fração bioacessível ou dialisável (\%, m/m)} = \frac{\text{massa do elemento solúvel}}{\text{massa total do elemento}} \times (100)$$

onde a massa do elemento solúvel refere-se à massa do elemento presente no quimo ou no dialisado obtido no método de digestão *in vitro* e a massa total do elemento refere-se à massa total do elemento submetido ao ensaio, calculada com a determinação da concentração total do analito na amostra.

As frações potencialmente assimiláveis de arsênio, cádmio, cobre e chumbo, presentes no vinho digerido, foram determinadas após a centrifugação, como fração solúvel (bioacessível), e as frações que ultrapassaram as membranas do saco de diálise após a aplicação do modelo de digestão foram determinadas como fração dialisável.

As Tabelas 3 a 6 apresentam os teores totais e as frações bioacessíveis (solúveis) e dialisadas obtidas para os elementos cobre, chumbo, cádmio e arsênio, respectivamente.

Cobre

Tabela 3. Teor total, fração solúvel e fração dialisável do cobre nos vinho tinto, branco e espumante.

Cobre	Vinho tinto	Vinho branco	Espumante
Teor total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1629,0 \pm 14,0	55,9 \pm 0,80	241,8 \pm 2,3
Fração solúvel			
%	83 \pm 4	80 \pm 23	86 \pm 13
Dialisável			
%	10 \pm 0,6	10 \pm 1	25 \pm 3

Os valores obtidos para os vinhos tinto, branco e espumante demonstraram que 80% do cobre presente provavelmente estava na forma solúvel, porém com relação à fração dialisável as porcentagens foram bem menores e iguais para os vinhos tinto e branco (10%) (Figura 2). Este fato pode estar relacionado com algumas evidências citadas na literatura de que o cobre e o chumbo presentes nos vinhos estão principalmente associados a macromoléculas maiores que 30 kDA, e, portanto, não ultrapassam os poros do saco de diálise. (AZENHA, 2000).

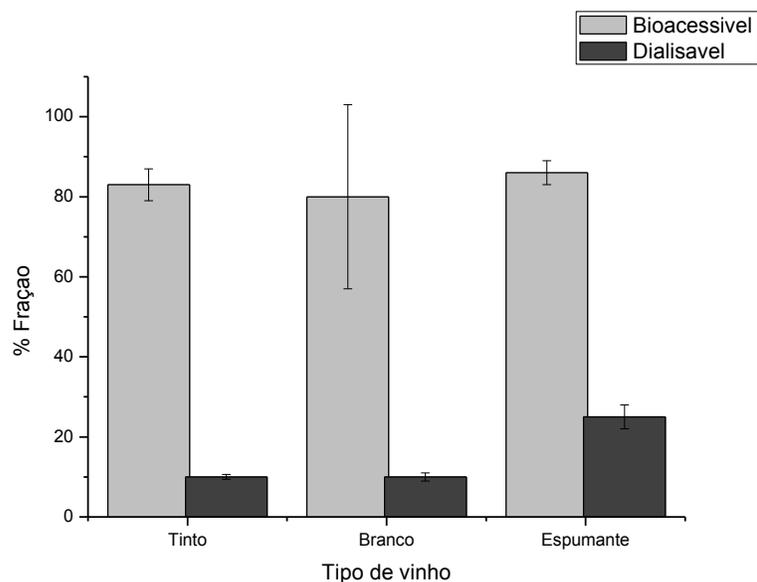


Figura 2. Fração bioacessível (solúvel) e dialisável do cobre nas amostras de vinho tinto, branco e espumante.

A biodisponibilidade de um elemento depende da capacidade da sua forma físico-química, que está ligada ao sítio de absorção, de ultrapassar a barreira intestinal. A absorção intestinal requer que as formas sejam solúveis, sendo uma condição necessária, mas não suficiente. O elemento que pode ultrapassar a barreira intestinal é potencialmente biodisponível.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, Genebra), as formas solúveis de cobre são absorvidas a partir do intestino com uma eficiência usualmente na faixa de 40 a 60%. Alguns fatores podem inibir a absorção de cobre a partir do lúmen intestinal, reduzindo a sua biodisponibilidade geral; a forma química na qual o cobre se encontra afeta acentuadamente sua absorção. As espécies altamente solúveis de elementos metálicos, tais como o sulfato ou nitrato, são prontamente absorvidas, enquanto outras formas insolúveis,

como o óxido de cobre, são pouco absorvidas e as formas complexas como a porfirina de cobre não são absorvidas.

O aumento do pH reduz a absorção do cobre. Isto se deve provavelmente a diminuição de Cu^{+2} e um predomínio de hidróxido de cobre (II), $[\text{Cu}(\text{OH})_2]$, que tende a precipitar. É conhecido que a fração de cobre presente em grãos de cereais pode formar quelatos com lecitinas e glicoproteínas, que se dissociam em valores baixos de pH e formam complexos insolúveis. Um complexo de cobre, como o cobre metionina, é mais facilmente absorvido do que o cobre na forma de sais inorgânicos. Cisteína e ácido ascórbico, em contrapartida, podem reduzir a biodisponibilidade de cobre, provavelmente através da redução de $\text{Cu}(\text{II})$ para $\text{Cu}(\text{I})$ (MENEZES, 2010).

Chumbo

A solubilidade das diferentes espécies de chumbo depende do pH do meio. Em pH ácido (1 a 5), como o encontrado no estômago humano, muitas espécies de chumbo são solúveis, e por isto a ingestão de alimentos, solo ou poeiras contaminadas pode resultar na absorção do chumbo. A absorção do chumbo ocorre no estômago (em menor escala) e no duodeno, desde que as condições sejam favoráveis. O elemento deve estar solúvel, na sua forma livre (Pb^{2+}) ou complexada por aminoácidos, ácidos ou sais orgânicos e pelos componentes da bile. Desta forma, é transportado através da parede epitelial, onde pode ser absorvido e entrar na circulação sanguínea (BOSSO, 2008).

Neste estudo, os valores obtidos para as frações variaram de 52 a 89% para a fração solúvel e de 43 a 80% para a fração dialisável, como mostram os dados da Tabela 4, diferentemente do que foi reportado por Azenha *et al.*, em 2000, quando determinou as frações solúveis de chumbo em vinhos de Portugal e obteve 74 a 77% para os vinhos brancos e 36 a 39% para os vinhos tintos, utilizando um método modificado descrito por Crews *et al.*, 1986. Porém, este resultado pode ser devido à diferença do método utilizado quanto a composição dos sucos e fluidos digestivos e também pelas diferenças da composição dos vinhos estudados.

Tabela 4. Teor total, fração solúvel e fração dialisável de chumbo nos vinhos tinto, branco e espumante.

Chumbo	Vinho tinto	Vinho branco	Espumante
Teor total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	22,0 \pm 0,2	30,7 \pm 0,8	23,6 \pm 0,3
Fração solúvel	83,0 \pm 4	52 \pm 2	89 \pm 27
%			
Dialisável	80 \pm 15	43 \pm 8	60 \pm 15
%			

A biodisponibilidade média de chumbo presente numa dieta comum (alimentos e água) de crianças varia de 40 a 53% e em adultos de 7 a 15%. Para a ingestão de solos e poeiras, a EPA (EUA) propõe uma biodisponibilidade média de Pb em torno de 30%,

enquanto para água e a dieta ela é de 50%. Estes resultados são provenientes de testes *in vivo* executados com porcos, que viviam em solos contaminados (OOMEN *et al.*, 2003).

Estudos realizados por McKinnon e Scollary (1997) demonstraram que a maioria do Pb presente nos vinhos é encontrado complexado com moléculas cuja massa molecular é superior a 30 kDa. Os taninos condensados foram identificados como os ligantes mais prováveis para Pb. A concentração de taninos nos vinhos tintos é geralmente maior do que nos vinhos brancos. Estes compostos polifenólicos são considerados como um fator anti-nutricional, porque eles podem diminuir a digestibilidade dos nutrientes. Peaslee e Einhelling (1977), mostraram que os taninos inibem a bioacessibilidade do chumbo de alimentos em estudos realizados em camundongos.

Os valores de polifenóis totais encontrados para as amostras estudadas foram: espumante 1.540 mg L⁻¹, vinho tinto 1.421 mg L⁻¹ e vinho branco 1.359 mg L⁻¹ e a fração dialisável dessas amostras foram espumantes (60%), vinho tinto (80%), vinho branco (43%). Porém, esses teores representam os polifenóis totais onde outras moléculas estão presentes, como as antocianinas e os flavonóides entre outras, e não somente o teor de taninos, não permitindo dessa maneira a relação entre teor total de polifenóis e fração dialisável.

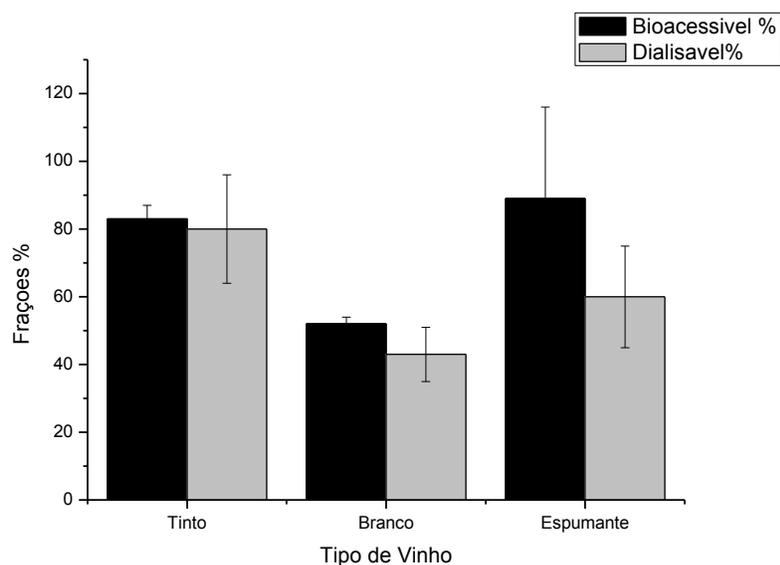


Figura 3. Fração bioacessível (solúvel) e dialisável do chumbo nas amostras de vinho tinto, branco e espumante.

Observa-se na Figura 3, que a fração solúvel de chumbo nos vinhos foi ligeiramente maior que a fração dialisável e, também, que a capacidade de permeabilidade através da membrana do saco de diálise independe da concentração total do elemento, ou seja, na Tabela 4 observa-se que o vinho branco apresentou maior concentração total de chumbo, porém a porcentagem da fração solúvel e dialisável foi menor que os outros vinhos que apresentaram menor concentração total.

Cádmio

Analisando a Tabela 5 e a Figura 4, observamos uma alta porcentagem da fração dialisável do cádmio, indicando que grande parte do cádmio presente nas amostras de vinho provavelmente estaria na sua forma livre, ou foi liberada através da lise ocasionada com a presença das enzimas adicionadas no procedimento de digestão *in vitro*. Outra possibilidade é que cádmio poderia estar ligado às moléculas de baixa massa molecular, como alguns aminoácidos que atravessariam os poros do saco de diálise.

Tabela 5. Teor total, fração solúvel e fração bioacessível de cádmio nos vinho tinto, branco e espumante.

Cádmio	Vinho tinto	Vinho branco	Espumante
Teor total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,02 \pm 0,10	1,40 \pm 0,02	1,40 \pm 0,09
Fração solúvel			
%	100 \pm 12	37 \pm 6	84 \pm 24
Fração dialisável			
%	124 \pm 1	102 \pm 10	107 \pm 10

Observa-se, também, que as amostras de vinho branco e de espumante mostram o mesmo teor para o cádmio total. Entretanto, os resultados da fração solúvel e da dialisável foram diferentes, demonstrando que os fatores que envolvem a capacidade de solubilidade e permeabilidade dependem da composição da amostra.

A contaminação de solos por cádmio é atribuída ao uso de fertilizantes fosfatados que contêm cádmio em sua composição, considerando sua rápida distribuição no meio ambiente, devido a sua alta solubilidade em água.

Quando presente em solos, o cádmio acumula-se nas plantas e, como consequência, vegetais e cereais representam a maior fonte de cádmio na dieta humana.

Como o cádmio não exerce nenhuma função essencial no metabolismo das plantas, estas tentam evitar sua absorção. Porém, a absorção depende de vários fatores, como a concentração do elemento metálico no solo e o pH.

Uma possível explicação para a acumulação de cádmio em plantas (videiras) é a sua afinidade por grupos tióis. Acredita-se que o cádmio se ligue a grupos tióis presentes em proteínas e enzimas, podendo causar inibição de suas atividades e/ou interferir em reações enzimáticas de óxido-redução. Outra possível rota de acumulação é a similaridade entre o íon Cd^{2+} e íons que atuam como co-fatores de enzimas, como Zn^{2+} e Fe^{2+} , por exemplo (DALCORSO, 2008).

Com relação ao metabolismo, pouco se sabe sobre o que acontece com o Cd após sua absorção pelo organismo humano. Acredita-se que uma vez absorvido, o Cd se ligue à proteína albumina, sendo transportado através da corrente sanguínea. No fígado, a presença de Cd induziria a produção de metalotioneína, formando o complexo Cd-metalotioneína pela ligação do Cd com os resíduos de cisteína presentes nesta proteína. Acredita-se que a ligação intracelular do Cd à proteína metalotioneína em tecidos possa evitar a ação tóxica do Cd no organismo humano. Até o momento, todos os efeitos nocivos do Cd são associados ao Cd não complexado, o que pode acontecer mediante a ingestão de altas concentrações deste contaminante (WHO, 1992).

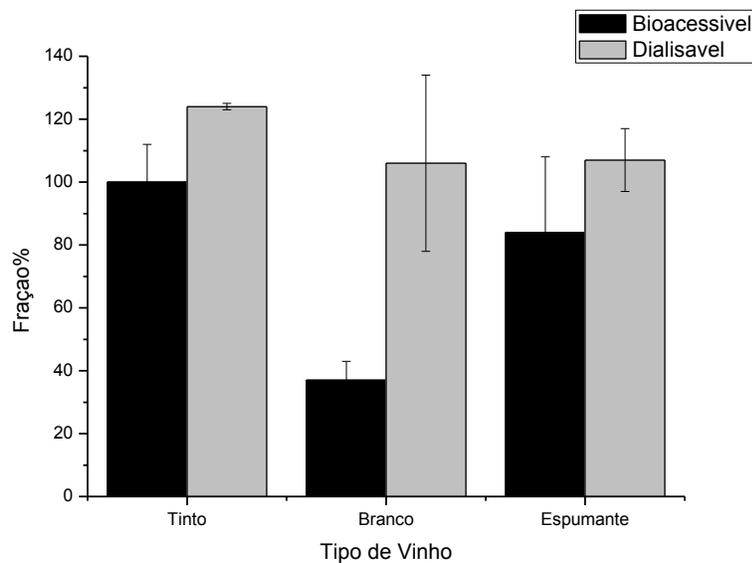


Figura 4. Fração bioacessível (solúvel) e dialisável do cádmio nas amostras de vinho tinto, branco e espumante.

Arsênio

Muitos estudos têm abordado o que acontece após a ingestão das espécies de arsênio e como estas são biotransformadas no organismo humano para desencadear os possíveis efeitos tóxicos.

Uma vez ingerido, acredita-se que espécies de arsênio inorgânico [As(III) e As(V)] sofram reações de metilação, processo que ocorre principalmente no fígado, levando à formação de espécies de monometilarsenatos [MMA(III) e MMA(V)], dimetilarsenatos [DMA(III) e DMA(V)] e metabólitos trimetilados [TMA(III) e TMAO(V)].

O processo de metilação foi considerado por muitos anos como um processo de desintoxicação do organismo devido à baixa toxicidade das espécies de arsênio metiladas (ROY, 2002). No entanto, hoje em dia tal consideração não é mais totalmente aceita, já que estudos recentes têm apontado para a alta toxicidade de algumas espécies metiladas trivalentes de arsênio (DOPP, 2010).

Observa-se na Tabela 6 e na Figura 5, que não foi possível determinar as frações solúveis e dialisáveis no vinho tinto, por esse apresentar teor total de arsênio muito baixo ($4,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Para os vinhos branco e espumante foi possível obter as frações solúveis e dialisáveis, porém não foi possível comparar os teores encontrados com a literatura porque as matrizes estudadas citadas são bem diferentes do vinho e a composição da matriz exerce um efeito bastante significativo na solubilidade dos elementos.

Tabela 6. Teor total, fração solúvel e fração bioacessível de arsênio nos vinho tinto, branco e espumante.

Arsênio	Vinho tinto	Vinho branco	Espumante
Teor total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$4,0 \pm 0,1$	$17,4 \pm 0,4$	$27,7 \pm 0,8$
Fração solúvel	ND		
%		62 ± 16	99 ± 2
Dialisável	ND		
%		69 ± 10	89 ± 8

ND – Valor não determinado, devido a baixa concentração total de arsênio no vinho tinto

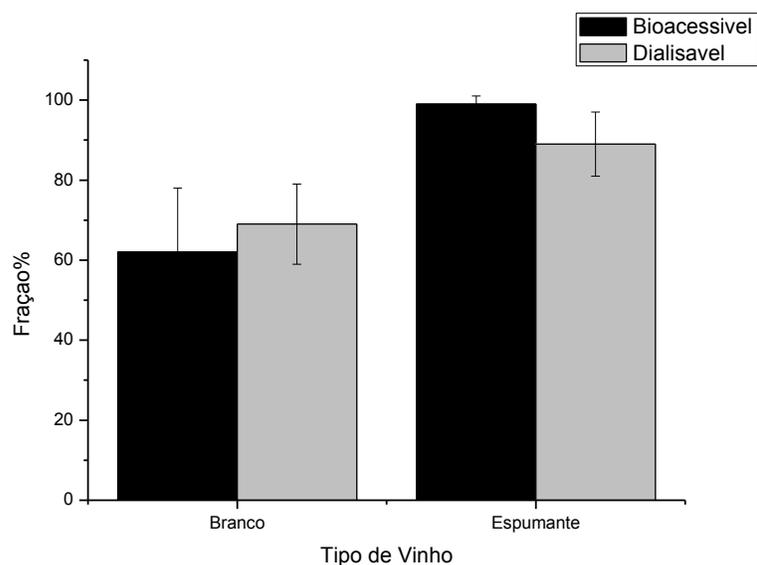


Figura 5. Fração bioacessível (solúvel) e dialisável do arsênio nas amostras de vinho tinto, branco e espumante.

Devido ao grande número de etapas e a complexidade da simulação do processo digestivo humano, para este tipo de ensaio são aceitos resultados com um coeficiente de variação de até 25% (VERSANTVOORT, 2004). Neste estudo, a dificuldade encontrada quanto à repetitividade do ensaio pôde ser notada pelos maiores desvios obtidos na análise da fração solúvel (bioacessível) e da fração dialisada, quando comparado aos desvios obtidos para a determinação do teor total dos analitos estudados. No entanto, os resultados obtidos apresentaram precisão bastante satisfatória.

De uma maneira geral, observou-se uma porcentagem alta da fração bioacessível de todos os elementos estudados utilizando o processo de simulação do modelo digestivo, o que confirma os dados da literatura que mostraram que a fase de maior absorção é a etapa de digestão intestinal, como esperado (MAULVAULT, 2011). Considerando a fração

bioacessível obtida ao final do processo digestivo, os elementos As, Cd, Cu e Pb mostraram alta possibilidade de serem bioacessíveis ao organismo humano, considerando que aproximadamente todo o conteúdo destes elementos nas amostras analisadas mostraram-se disponíveis para absorção intestinal.

Desta maneira, a determinação da concentração total de um elemento em uma amostra alimentícia não é suficiente para predizer sua toxicidade, sendo necessários estudos da bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade dos elementos de interesse, considerando que nem toda a fração de uma substância ingerida é assimilada pelo organismo humano.

Conclusão

Os elementos estudados, As, Cd, Cu e Pb nos vinhos apresentaram, em média, uma solubilidade relativamente alta e também alta capacidade de permeabilidade através dos poros de diálise nos ensaios *in vitro*, demonstrando ser um bom indicador para os estudos de biodisponibilidade. A bioacessibilidade desses elementos é bastante influenciada por vários fatores como a composição da matriz e as propriedades químicas dos contaminantes.

O método de digestão *in vitro* mais completo, proposto por Versantvoort, no qual são simulados os processos digestivos que ocorrem na boca, no estômago e no intestino e a consideração da composição dos fluidos digestivos, além de fatores como pH e tempo de residência, representaram um significativo avanço nos métodos de digestão *in vitro* utilizados até então.

Apesar dos indicativos fornecidos pelo método *in vitro*, para se ter uma estimativa da bioacessibilidade dos elementos estudados, fornecendo informações relevantes para a avaliação de risco, é necessário que seja realizada uma complementação destes estudos através de métodos que utilizem outras ferramentas, como por exemplo as células de linhagem específica como a Caco 2. Neste caso, o experimento simula uma situação mais próxima da real, considerando que os sistemas *in vitro* não possuem a capacidade de simular a absorção do analito pelo intestino, a interação e o sinergismo entre os nutrientes.

Referências bibliográficas

AZENHA, M. A. G. O; VASCONCELOS, M. T. S. D. Assessment of the Pb and Cu *in vitro* availability in wines by means of speciation procedures. **Food and Chemical Toxicology**. v. 38, p. 899-912, 2000.

BOSSO, S.T.; ENZWEILER, J. Ensaio para determinar a (Bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: Revisão. **Química Nova**. v.31. nº 2, p 394-400, 2008

BRANDON, E.F.A.; OOMEN, A.G.; ROMPELBERG, C.J.M.; VERSANTVOORT, C.H.M.; VAN ENGELEN, J.G. M.; SLIPS, A.; Consumer product *in vitro* digestion model: bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 44, p 161-171, 2006.

COLES, L.T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and others simple stomached animals. **Animal Food Science and Technology**. v. 123-124, p 421-444, 2005.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2. ed. Barueri : Manole, 2007. 952 p.

CREWS, H.; CLARKE, P.; LEWIS, J.; OWEN, L.; STRUTT, P. Investigation of selenium speciation *in vitro* gastro-intestinal extracts of cooked cod by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v.11, p 1177-1182, 1986.

DALCORSO, G.; FARINATI, S.; MAISTRI, S.; FURINI, A., How Plants Cope with Cadmium: Staking All on Metabolism and Gene Expression, **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 50 (10), p 1268-1280, 2008.

EKMEKCIOGLU,C. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. **Food Chemistry**. v. 76, p 225-230, 2002.

DOPP, E.; VON RECKLINGHAUSEN, U.; DIAZ-BONE, R.; HIRNER, A.V.; Rettenmeier, A.W., Cellular uptake, subcellular distribution and toxicity of arsenic compounds in methylating and non-methylating cells. **Environmental Research**. v. 110, p 435-442, 2010.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**. v.29,p 751-760, 2009.

HUR, S.J.; LIM. B.O.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**. v. 125, p 1-12, 2011.

OOMEN, A.G.; ROMPELBERG, C.J.M.; BRUIL, M.A.; DOBBE, C.J.G.; PEREBOOM, D.P.K.H.; SIPS, A.J.A.M. Development of an in vitro digestion model for estimation of bioaccessibility of soil contaminants. **Archeology Environment Contaminant Toxicology**. v. 44, p 281-287, 2003.

PEASLEE,M.; EINHELLIG, F. Protective effect of tannic acid in mice receiving dietary lead. **Experientia**. v. 33, p 1206, 1977.

ROY, P.; SAHA, A., Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen, **Current Science**. v. 82(1), p 38-45, 2002.

VERSANTVOORT, C. H. M. ; KAMP, E. V.; ROMPELBERG, C. J. M. **Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food**. Report n°320102002, **2004**, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands, Disponível em <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/8885/1/320102002.pdf>, acessado em 8/06/12.

VERSANTVOORT, C.H.M.; OOMEN, A.G.; KAMP,E.V.; ROMPELBERG,C.J.M.; SIPS, A.J.A.M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**. v.43, p31-40, 2005.

SILVERTHORN, D. U., *et al.* **Fisiologia humana: Uma abordagem integrada**. Barueri : Manole, 2003. 820 p.

JACOB, S.W.; FRANCONI, C.A.; LOSSOW, W.J. **Anatomia e Fisiologia Humana**. 4ª Edição, Rio de Janeiro: Interamericana, 1980.

MAULVAULT, A.L.; MACHADO, R.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H.M.; NUNES, M.L.; COELHO, I.; LANGERHOLC, T.; MARQUES, A., “Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked Black scabbard fish and edible crab”, **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, p 2808-2815, 2011.

MAURER, F.; DAUM, N.; SCHAEFER, U.F.; LEHR, C.; BAUER, P., Plant genetic factors for iron homeostasis affect iron bioavailability in Caco-2 cells, **Food Research International**. v. 43, p1661-1665, 2010.

MCKINNON A.; SCOLLARY G. Size fractionation of metals in wine using ultrafiltration. **Talanta**. v. 44, p 1649-1658, 1997.

MENEZES, E.A. **Determinação da disponibilidade de Ca,Cu,Fe, Mg e Zn em amostras de carnes suínas e de frango in natura e processadas termicamente**. 2010. 108 f. Tese (doutorado) Química Analítica – Universidade Federal de São Carlos, 2010.

WHO (World Health Organization) Internacional Programme on Chemical Safety, “**Environmental Health Criteria 134-Cadmium**”, World Health Organization, Vammala, **1992**,

Capítulo 5

Avaliação dos dizeres de rotulagem de alguns vinhos brasileiros

Avaliação dos dizeres de rotulagem de alguns vinhos brasileiros

RESUMO

As informações contidas no rótulo são essenciais para a escolha do produto pelo consumidor. Neste trabalho foi avaliada a rotulagem de 39 vinhos nacionais, quanto à sua conformidade com as legislações vigentes. Nesta análise, foram considerados os seguintes dizeres: nome do produtor/elaborador, endereço do estabelecimento, número de registro no Ministério da Agricultura, nome do produto e sua marca comercial, a expressão “indústria brasileira”, o conteúdo líquido, os aditivos empregados, a graduação alcoólica, a declaração dos ingredientes, a identificação do lote, o prazo de validade, a frase de advertência “Evite o consumo excessivo de álcool” e a declaração de presença ou não de glúten. Em relação à legislação específica para vinhos, todas as amostras estavam em conformidade. No entanto, ao considerar a legislação para bebidas em geral, 28% das amostras foram não conforme pela falta de identificação do lote ou por esta informação estar ilegível. Em relação à declaração de contém ou não glúten, 2,5% estava em desacordo. Neste contexto, pode-se inferir que há necessidade de harmonizar os descritivos nos rótulos com as informações obrigatórias exigidas pelas legislações existentes, a fim de melhorar o esclarecimento ao consumidor e o controle através da rastreabilidade.

Palavras-chave. vinhos brasileiros, rotulagem, legislação.

Evaluation of the quality of labels on some of the Brazilian wines samples

ABSTRACT

The information on the label is essential for the product choosing by the consumer. Thirty-nine labels on the national wines were evaluated following the legislations in force. For this purpose, the following products details were investigated: the producer name, the establishment address, the registration number at the Ministry of Agriculture, the product name and respective trademark, the “Brazilian Industry” statement, the liquid contents, the used additives, the alcoholic contents, the ingredients description, the lot identification, the expiration date, the “immoderate alcohol drinking restriction” warning words, and the gluten-free or gluten-added remark. According to the legislation for general drinks, 28% of samples showed noncompliant labels because of unreadable lot identification or lack of this information; and noncompliance in information on “contains gluten or not” was found in 2.5% samples. In this context, it may be inferred to bring into agreement the characteristics on products labels with the required labeling information based on the current legislations, in order to make them better understandable to consumers.

Keywords. Brazilian wine, labeling, legislation.

Capítulo 5

Introdução

A rotulagem é o processo através do qual se estabelece uma linha de comunicação entre as empresas produtoras de alimentos e os consumidores. É uma forma legal, que assegura a defesa e a proteção ao consumidor, e apresenta todas as informações necessárias para que esse consumidor saiba o que está adquirindo, além de fornecer todas as bases necessárias para que os órgãos competentes realizem seu trabalho de fiscalização (BRASIL, 1990).

Rótulo é toda inscrição, legenda, imagem ou toda matéria descritiva ou gráfica que esteja escrita, impressa, estampada, gravada, gravada em relevo ou litografada ou colocada sobre a embalagem do alimento (BRASIL, 2005). É um dos fatores que pode influenciar na escolha do consumidor ao adquirir um produto ou outro. Por essa razão, é necessário que os rótulos atendam a determinadas exigências legais devendo, dessa maneira, fornecer informações úteis e confiáveis sobre o produto para garantir segurança e qualidade ao consumidor (TEIXEIRA, 2007).

Para assegurar a declaração de informações básicas no rótulo de vinhos, há algumas legislações em vigor. No âmbito da indústria de bebidas em geral, vigora a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994 (BRASIL, 1994), regulamentada pelo Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009 (BRASIL, 2009). Em relação a determinações específicas de vinhos e derivados, está em vigor a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988), regulamentada pelo Decreto nº 99.066, sendo que alguns dispositivos desta foram alterados pela Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004 (BRASIL, 2004).

Outra legislação, que também deve ser considerada, é a Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), que obriga a informação de presença ou não de glúten no alimento e o Regulamento Técnico RDC Nº 259, de 20 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002), que se aplica à rotulagem de alimentos comercializados, qualquer que seja a sua origem, embalado na ausência do cliente, e pronto para o consumo. Esta última foi aplicada de maneira complementar, no presente trabalho, uma vez que o vinho possui legislação específica tanto para seus padrões de qualidade, identidade e comercialização, quanto para a rotulagem.

No Brasil, as informações fornecidas através da rotulagem contemplam um direito assegurado pelo Código de Defesa do Consumidor que, em seu artigo 6º, determina que a informação sobre produtos e serviços deve ser clara e adequada e “com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade e preço, bem como sobre os riscos que apresentem” (BRASIL, 1990).

Embora exista legislação, pouco se sabe sobre a situação da rotulagem dos vinhos vendidos no Brasil. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a rotulagem de vinhos finos, de mesa e espumantes nacionais, comercializados na região de Campinas, quanto às legislações vigentes.

Materiais e Métodos

Foram analisados 39 rótulos de vinhos nacionais adquiridos no comércio de Campinas/SP, no período de maio a dezembro de 2011. Deste total, 19 (48,7%) eram referentes a vinhos finos, 13 (33,3%) a vinhos de mesa e 7 (18%) a espumantes. Quanto à

região de produção, 21 (53,9%) eram do Rio Grande do Sul, 7 (17,9%) de São Paulo, 5 (12,9%) de Minas Gerais, 3 (7,7%) do Pernambuco, 2 (5,1%) da Bahia e 1 (2,5%) do Paraná.

Os rótulos foram avaliados quanto a sua declaração utilizando um *check list* baseado nos parâmetros obrigatórios exigidos nas legislações vigentes. Segundo a legislação específica para vinhos, os parâmetros avaliados foram: nome do produtor/elaborador, endereço do estabelecimento, número de registro no Ministério da Agricultura, nome do produto e sua marca comercial, a expressão “indústria brasileira”, o conteúdo líquido, os aditivos empregados e a graduação alcoólica.

Além dos itens citados acima, a legislação para bebidas exige, ainda, a declaração dos ingredientes, a identificação do lote, o prazo de validade e frase de advertência relacionada ao consumo de bebida alcoólica. Outro item avaliado foi a declaração de presença ou não de glúten, obrigatória pela Lei nº 10674, de 16 de maio de 2003, como medida preventiva e de controle da doença celíaca.

O Regulamento RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002, foi aplicado de maneira complementar, quanto aos parâmetros de denominação de venda, lista de ingredientes, conteúdo líquido, identificação de origem, razão social/nome, lote e validade, embora esta última não seja considerada obrigatória para vinhos. De acordo com este regulamento, ainda é previsto a visibilidade correta das informações.

Resultados e discussão

Em relação à legislação para vinhos, 100% das amostras estavam de acordo com as especificações exigidas. Já em relação à legislação para bebidas, das 39 amostras analisadas, 9 (23%) foram consideradas em desacordo por não apresentarem a identificação do lote e 2 (5,1%), por apresentarem tal informação ilegível (Figura 1). Do total das 11 amostras condenadas, 45,4% referiam-se a vinhos de mesa, 27,3% a vinhos finos e 27,3% a vinhos espumantes.

Ao consumidor e aos órgãos de fiscalização o lote é um importante instrumento para individualizar produtos com eventuais problemas ou características especiais, permitindo a rastreabilidade de processos, matérias-primas e safras (MARZAROTTO, 2012).

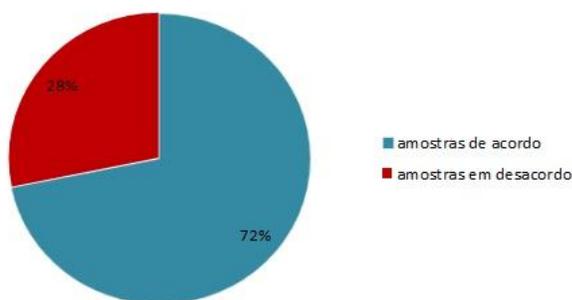


Figura 1. Percentual de rotulagem de vinhos em conformidade segundo Lei nº 8.918/94.

Os rótulos foram avaliados também quanto a sua clareza e disposição das informações. Em 3 (8%) amostras, a descrição não era de fácil leitura por haver pouco contraste entre as cores da letra e do fundo ou por ser utilizada letra muito estreita e muito próximas uma das outras.

A denominação de venda ou designação do produto é um dos itens mais importantes da rotulagem, pois informa a respeito da natureza do produto, definindo a classe, cor e conteúdo de açúcar.

Para atender à legislação brasileira os rótulos de vinho tornaram-se carregados de informações, diante da grande quantidade de dizeres obrigatórios exigidos. Para solucionar tal questão, a rotulagem passou a ser distribuída em painel principal e contra-rótulo, buscando manter a apresentação das informações, de forma elegante e estética (MARZAROTTO, 2012).

Quanto ao uso da expressão “contém ou não contém glúten”, embora o vinho seja um produto que não apresente risco para o consumidor celíaco, o seu uso é obrigatório para facilitar a identificação de tal conteúdo pela população de risco. Dentre todos os rótulos avaliados, 1 (2,5%) não apresentou tal informação.

O principal ingrediente do vinho é a uva, fazendo parte também da sua composição, conforme o caso, os aditivos e os açúcares utilizados para adoçar os vinhos suaves. Os aditivos permitidos são o dióxido de enxofre (INS 220), utilizado como conservante e antioxidante, e o sorbato de potássio (INS 202), utilizado como antifermentativo em vinhos adocicados.

Embora atendendo às exigências para os rótulos, 5 (13%) amostras foram consideradas em desacordo, por apresentar a expressão “produto natural”, embora apresentassem entre seus ingredientes, aditivos. Tal expressão pode, portanto, levar o consumidor ao equívoco ou erro, infringindo a Resolução RDC n° 259 e Leis n° 8.918 e n° 7.678.

Os Conselhos de Classe Profissional estão requerendo a inclusão de identificação do responsável técnico pelo produto, para que este possa ser interpelado em caso de alguma inconformidade do produto (MARZAROTTO, 2012). Tal informação estava presente na maioria dos rótulos (74%).

O vinho, por se tratar de uma bebida alcoólica, é obrigado por legislação (Lei nº 9.294 de 02/07/1996) (BRASIL, 1996), a trazer em sua rotulagem a frase de advertência “Evite o consumo excessivo de álcool”. Tal frase foi observada em 44,5% das amostras. Nas demais, foram observadas frases semelhantes, como: “Beber com moderação” (44,5%) e “Aprecie com moderação” (11%).

A legislação específica para bebidas exige a informação referente à sua validade. As vinícolas utilizam, para os vinhos em embalagens de vidro, a expressão “validade indeterminada”. Tal informação é dada desta maneira, já que a alteração das propriedades pode variar de vinho para vinho e pela maneira com que são armazenados. Visando prolongar a manutenção de tais características, algumas vinícolas indicam no rótulo as condições ideais de armazenamento, como mantê-los em local seco, fresco, ao abrigo de luz e em posição horizontal. Dessa maneira, fica a cargo do consumidor avaliar o período máximo de armazenamento, evitando assim a perda do produto.

Alguns parâmetros independentes da legislação de rotulagem são importantes para a escolha de um vinho fino pelo consumidor. Nem todos os rótulos apresentam a mesma qualidade de informação e complexidade. Algumas informações básicas são necessárias, como: nome do vinho que se refere ao nome comercial ou de “batismo”; nome da uva que deve ser declarado somente quando se utiliza no mínimo 70% da variedade indicada; ano

da safra, que indica o ano da colheita da uva e que não necessariamente coincide com o ano do engarrafamento do vinho; o grau alcoólico e o volume, que devem necessariamente estar expostos no rótulo; e nome da região de origem, que nem sempre está presente, mas pode ser importante, pois a sua procedência indica na maioria das vezes sua qualidade e essa tendência vem sendo fortemente trabalhada no Brasil.

Conclusão

Mediante ao que foi discutido, conclui-se que a legislação específica para vinhos (Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988), não exige itens que são considerados importantes na rotulagem como lote, orientação de validade e frase de advertência, o que evidencia a necessidade de uma complementação com outras legislações, principalmente com o regulamento técnico RDC nº 259, de 20/09/2002, que se aplica à rotulagem de alimentos comercializados, qualquer que seja a sua origem, embalado na ausência do cliente, e pronto para o consumo, abrangendo itens importantes para a qualidade do rótulo. O rótulo, com todas as informações obrigatórias e relevantes sobre o produto, é um instrumento essencial para a escolha dos produtos mais adequados pelo consumidor. No entanto, para assegurar que os dizeres obrigatórios estejam contidos nos rótulos, é preciso haver a prática da fiscalização contínua e efetiva pelos órgãos responsáveis.

Referências bibliográficas

BRASIL, 1988. **Lei nº 7.678 de 8 de novembro de 1988**. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL, 1990. **Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990**. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Ministério da Justiça.

BRASIL, 1994. **Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994**. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersectorial de Bebidas e dá outras providências. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL, 1996. **Lei nº 9.294 de 2 de julho de 1996**. Dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumigantes, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas, nos termos do § 4º do art. 220 da Constituição Federal. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRASIL, 2002. **Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico para rotulagem de alimentos embalados. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

BRASIL, 2003. **Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003**. Obriga que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL, 2004. **Lei nº 10.970, 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. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL, 2005. **Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005**. Aprova o regulamento Técnico para rotulagem de produto de origem animal embalado. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL, 2009. **Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994**. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MARZAROTTO, V. Como ler um rótulo. **Revista Adega** [revista na internet]. 2006 [acesso em 05 jan 2012]; 16^a ed. Seção Enotécnico. Disponível em: <http://revistaadega.uol.com.br/Edicoes/16/artigo41382-1.asp>

TEIXEIRA, A. M.; Pinto, E. P.; JANTZEN M. M.; Ferri, V. C. Legislação e rotulagem de vinhos finos tintos comercializados na cidade de pelotas – RS. **Revista Brasileira de Agrociências**. v.13(1): 119-121. 2007

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente trabalho mostraram que todas as amostras de vinho analisadas quanto aos teores de As, Cd, Cu e Pb, apresentaram teores abaixo dos valores máximos permitidos pela legislação brasileira vigente. Os teores encontrados demonstraram pouca contribuição para a ingestão desses elementos através do consumo de vinho, embora os estudos para estimativa da bioacessibilidade tenham mostrado que a maioria dos elementos estudados apresentaram uma bioacessibilidade maior que 37% pelo método *in vitro*. O modelo de digestão utilizado e a matriz (vinho) estudada, ainda não relatada por pesquisadores no Brasil, permitiu a obtenção de informações relevantes que podem contribuir para futuras investigações sobre avaliação de risco de contaminantes inorgânicos nos vinhos brasileiros.

Através dos resultados obtidos com a análise de PCA, a variável mais importante que separou os vinhos de mesa foi o teor de polifenóis totais, enquanto as variáveis GA (grau alcoólico) e pH foram as responsáveis pela separação dos vinhos finos. Os vinhos espumantes sofreram maior influência dos elementos inorgânicos e foram as responsáveis pela dispersão destas amostras. Também foi possível distinguir a variedade de uva híbrida americana das demais. Observa-se, no entanto, que não foi possível distinguir um padrão de vinhos pela sua procedência geográfica, usando as variáveis estudadas.

Com relação à rotulagem dos vinhos, conclui-se que a legislação específica para vinhos (Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988) deveria ser complementada quanto a rotulagem, considerando também itens que são avaliados como importantes, como lote,

orientação de validade e frase de advertência, melhorando dessa forma a qualidade das informações necessárias para a escolha do consumidor.

Anexos

Anexo 1

Sequência para o cobrimento da plataforma de THGA com tungstênio (W), segundo OSHITA, 2003.

- 1) Foi pipetado 50 μL de 1,0 g L^{-1} de W na plataforma de grafite.
- 2) Aplicou-se o programa de aquecimento (rampa, permanência) para secagem e pirólise.

	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa (s)	Permanência (s)
Secagem	120	5	25
Secagem	150	10	60
Pirólise	600	20	15
Pirólise	1000	10	15

- 3) Repetiu-se o passo 1 e o 3 mais três vezes.

4) Pipetou-se mais 50 μL de 1,0 g L^{-1} de W na plataforma de grafite e seguiu-se o seguinte programa:

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa (s)	Permanência (s)
120	5	25
150	10	60
600	20	15
1000	10	15
1400	10	5
2000	3	2

5) Aplicou-se 04 vezes o programa abaixo, utilizando temperaturas moderadas

Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)
150	1	10
600	10	15
1.100	10	5
1.400	10	10

6) Aplicou-se 04 vezes o programa descrito abaixo, utilizando temperaturas altas.

Temperatura (°C)	Rampa (s)	Permanência (s)
150	1	10
600	10	15
1.100	10	5
1.400	10	10
1.500	3	5
1.600	1	1
1.700	1	1
1.800	1	1
1.900	1	1
2000	1	1

Referência bibliográfica

OSHITA, D; OLIVEIRA, P; GOMES NETO, J. A; MORAES, M. Determinação direta e simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em cachaça por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, **Eclética Química**. v. 28, nº 1, p. 91-96, 2003.

Anexo 2

Tratamento do resíduo químico gerado

As soluções de amostras enriquecidas e os resíduos das soluções-padrão foram estocados em galões de polipropileno. Este procedimento utilizado é adotado pelo laboratório do Grupo de Espectrometria Atômica (GEAtom) do Instituto de Química da Unicamp, para tratar resíduos aquosos que contêm vários metais. Consiste em separar os elementos da fase aquosa por precipitação controlada. Em pH 7 a 8 Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, Al, Pb e Cd foram tratados com solução de NaOH (1 mol L^{-1}) e FeCl_3 (1 mol L^{-1}) e co-precipitaram com o Fe(OH)_3 formado. Os sais precipitados são separados da fase aquosa por filtração comum, empregando papel de filtro qualitativo. A solução restante foi condicionada em pH 7, aproximadamente, com o auxílio de H_2SO_4 1 mol L^{-1} e a ela se adicionou uma solução de Na_2S (78 g L^{-1}). Os resíduos obtidos foram mantidos nos papéis de filtro utilizados e enviados para o depósito de resíduos sólidos do Instituto de Química da UNICAMP (SOUSA, 2003).

Referência bibliográfica

SOUZA, R.A. **Uso da espectrometria de emissão óptica em plasma de argônio com acoplamento indutivo na determinação de nutrientes e contaminantes inorgânicos em água de coco natural e industrializada.** 2003.71f. Dissertação (mestrado) Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, 2003.