

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES QUÍMICAS INORGÂNICAS E  
COMPOSTOS BIOATIVOS EM VINHOS**

**CANDICE NÓBREGA CARNEIRO**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
JULHO - 2020**

# **AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES QUÍMICAS INORGÂNICAS E COMPOSTOS BIOATIVOS EM VINHOS**

**CANDICE NÓBREGA CARNEIRO**

Engenheira Química

Universidade Federal de Campina Grande, 2005

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Souza Dias

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Fernanda Silva

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JULHO - 2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

C289a Carneiro, Candice Nóbrega  
Avaliação de espécies químicas inorgânicas e compostos bioativos em vinhos / Candice Nóbrega Carneiro.\_ Cruz das Almas, BA, 2020.  
123f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Souza Dias  
Co-Orientador: Profª. Drª. Maria Fernanda Silva

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias

1. Vinho. 2. Produção de Vinho 3. Espécies Inorgânicas.  
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 641.22

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração - Neubler Nilo Ribeiro da Cunha (*Bibliotecário - CRB5/1578*)  
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES QUÍMICAS INORGÂNICAS E  
COMPOSTOS BIOATIVOS EM VINHOS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DA TESE  
DE CANDICE NÓBREGA CARNEIRO**

Realizada em 06 de julho de 2020

Prof. Dr. Fabio de Souza Dias  
Universidade Federal da Bahia-UFBA  
Examinador interno (Orientador)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Franceli Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Examinadora interna

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos  
Universidade do Estado da Bahia  
Examinador externo

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
Examinador externo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacira Teixeira de Castro  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Examinador externo

## DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha mãe Maria Célia Nóbrega (*in memoriam*), maior incentivadora dos meus estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade de enfrentar as dificuldades e desenvolver este trabalho.

À minha família por todo carinho e apoio.

Ao meu orientador, prof. Fabio Dias, pela dedicação ao grupo de pesquisa e por todos os aprendizados que este trabalho me permitiu vivenciar.

Aos colegas de grupo de pesquisa, em especial Angélica Fagundes, Gilvanda Leão e Gisele Chagas, fiéis companheiras.

Aos amigos que foram essenciais nesta caminhada: Cristiane Oliveira, Fabrício Miranda, Joyce Batista, Katia Buri, Manuela Oliveira e Tâmara Bulcão.

Aos colegas de trabalho da UFRB, servidores docentes e técnicos, pela troca de experiências ao longo dos anos de convivência.

A todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser desenvolvido, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

Página

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** ..... 1

### **Artigo 1**

OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE VINHOS DO VALE DO SÃO FRANCISCO ..... 47

### **Artigo 2**

DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE VINHOS BRASILEIROS E ARGENTINOS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS E CLASSIFICAÇÃO DOS VINHOS DE ACORDO COM A REGIÃO DE ORIGEM USANDO MAPAS AUTO-ORGANIZÁVEIS DE KOHONEN ..... 69

### **Artigo 3**

CARACTERIZAÇÃO GEOGRÁFICA DE VINHOS DA AMÉRICA DO SUL COM BASE EM SUA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E MELATONINA: UMA ANÁLISE EXPLORATÓRIA ..... 88

**CONSIDERAÇÕES FINAIS** ..... 114

# AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES QUÍMICAS INORGÂNICAS E COMPOSTOS BIOATIVOS EM VINHOS

Autora: Candice Nóbrega Carneiro

Orientador: Fabio de Souza Dias

**Resumo:** O vinho é uma bebida consumida em todo mundo e produzida em diversas regiões. A composição química dos vinhos é influenciada por diversos fatores como técnicas enológicas, variedade das uvas e sua origem, fatores climáticos e técnicas do manejo produtivo. Tem sido recomendado o consumo moderado de vinho devido aos efeitos como a prevenção a doenças coronárias, atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena. O presente trabalho tem foco no estudo da composição química e de bioativos, compreendendo compostos fenólicos e melatonina em vinhos. Foi otimizado um método simples, rápido, preciso, exato, com baixo custo operacional e baixos limites de detecção e quantificação para determinação multielementar por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas em amostras de vinhos do Vale do São Francisco, região nordeste do Brasil. Foram utilizados mapas auto-organizáveis de Kohonen para análise não supervisionada de agrupamentos a fim de discriminar vinhos produzidos no Vale do São Francisco e vinhos argentinos produzidos na região de Mendoza utilizando a composição elementar. Os vinhos brasileiros foram classificados em um grupo, enquanto que os vinhos argentinos formaram outro agrupamentos. No estudo dos compostos bioativos, foram determinados ácido elágico, ácido vanílico, ácido siríngico, quercetina e melatonina por cromatografia líquida de alta eficiência em vinhos provenientes do Brasil e da Argentina. Uma análise exploratória dos dados foi realizada e os vinhos foram classificados em dois grupos conforme região de origem.

**Palavras-chave:** Composição química, compostos fenólicos, melatonina.



# EVALUATION OF INORGANIC CHEMICAL SPECIES AND BIOACTIVE COMPOUNDS IN WINES

Author: Candice Nóbrega Carneiro

Advisor: Fabio de Souza Dias

**Abstract:** Wine is a drink consumed worldwide and manufactured in several regions. The chemical composition of wines is influenced by several factors, such as enological techniques, variety of grapes of origin, climatic factors and productive management techniques. It has been recommended the moderate consumption of wine due to the effects reported in the literature such as the prevention of coronary heart disease, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activity. The present work focuses on the study of the chemical and bioactive composition, composed of phenolic compounds and melatonin in wines. It has been optimized for a simple, fast and precise method, with low operating cost and low limit of detection and quantification for the detection multi-element by optical emission spectrometry with microinduced plasma waves in wine samples from the São Francisco Valley, northeastern Brazil. Kohonen self-organizing maps were used for unsupervised cluster analysis in order to discriminate wines produced in the São Francisco Valley and Argentine wines produced in the Mendoza region using the elementary composition. In the study of bioactive compounds, ellagic acid, vanillic acid, syringic acid, quercetin and melatonin were selected by high performance liquid chromatography in wines sold in Brazil and Argentina. An exploratory analysis of the data was performed and the wines were classified into two groups according to the region of origin.

**Keywords:** Chemical composition, phenolic compounds, melatonin.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Vinho

O vinho, resultante da fermentação do açúcar presente no suco da uva, é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Segundo o Anuário Brasileiro da Uva e do Vinho de 2019, publicado pela Organização da Vinha e do Vinho, o Brasil está entre os 15 maiores produtores da bebida. O ranking de produção mundial em 2018 foi liderado pela Itália, seguido por França e Espanha (OIV, 2020). Ainda segundo a OIV (2020), o maior consumidor de vinho são os Estados Unidos, seguido pela França e Itália. O Brasil ocupa a 17ª posição. O início da viticultura no Brasil se deu com a chegada dos colonizadores portugueses e a partir do século XX tornou-se uma relevante atividade comercial (CAMARGO, 2011).

A partir da década de 60 a região do Vale do São Francisco vem sendo reconhecida como pólo produtor de uvas de qualidade. Atualmente é considerada uma das mais importantes regiões vinícolas brasileiras. Abrange sete cidades, destacando-se a região do Submédio do São Francisco, formado pelos estados da Bahia e de Pernambuco. Juntos, os dois estados somam mais de 10 mil hectares de área cultivada com videiras (IGBE, 2020).

As condições climáticas distintas do clima tropical da região semi-árida nordestina permitem o crescimento e a produção contínuos de uvas e vinho durante todo o ano no Vale do São Francisco (ALMEIDA, 2016; CAMARGO, 2011). O predomínio de elevadas temperaturas favorece uma maior atividade metabólica acelerando os eventos que caracterizam cada fase fenológica, permitindo mais ciclos produtivos em relação às demais regiões produtoras (KIILL & LIMA, 2009). Ainda conforme Kiill & Lima (2009), abundância de energia solar e elevadas temperaturas favorecem a síntese de pigmentos e o transporte de carboidratos para os frutos. Tal condição propicia o acúmulo de sólidos solúveis nos frutos, essencialmente açúcares, imprimindo o sabor doce às uvas maduras.

O cultivo de videiras no Submédio São Francisco é influenciado pelos fatores edafoclimáticos que definem as características da vegetação da região, dentre os quais se destacam: quantidade de radiação solar, número de horas de insolação,

temperatura e umidade relativa do ar. Tais fatores são determinantes para os níveis de produtividade e a qualidade da fruta (KIILL & LIMA, 2009).

Conforme Kiill & Lima (2009), as características geográficas e climáticas da região do Submédio do São Francisco são: altitude média de 365 m, temperatura média 26 °C, umidade relativa média 50%, precipitação média anual de 550 mm, insolação de 3000 h/ano, com 300 dias de sol/ano, evaporação de aproximadamente 2080 mm/ano, velocidade do vento de 4m/s e a fonte de água para irrigação é o Rio São Francisco.

Latossolos e argissolos com profundidades em torno de 1,50 m são os principais tipos de solos onde as videiras do Submédio do São Francisco são cultivadas (BORGES et al., 2009). A região do Submédio do São Francisco abrange cerca de 120 mil hectares irrigados e é uma das principais áreas de exploração da hortifruticultura irrigada do Brasil com mais de 51% da população economicamente ativa empregada na agricultura (BEDOR et al., 2007).

A Figura 1 mostra o Submédio do Vale do São Francisco, onde o cultivo de videiras é uma das principais atividades do setor agrícola que contribui para o desenvolvimento sócio-econômico da região.

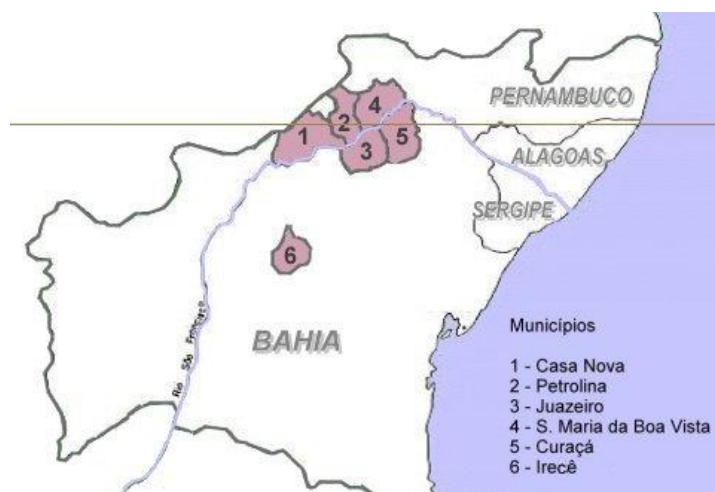


Figura 1 – Região do Submédio do Vale do São Francisco (fonte: [https://www.academiadovinho.com.br/\\_mod\\_regiao.php?reg\\_num=BR04](https://www.academiadovinho.com.br/_mod_regiao.php?reg_num=BR04))

As etapas do processo produtivo do vinho são: cultivo da uva, esmagamento e maceração, fermentação, filtração e engarrafamento. A fermentação é a etapa mais complexa. Consiste num processo anaeróbio onde a glicose é transformada

em álcool pela ação de leveduras, sendo a mais comum a *Saccharomyces cerevisiae*. As espécies das uvas usadas na vinificação devem ser equilibradas para que a fermentação ocorra sem necessidade de adição de açúcar, ácidos, enzimas ou nutrientes (RIBEREAU-GAYGON et al., 2000; PEYNARD, 1996).

Além da importância econômica e social, diversos estudos relacionam o consumo regular e moderado do vinho, particularmente o tinto, com benefícios à saúde humana, tais como: efeito antioxidante, auxílio na homeostase lipídica, modulação de respostas da imunidade, auxílio na prevenção de câncer e diabetes tipo 2, além de outros efeitos positivos relacionados a doenças cardiovasculares (GUILFORD & PEZZUTO, 2011; DURUIBE et al., 2007; IBANEZ et al., 2008).

O vinho contém diversas classes de componentes, dentre eles: açúcares, ácidos, taninos, minerais e proteínas (GEANA et al., 2014). Estudar a concentração dos minerais é relevante devido os impactos que alguns destes elementos podem causar à saúde, seu papel na estabilidade do vinho, a possibilidade de riscos toxicológicos e ainda devido às regulamentações estabelecidas para os alimentos e bebidas (FRIAS et al., 2002).

A presença de elementos minerais nos vinhos está relacionada com a sua origem, com a variedade das uvas, com a composição mineral do solo, com as variações climáticas da região, com as práticas do processo de vinificação, transporte e armazenamento (MORENO et al., 2018; CATARINO et al., 2008; TARIBA, 2011). Segundo Pyrynska (2007), os metais contidos no vinho podem ser provenientes de fontes naturais como deposição atmosférica de material particulado para as uvas e do processo de absorção radicular das videiras, ou ainda da contaminação durante o processo produtivo do vinho. O excesso de alguns metais no vinho pode causar fenômenos depreciativos na sua qualidade, devido às reações de precipitação e oxidação (CATARINO, 2008).

A Figura 2 ilustra as fontes endógenas e exógenas de metais no vinho.

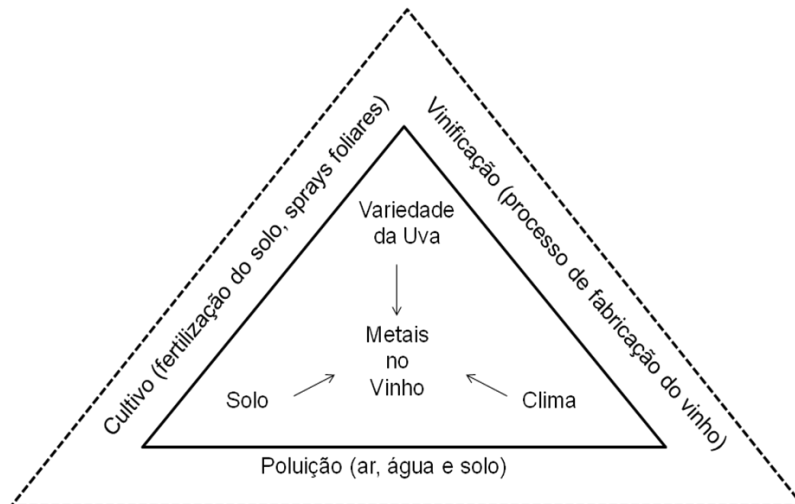


Figura 2 – Fontes endógenas (linha sólida) e exógenas (linha tracejada) de metais em vinhos (fonte: Pohl, 2007)

### 1.1 Espécies Metálicas em Vinhos

Algumas espécies metálicas são biogénicas, ou seja, sua presença é essencial ao funcionamento normal de várias rotas metabólicas. No entanto, há espécies químicas que podem ser tóxicas e acumulativas se ingeridos em excesso, pois não são degradados de forma natural (VIEIRA et al., 2012). A exposição a elementos tóxicos pelo consumo de alimentos contaminados tem sido refletida em diversas desordens bioquímicas dos organismos (DURUIBE et al., 2007). Estudos indicam efeitos adversos à saúde pela exposição a cádmio (lesões renais, ósseas e pulmonares) e chumbo (neuropatologias e danos nos tratos gastrointestinal e urinário) (JARUP, 2003; DURUIBE et al., 2007).

Conforme Jarup (2003), a presença de metais no ambiente ocorrem por um largo conjunto de processos e rotas para o ar (via processos de combustão e mineração), para as águas superficiais (via escoamento e lançamentos) e para os solos (consequentemente para os lençóis freáticos e plantações).

O solo onde as videiras são cultivadas é a fonte principal de metais no vinho (KMENT et al., 2005; KUNKEE & ESCHNAUER, 2003). Aliados ao tipo de solo, a variedade e maturidade das uvas e as condições climáticas durante o crescimento da planta são fatores que também influenciam na concentração de espécies metálicas no vinho (HERNÁNDEZ et al., 1996).

O segundo fator que mais contribui na presença de metais na bebida está associado com as contaminações externas durante as fases de crescimento, colheita e engarrafamento. Diaz et al. (2003) afirmam que os fertilizantes usados no cultivo das videiras influenciam nas concentrações de potássio, cálcio e cobre. Kment et al. (2005) e Galani-Nikolakakai et al. (2002) afirmam que fertilizantes, pesticidas e fungicidas contendo cádmio, cobre, manganês, chumbo e zinco são possíveis colaboradores no aumento das concentrações desses metais no vinho. Kment et al. (2005) e Pohl (2007) citam a relevância de outra possível fonte de contaminação que é o longo contato da bebida com máquinas, tubulações, tonéis e barris usados na armazenagem. Esses materiais são construídos à base de bronze, vidro, aço inoxidável, madeira e, portanto, podem conter alumínio, cádmio, cromo, cobre, ferro e zinco.

Angelova et al. (1999) determinaram chumbo, cobre, zinco e cádmio e estudaram o modo de absorção desses elementos por diferentes órgãos e partes da videira em uma região a 3,5 km de uma indústria extratora de metais na Bulgária. Foram analisadas amostras de solo, raízes, caule, brotos, folhas e frutos. As espécies metálicas foram determinadas por espectrometria de absorção atômica por chama. Os autores encontraram altas concentrações dos metais no solo. Concluíram que a contaminação pela indústria dá-se via aerossóis e que ocorre uma acumulação seletiva de metais em diferentes partes do fruto, sendo a maior parte localizada nos cachos das uvas.

Romic et al. (2004) estudaram o acúmulo de cádmio, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel, chumbo e zinco em solos superficiais (de 0-10 cm) de duas regiões vitivinícolas na Croácia. Os autores afirmam que o aporte antropogênico de metais nos solos é originário principalmente de agroquímicos, uma vez que a influência direta do ambiente urbano ou da indústria é quase insignificante na região do estudo. Segundo os autores, o acúmulo de cobre e zinco no solo é o efeito mais comum da fertilização contínua e proteção contra doenças e pragas em vinhedos.

Alkis et al. (2014) determinaram a concentração de metais (cromo, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, zinco, cádmio e chumbo) em vinhos (tinto e branco) produzidos em 4 regiões da Turquia. As espécies foram determinadas por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS). Cromo, manganês e ferro foram encontrados em concentrações bem mais elevadas no vinho tinto em

comparação com o vinho branco. Os metais níquel e zinco foram encontrados em concentrações mais elevadas nas amostras de vinho branco.

Bimpilas et al. (2015) estudaram a evolução de compostos fenólicos e metais em vinhos produzidos na Grécia durante as fases de fermentação e armazenamento. Foi verificado um decréscimo na concentração de cobre durante o processo. O método de determinação das espécies metálicas no estudo foi espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP OES e ICP-MS) após a digestão das amostras e para determinar fenóis totais, o método utilizado foi cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Brainina et al. (2004) desenvolveram um método para determinação de cobre, chumbo, cádmio e zinco em amostras de vinhos branco e tinto por voltametria. Os resultados obtidos por voltametria foram confirmados por análises em ICP-MS e apenas para o cádmio os autores determinaram uma diferença nos valores obtidos, no entanto com concentrações próximas ao limite de detecção do método.

Dugo et al. (2005) determinaram cátions (cádmio, cobre, chumbo e zinco) e ânions inorgânicos (cloreto, nitrato e sulfato) em vinhos produzidos no oeste da Sicília, Itália. No estudo, correlacionaram os elementos citados com algumas características do vinho como idade, cor e teor de açúcar. Para as determinações de Cd, Cu, Pb e Zn, as amostras foram acidificadas, filtradas e analisadas por cronopotenciometria. Os resultados obtidos para todos os cátions e ânions estudados foram abaixo dos limites estabelecidos pela legislação.

Illuminate et al. (2014) estudaram as variações temporais de metais em nível traço (cádmio, chumbo e cobre) em vinho branco italiano no período de 1995 a 2010. Foi verificado um decréscimo de 30% para cádmio no período do estudo, devido o uso de pesticidas com presença reduzida de metais. Para o cobre, a redução na concentração foi aproximadamente 74%. Para o chumbo, o decréscimo foi de aproximadamente 74%, segundo os autores, provavelmente devido à diminuição na emissão do metal na atmosfera, acarretada pela redução do teor na gasolina na Itália desde 2002. Os elementos estudados foram determinados por voltametria.

La Torre et al. (2008) determinaram as concentrações de carboidratos (lactose e rhamnose), polifenóis (tirosol, ácido cafeico, procianidina B1, catequina,

quercetina, kaempferol) e metais (zinco, cobre, cádmio e chumbo) em diferentes tipos de vinho Marsala. Os metais foram determinados por cronopotenciometria. Zinco foi encontrado em maior concentração, seguido pelo cobre e chumbo. Os níveis de cádmio foram inferiores a 3 ppb em todas as amostras estudadas.

Pessanha et al. (2010) determinaram concentrações de metais tóxicos em diferentes estágios de produção de vinhos portugueses por fluorescência de raios-X em dois vinhedos. Para as folhas e frutos foi utilizada a técnica de EDXRF (fluorescência de raios-X por dispersão de energia) e para avaliar metais no mosto e no vinho, foi usada a técnica TXRF (fluorescência de raios-X por reflexão total). A maioria dos elementos presentes no vinho e no mosto não excederam os valores recomendados na literatura. Já nas folhas e nas uvas foi encontrado excesso de cobre, provavelmente proveniente de pesticidas à base do metal, segundo os autores.

Ferreira et al. (2008) determinaram ferro e manganês em vinhos usando espectrometria de absorção atômica por chama. Foram testados cobalto, prata, níquel e índio como padrão interno. O cobalto e o índio foram considerados eficientes para quantificação de manganês e ferro, respectivamente. Os resultados foram ainda comparados com outros obtidos por ICP após digestão ácida dos vinhos estudados e não foi evidenciada diferença significativa entre os resultados.

Vystavna et al. (2014) investigaram a concentração de cromo, cobre, níquel, chumbo e zinco em videiras e nos vinhos de uma região da Ucrânia por FAAS e por ICP OES, respectivamente. Foram realizadas análises na água de irrigação, no suco das uvas e no vinho para determinação de Cr, Cu, Ni, Pb e Zn; e no solo, nas folhas e nos frutos para os elementos Cu, Pb e Zn. Foi constatado que os níveis de Cu e Zn, provenientes do solo, são mais elevados nas folhas do que no fruto. O chumbo tem um menor potencial de acúmulo na parte aérea da planta que o cobre e o zinco. Foi observado que os níveis de Zn e Cu são mais altos no vinho do que no suco das uvas. Os autores afirmam que os metais em nível traço são regulados pela composição do solo e pelas especificidades biológicas das cultivares.

Volpe et al. (2009) estudaram amostras de uvas e do mosto de três tipos de vinhos do sul da Itália. O objetivo do trabalho foi determinar as concentrações de elementos nas fases de fermentação e maturação do processo produtivo do vinho. Cobre, cromo, níquel, ferro, zinco, chumbo e cádmio foram determinados por



espectrofotometria de absorção atômica por chama. Com exceção do cobre, que tem concentração geralmente alta devido ao tratamento antiparasitário, e do zinco que é absorvido pela planta, a concentração dos elementos estudados durante o processo produtivo dos vinhos estão dentro dos limites estabelecidos pelas legislações italiana e europeia.

Karadjova et al. (2002) apresentaram uma metodologia de fracionamento e determinação de ferro, cobre e zinco em vinhos da Turquia, Macedônia e Bulgária. Foi utilizada uma resina de troca iônica para realização de extração em fase sólida de cátions e ânions, e para a determinação dos metais foi utilizada espectrometria de absorção atômica por chama. O estudo mostrou que na presença de ácido tânico ou ácido gálico, aproximadamente 50% de ferro, 30% de cobre e 10% do zinco são adsorvidos na resina trocadora de íons.

Voica et al. (2009) validaram um método para determinação de elementos tóxicos em vinhos por ICP-MS. Os elementos estudados foram: cromo, arsênio, cádmio, níquel, mercúrio e chumbo. Para a validação do método foram calculados: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. O método foi aplicado em 13 amostras de vinhos provenientes da Romênia. Os autores relatam que os resultados encontrados estão em concordância com resultados da literatura e que a variabilidade das concentrações dos elementos em níveis traço possibilita a correlação com a origem dos vinhos.

Catarino et al. (2002) determinaram zinco em vinhos (branco, tinto e licoroso) por absorção atômica e validaram o método estudado calculando limite de detecção, limite de quantificação, taxa de recuperação, exatidão, precisão e aplicabilidade. Concluíram que o método é capaz de fornecer resultados precisos e exatos e é apropriado para controle de rotina de teor total de zinco em vinhos.

Galani-Nikolakaki et al. (2002) investigaram a forma e o grau de contaminação de uvas e seus produtos alcoólicos, na região cretense, Grécia. Os elementos estudados foram: alumínio, arsênio, cádmio, cobre, cromo, ferro, chumbo, manganês, níquel e zinco. Quinze amostras de uvas foram usadas para fabricação de vinho, um tipo com uvas lavadas e outro tipo com uvas não lavadas. Um forno de micro-ondas foi usado para digestão e dissolução das amostras estudadas (vinho de uvas lavadas, vinho de uvas não lavadas e o precipitado do processo de fabricação dos dois tipos de vinho), visando a remoção dos constituintes orgânicos. As análises

foram realizadas por fluorescência de raios-X (TXRF) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). Os resultados mostraram que para os elementos estudados, as concentrações estão abaixo dos limites estabelecidos pelas legislações da Grécia e da União Europeia.

Vinhos tintos espanhóis, provenientes das Ilhas Canárias, foram classificados de acordo com os diferentes locais de produção por Moreno et al. (2018). Foram categorizados em 7 classes e em 20 amostras de cada classe foram determinadas as espécies químicas (B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Na, Pb e Zn) e parâmetros físico-químicos (pH, acidez volátil, acidez total, ácido málico, ácido acético, açúcares redutores, teor de álcool, SO<sub>2</sub> livre, SO<sub>2</sub> total e polifenóis totais). As amostras foram digeridas em forno mufla a 450 °C num período entre 18 e 24 horas. As cinzas obtidas foram dissolvidas em ácido nítrico 1,5% para posterior determinação dos elementos por ICP OES.

Determinações de metais (Zn, Mn, Fe e Cu) em três tipos de vinhos portugueses por análise de injeção em fluxo (FIA) com espectrometria de absorção atômica por chama foram realizadas por Costa et al. (2000). Os experimentos de pré-concentração foram realizados com uma coluna de recheio (sílica C18 como fase sólida). O sistema proposto no estudo possibilita o ajuste da concentração das amostras para um intervalo de resposta linear da técnica analítica além de permitir determinações multiparamétricas. Segundo os autores, a etapa de pré-concentração permite a determinação de diversas espécies presentes nos vinhos em baixas concentrações.

A Tabela 1 apresenta um resumo dos resultados dos trabalhos supracitados sobre determinação de espécies químicas em amostras de vinhos.

Tabela 1 – Concentrações de espécies químicas em vinhos de diversos países (valores médios ou intervalos)

Amostras	Concentrações dos analitos	Técnicas de determinação	Referências
Vinhos brancos e vinhos tintos da Turquia	Valores em $\mu\text{g L}^{-1}$ : Cr: 38,6 (tinto); 29,4 (branco) Mn: 697 (t); 101 (b); Fe: 1,7 (t); 0,7 (b) Co: 6,3 (t); 0,5 (b); Ni: 134 (t); 573 (b) Cu: 131 (t); 158 (b); Zn: 389 (t); 2099 (b) Cd: 2,8 (t); <LD (b); Pb: 6,3 (t); <LD (b)	FAAS e ETAAS	Alkis et al. (2014)
Vinhos tintos da Grecia	Valores em $\mu\text{g L}^{-1}$ : Fe: 795 (Syrah); 627 (Merlot) Cu: 34 (S); 413 (M); Mn: 649 (S); 928 (M) Zn: 652 (S); 978 (M); Ni: 5 (S); 10 (M) Pb: 25 (S); 21 (M); Cr: 20 (S); 15 (M) Cd: 7 (S); 8 (M); Ba: 278 (S); 269 (M) Al: 175 (S); 155 (M)	ICP OES e ICP-MS	Bimpilas et al. (2015)
Vinhos da República de Moldova e da Itália	Valores em $\mu\text{g L}^{-1}$ : Cu: 25 – 168; Pb: 16 – 56; Cd: 0,11 - 0,42; Zn: 138 - 762	ICP-MS	Brainina et al. (2004)
Vinhos Marsala	Cu: 0,7 - 0,9 $\text{mg L}^{-1}$ ; Zn: 0,4 - 3,1 $\text{mg L}^{-1}$ Pb: 18,7 - 169,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Cd: 2 - 12,4 $\mu\text{g L}^{-1}$	dASCP	Dugo et al. (2005)
Vinho branco italiano	Valores em $\mu\text{g L}^{-1}$ : Cd: 0,17; Pb: 18; Cu: 32	Voltametria	Illuminati et al. (2014)
Vinhos da Ucrânia	Valores em $\text{mg L}^{-1}$ : Cr: 0,48; Cu: 0,45; Ni: 0,03; Pb: 0,06; Zn: 0,08	ICP OES	Vystavna et al. (2014)
Vinhos Marsala	Valores em $\mu\text{g L}^{-1}$ : Cd: 1,2 - 1,6; Cu: 10,2 – 73,1; Pb: 74,7 - 500; Zn: 777 - 1508	Cronopotenciometria	La Torre et al. (2008)
Vinhos branco, tinto, seco, de mesa e doce comercializados em Salvador-BA	Valores em $\text{mg L}^{-1}$ : Fe: 0,88 - 9,22; Mn: 0,78 - 2,89	FAAS	Ferreira et al. (2008)
Vinhos italianos	Valores em $\text{mg L}^{-1}$ : Fe: 0,4 - 0,8; Zn: 0,4 - 0,6; Pb: <LD; Cd: <LD	FAAS	Volpe et al. (2009)

Vinhos da Turquia, da Macedônia e da Bulgária	Valores em mg L <sup>-1</sup> : Cu: 0,16 - 0,46; Zn: 0,12 - 1,2; Fe: 1,2 - 12,4	FAAS	Karadjova et al. (2002)
Vinho da Grecia produzido experimentalmente	Valores em mg L <sup>-1</sup> : Al: 0,36 - 9,5; As: <LD; Cd: <LD - 0,006; Mn: <LD - 10; Cu: 0,2 - 0,6 ; Fe: 4,7 - 12; Cr: <LD - 1,6; Ni: <LD - 2,3 Pb: 0,018 - 0,42; Zn: 0,3 - 31	FRX e GFAAS	Galani-Nikolakaki et al. (2002)
Vinhos portugueses (Porto, Maduro e Verde)	Valores em mg L <sup>-1</sup> : Zn: 0,49-0,60(P); 0,033-0,56(M); 0,29-1,37(V) Mn: 1,16-1,81(P); 0,65-1,29(M); 0,9-2,57(V) Fe: 4,73-13,24(P); 2,59-4,02(M); 1,41-12,52(V) Cu: 0,189-0,56(P); 0,094-0,345(M); 0,091-1,16(V)	FIA/FAAS	Costa et al. (2000)

FAAS – Espectrometria de absorção atômica por chama; GFAAS - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite; ICP – Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente; FRX – Fluorescência de raios-X; FIA – Análise de injeção em fluxo; ETAAS - Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica; dASCP – Cronopotenciometria de redissolução anódica.

## 1.2 Compostos Bioativos em Vinhos

A relação entre dieta alimentar e saúde tem alavancado pesquisas sobre compostos bioativos em alimentos. O vinho é um dos componentes principais na dieta da população mediterrânea e é um dos responsáveis pelas suas propriedades benéficas (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012). Estudos relatam que alguns dos compostos bioativos presentes nos vinhos podem atuar como agentes antioxidantes, cardioprotetores, anticancerígenos, antidiabéticos e neuroprotetivos (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012; GEORGIEV et al., 2014; SALEHI et al., 2019).

### 1.2.1 Compostos Fenólicos

A água é o componente majoritário do vinho, correspondendo entre 75 e 90%, outros 15% constituem compostos fenólicos, ácidos orgânicos, sais minerais e pectinas (CONDE et al., 2007). A maioria dos componentes do vinho é produzida pela própria videira, nas folhas (açúcar e ácidos) e no bago (ácidos e fenólicos).

Alguns constituintes relacionados ao aroma e sabor são produzidos durante o desenvolvimento e o amadurecimento do fruto (CONDE et al., 2007).

O metabolismo da planta pode ser dividido em dois tipos: o primário e o secundário, e estes desempenham funções diferentes. Metabólitos primários estão envolvidos nas funções de crescimento, desenvolvimento e reprodução. Metabólitos secundários atuam na defesa contra predadores, parasitas e doenças, além de facilitar processos reprodutivos (agentes corantes, produtores de odor e outros). Os metabólitos secundários influenciam na diversidade química das plantas e são sensíveis às condições externas (ALI et al., 2010).

Os compostos fenólicos são um vasto grupo de metabólitos secundários. Quimicamente, pertencem a uma classe de moléculas com diversidade estrutural caracterizada pela presença de um anel aromático, tendo um ou mais grupos hidroxilas diretamente ligados com o anel e podem variar de moléculas simples até compostos altamente polimerizados (ZHU et al, 2012).

Os compostos fenólicos são responsáveis pelas características sensoriais do vinho tinto (BIMPILAS et al., 2015; BELMIRO et al., 2017, SOLEAS et al., 1997). Representam um importante fator de definição da qualidade dos vinhos uma vez que interferem na coloração, sabor, adstringência e amargura (GHANEM et al, 2014).

Um grande número de diferentes compostos fenólicos está presente nas cascas, polpa e sementes das uvas. Eles sofrem extração parcial durante o processo produtivo do vinho (DEIS et al., 2011). Processos químicos e bioquímicos durante a fermentação favorecem a extração e formação desses compostos (ROBINSON et al., 2014). Como exemplos de compostos fenólicos em vinhos podem ser citados: quercetina, catequina, resveratrol, malvidina, etc.

Os compostos fenólicos são classificados em flavonoides e não-flavonoides. Flavonoides possuem a estrutura química  $C_6 - C_3 - C_6$ , consistindo em dois anéis fenólicos ligados por um anel central contendo oxigênio (DEL RIO et al., 2013). Os flavonoides ocorrem em plantas na forma de glicosídeos, que são uma das classes de substâncias responsáveis pelo perfil sensorial. A distribuição dos flavonoides pode variar de acordo com a ordem e a família da planta, bem como pela variação das espécies (CORDENUNSI et al., 2002).

Os flavonoides conferem às uvas e ao vinho atividade antioxidante (CONDE et al., 2007, DIAS et al., 2017). Eles são considerados os maiores contribuintes de

atividade biológica em uvas (GEORGIEV et al., 2014). Além do valor nutricional das uvas e dos produtos a partir delas obtidos, os flavonoides atuam com benefícios à saúde humana, como é citado por Georgiev et al. (2014) e Ali et al. (2010): em apoio a algumas funções cerebrais e do sistema nervoso central, na prevenção da obesidade e da diabetes tipo 2, em atividade hepatoprotetiva, além de efeitos benéficos cardiovasculares e na prevenção de alguns tipos de câncer.

Nas videiras e em outras plantas, os flavonoides participam na defesa contra patógenos microbiológicos, pestes e herbívoros, atuando ainda nas variações de teor de água, luz, radiação UV e deficiência mineral (HE et al., 2012). Os flavonoides mais comumente encontrados em uvas são: antocianinas, flavonóis, catequinas e proantocianidinas (GEORGIEV et al., 2014, ALI et al., 2010).

No vinho tinto, a coloração tem grande importância comercial e as antocianinas são os compostos responsáveis pela pigmentação das cascas das uvas. O acúmulo de antocianinas em uvas tem início após o início do estágio fenológico denominado *verasion*, que representa a mudança na coloração da casca da uva, indicando a fase de amadurecimento. Segundo Deis et al. (2011), condições climáticas, intensidade de luz e temperatura, reguladores de crescimento e práticas de manejo do vinhedo são fatores que influenciam esta fase do desenvolvimento da videira.

Os não-flavonoides são classificados em ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis e estilbenos (DEL RIO et al, 2013). Fazem parte do grupo dos ácidos hidroxibenzoicos: ácido gálico, protocatequina, ácido vanílico e ácido siríngico (BALASUNDRAM et al., 2006). Os ácidos hidroxicinâmicos representam as classes de ácidos fenólicos encontrados em uvas e vinhos a partir da obtenção do mosto no final da fermentação. Podem ser citados os ácidos ferúlico, caftárico e cumárico (BARCIA et al., 2015). O resveratrol, polifenol pertencente a classe dos estilbenos, também é encontrado em uvas (BARCIA et al., 2015) e é considerado um importante componente fitoquímico. Minuti & Pellegrino (2008) afirmam que nas uvas e nos produtos delas derivados, como o vinho tinto, é encontrada uma grande quantidade de compostos fenólicos, especialmente flavonoides e ácidos hidroxinâmicos e hidroxibenzóicos.

As estruturas dos flavonoides quercertina e kaempferol, e dos não-flavonoides ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, estão apresentadas na Figura 3.

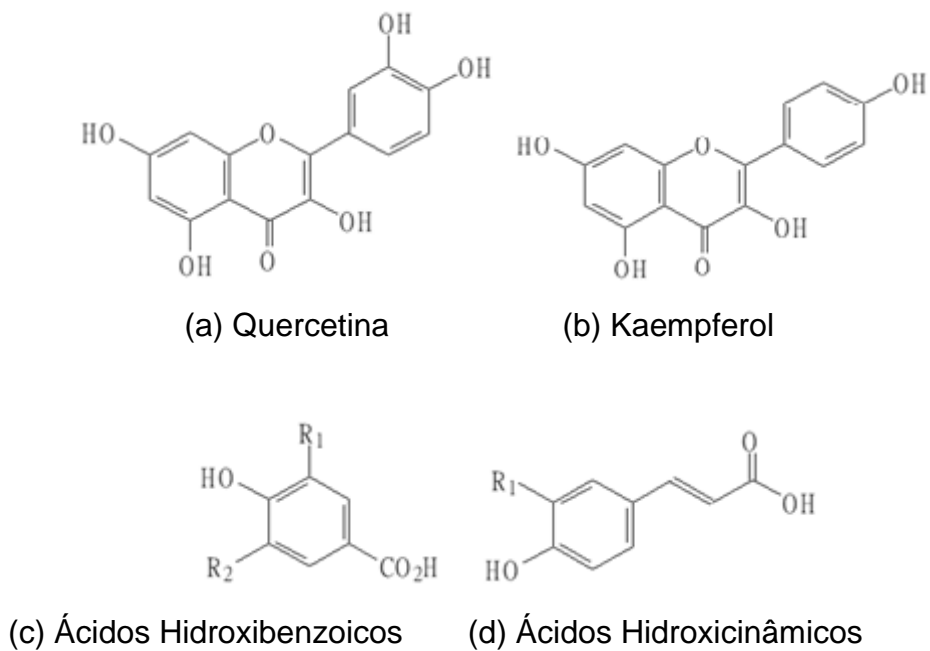


Figura 3 – Estruturas químicas de flavonoides (quercetina e kaempferol) e não-flavonoides (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos)

### 1.2.2 Melatonina

Melatonina (N-acetyl-5-metoxitriptamina) é um neurohormônio que participa da regulação do ciclo circadiano. Nos vertebrados, é produzido pela glândula pineal no período noturno. É sintetizada do metabolismo do L-triptofano via serotonina (REITER, 1991; POSMYK & JANAS, 2009). É um composto bioativo com propriedades antioxidantes (REITER, 1993; POSMYK & JANAS, 2009; JUNG-HYNES et al., 2010), atividades anticâncer, neuroprotetiva e imunomodulatória (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012).

A tradicional dieta do Mediterrâneo sugere que os produtos derivados de uvas são componentes associados à redução dos riscos de doenças crônicas degenerativas (LA VECCHIA & BOSETTI, 2006). Iriti et al. (2010) sugerem que a melatonina, além dos compostos fenólicos, são responsáveis por esses benefícios à saúde.

A literatura reporta que melatonina tem sido encontrada em órgãos de plantas como em folhas, frutos e sementes (KOLAR & MACHACKOVA, 1994; REITER et al, 2001; REITER & TAN, 2002). Têm sido atribuídas as funções de fitormônio protetor

contra estresse oxidativo e como regulador de crescimento à melatonina (REITER, et al., 2009). Segundo Reiter et al. (2009), melatonina está presente em morango, kiwi, abacaxi, banana e maçã. A presença de melatonina em variedades de uvas italianas e francesas foi detectada pela primeira vez por Iriti et al. (2006).

Diversos trabalhos avaliam a presença de melatonina e/ou seus isômeros em vinhos (IRITI et al., 2011; IRITI et al., 2013; IRITI et al., 2015; GOMEZ et al., 2012; RODRIGUEZ-NARANJO et al., 2011a; RODRIGUEZ-NARANJO et al., 2011b; FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2017; KOCADAGLI et al., 2014), especialmente devido sua capacidade oxidante, contribuindo para validar a hipótese que vinhos tintos trazem benefícios à saúde humana.

Há fatores externos que podem influenciar o nível de melatonina nas uvas e vinhos, como variação genética, a parte do fruto estudado, o estágio de crescimento da planta, as condições agro-meteorológicas, o estresse ambiental e os procedimentos da vinificação (MURCH et al., 2010; GOMEZ et al., 2012).

Rodríguez-Naranjo et al. (2011a) avaliaram a ausência de melatonina em mostos antes da etapa de fermentação no preparo de vinhos e a presença de seu isômero após a inoculação com leveduras. Kocadagli et al. (2014) encontraram quantidades elevadas de um isômero de melatonina em alimentos fermentados como vinho tinto, cerveja e farelo de pão. Gomez et al. (2012) avaliaram melatonina e seu isômero em extratos de uvas e vinho Malbec para demonstrar que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* contribui para a presença de melatonina e seus isômeros nos vinhos. No extrato das uvas foi quantificada melatonina, porém no vinho produzido foi detectada a presença do seu isômero. Fernández-Cruz et al. (2017) avaliaram se as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima* têm influência na síntese da melatonina em vinhos. Concluíram que cinco das sete leveduras estudadas formaram melatonina durante o processo fermentativo.

A estrutura química da melatonina é apresentada na Figura 4.



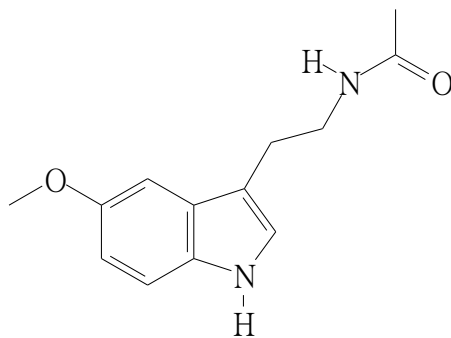


Figura 4 – Estrutura química da melatonina

## 2. Técnicas Espectroquímicas de Análise

Os métodos espectroanalíticos são ferramentas indispensáveis para a elucidação de estruturas moleculares, bem como para a determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos (SKOOG et al., 2006).

A detecção seletiva de metais permite a aplicação de técnicas espectrométricas com alta seletividade e sensibilidade, como por exemplo: absorção atômica, emissão óptica, fluorescência atômica e espectrometria de massas (ROSENKRANZ e BETTMER, 2000).

Na espectroscopia atômica, a amostra solubilizada que está sendo analisada é atomizada por meio de uma chama, de um forno, ou por meio de um plasma. As amostras são vaporizadas no intervalo de temperatura entre 2000 e 6000 K, decompondo-se em átomos. As concentrações dos átomos no estado gasoso são determinadas pela medida da absorção ou da emissão de radiação em determinados comprimentos de onda característicos dos elementos (HARRIS, 2005).

Espectrometria de absorção atômica é a técnica mais empregada para determinação de espécies químicas essencialmente pela sua simplicidade e custo relativamente baixo. Porém, para alguns elementos é menos sensível que outras técnicas, como fluorescência e emissão atômica. Consiste na aspiração da amostra para a chama com temperatura entre 2000 e 3000 K. Os átomos absorvem parte da radiação proveniente da fonte e a luz não absorvida alcança o detector (HARRIS, 2005). Sua maior limitação é a natureza monoelementar.

Na espectroscopia de fluorescência atômica, os átomos presentes na chama são irradiados com um laser, sendo promovidos a um estado eletrônico excitado, a

partir do qual eles podem fluorescer para retornar ao estado fundamental. (HARRIS, 2005).

Na espectrometria de emissão atômica os átomos são excitados por uma energia externa que pode ser suprida por um plasma ou por uma chama e permite a determinação multielementar, o que representa um diferencial em relação aos métodos de absorção atômica. Conforme Skoog et al. (2006), o plasma é uma mistura gasosa condutiva que contém uma concentração significativa de cátions e elétrons. Os íons, uma vez formados no plasma, são capazes de absorver potência suficiente de uma fonte externa para manter a temperatura em um dado nível, de forma que a ionização adicional sustenta o plasma.

A espectrometria com plasma indutivamente acoplado (ICP) é utilizada na determinação simultânea de mais de 70 elementos em poucos minutos de análise. No ICP-MS, os íons formados no plasma são encaminhados para o analisador de massas, onde são selecionados de acordo com sua razão massa-carga e detectados (SKOOG et al., 2006). Conforme Harris (2005), no plasma, a temperatura mais elevada, a estabilidade e o ambiente quimicamente inerte da atmosfera de argônio eliminam a maioria das interferências encontradas nas análises que utilizam chamas. O ICP OES é a técnica espectroscópica de emissão mais utilizada, visto que oferece alta estabilidade, baixo ruído e imunidade a muitos tipos de interferências, no entanto, os custos de obtenção e operação são elevados.

### ***2.1 Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas (MIP OES)***

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) permite a determinação multielementar de espécies químicas em vários tipos de matrizes e é atualmente reconhecida por seu baixo custo operacional, além de reduzidos tempo de análise e consumo de amostras. O aparelho utiliza nitrogênio como fonte do plasma e conta com o próprio gerador do gás a partir do ar (MATUSIEWICZ & SLACHCIŃSKI, 2014; LIMA et al., 2016). Estudos apontam que o MIP OES pode oferecer desempenhos comparáveis ou melhores que outras técnicas analíticas como FAAS ou ICP OES para diversos elementos em materiais como amostras ambientais, produtos derivados de petróleo, alimentos, amostras

geológicas, materiais biológicos, etc. (LIMA et al., 2016; MATUSIEWICZ & SLACHCIŃSKI, 2006; NIEDZIELSKI et al. 2015; OZBEK & AKMAN, 2016; LEÃO et al. 2018; KARLSSON et al., 2015).

Jung et al. (2019) compararam as técnicas de ICP OES e MIP OES quando estudaram a quantificação de manganês em uvas e vinhos tintos de diferentes regiões do sul da Coreia. Foi observado efeito de matriz com o MIP OES e a técnica de adição de padrão foi usada para compensação. Os autores testaram duas formas de pré-tratamento nas amostras: digestão com ácido nítrico e diluição com ácido nítrico 5%. Ambos os métodos de pré-tratamento puderam ser usados para determinar manganês com o MIP OES. Sensibilidade e precisão foram observadas tanto para as determinações por ICP OES como para MIP OES.

Nelson et al. (2015) determinaram Sr, Rb, K, Na e Mg em 26 vinhos Malbec da região de Mendonza (Argentina) usando espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas. Os resultados obtidos foram comparados com 15 vinhos da Califórnia (EUA). Este foi o primeiro trabalho onde o MIP AES foi usado na determinação multielementar para estudo de classificação pela origem geográfica de vinhos. Os autores avaliaram a técnica como importante, uma vez que é possível realizar análises multielementares e com baixo custo de operação.

Pires et al. (2019) estudaram Be, Ga, In, Sc e Y como padrões internos na determinação de 14 elementos em amostras de cerveja por MIP OES. Os analitos foram determinados após degaseificação em ultrassom, diluição das amostras de cerveja com uma solução de ácido nítrico 1 mol L<sup>-1</sup> (1:4) e com a adição do padrão interno. Cada analito respondeu de forma diferente a cada padrão interno aplicado. O método proposto foi aplicado na determinação multi-elementar em cervejas comerciais e os resultados foram comparados com os obtidos por ICP OES após digestão das amostras.

MIP OES foi utilizado por Leão et al. (2018) para determinação multielementar (Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn) em cervejas. O estudo propõe um método para decomposição das amostras por digestão em meio ácido com sistema de refluxo. Os autores destacaram como vantagens da técnica MIP OES a análise multielementar, menores limites de quantificação, redução de custos operacionais e necessidade de pequena quantidade de amostra.

Lima et al. (2016) determinaram cádmio, cobre, cromo, manganês, chumbo e zinco em fertilizantes por MIP OES após extração por aquecimento e sonicação em banho ultrassônico. Os extratos foram preparados com a dissolução de 150 mg de fertilizante em 4 mL de ácido clorídrico 50% (v/v) e sonicação em banho ultrassônico por 10 minutos a 85 °C. Os autores concluíram que a combinação da sonicação com aquecimento é um método eficiente, de baixo custo e rápido para extração de metais em fertilizantes.

Ozbek e Akman (2016) desenvolveram um método para determinação de cálcio, cobre, magnésio, manganês, ferro, potássio, fósforo e zinco em diferentes tipos de pães na Turquia por espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas. As amostras de pães foram secas a 100 °C e digeridas com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio na proporção 3:1. O método foi validado e os autores ressaltaram as vantagens da técnica MIP AES: rapidez, praticidade e baixo custo operacional.

Matusiewicz e Slachciński (2006) determinaram simultaneamente elementos que formam hidretos (As, Sb, Se e Sn) e Hg de amostras residuais de natureza ambiental (sedimento marinho) e biológica (fígado de peixe e hepatopâncreas de lagosta) utilizando MIP OES. O método foi validado pela análise de amostras de referências e foi considerado como alternativa atrativa uma vez que o consumo de reagentes e a produção de resíduos perigosos foram reduzidos.

Matusiewicz & Slachciński (2014) desenvolveram e validaram um método de extração de Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb, Sr e Zn por fluido supercrítico assistido por microondas em materiais de referência, visando um procedimento limpo e eficiente para determinação de elementos inorgânicos. Os parâmetros da extração foram: tempo de 10 minutos, temperatura de 280 °C e pressão de 90 bar. As espécies químicas foram determinadas por MIP OES e os resultados foram concordantes com os valores certificados.

Neher et al. (2018) otimizaram um método analítico de determinação multielementar em um suplemento nutricional, a spirulina, derivado de uma microalga. Foram determinados por MIP OES os seguintes elementos: Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, V e Zn. Foi realizado o procedimento de digestão assistida por ultrassom. Exceto para o cádmio, todos os valores obtidos

estão em concordância com os recomendados pela FDA (Food and Drug Administration).

Karlsson et al. (2015) compararam resultados obtidos por MIP OES e ICP-MS quando determinaram os teores de Ca, K, Mg, Na, Al, Fe, Mn, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, V e Zn em amostras de biomassa de girassol digeridas por micro-ondas com ácido nítrico, que é considerada uma matriz complexa. O estudo demonstrou que a digestão com ácido nítrico é um método de decomposição adequado para a matriz e que os resultados obtidos no MIP OES são correspondentes aos resultados encontrados por ICP-MS. Para As, Mo e Co, as concentrações encontradas foram abaixo do limite de detecção do método. Os autores recomendaram o uso de padrão interno para correção de efeitos de matriz.

### **3. Método de Tratamento das Amostras: Degradação Sonoquímica**

A sonoquímica estuda o efeito de ondas ultrassônicas sobre sistemas químicos. O princípio físico que rege este processo é a cavitação acústica. A cavitação consiste na formação, crescimento e colapso de bolhas que ocorre devido a transmissão de energia acústica de um transdutor ultrassônico para o sistema reacional. Durante o colapso das bolhas são geradas altas tensões que tem a capacidade de modificar estruturas químicas (MARTINES et al., 2000; BORGES & KORN, 2002).

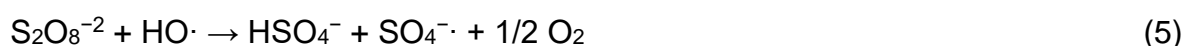
Luque-García & Luque de Castro (2003) relatam que a rápida compressão adiabática de gases e vapores nas bolhas produzem temperaturas e pressões extremamente altas. A combinação de fatores como calor, pressão e turbulência é usada para acelerar a transferência de massa em reações químicas, para criar novos caminhos reacionais, para quebrar ou desalojar partículas ou gerar diferentes produtos daqueles obtidos pelas condições convencionais (FENG et al., 2011).

Conforme Safari et al. (2015), em soluções aquosas a cavitação acústica produz radicais livres e outras espécies reativas, como os radicais HO• e H• devido à degradação térmica da água como mostram as reações (1) e (2). Os radicais HO• e H• também podem reagir com o persulfato e produzir radicais SO<sub>4</sub><sup>-•</sup> que também são espécies reativas de acordo com as reações (3) a (7).



Onde o símbolo “sonicação” significa a sonicação.

Na presença do  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  tem-se:



Aplicações do ultrassom são objeto de vários estudos disponíveis na literatura: limpeza de materiais, fonte de agitação e dispersão, síntese orgânica, degradação de polímeros, polimerização, sonoluminescência, sonólise, preparação de catalisadores (MARTINES et al., 2000; SUSLIK et al., 1999), preparo de amostras visando a extração de analitos de diferentes tipos de amostras (LUQUE-GARCÍA & LUQUE DE CASTRO, 2003; CHEMAT et al., 2004; LIMA et al., 2016).

Zhang et al. (2015) estudaram a evidência direta da formação de radicais livres de 1-hidroxietil em vinho tinto Cabernet Sauvignon da China que recebeu tratamento em banho ultrassônico de baixa frequência. Os radicais livres foram detectados por EPR (Ressonância Paramagnética Eletrônica). Segundo os autores, ultrassom é uma técnica considerada promissora para processamento, preservação e extração na tecnologia de alimentos.

Zheng et al. (2014) usaram ondas ultrassônicas de baixa frequência para acelerar a maturação de vinhos de ameixa na China. Foram avaliadas as mudanças após a sonicação nos seguintes parâmetros: acidez total, esterificação total, compostos voláteis e as qualidades sensoriais do vinho de ameixa. As condições ótimas para o tratamento ultrassônico para acelerar a maturação do vinho foram: frequência de 45 kHz, potência de 360 W e tempo de sonicação de 30 minutos. Os

resultados mostraram que o tratamento ultrassônico de baixa frequência tem efeito positivo no processo de envelhecimento de vinhos de ameixa.

Bermejo-Barrera et al. (2001) determinaram por espectrometria de absorção atômica elementos traço (As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Pb, Se e Zn) em frutos do mar após lixiviação ácida induzida por banho ultrassônico como etapa de pré-tratamento das amostras. As condições operacionais foram otimizadas e o método foi aplicado em amostras de mexilhão, atum e moluscos.

Priego-Capote e Luque de Castro (2004) determinaram macro (Ca e Mg) e micronutrientes (Fe, Cu e Zn) em ração animal por absorção atômica por chama utilizando um sistema dinâmico de extração assistida por ultrassom. O método foi proposto após desenho experimental e otimização dos parâmetros estudados. Os autores apresentam como vantagens o reduzido tempo de extração e manipulação de amostra com pouca quantidade de solução extratora.

Lima et al. (2016) pesquisaram sobre o efeito da combinação de sonicação e aquecimento sobre a extração de metais (Cd, Cu, Cr, Mn, Pb e Zn) em fertilizantes inorgânicos. O método de determinação dos metais utilizado foi MIP OES. O resultado foi satisfatório, uma alta eficiência na extração dos elementos estudados foi obtida com os seguintes parâmetros do processo: 150 mg de fertilizante e 4 mL de HCl 50% (v/v) sonicados por 10 minutos com temperatura de 85 °C. Apenas para o elemento cádmio o rendimento da extração do metal foi de 50%. Os autores afirmam que a energia ultrassônica tem um efeito significativo no pré-tratamento de amostras de fertilizantes.

A otimização da degradação sonoquímica de tetraciclina em solução aquosa na presença de persulfato de sódio foi estudada por Safari et al. (2015). Os parâmetros estudados foram: pH, concentração do persulfato, concentração inicial da tetraciclina e tempo da reação. Os resultados mostraram que o tempo de reação é o parâmetro com maior efeito na degradação, seguido por concentração do persulfato, concentração inicial da tetraciclina e pH.

Songlin et al. (2015) utilizaram ultrassom para degradação do ácido húmico na presença de anions de persulfato e realizaram um estudo cinético do processo. Dos fatores estudados, concentração do persulfato, potência do ultrassom, pH da solução e temperatura são os que influenciam a degradação do ácido húmico.

Micro-ondas e ultrassom foram utilizados por Chemat et al. (2004) na digestão de amostras de óleos comestíveis para determinação de cobre e de nitrogênio total em amostras de alimentos. Os autores ressaltaram que as duas técnicas tem sido utilizadas visando redução de tempo de digestão, redução da quantidade de reagentes, diminuição da geração de resíduos, automação e segurança. Foi concluído no estudo que a combinação de digestão por micro-ondas e ultrassom é um método eficiente de determinação de cobre em óleos e de nitrogênio total em amostras de alimentos.

Borges e Korn (2002) estudaram a geração sonoquímica de oxidantes em solução aquosa saturada de tetracloreto de carbono. Os autores observaram a geração de radicais  $\cdot\text{Cl}$ , que podem produzir HCl se interagirem com moléculas de água, podem ainda oxidar outras espécies presentes no meio durante o processo de irradiação e ainda podem formar  $\text{Cl}_2$  se combinados. Além da determinação de espécies químicas, a produção de oxidantes pela sonicação de soluções pode ser considerada uma alternativa para o preparo de amostras, colaborando para a redução do uso de reagentes e um reduzido descarte de rejeitos para o meio ambiente.

## **4. Estatística Multivariada**

### ***4.1 Otimização Multivariada***

Em um sistema, as variáveis (ou fatores) podem influenciar a resposta desejada. O número de experimentos aumenta de acordo com o número de fatores envolvidos no estudo. No processo de otimização, há dois tipos de variáveis: as respostas, ditas variáveis dependentes, que podem ser qualitativas ou quantitativas; e os fatores, que são as variáveis independentes.

Experimentos de triagem são executados para determinar as variáveis experimentais e as interações entre elas que possam influenciar significativamente a(s) resposta(s) de interesse (LUNDSTEDT, 1998).

Uma vez selecionadas as variáveis que provavelmente interferem no sistema, um desenho experimental deve ser utilizado a fim de otimizar a resposta desejada.



Os fatores que não afetam significativamente a resposta experimental devem ser fixados durante toda realização do experimento (TEÓFILO & FERREIRA, 2006).

Otimizar um experimento, segundo Teófilo & Ferreira (2006), significa encontrar os valores das variáveis que produzirão a melhor resposta desejada, ou seja, encontrar a região ótima na área definida pelos fatores. Novaes et al. (2016) acrescentam que o objetivo da otimização de análises químicas é melhorar a performance do método, assegurar boas características analíticas como precisão, exatidão e sensibilidade, garantindo a qualidade dos dados gerados.

A otimização univariada é caracterizada pelo estudo de uma variável por vez e tem como principais desvantagens: uma grande quantidade de experimentos, que leva a um maior consumo de tempo e reagentes, além de não levar em consideração a avaliação das interações entre as variáveis estudadas. Neste tipo de otimização, enquanto o nível de um fator é alterado, os níveis dos demais são mantidos constantes (BEZERRA et al, 2008).

A otimização multivariada tem se destacado no estabelecimento de condições ótimas para aplicação de métodos analíticos (BAS & BOYACI, 2007). São métodos baseados em ferramentas estatísticas e matemáticas que permitem estabelecer a relevância e a significância estatística dos efeitos dos fatores estudados, bem como avaliar os efeitos de interações entre os mesmos, tendo como vantagem a redução do tempo e do consumo de reagentes (NOVAES et al., 2017).

Ferreira et al. (2007) estudaram fundamentos e aplicações de técnicas multivariadas usadas para otimização de procedimentos analíticos e sistemas envolvendo métodos espectroanalíticos como FAAS, ETAAS, ICP OES e ICP-MS. Os autores estudaram a aplicação de desenhos de otimização experimental em sistemas de amostragem, procedimentos de digestão, parâmetros instrumentais de métodos analíticos e testes de robustez.

#### *4.1.1 Planejamento Fatorial*

Planejamentos fatoriais completos ou fracionários são metodologias multivariadas baseadas na variação de fatores simultaneamente a um limitado número de níveis para cada variável. Permitem a realização de triagem de variáveis evidenciando as mais significativas e quantificando suas interações (NOVAES et al.,

2017). Candiote et al. (2014) afirmam que planejamentos fatoriais são ferramentas econômicas e eficientes muito utilizadas para seleção de fatores em experimentos de triagem.

O planejamento fatorial completo é utilizado para estudos preliminares do processo de otimização, enquanto o planejamento fracionário é recomendado tanto quando o problema envolve um grande número de variáveis, como para experimentos de triagem (FERREIRA et al., 2007). No planejamento fatorial a influência de todas as variáveis e fatores experimentais e os efeitos das interações na resposta são investigados. Se a combinação de  $k$  fatores é investigada em dois níveis, o desenho fatorial terá  $2^k$  experimentos (TEÓFILO & FERREIRA, 2006).

O limite do número de experimentos possível de ser colocado em prática é facilmente excedido uma vez que o número de variáveis aumenta, principalmente para planejamentos com  $k > 4$ . Lundstedt et al. (1998) afirmam que na maioria das investigações, é admissível assumir que a influência das interações de terceira ordem ou mais são muito pequenas ou negligenciáveis e podem ser excluídas do modelo polinomial. O fracionamento do planejamento fatorial com  $2^{k-p}$  (onde  $k$  representa o número de variáveis e  $p$  representa o tamanho da fração) foi definido para diminuição do número de experimentos quando se trabalha com muitas variáveis. Desta forma, um grande número de variáveis experimentais pode ser investigado sem o aumento excessivo do número de experimentos, garantindo ainda a cobertura do domínio experimental.

A identificação das variáveis significativas de um processo pode ser alcançada através de métodos de triagem como o planejamento fatorial completo ou fracionário. Porém, a otimização das variáveis estudadas pode ser alcançada somente através da aplicação de métodos capazes de identificar o comportamento da(s) resposta(s). Uma das abordagens mais comuns utilizadas para otimização completa é a metodologia de superfície de resposta (BEZERRA et al., 2008; BAS & BOYACI, 2007), onde podem ser citados os Planejamentos Box-Behnken, Composto Central e Doehlert.

#### *4.1.2 Planejamento Box-Behnken*

O planejamento Box-Behnken é um desenho rotativo de segunda ordem baseado em um arranjo fatorial incompleto de três níveis (FERREIRA et al., 2007). Requer poucas combinações de fatores que são estudados sempre em três níveis. Como desvantagem deste planejamento, pode ser citado o fato que algumas combinações de níveis de variáveis não podem ser testadas, no caso de experimentos com três variáveis. (NOVAES et al., 2017).

#### *4.1.3 Planejamento Composto Central*

Planejamento composto central é uma ferramenta estatística baseada em modelo não-linear multivariado para otimização de processos analíticos e para determinar equações de modelos de regressão (SADHUKHAN et al., 2016). O processo de otimização envolve basicamente três passos: 1) um planejamento fatorial de dois níveis; 2) pontos axiais de um planejamento em estrela e 3) um ponto central (NOVAES et al., 2017).

#### *4.1.4 Planejamento Doehlert*

É considerado um planejamento prático e eficiente e que necessita de um número reduzido de experimentos, visto que o domínio da vizinhança da região ótima é facilmente explorado pelo ajuste de poucos experimentos (LUNDSTEDT et al., 1998). O número de experimentos necessários para a aplicação do planejamento é  $N = k^2 + k + pc$ , onde  $k$  é o número de variáveis e  $pc$  é o número de réplicas do ponto central. A Figura 5 mostra tal informação, uma vez que o próximo hexágono utiliza pontos experimentais já explorados pelo hexágono anterior.

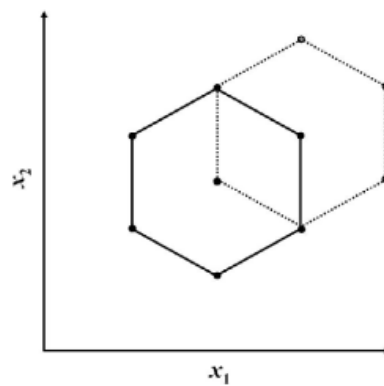


Figura 5 – Planejamento Doehlert com duas variáveis (linha sólida) com adição de novos experimentos (linha pontilhada) (fonte: TEÓFILO & FERREIRA, 2006)

Segundo Bezerra et al. (2008), para duas variáveis, a matriz Doehlert consiste de um ponto central e mais seis pontos adicionais, está situada sob um círculo, e por isso forma um hexágono regular. A Tabela 2 apresenta a matriz Doehlert para duas e três variáveis.

Tabela 2 - Matriz Doehlert para duas e três variáveis

Variáveis experimentais – Matriz Doehlert					
	2 variáveis		3 variáveis		
	X <sub>1a</sub>	X <sub>2a</sub>	X <sub>1b</sub>	X <sub>2b</sub>	X <sub>3b</sub>
1	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0
3	0,5	0,866	0,5	0,866	0
4	-1	0	0,5	0,289	0,817
5	-0,5	-0,866	-1	0	0
6	0,5	-0,866	-0,5	0,866	0
7	-0,5	0,866	-0,5	-0,289	-0,817
8			0,5	-0,866	0
9			0,5	-0,289	-0,817
10			-0,5	0,866	0
11			0	0,577	-0,817
12			-0,5	0,289	0,817
13			0	-0,577	0,817

Conforme Teófilo & Ferreira (2006), cada planejamento é definido considerando o número de variáveis e os valores codificados ( $x_i$ ) da matriz experimental. A relação entre os valores experimentais e os codificados é dada pela equação 1.

$$x_i = \left( \frac{z_i - z_i^0}{\Delta z_i} \right) \beta_d \quad (1)$$

Onde o termo  $x_i$  é o valor codificado para o nível do fator  $i$ ,  $z_i$  é o seu experimental,  $\Delta z_i$  é a distância entre o valor experimental no ponto central e o experimental no nível superior ou inferior,  $\beta_d$  é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator (valores tabelados) e  $z_i^0$  é o valor experimental no ponto central.

O planejamento Doehlert descreve um domínio esférico para três variáveis (representado graficamente por um cubo octaedro) e hiperesférico para mais de três variáveis. Uma importante característica deste planejamento é que cada variável pode ser estudada em diferentes níveis (NOVAES et al., 2016) e o deslocamento da matriz experimental para outra região do domínio experimental pode ser realizado usando os pontos adjacentes anteriores (BEZERRA et al., 2008).

## **4.2 Múltiplas Respostas**

Algumas técnicas analíticas podem gerar um número grande de respostas que não podem ser otimizadas separadamente devido a quantidade de dados obtidos. Nesses casos, é necessário realizar uma otimização simultânea dos dados coletados, como por exemplo, a aplicação de uma função de desejabilidade.

### **4.2.1 Função Desejabilidade**

Eficiente, econômica e objetiva, a função desejabilidade é bastante utilizada na otimização de métodos analíticos de procedimentos com múltiplas respostas (BEZERRA et al., 2008).

Segundo Novaes et al. (2017), a metodologia é baseada na transformação de cada resposta individual em uma escala adimensional de desejabilidades individuais

(d). A escala de desejabilidades individuais pode variar de 0 a 1. Para uma resposta inaceitável deve-se obter valores próximos de 0, e para a resposta desejada deve-se obter valores próximos a 1. Esta transformação permite combinar os resultados obtidos para as propriedades medidas em diferentes ordens de grandeza. A partir da média geométrica das desejabilidades individuais é possível calcular a desejabilidade global pela equação 2.

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (2)$$

Onde m é o número de respostas estudadas no processo de otimização. Portanto, para estudo do processo de otimização simultânea deve-se simplesmente calcular os níveis das variáveis que maximizem a:

$$d = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases}$$

Onde L é o menor valor aceitável para a resposta e s é o peso. Logo, quando s=1, a função de desejabilidade é linear e quando s>1, uma maior importância é dada aos valores perto do ótimo.

O objetivo da função desejabilidade é encontrar as condições operacionais que garantam a conformidade de todas as respostas envolvidas e, ao mesmo tempo, o melhor valor da junção das respostas desejáveis (MYERS & MONTGOMERY, 2009).

Sadhukhan et al. (2016) aplicaram otimização usando planejamento composto central e função desejabilidade para o processo de sorção de azul de metileno de soluções aquosas por uma biomassa de baixo custo (*Lemna major*). Os parâmetros otimizados foram: concentração inicial da solução, dose de bioadsorvente, pH e agitação. A função desejabilidade foi usada para encontrar as condições ótimas onde a capacidade de adsorção máxima foi obtida para remover o azul de metileno usando a menor quantidade de biomassa.

Wang & Wan (2009) aplicaram a função desejabilidade visando otimizar o processo de produção de biohidrogênio. Os fatores estudados no planejamento

fatorial fracionário foram: temperatura (39 °C), pH inicial (7) e concentração de glucose (24,6 g L<sup>-1</sup>) na produção fermentativa de hidrogênio. A função desejabilidade foi utilizada para obter a eficiência máxima da degradação do substrato (95,3%), produção de hidrogênio (305,3 mL g<sup>-1</sup>) e taxa de produção média de hidrogênio (23,9 mL h<sup>-1</sup>).

Candiote et al. (2014) estudaram o papel do desenho experimental multivariado na otimização de métodos analíticos. Foram apresentadas algumas aplicações analíticas no contexto do desenvolvimento de métodos analíticos, especialmente a função desejabilidade, considerada uma das ferramentas mais utilizadas.

### ***4.3 Métodos de Decomposição Multivariada e Análise de Clusters***

Métodos de decomposição multivariada são indicados para otimizar dados multivariados a partir da redução da dimensão do número de variáveis correlacionadas, denominadas componentes principais ou variáveis latentes (KUMAR et al., 2014). Análise de agrupamentos é uma técnica multivariada que organiza os componentes com base nas suas características.

#### ***4.3.1 Análise por Grupamento Hierárquico e Análise de Componentes Principais***

Análise por grupamento hierárquico (HCA) e análise de componentes principais (PCA) são algoritmos desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível de informações contidas em um conjunto de dados analíticos. Permitem a visualização (gráficos bi ou tridimensionais) de um conjunto de dados, mesmo com um grande número de amostras e variáveis e ainda examina a presença ou a ausência de agrupamentos naturais entre as amostras (MOITA NETO & MOITA, 1998; CORREIA & FERREIRA, 2007).

A ideia central da análise de componentes principais é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados que consiste em um grande número de variáveis que se relacionam (KUMAR et al., 2014).

Belmiro et al. (2017) estudaram em 32 amostras de vinhos do Brasil (regiões do Vale do São Francisco, Serra Gaúcha e Campanha) e Argentina (Mendoza e San

Juan) compostos fenólicos e os classificaram de acordo com a região de origem. Determinaram oito compostos fenólicos por HPLC UV/Vis. Utilizaram PCA para avaliar os agrupamentos dos vinhos estudados de acordo com sua composição e origem geográfica.

Geana et al. (2014) utilizaram PCA como ferramenta para diferenciar vinhos da Romênia de acordo com dois parâmetros: origem geográfica e variedade. Os parâmetros químicos foram determinados por HPLC PDA, ICP-MS e FAAS. Foram determinados 22 espécies químicas e 7 compostos fenólicos em 22 amostras de vinhos de duas regiões produtoras do país.

Kwan et al. (1979) e Kwan et al. (1980) utilizaram Análise de Componentes Principais (PCA) no estudo da composição química e análise de substâncias orgânicas, respectivamente, em vinhos Pinot Noir proveniente da França e dos EUA.

Andrade et al. (2013) aplicaram Análise de Componentes Principais para determinar e correlacionar o perfil de antocianinas (9 tipos) de vinhos brasileiros (regiões Vale do São Francisco e Rio Grande do Sul) e chilenos (Valle Del Colchagua e Central Valley) de acordo com a origem geográfica.

Tian et al. (2017) classificaram vinhos (tinto e branco) de cinco regiões da França a partir de 17 elementos, entre metais e metalóides, determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS). Foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) para classificar os vinhos de acordo com a região de produção.

Kruzliova et al. (2013) classificaram 75 tipos de vinhos da Croácia. As espécies químicas foram determinadas por ICP-MS. Foram utilizadas as ferramentas análise de componentes principais, análises de *clusters*, análise discriminatória linear e análise de variância no tratamento estatístico dos dados. A aplicação de técnicas estatísticas multivariadas possibilita o uso e entendimento de dados gerados por técnicas baseadas nas propriedades gerais das amostras e ainda uma classificação sem necessidade de dados adicionais de composição química.

#### 4.3.2 Redes Neurais Artificiais

As redes neurais artificiais têm sido amplamente utilizadas nas áreas de processamento de imagens. Têm como foco a visualização e agrupamento de dados



e oferecem a vantagem da possibilidade de previsão de modelos não-lineares para superfícies de resposta e otimização de dados analíticos. Redes neurais artificiais são inspiradas no arranjo de redes cerebrais e consistem no processamento de um grupo de elementos com alta conexão denominados neurônios (BEZERRA et al., 2008).

Ainda de acordo com Bezerra et al. (2008), esses neurônios são arranjados em uma série de camadas: uma camada de entrada representando as variáveis independentes, uma camada de saída representando as variáveis dependentes e diversas camadas ocultas que associam as entradas com as saídas. Cada neurônio de cada camada é conectado com cada neurônio da próxima camada. O padrão de interconexão ente os neurônios é chamado de arquitetura de rede.

Para Kohonen (1989), umas das principais abordagens das redes neurais artificiais é o uso de aprendizagem competitiva, resultando no agrupamento (ou *clustering*) dos dados. Um dos exemplos mais conhecidos é o Mapa Auto-Organizável de Kohonen (SOM).

O modelo de Kohonen produz um mapeamento topológico e arranja de forma otimizada, com dimensão inferior aos dados de entrada, um número fixo de vetores em um espaço de entrada de alta dimensionalidade, facilitando a compreensão dos dados (NOVAES et al., 2017; SHIEH & LIAO, 2012).

Segundo Costa e Costa (2010), cada neurônio  $i$  é representado por um vetor de pesos  $m_i = [m_{i1}, m_{i2}, m_{ip}]^T$  onde  $p$  é a dimensão dos vetores de entrada. Para cada padrão de entrada um neurônio é escolhido o vencedor,  $c$ , usando o critério de maior similaridade apresentado na equação 3 abaixo:

$$\|x - m_c\| = \min \{\|x - m_i\|\} \quad (3)$$

Onde  $\|\cdot\|$  representa a distância Euclidiana entre os vetores.

Uma vez que a distância entre o vetor de pesos de um neurônio e o vetor de dados de entrada é a mínima para todos os neurônios da rede, esse neurônio juntamente com um conjunto pré-definido de neurônios vizinhos terá seus pesos automaticamente reajustados pelo algoritmo de aprendizagem da rede (GONÇALVES et al., 1996).

No processo de treinamento de auto-organização de mapas, a rede determina a unidade de saída que melhor responde ao vetor de entrada e o vetor de pesos para a unidade chamada de vencedora (unidade do *cluster* cujo vetor de pesos mais se aproxima do vetor de padrões de entrada) é ajustado de acordo com um algoritmo de treinamento, preservando ao máximo a topologia dos dados de entrada (HAYKIN, 2007).

Shieh & Liao (2012) estudaram e aplicaram uma versão aprimorada para interpretação de informações de um método de visualização de dados por redes neurais. Os resultados obtidos mostram que a abordagem proposta tem capacidade de demonstrar a distribuição de dados, as distâncias entre os neurônios e as fronteiras do agrupamento. Os resultados mostraram ainda que os efeitos de visualização resultante do algoritmo proposto são melhores que outros métodos de visualização.

Sauthier et al. (2019) determinaram 12 compostos bioativos em casca e polpa de uma variedade de manga (*Mangifera indica* L.) cultivada na Bahia. Os resultados obtidos foram avaliados por PCA e redes neurais artificiais. Segundo os autores, o PCA é aplicável para o processamento de dados de natureza linear. As redes neurais artificiais podem ser empregadas para dados lineares e não-lineares. É possível extrair os mesmos resultados usando as duas formas exploratórias de análise, mas as redes neurais artificiais são uma ferramenta mais vantajosa, pois permitem gerar uma quantidade de informações maior com menos variáveis.

Novaes et al. (2017) utilizaram as ferramentas PCA e mapas auto-organizáveis de Kohonen para análise exploratória dos dados do estudo da composição mineral em cascas, polpa e semente de *Passiflora L* cultivada na Bahia. O método de determinação das espécies químicas foi otimizado. Os autores afirmam que SOM é uma excelente ferramenta de análise de *clusters*, de fácil aplicação e interpretação e que permite inferir tendências na formação dos grupos com base nas características estatísticas das amostras. Eles concluíram que redes neurais e PCA são métodos complementares para análise e interpretação dos dados.

Silva et al. (2019) avaliaram nove elementos por ICP OES em refrigerantes e fizeram uso da análise de componentes principais e mapas auto-organizáveis de Kohonen para comparar a capacidade de agrupamento das amostras de acordo com as características. Os autores afirmam que as duas ferramentas se complementam

na análise dos dados e ressaltam as vantagens das redes neurais/mapas auto-organizáveis de Kohonen: facilidade da identificação dos grupos formados, identificação das concentrações de cada elemento nos agrupamentos e minimização dos erros, tornando mais precisa a descrição do comportamento dos dados.

Li et al. (2018) utilizaram mapas auto-organizáveis de Kohonen para classificar água do mar em região costeira da província de Fujian, sudeste da China, avaliando 19 variáveis relacionadas à qualidade da água. Os autores compararam os resultados obtidos com as análises exploratórias de PCA e SOM e concluíram que os mapas auto-organizáveis de Kohonen forneceram uma classificação mais detalhada e mais útil das amostras estudadas (água localizada na superfície, em região média e em região profunda).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, K.; MALTESE, F.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. **Phytochemistry Reviews**, 9, 357-378, 2010.

ALKIS, I. M.; OZ, S.; ATAKOL, A.; YILMAZ, N.; ANLI, R. E.; ATAKOL, O. Investigation of heavy metal concentrations in some Turkish wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, 33, 105-110, 2014.

ALMEIDA, C. M. S.; ALMEIDA, A. C.; GODOY, M. L. D. P.; SAINT'PIERRE, T. D.; GODOY, J. M. Differentiation Among Brazilian Wine Regions Based on Lead Isotopic Data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 27, 1026-1031, 2016.

ANDRADE, R. H. S.; NASCIMENTO, L. S.; PEREIRA, G. E.; HALLWASS, F.; PAIM, A. P. S. Anthocyanic composition of Brazilian red wines and use of HPLC-UV-Vis associated to chemometrics to distinguish wines from different regions. **Microchemical Journal**, 110, 256-262, 2013.

ANGELOVA, V. R.; IVANOV, A. S.; BRAIKOV, D. M. Heavy metals (Pb, Cu, Zn and Cd) in the system soil – grapevine – grape. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79, 713-721, 1999.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, 99, 191-203, 2006.

BARCIA, M. T.; PERTUZATTI, P. B.; BOCHI, V. C.; HERMOSÍN-GUTIERREZ, GODOY, H. T. Vinification by-products and their phenolic compounds. **American Journal of Food Science and Technology**, 3, 18-23, 2015.

BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, 78, 836-845, 2007.

BEDOR, C. N. G.; RAMOS, L. O.; REGO, M. A. V.; PAVÃO, A. C.; AUGUSTO, L. G. S. Avaliação e reflexos da comercialização e utilização de agrotóxicos na região do Submédio do Vale do São Francisco. **Revista Baiana de Saúde Pública**, 31, 68-76, 2007.

BELMIRO, T. M. C.; PEREIRA, C. F.; PAIM, A. P. S. Red wibes from South America: Content of phenolic compounds and chemometric distinction by origin. **Microchemical Journal**, 133, 114-120, 2017.

BERMEJO-BARRERA, P.; MUÑIZ-NAVEIRO, O.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A. The multivariate optimisation of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 439, 211–227, 2001.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76, 965-977, 2008.

BIMPILAS, A.; TSIMOGIANNIS, D.; BALTA-BRIUMA, K.; LYMPEROPOULOU, T.; OREOPOULOU, V. Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. **Food Chemistry**, 178, 164-171, 2015.

BORGES, R. M. E.; SOARES, J. M.; LIMA, M. A. C. Características da Viticultura no Vale do Submédio São Francisco. **Documento online 222, Embrapa Semi-árido**, Petrolina, out. 2009. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/178148/1/pATRICIA-2.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2019.

BORGES, S. da S.; KORN, M. Geração sonoquímica de oxidantes em solução aquosa saturada de tetracloreto de carbono. **Química Nova**, 25, 558-562, 2002.

BRAININA, K. Z.; STOZHOK, N. Y.; BELYSHEVA, G. M.; INZHEVATOVA, O. V.; KOLYADINA, L. I.; CREMISINI, C.; GALLETTI, M. Determination of heavy metals in wines by anodic stripping voltammetry with thick-film modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, 514, 227-234, 2004.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progresso da Viticultura Brasileira. **Revista Brasileira de Viticultura**, Volume Especial E., 144-149, 2011.

CANDIOTI, L. V.; DE ZAN, M. M.; CÁMARA, M. S.; GOICOCHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, 124, 123-138, 2014.

CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S.; de SOUSA, R. B. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, 23, 3-19, 2008.

CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S.; de SOUSA, R. B. Determinação do zinco em vinhos por espectrofotometria de absorção atômica com chama. Validação do método de análise. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, 17, 15-26, 2002.

CHEMAT, S.; LAGHA, A.; AMAR, H. A.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted microwave digestion. **Ultrasonics Sonochemistry**, 11, 5-8, 2004.

CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A. C. P.; TAVARES, R. M.; SOUSA, M. J.; AGASSE, A.; DELROT, S.; GERÓS, H. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Food**, 1, 1-22, 2007.

CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry frutis grown in Brazil. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 50, 9, 2581-2586, 2002.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, 30, 481-487, 2007.

COSTA, R. C. C.; CARDOSO, M. I.; ARAÚJO, A. N. Metals Determination in Wines by Sequential Injection Analysis with Flame Atomic Absorption Spectrometry. **American Journal of Enology and Viticulture**, 51, 131-136, 2000.

COSTA, J. A. F.; COSTA, B. di A. C. S. Uma nova abordagem para visualização e detecção de agrupamentos em mapas de Kohonen baseado em gradientes das components. **VI Workshop de Visão Computacional**, 120–125, 2010.

DEIS, L.; CAVAGNARO, B.; BOTTINI, R.; WUILLOUD, R.; SILVA, M. F. Water déficit and exogenous ABA significantly affect grape and wine phenolic composition under in field and in-vitro conditions. **Plant Growth Regulation**, 65, 11-21, 2011.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (Poly) phenolics in human health: structures, bioavailability and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, 18, 1818-1892, 2013.

DIAS, F. S.; LOVILLO, M. P.; BARROSO, C. G.; CARNEIRO, A. F.; DAVID, J. M. Direct determination of phenolic acids and hydroxymethylfurfural in wines elaborated in Vale do São Francisco region-Brazil by HPLC-DAD. **Analytical Methods**, 9, 643-648, 2017.

DIAZ, C.; CONDE, J. E.; ESTEVEZ, D.; OLIVERO, S. J. P.; TRUJILLO, J. P. P. Application of multivariate analysis and artificial neural networks for the differentiation of red wines from the Canary Islands according to the Island of origin. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 51, 4303-4307, 2003.

DORDONI, R.; COLANGELO, D.; GIRIBALDI, M.; GIUFFRIDA, M. G.; DE FAVERI, D. M.; LAMBRI, M. Effect of Bentonite Characteristics on Wine Proteins, Polyphenol, and Metals under Conditions of Different pH. **American Journal of Enology and Viticulture**, 66, 518-530, 2015.

DUGO, G.; LA PERA, L.; PELLICANÓ, T. M.; DI BELLA, G.; D'IMPERIO, M. Determination of some inorganic anions and heavy metals in D.O.C. Golden and Amber Marsala wines: statistical study of the influence of ageing period, colour and sugar content. **Food Chemistry**, 91, 355-363, 2005.

DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, 2, 112-118, 2007.

FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WEISS, J. **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing**, New York: Springer, 2011, 665p.

- FERNÁNDEZ-CRUZ, E.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, M. A.; VALERO, E.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic fermentation by different wine yeast strains. **Food Chemistry**, 217, 431-437, 2017.
- FERNÁNDEZ-MAR, M. I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILA, M. C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry**, 130, 797-813, 2012.
- FERREIRA, S. L. C.; LEMOS, V. A.; de CARVALHO, V. S.; da SILVA, E. G. P.; QUEIROZ, A. F. S. Q.; FELIZ, C. S. A.; da SILVA, D. L. F.; DOURADO, G. B.; OLIVEIRA, R. V. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry – an overview. **Microchemical Journal**, 140, 176-182 2018.
- FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. das G. A.; FERREIRA, H. S.; da SILVA, E. G. P.; ARAÚJO, R. G. O.; SOUZA, A. S.; MACEDO, S. M.; LIMA, D. de C.; de JESUS, R. M.; AMORIM, F. A. C.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. **Applied Spectroscopy Reviews**, 42, 475-491, 2007.
- FERREIRA, S. L. C.; SOUZA, A. S.; BRANDAO, G. C.; FERREIRA, H. S.; dos SANTOS, W. N. L.; PIMENTEL, M. F.; VALE, M. G. R. Direct determination of iron and manganese in wine using the reference element technique and fast sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 74, 699-702, 2008.
- FRIAS, F.; CONDE, J. E.; RODRIGUEZ, M. A.; DOHNAL, V.; PEREZ-TRUJILLO, J. P. Metallic content of wines from the Canary Islands (Spain). Application of artificial neural networks to the data analysis. **Nahrung**, 46, 370-375, 2002.
- GALANI-NIKOLAKAKAI, S.; KALLITHRAKAS-KONTOS, N.; KATSANOS, A. A. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. **The Science of the Total Environment**, 285, 155-163, 2002.
- GEANA, E. I.; MARINESEU, A.; IORDACHE, A. M.; SANDRU, C.; IONETE, R. E.; BALA, C. Differentiation of Romanian Wines on Geographical Origin and Wine Variety by Elemental Composition and Phenolic Components. **Food Analytical Methods**, 7, 2064-2074, 2014.
- GEORGIEV, V.; ANTHONY, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceutical. **Nutrients**, 6, 391-415, 2014.
- GHANEM, C.; HANNA-WAKIM, L.; NEHME, N.; SOUCHARD, J.; TAILLANDIER, P.; EL RAYESS, Y. Impact of winemaking techniques on phenolic compounds composition and content of wine: a review. **Nova science publishers**, New York, 104–130, 2014.
- GOMEZ, F. J. V.; RABA, J.; CERUTTI, S.; SILVA, M. F. Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. **Journal of Pineal Research**, 52, 349-355, 2012.

GONÇALVES, M. L.; de ANDRADE NETTO, M. L.; ZULLO JUNIOR, J. Um sistema neural modular para classificação de imagens utilizando mapas de Kohonen. **VIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Salvador, 845-849, 1996.

GUILFORD, J. M.; PEZZUTO, J. M. Wine and Health: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, 62, 471-486, 2011.

HARRIS, D. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2005, 876p.

HAYKIN, S. **Redes Neurais - Princípios e Práticas**, São Paulo: Bookman, 2007.

HE, F.; LIANG, N. N.; MU, L.; PAN, Q. H.; WANG, J.; REEVES, M. J.; DUAN, C. Q. Anthocyanins and their variation in red wines I. monomeric anthocyanins and their color expression. **Molecules**, 17, 1571, 2012.

HERNÁNDEZ, G. G.; LA TORRE, A. H.; LÉON, J. J. A. Quantity of K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Pb, Zn and ashes in DOC Tacoronte-Acentejo (Canary Islands, Spain) musts and wines. **Lebensm Unters Forsch**, 203, 517-521, 1996.

IBANEZ, J. G.; CARREON-ALVAREZ, A.; BARCENA-SOTO, M.; CASILLAS, N. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 672-683, 2008.

IBGE, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Fev/2020. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil>> Acesso em: 21 fev. 2020.

ILLUMINATI, S.; ANNIBALDI, A.; TRUZZI, C.; SCARPONI, G. Recent temporal variations of trace metal content in an Italian White wine. **Food Chemistry**, 159, 493-497, 2014.

IRITI, M.; VIGENTINI, I. Tryptophan-Ethylester, the False (Unveiled) Melatonin Isomer in Red Wine. **International Journal of Thryptophan Research**, 8, 27-29, 2015.

IRITI, M.; VITALINI, S.; GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; FICO, G. Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity. **Journal of Pineal Research**, 54, 322-333, 2013.

IRITI, M.; VITALINI, S.; GARDANA, C.; ZANZOTTO, A.; FICO, G.; FAORO, F.; SIMONETTI, P. From vineyard to glass: agrochemicals enhance the melatonin and total polyphenol contents and antiradical activity of red wines. **Journal of Pineal Research**, 51, 278-285, 2011.

IRITI, M.; VARONI, E. M.; VITALINI, S. Melatonin in Mediterranean diets. **Journal of Pineal Research**, 49, 101-105, 2010.



IRITI, M.; ROSSONI, M.; FAORO, F. Melatonin content in grape: myth or panacea? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86, 1432–1438, 2006.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, 68, 167-182, 2003.

JUNG, M. Y.; KANG, J. H.; CHOI, Y. S.; LEE, D. Y.; LEE, J. Y.; PARK, J. S. Analytical features of microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) for the quantitation of manganese (Mn) in wild grape (*Vitis coignetiae*) red wines: Comparison with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). **Food Chemistry**, 274, 20-25, 2019.

JUNG-HYNES, B.; REITER, R. J.; AHMAD, N. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and câncer. **Journal of Pineal Research**, 48, 9-19, 2010.

KARADJOVA, I.; IZGI, B.; GUCER, S. Fractionation and speciation of Cu, Zn and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 57, 581-590, 2002.

KARLSSON, S.; SJOBERG, V.; OGAR, A. Comparison of MPAES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (*Helianthus annuus*). **Talanta**, 135, 124-132, 2015.

KILL, L. H. P.; LIMA, M. A. C. de. Descrição do Ecosistema e sua Influência na Qualidade das Uvas e das Mangas Produzidos no Vale do Submédio São Francisco. **Documento online 222, Embrapa Semi-árido**, Petrolina, out. 2009. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/661915/1/kiill.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

KMENT, P.; MIHALJEVIC, M.; ETTLER, V.; SEBEK, O.; STRNAD, L. ROHLOVA, L. Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. **Food Chemistry**, 91, 157-165, 2005.

KOCADAGLI, T.; YILMAZ, C.; GOKMEN, V. Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 153, 151-156, 2014.

KOLLAR, J.; MACHACKOVA, I. Melatonin: does it regulate rhythmicity and photoperiodism also in higher plants?. **Flower Newsletter**, 17, 53-54, 1994.

KRUZLICOVA, D.; FIKET, Z.; KNIEWALD, G. Classification of Croatian wine varieties using multivariate analysis of data obtained by high resolution ICP-MS analysis. **Food Research International**, 54, 621-626, 2013.

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, 123, 186-199, 2014.

KUNKEE, R. E.; ESCHNAUER, H. R. **Wine**. 6 edição, Germany: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2003.

KWAN, W.-O.; KOWALSKI, B. R.; SKOGERBOY, R. K. Pattern recognition analysis of elemental data. Wines of *Vitis vinifera* cv. Pinot noir from France and the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 27, 1321-1326, 1979.

KWAN, W.-O.; KOWALSKI, B. R.; SKOGERBOY, R. K. Pattern recognition analysis of gas chromatographic data. Geographic classification of wines of *Vitis vinifera* cv Pinot Noir from France and the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 28, 356–359, 1980.

LA TORRE, G. L.; LA PERA, L.; RANDO, R.; LO TURCO, V.; DI BELLA, G.; SAITTA, M.; DUGO, G. Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. **Food Chemistry**, 110, 729-734, 2008.

LA VECCHIA, C.; BOSETTI, C. Diet and câncer risk in Mediterranean countries: open issues. **Public Health Nutrition** 9, 1077-1082, 2006.

LEÃO, P. R. P.; MEDINA, A. L.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Decomposição de amostras de cerveja com sistema de refluxo para determinação monoelementar por FAAS/AES e determinação multielementar por MIP OES. **Brazilian Journal Food Technology**, 21, 1-11, 2018.

LI, T.; SUN, G.; YANG, C.; LIANG, K.; MA, S.; HUANG, L. Using self-organizing map for coastal water quality classification: Towards a better understanding of patterns and processes. **Science of the Total Environment**, 628-629, 1446-1459, 2018.

LIMA, A. F.; LIMA, F. F.; RITCHER, E. M.; MUNOZ, R. A. A.; Combination of sonication and heating for metal extraction from inorganic fertilizers prior to microwave-induced plasma spectrometry determinations. **Applied Acoustics**, 103, 124-128, 2016.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, 22, 41-47, 2003.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, A.; PETERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 42, 3-40, 1998.

MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI JÚNIOR, M. O efeito do ultrassom em reações químicas. **Química Nova**, 23, 251-255, 2000.

MATUSIEWICZ, H.; SLACHCIŃSKI, M. Simultaneous determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in sonicate slurries of biological and environmental reference materials by hydride generation microwave induced plasma optical emission spectrometry (SS-HG-MIP-OES). **Microchemical Journal**, 82 78-85, 2006.

MATUSIEWICZ, H.; SLACHCIŃSKI, M. Development of a one-sep microwave-assisted subcritical water extraction for simultaneous determination of inorganic elements (Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb, Sr, Zn) in reference materials by microwave induced plasma spectrometry. **Microchemical Journal**, 115, 6-10, 2014.

MINUTI, L.; PELLEGRINO, R. Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gás chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1185, 23-30, 2008.

MOITA NETO, J.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, 21, 467-469, 1998.

MORENO, I. M.; GUTIÉRREZ, A. J., RUBIO, C.; GONZÁLEZ, A. G.; GONZALEZ-WELLER, D.; BENCHARKI, N.; HARDISSON, A.; REVERT, C. Classification of Spanish Red Wines Using Artificial Neural Networks with Enological Parameters and Mineral Content. **American Journal of Enology and Viticulture**, 69, 167-175, 2018.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product, Optimization Using Designed Experiments**, New York: Wiley, 2009.

MURCH, S.J.; HALL, B.A.; LE, C.H.; SAXENA, P. K. Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during véraison and ripening of wine grapes. **Journal of Pineal Research**, 49, 95 -100, 2010.

NEHER, B. D.; AZCARATE, S. M.; CAMINA, J. M.; SAVIO, M.; Nutritional analysis of Spirulina dietary supplements: Optimization procedure of ultrassound-asssited digestion for multielemental determination. **Food Chemistry**, 257, 295-301, 2018.

NELSON, J.; HOPFER, H.; GILLELAND, G.; CUTHBERTSON, D.; BOULTON, R.; EBELER, S. E. Elemental Profiling of Malbec Wines under Controlled Conditions Using Microwave Plasma-Atomic Emission Spectroscopy. **American Journal of Enology and Viticulture**, 66, 373-378, 2015.

NIEDZIELSKI, P.; KOZAK, L.; WACHELKA, M.; JAKUBOWSKI, K.; WYBIERALSKA, J. The microwave induced plasma with optical emission spectrometry (MIP-OES) in 23 elements determination in geological sample. **Talanta**, 132 591–599, 2015.

NOVAES, C. G.; BEZERRA, M. A.; da SILVA, E. G. P.; dos SANTOS, A. M. PINTO; ROMÃO, I. L. da S.; SANTOS NETO, J. H. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal**, 128, 331-346, 2016.

NOVAES, C. G.; ROMÃO, I. L. da S.; SANTOS, B. G.; RIBEIRO, J. P.; BEZERRA, M. A.; da SILVA, E. G. P. Screening of *Passiflora L.* mineral content using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. **Food Chemistry**, 233, 507-513, 2017.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; de PAULA, V. F.; do NASCIMENTO JUNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfície de resposta – Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, 9, 1184-1215, 2017.

OIV Statistical Report on World Vitiviniculture, International Organisation of Vine and Wine. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>>. Acesso em: 3 mai. 2020.

OZBEK, N.; AKMAN, S.; Method development for the determination of calcium, cooper, magnesium, manganese, iron, potassium, phosphorus and zinc in different types of breads by microwave induced plasma-atomic emission spectrometry. **Food Chemistry**, 200, 245-248, 2016.

PESSANHA, S.; CARVALHO, M. L.; BECKER, M.; BOHLEN, A. V. Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by Total Reflection X-ray Fluorescence and Energy Dispersive X-ray Fluorescence: Comparison on two vineyards. **Spectrochimica Acta Part B**, 65, 504-507, 2010.

PEYNARD, E. **The taste of wine: The art and science of wine appreciation**. England: John Wiley e Sons, 1996.

PIRES, L. N.; DIAS, F. S.; TEIXEIRA, L. S. G. Assessing the internal standardization of the direct multi-element determination in beer samples through microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, 1090, 31-38, 2019.

POHL, P. What do metals tell us about wine?. **Trends in Analytical Chemistry**, 26, 941-949, 2007.

POSMYK, M. M.; JANAS, K. M. Melatonin in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31, 1 – 11, 2009.

PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Dynamic ultrasound-assisted leaching of essential macro and micronutrient metal elements from animal feeds prior to flame atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 378, 1376-1381, 2004.

PYRZYNSKA, K. Chemical speciation and fractionation of metals in wine. **Chemical Speciation and Bioavailability**, 19, 1-8, 2007.

REITER, R. J. Pineal melatonin – Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, 12, 151-180, 1991.

REITER, R. J. The melatonin rhythm – Both a clock and a calendar. **Experientia**, 49, 654-664, 1993.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; BURKHARDT, S.; MANCHESTER, L. C. Melatonin in plants. **Nutrition Reviews**, 59, 286-290, 2001.

REITER, R. J.; TAN, D. X. Melatonin: an antioxidant in edible plants. **New York Academy of Sciences**, 957, 341-344, 2002.

REITER, R. J.; PAREDES, S. D.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Phytomelatonin: A review. **Journal of Experimental Botany**, 60, 57-69, 2009.

RIBEREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAEYEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments**. England: John Wiley and Sons, 2000.

ROBINSON, A. L.; BOSS, P. K.; SOLOMON, P. S.; TRENKOVE, R. D.; HEYMANN, H.; EBELER, S. E. Origins of grape and wine aroma. Part 1. Chemical components and viticultural impacts. **American Journal of Enology and Viticulture**, 65, 1-23, 2014.

RODRIGUEZ-NARANJO; M. I.; GIL-IZQUIERDO, A.; TRONCOSO, A. M.; CANTOS, E.; GARCIA, PARRILLA, M.C. Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. **Food Chemistry**, 126, 1608-1613, 2011a.

RODRIGUEZ-NARANJO; M. I.; GIL-IZQUIERDO, A.; TRONCOSO, A. M.; CANTOS, E.; GARCIA, PARRILLA, M.C. Melatonin: a new bioactive compound in wine. **Journal of Food Composition and Analysis**, 24, 603-608, 2011b.

ROMIC, M.; ROMIC, D.; DOLANJSKI, D.; STRICEVIC, I. Heavy Metals Accumulation in Topsoils from the Wine-growing Regions. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, 69, 1-10, 2004.

ROSENKRANZ, B.; BETTMER, J. Microwave-induced plasma-optical emission spectrometry- fundamental aspects and application in metal speciation analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, 19, 138-156, 2000.

SADHUKHAN, B.; MONDAL, N. K.; CHATTORAJ, S. Optimisation using central composite design (CCD) and the desirability function for sorption of methylene blue from aqueous solution onto *Lemna major*. **Karbala International Journal of Modern Science**, 2, 145-155, 2016.

SAFARI, G. H.; NASSERI, S.; MAHVI, A. H.; YAGHMAEIAN, K.; NABIZADEH, R.; ALIMOHAMMADI, M. Optimization of sonochemical degradation of tetracycline in aqueous solution using sono-activated persulfate process. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, 13, 1-15, 2015.

SALEHI, B.; VLAISAVLJEVIC, S.; ADETUNJI, C. O.; ADETUNJI, J. B.; KREGIEL, D.; ANTOLAK, H.; PAWLIKOWSKA, E.; UPRETY, Y.; MILESKI, K. S.; DEVKOTA, H. P.; SHARIFI-RAD, J.; DAS, G.; PATRA, J. K.; JUGRAN, A.K.; SEGURA-CARRETERO, A.; CONTREAS, M.; DEL M. Plants of genus *Vitis*: Phenolic compounds, anticancer properties and clinical relevance. **Trends in Food Science & Technology**, 91, 362-379, 2019.

SAUTHIER, M. C. da S.; da SILVA, E. G. P.; SANTOS, B. R. da S.; SILVA, E. F. R.; CALDAS, J. da C.; MINHO, L. A. C.; dos SANTOS, A. M. P.; dos SANTOS, W. N. L. Screening of *Mangifera indica* L. funcional content using PCA and neural networks (ANN). **Food Chemistry**, 273, 115-123, 2019.

SHIEH, S-L.; LIAO, I-E. A new approach for data clustering and visualization using self-organizing maps. **Expert Systems with Applications**, 39, 11924-11933, 2012.

SILVA, E. dos S.; da SILVA, E. G. P., SILVA, D. dos S.; NOVAES, C. G.; AMORIM, F. A. C.; dos SANTOS, M. J. S.; BEZERRA, M. A. Evaluation of macro and micronutrient elements content from soft drinks using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. **Food Chemistry**, 273 9-14, 2019.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2006, 999p.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 11,287-313, 1997.

SONGLIN, W.; NING, Z.; SI, W.; QI, Z.; ZHI, Y. Modeling the oxidation kinetics of sono-activated persulfate's process on the degradation of humic acid. **Ultrasonics Sonochemistry**, 23, 128-134, 2015.

SUSLIK, K. S.; DIDENKO, Y.; FANG, M. M.; HYEON, T.; KOLBECK, K. J.; MCNAMARA III, W.; MDLELENI, M. M.; WONG, M. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, 357, 335-353, 1999.

TARIBA, B. Metals in Wine – Impact on Wine Quality and Health Outcomes. **Biological Trace Element Research**, 144, 143-156, 2011.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, 29, 338-350, 2006.

TIAN, Y.; YAN, C.; ZHANG, T.; TANG, H.; LI, H.; YU, J.; BERNARD, J.; CHEN, L.; MARTIN, S.; DELEPINE-GILON, N.; BOCKOVÁ, J.; VEIS, P.; CHEN, Y.; YU, J. Classification of wines according to their production regions with the contained trace elements using laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B**, 135, 91-101, 2017.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, 32, 1278-1287, 2009.

VIEIRA, M. G. A.; ALMEIDA NETO, A. F. de; SILVA, M. G. C. da; CARNEIRO, C. N.; MELO FILHO, A. A. Characterization and use of *in natura* and calcined rice husks for biosorption of heavy metals ions from aqueous effluents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 29, 619-633, 2012.

VOICA, C.; DEHELEAN, A.; PAMULA, A. Method validation for determination of heavy metals in wine and slightly alcoholic beverages by ICP-MS. **Journal of Physics: Conference Series**, 182, 2009.

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

VYSTAVNA, Y.; RUSHENKO, L.; DIADIN, D.; KLYMENKO, O.; KLYMENKO, M. Trace metals in wine and vineyard environment in southern Ukraine. **Food Chemistry**, 146, 339-344, 2014.

WANG, J.; WAN, W. Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process. **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 1253-1259, 2009.

ZHANG, Q.-A.; SHEN, Y.; FAN, X.-H.; MARTÍN, J. F. G.; WANG, X.; SOMG, Y. Free radical generation induced by ultrasound in red wine and model wine: Na EPR spin-trapping study. **Ultrasonics Sonochemistry**, 27, 96-101, 2015.

ZHENG, X.; ZHANG, M.; FANG, Z.; LIU, Y. Effects of low frequency ultrasonic treatment on the maturation of steeped greengage wine. **Food Chemistry**, 162, 264-269, 2014.

ZHU, L.; ZHANG, Y.; LU, J. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. **International Journal of Molecular Science**, 13, 3492-351, 2012.

## **ARTIGO 1**

### **OTIMIZAÇÃO DA DIGESTÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE VINHOS DO VALE DO SÃO FRANCISCO<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Food Analytical Methods



## **Otimização da digestão assistida por ultrassom para determinação multielementar em amostras de vinhos do Vale do São Francisco**

**Resumo:** No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação de alumínio, manganês, chumbo, cobre, cádmio e zinco por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas em cinco amostras de vinhos do Vale do São Francisco, região nordeste do Brasil. As amostras estudadas passaram por um tratamento sonoquímico visando a degradação dos compostos orgânicos. Um planejamento fatorial fracionário de dois níveis foi utilizado para estudar cinco variáveis experimentais e determinar quais foram significativas para o processo. Concentrações de ácido nítrico (2,3 mol L<sup>-1</sup>) e de peróxido de hidrogênio (9%) foram as variáveis significativas otimizadas pelo planejamento Doehlert, que teve como resposta a função desejabilidade. O método desenvolvido é simples, rápido, preciso, exato, tem baixo custo operacional e apresenta baixos limites de detecção e quantificação. Os valores obtidos foram (mg L<sup>-1</sup>): Cd: <LQ; Zn: <LQ-0,37; Pb: <LQ-0,1; Mn: LQ-1,03; Cu: 0,033-0,16 e Al: 0,31-0,56. Para zinco, cobre, chumbo e cádmio foram obtidos valores abaixo dos valores estabelecidos pela OIV e pelo Mercosul.

**Palavras-chave:** metais, degradação sonoquímica, planejamento Doehlert.

## **Optimization of ultrasound-assisted digestion for multielementary determination in samples of wine from the São Francisco Valley**

**Abstract:** In the present work, an analytical method was developed and validated for the determination of aluminum, manganese, lead, copper, cadmium and zinc by optical emission spectrometry with microwave-induced plasma in five wine samples from the São Francisco Valley, northeastern Brazil. The studied samples underwent a sonochemical treatment aiming the degradation of the organic compounds. A two-level fractional factorial design was used to study five experimental variables and determine which were significant for the process. Concentrations of nitric acid (2.3 mol L<sup>-1</sup>) and hydrogen peroxide (9%) were the significant variables optimized by the Doehlert design, which had the desirability function as response. The developed method is simple, fast, accurate, has low operating cost and has low limits of detection and quantification. The values obtained were (mg L<sup>-1</sup>): Cd: <LOQ; Zn: <LOQ-0.37; Pb: <LOQ-0.1; Mn: LOQ-1.03; Cu: 0.033-0.16 e Al: 0.31-0.56. For zinc, copper, lead and cadmium, values were below the values determined by the OIV and Mercosur.

**Keywords:** metals, sonochemical degradation, Doehlert design.

## 1. Introdução

A importância de algumas espécies químicas tem sido relatada em diversos trabalhos e a inserção na dieta de elementos como ferro, zinco, cálcio e magnésio é recomendada pelos especialistas em saúde e nutrição. No entanto, atenção deve ser dada aos limites estabelecidos pela legislação, tendo em vista que, se em excesso, alguns elementos químicos podem causar efeitos tóxicos nos processos metabólicos dos organismos (DURUIBE et al., 2007).

Os efeitos adversos à saúde decorrentes da contaminação por espécies químicas tóxicas têm sido estudados ao longo do tempo. A exposição prolongada a elementos como chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio apresentam riscos uma vez que eles não são degradados naturalmente e podem se acumular nos organismos. Tian et al. (2017) atentam para a necessidade do desenvolvimento de um método de determinação elementar em vinhos que permita acesso fácil, rápido e ambientalmente favorável às concentrações de elementos majoritários, minoritários e em nível traço.

O vinho, assim como as demais bebidas alcoólicas, é uma matriz complexa que contém uma variedade de compostos orgânicos. Diversas técnicas estão reportadas na literatura relacionando etapas de pré-tratamento visando eliminar a matriz da amostra para posterior determinação de espécies químicas, sendo as mais comuns: diluição com água (VOICA et al., 2009), tratamento com ácido nítrico ou ácido clorídrico (JUNG et al., 2019; NELSON et al., 2015; VOLPE et al., 2009; LA TORRE et al., 2008; DUGO et al., 2005), digestão com ácido nítrico ou ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio (JUNG et al., 2019; DORDONI et al., 2015; FERREIRA et al., 2008; ALKIS et al., 2014; KARADJOVA et al., 2002; VYSTAVNA et al., 2014; BRAININA et al., 2004), extração assistida em forno de micro-ondas (GALANI-NIKOLAKAKI et al., 2002), evaporação do álcool, queima do resíduo e posterior dissolução (AMORELLO et al., 2017) e tratamento ultrassônico (ZHENG et al., 2014).

O tratamento da amostra pode envolver uma transformação da(s) espécie(s) química(s) de interesse para uma forma apropriada visando a posterior aplicação do método de determinação. A degradação sonoquímica é um processo emergente e eficiente na degradação e extração de compostos orgânicos e inorgânicos, dentre

outras aplicações (LUQUE-GARCÍA & LUQUE DE CASTRO, 2003; NEHER et al., 2018). É um método promissor no tratamento de amostras, é considerado simples, robusto, de baixo custo e que utiliza menor quantidade de reagentes a serem reciclados ou descartados no ambiente (CHEMAT et al., 2004).

Em virtude do aumento dos padrões de produção e consumo estabelecidos pelos órgãos e agências regulamentadoras, do alto custo de reagentes e da grande quantidade de variáveis que interferem nos processos, a otimização é uma etapa significativa para melhoria do desempenho dos processos analíticos. A aplicação da função desejabilidade na otimização de métodos com múltiplas respostas traz vantagens como eficiência, economia e objetividade aos procedimentos analíticos (CANDIOTI et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e otimizar um método de degradação assistida por ultrassom para determinação multielementar em amostras de vinhos do Vale do São Francisco, região nordeste do Brasil.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Amostras, reagentes e soluções**

Foram determinadas as concentrações de zinco, cádmio, alumínio, cobre, chumbo e manganês em cinco amostras de vinhos tintos (Tempranillo, Tannat, Alicante, Cabernet Sauvignon e Petit Syrah) cedidas por duas vinícolas da região do Vale do São Francisco. As amostras foram coletadas direto dos tanques de armazenamento de cada variedade de vinho, armazenadas em frasco de vidro âmbar e estocadas sob refrigeração.

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram grau analítico: ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e persulfato de potássio. As vidrarias foram descontaminadas em banho de ácido nítrico 10% (v/v) por 24 horas e lavadas com água deionizada antes da utilização. As soluções estoque de Al (III), Mn (II), Pb (II), Cd (II), Zn (II) e Cu (II) (1000 mg L<sup>-1</sup>) (SpecSol, Quimlab Química e Metrologia, São José dos Campos, Brasil) foram usadas para preparar os padrões de referência (diluídas em HNO<sub>3</sub> 1,0 mol L<sup>-1</sup>) para uso na calibração.

## **2.2 Instrumentação**

A degradação das amostras de vinho foi realizada em banho ultrassônico Elma Ultrasonic S10H®, frequência de 50/ 60 Hz e potência de 90 W, Alemanha.

As determinações multielementares foram realizadas em um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas MIP OES modelo 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Os parâmetros instrumentais foram utilizados conforme as recomendações do fabricante. O sistema de introdução da amostra inclui uma câmara de nebulização ciclônica de vidro de dupla passagem e nebulizador OneNeb inerte. Um gerador de nitrogênio modelo 4107 (Agilent Technologies) foi usado como fonte de gás para o plasma.

Usando o software MP Expert foi efetuada uma correção de fundo automática. A bomba peristáltica foi programada para operar em 15 rpm. O tempo de estabilização foi de 15 segundos e o tempo de integração de 3 segundos. Dois parâmetros operacionais críticos (fluxo do nebulizador e posição de observação no plasma) foram automaticamente otimizados pelo software MP Expert (Agilent Technologies). Os comprimentos de onda (nm) selecionados foram Al (396,152), Mn (403,449), Pb (405,781), Cu (324,754), Cd (508,582) e Zn (213,857).

## **2.3 Procedimento Experimental**

### *2.3.1 Planejamento e Otimização do Experimento*

A fim de determinar quais as variáveis afetam de maneira significativa a resposta analítica, que neste estudo foi a função desejabilidade, foi proposto um planejamento fatorial fracionário de dois níveis para os fatores: concentração de ácido nítrico, concentração de peróxido de hidrogênio, temperatura do banho ultrassônico, tempo e concentração de persulfato de potássio para a sonicação das amostras de vinho em banho ultrassônico (Elma Ultrasonic S10H, frequência 50/60Hz, potência 90W, Alemanha). Foi utilizado o software Statistica 7 para Windows (Statsoft, Inc. Tulsa, EUA) no tratamento estatístico dos dados obtidos. As amostras de vinho passaram pela etapa de pré-tratamento, a degradação sonoquímica, visando eliminar as interferências causadas pela matriz.

### 2.3.2 Planejamento Doehlert e Função Desejabilidade

A partir dos resultados obtidos do planejamento fatorial fracionário, foram otimizadas as variáveis estatisticamente significativas (concentrações de ácido nítrico e de peróxido de hidrogênio) utilizando a matriz de Doehlert como ferramenta e tendo como resposta a função desejabilidade.

## 2.4 Validação

É necessário garantir a qualidade das medições realizadas em estudos analíticos. Comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade são alguns dos principais meios utilizados para firmar que o método estudado ou desenvolvido atende ao seu propósito e às normas estabelecidas por agências reguladoras e órgãos de fiscalização (VALDERRAMA et al., 2009). Para tanto, foram determinados limite de detecção, limite de quantificação, desvio padrão relativo, teste de adição/recuperação e comparação dos resultados utilizando um procedimento estabelecido na literatura.

### 2.4.1 Limite de Detecção

A IUPAC define que o limite de detecção é a menor quantidade que pode ser diferenciada do sinal de ruído com 95% de confiança (THOMPSON et al., 2002). Para os métodos analíticos que empregam uma curva analítica, o limite de detecção é definido como a concentração analítica que gera uma resposta superior ao desvio padrão do branco,  $s_b$ , considerando os erros tipo I e tipo II (falsos positivos e os falsos negativos) de acordo com a equação 1:

$$LD = 3,3 \cdot s_b / m \tag{1}$$

Onde  $m$  é a inclinação da curva analítica.

#### 2.4.2 Limite de Quantificação

Limite de quantificação representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser quantificado com 95% de confiança (THOMPSON et al., 2002). Assim como o LD, o LQ pode ser calculado a partir dos parâmetros da curva analítica conforme equação 2:

$$LQ = 10 \cdot s_b / m \quad (2)$$

Onde  $s_b$  é o desvio padrão do branco e  $m$  é a inclinação da curva analítica.

#### 2.4.3 Desvio Padrão Relativo

O desvio padrão relativo (RSD) representa quanto um resultado individual difere da média e pode ser calculado a partir da equação (3):

$$RSD = s/x \quad (3)$$

Onde  $s$  é o desvio padrão e  $x$  é a média do conjunto de dados.

#### 2.4.4 Teste de Adição e Recuperação

Diferentes concentrações dos analitos foram adicionadas às amostras para avaliar o efeito de matriz nos resultados analíticos. As recuperações foram realizadas adicionando os padrões em concentrações entre 0,5 e 8 mg L<sup>-1</sup>. A equação 4 apresenta a fórmula para o cálculo das porcentagens de recuperação.

$$\% \text{ Rec} = [(C_s - C_0) / C_{\text{add}}] \cdot 100 \quad (4)$$

Onde  $C_s$  é a concentração do analito na amostra mais o valor adicionado,  $C_0$  é a concentração do analito na amostra e  $C_{\text{add}}$  é a quantidade de analito que foi adicionada à amostra.

#### *2.4.5 Análise de Material de Referência*

Material de referência NIST 1570a (0,100 gramas de folhas de espinafre) foi digerido em triplicata em bloco digestor. A cada tubo de digestão com orla foi adicionado 1,0 mL de ácido nítrico concentrado (Merck), seguido de 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (Vetec) 30% (v/v). A mistura foi aquecida à temperatura de 150 °C por duas horas. O experimento foi realizado em triplicata. O conteúdo, ao final do tempo de digestão, foi filtrado, transferido para balões volumétricos e avolumados com água deionizada. As espécies químicas foram determinadas por MIP OES.

#### *2.4.6 Determinação das espécies químicas nas amostras de vinhos decompostas por digestão ácida*

Amostras dos vinhos estudados foram decompostas em bloco digestor para determinação das espécies químicas e comparação com os valores obtidos pela degradação sonoquímica. Dois mililitros de vinho foram pipetados para tubos de digestão com orla. A cada um foi adicionado 1 mL de ácido nítrico. Os tubos foram inseridos no bloco digestor e submetidos à temperatura de 150 °C. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 0,5 mL de peróxido de hidrogênio e novamente os tubos foram submetidos à temperatura de 150° C no bloco digestor. O experimento foi realizado em triplicata. Decorrida a decomposição das amostras, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente, o conteúdo foi filtrado e transferido para balões volumétricos de 50 mL que foram avolumados com água deinoizada. As espécies químicas foram determinadas no espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas.

### **3. Resultados e Discussão**

#### ***3.1 Planejamento e Otimização***

As condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) na determinação das espécies químicas nas



amostras de vinho foram: 3 replicatas, velocidade da bomba peristáltica de 15 rpm, tempo de estabilização do plasma de 15 segundos e tempo de leitura de 15 segundos.

A Tabela 1 apresenta os resultados do planejamento fatorial fracionário para a função desejabilidade no estudo da otimização da degradação de vinho assistida por ultrassom. É possível comprovar a informação obtida graficamente na Figura 1 sobre efeito do sinal negativo da concentração de ácido nítrico no processo: os valores obtidos para as desejabilidades nos níveis (-1) são superiores aos valores dos experimentos de níveis (+1). O sinal positivo do valor do efeito da concentração de peróxido de hidrogênio indica que a mudança de concentração do nível (-1) para o nível (+1) reflete num aumento da resposta no processo.

Tabela 1 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionário e resposta (função desejabilidade) para otimização do processo de degradação sonoquímica de amostras de vinhos

<b>K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub></b> <b>(mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> <b>(%)</b>	<b>HNO<sub>3</sub></b> <b>(mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Temperatura</b> <b>(°C)</b>	<b>Tempo</b> <b>(min)</b>	<b>Zn</b>	<b>Cd</b>	<b>Al</b>	<b>Cu</b>	<b>Pb</b>	<b>Mn</b>	<b>Desejabilidade</b>
0 (-1)	0 (-1)	3 (1)	30 (-1)	90 (1)	9060,85	1288,78	2930,83	8029	8842,22	25293,39	0,051
0,4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	30 (-1)	10 (-1)	16595,17	1483,44	16289,21	21953,35	12706,83	72911	0,659
0 (-1)	6 (1)	0 (-1)	30 (-1)	90 (1)	20172,82	1476,77	31960,7	22688,82	10187,88	63098,2	0,724
0,4 (1)	6 (1)	3 (1)	30 (-1)	10 (-1)	16480,11	1517,55	28118,46	16960,46	12353,33	40052,2	0,569
0 (-1)	0 (-1)	3 (1)	60 (1)	10 (-1)	6509,57	684	3205,47	7417,22	4172,39	23461,62	0
0,4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	60 (1)	90 (1)	16169,84	1800,89	11156,73	21511,02	14481,38	65798,59	0,637
0 (-1)	6 (1)	0 (-1)	60 (1)	10 (-1)	19695,49	2679,55	33038,66	20208,4	8472,22	63941,42	0,778
0,4 (1)	6 (1)	3 (1)	60 (1)	90 (1)	17170,83	1080,89	31509,19	17177,01	8781,55	41844,13	0,482
0,2 (0)	3 (0)	1,5 (0)	45 (0)	50 (0)	19074,17	1478,33	23463,47	20259,07	10318,55	61069,6	0,651
0,2 (0)	3 (0)	1,5 (0)	45 (0)	50 (0)	16844,17	1636,33	20880,81	20589,73	9736,22	66272,97	0,641
0,2 (0)	3 (0)	1,5 (0)	45 (0)	50 (0)	17978,39	3165,44	27320,81	17531,02	12698,38	61575,92	0,812

A Figura 1 mostra o Gráfico de Pareto obtido no estudo das variáveis do processo. É possível visualizar que as variáveis significativas em um nível de confiança de 95% são as concentrações de peróxido de hidrogênio e de ácido nítrico. Concentração de persulfato de potássio, temperatura e tempo de sonicação não foram significativas.

O efeito da concentração de peróxido de hidrogênio é positivo e menor que o efeito da concentração de ácido nítrico. O efeito da concentração de ácido nítrico na resposta foi negativo, o que indica que a variação da concentração de ácido nítrico do baixo para o alto nível causou uma diminuição na desejabilidade.

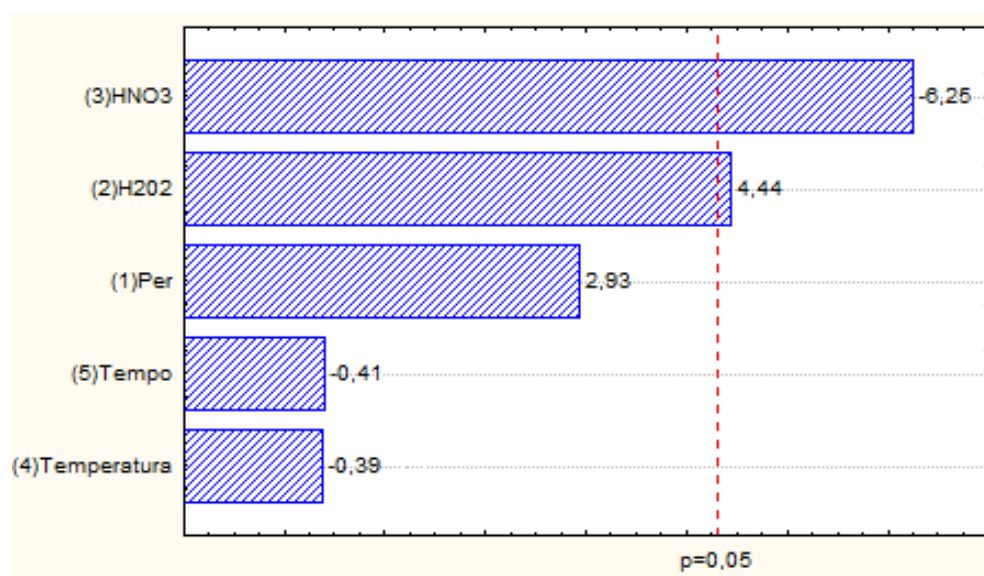


Figura 1 – Gráfico de Pareto a 95% de confiança obtido no experimento de otimização de cinco variáveis do processo de degradação assistida por ultrassom de amostras de vinhos

A Tabela 2 apresenta os resultados do Planejamento Doehlert a partir do estudo da otimização das variáveis significativas do processo, concentração de ácido nítrico e concentração de peróxido de hidrogênio, tendo como resposta as intensidades dos sinais obtidos dos elementos zinco, cádmio, alumínio, cobre, chumbo e manganês na matriz vinho. O ensaio 1 mostras as condições operacionais que maximizaram a resposta múltipla, apresentando a função desejabilidade global igual a 0,626.

Tabela 2 – Matriz do Planejamento Doehlert e respostas (intensidade) para otimização das variáveis [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] e [HNO<sub>3</sub>]

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	HNO <sub>3</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	Zn (cps)	Cd (cps)	Al (cps)	Cu (cps)	Pb (cps)	Mn (cps)	Desejabilidade Global
(0) 6	(0) 2	61069,29	54841,37	6971,17	11693,86	2929,08	24749,51	0,625709
(0) 6	(0) 2	59817,42	54359,37	6019,33	11584,19	3011,91	24271,51	0,443418
(0) 6	(0) 2	60664,88	54998,2	6126,67	11552,7	3028,91	24038,01	0,565178
(1) 10	(0) 2	61347,71	55306,86	6016,33	11602,36	2976,08	23950,34	0,592374
(0,5) 8	(0,866) 3	62894,59	56966,53	7272,67	11310,03	2860,41	23089,01	0,465647
(-1) 2	(0) 2	59155,88	53731,2	7058,33	11617,7	2981,91	25426,34	0
(-0,5) 4	(-0,866) 1	59979,05	54667,7	4586,5	11319,36	2816,08	23085,01	0
(0,5) 8	(-0,866) 1	59602,88	54646,36	4697	11287,03	2876,41	22867,18	0,143769
(-0,5) 4	(0,866) 3	62789,38	57206,36	5773	11141,53	2839,24	22617,17	0

A determinação das melhores condições experimentais para os dados modelados a partir do planejamento Doehlert pode ser realizada pela análise visual da superfície de resposta que, de forma usual, é uma representação bidimensional de um gráfico tridimensional. A Figura 2 mostra os gráficos da superfície de resposta e da superfície de contorno para as variáveis otimizadas (concentrações de ácido nítrico e de peróxido de hidrogênio) tendo como resposta múltipla a função desejabilidade global.

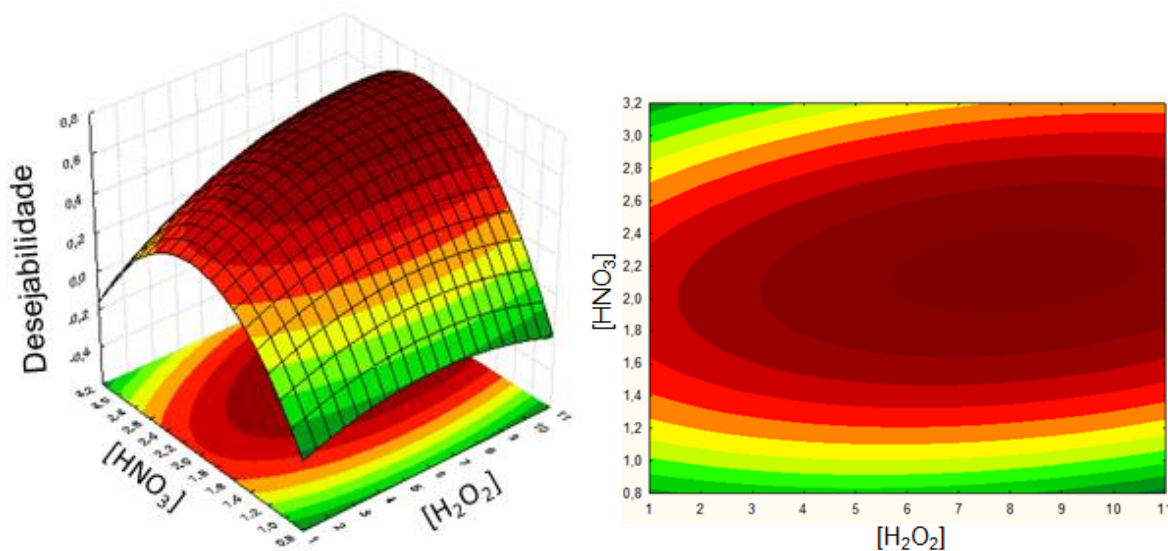


Figura 2 – Superfície de Resposta e Superfície de Contorno para otimização das variáveis  $[H_2O_2]$  e  $[HNO_3]$

Observa-se na Figura 2 a superfície com ponto de máximo dentro da região experimental. A equação polinomial obtida foi  $D = -1,46 + 0,181[H_2O_2] - 0,015[H_2O_2]^2 + 1,16[HNO_3] - 0,33[HNO_3]^2 + 0,040[H_2O_2]*[HNO_3]$ . Para determinar as condições ótimas, um sistema com derivadas parciais em relação a cada variável é montado e as coordenadas do ponto crítico são dadas com a resolução desse sistema de primeiro grau. As condições ótimas experimentais para obtenção da melhor resposta possível na determinação das espécies químicas estudadas foi: 9% de peróxido de hidrogênio e  $2,3 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido nítrico.

A Figura 3 apresenta os perfis para os valores preditos das desejabildades individuais e global na otimização das variáveis, concentração de ácido nítrico e concentração de peróxido de hidrogênio, usando Planejamento Doehlert na degradação assistida por ultrassom de amostras de vinho.

O valor teórico obtido para a desejabildade global foi 0,759 e pode ser observado na Figura 3. Este valor pode variar de 0 a 1 e quanto mais próximo da unidade, melhor será para a otimização simultânea das variáveis estudadas. A desejabildade global máxima indica que os ótimos individuais correspondentes a cada resposta estão próximos entre si e que pode haver uma condição experimental que os satisfaçam simultaneamente (NOVAES et al., 2017).

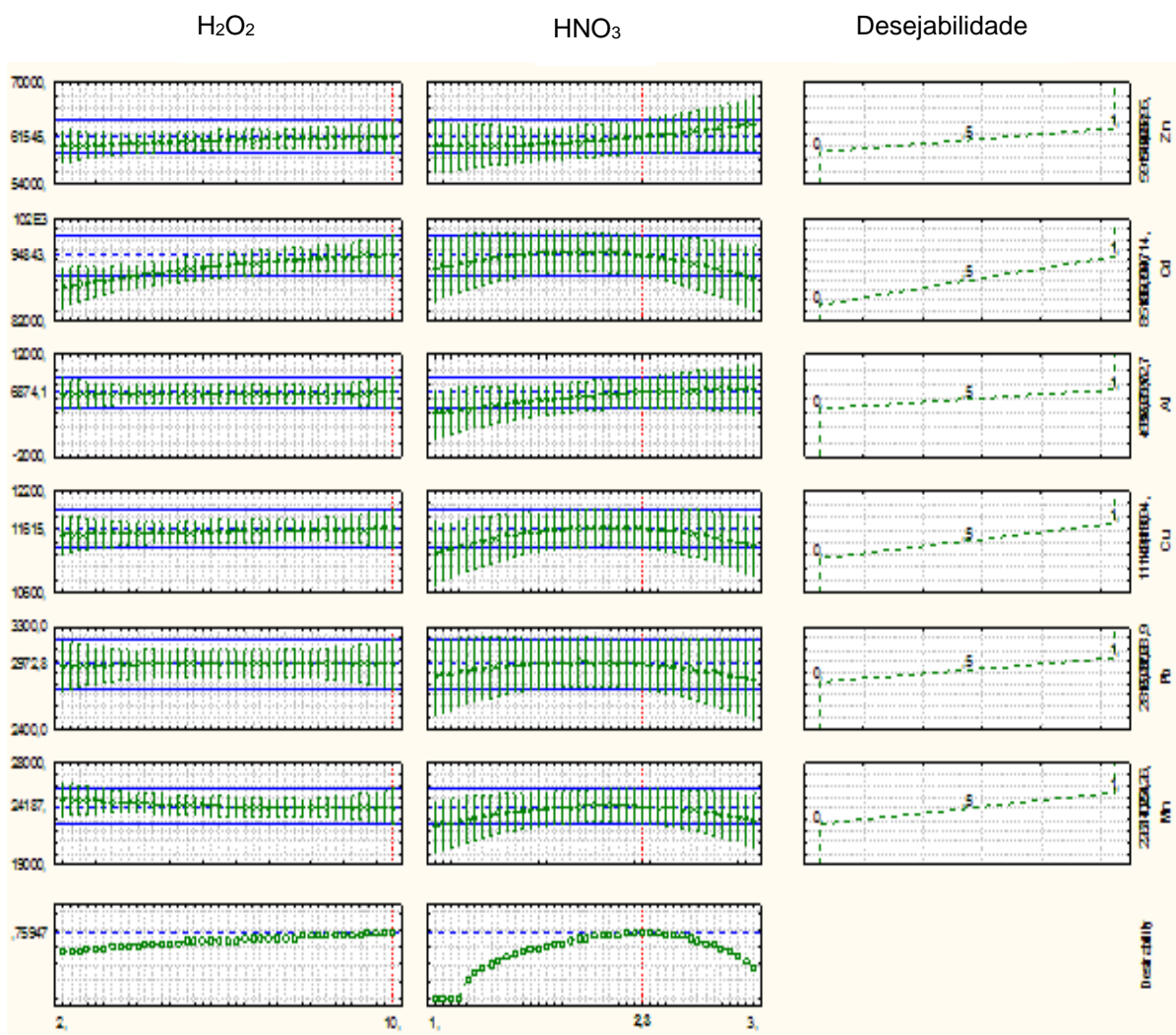


Figura 3 – Perfil dos valores preditos das deseabilidade individuais e global usando planejamento Doehlert na otimização da degradação sonoquímica de amostras de vinhos

### 3.2 Validação

#### 3.2.1 Limites de Detecção, Limites de Quantificação, Desvios Padrões Relativos, Teste de Adição e Recuperação e Análise de Material de Referência Certificado

Os limites de detecção encontrados variaram de 0,15 a 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que os limites de quantificação variaram de 0,5 a 110  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados encontrados para o teste de adição e recuperação variaram de 88 a 119%, os valores foram apresentados na Tabela 3 para cada elemento. A precisão foi expressa em termos do desvio padrão relativo com base nos resultados de dez

repetições em duas concentrações diferentes do analito, 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Os valores de RSD foram todos inferiores a 3%.

Tabela 3 – Limites de detecção, limites de quantificação, desvios padrões relativos e teste de adição e recuperação de analitos em vinhos

<b>Analito</b>	<b>Valor adicionado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor encontrado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>LD (µg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQ (µg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>RSD (%) 1,0 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>RSD (%) 10 mgL<sup>-1</sup></b>
<b>Zn</b>	0	< LQ					
	0,5	0,49	99	3,1	10,2	1,5	0,2
	2,5	2,2	88				
<b>Cu</b>	0	0,02					
	0,5	0,6	113	1,3	4,3	0,5	0,3
	2,5	2,9	117				
<b>Pb</b>	0	0,97					
	0,5	1,56	118	30	110	0,8	0,5
	2,5	3,7	109				
<b>Mn</b>	0	0,31					
	2,0	2,69	119	0,15	0,5	0,8	0,5
	8,0	8,73	105				
<b>Al</b>	0	0,20					
	0,5	0,77	108	17,4	58	0,7	0,5
	2,5	2,7	99				
<b>Cd</b>	0	0,34					
	2,0	2,5	114	15,3	51	2,7	0,3
	8,0	7,8	97				

A exatidão dos valores obtidos pelo MIP OES foi confirmada pela determinação dos analitos em material de referência (folhas de espinafre). Os valores determinados no presente trabalho estão apresentados na Tabela 4 e comparados com os valores certificados (NIST 1570a).

Tabela 4 – Análise de Amostra de Referência (folhas de espinafre NIST 1570a)

	<b>Zn</b>	<b>Cu</b>	<b>Mn</b>
<b>Valor determinado MIP OES (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	81,09 ± 2,08	11,87 ± 0,36	77,21 ± 0,69
<b>Valor certificado (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	82,3 ± 3,9	12,22 ± 0,86	76,0 ± 1,2
	<b>Pb</b>	<b>Cd</b>	<b>Al</b>
<b>Valor determinado MIP OES (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<LQ	<LQ	303,64 ± 9,20
<b>Valor certificado (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	-	2,870 ± 0,058	310 ± 15

### 3.3 Determinação multi-elementar em amostras de vinhos do Vale do São Francisco

Os resultados obtidos para as concentrações de Zn, Cd, Cu, Mn, Al e Pb em amostras de vinhos da região do Vale do São Francisco estão apresentados na Tabela 5. Na tabela estão os limites admissíveis para os elementos zinco, cádmio, cobre e chumbo estabelecidos pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2019). As siglas VB e VRS se referem às duas vinícolas que cederam as amostras para estudo. A identificação estabelecida para os vinhos foi: Tannat – TAN, Alicante – ALI e Cabernet Sauvignon – CS.

Tabela 5 – Concentrações dos analitos (mg L<sup>-1</sup>) em vinhos do Vale do São Francisco

	<b>Zn</b> Limite: 5 mg L <sup>-1</sup>	<b>Pb</b> Limite: 0,15 mg L <sup>-1</sup> (*)	<b>Mn</b>
<b>CS VB</b>	0,370 ± 0,006	0,100 ± 0,010	0,860 ± 0,021
<b>ALI VRS</b>	<LQ	0,1000 ± 0,0012	1,030 ± 0,036
<b>TAN VB</b>	0,2000 ± 0,0023	<LQ	<LQ
	<b>Cu</b> Limite: 1 mg L <sup>-1</sup>	<b>Cd</b> Limite: 0,01 mg L <sup>-1</sup>	<b>Al</b>
<b>CS VB</b>	0,053 ± 0,007	<LQ	0,470 ± 0,013
<b>ALI VRS</b>	0,160 ± 0,006	<LQ	0,310 ± 0,030
<b>TAN VB</b>	0,033 ± 0,008	<LQ	0,560 ± 0,010

(\*) O Regulamento Vitivinícola do Mercosul (GMC/RES N°45/96) estabelece o limite máximo para chumbo de 0,3 mg L<sup>-1</sup>.

A partir dos resultados da Tabela 5, é possível verificar que os valores obtidos para zinco, cobre, chumbo e cádmio estão abaixo dos valores estabelecidos pelo Regulamento do Mercosul e pela OIV. Para todos os vinhos estudados, os valores de cádmio obtidos foram abaixo do limite de quantificação.

Os resíduos de produtos agroquímicos como inseticidas, fungicidas e fertilizantes que contem sais de metais podem ser considerados fontes destes elementos nos vinhos (PYRYNSKA, 2007). Catarino e Curvelo-Garcia (2011) afirmam que os elementos minerais presentes no vinho provêm essencialmente da absorção radicular, havendo um constante enriquecimento durante a formação e maturação do bago da uva. Ainda segundo os autores, manganês e cobre são



indispensáveis ao desenvolvimento de leveduras e bactérias lácticas, enquanto chumbo e cádmio são potencialmente tóxicos mesmo em baixas concentrações. Galani-Nikolakaki et al. (2002) atribuem a presença de chumbo (até 0,42 mg L<sup>-1</sup>) nos vinhos gregos estudados à poluição ambiental dos escapamentos dos carros que trafegavam próximos à vinícola. Catarino et al. (2008) estimam que os combustíveis sejam responsáveis por cerca de 90% da poluição atmosférica em chumbo em vinhos, uma vez que é componente de aditivos anti-detonantes organometálicos voláteis e lipossolúveis. A presença de alumínio no vinho é de natureza essencialmente exógena e está associada ao uso de pesticidas e contato com superfícies de alumínio (CATARINO et al., 2008). Nicolini et al. (2004) afirmam, no entanto que argila bentonita é considerada a maior fonte de contaminação do alumínio nos vinhos.

### **3.4 Determinação das espécies químicas em amostras de vinhos decompostas por digestão ácida**

Al (III), Mn (II), Zn (II), Pb (II), Cu (II) e Cd (II) foram determinados usando espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas em amostras de vinhos decompostas em bloco digestor. Os resultados estão apresentados na Tabela 6 e são comparados com os valores obtidos pelas amostras de vinhos degradados por ultrassom, conforme a metodologia desenvolvida.

Tabela 6 – Comparação entre os métodos de degradação por ultrassom e por digestão ácida para vinhos do Vale do São Francisco (concentrações em mg L<sup>-1</sup>)

	Zn		Pb		Mn	
	US	Digestão	US	Digestão	US	Digestão
<b>CS VB</b>	0,370 ± 0,006	0,360 ± 0,002	<LQ	0,12 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,870 ± 0,024
<b>ALI VRS</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,03 ± 0,04	1,01 ± 0,03
<b>TAN VB</b>	0,200 ± 0,002	0,210 ± 0,002	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Cu		Cd		Al	
	US	Digestão	US	Digestão	US	Digestão
<b>CS VB</b>	0,053 ± 0,007	0,059 ± 0,009	<LQ	<LQ	0,470 ± 0,013	0,42 ± 0,03
<b>ALI VRS</b>	0,160 ± 0,006	0,12 ± 0,02	<LQ	<LQ	0,31 ± 0,03	0,33 ± 0,03
<b>TAN VB</b>	0,033 ± 0,008	0,034 ± 0,008	<LQ	<LQ	0,56 ± 0,01	0,54 ± 0,01

É possível observar que para as seis espécies químicas determinadas nas amostras de vinhos, os resultados obtidos para as amostras degradadas por ultrassom estão em concordância com os resultados obtidos pela degradação por digestão.

#### **4. Conclusões**

O planejamento Doehlert foi uma ferramenta eficiente para otimização de método analítico para determinação de zinco, cádmio, cobre, manganês, alumínio e chumbo por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas em amostras de vinho utilizando degradação assistida por ultrassom. As variáveis significativas foram concentrações de ácido nítrico (melhor condição 2,3 mol L<sup>-1</sup>) e de peróxido de hidrogênio (melhor condição 9%). O método é simples, rápido, preciso, exato e apresenta baixos limites de detecção e quantificação. O método desenvolvido foi validado e aplicado na determinação multielementar em três amostras de vinho tinto da região do Vale do São Francisco. Os resultados obtidos foram (em mg L<sup>-1</sup>): Cd: <LQ; Zn: <LQ-0,37; Pb: <LQ-0,1; Mn: LQ-1,03; Cu: 0,033-0,16 e Al: 0,31-0,56. Para zinco, cobre, chumbo e cádmio foram obtidos valores abaixo dos valores estabelecidos pela OIV e pelo Mercosul.

## Referências Bibliográficas

- ALKIS, I. M.; OZ, S.; ATAKOL, A.; YILMAZ, N.; ANLI, R. E.; ATAKOL, O. Investigation of heavy metal concentrations in some Turkish wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, 33, 105-110, 2014.
- AMORELLO, D.; BARRECA, S.; GULLI, E.; ORECCHIO, S. Platinum and rodhium in wine samples by using voltammetric techniques. **Microchemical Journal**, 130, 229-235, 2017.
- BRAININA, K. Z.; STOZHOK, N. Y.; BELYSHEVA, G. M.; INZHEVATOVA, O. V.; KOLYADINA, L. I.; CREMISINI, C.; GALLETTI, M. Determination of heavy metals in wines by anodic stripping voltammetry with thick-film modified eletrodic. **Analytica Chimica Acta**, 514, 227-234, 2004.
- CANDIOTI, L. V.; DE ZAN, M. M.; CÂMARA, M. S.; GOICOCHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, 124, 123-138, 2014.
- CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S.; de SOUSA, R. B. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, 23, 3-19, 2008.
- CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, S. Composição Mineral do Vinho – Ocorrência de metais contaminantes. **Viticultura e Enologia**, 48-60, 2011.
- CHEMAT, S.; LAGHA, A.; AMAR, H. A.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted microwave digestion. **Ultrasonics Sonochemistry**, 11, 5-8, 2004.
- DORDONI, R.; COLANGELO, D.; GIRIBALDI, M.; GIUFFRIDA, M. G.; DE FAVERI, D. M.; LAMBRI, M. Effect of Bentonite Characteristics on wine proteins, polyphenol, and metals under condicions of different pH. **American Journal of Enology and Viticulture**, 66, 518-530, 2015.
- DUGO, G.; LA PERA, L.; PELLICANÓ, T. M.; DI BELLA, G.; D'IMPERIO, M. Determination of some inorganic anions and heavy metals in D.O.C. Golden and Amber Marsala wines: statistical study of the influence of ageing period, colour and sugar content. **Food Chemistry**, 91, 355-363, 2005.
- DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, 2, 112-118, 2007.
- FERREIRA, S. L. C.; SOUZA, A. S.; BRANDAO, G. C.; FERREIRA, H. S.; dos SANTOS, W. N. L.; PIMENTEL, M. F.; VALE, M. G. R. Direct determination of iron and manganese in wine using the reference element technique and fast sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 74, 699-702, 2008.

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

JUNG, M. Y.; KANG, J. H.; CHOI, Y. S.; LEE, D. Y.; LEE, J. Y.; PARK, J. S. Analytical features of microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) for the quantitation of manganese (Mn) in wild grape (*Vitis coignetiae*) red wines: Comparison with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). **Food Chemistry**, 274, 20-25, 2019.

KARADJOVA, I.; IZGI, B.; GUCER, S. Fractionation and speciation of Cu, Zn and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 57, 581-590, 2002.

LA TORRE, G. L.; LA PERA, L.; RANDO, R.; LO TURCO, V.; DI BELLA, G.; SAITTA, M.; DUGO, G. Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. **Food Chemistry**, 110, 729-734, 2008.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, 22, 41-47, 2003.

NEHER, B. D.; AZCARATE, S. M.; CAMINA, J. M.; SAVIO, M.; Nutritional analysis of Spirulina dietary supplements: Optimization procedure of ultrasonication-assisted digestion for multielemental determination. **Food Chemistry**, 257, 295-301, 2018.

NELSON, J.; HOPFER, H.; GILLELAND, G.; CUTHBERTSON, D.; BOULTON, R.; EBELER, S. E. Elemental Profiling of Malbec Wines under Controlled Conditions Using Microwave Plasma-Atomic Emission Spectroscopy. **American Journal of Enology and Viticulture**, 66, 373-378, 2015.

NICOLINI, G.; LARCHER, R.; PANGRAZZI, P.; BONTEMPO, L. Changes in the contents of micro and trace elements in wine due to winemaking treatments. **Vitis**, 43, 41-45, 2004.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; de PAULA, V. F.; do NASCIMENTO JUNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfície de resposta – Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, 9, 1184-1215, 2017.

OIV Statistical Report on World Vitiviniculture, International Organisation of Vine and Wine. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>>. Acesso em: 3 mar. 2020.

TIAN, Y.; YAN, C.; ZHANG, T.; TANG, H.; LI, H.; YU, J.; BERNARD, J.; CHEN, L.; MARTIN, S.; DELEPINE-GILON, N.; BOCKOVÁ, J.; VEIS, P.; CHEN, Y.; YU, J. Classification of wines according to their production regions with the contained trace elements using laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B**, 135, 91-101, 2017.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, 74, 835-855, 2002.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, 32, 1278-1287, 2009.

VOICA, C.; DEHELEAN, A.; PAMULA, A. Method validation for determination of heavy metals in wine and slightly alcoholic beverages by ICP-MS. **Journal of Physics: Conference Series**, 182, 2009.

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

VYSTAVNA, Y.; RUSHENKO, L.; DIADIN, D.; KLYMENKO, O.; KLYMENKO, M. Trace metals in wine and vineyard environment in southern Ukraine. **Food Chemistry**, 146, 339-344, 2014.

ZHENG, X.; ZHANG, M.; FANG, Z.; LIU, Y. Effects of low frequency ultrasonic treatment on the maturation of steeped greengage wine. **Food Chemistry**, 162, 264-269, 2014.

## **ARTIGO 2**

### **COMPOSIÇÃO MULTIELEMENTAR DE VINHOS BRASILEIROS E ARGENTINOS E CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A REGIÃO DE ORIGEM USANDO MAPAS AUTO-ORGANIZÁVEIS DE KOHONEN<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Artigo a ser submetido

## **Composição multielementar de vinhos brasileiros e argentinos e classificação de acordo com a região de origem usando mapas auto-organizáveis de Kohonen**

**Resumo:** O espectrômetro de emissão óptica de plasma induzido por microondas foi utilizado para determinação multielementar em vinhos. Os analitos foram determinados após digestão ácida de 22 amostras de vinhos brasileiros e argentinos e foram utilizados os mapas auto-organizáveis (SOM) para análise não supervisionada de agrupamentos. As amostras de vinhos brasileiros foram classificadas em um grupo, enquanto as amostras de vinhos argentinos formaram outro *cluster*. Os limites de quantificação obtidos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) foram Fe (0,05); P (0,06); B (0,08); K (0,17); Mn (0,002); Cr (0,002) e Al (0,02). A exatidão do método foi avaliada pela análise de materiais de referência certificados (folhas de maçã - Nist 1515 e folhas de tomate – Nist 1573a). As concentrações (em  $\text{mg L}^{-1}$ ) encontradas para cada elemento nas amostras de vinho foram Al (<LQ - 1,82), Cr (0,15 - 0,50), Fe (37 - 1103), Mn (<LQ - 0,8), P (97 - 277), B (1,7-11,6), Pb (<LQ - 0,3) e K (604 - 1701).

**Palavras-chave:** composição química, estatística multivariada, redes neurais artificiais.

## **Multielement composition of Brazilian and Argentine wine and classification of according to the region of origin using Kohonen self-organizing maps**

**Abstract:** The microwave-induced plasma optical emission spectrometer has been used for multielement determination in wines. The analytes were determined after acid digestion of 22 samples of Brazilian and Argentine wine and the application of Self-organizing maps (SOM) for unsupervised *cluster* analysis. The Brazilian wines samples were clustering in a group, while Argentines wines samples formed another *cluster*. The quantification limits ( $\text{mg L}^{-1}$ ) were Fe (0.05); P (0.06); B (0.08); K (0.17); Mn (0.002); Cr (0.002) and Al (0.02). The accuracy of the method was evaluated by the analysis of certified reference materials (Apple leaves - NIST 1515 and tomato leaves – NIST 1573a). The concentration (in  $\text{mg L}^{-1}$ ) found for each element in wine samples, were Al (<LOQ – 1.82), Cr (0.15 – 0.50), Fe (37 - 1103), Mn (<LOQ - 0.8), P (97 - 277), B (1.7- 11.6), Pb (<LOQ – 0.3) and K (604 - 1701).

**Keywords:** chemical composition, multivariate statistics, artificial neural networks.



## 1. Introdução

O consumo de vinho é recomendado devido aos benefícios à saúde humana em decorrência da presença de elementos como cobre, ferro, potássio, selênio, manganês e zinco, além dos compostos fenólicos (POHL, 2007; GUILFORD & PEZZUTO, 2011).

A presença de espécies inorgânicas no vinho pode estar relacionada com a qualidade desta bebida. Algumas espécies iônicas podem causar mudanças nas características organolépticas e na estabilidade no vinho (PYRYNSKA, 2007; MORENO et al., 2018). A obtenção de vinho de boa qualidade requer o conhecimento e monitoramento dos compostos presentes na bebida. A composição química do vinho está ligada à variedade de uvas, tipo de solo, variações climáticas, região onde são cultivadas e tipo de tratamento pelo qual as uvas foram submetidas durante o processo de produção e preservação do vinho (POHL, 2007; TARIBA, 2011), contaminação atmosférica, adição de pesticidas e fertilizantes e até pelos próprios métodos e equipamentos usados na vinificação (CATARINO et al., 2008). A partir da determinação das espécies químicas presentes, é possível associar com a região geográfica de origem do vinho (SOARES et al., 2018).

Diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas para determinação elementar em variados tipos de amostras, como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), eficiente para análises mono-elementares, porém este método apresenta baixa sensibilidade. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), são técnicas de alta seletividade e sensibilidade, porém com custo de operação alto (JUNG et al., 2019). Uma técnica analítica que tem sido relatada na literatura com uma nova proposta por análises multielementares é a espectrometria de emissão óptica induzida por microondas (MIP OES) (ALTHOFF et al., 2017; GONÇALVES et al., 2016; NIEDSIELSKI et al., 2015; OZBEK & AKMAN, 2016). É uma técnica de baixo custo operacional porque utiliza um plasma de nitrogênio e apresenta boa sensibilidade para determinação multielementar (MATUSIEWICZ & SLACHCIŃSKI, 2014; BROEKAERT & SIEMENS, 2004).

Uma importante ferramenta para caracterização de vinhos são análises de agrupamento de dados para classificar os vinhos de acordo com a região geográfica de origem e o tipo de uva (TIAN et al., 2017; AZCARATE et al., 2015). Nelson et al. (2015) determinaram Sr, Rb, Ca, K, Na, e Mg em amostras de vinho Malbec e usaram análise de componentes principais e mínimos quadrados parciais como análises discriminatórias para distinguir vinhos de diferentes regiões pela comparação de concentrações de metais que são característicos da composição do solo da região de produção. Ivana-Petropulos et al. (2013) estudaram a determinação de 42 elementos em vinhos da Macedônia com objetivo de relacionar a concentração dos elementos com duas variáveis: tipo de vinho (branco *versus* tinto) e indicação geográfica. Para este fim, foram usadas análise descritiva, análise fatorial e análise de componentes principais. Uma ferramenta alternativa de análise de agrupamentos são as redes neurais artificiais.

Redes neurais artificiais são modelos matemáticos de aprendizagem baseados no comportamento de células neurais que mapeiam variáveis de entrada e saída de um sistema (HAYKIN, 2007). Mapas auto-organizáveis (SOM) são redes neurais artificiais usadas para classificar variáveis semelhantes entre si formando agrupamentos denominados *clusters*. Tem sido reportado na literatura o uso de SOM para análises de agrupamentos: mapas neurais de Kohonen tem sido aplicados para triagem dos minerais que compõem a *Passiflora L.* (NOVAES et al., 2017), vinhos da Eslovenia são classificados de acordo com a região geográfica de origem (SELIH et al., 2014), Santos et al. (2017) avaliaram minerais, elementos tóxicos e compostos fenólicos em pétalas de rosas usando redes neurais artificiais para classificar os dados obtidos.

O presente trabalho tem como objetivo usar mapas auto-organizáveis de Kohonen para classificar amostras de vinho de acordo com sua região de origem usando as concentrações dos metais determinados por MIP OES.

## **2. Materiais e Métodos**

As determinações multielementares foram realizadas em um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas MIP OES modelo 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Os parâmetros instrumentais foram

utilizados conforme as recomendações do fabricante. O sistema de introdução da amostra inclui uma câmara de nebulização ciclônica de vidro de dupla passagem e nebulizador OneNeb inerte. Um gerador de nitrogênio modelo 4107 (Agilent Technologies) foi usado como fonte de gás para o plasma.

Usando o software MP Expert foi efetuada uma correção de fundo automática. A bomba peristáltica foi programada para operar em 15 rpm. O tempo de estabilização foi de 15 segundos e o tempo de integração de 3 segundos. Dois parâmetros operacionais críticos (fluxo do nebulizador e posição de observação no plasma) foram automaticamente otimizados pelo software MP Expert (Agilent Technologies). Os comprimentos de onda (nm) selecionados foram Al (396,152), Fe (371,993), Mn (403,449), P (214,915), B (249,772), Pb (283,305), K (766,491) e Cr (425,433).

## **2.1 Reagentes, soluções e amostras**

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram grau analítico. As vidrarias foram descontaminadas em banho de ácido nítrico 10% (v/v) por 24 horas e lavados com água deionizada antes do uso.

As soluções estoque de Al (III), Fe (III), Mn (II), P(V), B (III), Pb (II), K (I) e Cr (VI) ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) (SpecSol, Quimlab Química e Metrologia, São José dos Campos, Brasil) foram usadas para preparar os padrões de referência (diluídas em  $\text{HNO}_3$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) para uso na calibração. Ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram utilizados nas digestões. As amostras de vinho Malbec foram obtidas da região de Mendonza, Argentina e as amostras de Tempranillo, Tannat, Alicante, Cabernet Sauvignon e Petit Syrah, obtidas da região do Vale do São Francisco, Bahia, Brasil.

Na nomenclatura dos vinhos, as siglas VB e VRS se referem às duas vinícolas brasileiras que cederam as amostras para este estudo. A identificação adotada para os vinhos brasileiros foi: Tempranillo – TEM, Tannat – TAN, Alicante – ALI, Cabernet Sauvignon – CAB e Petit Syrah – PS. As amostras de vinhos argentinos estão identificadas com as siglas RM, SU e DP precedidas de numeração.

## **2.2 Procedimentos de Digestão**

### **2.2.1 Digestão das amostras de vinho**

Ao volume de 2,0 mL de vinho foram adicionados 1,0 mL de ácido nítrico concentrado e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) para decomposição em bloco digestor. O procedimento foi realizado em triplicata e na temperatura de 150° C por 2 horas. Ao final da digestão das amostras, o conteúdo foi transferido para balões volumétricos de 50 mL e avolumados com água deionizada.

### **2.2.2 Digestão das amostras de referência**

Cerca de 0,100 gramas de amostras de referências certificadas de folhas de maçã (NIST 1515) e folhas de tomate (NIST 1573a) foram digeridas em triplicata em bloco digestor onde a cada tubo foi adicionado 1,0 mL de ácido nítrico concentrado seguido de 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). A mistura foi aquecida à temperatura de 150 °C por duas horas. O conteúdo, ao final do tempo de digestão foi filtrado, transferido para balões volumétricos e avolumados com água deionizada.

## **2.3 Análises Estatísticas**

Mapas auto-organizáveis de Kohonen foram utilizados para análises de *clusters* das amostras de vinho. Os dados experimentais foram processados usando o software Matlab R2013a (The MathWorks Co., Natick, MA, EUA) na implementação dos algoritmos.

## **3. Resultados e Discussão**

### **3.1 Determinação multielementar em amostras de vinho**

Al (III), Fe (III), Mn (II), P (V), B (III), Pb (II), K (I) e Cr (VI) foram determinados em amostras de vinhos tintos provenientes do Brasil e da Argentina usando espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas. Na análise

dos dados foi aplicada a ferramenta de aprendizagem redes neurais artificiais, uma análise de *clusters* não-supervisionada, considerada relativamente simples, tomando como base a similaridade dos vetores de entrada. Novaes et al. (2017) afirmam que os mapas auto-organizáveis de Kohonen podem se tornar uma alternativa interessante para o processamento de dados devido a facilidade de aplicação e interpretação dos resultados.

Os mapas neurais agruparam 22 amostras em 3 grupos distintos conforme apresentado na Figura 1.

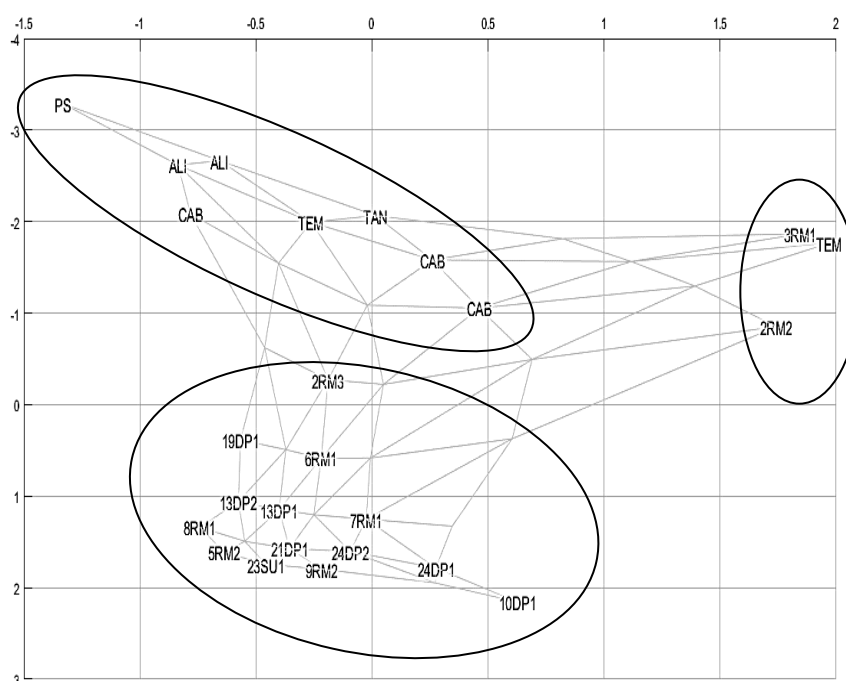


Figura 1 – Rede tridimensional apontando a formação de 3 grupos de vinhos brasileiros e argentinos a partir da determinação de espécies químicas inorgânicas

A densidade dos neurônios em um mapa treinado é uma aproximação da densidade dos dados (KASKI et al., 2003). Logo, é possível obter informações dos *clusters* analisando as relações dos neurônios após o treinamento.

A Figura 2(a) representa o neurônio vencedor, ou seja, a unidade do *cluster* cujo vetor de pesos mais se aproxima do vetor dos padrões de entrada. Cada hexágono representa um neurônio no mapa e cada amostra é representada por um

neurônio. A matriz de distância unificada (ou *U-matrix*), método mais comum de visualização do SOM, é uma imagem decorrente das distâncias entre neurônios adjacentes, resultante do treinamento de um mapa auto-organizado bidimensional (8x5) com 40 neurônios é apresentada na Figura 2(b). A escala lateral indica a distância entre os neurônios. Os elementos do mesmo grupo tem menor distância entre si e são indicados em áreas com coloração uniforme: baixos valores em azul e altos valores em vermelho.

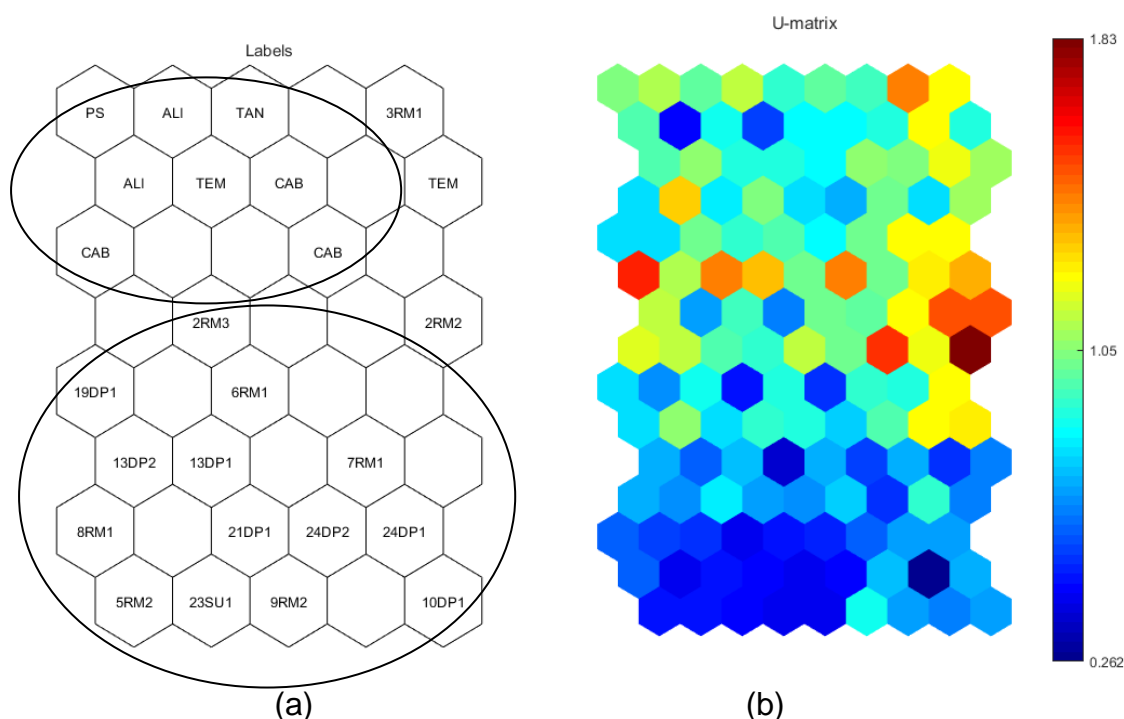


Figura 2 – (a) Neurônio vencedor (b) Matriz de distância unificada

As amostras de vinhos brasileiros estão classificadas no grupo I, enquanto que as amostras de vinhos argentinos foram classificadas no grupo II. O grupo III foi formado por dois vinhos argentinos e um vinho brasileiro. A formação dos três grupos pode ser também visualizada na representação tridimensional do mapa neural apresentado na Figura 1.

A Figura 3 apresenta o mapa das variáveis, as espécies químicas identificadas nas amostras de vinhos, obtido a partir dos dados experimentais. As concentrações podem ser observadas na escala lateral. A partir de uma inspeção visual é possível detectar a alta concentração de fósforo nas amostras de vinhos brasileiros (grupo I). É possível detectar ainda a baixa concentração de ferro no grupo II contribuindo

para o agrupamento dos vinhos argentinos. A alta concentração de chumbo e alumínio contribui para a formação do terceiro grupo formado por duas amostras de vinhos argentinos e uma amostra de vinho brasileiro. Baixas concentrações de chumbo, alumínio, cromo e potássio foram identificadas nos vinhos argentinos. A alta concentração de potássio contribui para a formação do grupo de amostras de vinhos brasileiros. Também é possível que os vinhos argentinos estudados tenham uma alta concentração de boro e manganês, enquanto que nos vinhos brasileiros a concentração seja mais baixa e formem um terceiro grupo com concentrações intermediárias. Segundo Galani-Nikolakaki et al. (2002), em baixas quantidades o manganês é um constituinte natural das uvas e pequenas variações de concentração encontradas podem ser justificadas pela diferença de composição do solo.

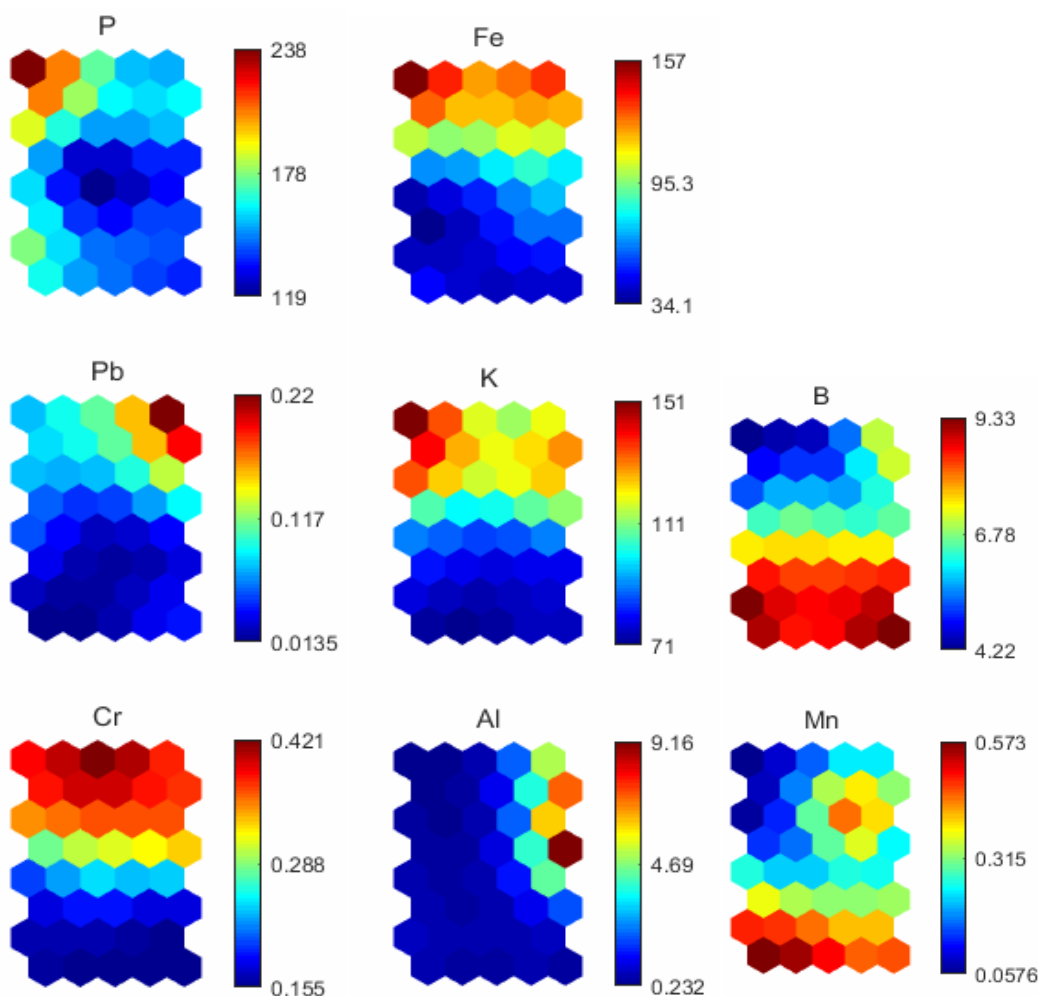


Figura 3 – Mapa neural apresentando as concentrações das espécies químicas nas amostras de vinhos brasileiros e argentinos

A presença de alguns desses elementos pode ser explicada do ponto de vista agrônomo uma vez que fósforo e potássio são aplicados no solo pela adição de fertilizantes (WOLLENHAUPT et al., 2013). Rizzon & Miele (2002) afirmam que o potássio é o cátion mais abundante no vinho, resultado obtido pelo presente estudo conforme se verifica na Tabela 1, é liberado pela película e semente das uvas durante a maceração. Os autores ressaltam ainda que além do solo, da planta, das condições climáticas e do sistema de vinificação, a concentração de potássio também depende do equilíbrio iônico no vinho.

Chumbo é um elemento encontrado em baixas concentrações no solo, é possível então supor que as altas concentrações encontradas no grupo III podem estar relacionadas com emissões do elemento no ambiente (ANGELOVA et al., 1999). Galani-Nikolakaki et al. (2002) afirmam que o principal problema que o vinho apresenta quando a concentração de ferro excede  $10 \text{ mg L}^{-1}$  é a instabilidade (turvações ou alterações da cor). Ainda segundo os autores, a principal fonte de ferro nos vinhos é o solo onde as uvas são produzidas.

Romic et al. (2004) afirmaram que deposição atmosférica e dispersão ambiental de produtos químicos utilizados na agricultura, como fertilizantes e pesticidas, é um fator importante que afeta diretamente as funções naturais do solo, ou indiretamente colocando em risco a biosfera por bioacumulação e inclusão na cadeia alimentar.

Medidas quantitativas foram desenvolvidas para avaliar a qualidade do mapa gerado após o processo de aprendizagem, com a finalidade de estimar os erros de quantização e topografia (KOHONEN, 2001). O erro de quantização (QE) avalia a convergência da rede e pode estimar o número de neurônios necessários para mapear antes do treinamento da rede. O erro de quantização é definido como a diferença entre o vetor de dados de entrada e os pesos do neurônio vencedor correspondente e pode ser calculado pela equação 1 abaixo.

$$QE = ( \sum ||v_k - w_{bmu}|| )/n \quad (1)$$

Onde  $||\cdot||$  representa a distância Euclidiana entre vetores,  $v_k$  corresponde ao vetor do padrão (ou dados de entrada),  $w_{bmu}$  representa o vetor correspondente ao neurônio vencedor e  $n$  é o número de dados de entrada.



O erro topográfico é uma medida que procura pontos no espaço de entrada no vizinho mais próximo. Por outro lado, o erro de quantização corresponde à média das distâncias entre cada vetor de dados e os pesos do neurônio vencedor (COSTA & NETO, 2007). O erro topográfico quantifica a capacidade do mapa em representar a topologia dos dados de entrada e é calculado pela Equação 2, segundo Costa e Netto (2007).

$$TE = 1/n \sum u(x_k) \quad (2)$$

Onde  $u(x_k)$  é igual a 1 caso o primeiro e o segundo neurônios vencedores não sejam adjacentes e 0 caso contrário,  $n$  é o número total de dados de entrada. O erro topográfico corresponde a uma proporção do número de dados de entrada que foram mapeados incorretamente.

No presente trabalho, o erro de quantização obtido foi  $QE=1,275$ , valor considerado bom, já que valores que tendem a zero podem levar ao erro de concluir que quanto maior o número de neurônios, maior sua capacidade de representar o conjunto de dados. Entretanto, se o arranjo tiver um número muito grande de neurônios, eles podem ser posicionados virtualmente sobre os objetos a serem representados. O valor do erro topográfico  $TE=0,033$  também é apropriado, pois tende a zero, neste caso, quantificando corretamente a capacidade do mapa de representar a topologia dos dados de entrada.

O intervalo (min-max) de concentração de cada analito (em  $mg L^{-1}$ ) encontrado nas amostras de vinhos argentinos e brasileiros é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Faixas de concentração (min-max) dos analitos (mg L<sup>-1</sup>) encontrados nas amostras de vinhos brasileiros e argentinos

<b>Amostras de vinho</b>	<b>P</b>	<b>Fe</b>	<b>B</b>	<b>Pb</b>	<b>Mn</b>	<b>Cr</b>	<b>Al</b>	<b>K</b>
TAN VB	142-144	100-104	1,7-4,0	0-0,01	<0,002	0,44-0,49	<0,02	876-940
CAB VB	181-194	94-113	4,5-5,2	0,06-0,1	<0,002	0,36-0,39	0,84-1,38	1460-1496
PS VB	271-277	240-303	3,0-4,7	<0,043	0,03-0,04	0,34-0,45	0,00	1664-1701
TEM VB	196-208	112-153	6,0-9,3	0,1-0,2	0,23-0,29	0,38-0,4	0-16,7	1585-1620
ALI VRS	218-227	101-104	4,3-7,0	0,1-0,2	0,07-0,13	0,36-0,4	<0,02	1314-1373
CAB VRS	157-163	141-182	5,0-5,6	0,05-0,06	0,67-0,76	0,35-0,47	0,62-0,70	1179-1182
TEM VRS	156-161	126-148	3,9-7,9	0,1-0,11	0,67-0,72	0,35-0,39	0-9,33	1264-1341
2RM	67-69	41-51	5,6-7,6	0,06-0,14	<0,002	0,35	0-22,5	1029-1036
3RM	146-149	37-46	5,3-5,5	<0,043	<0,002	0,34-0,35	0-9,06	1070-1092
4RM	92-97	49-285	9-11	0-0,3	<0,002	0,35-0,37	<0,02	848-919
5RM	149-155	746-777	9,3-9,6	<0,043	0,76-0,77	0,15-0,17	0,76-1,1	723-844
6RM	88-90	442-451	5,2-7,5	<0,043	0,23-0,24	0,15-0,18	0-0,97	636-775
7RM	144-149	722-746	7,7-8,0	<0,043	0,24-0,26	0,15	0-1,35	766-785
8RM	216-221	1078-1103	10-11,6	<0,043	0,45-0,52	0,15	0,29-1,82	780-791
9RM	116-123	579-613	7,7-8,5	<0,043	0,57-0,66	0,14-0,15	0,06-0,47	666-751
23SU	162-171	813-856	7,6-8,3	0,02	0,56-0,62	0,15-0,17	0-0,83	604-636
10DP	152-153	759-767	9,8-10	<0,043	0,56-0,58	0,16	0,01-0,85	803-809
13DP	152-160	762-802	8,4-9,0	<0,043	0,29-0,34	0,15-0,19	0,3-0,62	807-855
18DP	107-111	537-556	8,0-10	<0,043	0,40	0,15	0,22-0,72	682-690
19DP	158-173	791-865	6,4-6,9	0,06-0,07	0,28-0,33	0,15	0,2-1,42	816-866
21DP	146-150	733-754	8,8-9,4	<0,043	0,44-0,46	0,15-0,16	0,73-0,83	750-769
24DP	157-160	789-804	9,3-9,5	<0,043	0,37-0,38	0,15-0,16	0,24-1,56	773-789

### 3.2 Validação

O limite de detecção é definido como a concentração analítica que gera uma resposta superior ao desvio padrão do branco,  $s_b$ , considerando os erros tipo I e tipo II (falsos positivos e os falsos negativos) de acordo com a equação 3 (THOMPSON et al., 2002):

$$LD = 3,3 \cdot s_b / m \quad (3)$$

Onde  $m$  é a inclinação da curva analítica.

Limite de quantificação pode ser calculado a partir dos parâmetros da curva analítica conforme equação 4:

$$LQ = 10 \cdot s_b / m \quad (4)$$

Onde  $s_b$  é o desvio padrão do branco e  $m$  é a inclinação da curva analítica.

Os limites de detecção encontrados variaram de 0,0005 a 0,05 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que os limites de quantificação variaram de 0,002 a 0,17 mg L<sup>-1</sup>, os valores foram apresentados na Tabela 2.

A exatidão foi avaliada pela determinação dos analitos em materiais de referência, NIST 1511 (folhas de maçã) e NIST 1573a (folhas de tomate). A concentração dos analitos foi determinada usando o MIP OES e os valores certificados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Avaliação da performance analítica: análise de material de referência certificado (folhas de maçã NIST 1515 e folhas de tomate NIST 1573a), limites de detecção e limites de quantificação

	<b>P</b>	<b>Fe</b>	<b>B</b>	<b>Pb</b>
<b>Valor determinado MIP OES (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	1418 ± 37	81 ± 6	24 ± 4	0,50 ± 0,16
<b>Valor certificado (mg kg<sup>-1</sup>) NIST 1515</b>	1593 ± 68	82,7 ± 2,6	27,6 ± 2,8	0,470 ± 0,024
<b>LD (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,02	0,016	0,02	0,013
<b>LQ (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,06	0,05	0,08	0,043
	<b>K</b>	<b>Mn</b>	<b>Al</b>	<b>Cr</b>
<b>Valor determinado MIP OES (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	15685 ± 738	57 ± 5	285 ± 31	NA
<b>Valor certificado (mg kg<sup>-1</sup>) NIST 1515</b>	16080 ± 210	54,1 ± 1,1	284,5 ± 5,8	NA
<b>Valor determinado MIP OES (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	NA	NA	NA	2,3 ± 0,4
<b>Valor certificado (mg kg<sup>-1</sup>) NIST 1573a</b>	-	-	-	1,988 ± 0,034
<b>LD (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,05	0,0007	0,005	0,0005
<b>LQ (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,17	0,002	0,02	0,002

NA – não analisado

#### 4. Conclusões

Os resultados obtidos na identificação de espécies químicas (P, Fe, B, Pb, Mn, Cr, Al e K) em amostras de vinhos das regiões do Vale do São Francisco (Brasil) e de Medonza (Argentina), apresentados tanto no aspecto de visualização como no agrupamento dos dados, demonstraram a capacidade de transformação de dados multivariados em imagens.

Foi possível verificar o agrupamento de 22 amostras em 3 grupos distintos: o primeiro grupo dos vinhos brasileiros, o segundo grupo dos vinhos argentinos e um terceiro grupo composto por duas amostras de vinhos argentinos e uma amostra de vinho brasileiro.

Foi utilizada a técnica multielementar de espectrometria de emissão óptica induzida por microondas para a determinação das espécies químicas presentes nas amostras estudadas devido a facilidade e baixo custo operacionais do equipamento. As concentrações encontradas para cada elemento foram (em mg L<sup>-1</sup>): Al (<LQ - 1,82); Cr (0,15 - 0,50); Fe (37 - 1103); Mn (<LQ - 0,8); P (97 - 277); B (1,7-11,6); Pb (<LQ - 0,3) e K (604 - 1701). Foram analisadas amostras de referência e calculados os limites de detecção (que variaram entre 0,0005 e 0,05 mg L<sup>-1</sup>) e quantificação

(que variaram entre 0,002 e 0,17 mg L<sup>-1</sup>), atestando a exatidão e precisão analíticas dos resultados.

## Referências Bibliográficas

- ALTHOFF, A. G.; WILLIAMS, C. B. ; MCSWEENEY, T.; GONÇALVES, D. A.; DONATI, G. L. Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry (MIP OES) and Standard Dilution Analysis to determine trace elements in pharmaceutical samples. **Applied Spectroscopy**, 71, 2692–2698, 2017.
- ANGELOVA, V. R.; IVANOV, A. S.; BRAIKOV, D. M. Heavy metals (Pb, Cu, Zn and Cd) in the system soil – grapevine – grape. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79, 713-721, 1999.
- AZCARATE, S. M.; MARTINEZ, L. D.; SAVIO, M.; CAMIÑA, J. M.; GIL, R. A. Classification of monovarietal Argentinean white wines by their elemental profile. **Food Control**, 57, 268–274, 2015.
- BROEKAERT, J. A. C.; SIEMENS, V. Recent trends in atomic spectrometry with microwave-induced plasmas. **Spectrochimica Acta Part B**, 59, 1823– 1839, 2004.
- CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S.; de SOUSA, R. B. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, 23, 3-19, 2008.
- COSTA, J. A. F.; NETTO, M. L. A. Segmentação de mapas auto-organizáveis com espaço de saída 3-D. **Revista Controle & Automação**, 18, 150-162, 2007.
- GALANI-NIKOLAKAKAI, S.; KALLITHRAKAS-KONTOS, N.; KATSANOS, A. A. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. **The Science of the Total Environment**, 285, 155-163, 2002.
- GUILFORD, J. M.; PEZZUTO, J. M. Wine and Health: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, 62, 471-486, 2011.
- GONÇALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; SANTOS, M. C.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 909, 24-29, 2016.
- HAYKIN, S. **Redes Neurais - Princípios e Práticas**, São Paulo: Bookman, 2007.
- HAYKIN, S. **Neural Networks: A Comprehensive Foundation**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1998.
- IVANOVA-PETROPULOS, V.; WILTSCHE, H.; STAFILOV, T.; STEFOVA, M.; MOTTER, H.; LANKMAYR, E. Multi-element analysis of Macedonian wines by inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP–MS) and inductively coupled plasma–optical emission spectrometry (ICP-OES) for their classification. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, 32, 265–281, 2013.

JUNG, M. Y.; KANG, J. H.; CHOI, Y. S.; LEE, D. Y.; LEE, J. Y.; PARK, J. S. Analytical features of microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) for the quantitation of manganese (Mn) in wild grape (*Vitis coignetiae*) red wines: Comparison with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). **Food Chemistry**, 274, 20-25, 2019.

KASKI S.; NIKKILÄ J.; KOHONEN T. **Methods for Exploratory Cluster Analysis**. In: Szczepaniak P.S., Segovia J., Kacprzyk J., Zadeh L.A. (eds) Intelligent Exploration of the Web. Studies in Fuzziness and Soft Computing, vol. 111. Physica, Heidelberg, 2003.

KOHONEN, T. **Self-Organizing Maps**, Berlin: Springer, 2001.

MATUSIEWICZ, H.; SLACHCIŃSKI, M. Development of a one-sep microwave-assisted subcritical water extraction for simultaneous determination of inorganic elements (Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb, Sr, Zn) in reference materials by microwave induced plasma spectrometry. **Microchemical Journal**, 115, 6-10, 2014.

MORENO, I. M.; GUTIÉRREZ, A. J., RUBIO, C.; GONZÁLEZ, A. G.; GONZALEZ-WELLER, D.; BENCHARKI, N.; HARDISSON, A.; REVERT, C. Classification of Spanish Red Wines Using Artificial Neural Networks with Enological Parameters and Mineral Content. **American Journal of Enology and Viticulture**, 69, 167-175, 2018.

NELSON, J.; HOPFER, H.; GILLELAND, G.; CUTHBERTSON, D.; BOULTON, R.; EBELER, S. E. Elemental profiling of malbec wines under controlled conditions using microwave plasma atomic emission spectroscopy. **American Journal of Enology and Viticulture**, 66, 373-378, 2015.

NIEDZIELSKI, P.; KOZAK, L.; WACHELKA, M.; JAKUBOWSKI, K.; WYBIERALSKA, J. The microwave induced plasma with optical emission spectrometry (MIP-OES) in 23 elements determination in geological sample. **Talanta**, 132 591–599, 2015.

NOVAES, C. G.; ROMÃO, I. L. da S.; SANTOS, B. G.; RIBEIRO, J. P.; BEZERRA, M. A.; da SILVA, E. G. P. Screening of *Passiflora L.* mineral content using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. **Food Chemistry**, 233, 507-513, 2017.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Method development for the determination of calcium, copper, magnesium, manganese, iron, potassium, phosphorus and zinc in different types of breads by microwave induced plasma-atomic emission spectrometry. **Food Chemistry**, 200, 245-248, 2016.

POHL, P. What do metals tell us about wine? **Trends in Analytical Chemistry**, 26, 941-949, 2007.

PYRZYNSKA, K. Chemical speciation and fractionation of metals in wine. **Chemical Speciation and Bioavailability**, 19, 1-8, 2007.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da CV. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 22, 192-198, 2002.

ROMIC, M.; ROMIC, D.; DOLANJSKI, D.; STRICEVIC, I. Heavy Metals Accumulation in Topsoils from the Wine-growing Regions. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, 69, 1-10, 2004.

SANTOS, A. M. P. DOS; SANTOS, W. N. L. DOS ; SILVA; E. F. R. SILVA, E. G. P. DA L. O. DOS SANTOS; SANTOS; B. R. DA S.; SAUTHIER; M. C. DA S.; SANTOS, W. P. C. DOS. Evaluation of minerals, toxic elements and bioactive compounds in rose petals (*Rosa spp.*) using chemometric tools and artificial neural networks. **Microchemical Journal**, 1, 1-5, 2017.

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

SOARES, F.; ANZANELLO, M. J.; FOGLIATTO, F. S.; MARCELO, M. C. A.; FERRÃO, M. F.; MANFROI, V.; POZEBON, D. Element selection and concentration analysis for classifying South America wine samples according to the country of origin. **Computers and Electronics in Agriculture**, 150, 33-40, 2018.

TARIBA, B. Metals in Wine – Impact on Wine Quality and Health Outcomes. **Biological Trace Element Research**, 144, 143-156, 2011.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, 74, 835-855, 2002.

TIAN, Y.; YAN, C.; ZHANG, T.; TANG, H.; LI, H.; YU, J.; BERNARD, J.; CHEN, L.; MARTIN, S.; DELEPINE-GILON, N.; BOCKOVÁ, J.; VEIS, P.; CHEN, Y.; YU, J. Classification of wines according to their production regions with the contained trace elements using laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B**, 135, 91-101, 2017.

WOLLENHAUPT, N. C.; WOLKOWSKI, R. P.; CLAYTON, M. K. Mapping soil test phosphorus and potassium for variable-rate fertilizer application. **Journal of Product Agriculture**, 7, 441-448, 2013.



## **ARTIGO 3**

### **CARACTERIZAÇÃO GEOGRÁFICA DE VINHOS DA AMÉRICA DO SUL COM BASE EM SUA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E MELATONINA: UMA ANÁLISE EXPLORATÓRIA <sup>3</sup>**

---

<sup>3</sup> Artigo aceito para publicação no periódico Microchemical Journal

## **Caracterização geográfica de vinhos da América do Sul com base em sua composição fenólica e melatonina: uma análise exploratória**

**Resumo:** Este estudo objetivou a determinação de ácido elágico, ácido vanílico, ácido siríngico, quercetina e melatonina em amostras de vinhos do Brasil, região do Vale do São Francisco, e da Argentina, região de Mendoza. Cromatografia líquida de alta eficiência foi a técnica utilizada para a determinação dos compostos fenólicos e a melatonina foi determinada por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. Quercetina foi o composto encontrado em maior quantidade nos vinhos argentinos. Em algumas amostras de vinhos brasileiros, o ácido vanílico e o ácido elágico foram encontrados em concentrações mais altas em relação aos vinhos argentinos. Já para o ácido siríngico, as concentrações obtidas nos vinhos brasileiros foram inferiores às encontradas nos vinhos argentinos. Foram realizadas Análise de Componentes Principais e Análise de Componentes Hierárquicos com objetivo de agrupar os dados obtidos de acordo com a região de origem dos vinhos.

**Palavras-chave:** compostos bioativos, análises de agrupamento, origem geográfica.

## Determination of phenolic compounds and melatonin in samples of wines and exploratory analysis

**Abstract:** This study aimed to determine ellagic acid, vanillic acid, syringic acid, quercetin and melatonin in samples of wines from Brazil, the São Francisco Valley region and Argentina, Mendoza region. High performance liquid chromatography was a technique used to determine phenolic compounds and melatonin was determined by ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Quercetin was the compound found in major quantity in Argentine wines. In some bottles of Brazilian wines, vanillic acid and ellagic acid were found in higher bottles compared to Argentine wines. As for syringic acid, as selected filters in Brazilian wines, they were inferior in samples in Argentine wines. Principal Component Analysis and Hierarchical Cluster Analysis were carried out in order to group the data obtained according to the region of origin of the wines.

**Keywords:** bioactives compounds, *cluster* analyses, geographical origin.

## 1. Introdução

O vinho é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Porém sua importância não está relacionada somente à contribuição econômica e cultural. Estudos apontam diversos efeitos benéficos à saúde relacionados ao consumo moderado e regular da bebida, tais como: favorecendo algumas funções cerebrais e do sistema nervoso central, na prevenção da obesidade e da diabetes tipo 2, em atividade hepatoprotetiva, além de efeitos benéficos cardiovasculares e na prevenção de alguns tipos de câncer (SALEHI et al., 2019; GEORGIEV et al., 2014; ALI et al., 2010; SOLEAS et al., 1997).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de natureza e concentrações variáveis em videiras e também em outros vegetais, muitos estão envolvidos na proteção das plantas, como inibidores biológicos de outros sistemas vivos, como patógenos microbiológicos, pragas e herbívoros. Outros são responsáveis pela coloração e sabor dos alimentos onde estão presentes (CONDE et al., 2007; BARCIA et al., 2015). Quimicamente, pertencem a uma classe de moléculas com diversidade estrutural caracterizada pela presença de um anel aromático, tendo um ou mais grupos hidroxilas diretamente ligados com o anel, podem variar de moléculas simples até compostos altamente polimerizados (ZHU et al., 2012).

Os compostos fenólicos representam um papel importante na enologia pela contribuição na definição da qualidade dos vinhos, uma vez que são determinantes nas características organolépticas como cor (as antocianinas nos vinhos tintos), adstringência e sabor (BARCIA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2014; GHANEM et al., 2014). Diversos tipos de compostos fenólicos, como os encontrados nas videiras e, conseqüentemente nos seus produtos derivados, são amplamente estudados devido a presença dos fitonutrientes que remetem efeitos positivos à saúde humana, tais como atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (SALEHI et al., 2019; ALI et al., 2010; DIAS et al., 2017; TEIREIXA et al., 2014).

Os compostos fenólicos são classificados em flavonoides e não-flavonoides. Os flavonoides representam uma diversidade de estruturas químicas responsável pela ampla atividade biológica e fisiológica destes compostos. Os flavonoides mais encontrados nas uvas são as antocianinas (somente encontradas em uvas vermelhas), flavanois (catequina, epicatequina), flavonois (quercetina, rutina,

kaempferol) e proantocianidinas (ALI et al., 2010; GEORGIEV et al. 2014). Os não-flavonoides são representados pelos ácidos cinâmicos ou hidroxicinâmicos (cafeico, p-cumárico e ferúlico), ácidos benzoicos ou hidroxibenzoicos (gálico, vanílico e siríngico) e estilbenos (reverastrol) (BELMIRO et al., 2017).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio produzido na glândula pineal durante o período da noite (MERCOLINI et al., 2012). Está relacionada com a regulação do ciclo circadiano e apresenta efeitos analgésico e antidepressivo (RAHMAN et al., 2010). Jung-Hynes et al. (2010) afirmam que a melatonina atua como agente diferenciador em alguns tipos de células cancerígenas, diminuindo seu status invasivo e metastático. Korkmaz et al. (2009) relatam que a melatonina é um dos melhores antioxidantes na resistência à destruição molecular por radicais livres.

Estudos relatam a presença de melatonina também em vegetais. Segundo Posmyk e Janas (2009), a melatonina é um fitohormônio regulado pela luz e é considerado um metabólito secundário das plantas. Diversos trabalhos mostram a presença de melatonina em uvas e vinhos (GOMEZ et al., 2012a; IRITI et al., 2006; MURCH et al., 2010). Iriti & Vigentini (2015) relatam sobre a presença de melatonina (ou seus isômeros) em vinhos tintos de diferentes regiões geográficas, como Itália, Espanha, Argentina e Canadá.

Compostos fenólicos e melatonina podem ser determinados em diversas matrizes por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos - HPLC DAD (DIAS et al., 2017; SAUTHIER et al., 2019; BIMPILAS et al., 2015; GEANA et al., 2016), acoplado a um espectrômetro de massas – HPLC-MS (DORTA et al., 2014; GOMEZ et al., 2012a; ESATBEYOGLU et al., 2016) ou com detector ultravioleta/visível - HPLC UV/Vis (BELMIRO et al., 2017; ANDRADE et al., 2013), ou ainda pode ser utilizada a eletroforese capilar (SPISSO et al., 2018; GOMEZ et al., 2012b; DEIS et al., 2011).

O objetivo do presente trabalho é a determinação de ácido vanílico, ácido siríngico, ácido elágico, quercetina utilizando a técnica HPLC DAD e de melatonina por UHPLC-MS/MS em amostras de vinhos da região do Vale do São Francisco, nordeste do Brasil, e de Mendoza, Argentina. Foi realizado um estudo exploratório através da Análise de Componentes Principais (PCA) e da Análise de Agrupamento

Hierárquico (HCA) para visualizar os vinhos estudados em grupos de acordo com sua região de origem.

## **2. Materiais e Métodos**

Foram determinadas as concentrações de ácido vanílico, ácido siríngico, ácido elágico, quercetina e melatonina em 35 amostras de vinhos. Sendo 9 amostras de vinhos do Vale do São Francisco, região nordeste do Brasil, e 26 amostras de vinhos argentinos, provenientes das regiões de Valle de Uco, Luján de Cuyo, Mendoza e Neuquén.

### **2.1 Amostras**

As variedades das amostras de vinhos brasileiros são Tempranillo, Tannat, Alicante, Cabernet Sauvignon, Egiodola Syrah e Petit Syrah, e as de vinhos argentinos Malbec. Todas as amostras foram coletadas diretamente dos tanques de armazenamento e estocadas em frascos ambar sob refrigeração.

#### *2.1.1 Determinação de compostos fenólicos*

Foi realizada uma etapa de extração dos compostos fenólicos nas amostras de vinho antes da injeção no HPLC conforme metodologia de Spisso et al. (2018). A extração foi realizada por SPE (extração em fase sólida) em uma coluna elaborada no laboratório. Cartuchos Strata X, C8 e C18 (5 mg) foram preparados em ponteiras de pipeta de 1000 µL. Foi utilizada lã de vidro para manter o material adsorvente na ponteira. Os cartuchos foram condicionados com etapas sucessivas de lavagem com 1 mL de água ultrapura e 1 mL de metanol e depois foram secos ao ar antes da passagem da amostra. Amostras filtradas de vinho foram introduzidas na coluna ativada. Os compostos (ácido vanílico, ácido siríngico, ácido elágico e quercetina) retidos no cartucho da ponteira foram eluídos com 500 µL de metanol. O eluente de cada amostra foi analisado diretamente por HPLC.

### *2.1.2 Determinação de melatonina*

Para a determinação de melatonina, as amostras dos vinhos estudados foram filtradas através de um filtro 0,45 µm (Waters) e armazenadas em frascos de âmbar adequados para análise em UHPLC-MS/MS de acordo com a metodologia proposta por Gomez et al (2012a).

## **2.2 Reagentes e soluções**

Soluções estoque de 100 mg L<sup>-1</sup> dos padrões de ácido vanílico, ácido siríngico, ácido elágico, quercetina e melatonina Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) foram preparadas com metanol e estocadas no escuro a 4 °C. Metanol e acetonitrila utilizados foram adquiridos da Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA). Ácido fórmico 98% foi obtido na Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido). Água ultrapura (18 MΩ cm) foi obtida do sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, EUA).

## **2.3 Instrumentação**

### *2.3.1 Determinação de compostos fenólicos*

A determinação dos compostos fenólicos foi baseada na metodologia de Spisso et al. (2018). O sistema cromatográfico consistiu em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Dionex Ultimate 3000 (Dionex Softron GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc., Alemanha) composto por uma unidade de desgaseificação a vácuo, amostrador automático, bomba quaternária e um forno cromatográfico. O detector modelo Dionex MWD-300 (RS). O comprimento de onda para o trabalho foi fixado em 254 nm. O software foi o Chromeleon 7.1 utilizado para controlar todos os parâmetros do sistema do HPLC-MWD e os dados obtidos. A coluna utilizada foi Zorbax SB-Aq (4,6 mm x 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies. Água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) foram as fases móveis utilizadas. O gradiente utilizado foi: 0-8,5 minutos, 10-30% B; 8,5-10 minutos, 30-35% B; 10-16

minutos, 35-75% B; 16-18 minutos, 75-100% B. O fluxo da fase móvel foi 1 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna foi mantida em 20 °C e o volume de injeção foi de 5 µL.

### 2.3.2 *Determinação de melatonina*

Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência "Aquity" (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com sistemas de injeção de amostrador automático e de bombas (Waters). A bandeja do frasco do amostrador automático foi mantida a 15 °C. A agulha foi lavada com misturas adequadas de acetonitrila e água. A separação foi realizada através da injeção de 10 µL de amostra em uma coluna analítica ACQUITY UHPLC BEH C18 (Waters) com 2,1 mm de diâmetro interno por 50 mm de comprimento e 1,7 µm de tamanho de partícula. As fases móveis binárias consistiram em água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (B) numa vazão de 0,45 mL min<sup>-1</sup>. O gradiente foi iniciado com uma composição inicial de 85% A e 15% B, depois o gradiente linear de 3,5 minutos a 70% A, mantido por 0,5 minuto. Um retorno às condições iniciais foi realizado por um gradiente de 0,2 minutos a 85% A, onde foi mantido por 1,8 minutos. Assim, o tempo total de execução cromatográfica foi de 5,0 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura de 30 °C. As amostras foram filtradas imediatamente antes da injeção no sistema CL. Como detector foi utilizado um espectrômetro de massa triplo quadrupolo Quattro Premier XE Micromass MS Technologies com uma fonte de ionização por eletropulverização ZSpray (Waters). A fonte foi operada em modo positivo (ES +) a 350 °C com N<sub>2</sub> como gás nebulizador e a temperatura da fonte foi mantida em 150 °C. A tensão capilar foi mantida em 3,0 kV e a tensão do extrator foi ajustada em 5,0 kV. O nitrogênio ultrapuro foi usado como gás de dessolvatação com um fluxo de 800 L h<sup>-1</sup>. O argônio foi usado como gás de colisão a um fluxo de 0,19 mL min<sup>-1</sup>. A detecção foi realizada no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) de íons selecionados no primeiro (Q1) e no terceiro quadrupolos (Q3). Para escolher os padrões de fragmentação de m/z (Q1) fi/z (Q3) para os analitos no modo MRM, foram realizadas infusões diretas (via bomba de seringa) no MS da solução padrão de melatonina em metanol e a massa de varredura iônica do produto os espectros foram gravados. Os dados foram adquiridos usando o software MassLinx Mass Spectrometry (Waters).



## 2.4 Análise Exploratória

Para avaliar as relações entre as concentrações dos compostos fenólicos e de melatonina e o tipo de vinho dos conjuntos de dados e, avaliar as variáveis que mais contribuem para a diferenciação das amostras, foi realizada uma análise multivariada. Análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquica (HCA) foram utilizadas como ferramentas descritivas para visualizar o agrupamento dos dados, utilizando o software Unscrambler X 10.3 (CAMO-ASA, Trondheim, Noruega).

## 3. Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os valores obtidos para as concentrações dos compostos fenólicos e de melatonina em 35 amostras de vinhos, sendo 9 amostras de vinhos brasileiros (B1-B9) e 26 amostras de vinhos argentinos (A1-A26).

Tabela 1 – Concentrações de compostos fenólicos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e de melatonina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em vinhos brasileiros e argentinos

Amostra	Ácido Vanílico	Ácido Siríngico	Ácido Elágico	Quercetina	Melatonina
A1	3,33 $\pm$ 0,10	2,99 $\pm$ 0,10	2,92 $\pm$ 0,01	4,15 $\pm$ 0,67	7,47 $\pm$ 0,25
A2	4,65 $\pm$ 0,24	3,31 $\pm$ 0,04	2,72 $\pm$ 0,01	6,91 $\pm$ 0,04	5,88 $\pm$ 0,23
A3	1,91 $\pm$ 0,05	1,50 $\pm$ 0,08	1,93 $\pm$ 0,08	9,49 $\pm$ 0,04	5,80 $\pm$ 0,24
A4	3,96 $\pm$ 0,02	2,50 $\pm$ 0,02	2,94 $\pm$ 0,01	10,25 $\pm$ 0,13	6,15 $\pm$ 0,27
A5	2,16 $\pm$ 0,02	1,47 $\pm$ 0,12	2,50 $\pm$ 0,09	9,22 $\pm$ 0,25	4,67 $\pm$ 0,42
A6	3,80 $\pm$ 0,29	2,46 $\pm$ 0,39	2,53 $\pm$ 0,02	11,73 $\pm$ 0,38	4,15 $\pm$ 0,07
A7	2,62 $\pm$ 0,72	2,27 $\pm$ 0,23	2,24 $\pm$ 0,05	1,67 $\pm$ 0,04	4,81 $\pm$ 0,24
A8	3,13 $\pm$ 0,14	2,47 $\pm$ 0,06	2,46 $\pm$ 0,03	1,52 $\pm$ 0,16	6,56 $\pm$ 0,02
A9	3,74 $\pm$ 0,10	2,9 $\pm$ 0,1	3,61 $\pm$ 0,09	3,56 $\pm$ 0,47	6,11 $\pm$ 0,49
A10	2,33 $\pm$ 0,31	3,42 $\pm$ 0,04	2,48 $\pm$ 0,06	9,57 $\pm$ 0,11	9,67 $\pm$ 0,46
A11	2,25 $\pm$ 0,05	1,8 $\pm$ 0,1	1,72 $\pm$ 0,10	3,65 $\pm$ 0,11	9,46 $\pm$ 0,20
A12	3,9 $\pm$ 0,1	2,94 $\pm$ 0,02	2,28 $\pm$ 0,10	4,26 $\pm$ 0,02	9,68 $\pm$ 0,19
A13	3,47 $\pm$ 0,05	2,2 $\pm$ 0,1	1,85 $\pm$ 0,02	6,02 $\pm$ 0,67	7,81 $\pm$ 0,05
A14	2,08 $\pm$ 0,05	1,96 $\pm$ 0,19	2,49 $\pm$ 0,22	3,18 $\pm$ 0,2	7,33 $\pm$ 0,20
A15	3,28 $\pm$ 0,26	2,42 $\pm$ 0,02	2,80 $\pm$ 0,28	6,7 $\pm$ 0,1	10,49 $\pm$ 0,23
A16	4,89 $\pm$ 0,05	3,24 $\pm$ 0,06	2,33 $\pm$ 0,01	4,59 $\pm$ 0,31	8,34 $\pm$ 0,01
A17	2,11 $\pm$ 0,05	1,96 $\pm$ 0,12	2,36 $\pm$ 0,13	3,91 $\pm$ 0,02	12,53 $\pm$ 0,15

<b>A18</b>	1,89 ± 0,02	1,29 ± 0,10	1,66 ± 0,02	3,18 ± 0,11	12,51 ± 0,003
<b>A19</b>	3,38 ± 0,12	2,92 ± 0,39	1,95 ± 0,11	8,00 ± 0,31	4,55 ± 0,04
<b>A20</b>	2,13 ± 0,02	1,22 ± 0,04	1,50 ± 0,06	5,72 ± 0,25	7,80 ± 0,08
<b>A21</b>	2,0 ± 0,1	2,09 ± 0,14	2,08 ± 0,16	5,93 ± 0,22	12,39 ± 0,20
<b>A22</b>	4,63 ± 0,17	4,85 ± 0,39	2,71 ± 0,02	2,79 ± 0,16	10,89 ± 0,57
<b>A23</b>	3,31 ± 0,07	3,31 ± 0,16	2,61 ± 0,02	7,04 ± 0,22	7,62 ± 0,04
<b>A24</b>	4,72 ± 0,33	4,12 ± 0,10	2,27 ± 0,08	9,44 ± 0,20	5,93 ± 0,18
<b>A25</b>	2,91 ± 0,07	3,57 ± 1,03	1,37 ± 0,01	3,40 ± 0,07	3,30 ± 0,05
<b>A26</b>	3,21 ± 0,55	3,78 ± 0,93	1,84 ± 0,18	6,56 ± 0,22	3,56 ± 0,12
<b>B1</b>	10,58 ± 0,22	0,82 ± 0,06	2,95 ± 2,23	10,67 ± 0,27	12,08 ± 0,51
<b>B2</b>	11,39 ± 1,41	0,84 ± 0,04	3,44 ± 0,76	7,17 ± 0,22	4,97 ± 0,10
<b>B3</b>	7,61 ± 0,45	0,78 ± 0,27	2,10 ± 0,02	2,91 ± 0,40	19,89 ± 0,08
<b>B4</b>	3,03 ± 0,12	1,19 ± 0,04	5,96 ± 0,02	3,22 ± 0,22	7,40 ± 0,12
<b>B5</b>	2,50 ± 0,02	1,45 ± 0,10	4,94 ± 0,04	8,30 ± 0,07	4,15 ± 0,36
<b>B6</b>	7,69 ± 0,05	0,93 ± 0,10	7,04 ± 0,10	3,54 ± 0,18	8,06 ± 0,09
<b>B7</b>	7,27 ± 0,12	0,93 ± 0,12	7,04 ± 0,09	3,54 ± 0,22	8,06 ± 0,23
<b>B8</b>	4,97 ± 0,02	1,06 ± 0,04	5,95 ± 0,06	6,10 ± 0,02	3,51 ± 0,01
<b>B9</b>	14,48 ± 0,29	0,82 ± 0,29	8,07 ± 0,71	8,09 ± 0,22	2,74 ± 0,23

Valores expressos em media ± desvio padrão

Observa-se que nos vinhos argentinos o composto fenólico encontrado em maior quantidade na maioria das amostras foi a quercetina, nos vinhos brasileiros foram a quercetina e o ácido vanílico. Nos vinhos brasileiros, o ácido sirínico foi o composto encontrado em menor quantidade em todas as amostras estudadas. É possível destacar que em 6 amostras dentre os vinhos brasileiros, (B1, B2, B3, B6, B7 e B9), as concentrações de ácido vanílico foram mais elevadas em relação aos vinhos argentinos. Outro composto fenólico que em 6 amostras (de B4 a B9) de vinhos brasileiros se destaca com concentrações até 4 vezes maiores que nos vinhos argentinos é o ácido elágico. Para o ácido sirínico, as concentrações obtidas nos vinhos brasileiros foram inferiores às encontradas nos vinhos argentinos.

Os compostos fenólicos mais simples das uvas são sintetizados da fenilalanina (HRAZDINA et al., 1984) e deles derivam os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos. Segundo Ali et al. (2010) quando comparado com os hidroxicinâmicos, os vinhos têm baixos níveis de ácidos hidroxibenzóicos, como protocatequina, ácido vanílico e ácido sirínico.

Para a quercetina, os valores encontrados nos vinhos brasileiros variaram de 2,91 a 10,67 mg L<sup>-1</sup>; nos vinhos argentinos a variação foi de 1,52 a 11,73 mg L<sup>-1</sup>. Quercetina pertence a um grupo de flavonoides abundante em uvas, desde as hastes da videira e no bagaço da uva (que inclui semente, casca e polpa) (TEIXEIRA et al., 2014). Nos vinhos eles podem ser um produto da hidrólise ácida que acontece durante o processo produtivo e de armazenamento (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007).

As particularidades das condições dos sistemas produtivos imprimem características próprias às uvas e aos vinhos. Conforme Kill & Lima (2009), variáveis climáticas como temperatura, quantidade de radiação solar, número de horas de insolação e baixa umidade relativa do ar da região do Vale do São Francisco influenciam fortemente no cultivo das videiras. O predomínio de temperaturas elevadas praticamente durante todo o ano predispõe a uma maior atividade metabólica que acelera as fases de desenvolvimento da planta, possibilitando que uma videira produza frutos até 3 vezes por ano.

Ainda segundo Kill & Lima (2009), a abundância de energia solar e altas temperaturas propiciam a síntese de pigmentos e o transporte para os frutos dos carboidratos produzidos nas folhas e armazenados nos ramos. As principais características geográficas da região do Vale do São Francisco são: altitude 365 m, temperatura média 26 °C, umidade relativa do ar 50%, precipitação média anual 550 mm, insolação de 3000 horas/ano, com 300 dias de sol/ano e a fonte de irrigação é o Rio São Francisco.

Mendoza é uma das regiões que mais produz e exporta vinhos na Argentina (BELMIRO et al., 2017). É uma região de clima árido com cerca de 20 cm de precipitação pluviométrica anual. A irrigação da região só é possível devido à relativa planicidade da terra e à disponibilidade de água fluvial e artesiana. O céu claro e a altitude (aproximadamente 500–750 m) da região geram flutuações de temperatura de até 25 °C (JACKSON, 2008).

Segundo Bramley et al. (2011), os *terroirs* (termo usado para descrever a influência do clima, solo e atividades humanas na composição química e metabólica de vinhos) das regiões vinícolas em todo o mundo influenciam nas propriedades das

uvas e vinhos: em climas temperados, por exemplo, que possuem amplitude térmica favorável entre temperaturas noturnas e diurnas e baixa precipitação, oferecem condições ideais para maturação fenólica dos frutos.

Dias et al. (2017) determinaram ácidos fenólicos e hidroximetilfurfural em 8 amostras de vinhos da região do Vale do São Francisco. Para o ácido vanílico, obtiveram valores aproximados aos obtidos pelo presente estudo ( $\text{mg L}^{-1}$ ): PS  $2,16 \pm 0,03$ ; SZ  $3,31 \pm 0,17$ ; CS  $2,90 \pm 0,17$ ; CSS  $11,57 \pm 0,01$ ; CSS  $4,26 \pm 0,21$ ; RS <LQ, SZ <LQ e CBMC <LQ.

Casaza et al. (2010) estudaram o efeito de dois métodos de extração: por ultrassom e extração sólido-líquido clássica para obtenção de compostos fenólicos em cascas e sementes de uvas Pinot Noir. Dentre os principais compostos fenólicos, foram encontrados: isômeros de ácido vanílico ( $334,3 \text{ mg}/100\text{g}$  para sementes e  $20,5 \text{ g}/100\text{g}$  para cascas) e quercetina ( $124,8 \text{ mg}/100\text{g}$  para sementes e  $66,1 \text{ mg}/100\text{g}$  para cascas) nas condições de  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  e 200 bar usando metanol como solvente durante 30-90 minutos.

Spisso et al. (2018) determinaram ácido elágico por eletroforese capilar em vinhos argentinos comerciais e preparados em escala piloto. Foram obtidos valores entre  $2,71$  e  $17,65 \text{ mg L}^{-1}$  dentre as 22 amostras estudadas de vinhos Malbec, Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir e Chardonnay.

Bimpilas et al. (2015) determinaram quercetina em vinhos gregos Merlot e Syrah preparados pelos pesquisadores. Encontraram os valores de  $34,4 \pm 0,4$  e  $33,8 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

Os constituintes e a atividade antioxidante de vinhos (12 tipos) e uvas de mesa (8 variedades) de diferentes regiões da Bulgária foram avaliadas por Tzanova et al. (2019). Quercetina foi um dos compostos determinados por HPLC e os valores obtidos foram: para os vinhos, entre  $0,27 \pm 0,03$  e  $1,98 \pm 0,18 \text{ mg kg}^{-1}$ ; para as uvas, entre  $0,63 \pm 0,07$  e  $2,12 \pm 0,20 \text{ mg kg}^{-1}$ , valores inferiores aos encontrados no presente trabalho. Os autores concluem o trabalho afirmando que os valores dos compostos antioxidantes estudados estão em maiores concentrações nas uvas do que nos vinhos. Ressaltam ainda a diferença entre os valores obtidos pelas uvas e

vinhos da região norte e sul do país e que a principal razão são as condições agrometeorológicas.

Valentin et al. (2020) determinaram cor, parâmetros enológicos, atividade antioxidante e compostos fenólicos de 83 amostras de vinhos tintos comerciais da América do Sul (Argentina, Brasil, Uruguai e Chile) que foram classificados em 4 categorias após realização de Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamentos Hierárquico. Os seguintes resultados foram obtidos (mg L<sup>-1</sup>): ácido elágico (Tanat/Malbec 2,001; Carménère 24; Carménère/Merlot 31; Malbec 50), ácido siríngico (Tanat/Malbec 7,994; Carménère 5,012; Carménère/Merlot 30,291; Malbec 4,573) e quercetina (Tanat/Malbec 7,9; Carménère 6,3; Carménère/Merlot 5,6; Malbec 6,0).

La Torre et al. (2008) estudaram concentrações de carboidratos, polifenóis e metais de 5 tipos de vinhos Marsala. As concentrações obtidas de ácido vanílico (mg L<sup>-1</sup>) foram: Superiore Ambra Secco 6,25 ± 2,60; Fine Ambra Secco 3,57 ± 0,40; Superiore Riserva 5,27 ± 0,20; Vergine Soleras 4,38 ± 0,15 e Fine Oro Dolce 5,99 ± 0,97. Para o ácido siríngico: Superiore Ambra Secco 1,60 ± 0,26; Fine Ambra Secco 0,86 ± 0,33; Superiore Riserva 0,26 ± 0,01; Vergine Soleras 0,85 ± 0,02 e Fine Oro Dolce 0,71 ± 0,12. E para quercetina foram obtidos: Superiore Ambra Secco 0,95 ± 1,14; Fine Ambra Secco ≤ 0,003; Superiore Riserva ≤ 0,003; Vergine Soleras ≤ 0,003 e Fine Oro Dolce 2,19 ± 0,31.

A variedade das uvas, as condições agro-climáticas e o tipo de extração são fatores contribuintes para as diferenças entre as quantidades dos compostos fenólicos (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2014). Basha et al. (2004) afirmam que o genótipo parece ser o fator de maior influência na concentração relativa de diferentes compostos fenólicos. Zerbib et al. (2018) afirmam que a variação da composição fenólica em vinhos depende do cultivar e do período da colheita.

Conde et al. (2007) ressaltam ainda que as condições da fermentação, em particular a temperatura e a escolha da levedura conferem diferentes características químicas e sensoriais ao vinho. A presença de leveduras ou bactérias impacta diretamente na qualidade do vinho e ainda influencia no metabolismo dos seus compostos fenólicos. Os autores afirmam que as características do vinho são

também influenciadas pela idade e pela preparação do carvalho do barril de armazenamento: barris menores resultam em maiores quantidades de compostos fenólicos, devido ao aumento da área superficial de exposição e extração.

Muñoz-Bernal et al. (2020) avaliaram as mudanças no perfil e no conteúdo dos compostos fenólicos em cada dia da maceração pré-fermentativa a frio e da fermentação durante o preparo de vinho do tipo Cabernet Sauvignon no México. Os resultados mostraram que os flavonoides são os principais componentes no vinho e sua quantidade é maior no final do processo produtivo, enquanto que alguns ácidos fenólicos diminuíram. Os autores concluem afirmando que a quantidade dos compostos fenólicos não se altera, porém há mudança nas diferentes frações ao final do processo fermentativo. Os principais ácidos fenólicos identificados foram ácido gálico, cafeico, ferúlico e siríngico, os dois últimos sofreram redução ao final da fermentação. Quercetina, kaempferol e laricitrina foram encontrados durante todos os dias da fermentação. Ácidos elágico e vanílico também foram encontrados nas amostras durante todo o processo.

No presente estudo, as concentrações de melatonina encontradas nos vinhos brasileiros variaram de 2,74 a 19,89  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; e nos vinhos argentinos de 3,3 a 12,53  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Melatonina e isômeros de melatonina foram determinados em vinhos, sucos e vinagres italianos derivados de uvas por Iriti et al. (2013). Nos vinhos, as mais altas concentrações de melatonina foram detectadas no vinho tinto Melag ( $0,62 \pm 0,04 \text{ ng mL}^{-1}$ ), valor inferior aos encontrados no presente estudo. Não foi detectada a presença de melatonina nos sucos de uva. Dos isômeros de melatonina, o mais abundante foi a indoleamina encontrada no vinho Syrah ( $72,4 \pm 1,83 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

Kocadagli et al. (2014) avaliaram a presença de melatonina e seus isômeros em alimentos por CL-MS/MS. Dentre as matrizes, os autores não encontraram melatonina no vinho tinto que estudaram, porém encontraram quantidades elevadas de um isômero de melatonina em alimentos fermentados como vinho tinto ( $170,7 \pm 29,9 \text{ ng mL}^{-1}$ ), cerveja ( $14,3 \pm 0,48 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e farelo de pão ( $15,7 \pm 1,4 \text{ ng g}^{-1}$ ).

Gomez et al. (2012) avaliaram melatonina e seu isômero (indolamina) em extratos de uvas e vinho Malbec para demonstrar que *Saccharomyces cerevisiae* contribui para o conteúdo de melatonina e seus isômeros nos vinhos. Para realizar o estudo, foi montada uma planta produtiva em escala piloto para execução do processo fermentativo. Os compostos foram extraídos das uvas, do mosto da fermentação e do vinho e foram determinados por CL-MS/MS. No extrato das uvas foi obtido entre 120 e 160 ng g<sup>-1</sup> de melatonina. Foi detectada apenas a presença do isômero da melatonina no vinho produzido.

Fernández-Cruz et al. (2017) avaliaram se as cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima* têm influencia na síntese da melatonina em vinhos. Para desenvolver o estudo, foram monitoradas 7 linhagens comerciais em condições controladas de fermentação em mosto sintético. Os autores concluíram que cinco das sete leveduras influenciaram na síntese de melatonina durante o processo fermentativo.

Rodriguez-Naranjo et al. (2011a) prepararam 7 tipos de vinho visando estudar a presença de melatonina. Os autores afirmam que a melatonina é sintetizada durante o processo produtivo do vinho, precisamente depois da fermentação alcoólica, uma vez que o estudo não constatou presença de melatonina nas uvas e nos mostos. Foram obtidos valores entre 74,13 ± 2,65 e 423,01 ± 1,60 ng mL<sup>-1</sup>.

Em outra pesquisa realizada por Rodriguez-Naranjo et al. (2011b), foram determinados melatonina e seus isômeros por HPLC-MS/MS em oito vinhos produzidos em escala piloto na Espanha. Foi detectada melatonina em cinco amostras de vinho, com valores entre 5,1 ± 0,6 e 129,5 ± 3,5 ng mL<sup>-1</sup>; e ainda um isômero da melatonina em seis amostras, com valores entre 5,2 ± 0,4 e 21,9 ± 2,9 ng mL<sup>-1</sup>.

Biosíntese e acumulação de compostos fenólicos em uvas dependem de fatores climáticos e geográficos (OBREQUE-SLIER et al., 2010). Valentin et al. (2020) afirmam que o perfil químico dos vinhos pode mudar de acordo com diversos fatores, como variedade e região de produção das uvas, clima, práticas agrícolas, técnicas enológicas e condições de armazenamento. Os autores supõem que há um grupo de componentes químicos que estão sempre presentes em algumas

combinações de variedade e região de produção das uvas. Ressaltam, portanto a importância do estudo e aplicação de técnicas de agrupamento de vinhos a partir da origem geográfica e da variedade das uvas.

A Tabela 2 apresenta trabalhos da literatura de diversas regiões que estudaram os compostos bioativos em vinhos.

Tabela 2 - Concentrações de compostos bioativos em vinhos de diversas regiões (valores médios ou intervalos)

Origem do vinho	Ácido Vanílico (mg L <sup>-1</sup> )	Ácido Elágico (mg L <sup>-1</sup> )	Ácido Siríngico (mg L <sup>-1</sup> )	Quercetina (mg L <sup>-1</sup> )	Melatonina (ng L <sup>-1</sup> )	Referência
Brasil	<LQ - 11,57±0,01	-	-	-	-	Dias et al. (2017)
Argentina	-	2,71 - 17,65	-	-	-	Spisso et al. (2018)
Grecia	-	-	-	34,4±0,4 - 33,8±0,6	-	Bimpilas et al. (2015)
Bulgaria	-	-	-	0,27±0,03 - 1,98±0,18 (mg kg <sup>-1</sup> )	-	Tzanova et al. (2019)
América do Sul	-	2 - 50	4,57 - 30,29	5,6 - 7,9	-	Valentin et al. (2020)
Italia	3,57±0,4 - 5,99±0,97	-	0,26±0,01 - 1,6±0,26	<LQ - 2,19±0,31	-	La Torre et al. (2008)
Italia	-	-	-	-	0,62±0,04	Iriti et al. (2013)
Espanha	-	-	-	-	74,13±2,65 - 423,01±1,60	Rodriguez-Naranjo et al.



						(2011a)
Espanha	-	-	-	-	5,1±0,6 - 129,5±3,5	Rodriguez- Naranjo et al. (2011b)
América do Sul	1,89-14,48	1,37-8,07	0,78-4,85	1,52-11,73	2,74-19,89	Presente trabalho

### 3.1 Análise Exploratória de Dados

Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamento Hierárquico têm sido reportadas na literatura para descrever dados agrupados de trabalhos envolvendo uvas e vinhos (ANDRADE et al., 2013; BELMIRO et al., 2017; KRUZLICOVA et al. 2013; GEANA et al. 2014).

#### 3.1.1. Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais foi utilizada como análise exploratória para visualização dos vinhos argentinos e brasileiros na forma de grupos. Os dados de composição de bioativos foram utilizados como matriz de resposta. Foi construída uma matriz com 35 amostras e 5 variáveis, utilizando o dimensionamento automático como pré-processamento para cada variável. Os dois componentes principais (PCs) foram extraídos, explicando 60,52% da variância acumulada. O gráfico de escores no plano definido por PC1 (36,78%) e PC2 (24,74%), representado na Figura 1(a), mostra a separação em dois grupos diferentes, de acordo com as regiões avaliadas: Argentina e Brasil. A discriminação foi possível devido às diferentes concentrações dos cinco compostos avaliados, que variam dependendo das regiões. O gráfico de pesos (Figura 1(b)) no plano PC1 *versus* PC2 mostra quais variáveis tiveram mais peso no modelo. Pode-se observar que as principais discriminações das amostras são dadas ao longo do PC1, que está principalmente associado positivamente às concentrações de ácido vanílico e elágico, esses valores são mais altos nos vinhos

brasileiros e associado negativamente ao ácido siríngico, que é maior nos vinhos argentinos. Aparentemente, o PC2 não parece influenciar na discriminação das amostras, no entanto, as concentrações de quercetina e melatonina explicam a grande variabilidade dentro de cada região estudada, são, portanto as variáveis mais importantes para determinar o posicionamento vertical das amostras no gráfico de pesos. As amostras B3 e B9 não foram consideradas informativas para distinção da origem geográfica das amostras de vinho, por isso não foram consideradas na PCA.

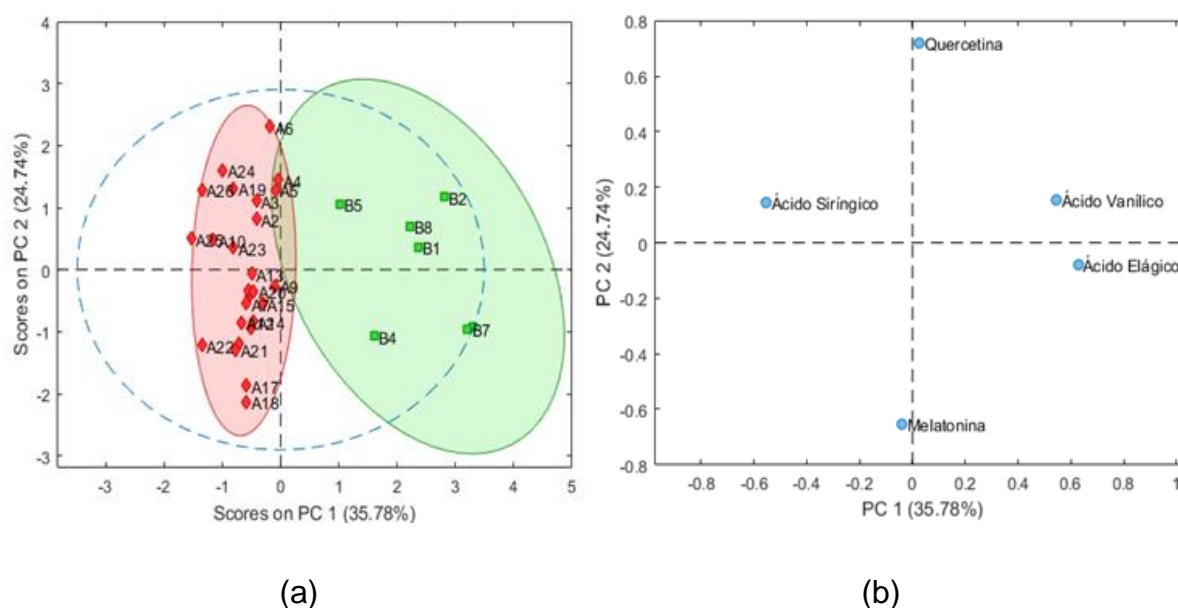


Figura 1- (a) Gráfico de escores e (b) Gráfico de peso das variáveis (ácidos siríngico, elágico, vanílico, quercetina e melatonina) de 35 amostras de vinhos obtidos por PCA

### 3.1.2 Análise de Agrupamento Hierárquico

A análise de agrupamento hierárquico classifica componentes com base nas suas similaridades (KUMAR et al., 2014). Cada observação é inicialmente tratada como um agrupamento separado. Em seguida, são executadas repetidamente as duas etapas: (1) identificação dos dois agrupamentos mais próximos e (2) mesclagem dos dois agrupamentos mais semelhantes. O procedimento continua até que todos os agrupamentos sejam mesclados. Uma maneira de visualizar a HCA é

por meio do dendrograma, que mostra a similaridade hierárquica entre os grupos (CORREIA & FERREIRA, 2007).

A distância entre dois agrupamentos foi calculada com base no comprimento da linha traçada de um agrupamento para outro. O método de Ward calcula quais observações agrupar com base na redução da soma das distâncias ao quadrado de cada observação da observação média em um agrupamento (MURTAGH & LEGENDRE, 2014).

A Figura 2 apresenta os dendogramas obtidos a partir da análise de agrupamento hierárquico utilizando os métodos de Ward e de distancia média de grupos de pares.

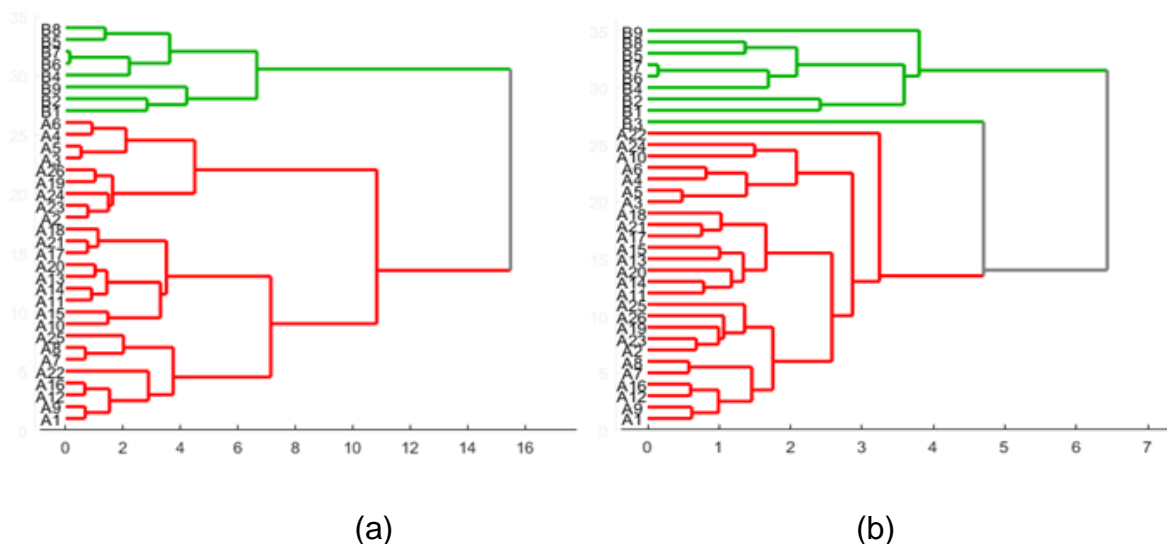


Figura 2 – Dendogramas de vinhos brasileiros (em verde) e argentinos (em vermelho) para análise de cluster (a) método de Ward e (b) distancia média de grupos de pares

As análises de componentes principais e de agrupamento hierárquico realizadas permitiram a visualização do conjunto de dados estudados em dois grupos: o dos vinhos brasileiros e o dos vinhos argentinos. HCA agrupou as amostras em classes com base na similaridade dos participantes da mesma classe e nas diferenças entre as amostras de classes diferentes. PCA reduziu a dimensionalidade do conjunto dos dados gerando gráficos que representam as

amostras em um sistema cartesiano, preservando o máximo possível de informações.

Belmiro et al. (2017) desenvolveram e validaram um método para determinação de compostos fenólicos (ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina, miricetina, resveratrol, quercetina-3-glucoside e kaempferol) por HPLC UV/Vis em vinhos do Brasil (Vale do São Francisco e Rio Grande do Sul) e Argentina, e utilizaram análise multivariada de dados para confirmar a origem geográfica dos vinhos. Para a quercetina, os valores encontrados nos vinhos do Vale do São Francisco variaram de 2,81 a 6,47 mg L<sup>-1</sup>, valores aproximados aos encontrados pelo presente estudo. Entre os vinhos do Rio Grande do Sul, os valores encontrados variaram entre 0,95 e 16,05 mg L<sup>-1</sup>. Nos vinhos argentinos, os valores encontrados também estão próximos aos obtidos neste trabalho: entre 1,75 e 7,51 mg L<sup>-1</sup>. Os autores representaram os dois grupos de vinhos de acordo com a região de origem a partir da PCA obtida.

Andrade et al. (2013) determinaram o perfil de antocianinas por HPLC UV/Vis em vinhos de duas regiões do Brasil (Vale do São Francisco e Rio Grande do Sul) e do Chile (Vale do Colchagua e Vale Central) e utilizaram PCA para relacionar os dados com a origem geográfica dos vinhos. Nove componentes foram identificados e foi possível visualizar 3 grupos distintos: um grupo dos vinhos do Vale do São Francisco, um do Rio Grande do Sul e um grupo com os vinhos do Chile.

Geana et al. (2014) diferenciaram 22 vinhos tintos da Romênia pela região de origem geográfica a partir da composição elementar e dos compostos fenólicos, utilizando análise exploratória dos dados por Análise de Componentes Principais. Dentre os fenólicos, foram determinados catequina, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e resveratrol. Os resultados obtidos mostraram a divisão dos vinhos em dois grupos que identificam duas regiões produtoras a partir das variáveis ácido ferúlico, catequina e resveratrol.

Valentin et al. (2020) determinaram componentes voláteis e fenólicos em 83 vinhos tintos da América do Sul, Chile, Argentina, Uruguai e Brasil. Utilizaram métodos quimiométricos para discriminar os vinhos de acordo com a variedade e a origem geográfica. Os vinhos chilenos formaram o grupo melhor discriminado pelo

estudo com o método aplicado, seguidos pelos vinhos argentinos. Os demais vinhos foram agrupados de forma combinada.

#### **4. Conclusões**

O composto fenólico encontrado em maior quantidade nos vinhos argentinos foi a quercetina. Em 6 amostras de vinhos brasileiros, as concentrações de ácido vanílico foram mais altas que nos vinhos argentinos. Em 6 amostras de vinhos brasileiros, o ácido elágico se destaca com concentrações até 4 vezes maiores que nos vinhos argentinos. Para o ácido siríngico, as concentrações obtidas nos vinhos brasileiros foram inferiores às dos vinhos argentinos.

Nos vinhos brasileiros as concentrações dos compostos fenólicos (em mg L<sup>-1</sup>) variaram entre: 0,78 e 1,45 para ácido siríngico; 2,1 e 8,07 para ácido elágico; 2,5 e 14,48 para ácido vanílico e 2,91 e 10,67 para quercetina. Nos vinhos argentinos foram obtidos valores (em mg L<sup>-1</sup>) entre: 1,22 e 4,85 para ácido siríngico; 1,37 e 3,61 para ácido elágico; 1,89 e 4,89 para ácido vanílico e 1,52 e 11,73 para quercetina. As concentrações de melatonina encontradas nos vinhos brasileiros variaram de 2,74 a 19,89 µg L<sup>-1</sup>; e nos vinhos argentinos de 3,3 a 12,53 µg L<sup>-1</sup>.

Pela análise multivariada dos dados obtidos na determinação de ácido elágico, ácido vanílico, ácido siríngico, quercetina e melatonina, foi possível discriminar vinhos tintos pela região de origem: Brasil e Argentina. Em conformidade com a literatura, os resultados mostram que a origem geográfica dos vinhos pode ser distinguida com base na análise dos seus compostos bioativos.

## Referências Bibliográficas

ALI, K.; MALTESE, F.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. **Phytochemistry Reviews**, 9, 357-378, 2010.

ANDRADE, R. H. S.; NASCIMENTO, L. S.; PEREIRA, G. E.; HALLWASS F.; PAIM, A. P. S. Anthocyanic composition of Brazilian red wines and use of HPLC-UV-Vis associated to chemometrics to distinguish wines from different regions. **Microchemical Journal**, 110, 256-262, 2013.

BASHA, S. M.; MUSINGO, M.; COLOVA, V. S. Compositional differences in the phenolics compounds of muscadine and bunch grape wines. **African Journal of Biotechnology**, 3, 523-528, 2004.

BARCIA, M. T.; PERTUZATTI, P. B.; BOCHI, V. C.; HERMOSÍN-GUTIERREZ, I.; GODOY, H. T. Vinification by-products and their phenolic compounds. **American Journal of Food Science and Technology**, 3, 18-23, 2015.

BELMIRO, T. M. C.; PEREIRA, C. F.; PAIM, A. P. S. Red wines from South America: Content of phenolic compounds and chemometric distinction by origin. **Microchemical Journal**, 133, 114-120, 2017.

BIMPILAS, A.; TSIMOGIANNIS, D.; BALTA-BRIUMA, K.; LYMPEROPOULOU, T.; OREOPOULOU, V. Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. **Food Chemistry**, 178, 164-171, 2015.

BRAMLEY, R. G. V.; OUZMAN, J.; BOSS, P. K. Variation in vine vigour, grape yield and vineyard soils and topography as indicators of variation in the chemical composition of grapes, wine and wine sensory attributes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, 17, 217-229, 2011.

CASAZZA, A. A.; ALIAKBARIAN, B.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G.; PEREGO, P. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. **Journal of Food Engineering**, 100, 50-55, 2010.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 992-1002, 2007.

CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A. C. P.; TAVARES, R. M.; SOUSA, M. J.; AGASSE, A.; DELROT, S.; GERÓS, H. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Food**, 1, 1-22, 2007.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, 30, 481-487, 2007.

DEIS, L.; CAVAGNARO, B.; BOTTINI, R.; WUILLOUD, R.; SILVA, M. F. Water deficit and exogenous ABA significantly affect grape and wine phenolic composition under in field and in-vitro conditions. **Plant Growth Regulation**, 65, 11-21, 2011.

DIAS, F. S.; LOVILLO, M. P.; BARROSO, C. G.; CARNEIRO, A. F.; DAVID, J. M. Direct determination of phenolic acids and hydroxymethylfurfural in wines elaborated in Vale do São Francisco region-Brazil by HPLC-DAD. **Analytical Methods**, 9, 643-648, 2017.

DORTA, E.; GONZÁLEZ, M.; LOBO, M. G.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DE ANCOS, B. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. **Food Research International**, 57, 51-60, 2014.

ESATBEYOGLU, T.; EWALD, P.; YASUI, Y.; YOKOKAWA, H.; WAGNER, A. E.; MATSUGO, S. Chemical characterization, free radical scavenging, and cellular antioxidant and anti-inflammatory properties of a stilbenoid-rich root extract of *Vitis vitifera*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

FERNÁNDEZ-CRUZ, E.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, M. A.; VALERO, E.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic fermentation by different wine yeast strains. **Food Chemistry**, 217, 431-437, 2017.

GEANA, E. I.; POPESCU, R.; COSTINEL, D.; DINCA, O. R.; IONETE, R. E.; STEFANESCU, I.; ARTEM, V.; BALA, C. Classification of red wines using suitable markers coupled with multivariate statistical analyses. **Food Chemistry**, 192, 1015-1024, 2016.

GEANA, E. I.; MARINESEU, A.; IORDACHE, A. M.; SANDRU, C.; IONETE, R. E.; BALA, C. Differentiation of Romanian Wines on Geographical Origin and Wine Variety by Elemental Composition and Phenolic Components. **Food Analytical Methods**, 7, 2064-2074, 2014.

GEORGIEV, V.; ANTHONY, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceutical. **Nutrients**, 6, 391-415, 2014.

GHANEM, C.; HANNA-WAKIM, L.; NEHME, N.; SOUCHARD, J.; TAILLANDIER, P.; EL RAYESS, Y. Impact of winemaking techniques on phenolic compounds composition and content of wine: a review. **Nova science publishers**, New York, 104-130, 2014.

GOMEZ, F. J. V.; RABA, J.; CERUTTI, S.; SILVA, M. F. Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. **Journal of Pineal Research**, 52, 349-355, 2012a.

GOMEZ, F. J. V.; MONASTERIO, R. P.; VARGAS, V. C. S.; SILVA, M. F. Analytical characterization of wine and its precursors by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, 33, 2240-2252, 2012b.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; KNOERZER, K.; SABAREZ, H.; SIMAL, S.; ROSSELÓ, C.; FEMENIA, A. Effect of acoustic frequency and Power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera*) – A response surface approach. **Ultrasonic Sonochemistry**, 21, 2176-2184, 2014.

HRAZDINA, G.; PARSONS, G. F.; MATTICK L. R. Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, 35, 220-227, 1984.

IRITI, M.; VIGENTINI, I. Tryptophan-Ethylester, the False (Unveiled) Melatonin Isomer in Red Wine. **International Journal of Tryptophan Research**, 8, 27-29, 2015.

IRITI, M.; VITALINI, S.; GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; FICO, G. Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity. **Journal of Pineal Research**, 54, 322-333, 2013.

IRITI, M.; ROSSONI, M.; FAORO, F. Melatonin content in grape: myth or panacea?. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86, 1432–1438, 2006.

JACKSON, R.S. **Wine Science: Principles and Applications**, 3 ed. EUA: Elsevier, 2008.

JUNG-HYNES, B.; REITER, R. J.; AHMAD, N. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. **Journal of Pineal Research**, 48, 9-19, 2010.

KILL, L. H. P.; LIMA, M. A. C. de. Descrição do Ecossistema e sua Influência na Qualidade das Uvas e das Mangas Produzidos no Vale do Submédio São Francisco. **Documento online 222, Embrapa Semi-árido**, Petrolina, out. 2009. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/661915/1/kiill.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

KOCADAGLI, T.; YILMAZ, C.; GOKMEN, V. Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 153, 151-156, 2014.

KORKMAZ, A.; REITER, R. J.; TOPAL, T.; MANCHESTER, L. C.; OTER, S.; TAN, D. Melatonin: An Established Antioxidant Worthy of Use in Clinical Trials. **Journal Molecular Medicine**, 15, 43-50, 2009.

KRUZLICOVA, D.; FIKET, Z.; KNIEWALD, G. Classification of Croatian wine varieties using multivariate analysis of data obtained by high resolution ICP-MS analysis. **Food Research International**, 54, 621-626, 2013.

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, 123, 186-199, 2014.



LA TORRE, G. L.; LA PERA, L.; RANDO, R.; LO TURCO, V.; DI BELLA, G.; SAITTA, M.; DUGO, G. Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. **Food Chemistry**, 110, 729-734, 2008.

MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; RAGGI, M. A. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. **Journal of Pineal Research**, 53, 21 - 28, 2012.

MUÑOZ-BERNAL, O. A.; CORIA-OIVEROS, A. J.; VAZQUEZ-FLORES, A. A.; DE LA ROSA, L. A.; NÚÑEZ-GASTÉLUM, J. A.; RODRIGO-GRACIA, J.; AYALA-ZAVALA, J. F.; ALVAREZ-PARRILA, E. Evolution of phenolic content, antioxidant capacity and phenolic profile during cold pré-fermentative maceration and subsequent fermentation of Cabernet sauvignon red wine. **South African Journal for Enology and Viticulture**, 41, 72-82, 2020.

MURCH, S.J.; HALL, B.A.; LE, C.H.; SAXENA, P. K. Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during véraison and ripening of wine grapes. **Journal of Pineal Research**, 49, 95 -100, 2010.

MURTAGH, F.; LEGENDRE, P. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion?. **Journal of Classification** 31, 274-295, 2014.

OBREQUE-SLIER, E.; PENA-NEIRA, A.; LOPEZ-SOLIS, R.; ZAMORA-MARIN, F.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; LAUREANO, O. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carmenere and Cabernet sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L) during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 3591-3599, 2010.

POSMYK, M. M.; JANAS, K. M. Melatonin in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31, 1 – 11, 2009.

RAHDAM, S. A.; KAYUMOV, L.; SHAPIRO, C. M. Antidepressant action of melatonin in the treatment of Delayed Sleep Phase Syndrome. **Sleep Medicine**, 11, 131-136, 2010.

RODRIGUEZ-NARANJO; M. I.; GIL-IZQUIERDO, A.; TRONCOSO, A. M.; CANTOS, E.; GARCIA- PARRILLA, M.C. Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. **Food Chemistry**, 126, 1608-1613, 2011a.

RODRIGUEZ-NARANJO; M. I.; GIL-IZQUIERDO, A.; TRONCOSO, A. M.; CANTOS, E.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Melatonin: a new bioactive compound in wine. **Journal of Food Composition and Analysis**, 24, 603-608, 2011b.

SALEHI, B.; VLAISAVLJEVIC, S.; ADETUNJI, C. O.; ADETUNJI, J. B.; KREGIEL, D.; ANTOLAK, H.; PAWLIKOWSKA, E.; UPRETY, Y.; MILESKI, K. S.; DEVKOTA, H. P.; SHARIFI-RAD, J.; DAS, G.; PATRA, J. K.; JUGRAN, A.K.; SEGURA-CARRETERO, A.; CONTREAS, M. DEL M. Plants of genus *Vitis*: Phenolic compounds, anticancer

properties and clinical relevance. **Trends in Food Science & Technology**, 91, 362-379, 2019.

SAUTHIER, M. C. da S.; da SILVA, E. G. P.; SANTOS, B. R. da S.; SILVA, E. F. R.; CALDAS, J. da C.; MINHO, L. A. C.; dos SANTOS, A. M. P.; dos SANTOS, W. N. L. Screening of *Mangifera indica* L. functional content using PCA and neural networks (ANN). **Food Chemistry**, 273, 115-123, 2019.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 11, 287-313, 1997.

SPISSO, A.; GOMEZ, F. J. V.; SILVA, M. F. Determination of ellagic acid by capillary electrophoresis in Argentinian wines. **Electrophoresis**, 39, 1621-1627, 2018.

TEIXEIRA, A.; BAENAS, N.; DOMINGUEZ-PERLES, R.; BARROS, A.; ROSA, E.; MORENO, D. A.; GARCIA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, 15, 15638-15678, 2014.

TZANOVA, M.; ATANASOV, V.; IVANOV, M.; ILIEV, A.; ATANASSOVA, S.; PEEVA, P.; GROZEVA, N.; GERDZHIKOVA, M.; DINEV, T. Antioxidant constituents and antioxidant activity of some red wine and red table grape varieties, cultivated in different regions of Bulgaria. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 25, 3-12, 2019.

VALENTIN, L.; BARROSO, L. P.; BARBOSA, R. M.; DE PAULO, G. A. Chemical typicality of South American red wines classified according to their volatile and phenolic compounds using multivariate analysis. **Food Chemistry**, 302, 1-8, 2020.

ZERBIBI, M.; MAZAURIC, J. P.; MEUDEC, E.; GUERNEVÉ, C. L.; LEPAK, A.; NIDETZKY, B.; CHEYNIER, V.; SAUCIER, C.; TERRIER, N. New flavonol O-glycosides in grape and wine. **Food Chemistry**, 266, 441-448, 2018.

ZHU, L.; ZHANG, Y.; LU, J. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. **International Journal of Molecular Science**, 13, 3492-351, 2012.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do uso de ferramentas quimiométricas foi possível classificar vinhos tintos da região do Vale do São Francisco, utilizando a composição elementar e de compostos bioativos. Os dados obtidos no presente trabalho contribuíram significativamente para caracterização dos vinhos elaborados na região do Vale do São Francisco, colaborando com informações que podem conferir uma garantia da qualidade dos vinhos produzidos nesta região, possibilitando que pequenos e médios produtores obtenham um selo de denominação de origem. Neste estudo, os vinhos do Vale do São Francisco foram comparados com vinhos elaborados em uma região de grande relevância no mercado mundial vinícola, a região de Mendoza, Argentina.