



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**RAINELDES AVELINO CRUZ JUNIOR**

**Desenvolvimento de métodos analíticos baseados na foto-oxidação UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para determinação de metais em amostras de bebidas alcoólicas empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica**

Salvador

2021

**RAINELDES AVELINO CRUZ JUNIOR**

**Desenvolvimento de métodos analíticos baseados na foto-oxidação UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para determinação de metais em amostras de bebidas alcoólicas empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia - UFBA como parte dos requisitos para a obtenção do grau de doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira

Salvador

2021

## DEDICATÓRIA

Dedico a todos que contribuíram direta/indiretamente para que isso fosse possível.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar os meus caminhos e me fortalecer nos momentos difíceis; À minha família, por todo incentivo e cuidado, que me acompanhou nesta longa jornada;

Ao Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira, pela orientação, amizade, confiança, oportunidades e bons momentos compartilhados; um grande exemplo de vida a ser seguido;

A todos os professores que nesta jornada contribuíram com seus valiosos ensinamentos para o meu crescimento pessoal e profissional;

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (GRPQQ);

À banca avaliadora, antecipadamente por toda colaboração que esta venha a promover neste trabalho.

Aos meus amigos Mario, Caio, Cheilane e em especial a Geovani (jow) por toda disponibilidade e presteza.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia;

## EPÍGRAFE

A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo". (Albert Einstein)

## RESUMO

Nesse trabalho, foram desenvolvidas duas metodologias analíticas baseadas no emprego da foto-oxidação UV usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 70% (m/m) para degradação de amostras de bebidas alcoólicas, visando a determinação de metais por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS). Assim, o primeiro capítulo desse trabalho apresenta uma revisão bibliográfica que aborda aspectos gerais sobre bebidas alcoólicas, métodos de preparo de amostras e técnicas analíticas. O segundo capítulo apresenta um método proposto para o processo de decomposição de amostras de vinho por foto-oxidação usando radiação UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 70% (m/m) para determinação de Pb por ET AAS. Para esse propósito, foi utilizado um sistema de digestão UV em linha construído em laboratório, o qual foi constituído por uma lâmpada UV envolvida por uma bobina de tubo de PTFE. Para a determinação de Pb, a linha analítica em 283,306 nm foi usada e Al foi empregado como modificador químico. As temperaturas de pirólise e atomização foram de 800 e 1800 °C, respectivamente. De acordo com os resultados de um planejamento fatorial de dois níveis, as condições estabelecidas para o processo de foto-oxidação foram: volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2,0 mL e tempo de irradiação UV de 45 min, para um volume de amostra de 5,0 mL. Usando essas condições, os limites de detecção e quantificação foram de 0,89 e 0,27 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Precisão do método, avaliada como desvio padrão relativo (RSD), foi de 2,13% (*n* = 6) para uma amostra de vinho com teor de Pb de 16,35 µg L<sup>-1</sup>. A exatidão foi confirmada através de testes de adição e recuperação de analito e comparação com uma metodologia analítica de referência. O método proposto foi aplicado para a análise de diferentes amostras de vinho e os resultados de concentração variaram de 2,19 a 43,48 µg L<sup>-1</sup> de Pb. No terceiro capítulo, foi proposto o emprego do sistema de digestão UV em linha e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 70% (m/m) para a degradação de amostras de cerveja, visando a determinação de Cr por ET AAS. As condições para a foto-oxidação foram estabelecidas usando um planejamento fatorial completo de dois níveis, as quais foram: volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2,0 mL e tempo de irradiação UV de 20 min, para um volume de amostra de XX mL. A determinação de Cr foi realizada usando a linha analítica em 357,9 nm e Mg como modificador químico. Temperaturas de pirólise e atomização foram definidas como 1300 e 2500 °C, respectivamente. Para esse estudo, curvas cinéticas de degradação da cerveja em diferentes condições também foram avaliadas e a constante cinética aparente (*k<sub>app</sub>*) encontrada para o processo foi de 0,0668 min<sup>-1</sup> (*R*<sup>2</sup> = 0,9936). Nessas condições, limites de detecção e quantificação foram de 0,86 e 2,90 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A precisão do método foi de 3,81% (*n* = 7) para uma amostra de cerveja com teor de Cr de 33 µg L<sup>-1</sup>. A exatidão foi confirmada pela análise de um material de referência certificado de águas residuais (ERM-CAT 713), e também através de testes de adição e recuperação de analito. O método proposto foi então aplicado para a análise de seis diferentes amostras de cerveja. As concentrações de Cr encontradas variaram de 4,26 a 33,28 µg L.

Palavras-chave: foto-oxidação, preparo de amostra, metais, bebidas alcoólicas

## ABSTRACT

In this work, a complete study was developed on methodologies applied to beverage analysis, as well as presentation of a methodological proposal for sample preparation. The consumption of beverages, such as wine, around the world has been increasing significantly, as well as the sophistication of its mode of production. With this the need for sophisticated analytical methodologies for the determination of chemical species that help in the quality control, bioavailability and authenticity process of the product regarding the possible adulterations that may occur, become indispensable. The first chapter of this work focuses on bringing a descriptive qualitative bibliographic review on the most relevant works on the subject.

The second chapter presents a proposal of sample preparation method by photo oxidation using ultraviolet radiation in the process of decomposition of wine samples for pb determination. The limits of quantification and detection found were  $0.89 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $0.27 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The system was applied to different wine samples resulting in concentrations ranging from 2.19 to  $43.48 \mu\text{g L}^{-1}$  of lead.

The third chapter of this work proposes an online system employing 70% hydrogen peroxide (p/ p) and UV radiation for the determination of chromium in beer samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETAAS). The experimental factors were optimized using a complete factorial planning of two levels. The kinetic curves of degradation of the samples under different conditions were also evaluated. The apparent kinetic constant (kapp) found for the process was  $0.0668 \text{ min}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9936$ ). The online digestion procedure allowed the determination of chromium in beer samples by ETAAS, using the external calibration technique, with analytical line 357.9 nm, in the presence of magnesium as a chemical modifier with limits of detection and quantification of 0.86 and  $2.90 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The accuracy of the method was confirmed by the analysis of the reference material. The concentrations found ranged from 4.26 to  $33.28 \mu\text{g L}$ .

Keywords: sample preparation, metals, alcoholic beverages, photo-oxidation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Consumo de vinho do mundo.....	17
<b>Figura 2</b>	Maiores produtores de vinho no mundo .....	18
<b>Figura 3</b>	Escala de produção do vinho .....	18
<b>Figura 4</b>	Ácidos orgânicos presentes no vinho .....	24
<b>Figura 5</b>	Estrutura de flavonoides.....	27
<b>Figura 6</b>	Etapas envolvidas no procedimento SPE.....	32
<b>Figura 7</b>	Reconhecimento biomolecular .....	33
<b>Figura 8</b>	Etapas da síntese de IIP .....	34
<b>Figura 9</b>	Síntese por imobilização química.....	35
<b>Figura 10</b>	Síntese por aprisionamento.....	36
<b>Figura 11</b>	Síntese por impressão de superfície .....	36
<b>Figura 12</b>	Representação do modelo .....	37
<b>Figura 13</b>	Espectrômetro de absorção atômica por chama .....	44
<b>Figura 14</b>	Atomizador eletrotérmico com revestimento pirolítico .....	45
<b>Figura 15</b>	– Representação bidimensional de um pixel .....	50
<b>Figura 16</b>	Representação geométrica do sistema de cores RGB.....	50
<b>Figura 17</b>	Cubo representação RGB .....	52
<b>Figura 18</b>	Exemplo de modelo RGB para a coloração verde .....	52
<b>Figura 19</b>	Método RGB.....	53
<b>Figura 20</b>	Sistema de digestão fechado .....	62
<b>Figura 21</b>	Gráfico de Pareto para planejamento fatorial completo $2^3$ . .....	68
<b>Figura 22</b>	Gráfico de Pareto para planejamento fatorial completo $2^2$ . .....	70
<b>Figura 23</b>	Variação da absorbância .....	71
<b>Figura 24</b>	Curvas de fotodescoloração.....	72
<b>Figura 25</b>	– Curvas cinéticas seguindo um modelo de pseudo-primeira ordem. ....	73
<b>Figura 26</b>	Curvas de pirólise e atomização empregando alumínio como modificador químico.....	74
<b>Figura 27</b>	Curvas de degradação .....	95
<b>Figura 28</b>	Curvas de pirólise e atomização empregando magnésio como modificador químico .....	96

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Exemplo de matriz de planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) .....	64
<b>Tabela 2</b> Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de chumbo no ETAAS .....	66
<b>Tabela 3</b> Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis $2^3$ para avaliação da digestão de amostras de vinho.....	67
<b>Tabela 4</b> Otimização do sistema de digestão de amostras usando planejamento fatorial de dois níveis $2^2$ . .....	69
<b>Tabela 5</b> – Programa de temperatura para determinação de chumbo empregando alumínio como modificador químico .....	74
<b>Tabela 6</b> Determinação de chumbo em amostras de vinho (n=3) .....	78
<b>Tabela 7</b> – Comparação de diferentes estudos para determinação de Pb em amostras de vinho.....	82
<b>Tabela 8</b> Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de chumbo no ETAAS .....	91
<b>Tabela 9</b> Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis $2^2$ para avaliação do sistema digestor .....	92
<b>Tabela 10</b> Efeitos e interações dos fatores estudados .....	93
<b>Tabela 11</b> – Resultado da análise do ERM-CA713 empregando ETAAS.....	98
<b>Tabela 12</b> Determinação de cromo em amostras de cerveja.....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>DLLME</b>	Microextração líquido-líquido dispersiva
<b>EFS</b>	Extração em fase sólida
<b>ET AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica
<b>F AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com chama
<b>GF AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
<b>HG AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos
<b>ICP-OES</b>	Espectroscopia de massa acoplada por plasma indutivo
<b>LLE</b>	Extração em fase líquida
<b>LOD</b>	Limite de detecção ( do inglês, limit of detection)
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação (do inglês, Limit of Quantification)
<b>MOD</b>	Modificador químico
<b>MP-AES</b>	Emissão atômica com plasma de micro-ondas
<b>MIP</b>	Polímero Moleculamente Impresso
<b>OIV</b>	Organização Internacional da Uva e do Vinho
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>RGB</b>	Red Green Blue
<b>RSD</b>	Desvio padrão relativo
<b>UV</b>	Ultravioleta

# SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. PROCESSO PRODUTIVO .....	20
3. QUÍMICA DO VINHO.....	22
3.1 ÁGUA.....	22
3.2 CARBOIDRATOS.....	22
3.3 ÁLCOOIS.....	23
3.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	24
3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	26
3.6 COMPOSTOS NUTRICIONAIS.....	27
4. PREPARO DE AMOSTRAS .....	28
4.1 PROCEDIMENTOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO.....	29
4.1.1 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA.....	29
4.1.2 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – EFS.....	31
4.1.3 POLÍMERO MOLERCULAMENTE IMPRESSO (MIP).....	32
4.2 MÉTODOS DE DEDOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS .....	37
4.2.1 PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO (POA).....	37
4.2.2 DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA.....	39
5. TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	42
5.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	42
5.1.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA.....	43
5.1.2 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA .....	45
5.2 TÉCNICAS COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE .....	47
5.3 TÉCNICA POR IMAGEM DIGITAL.....	49
5.3.1 APLICAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS COLORIMÉTRICAS NA QUÍMICA ANALÍTICA .....	53
CAPÍTULO II .....	55
6. INTRODUÇÃO.....	56
7. OBJETIVOS.....	60
7.1 OBJETIVO GERAL.....	60
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60

<b>8. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	61
<b>8.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS</b> .....	61
<b>8.2 SISTEMA FECHADO DE DIGESTÃO DE AMOSTRA EM LINHA</b> .....	61
<b>8.3 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA</b> .....	62
<b>8.3.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO DE DOIS NÍVEIS</b> .....	63
<b>8.3.2 ESTRATÉGIA DE OTIMIZAÇÃO</b> .....	65
<b>8.3.3 INSTRUMENTAÇÃO</b> .....	65
<b>8.3.4 DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL DE CARBONO</b> .....	66
<b>9. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	67
<b>9.1 ESTUDO DO SISTEMA EM LINHA USANDO RADIAÇÃO UV</b> .....	67
<b>9.2 “ESTUDO CINÉTICO DA DEGRADAÇÃO DO VINHO USANDO RADIAÇÃO UV E H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 70%”</b> .....	70
<b>9.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE CHUMBO USANDO ETAAS</b> .....	73
<b>9.4 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO ETAAS PROPOSTO</b> .....	74
<b>9.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO</b> .....	75
<b>9.5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ</b> .....	75
<b>9.5.2 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO</b> .....	76
<b>9.5.3 MASSA CARACTERÍSTICA</b> .....	77
<b>9.5.4 PRECISÃO</b> .....	77
<b>9.5.5 EXATIDÃO</b> .....	78
<b>9.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO</b> .....	79
<b>10. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS</b> .....	83
CAPÍTULO III .....	84
<b>11. INTRODUÇÃO</b> .....	85
<b>12. OBJETIVOS</b> .....	89
<b>12.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	89
<b>12.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	89
<b>13. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	90
<b>13.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS</b> .....	90
<b>13.2 SISTEMA FECHADO DE DIGESTÃO DE AMOSTRA EM LINHA</b> .....	90
<b>13.3 ESTRATÉGIA DE OTIMIZAÇÃO</b> .....	90
<b>13.4 INSTRUMENTAÇÃO</b> .....	91
<b>14. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	92
<b>14.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DIGESTOR ONLINE USANDO RADIAÇÃO UV</b> .....	92
<b>14.2 ESTUDO CINÉTICO DA DEGRADAÇÃO DA CERVEJA USANDO RADIAÇÃO UV E H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 70%</b> .....	94

<b>14.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS EMPREGANDO ET AAS PARA DETERMINAÇÃO DE CROMO</b> .....	96
<b>14.4 ESTUDOS DE VALIDAÇÃO</b> .....	97
<b>14.4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ</b> .....	97
<b>14.4.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)</b> .....	97
<b>14.4.3 PRECISÃO</b> .....	97
<b>14.4.4 MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO</b> .....	97
<b>14.4.5 TESTE DE ADIÇÃO/RECUPERAÇÃO</b> .....	98
<b>14.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO</b> .....	98
<b>15. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS</b> .....	100
<b>16. CONCLUSÃO</b> .....	101
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	102

---

---

# **CAPÍTULO I**

---

---

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE  
ELEMENTOS QUÍMICOS EM AMOSTRAS DE VINHO EMPREGANDO  
TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS**

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

A relação entre humanidade e o consumo de bebidas alcoólicas é uma prática milenar, precedendo o processo de evolução social, tal como a escrita. A apresentação do vinho como um artigo de luxo, por exemplo, está relacionada ao surgimento de uma primeira sociedade complexa, sendo até hoje um produto de grande relevância histórica, cultural, religiosa e econômica [1].

O consumo excessivo de alimentos fermentados, como frutas, já é visto a milhares de anos. É o caso dos primatas e a busca por frutos mais maduros, atraídos principalmente pelos odores presentes nesses alimentos. A apresentação de um alto teor alcóolico já era suficiente para se observar os primeiros sinais de embriaguez. Estes conhecimentos foram sendo aprimorados ao longo dos anos, o que permitiu uma variabilidade dos sistemas de produção de bebidas [2].

A origem do processo da fermentação de bebidas alcoólicas é incerta. Ainda assim, dados arqueológicos remontam a prática iniciada em meados do quarto milênio, antes de Cristo, na região conhecida como Godin Tepe, no Irã, sendo essa uma importante e estratégica rota comercial. Essas descobertas devem-se principalmente aos resíduos de ácido tartárico, haja vista sua característica intrínseca em uvas, sobretudo em formas de cristais, além de variados componentes orgânicos encontrados em jarros de cerâmica piriformes, supostamente utilizados para fins de armazenamento e consumo desses produtos [1].

Embora não se saiba com precisão o surgimento das primeiras videiras, tem-se a videira selvagem eurasiática, *Vitis Vinifera sylvestris*, como indício das primeiras domesticações, sendo estendidas pelas regiões leste e oeste da Ásia Central, norte e sul da Crimeia e noroeste da África. Evidências históricas apontam seu nascimento no Oriente Próximo, o que permitiu sua disseminação em territórios adjacentes como Egito e Baixa Mesopotâmia [3].

As rotas comerciais eventualmente foram um grande propulsor que levaram a propagação da viticultura e domesticação mundo afora. O uso de ânforas era comum como método de transporte de produtos, como o vinho, já sendo utilizadas por muitas culturas, o que é confirmada pela recuperação de artefatos em todo Mediterrâneo contendo traços de substâncias que remetem ao vinho [1].

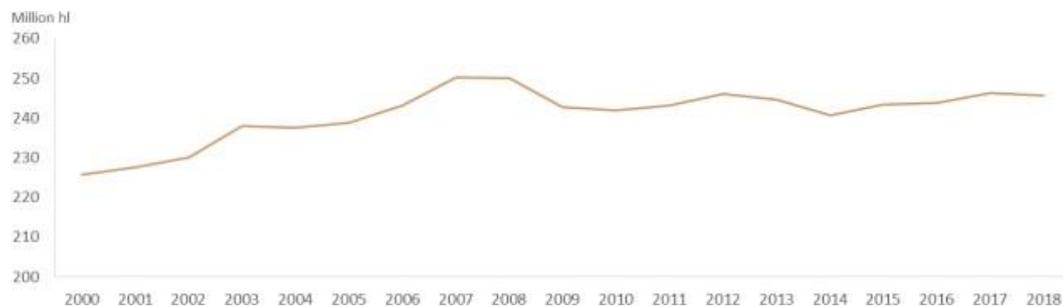
Os egípcios foram os primeiros grupos a registrarem os procedimentos de vinificação em pinturas e documentos, contribuindo para sua propagação em regiões como Europa Mediterrânea, África Central e Reinos Asiáticos. A vinificação no Egito foi marcada por um alto processo de sofisticação, já sendo vistas nas primeiras Dinastias pela presença de hieróglifos em diversos artefatos. A disseminação do vinho em outras regiões europeias ainda foi realizada por gregos, estando essas associadas a questões culturais e econômicas ao longo de sua história. Em relação a cerveja, os trabalhadores gregos que construíram as pirâmides de Gizé ganhavam em média 5 litros de cerveja por dia no intuito de conseguir manter a jornada exaustante de trabalho. [2][3]

Os romanos possuíam uma forte ligação com os processos de vinificação, tendo sua produção intensificada após a expansão do Império Romano e Cruzadas. Sua fabricação foi vinculada a demarcação territorial, divergindo na forma de armazenamento dessas bebidas, o qual diferente dos gregos que o armazenavam em ânforas, o acondicionamento pelos romanos era realizado em barris de madeira, tal condição foi associada ao aprimoramento do sabor da produção, bem como o aumento de sua qualidade [2].

Na Idade moderna, acompanhada pelos feitos das grandes navegações, a produção de bebidas se propagou pelo mundo. Na América, o processo de disseminação deve-se a Cristóvão Colombo. Já no Brasil, as primeiras videiras foram trazidas por Martim de Sousa para a capitania de São Vicente em 1532, enquanto as primeiras cervejas foram trazidas pelos holandeses pela Companhia das Índias Ocidentais [2].

A produção de bebidas no século XX passou por um processo de avanços científicos e tecnológicos que propiciou uma condição mecanizada de produção, elevando substancialmente a cadeia produtiva. Por consequência, a criação de espécies de leveduras geneticamente modificadas, tornou estes produtos nos mais consumidas em todo o mundo [4]. A **Figura 1** ilustra o consumo do vinho ao redor do mundo nos últimos anos.

**Figura 1** Consumo de vinho do mundo no mundo entre 2000 e 2018

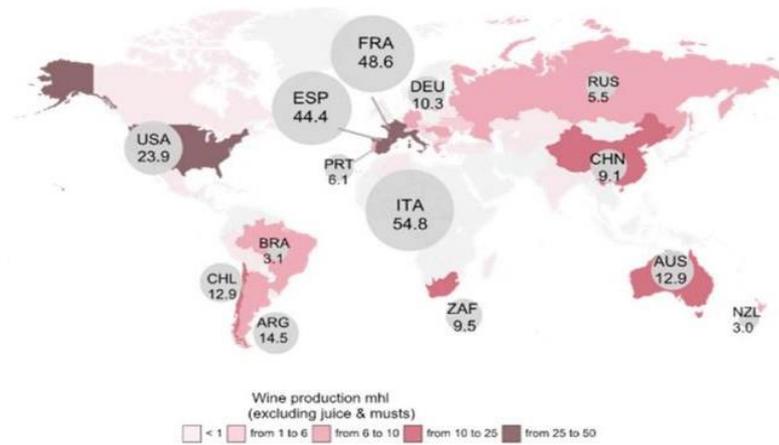


Fonte: Adaptado de [4]

Ainda assim, a produção dessas mercadorias em larga escala remetem preocupações no que diz respeito à qualidade do produto final, e os riscos associados ao seu consumo excessivo [5]. Vários aspectos refletem em suas características finais, como as condições edafoclimáticas, as quais incluem a fertilidade e geologia do solo cultivado, região geográfica como latitude, proximidade com os corpos d'água, a utilização de agrotóxicos, bem como aspectos socioculturais que podem estar relacionados com o desenvolvimento da uva, trazendo atributos distintos ao produto final [6].

Atualmente os maiores produtores de vinho a nível mundial são França, Itália, Espanha, sendo conhecidos como vinho do velho mundo, e os demais países como Chile, Austrália, Estados Unidos, África do Sul, Alemanha, Portugal, Argentina e Brasil, designados como vinho do novo mundo, ainda que contemporâneos, é notória a significância do seu processo de produção e exportação [4]. Esses dados são apresentados pelas **Figuras 2 e 3**.

**Figura 2** Maiores produtores de vinho no mundo



Fonte: Adaptado de [4]

**Figura 3** Escala de produção do vinho

	million hl	2014	2015	2016	2017	2018	2018/2017 Variation in volume	2018/2017 Variation in %
Italy	44.2	50.0	50.9	42.5	54.8	12.3	29%	
France	46.5	47.0	45.3	36.3	48.6	12.3	34%	
Spain	39.5	37.7	39.7	32.5	44.4	11.9	37%	
USA*	23.1	21.7	23.7	23.3	23.9	0.5	2%	
Argentina	15.2	13.4	9.4	11.8	14.5	2.7	23%	
Chile	9.9	12.9	10.1	9.5	12.9	3.4	36	
Australia	11.9	11.9	13.1	13.7	12.9	-0.8	-6%	
Germany	9.2	8.8	9.0	7.5	10.3	2.8	38%	
South Africa	11.5	11.2	10.5	10.8	9.5	-1.4	-12%	
China	13.5	13.3	13.2	11.6	9.1	-2.6	-22%	
Portugal	6.2	7.0	6.0	6.7	6.1	-0.7	-10%	
Russian Federation	5.1	5.6	6.6	5.8	5.5	-0.2	-4%	
Romania	3.7	3.6	3.3	4.3	5.1	0.8	18%	
Hungary	2.4	2.6	2.8	3.2	3.6	0.5	15%	
Brazil	2.6	2.7	1.3	3.6	3.1	-0.5	-13%	
New Zealand	3.2	2.3	3.1	2.9	3.0	0.2	6%	
Austria	2.0	2.3	2.0	2.5	2.8	0.3	11%	
Greece	2.8	2.5	2.5	2.6	2.2	-0.4	-15%	
Ukraine	1.5	1.1	1.1	1.9	2.0	0.1	5%	
Moldova	1.6	1.6	1.5	1.8	1.9	0.1	5%	
Switzerland	0.9	0.9	1.1	0.8	1.1	0.3	40%	
Bulgaria	0.8	1.4	1.2	1.2	1.0	-0.1	-10%	
World	270	275	270	249	292	43	17%	

Fonte: Adaptado de [4]

O controle de qualidade e harmonização desses produtos são realizados por institutos como a Organização Internacional de Vinha e do Vinho (OIV), responsáveis por regulamentar e facilitar os processos de comércio internacional, bem como o controle do que é permitido ou não no processo de produção e seus respectivos limites considerados seguros. O processo de fabricação perpassa por um protocolo de verificação e controle a fim de avaliar desde os teores de açúcar até as concentrações máximas de espécies químicas específicas permitidas [7].

No Brasil, a legislação que regulamenta as características do Vinho e seus derivados da uva são regidos pela Lei nº 7.678, de 08 de novembro de 1988, a qual é regulamentada pelo Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014 e instrução normativa do Ministério do Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA, IN nº 24, 08/09/2005 [8 -10].

A legislação de cada país vinicultor é responsável por definir as especificações da qualidade a serem seguidas. Os parâmetros de qualidade avaliados no processo são: acidez total, graduação alcoólica, pH, açúcares totais, espécies voláteis, polifenóis, densidade e cor.

É notória a importância do controle relacionado aos limites permitidos de espécies consideradas nocivas para o consumo humano. A OIV estipula limites máximos de (0,15 mg / kg) de chumbo, arsênio (0,2 mg / kg), cádmio (0,01 mg / kg), cobre (1,0 mg / kg), kg de prata) e zinco (5 mg / kg), entre outros elementos.

Diante deste cenário, a aplicação de técnicas analíticas instrumentais de alta sensibilidade é de fundamental importância no que diz respeito ao controle de qualidade do produto final, uma vez que permite determinar concentrações traços ou ultratraços dos elementos contidos na amostra, permitindo assim a detecção de elementos tóxicos em concentrações que não estejam de acordo com o considerado seguro pela legislação vigente, ou até mesmo a fim de monitorar produtos fraudulentos ou adulterados.

## 2. PROCESSO PRODUTIVO

Produto de grande versatilidade, o vinho é uma das bebidas mais apreciadas em todo mundo, resultante de sua significância comercial e, sobretudo, cultural. Desenvolvido a partir da fermentação alcóolica do mosto de uvas, partilham do mesmo processo produtivo, todavia, manifestam padrões característicos diferentes. Esses contrastes estão condicionados as castas de uva, região de cultivo, características de solo, exposição solar, entre outros fatores que refletem diretamente em sua qualidade final. Em consequência, obtém-se vinhos com impressões digitais diferentes, de maneira que apresentam variações quanto ao teor ou concentração de seus componentes [11][12].

A versatilidade da matéria-prima propicia a existência de uma variabilidade de produtos que podem ser classificados quanto à coloração, em vinhos tinto, branco, rosé; teor de açúcar, em vinhos seco, meio doce, suave; e classe, em vinhos de mesa, espumante, fino, leve, frisante, gaseificado, licoroso, composto. Embora sofram variações quanto ao teor alcóolico apresentado, de modo geral, seguem o mesmo processo produtivo [13][14].

A produção é iniciada pela colheita das uvas em vieiras. A escolha da fruta dependerá do produto final desejado, o qual impacta diretamente no estágio de maturação, haja vista a influência do amadurecimento na composição química dos frutos, sobretudo nos teores de açúcares. Essa safra é então armazenada a fim de seguir para linha de produção [11].

O estilo do vinho estará condicionado à escolha da casta de uva empregada para a produção, através da qual pode-se classificá-las ainda quanto ao tipo em brancas ou tintas. Todavia, existe um aporte econômico maior voltado para elaboração de vinhos finos, produtos estes oriundos de uvas europeias (*Vitis vinífera*), tais como a *Carbenet Sauvignon*, *Syrah*, *Suvignon Blanc*, *Riesling*, *Merlot*, etc. Estes produtos oferecem bebidas com características marcantes, decorrentes da maior complexidade aromática proveniente de suas frutas. A diferença para os vinhos comuns está associada as características organolépticas que influenciam na qualidade e textura final [15].

O próximo estágio consiste no desengaçamento, a fim de retirar alguns materiais (haste, caules, folhas) que possam afetar as características organolépticas

da produção, como a adstringência, amargor, etc. Posteriormente, seguem para prensagem. Nesse momento, ocorre o esmagamento das uvas, haja vista a necessidade de rompimento da casca para liberação de seu conteúdo, como a polpa e suco. Existe um controle estrito na prensagem para evitar a trituração concomitante das sementes. O tempo de contato do mosto com cascas e sementes terá influência na coloração final do vinho, decorrente da liberação de substâncias fenólicas [16].

Durante o processo de fermentação é comum a adição de SO<sub>2</sub>, haja vista sua ação antioxidante, antisséptica e estimulante [11]. A fermentação alcoólica do mosto acontece em subsequência pela presença natural de leveduras em uvas, e/ou adição de outras cepas, com o intuito de acelerar e aumentar o rendimento da produção. Como resultado dessas reações, tem-se a liberação de etanol e outros metabólitos essenciais para o vinho, os quais são provenientes da degradação de açúcares, sobretudo da glicose e frutose presentes em frutas [16].

Outra etapa de fermentação pode ser desencadeada, conhecida como fermentação malolática, a qual é responsável por converter o ácido málico em ácido lático, gerando em resposta um aumento de pH e redução da acidez total. Distintamente do primeiro processo fermentativo, ocorre pela inoculação de bactérias lácticas, tais como *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Todo processo de fermentação ocorre sobre rigoroso controle de temperatura [15].

Após fermentação, são necessários processos de clarificação, a fim de garantir a limpidez, e reduzir a turbidez causada pela presença de sólidos sedimentados e/ou em suspensão no produto. Normalmente são empregues etapas de filtração, ou centrifugação para posterior envasamento em adegas [16].

A etapa de amadurecimento garante a estabilização do vinho, promovendo a maturação do produto em barricas de carvalho, ou cubas inox. Esse estágio pode levar de semanas a anos, até o momento de engarrafamento final. O tempo de maturação dependerá do tipo de produto e qualidade almejada. Todavia, o período de incubação promove a incorporação do vinho, melhorando aroma, textura e palatabilidade [11].

### **3. QUÍMICA DO VINHO**

O vinho apresenta uma composição química complexa, particularmente pela diversidade de compostos abarcados, tendo a água e o etanol como constituintes majoritários. A complexidade de suas matrizes confere a singularidade de cada produto, na qual a partir destas, consegue-se realizar distinções quanto sua proveniência. Contudo, ainda que apresentem identidades diferentes, exibem essencialmente a mesma composição química como compostos voláteis, compostos fenólicos, minerais, vitaminas, e outros demais componentes presentes.

#### **3.1 ÁGUA**

Uma das substâncias essenciais para a vida, a água está presente em variadas rotas metabólicas, sobretudo no desenvolvimento de plantas. A absorção de água impacta em sua produtividade, e a consequente maturação de frutos, como o transporte de nutrientes que são fundamentais para processos bioquímicos que influenciam no desenvolvimento de seus compostos orgânicos e inorgânicos. A composição química da uva pode apresentar variações a depender de seu estágio de amadurecimento [17].

Principal constituinte do vinho, a água participa de diferentes processos, desde a dissolução de espécies à hidrólise de vários componentes, sendo essencial para o desencadeamento de várias reações durante o processamento do vinho. Apesar disso, o teor de água é variável, em razão das técnicas de extração, estilo de vinho e matéria-prima empregada, de modo que apresentam em torno de 80% do peso do produto final [18].

#### **3.2 CARBOIDRATOS**

Os açúcares são um importante grupo na composição do vinho, haja visto sua associação à produção de etanol durante a fermentação alcoólica do mosto. Dos monossacarídeos presentes, a glicose, frutose e hexose destacam-se pelo maior teor em uvas. Ainda que apareçam em mesma proporção, os dois primeiros são

responsáveis pela maior parte das reações catabólicas envolvidos na etapa de fermentação [19].

Todavia, a existência de espécies que não participam do processo fermentativo é comum. Estes são definidos como açúcares residuais e estão presentes em concentrações ainda menores, quando em comparação aos açúcares redutores, tendo como exemplos a pentose, aldopentose, ramnose, xilose, em que contribuem para a suavidade final do produto [18]. Embora a sacarose também seja um componente natural da uva, está sujeita a reações de hidrólise durante a fermentação, de modo que sua detecção está associada a processos de adulteração do vinho [20].

### **3.3 ÁLCOOIS**

Os álcoois representam cerca de 5 a 25% dos componentes dos vinhos, podendo ser classificados quanto sua volatilidade em compostos voláteis e não voláteis [11]. Dentre todos os álcoois presentes, o etanol destaca-se pela sua abundância, com um teor alcoólico em torno de 8 a 19%, consequência de seus precursores fermentativos, glicose e frutose, em que o álcool etílico é refletido como principal subproduto [21]. Apresenta um papel enológico importante, o que é atribuído a sua atuação como solvente, permitindo a extração de compostos aromáticos presentes na uva, além de seu caráter antisséptico, que contribui para a conservação do produto [18].

O metanol também pode ser formado, normalmente ocorre em concentrações inferiores, em que diferentemente do etanol, não apresenta um papel significativo na composição do vinho. Sua produção é oriunda da desmetilação de pectinas presentes em uvas pela ação de leveduras. Ainda que apresente baixas concentrações, está associado a um alto risco de toxicidade, em virtude de sua metabolização a ácido fórmico e formaldeído, os quais já são correlacionados a prejuízos no globo ocular, ou em casos mais sérios podem levar a morte [5].

Álcoois superiores são comumente detectados, também resultantes dos processos de fermentação, são presentes em concentrações pequenas. No entanto, tem um papel importante no que se refere às características organolépticas do vinho,

proporcionando agradáveis nuances aromáticas, sobretudo durante as etapas de envelhecimento do produto [18].

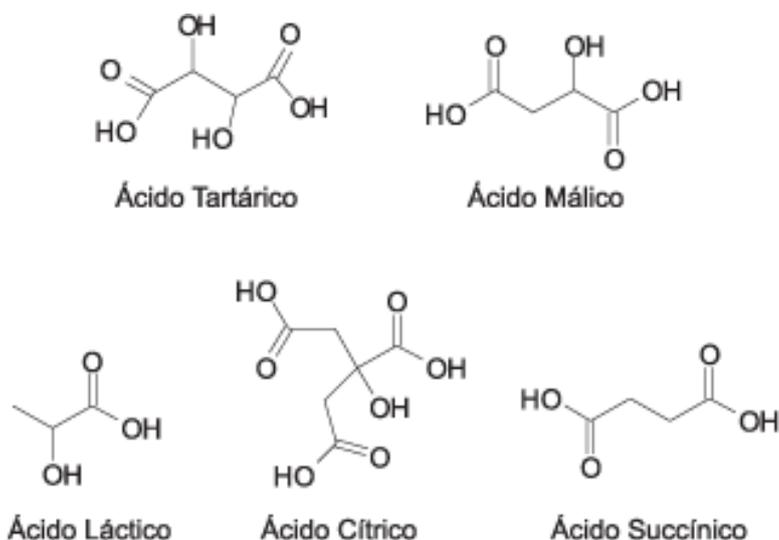
Ademais, tem-se a formação de polióis, no qual o glicerol se sobressai pela influência no sabor final do vinho, sendo encontrado na faixa de 0,5 a 1%. Oriundo da glicólise, contribui para as características sensitivas, ao que se deve a seu sabor adocicado [11].

Concentrações elevadas de sorbitol são associadas a adulterações do produto, visto que, apesar de ser empregado como conservante e identificado naturalmente em uvas, está presente em baixas quantidades. [22].

### 3.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Na composição química do vinho, os ácidos orgânicos representam aproximadamente 8% de seu total, sendo formados como subprodutos do processo de vinificação ou consequência da derivação de uvas. Classificados quanto à volatilidade em ácidos fixos ou voláteis, são caracterizados pela acidificação de vinhos [5]. Alguns destes álcoois são apresentados na **Figura 4**

*Figura 4* Ácidos orgânicos presentes no vinho



Dentre os ácidos orgânicos voláteis presentes em vinhos, encontra-se o ácido acético, ácido fórmico, ácido propiônico, ácido butírico, entre outros. Ainda assim, o ácido acético é identificado em concentrações mais altas, garantindo uma ação antisséptica. Apesar disso, pode ter sua produção decorrente de contaminações por

bactérias, como a *Acetobacter*, de modo que quantidades mais elevadas são associadas a um processo de degradação, as quais levam a alteração de características sensoriais [18]. Por conseguinte, a facilidade quanto sua detecção, permite que OIV controle os limites de ácidos voláteis em função da concentração de ácido acético, usualmente a faixa tolerada encontra-se entre 1,2 e 2,0 g/L [5].

O ácido tartárico caracteriza-se como um dos principais componentes responsáveis pela acidez fixa do vinho, sendo encarregado do controle de pH. Dentre os ácidos correspondentes, está presente em torno de 25 a 75% de seu total. Trata-se de um diácido e diálcool, que possui uma instabilidade, conhecida como instabilidade tartárica, a qual está relacionada com a baixa solubilidade de seus sais, principalmente na presença de álcool, que podem levar a sua precipitação. A solubilidade do tartarato de potássio, que já é baixa em meio aquoso, 5,6 g/L diminui significativamente em meio alcoólico, aproximadamente 3 vezes em um vinho contendo 12% de álcool a 10°C [18].

O ácido málico é outro composto de grande importância que compõe a acidez fixa. Presente naturalmente em uvas, está associado aos níveis de maturação da fruta. Embora contribua fortemente para acidez, participa ativamente dos processos de fermentação. A etapa de fermentação alcoólica induz a formação de etanol a partir de sua conversão. Todavia, a presença de bactérias pode suceder estágios de fermentação malolática, em que o ácido málico é convertido a ácido láctico, o que contribui para a suavidade final do vinho [22].

Outros ácidos podem ser encontrados como ácido cítrico e ácido succínico. O ácido cítrico também constitui a acidez fixa, embora seja encontrado em concentrações menores. Apesar de ser um constituinte intrínseco das uvas, é comum sua adição durante a produção como corretor de acidez. O ácido succínico é um dos subprodutos da ação de leveduras, em que contribui para o amargor e acidez da bebida. Ademais, podem ser obtidos outros produtos oriundos da fermentação, tal como o ácido glucônico e fórmico. Este é extremamente cáustico podendo ser reduzido a formaldeído [22].

### 3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

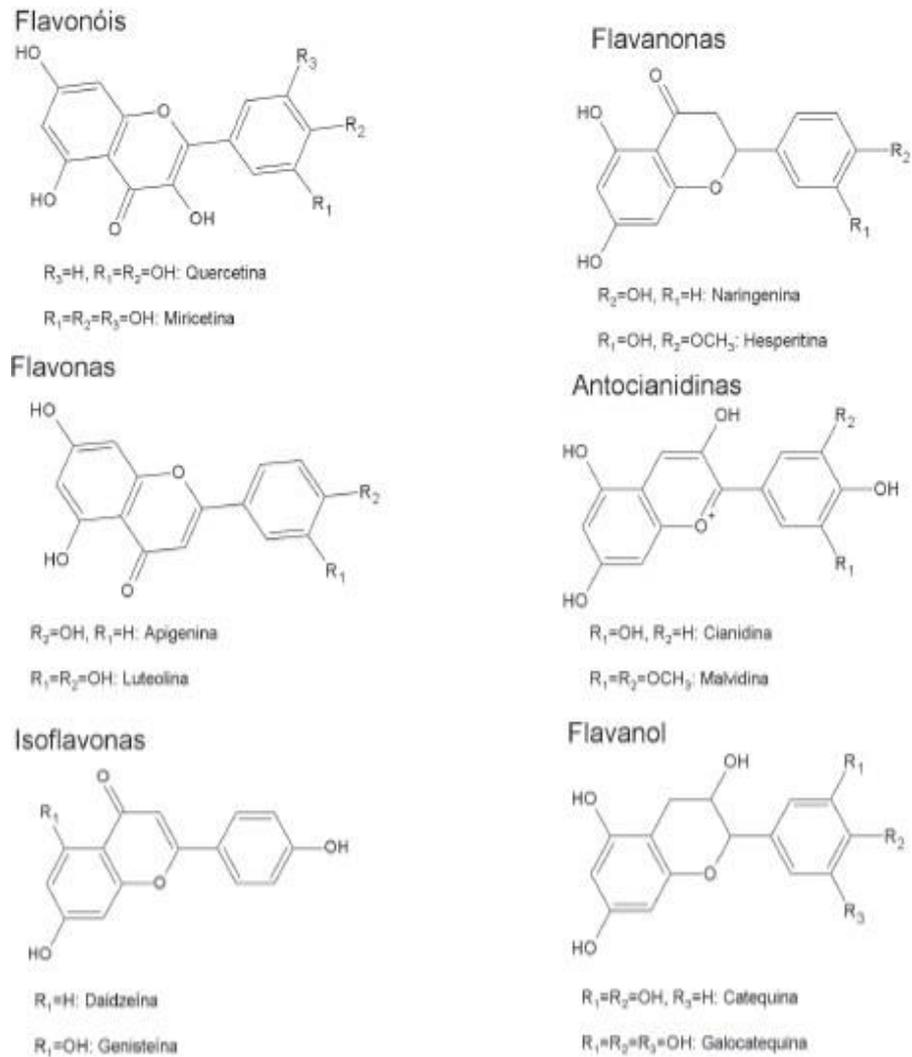
Polifenóis são metabólitos secundários de baixo peso molecular onipresentes no reino vegetal, os quais exercem diferentes funções, como proteção frente a radiação, polinização, defesa, ação antioxidante, entre outras funções como suas propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias [23][24].

As espécies fenólicas presentes no vinho contribuem em torno de 1% em sua composição. Apesar disso, são responsáveis direta ou indiretamente por sua qualidade, visto que estão associadas a características organolépticas como a coloração, adstringência e o amargor da bebida. Os compostos fenólicos são classificados em dois grandes grupos, compostos flavonoides, identificados pela presença de dois grupos fenil conectados em um anel heterocíclico, e compostos não flavonoides, constituídos por apenas um anel benzênico. No entanto, cerca de 90% dos polifenóis encontrados em vinhos, pertencem à classe do primeiro grupo respectivamente [18][25].

Compostos fenólicos, aldeídos benzílicos e ácidos cinâmicos são alguns subgrupos que compõe os compostos não flavonoides. Entre os ácidos benzóicos, tem-se um destaque para os ácidos vanílico, siríngico e salicílico, estes aparecem ligados às paredes celulares e, principalmente, o ácido gálico visto que se encontra sob a forma de éster dos flavonóis. Os ácidos fenólicos da série cinâmica encontram-se na uva combinados com o ácido tartárico na forma de monoésteres [18].

Os flavonoides podem ainda ser subdivididos em outros grupos, classificados quanto à estrutura de seus anéis fenólicos em: flavonas, flavonóis, antocianos, chalconas, auronas, flavanonas, di-hidroflavonóis, di-hidrochalconas, flavanas, isoflavonóides, neoflavonóides [24]. Alguns destes são apresentados na **Figura 5**.

**Figura 5** Estrutura de alguns flavonoides



### 3.6 COMPOSTOS NUTRICIONAIS

A composição nutricional do vinho sofre variações a depender das características de cultivo, clima e região dos frutos utilizados. No entanto, a maior parte desses produtos são perdidos quando submetidos a fermentação. Ainda assim, mesmo encontrados em níveis baixos, alguns minerais e vitaminas resistem ao processo de vinificação, são eles os oligominerais como K, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu e as vitaminas A, C, B1, B2, B6, biotina, niacina e ácido pantotênico, encontrados principalmente em níveis traços. Para determinação dessas espécies, métodos analíticos de alta sensibilidade podem ser aplicados, sendo empregados como métodos auxiliares no processo de identificação e autenticidade [5].

## 4. PREPARO DE AMOSTRAS

No desenvolvimento de um método analítico, a etapa de preparação de amostra é a mais crítica, em geral, é a fase que exige um maior tempo, estando associada a probabilidade elevada de erros sistemáticos ligados ao processo. No entanto, a evolução das técnicas analíticas tem possibilitado a determinação de espécies em níveis cada vez menores, como em  $\mu\text{g} / \text{L}$  e  $\text{pg} / \text{L}$ , o que faz com que uma maior atenção seja necessária, haja vista a possibilidade de crescimento de erros interlaboratoriais com o decaimento das concentrações, tornando o pré-tratamento um estágio essencial. Desse modo, procedimentos de preparo de amostra são empregados a fim de viabilizar a minimização de interferências provenientes da matriz durante os ensaios, permitindo determinar com confiabilidade a concentração dos elementos investigados.

A análise elementar de matrizes complexas com altos teores orgânicos, como o vinho, por exemplo, frequentemente requer etapas de solubilização e/ou decomposição total ou parcial da amostra antes da análise instrumental, a fim de eliminar possíveis interferências espectrais e/ou não espectrais, causadas por alguns componentes presentes em sua matriz, como o etanol, ácidos orgânicos, sais, etc. Todavia, os processos que envolvem a solubilização ou decomposição da amostra, pode representar a etapa mais complexa de toda análise, especialmente quando se deseja empregar técnicas espectroanalíticas.

Atualmente, a OIV é a instituição responsável pela padronização de métodos para análise de vinhos e seus derivados. À vista disso, foram encarregados pela elaboração de um compêndio internacional com métodos já bem estabelecidos e recomendados para determinação de metais em amostras de vinho. Uma das técnicas recomendadas pela organização consiste em processos de digestão ácida assistida por micro-ondas em situações que requerem a mineralização de amostras.

Ainda assim, diversas outras técnicas já são reportadas e aplicadas durante os procedimentos de preparo de amostra, tais como a utilização de sistema de digestão por refluxo utilizando banho frio, processos oxidativos avançados, amostragem por suspensão, microextração em fase sólida, microextração dispersiva, entre outras.

## **4.1 PROCEDIMENTOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO**

Nos últimos anos, a capacidade de detecção de instrumentações analíticas foi sendo aperfeiçoadas, permitindo detecções em uma ampla faixa de concentrações, o que tornou possível a identificação e quantificação de espécies em concentrações cada vez menores. Contudo, embora a sensibilidade e seletividade dessas técnicas tenham sido refinadas, as análises continuam sendo um desafio em decorrência da complexidade de algumas matrizes, que acabam por tornar inviável a aplicação direta de alguns métodos. Por consequência, algumas estratégias foram sendo adotadas a fim de eliminar ou corrigir essas possíveis interferências.

Um dos principais fatores associados a matrizes complexas decorre dos baixos níveis de concentração dos analitos ou etapas de diluição que diminuem a precisão do método. Contudo, a baixa sensibilidade de algumas técnicas acaba por tornar necessária a substituição do método proposto por algum instrumento que possua maior sensibilidade, o que pode proporcionar um custo operacional mais elevado. Outra alternativa é a realização de procedimentos que visem a extração ou pré-concentração de amostras. Sendo assim, técnicas baseadas em extração líquido-líquido ou extração em fase sólida podem ser aplicadas. Novas abordagens fundamentadas em reconhecimento biomolecular também já têm sido adotadas [26].

### **4.1.1 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA**

Recentemente, novos procedimentos analíticos de separação têm sido propostos, a partir do aprimoramento de métodos tradicionais, haja visto a necessidade de superação das desvantagens que os métodos apresentam, bem como o elevado tempo de extração, alto custo, grandes volumes de reagentes necessários, formação de resíduos de elevada toxicidade, etc [27].

A extração líquido-líquido convencional, também conhecida como extração por partição ou extração por solvente, é fundamentada em processos de transferências de massa. O procedimento ocorre mediante diferença de solubilidade entre o analito pelo diluente e solução extratora. Essa espécie, na qual se encontra dispersa no diluente é combinada à solução extratora, o que permite um contato direto entre analito e solvente, levando-o a um processo de migração para fase extratora.

Em seguida, será atingindo um equilíbrio dinâmico ocasionando na formação de duas interfaces capazes de serem visualizadas, o que possibilita a separação [28].

O método de microextração líquido-líquido dispersiva é um procedimento relativamente novo, sendo uma técnica de extração/pré-concentração por partição do analito entre duas fases líquidas imiscíveis (extrator e dispersor). Esse método é uma versão otimizada do processo convencional, mas que requer volumes menores do extrator, ocorre então uma formação quase que instantânea da emulsão, levando a uma alta recuperação do analito. Sua eficiência está relacionada com a afinidade do analito com o solvente extrator, além de outros fatores como é o caso do pH, que facilita a formação de espécies desejadas, assim como evita reações paralelas indesejadas que possam afetar o processo [29][30].

Martínez et al. (2018) [29] relata um novo método com uso de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para determinação de Pb e Cd em amostras de vinho. Os resultados demonstram que, sob condições experimentais ótimas da DLLME, a determinação exata de Pb pode ser facilmente realizada utilizando calibração externa. Em contrapartida, houve a necessidade de aplicação de uma estratégia alternativa para análise do Cd, uma vez que a alta concentração de zinco afeta diretamente a quantificação da espécie. O método proposto apresentou limites de detecção 0.01 e 0.08  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cd e Pb, respectivamente, resultado este dez vezes melhores que os métodos convencionais de extração, para análise por ETAAS.

Escudero et al. (2013) [30] propôs um método eficiente de pré-concentração de espécies de arsênio baseado em técnica de microextração dispersiva de líquido iônico implementada em um sistema de análise de fluxo. Esse procedimento apresentou alta seletividade para especiação de arsênio, a partir do qual, em condições otimizadas, obteve um fator de enriquecimento de 46 vezes utilizando apenas 4 mL de amostra. O método desenvolvido demonstrou vantagens como a alta sensibilidade e baixo custo, tendo como benefícios os baixos limites de detecção (5 ng / L). Além disso, a retenção e separação on-line da fase enriquecida de IL aumenta a velocidade de pré-concentração e análise, reduzindo o consumo de amostras e os riscos de contaminação.

#### 4.1.2 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – EFS

Outra alternativa interessante quando se deseja aplicar um método de pré-concentração e separação de um analito em amostras, é a aplicação de técnicas de sorção. Métodos que envolvam adsorção ganham destaque em decorrência da variabilidade de sistemas adsorventes possíveis de serem aplicados. Esses fenômenos também se baseiam em processos de transferência de massas, o qual ocorre entre o material adsorativo e a solução que contém a espécie de interesse, na qual pode estar dissolvida ou em suspensão [26][31].

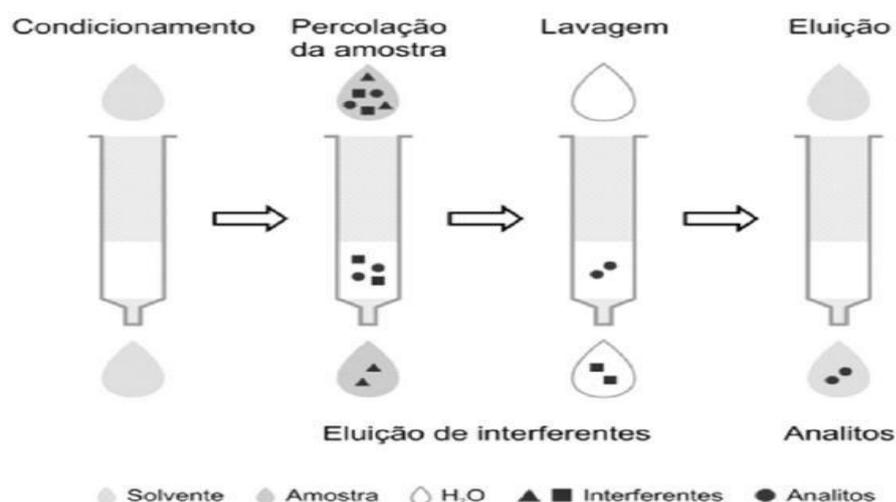
A cinética de adsorção rápida, seletividade, alta estabilidade, e a capacidade de execução de processos de eluição, tornam o método de extração em fase sólida uma técnica popular. Essa interação entre sorvente e analito, ocorre mediante interações em sítios ativos do material, sejam por fisissorção ou quimissorção, que levam a retenção dos compostos avaliados, permitindo sua remoção após eluição. Essa metodologia vem sendo aplicada quando a concentração do analito se encontra abaixo dos limites de quantificação da técnica analítica e/ou devido à complexidade da matriz [31][32].

Quando comparada a técnica de extração líquido-líquido, a metodologia por EFS apresenta algumas vantagens que favorecem a sua aplicação, como a possibilidade de regeneração da fase extratora, maior fator de enriquecimento, baixo custo, ausência de emulsão, fácil automação, rapidez e menor consumo de reagentes [31].

O princípio da técnica é semelhante ao método de extração em fase líquida (LLE), todavia fundamenta-se no particionamento entre duas fases: uma parte líquida (amostra/matriz) e outra sólida (sorvente). De maneira simplificada, o processo pode ser dividido em quatro estágios. O primeiro momento corresponde ao condicionamento do material extrator com o solvente, a fim de garantir a retenção das espécies investigadas. Posteriormente, sucede-se a passagem de toda amostra por uma coluna, onde o material adsorvente está fixado, com uma taxa de fluxo suficiente que garanta a retenção dos analitos alvos pelo sorvente. Em seguida, é realizada a primeira lavagem do material, de modo que possam ser removidos possíveis componentes da matriz que foram aprisionados. Por fim, o material extrator será

utilizado para processos de eluição [31]. A **Figura 6** esquematiza as etapas envolvidas no procedimento de SPE.

**Figura 6** *Etapas envolvidas no procedimento SPE*



Fonte: Adaptado de [124]

Diversos fatores devem ser considerados ao se realizar um estudo por SPE, são eles: a natureza do solvente, a qual depende do tipo de material que será utilizado no estudo, o pH, a vazão do processo tanto de concentração, como no processo de eluição, o volume do eluente para se obter boa recuperação. Todos esses parâmetros não devem ser desconsiderados do processo de análise [33].

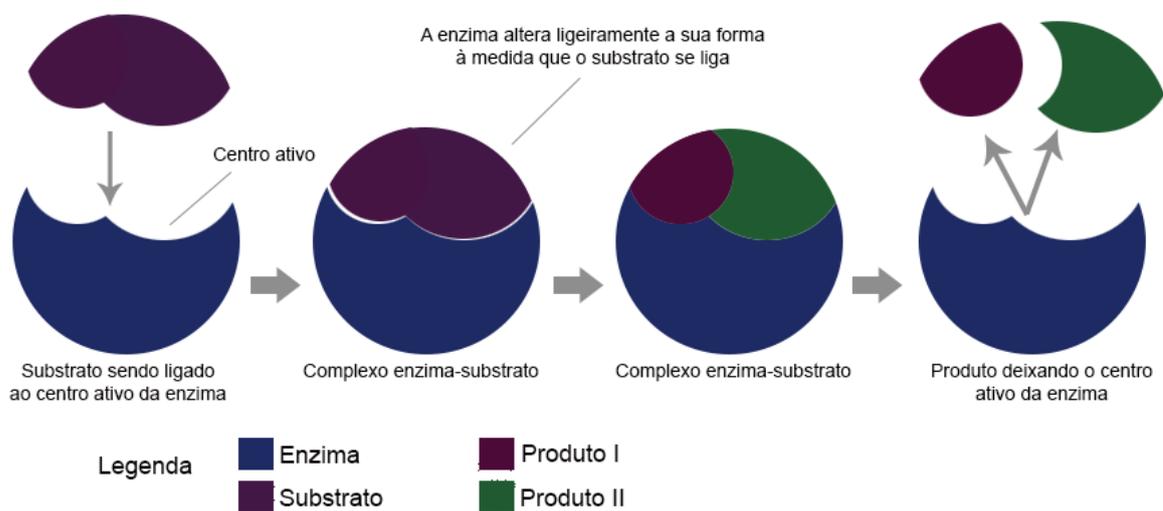
#### 4.1.3 POLÍMERO MOLERCULAMENTE IMPRESSO (MIP)

Processos biomiméticos encontram-se em crescente alta no campo de pesquisa, estando presentes nas mais diversas áreas da ciência. Essas novas abordagens, tem proporcionado a elaboração de materiais que simulam artificialmente os mesmos processos biológicos, já sendo vistos com frequência na Química Analítica. Por consequência, existe um interesse notório no desenvolvimento de estruturas com alta capacidade de seletividade baseadas em reconhecimento

molecular, de modo que respondam a uma série de parâmetros, como alta área superficial, biocompatibilidade e estabilidade. Essas tecnologias têm como vantagens uma simples operação, fácil manuseio, menor custo operacional e alta eficiência, permitindo o desenvolvimento de metodologias mais precisas e eficientes [34][35].

A técnica MIP é uma variação do método de extração em fase sólida que apresenta uma seletividade elevada. Esses materiais são desenvolvidos de modo que, proporcionem um reconhecimento aprimorado com alvos específicos. O procedimento baseia-se em sítios receptores do sorvente altamente seletivo, utilizados em processos de enriquecimento de elementos que estão presentes em baixas concentrações (traços e ultratraços) e consequente separação de outras espécies coexistentes em uma matriz. Os polímeros com íons impressos são então empregues de modo a permitir a extração, detecção para posterior quantificação das espécies de interesse [33][36]. A **Figura 7** esquematiza o processo de reconhecimento seletivo por uma molécula alvo.

**Figura 7** Reconhecimento biomolecular



Fonte: Adaptado de [39]

Os primeiros IIPs foram introduzidos por Nishidi em trabalhos datados de 1976 e 1977. Esses estudos foram caracterizados pela síntese de um material sorvente visando a extração de vários cátions metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ) através do emprego de 4-vinilpiridina como polímero ligante e 1,4-dibromobutano como reticulador. Resultados evidenciaram a estabilidade e seletividade do polímero

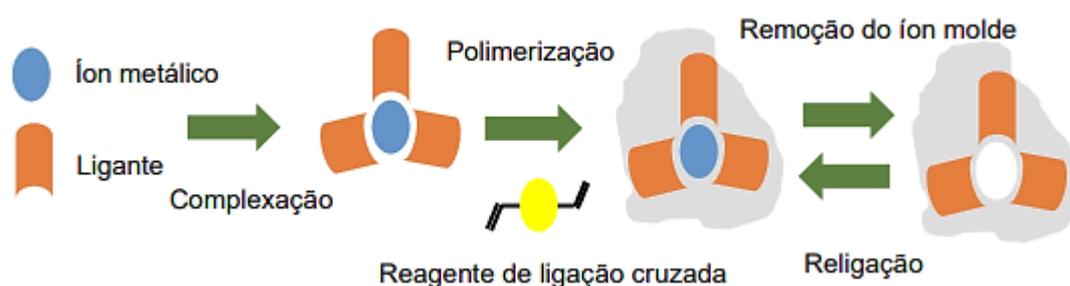
formado mesmo após vários ciclos de reação: a influência do pH no equilíbrio de adsorção também foram observadas [37][38].

De modo geral, podemos dividir esse processo de síntese em três etapas:

- i. Complexação entre ligante (monômero) e alvo específico (íon metálico);
- ii. Formação de cadeias poliméricas através da adição de agente reticulante;
- iii. Remoção da espécie molde.

Todo processo de preparação do material é apresentado na **Figura 8**.

*Figura 8* Etapas da síntese de IIP



Fonte: Adaptado de [39]

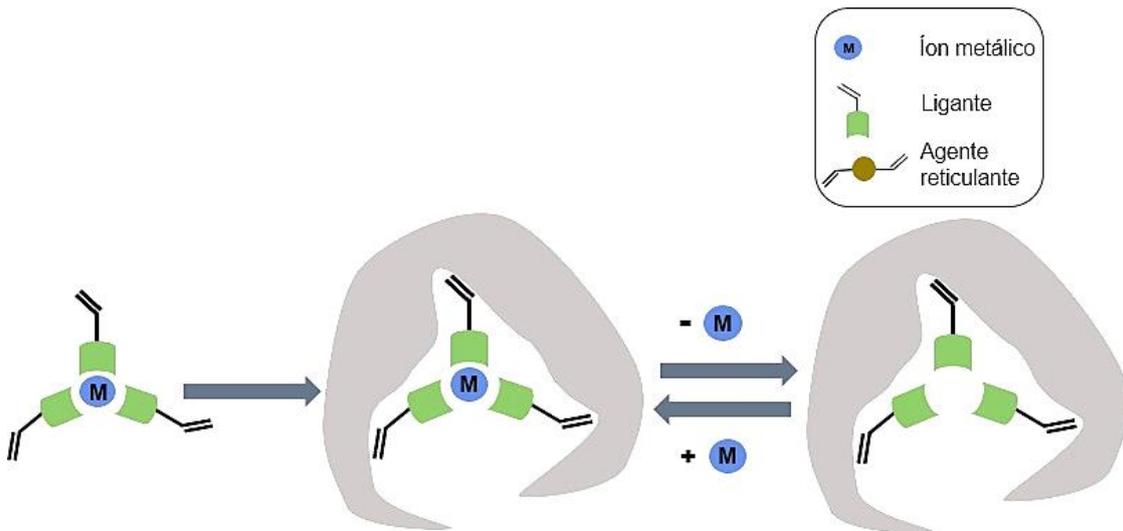
Conseqüentemente, são formadas estruturas de memória que permitem a adsorção de espécies que apresentem características específicas para o alvo, como formato, tamanho, carga, etc. Tais condições conferem um alto grau de seletividade e especificidade para o material [39].

Ainda que apresente simplicidade de elaboração, diferentes mecanismos de impressão molecular já são descritos.

A imobilização química processa-se pela fixação do monômero (ligante) a matriz polimérica após procedimentos de complexação entre íons metálicos e a espécie ligante (este deve apresentar algum grupo funcional com capacidade de polimerização), a reticulação ocorre então na presença de um agente de ligação cruzada. Normalmente, são preferíveis ligantes que apresentem grupos vinila. Todavia, não é um processo muito favorável, em decorrência da restrição quanto a

acessibilidade às cavidades formadas, possibilitando em uma limitação durante os processos de adsorção [39]. A **Figura 9** esquematiza o processo de síntese por imobilização química.

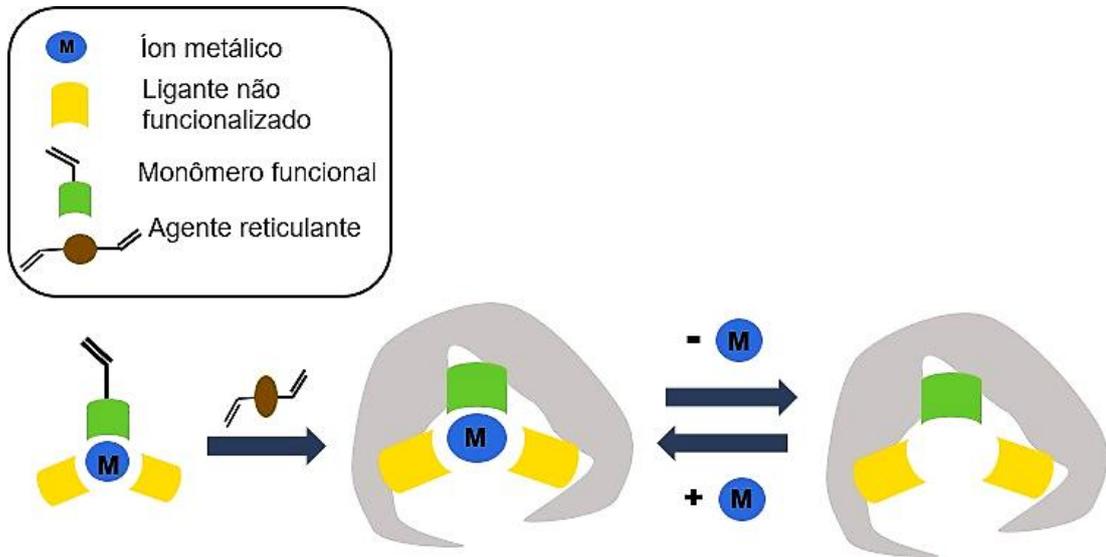
*Figura 9 Síntese por imobilização química*



Fonte: Adaptado de [39]

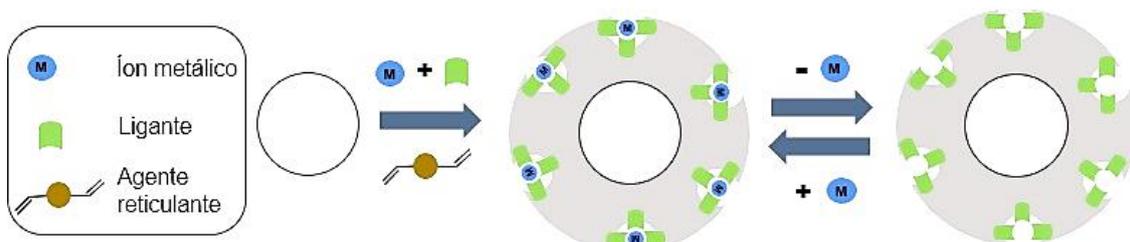
Outra abordagem é a síntese por aprisionamento. Esse método consiste no aprisionamento dos ligantes na matriz polimérica através de ligações químicas. O sistema é montado pela adição de um agente vinilado, com capacidade de interação entre a espécie alvo e a rede polimérica, e outro agente complexante não funcionalizado com afinidade específica para o alvo: De modo que são retidos na matriz polimérica após reticulação [40]. Esse processo é esquematizado pela **Figura 10**.

**Figura 10** Síntese por aprisionamento



A impressão de superfície é outra técnica de polimerização viabilizada em uma interface aquosa/orgânica. Esse método é proposto pela junção entre ligante (monômero funcional) que deve apresentar afinidade em ambos os meios, estabilizador de emulsão, co-monômero e alvo específico. O monômero funcional é complexado ao alvo na superfície da emulsão, onde será desencadeada a reticulação. Após a polimerização, faz-se a retirada do molde, permitindo a revelação das cavidades de reconhecimento. A vantagem desse processo em relação as demais, deve-se a acessibilidade dos locais de ligação que se encontram próximos a superfície, favorecendo a cinética de ligação do material adsorvente [40]. Esse método é ilustrado pela **Figura 11**.

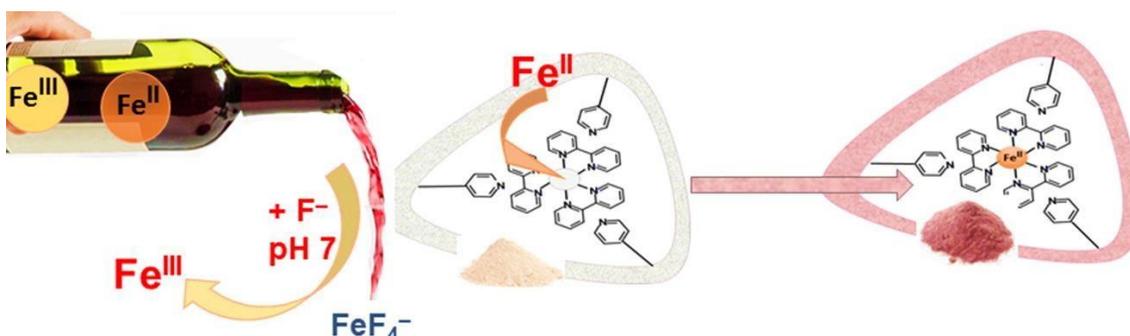
**Figura 11** Síntese por impressão de superfície



Dessa forma, os benefícios oferecidos pelos MIPs conferem a eles alta aplicabilidade em relação a matérias convencionais, permitindo a remoção de compostos variados, haja vista as características intrínsecas apresentadas como boa estabilidade, especificidade, seletividade, durabilidade, capacidade de reutilização e robustez [39][41].

Mitreva et al. (2017) [42] propuseram um método para determinação de  $\text{Fe}^{3+}$  e ferro total em amostras de vinho empregando polímero impresso. Copolimerização de precipitação reticulada utilizada foi 4 – vinilpiridina (monômero funcional), Trimetilolpropano trimetacrilato (agente reticulante). Os experimentos de otimização mostraram sorção quantitativa de ambos  $\text{Fe}(\text{II})$  e  $\text{Fe}(\text{III})$  na superfície do MIP a pH 7 em comparação com outros metais coexistentes na matriz, no entanto a sorção seletiva de apenas  $\text{Fe}(\text{II})$  pode ser alcançada na presença de íons fluoreto como agente de mascaramento para  $\text{Fe}(\text{III})$ . O procedimento analítico desenvolvido permite a determinação de ferro (III) e  $\text{Fe}(\text{II}) + \text{Fe}(\text{III})$  em amostras de vinho empregando FAAS, com os respectivos limites de quantificação de detecção  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ . Esse modelo pode ser visto pela representação esquemática da **Figura 12**.

*Figura 12* Representação esquemática do método proposto por Mitreva et al. (2017)



## 4.2 MÉTODOS DE DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS

### 4.2.1 PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO (POA)

O processo de decomposição da amostra se faz presente pela necessidade de eliminação de interferentes que possam vir a afetar a quantificação de uma

determinada espécie quando empregada uma técnica analítica. A mineralização por fotoconversão apresenta como vantagens o emprego de condições amenas: estas ocorrem sob condições de pressão e temperatura ambientes quando comparadas aos métodos tradicionais de decomposição, conseqüentemente são minimizadas as possíveis perdas do analito por volatilização. Ademais, faz-se necessário um menor consumo de reagentes, diminuindo assim o risco de contaminação da amostra e menor geração de resíduos, o que contribui para um processo mais verde [43].

O primeiro estudo empregando a radiação ultravioleta objetivava a avaliação da decomposição de carbono residual em água do mar, trabalho este datado de 1961. Neste estudo, o Fe (III) foi empregado para geração de radicais oxidantes. A radiação ultravioleta promove um processo de oxidação ou redução de uma espécie química. A foto-oxidação é mais comum para processos de tratamento de decomposição de espécies orgânicas, para sua forma inorgânica livre. Em contrapartida, processos de fotorredução são favorecidos quando espécies orgânicas que apresentam grupo carbonila ou amino são adicionados ao meio. Apesar de sua potencialidade, esse processo é pouco explorado para fins analíticos [44].

O processo de foto-oxidação tem como intermediários da reação, radicais hidroxila, que são gerados fotoliticamente. Estes irão promover a decomposição dos compostos alvos a fim de alcançar mineralização completa das amostras. Uma das grandes vantagens do método deve-se as características das espécies oxidativas, as quais por não apresentarem seletividade e possuem alto poder oxidante conseguem atuar sobre os mais variados compostos, incluindo aqueles mais recalcitrantes [44][45].

Ainda que apresente grande aplicabilidade, a mineralização única por foto-oxidação UV apresenta limitações em amostras de maior complexidade, em decorrência do alto conteúdo orgânico: De maneira que são necessárias um maior período de irradiação e/ou a adição de grandes volumes de reagentes que venham a potencializar essa degradação. Essa mineralização pode ser acompanhada de substâncias que auxiliem o processo de oxidação a fim de acelerar a formação de radicais, tais como:  $H_2O_2$ ,  $O_3$  e  $K_2S_2O_8$ . Um oxidante adequado nesse processo é o peróxido de hidrogênio, que tem como produto formado  $O_2$  e  $H_2O$ , minimizando interferências. No entanto, a baixa absorvidade do peróxido no comprimento de onda de 254 nm (lâmpada de Hg), dificulta sua implementação [44][46].

Buldini et al. (1999) [47] propuseram um método de preparo de amostra por digestão oxidativa com radiação UV através do emprego de lâmpada de Hg de alta pressão para determinação de metais e de transição em amostras de vinho. A adição de peróxido de hidrogênio mostrou reduzir o tempo de fotólise. Foi necessário o ajuste do pH para evitar perdas de metais por hidrólise e precipitação, permanecendo em sua forma iônica solúvel. O procedimento de digestão revelou-se adequado para determinação de baixas concentrações de cádmio (II), cobalto (II), cobre (II), ferro (III), chumbo (II), níquel (II) e zinco (II). O método exibiu superioridade em comparação com outras técnicas de pré-tratamento pela simplicidade de operação, além da minimização de contaminações externas pela necessidade de volumes reduzidos de reagentes.

Dos Santos et. al. (2009) [44] propuseram um método de preparação de amostra por foto-oxidação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para determinação de ferro e manganês em amostras de vinho. As condições experimentais foram otimizadas através da investigação da influência de pH, solução tampão, peróxido de hidrogênio e tempo de irradiação. O estudo compara os resultados obtidos pelo método proposto com o método de digestão convencional, a qual já é uma técnica bem estabelecida. Esse trabalho relata que não foram encontradas diferenças significativas entre dois métodos, baseando-se no teste T-pareado.

Ferreira et al. [48] propuseram um sistema de digestão em linha fechado para decomposição de vinho usando peróxido de hidrogênio a 70% e radiação UV. Embora diversos trabalhos apresentem a combinação de lâmpada UV com peróxido de hidrogênio no processo de decomposição, esse trabalho chama atenção para a concentração de peróxido utilizada, sendo recentemente sintetizado e aplicado em estudos em Química Analítica. O estudo mostrou ser satisfatório no processo de decomposição da amostra, sendo evidenciado pela avaliação de carbono residual antes e após aplicação do método. Os testes de adição e recuperação confirmaram a exatidão do método.

#### **4.2.2 DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA**

Muitas técnicas analíticas visando a determinação elementar requerem etapas de pré-tratamento, de modo que eliminem a matéria orgânica presente e/ou

liberem íons metálicos que se encontram complexados com outras espécies orgânicas ou inorgânicas coexistentes em uma matriz. Um dos métodos amplamente adotados é a decomposição por via úmida, também conhecida como digestão ou decomposição oxidativa. Este método, emprega o tratamento de matrizes mediante adição de ácidos inorgânicos em aquecimento, levando a decomposição dos componentes da matriz [49][50].

Embora seja a técnica mais utilizada durante análises químicas, existem alguns cuidados que devem ser considerados, como o risco de contaminação elevado pela adição de grandes volumes de reagentes, e consequente formação de resíduos de elevada toxicidade, além da restrição quanto ao tipo de amostra a fim de evitar perdas de elementos voláteis. Algumas limitações podem ser corrigidas pelo emprego de sistemas fechados, os quais restringem o volume de ácidos necessários, permitem a análise de espécies voláteis. No entanto, é imprescindível uma maior atenção, em decorrência da necessidade de um controle rigoroso dos processos ao que se devem as reações violentas sucedidas [50].

O ácido oxidante mais frequentemente empregado neste processo é o ácido nítrico, ao que se deve ao seu poder oxidante moderado, sua relativa pureza e seus produtos resultantes do processo de decomposição, sendo estes nitratos solúveis. No entanto, outros ácidos também podem ser empregues individualmente ou associados, tais como:  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HNO}_3/\text{HCl}$ . A adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  melhora a eficiência do ácido nítrico em vaso aberto por possibilitar o uso de temperaturas mais elevadas, uma vez que o PE do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  é maior que o do  $\text{HNO}_3$ . Outra mistura comumente empregada é o  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ , tendo o peróxido de hidrogênio como um oxidante auxiliar, aumentando dessa maneira a eficiência do processo. A escolha do reagente deve levar em consideração a composição da amostra [49][50][51].

As reações de decomposição podem ocorrer em sistemas abertos, onde, além do emprego de ácidos oxidantes, é necessário o emprego de blocos digestores. As principais vantagens da digestão nesse sistema consistem em sua aplicação a todos os tipos de amostras, exceto aquelas que contêm compostos refratários, outro benefício deve-se a flexibilidade quanto à massa da amostra a ser utilizada, bem como a segurança. Todavia, suas limitações também devem ser consideradas, como a restrição da temperatura ao ponto de ebulição dos reagentes, o que pode diminuir a

eficiência da digestão, riscos de contaminação pelo ar, perdas de elementos por volatilidade, etc [49].

Outra alternativa é a digestão de amostras em sistemas fechados usando alta pressão. Atualmente tem-se a digestão assistida por micro-ondas como técnica mais amplamente empregada, a qual permite aplicação das mais variadas amostras. A vantagem desse método deve-se a alta pressão e temperatura alcançada, minimização da contaminação, decorrente da restrição do contato com ar atmosférico e volumes de reagentes, e o tempo reduzido de reação essas condições favorecem o processo da digestão. Em contrapartida, a quantidade amostral limita-se a 0,5 g, visto que todo processo ocorre em ambiente fechado, estando sujeito a possíveis riscos de explosão em razão da formação de gases como subprodutos da decomposição realizada. Essas reações ocorrem então em sistemas pressurizados, onde a escolha do tipo de bomba de alta pressão, irá depender da amostra que será utilizada. [51].

## **5. TÉCNICAS ANALÍTICAS**

Muitas técnicas analíticas têm sido desenvolvidas e aplicadas, visando a determinação da composição elementar em amostras de bebidas. Tendo como exemplo, as técnicas espectrométricas são amplamente difundidas, na qual destacam-se algumas com grande utilização, como a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplada (ICP-MS) e técnicas de geração de compostos voláteis (HG- AAS, HG-AFS e CV-AAS) [21].

Todas as técnicas descritas conseguem determinar com confiabilidade, metais presentes em níveis de concentração que variam de mg/L a  $\mu\text{g/L}$ . Essas análises permitem a determinação de metais em amostras de bebidas, tais quais, cerveja e vinho, de maneira que são frequentemente empregadas com o intuito de monitorar possíveis contaminações, determinar limites legais para fins de exportação, confirmar autenticidade e avaliar a composição mineral, haja visto sua influência no sabor e qualidade do produto final [52].

### **5.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica vastamente aplicada nas ciências analíticas, com boa sensibilidade, é empregada para determinação de metais em diferentes matrizes [53][54].

Baseia-se na formação de átomos gasosos em estado livre, que são gerados a partir de processos de atomização. O fenômeno de absorção atômica permite a excitação dessas espécies, através da absorção de comprimentos de onda específicos emitido sobre eles. Desse modo, é feita a mensuração da quantidade de energia absorvida, que em resposta produzirá algum sinal analítico. Esses sinais são utilizados para determinação da concentração das espécies de interesse [53][54].

A AAS é segmentada em várias técnicas, que apresentam instrumentação similar, mas com devidas particularidades. Estas podem divergir quanto a fonte de radiação empregada, método de atomização, forma de introdução da amostra, etc. De modo geral, são constituídas por uma fonte de linhas, atomizador, monocromador e

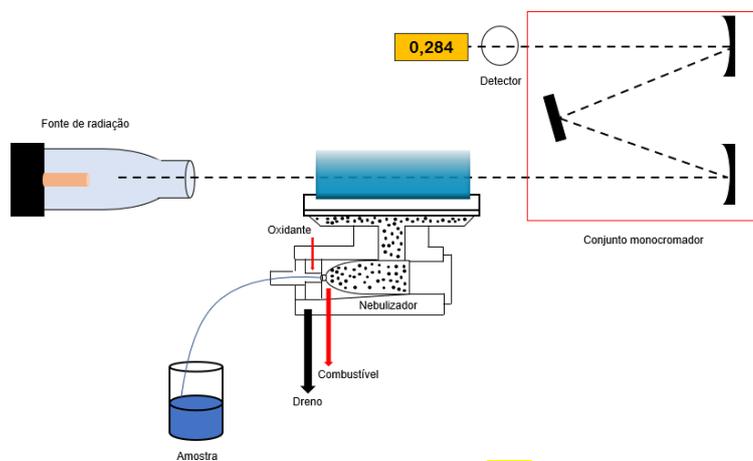
detector. Dentre as técnicas de absorção atômica, a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) e espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) possuem grande aplicabilidade [55][56].

### 5.1.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

A determinação dos principais elementos em amostras de vinho pode ser feita facilmente aplicando a técnica de chama após decomposição de amostra. Uma das grandes vantagens associadas, é o seu baixo custo e relativa sensibilidade para uma grande variabilidade de elementos. Esse método já bem estabelecido para análise de metais em diferentes matrizes e é uma das técnicas analíticas reconhecidas pelos órgãos que normatizam as análises elementares em vinho como a OIV e União Europeia [57].

Nessa técnica o procedimento baseia-se na aspiração da amostra, geralmente em solução, para o interior de um nebulizador pneumático, o qual responde pela formação de um aerossol fino, resultante da redução da amostra a pequenas gotículas. O líquido disperso entrará em contato com mistura de oxidante e combustível, sendo arrastado até um queimador, que conduzirá as etapas de atomização. Durante o percurso, a névoa é fragmentada a níveis menores, decorrente de choques em esferas de impacto. Ao chegar na câmara de pulverização, as gotículas podem entrar em contato com a chama, onde sofrem processos de dessolvatação, volatilização e atomização [58][59]. A **Figura 13** esquematiza a instrumentação de um espectrômetro de absorção atômica com chama.

**Figura 13** Representação esquemática do Espectrômetro de absorção atômica com chama



Fonte: Adaptado de [124]

A alta temperatura da chama permite a formação de átomos em estado livre, estando estes disponíveis para captação da radiação (com comprimentos de onda específicos) incidente. A quantificação das espécies de interesse pode ser então determinada por medidas dessa absorção. No entanto, ainda é comum a existência de interferências espectrais ou não espectrais durante as análises. Para superar essas limitações existe a necessidade de correção de fundo e/ou adição de agentes que melhorem a capacidade térmica dos analitos [58].

A F AAS geralmente é empregada para determinação de metais alcalinos e alcalinos terrosos em amostras de vinho. Todavia, à complexidade de sua matriz e altas concentrações de determinadas espécies, como o potássio, faz com que a quantificação de alguns elementos possa ser comprometida. Embora sua composição elementar sofra variações, a depender da localidade de sua matéria prima e/ou de processos produtivos empregados durante sua fabricação, a concentração de potássio nesses produtos é geralmente elevada, o que se torna um fator relevante para determinação de metais alcalinos, haja visto a supressão do processo de ionização desses metais [60].

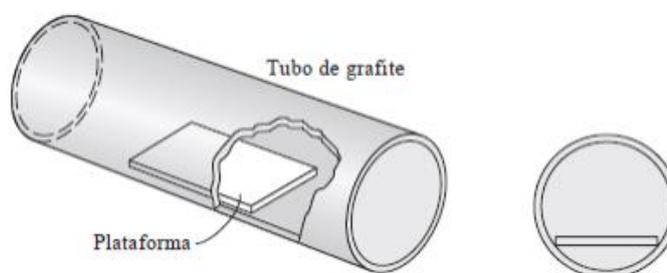
A concentração elevada de fosfato em matrizes de vinho, quando submetidos a processos de atomização por chama, podem gerar espécies refratárias com elementos como Ba, Mg, Sr, Al e Ca, o que leva a uma diminuição do sinal de absorvância dessas espécies. Por consequência, é necessária a utilização de agentes liberadores a fim de minimizar possíveis interferências [61].

A precisão de análises por FAAS em amostras de vinho são geralmente boas, sendo em média  $< 1\%$ , para todos os elementos, considerando níveis de concentração em mg/L., no entanto, para amostras nas quais o analito se encontra em concentrações traço ou ultra traço, os procedimentos de pré-concentração são imprescindíveis [21].

### 5.1.2 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA

O conceito de atomização eletrotérmica surge por volta de 1961, trazido por B. V. L'vov, contribuiu de maneira significativa para as análises químicas, de modo que é empregado até os dias de hoje. A atomização da amostra acontece sob um eletrodo de suporte, com revestimento pirolítico: onde é aquecido eletricamente [62], de maneira que viabiliza um maior tempo de residência do analito no caminho ótico do tubo de grafite levando-o a um aumento significativo na sensibilidade, na casa de 2 a 3 ordens de grandeza melhores que a FAAS, o que possibilita determinação em concentrações na ordem de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{ng.L}^{-1}$  [63]. A **Figura 14** ilustra o atomizador eletrotérmico.

*Figura 14* Atomizador eletrotérmico com revestimento pirolítico



Fonte: Adaptado de [124]

A ETAAS ocupa uma posição de destaque, dentre as técnicas espectroanalíticas. Tal condição está associada à elevada sensibilidade, seletividade, e a pequena quantidade de amostra requerida para realização das análises. Uma das grandes vantagens da técnica deve-se a possibilidade de tratamento térmico

específico para cada espécie, obtido através de processos de Otimização do programa de aquecimento do forno de grafite, o que promove uma decomposição controlada da amostra, possibilitando a introdução de amostras na forma sólida, líquida ou em suspensões [64].

Todavia, a determinação de metais por técnica eletrotérmica pode vir a ter sua reprodutibilidade comprometida, quando realizada análises em amostras não tratadas. O vinho, por exemplo, é uma amostra de grande complexidade, o que se deve principalmente a presença de etanol em sua matriz. De modo que a influência da matriz torna a análise direta um processo mais laborioso, para o qual a pirólise incompleta da matéria orgânica acaba produzindo fumos e acúmulo de resíduos carbonáceo após várias queimas dos tubos de grafite. Por consequência, as análises por ETAAS podem ser afetadas através da alta absorção de fundo produzida [63].

A necessidade de redução de interferências implica em etapas de otimização para ajuste das condições ótimas. O controle de temperaturas do atomizador eletrotérmico é realizado considerando as etapas sequenciais de análise, com um aquecimento progressivo, em que a atomização destaca-se pela criticidade, haja visto seu papel na sensibilidade da técnica. Ademais, condições Forno Plataforma com Temperatura Estabilizada (STPF) já são adotadas como estratégia, o que permite aumento de sensibilidade e precisão [62].

A absorção de fundo também pode ser mitigada através do emprego de modificadores químicos. Esses agentes possuem a capacidade de aumentar a capacidade térmica ou a volatilidade de concomitantes da matriz presentes em uma amostra. A principal função dessas espécies é diminuir ou eliminar possíveis interferências químicas provocadas pela matriz ou concomitantes delas, o que permite um aumento sensível da temperatura de pirólise, garantindo uma atomização completa do analito [29].

Martínez et al. [29] (2018) propuseram um método para determinação de cádmio e chumbo em amostras de vinho empregando microextração líquido-líquido dispersiva acoplada a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. Os autores utilizaram Pd como modificador químico, no intuito de minimizar o efeito de fundo estruturado, que pode vir a existir com a utilização de outros modificadores. Sob condições ótimas, os LD obtidos para Cd e Pb foram

menores que os anteriormente relatados na literatura em ET AAS usando estratégias convencionais de preparação de amostra, isto é, diluição, digestão e análise direta.

Dessuy et al. (2008) [65] investigaram a aplicação de diversos modificadores químicos para determinação de chumbo em vinhos por ETAAS, a fim de permitir análise direta. A utilização de Pd com adição de ácido ascórbico ou ácido cítrico para determinação de Pb propostas no estudo, não afetou significativamente o sinal de fundo e nem a determinação do sinal de Pb nas amostras. O efeito da influência não significativa dos ácidos orgânicos avaliados é comprovado mediante resultados do planejamento fatorial empregando.

Mollo et al. (2017) [66] propuseram um método para determinação de zinco em amostras de vinho por injeção direta em atomizador eletrotérmico (ETAAS). O método proposto foi comparado com a técnica FAAS, método convencional e aceito internacionalmente. As amostras foram introduzidas no forno de grafite sem etapas de preparação, e a determinação foi realizada pelo método de adição padrão. O limite de quantificação obtido foi de 0,10 mg L<sup>-1</sup>, a linearidade foi confirmada na faixa de 0,10 a 10 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados quando comparados com o método de referência OIV, evidenciaram uma concordância em torno de 10%.

## **5.2 TÉCNICAS COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE**

Outras formas de atomização, sucedem-se pela aplicação de fontes de plasma. Por definição, tem-se o plasma como um gás altamente energizado e detentor de quantidades significativas de íons e elétrons, responsáveis pela sustentação de elevadas temperaturas que garantem a atomização da amostra. Ao longo dos anos, várias fontes de íons foram desenvolvidas, todavia a limitação de alguns aparelhos causadas por interferências ou instabilidades do plasma, como em instrumentos baseados em energia de corrente contínua ou geradores de frequência de micro-ondas, fizeram com que novas fontes fossem introduzidas. Por consequência, o plasma acoplado indutivamente (ICP) ainda é um dos métodos mais empregados até hoje [67][68].

O princípio da técnica baseia-se em um fluxo de gás inerte, comumente empregado pelo argônio, através de uma bobina de indução que está associada à

produção de um campo eletromagnético. A ionização do gás é induzida pelo contato com a bobina de Tesla, o que faz com que o plasma seja gerado. A introdução da amostra ocorre mediante aspiração por nebulizador, onde em contato com o plasma sofre processos de dessolvatação, dissociação, atomização e excitação: De maneira que os espectros de emissão possam ser medidos, uma vez que a absorção de energia promoverá a excitação do átomo a um nível energético mais alto, seguida por processos de relaxamento e emissão com comprimento de onda característico. Essa relação é utilizada para identificação da concentração do analito presente na amostra [69].

Dentre os métodos espectrométricos multielementares bem estabelecidos comercialmente, as técnicas de ICP-OES e ICP-MS se destacam pela sua versatilidade e capacidade de detecção. O plasma é um gás altamente energizado e eletricamente neutro, sendo que a alta temperatura produzida por essa fonte permite a determinação com alta sensibilidade de elementos que normalmente são muito difíceis de serem analisados por outras técnicas, tais como elementos refratários e terras raras. Teoricamente, todos os elementos que existem na tabela periódica são possíveis de serem analisados, entretanto, existem limitações para utilização da técnica ICP, que decorrem das suas propriedades físicas e espectrais, são eles: os elementos artificialmente produzidos, oxigênio e gases inertes [70].

Selih et al. (2014) [71] utilizaram a técnica de plasma indutivamente acoplado para determinação da composição multielementar em 272 tipos de vinho eslovenos, com intuito de realizar uma avaliação geográfica dos mesmos, haja visto a “impressão digital” que cada um apresenta. Foram realizadas determinações de 49 elementos, todavia apenas 19 foram escolhidos para o processo de classificação, a qual ocorreu através de modelos estatísticos. As análises por ICP-OES obtiveram resultados com adequado limite de detecção para todos os elementos quantificados, os outros parâmetros de validação tais como precisão, teste de recuperação (96,2% a 103,4%) e reprodutibilidade obtidos para o estudo também foram satisfatórias.

Da mesma forma, Pérez-Álvarez et al. (2019) [72] desenvolveram um estudo similar para avaliação da autenticidade e caracterização de diferentes amostras de vinhos através de método multielementar por ICP-MS. O método proposto permitiu a classificação de vinhos sob diversos parâmetros, sendo estes: a variedade de castas, envelhecimento em barris de carvalho, adição de SO<sub>2</sub>, região geográfica, tipo de solo

e aplicação de nitrogênio. As funções discriminatórias conseguiram distinguir com precisão 100% dos vinhos para cada parâmetro avaliado, mostrando-se uma técnica eficiente para determinação da identidade de vinhos.

Jung et al. (2019) [73] desenvolveram um estudo comparativo entre as técnicas espectrometria de emissão atômica com plasma de micro-ondas (MP-OES) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), para quantificação de Mn em amostras de vinhos tintos (*Vitis coignetiae*). Os autores observaram um efeito de matriz significativo quando empregado MP-AES, independente do processo de tratamento de amostra (digestão ácida e diluição) que fosse aplicado, o que não foi visto quando empregado ICP-OES. Tal condição foi justificada pela diferença de temperaturas alcançada entre as duas fontes de plasma avaliadas. No entanto, a técnica ICP pode vir a ser limitada pelos altos custos operacionais que apresenta em relação a MP-AES.

Fu e Shi (2019) [74] propuseram um método por injeção direta empregando ICP-MS, para determinação multielementar em amostras de vinho de frutas. As amostras passaram apenas por processos de diluição e acidificação, a fim de corrigir possíveis efeitos de matriz. Processos de otimização com misturas de diferentes gases foram avaliadas para eliminação de interferências espectrais. O método proposto demonstrou satisfatória reprodutibilidade, linearidade e precisão, com limites de detecção que variaram de 0,41 a 58,1 ng/L.

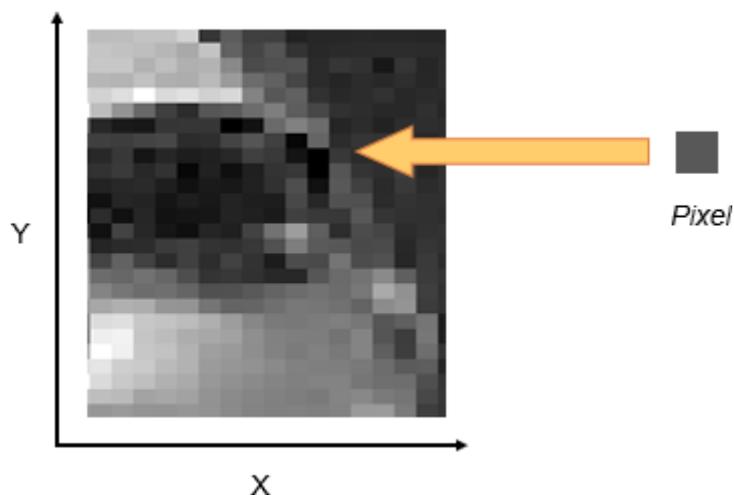
### **5.3 TÉCNICA POR IMAGEM DIGITAL**

Recentemente muitas técnicas alternativas estão sendo desenvolvidas, de modo que proporcionem resultados precisos e diretos durante as análises químicas, como por exemplo, a técnica por imagem digital. Essa nova abordagem, permite a captação de imagens em tempo real, acelerando a interpretação dos dados a serem obtidos, as metodologias tradicionais são adaptadas por métodos que se fundamentam na visão computacional, isso acontece através do emprego de scanner, câmera digital, smartphone, computador tablet e/ou webcam, de maneira que funcionem como sistema ótico, o que substitui a necessidade de detectores de custos mais elevados. Por consequência, procedimentos analíticos são otimizados de forma

que sejam mais ágeis, menos dispendiosos e com maior facilidade de transporte, o que facilita análises *in situ*. Ademais, resultados adquiridos podem ser encaminhados com facilidade para diferentes dispositivos [75][76][77][78].

O processamento de imagens digitais baseia-se em uma representação bidimensional que irão caracterizar a formação de um pixel correspondente a uma intensidade luminosa específica. Essa codificação é formada por dois eixos, (x,y), que consistem no número de colunas e linhas, respectivamente, presentes em uma matriz. A imagem é criada por uma faixa finita de coordenadas que irão culminar em sua formação. Por consequência, sua classificação dá-se pelas propriedades que apresentam, definidas pela cor e a posição a qual se encontra [79]. A **Figura 15** ilustra a representação gráfica da formação de um pixel considerando os eixos x e y.

*Figura 15 – Representação bidimensional de um pixel*



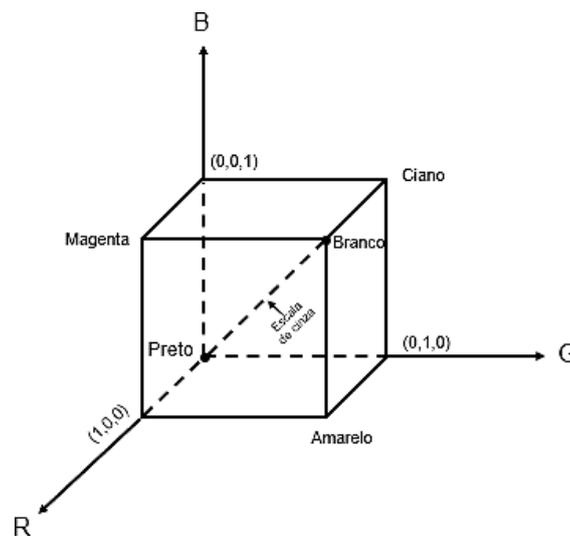
Fonte: Adaptado de [75]

As imagens podem ainda ser classificadas quanto ao tipo em: binária, em que é constituída por duas cores (preto e branco); escala de cinza, em que apresentam uma faixa variável de tons acinzentados; indexada, a qual apresenta uma matriz de pixels e um sistema RGB; e RGB, formada por três planos de cores: o vermelho (red, R), o verde (green, G) e o azul (blue, B) [79].

Imagens RGB são originárias do arranjo entre os três planos, onde a cor de cada pixel, é a combinação desses três elementos [75][79]. O desenho geométrico do sistema é refletido na formação de um cubo (**Figura 16**), através de representações

numéricas que contém três vértices que são marcados pelas cores primárias (vermelho, verde e azul). Cada cor apresenta uma posição específica, estando as variações localizadas entre os vértices principais caracterizados pelas cores secundárias, estas são definidas em ciano, magenta e amarelo. As cores preto e branco são localizadas na origem dos vértices RGB e no seu vértice oposto, respectivamente.

**Figura 16** Representação geométrica do sistema de cores RGB



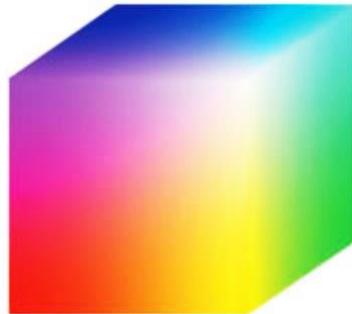
Fonte: Adaptado de [75]

Esses modelos são baseados em codificação para representação das coordenadas, com valores normalizados de 0 e 1. Cada eixo representa uma cor específica. De forma que, a quantidade de tonalidades possíveis é dependente da quantidade de bits presentes em um pixel. Além disso, os bits por definição evidenciam o número de tons existentes. Assim, considerando o sistema de cores RGB que contém três planos, cada um deles formado por 8 bits, retrata um total de 24 bits quando somados, o que proporciona a possibilidade de aproximadamente 16 milhões de cores [75]. A quantidade de tons pode ser calculada pela **Equação 1**. A variação de tonalidades pode ser vista pela **Figura 17**.

**(Equação 1)**  $2^n = \text{número de tons}$

Onde n corresponde a quantidade de bits presentes.

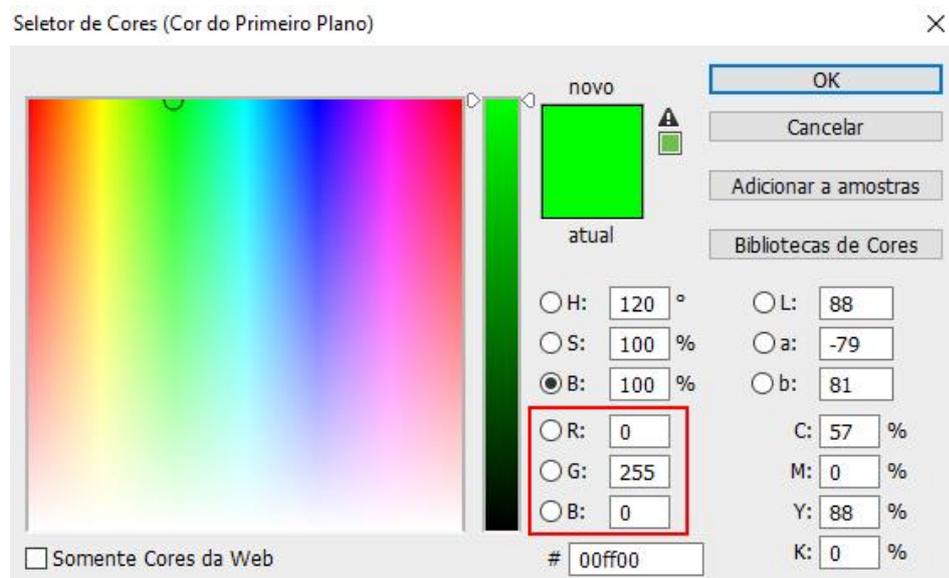
**Figura 17** *Cubo representação RGB*



Fonte: Adaptado de [75]

Além dos valores codificados por 0 e 1, podem ser usadas representações por níveis para identificação da intensidade de cor presentes em um pixel. Estes variam de 0 a 255, totalizando 266 níveis a serem atribuídos. Da mesma maneira que o espectro visível pode ser dividido em várias partes, onde, a região 0 é correspondente a ausência de coloração, o ponto 255, região máxima, definida pela cor branca, e a zona entre esses dois valores culmina nas demais variações de tonalidades [79]. Esse sistema é frequentemente visualizado em softwares para tratamento de imagens. A Figura 18 ilustra uma ferramenta para seleção de cores presente no programa Photoshop CS6.

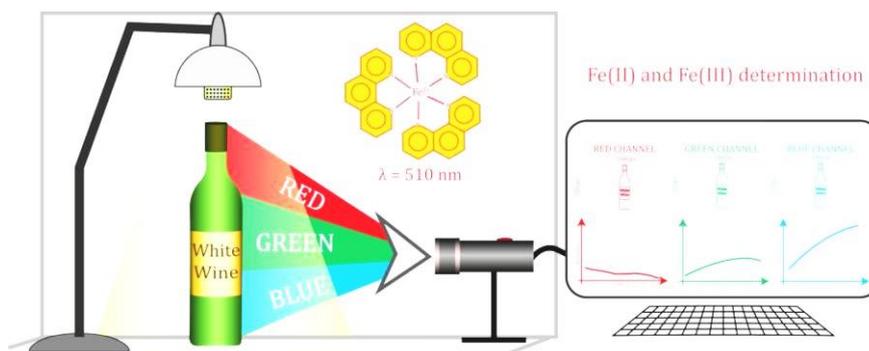
**Figura 18** *Exemplo de modelo RGB para a coloração verde*



### 5.3.1 APLICAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS COLORIMÉTRICAS NA QUÍMICA ANALÍTICA

Para a determinação da composição elementar em amostras, tem sido proposta uma grande variedade de técnicas analíticas, como técnicas eletroquímicas, cromatográficas e espectrométricas. O princípio da técnica analítica por meio de análise de imagem digital se baseia na medida da tonalidade obtida, após processos de reações colorimétricas, empregando modelo RGB, na qual a mudança da coloração estará diretamente relacionado com a concentração do analito [80]. Vários estudos já têm sido reportados aplicando essa nova abordagem para especificação de metais em matrizes de vinho ou como técnicas de controle de qualidade. A **Figura 19** ilustra a aplicação do método RGB para análise de vinho proposta por Santos et al.

*Figura 19 Método RGB*



Fonte: Adaptado de [80]

Honorato et al. (2018) [80] propuseram uma estratégia analítica empregando imagens digitais para especificação inorgânica de ferro em amostras de vinho branco. Na determinação, utilizaram o reagente cromogênico 1,2-orto-fenantrolina para complexação com os íons ferro (II) presentes na matriz, haja vista a formação de reações colorimétricas. A quantificação de ferro total foi realizada a partir da adição do agente redutor cloreto de hidroxilamônio, levando a redução de ferro (III) a ferro (II). Uma comparação entre os resultados obtidos para o ferro total pelo método imagem digital, com os resultados aplicando espectrometria de absorção atômica com chama comprovou exatidão.

Os autores realizaram a aquisição de imagens através de uma câmera webcam, empregada como detector em ambiente fechado. Esse sistema, permitiu a construção da curva de calibração considerando o modelo RGB, que apresenta três

planos de cores (vermelho, verde e azul). O processamento das imagens foi realizado a partir do histograma gerado. No entanto, o modelo linear obtido considerou os dados adquiridos pelo canal azul, haja vista uma maior sensibilidade em relação aos demais. O método proposto apresentou boa aplicação, simplicidade, baixo custo, alcançando bons limites de detecção.

Perez-Bernal et al. (2017) [81] propuseram um método colorimétrico para o estudo do escurecimento de vinho, aplicando análise digital. Neste estudo, foi utilizado um smartphone e uma fonte de luz difusa. Os resultados do estudo mostraram que a porcentagem de decaimento da cor azul foi proposta como marcador de qualidade do vinho, pois a mesma foi afetada pelo processo de escurecimento, enquanto as cores vermelha e verde permaneceram constantes. Essas repostas foram comparadas com os métodos de referência, apresentando satisfatória correlação.

---

---

# **CAPÍTULO II**

---

---

**UM SISTEMA FECHADO EM LINHA PARA DIGESTÃO DA  
AMOSTRA USANDO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 70% E  
RADIAÇÃO UV. DETERMINAÇÃO DE CHUMBO NO VINHO  
EMPREGANDO ETAAS**

## 6. INTRODUÇÃO

A presença de metais em bebidas atrai um crescente interesse da comunidade científica, haja vista sua associação quanto a qualidade e caracterização de seu produto final [82]. Ainda que sejam detectados em baixas concentrações, sobretudo em níveis traços, existe uma preocupação quanto a toxicidade de alguns elementos como metais pesados, o que se deve principalmente ao efeito bioacumulativo que apresentam no organismo [83]. Esforços para detecção de contaminantes já são avaliadas rotineiramente, com a finalidade de quantificar essas espécies na qual é necessário a realização de monitoramento regular, a fim de proteger a saúde da população quanto a sua exposição, controlando a concentração dentro de valores seguros[84].

Embora se tenha uma grande variedade de bebidas existentes, o vinho destaca-se pelos altos níveis de consumo em todo mundo, o que já é considerado como prática milenar. Decorrente dos processos de fermentação de matérias-primas como a uva, é caracterizado por sua complexidade em razão da diversidade de compostos orgânicos e inorgânicos presentes, tais constituintes são responsáveis por suas propriedades sensitivas e organolépticas que afetam a qualidade final. No entanto, a presença concomitante de metais acima dos limites permitidos pelas agências reguladoras ainda é um fator limitante [85][86].

A composição elementar do vinho é marcada pela presença de elementos essenciais. A ingestão moderada fornece minerais, como ferro, cálcio, magnésio, cromo, zinco, entre outros, que auxiliam processos biológicos fundamentais. No entanto, também são fontes de elementos com elevado potencial de toxicidade, como arsênio, cádmio, etc. Essa composição pode ser proveniente de diversas fontes, geralmente classificadas em endógenas e exógenas. A primeira está atrelada a características de cultivo da matéria-prima, como solo, clima, fertilizantes. Enquanto o último associa-se a contaminação exógena ligada a processos produtivos, como os reagentes adicionados, tubulação, etc [21].

Da mesma maneira que outros elementos de elevada toxicidade, o chumbo não é diferente, encontrado também na natureza, é originário principalmente de fontes antrópicas que acabam propiciando a contaminação ambiental, o que predispõe a

contaminação de materiais presentes em diversas cadeias produtivas, como o processamento de alimentos, impactando diretamente em sua ingestão. Mesmo em baixas concentrações, o Pb apresenta alto efeito nocivo, seus efeitos toxicológicos já são vistos em diferentes sistemas biológicos, como responsáveis por provocar disfunções neurológicas, renais, cardiovasculares, entre outras, sendo o risco aumentado quando se tem uma exposição crônica [87][88].

Conseqüentemente, ferramentas analíticas são empregadas a fim de permitir a determinação da composição elementar do vinho. A escolha do método para determinação de elementos em amostras de bebidas deve levar em consideração muitos fatores, tais como o objetivo do estudo (técnica elementar ou multielementar), a concentração do analito de interesse, custos operacionais, efeitos de matriz associados, interferências, técnicas analíticas disponíveis. Assim, embora a maior parte das amostras necessitem de etapas de preparação, muitos métodos analíticos diretos (sem pré-tratamento da amostra) já tem sido proposto empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) para a determinação de metais não voláteis em vinhos e outras bebidas alcoólicas [66][89][90].

Mollo et al. (2017) [66] propuseram um método para determinação de Zn em amostras de vinho empregando ETAAS por injeção direta. Condições ótimas de trabalho foram obtidas após o emprego de Mg como modificador químico. Os resultados foram corroborados após comparação com método de referência, onde o teste T evidenciou que diferenças significativamente estatísticas não foram observadas.

A eliminação dos efeitos de matriz, ao que se deve a complexidade de determinadas amostras, pode ser feita através do uso dos modificadores químicos e suas altas temperaturas de pirólise que permitem a eliminação completa ou parcial da matriz, possibilitando a determinação direta dos analitos [85].

Grindlay et al. (2011) [85] em uma breve revisão compara diferentes técnicas analíticas de espectrometria atômica para análise de vinhos, sendo evidenciado um grande número de estudos que empregam sua determinação direta, apenas otimizando as condições de trabalho como a realização das configurações das

instrumentações analíticas empregadas, técnicas de calibração como adição de padrão, calibração interna, etc.

A determinação de elementos voláteis tais como chumbo, cádmio, mercúrio, arsênio, antimônio, é frequentemente realizada em diferentes tipos de amostra, isso se deve a preocupação quanto aos seus elevados níveis de toxicidade e seus potenciais riscos associados à saúde humana. No entanto, estes processos de maior complexidade, uma vez que o controle da temperatura de pirólise é mais crítico. Assim, a determinação de elementos voláteis requer procedimentos de digestão em sistemas fechados, como fornos de micro-ondas [91][92][93] e sistema de refluxo (dedo frio) [50][94][95] sendo umas das técnicas mais amplamente utilizadas.

Lo Dico et al. (2018) [91] obtiveram resultados com boas figuras de mérito na determinação de vários metais pesados em amostras de cacau, empregando a digestão assistida por micro-ondas como pré-tratamento.

Huber et al. (2017) [92] desenvolveram um trabalho similar, submetendo as amostras a banho ultrassônico para posterior especiação de arsênio, as condições experimentais foram otimizadas empregando HCl e HNO<sub>3</sub>.

Ferreira et al. (2013) [50] revisaram a aplicação de sistemas de refluxo como procedimentos de pré-tratamento de amostras, tendo como vantagens a redução da perda dos analitos, diminuição do consumo de reagentes, haja vista a condensação das soluções nos tubos. Porém pode vir a ser limitada em decorrência dos níveis de acidez das soluções residuais. De Oliveira et al. (2016) [95] comparam diferentes métodos de preparo de amostra para quantificação de As, Cd, Pb e Se em arroz por GFAAS. O método de digestão com ácido nítrico em sistema aberto com dedo frio apresentou resultados satisfatórios, os quais são confirmados pelo teste de adição e recuperação, bem como através da análise de materiais de referência, sendo evidenciada uma boa resposta analítica quando avaliada a sensibilidade, bem como os baixos valores dos limites de detecção e quantificação relatados.

Ademais, técnicas baseadas na aplicação de processos oxidativos avançados (POAs) vem sendo adaptadas, a fim de seu uso como procedimentos de preparo de amostra. Esses sistemas permitem a geração de espécies reativas como o radical hidroxila ( $\bullet$  OH), que atua como intermediário, levando a degradação de diversos compostos orgânicos. Embora exista uma grande variedade de POAs aplicáveis, a

peroxidação fotoassistida, a qual combina a radiação ultravioleta (UV) com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), já tem sido frequentemente empregada para este propósito [96][97][98][99]. Como consequência, diversos estudos são desenvolvidos avaliando diferentes matrizes, como amostras ambientais [100][101], alimentícias [44][102][103], biológicas [96][99].

Alguns destes já vêm sendo empregadas para análise de vinhos [44][102][103][47]. Em 1999, Buldini et.al desenvolveram um método de pré-tratamento através da montagem de um sistema de empregando uma lâmpada de mercúrio de alta pressão como fonte de radiação UV [47]. As amostras foram digeridas na presença de  $H_2O_2$ , e o pH das soluções foram ajustadas pela adição de  $HNO_3$  e  $NH_4CH_3CO_2$ . A mineralização das soluções digeridas permitiu a quantificação de metais de transição por diferentes técnicas analíticas, tendo bons resultados quando avaliados por ZGFAAS. Almeida e Vasconcelos (2002) [103] propuseram um sistema similar formado por tubos de quartzo onde amostras de vinho foram digeridas na presença de lâmpada UV e peróxido de hidrogênio a 30%, viabilizando a quantificação multielementar por ICP-MS.

Um Procedimento em batelada foi realizado por Dos Santos et al. (2009) [44], em que foi empregado um processo oxidativo por radiação UV/ $H_2O_2$  para determinação de Fe e Mn por FAAS. O sistema foi equipado com 3 lâmpadas de mercúrio de baixa pressão e as amostras foram digeridas durante um período de 30 min. Da mesma maneira, Brandão et al. (2012) [102] propuseram um processo oxidativo usando radiação ultravioleta na presença de peróxido de hidrogênio para determinação de cobre em sucos de frutas através da montagem de um sistema de digestão similar e as medidas também foram realizadas por espectrômetro de absorção atômica em chama.

Métodos baseados no uso de peróxido de hidrogênio a 30% (m/m) como reagente oxidante em procedimentos de pré-tratamento já são bem estabelecidos na literatura. No entanto, poucos trabalhos reportados na literatura têm sido propostos para avaliar o uso desse reagente em outros níveis de concentração, como, por exemplo,  $H_2O_2$  70% (m/m) [104][105]. Deste modo, haja vista a limitação de estudos envolvendo a aplicação de  $H_2O_2$  a 70%, o presente estudo buscou desenvolver um sistema de digestão em linha fechado usando radiação UV e peróxido de hidrogênio 70% para determinação de chumbo em amostras de vinho empregando ETAAS.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver um sistema de digestão fechado para determinação de chumbo em amostras de vinho.

### **7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Empregar uma lâmpada ultravioleta de baixa pressão no desenvolvimento de um sistema em linha para digestão de amostras;

Avaliar a cinética de degradação de amostras por processos de fotólise UV e peroxidação fotoassistida (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);

Utilizar peróxido de hidrogênio na concentração de 70% (p/p);

Otimizar condições experimentais a partir de ferramentas quimiométricas;

Aplicar o método proposto para determinação de Pb em vinhos empregando ETAAS.

## 8. PARTE EXPERIMENTAL

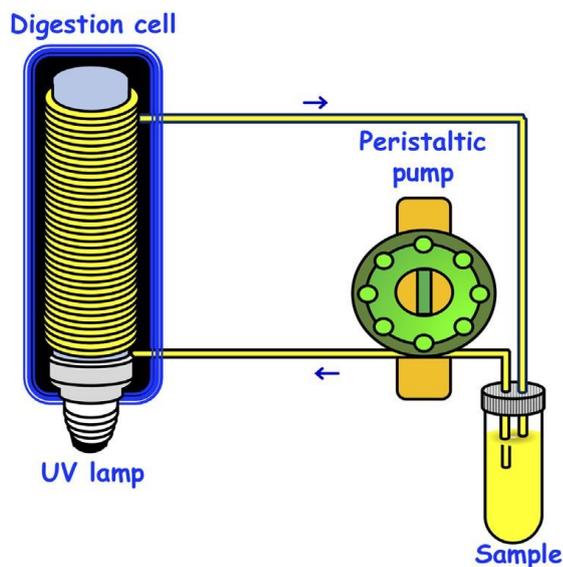
### 8.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todos os experimentos foram realizados utilizando água ultrapura e reagentes de grau analítico. A água ultrapura foi obtida a partir do sistema Mili-Q (Millipore, Bedford, EUA) com resistividade específica de  $18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ . Ácido nítrico 65% (m/m), peróxido de hidrogênio 30% (m/m) foram fornecidos por Merck, (Darmstadt, Alemanha) e peróxido de hidrogênio a 70% (m/m) por Peroxy (Bahia, Brasil). As soluções padrões foram preparadas imediatamente antes do uso por diluição em série a partir de solução estoque de chumbo de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (Merck) com ácido nítrico a 0,05% (m/m). Uma solução de alumínio  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (Merck) foi escolhida como modificador químico [106][107]. As etapas de otimização foram realizadas utilizando vinho tinto elaborado com uvas Cabernet Sauvignon. As amostras de vinhos brasileiros foram obtidas em um supermercado no município de Salvador – Ba, Brasil, em maio de 2018.

### 8.2 SISTEMA FECHADO DE DIGESTÃO DE AMOSTRA EM LINHA

O sistema digestor é composto por um tubo de PTFE (com 3,5 m de comprimento e 0,8 mm de diâmetro), envolto em torno de uma lâmpada UV de 8 W com 30 cm de comprimento. A lâmpada está instalada numa caixa de madeira com 50 cm de comprimento, 29 cm de altura e 29 cm de largura, e pintada inteiramente de preto no interior. Durante a etapa de digestão, uma bomba peristáltica é empregada para impulsionar a solução de amostra pelo tubo de PTFE a uma taxa de vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  por 45 min. Durante a digestão de 5,0 mL de amostra de vinho na presença de 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a temperatura da solução resultante variou de 24 a  $27^\circ \text{C}$ . A **Figura 20** esquematiza a montagem do sistema digestor.

**Figura 20** : Representação esquemática do sistema de digestão UV em linha usado para decomposição de amostras de vinho



### 8.3 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

Técnicas quimiométricas são aplicadas dentro do laboratório, importante estratégia que busca auxiliar a resolução de problemas associados a processos químicos. Conseqüentemente, a quimiometria aparece como uma disciplina na área das ciências, marcada pela interdisciplinaridade, que relaciona fundamentos estatísticos e matemáticos a ferramentas computacionais, que por sua vez otimizam as condições experimentais, reduzindo a quantidade de experimentos a serem realizados [108].

De modo geral, é necessário a determinação dos fatores que serão avaliados durante a otimização de um processo ou método, a partir dos quais serão obtidas as respostas que irão conduzir as condições ideais de trabalho [108].

Embora os métodos multivariados proporcionem estudos com maior detalhamento, um grande número de trabalhos tem aplicado metodologia univariada, haja vista a simplicidade que esta apresenta. Todavia, suas limitações devem ser observadas. As variáveis estudadas são analisadas isoladamente, conseqüentemente são desconsideradas as possíveis interações entre elas, aumentando assim a quantidade de procedimentos experimentais a serem feitos, como resultado tem-se um maior tempo de trabalho e consumo de reagentes associados [108][109].

A otimização multivariada por sua vez caracteriza-se pela aplicabilidade de estudos simultâneos, sendo considerada a influência de vários fatores em um mesmo sistema, de modo que os estudos sejam realizados de forma aleatória, minimizando possíveis interferentes que afetem os resultados. Diferentemente dos métodos univariados, as interações entre os fatores são consideradas em todos os experimentos, à vista disso, ocorre redução do número de procedimentos experimentais levando a um menor consumo de reagentes. Ademais, programas estatísticos podem ser empregados, o uso de softwares é comumente realizado quando se tem um grande número de fatores avaliados. Sua limitação vincula-se a necessidade de um maior conhecimento do analista quanto ao entendimento desses processos para interpretação dos dados obtidos [108][110].

Apesar disso, podemos dividir seus processos em duas etapas. Em um primeiro momento é necessário analisar e identificar as variáveis significativas do estudo, em seguida, é feita a otimização das respostas a fim de alcançar a melhor resposta analítica. Os fatores são determinados a partir de estudos prévios, de modo que as variáveis significativas sejam identificadas através de métodos de rastreio, normalmente aplicam-se técnicas de planejamento fatorial completo e a escolha do tipo de planejamento depende dos níveis investigados. A otimização completa, com valores experimentais aprimorados pode ser obtida através da identificação do comportamento correto da resposta. Dessa forma, o emprego da metodologia de superfície de resposta (RSM) parece ser a mais apropriada, visto que fornecem modelos matemáticos que auxiliam a elaboração das condições experimentais ótimas. Esses modelos podem prever informações importantes no que diz respeito ao comportamento das variáveis estudadas. A RSM envolve um conjunto de técnicas que podem ser empregadas, como o planejamento fatorial de três níveis, planejamento composto central, planejamento Box-Benhken e planejamento Doehlert, sendo estes dois últimos os mais comumente aplicados. Todavia, etapas de validação ainda são necessárias [108][111][112].

### **8.3.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO DE DOIS NÍVEIS**

O planejamento fatorial completo de dois níveis é uma ferramenta útil quando se tem múltiplos fatores em estudo e se deseja estudar suas respectivas interações.

Essa metodologia é estabelecida pelo emprego da expressão,  $n=2^k$ , sendo o valor obtido referente ao número de experimentos que devem ser realizados, onde k corresponde a quantidade de fatores investigados e 2 é a quantidade de níveis para cada fator [113].

Os fatores são então estudados em dois níveis, o que significa que cada fator será modificado duas vezes, e a análise estatística é feita a partir disso. De modo que a leitura seja simplificada, realiza-se a codificação dos valores reais de cada nível, sendo estes representados pelos sinais (-1) e (+1), nível inferior e superior, respectivamente. Contudo, ainda se faz necessário incluir outros experimentos que considerem os erros associados aos processos: para esse fim, são realizados testes em nível médio, também conhecido como ponto central (PC), em que sua codificação é representada por (0) [113]. A **Tabela 1** apresenta um esquema de uma matriz genérica de planejamento fatorial em dois níveis considerando três fatores investigados.

*Tabela 1 – Exemplo de matriz de planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>*

<b>Experimentos</b>	<b>Fator A</b>	<b>Fator B</b>	<b>Fator C</b>
1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	-1	+1	-1
7	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1
<b>9 (PC)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>10 (PC)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>11 (PC)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Esses experimentos são então realizados de forma aleatória, de modo que as variáveis incontroláveis não afetem significativamente as respostas esperadas [113].

Com base no fatorial gerado, pode-se realizar a avaliação desses resultados de várias maneiras, sendo que a mais comumente empregada é a análise do gráfico de Pareto. No que lhe diz respeito, apresenta uma fácil visualização o que é caracterizado pela presença de barras horizontais que evidenciam o comportamento das variáveis do sistema proposto. A partir dele, consegue-se observar o efeito dos fatores ou interações consideradas significativas ou não para o estudo. Essas determinações são dependentes do valor de  $p$  (probabilidade estatística), onde aqueles efeitos com  $p > 0,05$  ou  $p = 0,05$  são classificados com significância, considerando um nível de confiança de 95% [109].

Ademais, podem ser obtidos modelos de regressão, os quais descrevem as medidas gerais dos experimentos, o efeito de cada fator individualmente e suas respectivas interações. Através destes podem ser feitas estimativas das respostas em relação aos fatores investigados dentro do domínio experimental determinado [109].

### **8.3.2 ESTRATÉGIA DE OTIMIZAÇÃO**

As otimizações das condições experimentais foram realizadas empregando-se um planejamento fatorial completo de dois níveis, com três fatores investigados, sendo as variáveis independentes consideradas: os volumes de peróxido de hidrogênio, ácido nítrico e o tempo de irradiação. A resposta de interesse utilizada para avaliação foi a absorvância da solução resultante, medida no comprimento de onda de 512 nm, a qual apresentou uma região de máxima absorção para as amostradas analisadas. Ademais, triplicatas do ponto central foram realizadas dado que consideram a aleatoriedade dos ensaios, bem como erros sistemáticos associados. Os ensaios nessa condição foram necessários para determinação do erro experimental e teste de curvatura [114][115].

### **8.3.3 INSTRUMENTAÇÃO**

A quantificação de chumbo foi realizada usando um espectrômetro de absorção atômica ZEE nit 600 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) equipado com um atomizador de tubo de grafite aquecido transversalmente e correção de fundo de efeito

Zeeman, empregando um amostrador automático de forno MPE 60 (Analytik Jena) para a introdução da amostra.

Os parâmetros instrumentais são apresentados na **Tabela 2**. A lâmpada de cátodo oco de chumbo (Varian, Mulgrave, VA, Austrália) foi operada com uma corrente de 3 mA, um comprimento de onda de 283,306 nm e largura de banda espectral de 1,2 nm. As medidas analíticas foram realizadas utilizando tubos pirolíticos revestidos de grafite aquecidos transversalmente com plataformas de PIN. O gás argônio com pureza de 99,997% (White Martins, Salvador, Brasil) foi usado para purga com uma vazão interna de 2,0 L min<sup>-1</sup> em todas as etapas, exceto durante a etapa de atomização, quando o fluxo interno foi interrompido. O modificador químico, padrões e amostras foram transferidos para o tubo de grafite utilizando o amostrador automático.

*Tabela 2* Parâmetros instrumentais utilizados para determinação de chumbo por ETAAS

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições operacionais</b>
Comprimento de onda da lâmpada	283,306 nm
Corrente da lâmpada	3 mA
Largura de banda	1,2 nm
Fluxo de gás de purga	2,0 L min – 1
Gás	Argônio

#### **8.3.4 DETERMINAÇÃO INSTRUMENTAL DE CARBONO**

O teor de carbono foi quantificado por combustão empregando equipamento TruSpec CHN (LECO Corporation em St. Joseph, Michigan, EUA) usando uma massa de solução de 0,10 g em cápsula de antimônio.

## 9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.1 ESTUDO DO SISTEMA EM LINHA USANDO RADIAÇÃO UV

Um planejamento fatorial completo de dois níveis foi estabelecido para otimização das condições experimentais do procedimento proposto para a digestão de amostras de vinho. O sistema apresentado fundamenta-se na exposição das amostras a radiação UV associada ao oxidante peróxido de hidrogênio por um período de tempo necessário, de modo que seja alcançada a degradação completa dos componentes orgânicos da solução. O processo oxidativo empregado desencadeia a formação de espécies reativas que atuam sobre a matriz estudada promovendo a mineralização.

À vista disso, foram selecionados alguns fatores que pudessem afetar de maneira significativa o processo de foto-oxidação, sendo estes as concentrações de ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e o tempo de irradiação. A degradação da matriz em estudo foi definida a partir da diminuição do sinal de absorvância, onde a absorvância da solução digerida no comprimento de onda de 512 nm foi observada em função da variação dos fatores.

As variáveis estudadas, assim como, os valores codificados referentes aos domínios experimentais utilizados no planejamento e os resultados obtidos para cada experimento são apresentados na **Tabela 3**.

*Tabela 3* Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis  $2^3$  para avaliação da digestão de amostras de vinho.

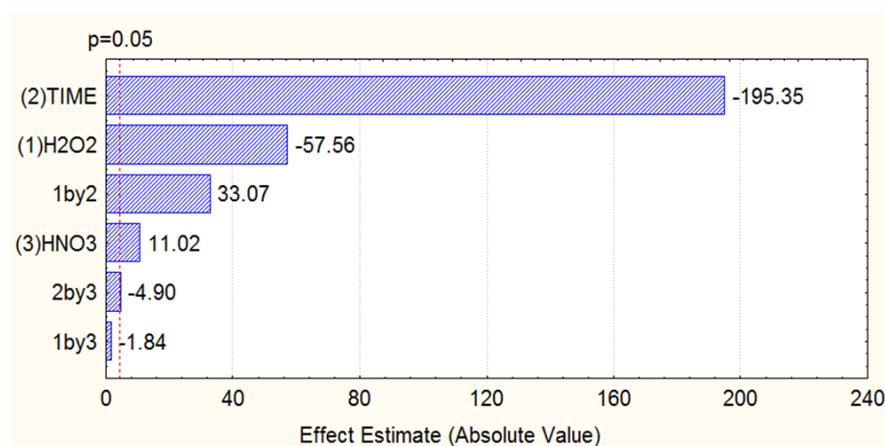
Experimentos	Volume H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Tempo de irradiação (min)	Volume HNO <sub>3</sub> (mL)	Absorvância (ABS – 512 nm)
1	-1 (1.0)	- (8)	- (0.0)	0.273
2	+1 (2.0)	- (8)	- (0.0)	0.182
3	-1 (1.0)	+ (20)	- (0.0)	0.072
4	+1 (2.0)	+ (20)	- (0.0)	0.072
5	-1 (1.0)	- (8)	+ (1.0)	0.269
6	+1 (2.0)	- (8)	+ (1.0)	0.212
7	-1 (1.0)	+ (20)	+ (1.0)	0.097

8	+1 (2.0)	+ (20)	+ (1.0)	0.057
<b>CP</b>	<b>0 (1.5)</b>	<b>0 (14)</b>	<b>0 (0.5)</b>	<b>0.107</b>
<b>CP</b>	<b>0 (1.5)</b>	<b>0 (14)</b>	<b>0 (0.5)</b>	<b>0.107</b>
<b>CP</b>	<b>0 (1.5)</b>	<b>0 (14)</b>	<b>0 (0.5)</b>	<b>0.109</b>

Volume total: 7,0 mL

Os resultados deste planejamento fatorial podem ser interpretados pelo gráfico de Pareto, o qual é apresentado na **Figura 21**. Informações relevantes no que diz respeito à significância dos fatores em estudos podem ser observadas.

**Figura 21** Gráfico de Pareto obtidos a partir planejamento fatorial completo  $2^3$ .



A partir das respostas obtidas pelo sistema de digestão UV proposto, nota-se que todos os fatores investigados se demonstram significativos: no entanto, as variáveis tempo de irradiação (-195,35) e volume de peróxido de hidrogênio (-57,56) apresentaram maior contribuição no que diz respeito a significância. Ambos os fatores evidenciaram efeitos negativos, de modo que a resposta é aumentada quando há variação do domínio experimental do maior nível para o menor. Isso indica que, em condições em que há o aumento dos fatores ocorre uma diminuição no sinal de absorvância, essa ABS reduzida foi, portanto, associada a alta degradação das amostras de vinho. Em contrapartida, a avaliação das condições por planejamento fatorial não conseguiu ser feitas com os dados que referem ao ácido nítrico quando observado os valores de absorvância (512 nm) das soluções residuais, visto que o reagente na presença de radiação UV promove a formação de compostos coloridos, que por sua vez apresentam absorção elevada dentro do comprimento de onda selecionado para estudo.

Quando avaliadas as interações entre os fatores selecionadas para o estudo pelo gráfico de Pareto, verifica-se que a interação “tempo de irradiação X volume de peróxido de hidrogênio” apresenta um efeito positivo significativo (+33,07), dado que resposta analítica é aumentada à medida que os valores na faixa de trabalho investigada crescem. Ademais, podem ser inferidas outras informações a partir da matriz de planejamento fatorial, como a região de trabalho que evidenciou maior degradação das amostras de vinho tinto, a qual foi constatada pela apresentação do menor valor de absorvância, sendo obtido para a condição experimental de tempo de irradiação e peróxido de hidrogênio ambos em nível máximo (Tempo: 20 min, volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2 mL).

Em decorrência da limitação dos estudos com ácido nítrico relatada anteriormente, foi realizada outra etapa de avaliação do sistema de digestão de amostras desenvolvido empregando um planejamento fatorial de dois níveis, porém com apenas dois fatores estudados, sendo estes o volume de peróxido de hidrogênio e o tempo de irradiação. Os resultados são apresentados na **Tabela 4**, assim como os valores codificados e reais para cada fator, e suas respectivas respostas (absorvância da solução residual a 512 nm).

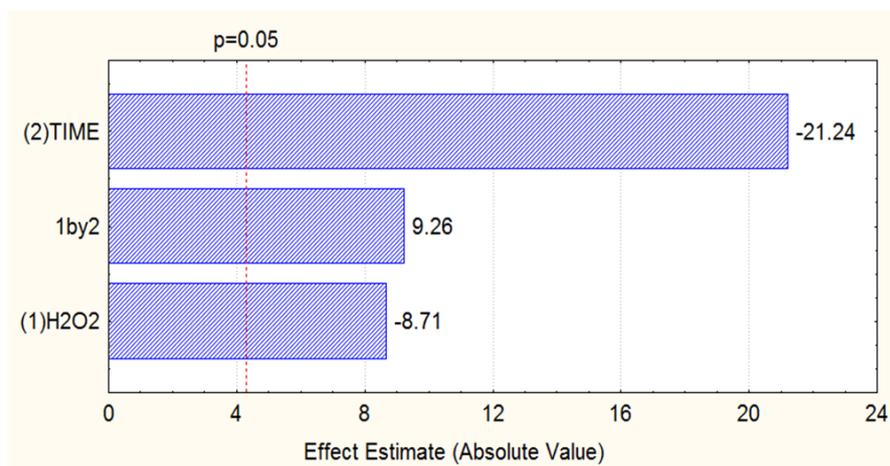
**Tabela 4** Avaliação do sistema de digestão de amostras usando planejamento fatorial de dois níveis <sup>22</sup>.

<b>Experimento</b>	<b>Volume H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 70% (mL)</b>	<b>Tempo de irradiação (min)</b>	<b>Absorvância (ABS em 512 nm)</b>
1	-1 (1.0)	- (8)	0.115
2	+1 (2.0)	- (8)	0.214
3	-1 (1.0)	+ (20)	0.046
4	+1 (2.0)	+ (20)	0.049
<b>CP</b>	<b>0 (1.5)</b>	<b>0 (14)</b>	<b>0.074</b>
<b>CP</b>	<b>0 (1.5)</b>	<b>0 (14)</b>	<b>0.079</b>
<b>CP</b>	<b>0 (1.5)</b>	<b>0 (14)</b>	<b>0.068</b>

**Volume total: 7,0 mL**

A partir da nova matriz pode-se gerar um novo gráfico de Pareto, como suporte para avaliação do efeito individual de cada fator, bem como a sua devida interação. Os resultados são então apresentados na **Figura 22**.

**Figura 22** Gráfico de Pareto obtido a partir planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.



Analisando o novo gráfico de Pareto, observa-se a significância dos dois fatores investigados, ratificando as informações obtidas pelo planejamento fatorial inicial. Ambas as variáveis (tempo de irradiação e peróxido de hidrogênio) demonstram efeito significativo negativo (-21,24 e -8,71 respectivamente). A interação tempo de irradiação X volume de peróxido de hidrogênio também apresentou efeito positivo (+9,26), corroborando a avaliação anterior.

## 9.2 ESTUDO CINÉTICO DA DEGRADAÇÃO DO VINHO USANDO RADIAÇÃO UV E H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 70%

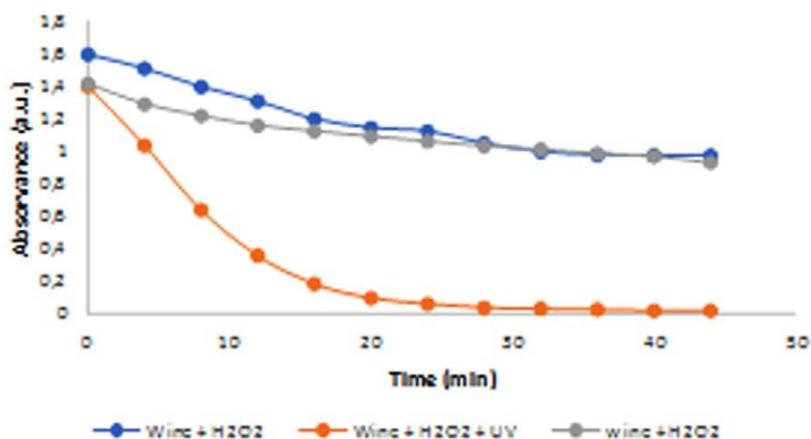
Após as técnicas de planejamento de experimentos, foram realizados estudos cinéticos a fim de alcançar condições ótimas de digestão, bem como a compreensão dos processos efetuados. A degradação do vinho tinto foi executada pelo emprego de lâmpada UV de baixa potência (8W). Os testes foram feitos com 5,0 mL de vinho e adição de 2,0 mL de peróxido de hidrogênio 70%.

As amostras foram preparadas e agitadas, tendo seu volume final ajustado para 10 mL com a adição de água desmineralizada. Em seguida, foram encaminhadas para o sistema digestor desenvolvido de modo a permitir sua irradiação. As experiências foram realizadas em intervalos de 4 em 4 minutos durante um tempo de 52 minutos. Após a digestão das amostras, a solução resultante foi medida para obtenção dos

valores de absorvância, de modo que pudesse ser avaliado a eficiência de degradação.

A degradação do vinho foi acompanhada pelas medidas da absorvância das soluções residuais no comprimento de onda de máxima absorção, o qual foi determinado previamente em 512 nm. Esses resultados são apresentados na **Figura 23**. A fim de avaliar a eficiência do sistema proposto são comparadas diferentes abordagens de digestão de amostra: radiação UV única (azul); radiação UV associada a peróxido de hidrogênio (laranja); peróxido de hidrogênio no escuro (cinza). As decomposições das amostras ocorreram em um período de 44 minutos. O método UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou a maior taxa de degradação. Em 32 minutos de reação a amostra foi quase completamente mineralizada. Esse gráfico da mesma forma explicita as informações referentes a significância dos fatores tempo de irradiação e peróxido de hidrogênio resultantes do planejamento fatorial. Assim é apontado o papel significativo da radiação ultravioleta na degradação desses compostos. No entanto, essa mesma degradação não é efetivada quando aplicado o oxidante sozinho no escuro.

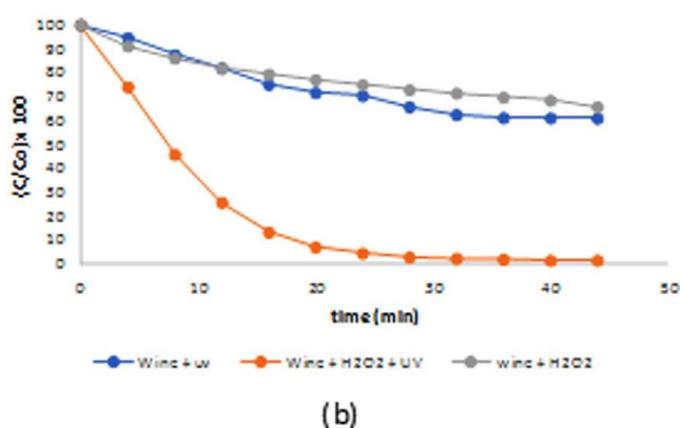
**Figura 23** : Avaliação da degradação do vinho em função tempo para diferentes abordagens de digestão usando o sistema proposto



De modo geral, sabe-se que a composição do vinho varia a depender do produto, assim em função da complexidade de suas matrizes recomenda-se um tempo de digestão em torno de 45 minutos, caso a amostra utilizada seja mais complexa que aquela usada durante as etapas de otimização, a fim de garantir que todo conteúdo orgânico possa ser eliminado.

A **Figura 24** mostra as curvas de fotodescoloração para as diferentes reações estudadas. A partir dela pode-se observar que o sistema combinado se mostra mais eficaz quando comparada aos métodos isolados. Sabe-se que os máximos de absorção ocorrem na presença de grupos cromóforos, assim é evidente a degradação dessas espécies em até 32 minutos quando a amostra é irradiada com luz ultravioleta na presença de peróxido de hidrogênio, apresentando uma taxa de degradação de 98%. Por outro lado, a atuação única da luz ultravioleta só foi capaz de degradar 38% das espécies presentes no vinho. A descoloração no escuro e na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi ainda menor, com uma taxa de 29%.

**Figura 24** Curvas de fotodescoloração

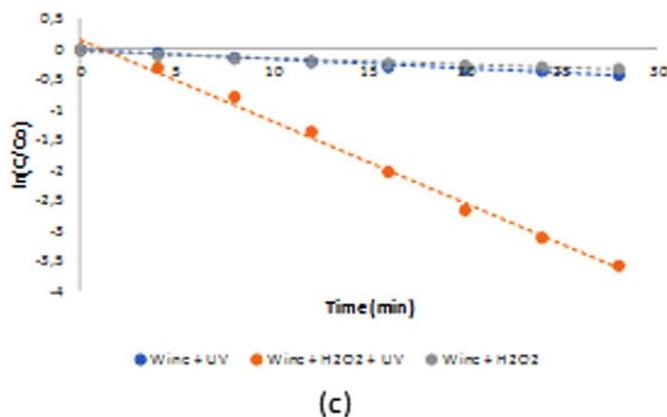


Resultados demonstram o papel importante que os radicais hidroxila ( $\bullet$  OH) possuem durante a fotoxidação, dado que podem ser formados por meio de processos fotocatalíticos, a presença de oxidantes como peróxido de hidrogênio sob irradiação UV já é suficiente para liberação de espécies reativas no meio. Esse radical apresenta alto poder oxidante ( $E^\circ = 2,8$  V) levando reações de degradação em moléculas orgânicas através de processos oxidativos avançados. Quando empregado POAs a avaliação da decomposição pode ser feita mediante o teor de carbono orgânico dissolvido. Em uma amostra de vinho a taxa de carbono foi reduzida de 10% a 2% após emprego de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, demonstrando mineralização de seu conteúdo orgânico por radicais OH [116].

Foram estudadas as curvas cinéticas de descoloração das amostras de vinho por diferentes condições experimentais empregando um modelo de pseudo-primeira ordem, os resultados são expostos pela **Figura 25**. A constante cinética aparente ( $k_{app}$ ) encontrada para a descoloração do vinho assistida por peróxido de hidrogênio

e luz UV foi de 0,135 min<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9936$ ) contra 0,010 min<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9454$ ) para a descoloração do vinho no escuro com peróxido de hidrogênio e 0,015 min<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9834$ ) para a descoloração do vinho sob irradiação UV sem peróxido de hidrogênio. Dessa forma, constata-se que a associação UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresenta uma taxa de degradação 10 vezes mais rápida quando comparada aos métodos isolados.

**Figura 25** – Curvas cinéticas seguindo um modelo de pseudo-primeira ordem.



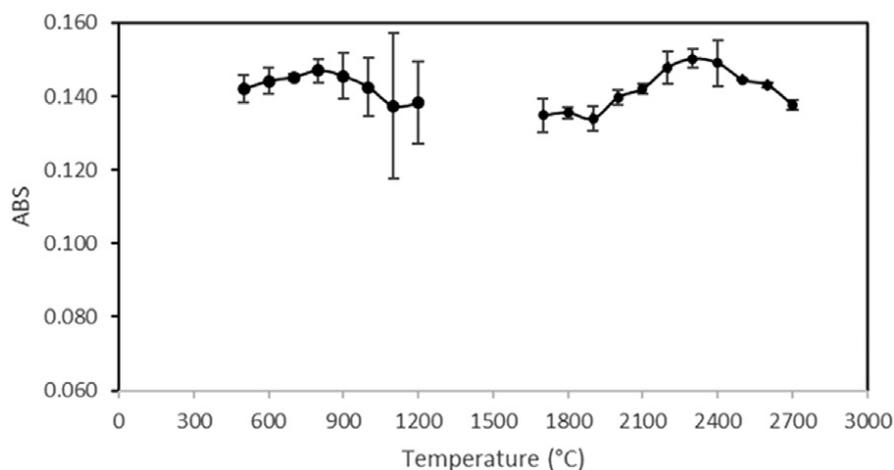
### 9.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE CHUMBO USANDO ETAAS

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica é uma técnica bem consolidada na literatura, com inúmeras vantagens mostra-se eficiente na determinação de metais a níveis traços, apresentando boa sensibilidade e baixos limites de detecção. Todavia, ainda se faz necessário a otimização de parâmetros instrumentais como seu programa de temperatura, de modo a garantir reprodutibilidade das análises, certificando a atomização completa das amostras e evitando seu espalhamento. As condições instrumentais para quantificação de chumbo foram realizadas através do emprego de técnica univariada, em que um fator é analisado por vez, enquanto os demais são mantidos constantes. Esses procedimentos baseiam-se na determinação da temperatura ótima de pirólise e atomização.

Para otimização do sistema foram construídas as curvas de pirólise e atomização a fim de garantir a estabilização do analito durante a etapa de pirólise, permitindo a queima da matriz e completa atomização da espécie de interesse. Os gráficos gerados são apresentados pela **Figura 26**. Realizou-se o emprego de alumínio como modificador químico. As faixas de temperatura de pirólise investigada

variaram de 500 °C a 1200°C, com um platô de absorvância obtido entre 700 °C a 900 °C, o tempo de pirólise foi definido em 20 segundos. Na otimização da atomização as temperaturas variaram de 1800 °C a 2700 °C, sendo observado um platô na faixa de 1800 °C a 2200 °C. Após construção das curvas, foram estabelecidas como temperaturas ótimas de pirólise e atomização 800 °C e 1800 °C respectivamente. A escolha baseou-se na observação dos sinais analíticos durante a análise, formação de picos e sinais de fundo considerados.

**Figura 26** Curvas de pirólise e atomização empregando alumínio como modificador químico.



O programa de temperatura proposto com os valores de temperatura otimizados para quantificação de chumbo é mostrado na **Tabela 5**. Todos os sinais analíticos foram medidos como valores de absorvância integrados, Aint (área do pico).

**Tabela 5** – Programa de temperatura para determinação de chumbo empregando alumínio como modificador químico

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Tempo (s)
Secagem	80	15	10
Secagem	120	10	15
Secagem	140	5	10
Pirólise	800	50	20
Atomização	1800	FP*	4
Limpeza	2550	FP*	5

\*FP – Full Power

#### 9.4 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO ETAAS PROPOSTO

O procedimento de digestão online proposto apresenta inúmeras vantagens, haja vista a dificuldade que analistas tem encontrado durante o emprego de técnicas de calibração externa com padrões aquosos, a fim da especificação de espécies químicas presentes em amostras de vinho por técnicas espectroanalíticas, consequência da alta complexidade das matrizes estudadas [117]. Grindlay et al. (2011) [21] em sua revisão afirmam que a maior parte dos trabalhos desenvolvidos para análise de vinhos requer a calibração externa com padrões matriciais casados, apesar da grande dificuldade de preparação de padrões analíticos com uma composição semelhante de matrizes de vinho.

Outros métodos já foram propostos. Ferreira et al. (2008) [118] realizaram determinação direta em vinho usando elementos de referência. Mutic et al. (2011) [119] empregaram técnicas de padronização interna para determinação de arsênio em amostras de vinho, os autores comparam diferentes padrões internos para redução do efeito de matriz. Iglesias et al. (2007) [120] desenvolveram um trabalho similar ao avaliar diferentes técnicas de calibração e procedimentos de digestão, seus resultados evidenciam uma boa performance analítica para análise elementar por padronização interna em vinhos tinto. As diluições de isótopos por ICP-MS também já são reportadas a fim de permitir a identidade dessas amostras [94][121]. Recentemente foram propostas novas abordagens baseadas em técnicas de calibração multi-energia [122] e análise de diluição de padrão [123].

## **9.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

### **9.5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ**

Durante o desenvolvimento do método proposto para determinação de chumbo em amostras de vinho tinto, um estudo foi estabelecido no sentido de avaliar a calibração do método a partir da comparação da técnica. O procedimento de calibração externa com padrões aquosos foi realizado para avaliação do efeito de matriz. Esse método consiste no preparo de soluções padrões com concentrações conhecidas que serão usados para construção da curva de calibração [124]. Em função destes serão analisados as respostas geradas para a solução desconhecida

(amostra). A inclinação da curva obtida para as soluções padrão de chumbo foi de  $(5,031 \pm 0,298) \times 10^{-3} \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ .

A curva de adição de analito também foi construída. Esse método baseia-se na adição de quantidades conhecidas do analito nas amostras em vários pontos [124]. A leitura dos sinais gerados é utilizada para construção de gráficos a fim de observar sua linearidade, haja vista a influência da matriz na inclinação da curva. Nesse caso, a inclinação da curva obtida foi de  $(5,026 \pm 0,588) \times 10^{-3} \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ .

Os resultados demonstraram a eficiência dos procedimentos de preparo de amostra aplicando digestão online para eliminação da matriz de vinhos tinto. Consequentemente, a análise das amostras para determinação de chumbo pode ser realizada por técnica de calibração externa empregando ETAAS.

### 9.5.2 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Dentre os parâmetros para validação de um método analítico, bem como a avaliação de seu desempenho, tem-se as figuras de mérito, sendo o limite de detecção e quantificação algumas delas.

O limite de detecção (LOD) é definido como a concentração mais baixa do analito que consegue ser detectada de maneira confiável pelo instrumento analítico através da geração de um sinal analítico que difere do branco ou ruídos presentes [125]. Esse limite pode ser calculado pela **Equação 1**.

$$\text{(Equação 1)} \quad \mathbf{LOD} = \frac{3 \sigma}{s}$$

Onde,  $\sigma$  representa o desvio padrão obtido através da leitura dos brancos e  $s$  corresponde ao coeficiente angular da curva de calibração construída, apresentando linearidade de 0,89 a  $80 \mu\text{g L}^{-1}$ . Nesse trabalho, o LOD calculado foi de  $0,27 \mu\text{g}^{-1}$ .

O limite de quantificação (LOQ) consiste na concentração mais baixa do analito de interesse que consegue ser quantificada pelo método proposto com precisão [125]. Sua mensuração baseia no emprego da **Equação 2**.

$$\text{(Equação 2)} \quad \mathbf{LOQ} = \frac{10 \sigma}{s}$$

Onde,  $\sigma$  representa o desvio padrão obtido através da leitura dos brancos e  $s$  corresponde ao coeficiente angular da curva de calibração construída, apresentando linearidade de 0,89 a 80  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O resultado de LOQ calculado foi de 0,89  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 9.5.3 MASSA CARACTERÍSTICA

A massa característica é definida como a massa do analito correspondente a uma absorvância integrada de 0,0044 s. Nesse estudo, a massa característica obtida foi de 17,5 pg.

Este valor foi obtido usando alumínio como um modificador químico, estando de acordo com outros trabalhos propostos para determinação de chumbo por ETAAS usando modificadores como paládio magnésio (21,3 pg) [126], nitrato de amônio-paládio (22,0 pg) e paládio-magnésio (22,0 pg) [127], ácido tartárico-ácido cítrico-sacarose (18,0 pg) [128] e difosfato de amônio (13,0 pg) [129].

### 9.5.4 PRECISÃO

A precisão do método foi avaliada calculando-se o desvio padrão relativo (RSD) considerando as medidas de seis repetições. Este modelo tem por função observar a proximidade dos valores obtidos individualmente e conseqüentemente seu grau de dispersão [130].

O cálculo de RSD é feito através da divisão entre o desvio padrão ( $s$ ) de todas as repetições e a média ( $X_m$ ) dessas medidas como apresentado pela **Equação 3**. O valor é então multiplicado pelo fator 100 para obtenção em porcentagem.

$$\text{(Equação 3)} \quad RSD = \frac{s}{X_m} \times 100$$

Neste trabalho, o resultado encontrado foi de 2,13% considerando a análise de uma amostra digerida de vinho com teor de chumbo de 16,35  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 9.5.5 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico reflete a concordância entre os valores obtidos pelo método com um valor tomado como referência [130].

A exatidão pode ser avaliada de diversas maneiras, sendo uma delas a análise de materiais de referência certificados (CRM). Este processo utiliza padrões internacionais, mas limita-se a algumas matrizes. Como consequência, existem restrições quanto à sua aplicação [130]. Outra alternativa é a comparação direta entre duas técnicas (método proposto e método de referência) [130].

Testes de adição e recuperação de analito também podem ser realizados para avaliar a exatidão de um método. Esse procedimento consiste na adição de padrão com concentrações conhecidas na amostra e a avaliação da concentração recuperada é feita a partir disso. Os valores de recuperação podem ser calculados utilizando a Equação 4

$$\text{Equação 4} \quad R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Onde, C1 é a concentração determinada na amostra adicionada, C2 é a concentração determinada na amostra não adicionada e C3 é a concentração adicionada.

Nesse trabalho, avaliação da exatidão foi realizada comparando-se os resultados obtidos pelo método proposto com ICP-MS e aplicação de testes de adição e recuperação de analito. Os resultados obtidos através da comparação de métodos são apresentados na Tabela 6, considerando um intervalo de confiança de 95%. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias obtidas entre as duas técnicas.

Tabela 6 Determinação de chumbo em amostras de vinho (n=3)

Amostra	ETAAS (Pb µg L-1)	ICP-MS (Pb µg L-1)
1 (Cabernet Sauvignon e Merlot)	2,19 ± 0,11	2,37 ± 0,16
2 (Cabernet Sauvignon)	43,48 ± 1,06	44,08 ± 1,31
3 (Merlot)	15,50 ± 0,73	***

4 (Cabernet Sauvignon e Merlot)	32,70 ± 1,69	***
---------------------------------	--------------	-----

Os experimentos realizados para os testes de adição e recuperação utilizaram uma amostra de vinho com concentração de chumbo de 16,35 µg L<sup>-1</sup> e os teores de chumbo adicionados foram 9,09 e 18,18 µg L<sup>-1</sup>, apresentando como recuperação os valores de 101 e 93%, respectivamente.

Todos os testes empregados confirmam a exatidão do método desenvolvido para quantificação de chumbo em amostras de vinho.

## 9.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Após validação, o método proposto para determinação de chumbo foi aplicado em quatro amostras de vinho, as quais foram previamente digeridas em sistema fechado mediante exposição à radiação ultravioleta, levando-as a mineralização de modo a eliminar o efeito de matriz proveniente dos componentes orgânicos.

A otimização do sistema analítico permitiu a quantificação da espécie de interesse por ETAAS. As concentrações de Pb obtidas variaram de 2,19 a 43,48 µg L<sup>-1</sup>. Esses resultados são resumidos na **Tabela 6**, evidenciando correlação com aqueles já reportados pela literatura.

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica com emprego de alumínio como modificador químico apresentou bom desempenho analítico, comparável a outras técnicas espectroanalíticas para determinação de chumbo em amostras de vinho. Alguns trabalhos são comparados com o método desenvolvido nesse estudo na **Tabela 7**.

Martínez et al. (2018) [131] empregaram um procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva para pré-concentração de amostras de vinho acoplada a ETAAS a fim de permitir uma análise direta. Seus resultados demonstraram boa sensibilidade analítica, apresentando LOD de 0,08 µg/L para Pb. Durante etapas de otimização, a reprodutibilidade das análises foi alcançada através da diluição do extrator com metanol. A exatidão foi investigada por testes de recuperação, em que

foi evidenciado uma recuperação de chumbo significativa em torno de 100%, atestando aplicabilidade.

Elçi et al. (2009) [132] propuseram outro método de pré-concentração a partir da geração de hidreto por FAAS. As amostras passaram por procedimentos de diluição com água deionizada e acidificação. As condições experimentais foram otimizadas para formação de hidreto de chumbo (IV). O método foi validado considerando diversos parâmetros, a calibração da matriz foi feita de acordo com técnica de calibração externa. A exatidão foi expressa em termos de teste de recuperação variando de 98% a 110%. Bom desempenho analítico foi alcançado, com baixo limite de detecção (0,16 µg/L).

Também realizando estudos de recuperação para validação do método proposto, Lara et al. (2005) [133] investigaram a detecção de Pb em amostras de vinhos argentinos através de medidas por espectrômetro de plasma acoplado indutivamente. Para isto, o sistema foi operado no comprimento de onda em 220,373 nm. As amostras foram previamente digeridas na presença de ácidos inorgânicos, e, em sequência, foram submetidas à nebulização ultrassônica, alcançando limites de detecção de 0,28 µg/L.

Apesar da complexidade de matrizes de vinho, Ivanova-Petropulos et al. (2015) [134] conseguiram realizar uma análise direta em amostras quando empregado ETAAS. Nesse estudo, a detecção foi viabilizada pelo uso de paládio enriquecido com magnésio como modificador químico. Durante o desenvolvimento do método foi construída uma curva de adição de padrão, confirmando sua exatidão. O limite de detecção encontrado foi de 2,8 µg/L.

Da mesma forma, Tariba et al. (2011) [86] propuseram uma abordagem similar. Amostras passaram apenas por diluição prévia antes da injeção direta no sistema de análise. Pd foi escolhido como modificador químico após processos de otimização do programa de temperaturas. Métodos de validação não evidenciaram efeito de matriz significativo. Os testes de adição de padrão permitiram uma recuperação média de 106% e 114% para diferentes produtos avaliados. O método foi considerado sensível para detecção de chumbo em vinhos, com LOD de 3,0 µg/L.

Os mesmos limites foram encontrados por Bakircioglu et al. (2003) [135] durante procedimentos de pré-concentração por extração em fase sólida. As medidas

foram obtidas por FAAS. Os autores desenvolveram um método empregando uma resina para retenção da espécie de interesse. Procedimentos de digestão assistida por micro-ondas foram realizados previamente para amostras de vinho como pré-tratamento. A exatidão do método proposto foi confirmada a partir de testes de adição e recuperação, onde resultados evidenciaram recuperação de 94 a 104%.

Kinaree e Chanthai (2014) [136] determinaram chumbo em bebidas alcólicas a partir de um procedimento de pré-concentração por extração líquido-líquido homogênea. A quantificação foi estabelecida por FAAS. Amostras de vinho foram tratadas por digestão ácida em sistema aberto. O sistema foi otimizado para obtenção das condições ótimas, sendo validado através da construção de curva de calibração. O sistema apresentou boa sensibilidade, confirmada pela linearidade. Resultados mostram um alto fator de enriquecimento com limite de detecção de 4,0 µg/L.

**Tabela 6 – Comparação de diferentes estudos para determinação de Pb em amostras de vinho.**

<b>Autor</b>	<b>Preparação de amostras</b>	<b>LD</b>	<b>Técnica de detecção</b>	<b>Amostras</b>
Martínez et al. (2018)	5 g de vinho e 5 mL de ácido nítrico concentrado em um recipiente de PTFE - sistema de micro-ondas e microextração líquido-líquido dispersiva.	0,08 µg/L	ETAAS	Vinho branco, rosé, espumante, fortificado e tinto – (Espanhol)
Elçi et al. (2009)	1 mL de vinho foi acidificado pela adição de 40 µL de HCl concentrado e então diluído para 10 mL com a água deionizada e injeção direta.	0,16 µg/L	FI-HG-AAS	Vinho tinto – (Italiano e Californiano)
Lara et al. (2005)	5 mL de vinho, digerido com a adição de 1 mL de ácido perclórico concentrado e 2 mL de ácido nítrico concentrado até a secura.	0,28 µg/L	USN-ICP-OES	Vinho branco e tinto – (Argentino)
Ivanova-Petropulos et al. (2015)	Injeção direta	2,8 µg/L.	ETAAS	Vinho branco – (Macedônio)
Tariba et al. (2011)	Injeção direta	3,0 µg/L	ETAAS	Vinho tinto e branco – (Croata)
Bakircioglu et al. (2003)	5 g de vinho foram digeridos com 5 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado em um forno de micro-ondas. Um mililitro de 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> foi adicionado após o resfriamento à temperatura ambiente.	3,0 µg/L	FAAS	Vinho do porto
Kinaree e Chanthai (2014)	50 mL de vinho digerido em uma placa quente com ácido nítrico concentrado e 5 mL de peróxido de hidrogênio a 30% e extração líquido-líquido homogêneo.	4,0 µg/L	FAAS	Vinho branco e tinto – (Tailandês)
Autor (2021)	5 mL de vinho digerido com peróxido de hidrogênio 70% e lâmpada UV de 8 W em um sistema em linha	0,27 µg/L	ETAAS	Vinho tinto e branco – (Brasileiro)

## 10. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O trabalho proposto teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema de digestão alternativo através do emprego de procedimentos oxidativos avançados. O processo de digestão de amostras mostrou-se uma alternativa promissora, permitindo a determinação de chumbo em matrizes de vinho por meio da técnica de calibração externa.

As técnicas de planejamento experimental por planejamento fatorial completo de dois níveis foram apropriadas para avaliação dos fatores estudados.

A montagem do sistema, constituído por tubo de PTFE enrolados na lâmpada UV, possibilitou um processo de irradiação mais eficiente, favorecendo a mineralização dos componentes orgânicos das amostras estudadas. Ademais, a ausência da adição de outros agentes inorgânicos como ácido nítrico ou ácido clorídrico e a digestão realizado em sistemas fechados, minimizaram os potenciais riscos de contaminação externa das amostras.

Com todas as condições otimizadas, o sistema desenvolvido proporcionou uma degradação eficiente das amostras, as quais foram atestadas pelo baixo teor de carbono apresentado. Dessa maneira, a determinação de chumbo em vinho foi alcançada com baixos limites de detecção obtidos, sendo um método preciso e exato quando comparada com outra técnica analítica (ICP-MS), o que demonstra confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Por fim, salienta-se a operação da digestão em ambiente fechado permitindo seu emprego para quantificação de espécies voláteis, evitando perdas por volatilização quando comparadas a sistemas abertos, um dos problemas mais frequentes durante análises rotineiras. Ademais, o uso de peróxido de hidrogênio a 70% associado a radiação ultravioleta tem permitido o desenvolvimento de métodos de acordo com a Química verde.

---

---

# CAPÍTULO III

---

---

SISTEMA DE DIGESTÃO VERDE EM LINHA USANDO  
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 70% E RADIAÇÃO UV PARA A  
DETERMINAÇÃO DE CROMO EM CERVEJA EMPREGANDO  
ETAAS

## 11. INTRODUÇÃO

A cerveja oriunda de processos de fermentação é uma das bebidas de grande popularidade ao redor do mundo. Marcada por um elevado consumo, apresenta variados sistemas de produção. Embora contenha ingredientes essenciais para sua elaboração, tais como, água, cevada maltada, lúpulo, fermento, esses constituintes são considerados como umas das principais fontes endógenas de metais em bebida. Ainda assim, podem ocorrer transferências desses minerais decorrentes dos recipientes responsáveis por seu armazenamento [139][140].

Apesar disso, muitos metais, sejam em níveis traço ou não, estão ligados diretamente à fermentação do produto, estando condicionados ao metabolismo da levedura. Quando se pensa nessas espécies, tem-se sua atividade como cofator como principal função, uma vez que auxiliam o funcionamento de enzimas. No entanto, o valor nutricional desses constituintes também é dependente de sua especiação, uma vez que influenciam em sua biodisponibilidade e consequente absorção final pelo corpo humano. Dessa maneira, a monitorização desses elementos tem por finalidade a avaliação de seus teores, haja vista a toxicidade que essas espécies possam vir a oferecer, bem como a alteração da qualidade final da cerveja, como estabilidade, formação de névoa, etc [140][141].

O cromo é um elemento onipresente em alguns alimentos, tendo sua atividade vinculada a ações metabólicas que favorecem o emagrecimento. Mineral biologicamente ativo, pode vir a ser detectado em dois estados de oxidação consideráveis, sendo estes o cromo hexavalente e trivalente. O Cr (VI) caracteriza-se por seus elevados níveis de toxicidade estando associados a condições carcinogênicas quando absorvidos pelo organismo. Em contrapartida, o Cr (III) tem-se sua atividade atrelada ao suporte nutricional fornecido e, em vista disso, é comumente empregado como suplemento dietético. Embora seja encontrado no organismo em concentrações baixas, desempenha papéis importantes como a regulação da insulina mediante aumento de sua sensibilidade, auxiliando na perda de peso [142][143][144].

Considera-se a presença de oligoelementos, como o cromo, fundamentais para o funcionamento correto dos processos fisiológicos. No entanto, a sua carência

pode vir a ser correlacionada a problemas de saúde. Este metal é comumente encontrado durante os processos de fermentação, sendo detectados em concentrações traços. Em vista disso, cervejas são tidas como uma das fontes endógenas e exógenas desse mineral [145]. O papel significativo de leveduras da cerveja deve-se a presença do cofator GTF (fator de tolerância a glicose) que apresenta como parte do seu complexo o íon  $\text{Cr}^{3+}$  atuante na sensibilidade da insulina. Conseqüentemente, verifica-se um papel coadjuvante nessa bebida como provedora desses elementos, auxiliando assim no alcance dos níveis diários recomendados [102].

Trabalhos tem evidenciado sua atuação no controle da glicemia e redução de lipoproteínas. Cekic et al. (2010) [146] avaliaram a aplicação de cevada e extratos de levedura de cerveja enriquecidas com Cr como terapia alternativa no tratamento de diabetes: os resultados mostraram uma redução significativa nos níveis de glicemia. Estudos de randomização duplo cego realizados por Martin et al. (2006) [147] apresentaram resultados similares, em que o picolinato de cromo favoreceu o controle glicêmico em indivíduos diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 ao longo do tempo. Em relação ao estudo de coorte, Cefalu et al. (2010) [148] investigaram a suplementação de Cr como recurso terapêutico, sendo constatada uma redução nos níveis de lipídeos miocelulares naqueles indivíduos que responderam a terapia por Cr.

A determinação elementar de metais é rotineiramente realizada empregando-se técnicas espectrométricas atômicas, ao que se deve as baixas concentrações comumente detectadas. Dentre estas, a espectrometria de absorção atômica por atomização eletrotérmica (ETAAS) aparece como alternativa, ao que se deve a facilidade em seu manuseio, alta sensibilidade, condições controladas a partir de um programa de aquecimento prévio, que possibilita a remoção de espécies interferentes que afetem a análise. No entanto, amostras de maior complexidade requerem um maior cuidado na escolha de modificadores químicos, a fim de aumentar a estabilidade térmica do analito quando sucedida a etapa de pirólise, melhorando a performance analítica.

A variedade de compostos orgânicos presentes na cerveja, conferem uma matriz de elevada complexidade, o que torna necessário etapas de processamento de amostras antes de sua análise final, a fim de permitir a degradação ou dissolução de espécies interferentes. Várias técnicas já são descritas visando a mineralização de

componentes orgânicos em solução. Abordagens químicas baseadas na aplicação de processos oxidativos como métodos de preparo de amostras tem ganhado destaque [149]. Diversos estudos têm sido desenvolvidos aplicando POAs como alternativas no tratamento de diferentes amostras, sendo elas ambientais [96][99], de alimentos [44][150], biológicas [151], efluentes farmacêuticos [152], etc. A digestão oxidativa assistida por radiação UV permite a mineralização parcial ou completa de amostras com altos teores orgânicos, minimizando os possíveis efeitos de matrizes que afetem a determinação dos analitos durante a análise.

Vários métodos de preparo de amostra já foram reportados na literatura. Em geral, são padronizados a adição de peróxido de hidrogênio a 30 % (m/m). O emprego de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentrações variadas ainda é uma prática pouco explorada na Química Analítica. No entanto, alguns trabalhos empregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 70% já foram descritos.

Barth e outros colaboradores [153], em um trabalho datado em 1961, desenvolveram um método de pré-tratamento envolvendo a aplicação de peróxido de hidrogênio a 70% durante uma etapa de digestão ácida visando a determinação de boro em amostras biológicas. Os autores exploraram a mistura de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, o que demonstrou vantagens em relação a utilização de outros ácidos, permitindo uma detecção com reprodutibilidade do boro em tecidos biológicos usando um espectrômetro de emissão atômica com plasma de corrente contínua (DCP-AES). Mandelli et al. (2008) [104] propuseram o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 70% durante uma reação de hidroperoxidação de alcanos catalisada por alumínio. Trujilliano et al. (2009) [105] empregaram peróxido de hidrogênio a 70% (m/m) como agente oxidante durante a epoxidação do Z-cicloocteno, o qual mostrou-se mais eficiente quando comparado ao uso de 30 % em peso do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao considerar as conversões realizadas.

Muller e colaboradores propuseram outros trabalhos envolvendo química verde empregando o peróxido de hidrogênio durante a etapa de digestão. A digestão por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 50% proporcionaram uma menor supressão de sinal durante as análises por ICP. Os autores investigaram a eficiência da digestão assistida por micro-ondas durante as análises de amostras para especiação de metais em leite em pó [154] e alimentos ricos em carboidratos [155] e íons brometo, cloreto, iodeto em mel [156].

Goncharuk et al. (2009) [149] investigaram a utilização de  $H_2O_2$  durante a aplicação de POAs a fim de avaliar a cinética de degradação de compostos orgânicos associada a exposição UV, bem como as reações foto oxidativas desencadeadas. Os radicais são formados em sua maior parte, decorrentes da fotólise quando expostos a radiação. As vantagens dessa técnica estão relacionadas à ausência de resíduos gerados, menor custo energético, atuação em condições amenas de temperatura e pressão e maior probabilidade de mineralização completa dos componentes. No entanto, sua eficiência está atrelada a composição química, teor, propriedades físico-químicas das moléculas alvo, presença de espécies concomitantes que possam levar a oxidação ou inibição dos radicais gerados no meio, faixa de pH e seus referidos potenciais oxidante e redutor.

Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo a montagem de um sistema fechado de digestão, seguindo os princípios da Química verde empregando peróxido de hidrogênio a 70% (m/m) associado a radiação ultravioleta ( $H_2O_2/UV$ ), visando a determinação de cromo em amostras de cerveja por ET AAS.

## **12. OBJETIVOS**

### **12.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver um sistema de digestão fechado para determinação de cromo em amostras de cerveja.

### **12.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Empregar uma lâmpada ultravioleta de baixa pressão no desenvolvimento de um sistema em linha para digestão de amostras;

Avaliar a cinética de degradação de amostras por processos de fotólise UV e peroxidação fotoassistida (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);

Utilizar peróxido de hidrogênio na concentração de 70% (m/m);

Otimizar condições experimentais a partir de ferramentas quimiométricas;

Aplicar o método proposto para determinação de Cr em cervejas empregando ET AAS.

## 13. PARTE EXPERIMENTAL

### 13.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todo o trabalho experimental foi desenvolvido utilizando água deionizada e reagentes de grau analítico. A água ultrapura foi obtida através do emprego de um sistema Mili-Q (Millipore, Bedford, EUA), apresentando resistividade específica de 18 M $\Omega$ -cm. As soluções padrões de cromo foram preparadas diariamente por diluição em série a partir de uma solução estoque de Cr de 1000 L<sup>-1</sup> fornecidas pela (Merck, Darmstadt, Alemanha) com ácido nítrico a 0,05%. Ácido nítrico 65% (m/m) e peróxido de hidrogênio 70%(m/m) fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha) e (Peroxy, Bahia, Brasil) respectivamente, foram utilizados durante os experimentos. Todas as etapas de otimização e validação foram realizadas utilizando os padrões de cromo preparados anteriormente. As amostras de cerveja foram obtidas em supermercados localizados no município de Salvador – BA, Brasil, em setembro de 2018.

### 13.2 SISTEMA FECHADO DE DIGESTÃO DE AMOSTRA EM LINHA

O sistema de digestão é composto por uma caixa de madeira com dimensões 50 x 29 x 29 cm<sup>3</sup> (comprimento, altura, largura), as paredes internas foram pintadas inteiramente na cor preta, estando de acordo com o modelo descrito pela **seção 8.2 (Figura 20)**. O sistema foi montado na presença de um tubo de PTFE envolto em uma lâmpada ultravioleta de 15 W com 45 cm de comprimento. A amostra foi circulada pelo tubo de PTFE, através de uma bomba peristáltica, com taxa de fluxo de 2 mL min<sup>-1</sup> por 30 minutos. Durante a etapa de digestão foram utilizados 5,0 mL de amostra de cerveja em contato com 2,0 mL de peróxido de hidrogênio a 70%, para o qual a temperatura da solução digerida variou de 24 a 27 ° C.

### 13.3 ESTRATÉGIA DE OTIMIZAÇÃO

Foram empregadas ferramentas quimiométricas para otimização das condições experimentais. Um planejamento fatorial completo de dois níveis foi estabelecido para avaliação preliminar do sistema digestor, considerando dois fatores investigados, sendo estes o volume de peróxido de hidrogênio e o tempo de irradiação

[157][158]. A resposta quimiométrica escolhida consistiu na absorvância da solução digerida. A região do comprimento de onda foi definida em 450 nm, por apresentar uma região de máxima absorção para cerveja preta. A matriz de planejamento incluiu experimentos no ponto central, utilizando testes em triplicata. Foram consideradas a aleatoriedade dos ensaios. Avaliação do ponto central e não aleatoriedade dos experimentos foi realizada pelo emprego de programas estatísticos (Statistica 6.0). [159]

### 13.4 INSTRUMENTAÇÃO

As medidas de cromo foram realizadas através do emprego de um espectrômetro de absorção atômica ZEE nit 600 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) equipado com um amostrador automático MPE 60 (Analytik Jena) e um atomizador eletrotérmico revestido piroliticamente com aquecimento transversal correção de fundo de efeito Zeeman.

Os parâmetros instrumentais são apresentados na **Tabela 8**. A lâmpada de cátodo oco de cromo foi operada com uma corrente de 5 mA, um comprimento de onda de 357,9 nm e uma largura de banda espectral de 0,8 nm. As medições foram realizadas em tubos pirolíticos de grafite em plataformas PIN. O gás argônio com pureza de 99,997% (White Martins, Salvador, Brasil) foi usado para purga com uma vazão interna de 2,0 L min<sup>-1</sup> em todas as etapas, exceto durante a etapa de atomização, quando o fluxo interno foi parado. O modificador químico, padrões e amostras foram transferidos para o tubo de grafite utilizando o amostrador automático.

*Tabela 7 Parâmetros instrumentais utilizados para determinação por chumbo no ET AAS*

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições operacionais</b>
Comprimento de onda da lâmpada	357,9 nm
Corrente da lâmpada	5 mA
Largura de banda	0,8 nm
Fluxo de gás de purga	2,0 L min – 1
Gás	Argônio

## 14. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 14.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DIGESTOR ONLINE USANDO RADIAÇÃO UV

Durante a otimização foram controlados os parâmetros referente ao tempo de irradiação UV e volume de peróxido de hidrogênio, tendo como efeito avaliado o sinal de absorvância da solução digerida correspondente. O estudo foi condicionado por meio da aplicação de um planejamento fatorial completo de dois níveis considerando dois fatores investigados. A delimitação do estudo é apresentada pela **Tabela 9**, em que são apresentados os valores codificados e reais de cada domínio experimental investigado. A faixa de operação dos fatores variou de 1 a 3 mL e 20 a 40 minutos para o volume de peróxido de hidrogênio e o tempo de irradiação, respectivamente. Os valores médios foram considerados durante os experimentos do ponto central, a fim da determinação do erro experimental e teste de curvatura.

*Tabela 8 Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis 2<sup>2</sup> para avaliação do sistema digestor*

<b>Experimentos</b>	<b>Volume H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mL)</b>	<b>Tempo de irradiação (min)</b>	<b>Absorvância (ABS – 512 nm)</b>
1	-1 (1,0)	- 1 (20)	0,6688
2	+1 (3,0)	- 1 (20)	0,4932
3	-1 (1,0)	+ 1 (40)	0,3091
4	+1 (3,0)	+ 1 (40)	0,1900
<b>CP</b>	<b>0 (2,0)</b>	<b>0 (30)</b>	<b>0,1514</b>
<b>CP</b>	<b>0 (2,0)</b>	<b>0 (30)</b>	<b>0,1752</b>
<b>CP</b>	<b>0 (2,0)</b>	<b>0 (30)</b>	<b>0,1552</b>

A avaliação da significância dos fatores individuais, bem como a sua interação é apresentada na **Tabela 10**. Os efeitos dos fatores (volume H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tempo) e da interação (Volume x Tempo) foram expressos considerando um nível de confiança de 95%, em que as variáveis individuais mostraram-se estatisticamente significativas. Ambas as variáveis (volume de peróxido de hidrogênio e tempo de irradiação UV)

mostraram um efeito significativo negativo (- 0,1474 e - 0,3313 respectivamente). Isto indica que o aumento do volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio e de tempo a exposição UV possibilita uma redução do sinal de absorbância da solução digerida, consequência de uma maior degradação da amostra. Ainda assim, o tempo de irradiação UV mostrou uma atuação maior na degradação da cerveja quando comparada as demais. Por outro lado, concluiu-se que a interação dos fatores (volume x tempo) não foi considerada estatisticamente significativa (+ 0,0283).

*Tabela 9 Efeitos e interações dos fatores estudados*

VARIÁVEL	EFEITO
Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1)	- 0,1474 ± 0,0551
Tempo de irradiação UV (2)	- 0,3313 ± 0,0551
Volume x Tempo (1x2)	+ 0,0283 ± 0,0551

A realização de um planejamento completo de dois níveis está sujeita a execução de experimentos no ponto central, o qual consiste nos valores médios dos fatores investigados, a fim da estimativa do erro experimental associado. O teste de curvatura é responsável pela avaliação do comportamento das respostas nessa região. Esse teste foi calculado seguindo a **Equação 5**.

$$\text{(Equação 5)} \quad \text{Curvatura} = \text{RFD} - \text{RCP}$$

Onde, RFD é a média dos experimentos do planejamento fatorial, e RCP é a média dos experimentos do ponto central.

Quando maior que zero, demonstra-se uma condição de mínimo do ponto central. Em contrapartida, valores negativos indicam uma região máxima. O valor nulo corresponde a não existência estatisticamente diferente entre as médias dos resultados das duas regiões (planejamento fatorial e ponto central), não sendo expresso áreas de máximo ou mínimo na região central [160][161].

Nesse estudo, a média dos experimentos na região do planejamento fatorial completo e ponto central foram 0,4153 e 0,1606, respectivamente. O resultado encontrado foi de +0,2547. Conclui-se a existência de uma condição mínima próximo a região central dos domínios experimentais, como consequência expressa-se uma maior taxa de degradação da amostra empregando um volume de 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 minutos de exposição à radiação UV (15W).

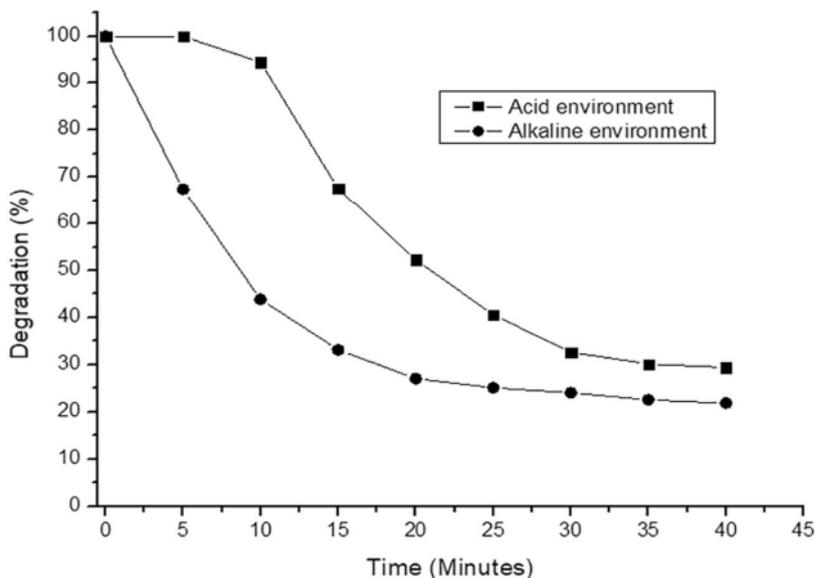
#### **14.2 ESTUDO CINÉTICO DA DEGRADAÇÃO DA CERVEJA USANDO RADIAÇÃO UV E H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 70%**

Após o emprego de ferramentas quimiométricas para otimização dos parâmetros experimentais, as amostras foram submetidas a estudos cinéticos visando as melhores condições de digestão. A degradação da cerveja preta foi desempenhada a partir da aplicação de uma lâmpada ultravioleta de baixa pressão (15 W). As análises foram realizadas através de 5,0 mL de cerveja em contato com 2,0 mL de peróxido de hidrogênio a 70%. O volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tempo de exposição a radiação UV foram determinados previamente.

As amostras foram preparadas e agitadas, sendo posteriormente encaminhadas ao sistema digestor. Os experimentos sucederam-se em um período de 40 minutos, com medições intervaladas do sinal de absorbância de 5 em 5 minutos. As soluções digeridas foram analisadas segundo um comprimento de onda de 450 nm para avaliação da taxa de degradação. Essa região foi definida como condição de máxima absorção.

Os resultados são apresentados pela **Figura 27**. A degradação da cerveja foi acompanhada considerando diferentes faixas de pH (pH 1 e pH 10). Conclui-se que em condições alcalinas a taxa de degradação é acelerada quando comparadas a um ambiente mais acidificado.

**Figura 27** *Curvas de degradação*



As cinéticas de degradação em condições otimizadas foram investigadas empregando um modelo de pseudo-primeira ordem. As degradações das amostras foram acompanhadas pelas medidas da absorbância das soluções residuais. Os valores das constantes de velocidade cinética aparente ( $k_{app}$ ) alcançados foram de  $0,0668 \text{ min}^{-1}$  e  $0,0388 \text{ min}^{-1}$  com coeficiente de correlação de 0,9801 e 0,9089 para um pH igual a 10,0 e 1,0, respectivamente, constatando uma boa correlação linear.

Essa condição está de acordo com o relatado em outros trabalhos, onde é ressaltado a significância do pH na atividade fotocatalítica, as quais podem vir a ser favorecidas em condições específicas. É demonstrado que a combinação da luz UV na presença de um agente oxidante, como peróxido de hidrogênio, em pH alcalino potencializa a geração de espécies reativas que favorecem a degradação da cerveja [162].

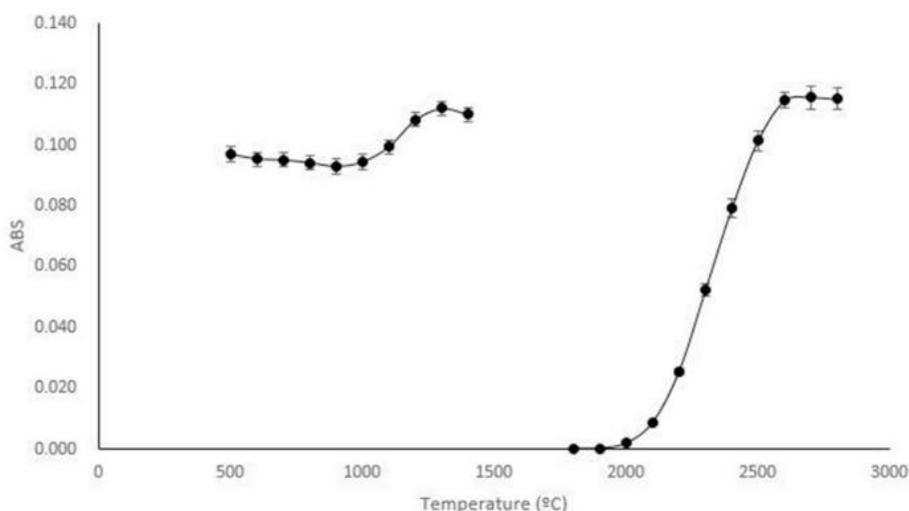
De modo geral, em decorrência da alta complexidade das matrizes de cervejas, reflexo da variedade de componentes orgânicos constituintes, recomenda-se um tempo de digestão de 45 minutos, a fim da eliminação de todo conteúdo orgânico que possa impactar diretamente na análise de outros componentes. O procedimento segue-se pela adição de 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 70% em 5,0 mL de amostra.

### 14.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS EMPREGANDO ET AAS PARA DETERMINAÇÃO DE CROMO

Um estudo univariado foi adotado para avaliar as condições térmicas de pirólise e atomização, garantindo a eliminação completa dos efeitos de matriz ou minimizando-os, sem diminuir a sensibilidade para sua determinação.

Para otimização do programa de temperaturas, foi empregado o magnésio como modificador químico, garantindo uma estabilidade do analito e permitindo uma volatilização seletiva, a fim de melhorar o desempenho analítico. Assim, foram construídas as curvas de pirólise e atomização. A faixa de temperaturas estudada variou de 500 °C a 1400 °C e de 1800 °C a 2800 °C para a pirólise e atomização, respectivamente. Essas curvas são apresentadas na **Figura 28**.

*Figura 28* Curvas de pirólise e atomização empregando magnésio como modificador químico



Um platô de absorvância é observado entre 1300 °C a 1400 °C e de 2500 °C a 2700 °C. Dessa forma, as temperaturas de pirólise e atomização foram definidas em 1300 °C e 2500 °C, respectivamente, considerando a formação de picos, sinais de fundo e melhor resposta. Todos os sinais analíticos foram medidos como valores de absorvância integrados, Aint (área do pico). A etapa de pirólise foi sucedida durante um estágio de 20 segundos.

## 14.4 ESTUDOS DE VALIDAÇÃO

### 14.4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ

Nesse estudo, as curvas analíticas foram obtidas a partir do emprego de padrões aquosos de cromo. A curva de adição de analito também foi obtida, o gráfico foi construído a partir da adição de analito em amostras digeridas pelo sistema proposto em vários pontos. As inclinações das curvas obtidas foram de  $0,0129 \pm 0,0009 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$  e  $0,0138 \pm 0,0011 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$  para a técnica de calibração externa e a técnica de calibração de adição de padrão, respectivamente. Conclui-se a não existência de diferença estatística significativa entre a inclinação das duas curvas. Consequentemente, a determinação de cromo em amostras de cerveja pode ser realizada através da aplicação da técnica de calibração externa com padrões aquosos empregando ETAAS.

### 14.4.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados seguindo as **Equações 1 e 2**, as quais encontram-se descritas na **seção 9.4.2**. Após otimização das condições experimentais, foram permitidas a determinação de cromo em amostras de cerveja. O LOD e LOQ encontrado para o método proposto foi de 0,86 e  $2,90 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente [163].

### 14.4.3 PRECISÃO

A precisão do método foi expressa em termos do desvio padrão relativo (RSD). O cálculo foi realizado seguindo a **Equação 3**, descrita na **seção 9.4.4**. Foram consideradas as medidas de sete repetições das soluções digeridas. O valor encontrado foi de 3,81%.

### 14.4.4 MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO

A exatidão do método proposto foi confirmada a partir da utilização de materiais de referência certificados (CRM), para avaliação da concordância com o

valor real. Foi empregado o material certificado de águas residuais ERM-CA713 (European Reference Materials). Os resultados são apresentados na **Tabela 11**.

*Tabela 10 – Resultado da análise do ERM-CA713 empregando ET AAS*

	Valor certificado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valor encontrado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Cr</b>	$20,9 \pm 1,3 \mu\text{g L}^{-1}$	$19,99 \pm 0,44 \mu\text{g L}^{-1}$

#### 14.4.5 TESTE DE ADIÇÃO/RECUPERAÇÃO

Ensaio de recuperação na matriz também foram realizados. Os valores da recuperação do analito foram calculados pela **Equação 4 (Seção 9.4.5)**. Duas amostras de cerveja foram mineralizadas através do sistema digestor desenvolvido. A **Tabela 12** mostra os resultados encontrados.

*Tabela 11 Determinação de cromo em amostras de cerveja*

Amostra (Cerveja)	Adição de Cr ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cr encontrado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
1	0,0	$7,91 \pm 0,15$	93,2
	5,0	$12,57 \pm 0,31$	
2	0,0	$4,26 \pm 0,06$	96,4
	5,0	$9,08 \pm 0,22$	
3	0,0	$18,60 \pm 0,36$	***
4	0,0	$26,07 \pm 1,15$	***
5	0,0	$24,89 \pm 1,46$	***
6	0,0	$33,28 \pm 0,47$	***

#### 14.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Após validação, o método proposto para determinação de cromo foi aplicado em seis amostras de cerveja, as quais foram previamente digeridas pelo sistema de digestão on-line fechado mediante exposição à lâmpada UV, levando-as a mineralização completa. Após otimização do sistema, as amostras foram quantificadas empregando ETAAS. As concentrações de cromo variaram de 4,26 a  $33,28 \mu\text{g L}^{-1}$ . Esses resultados são expressos pela **Tabela 12**.

A vantagem da técnica deve-se a eficiência na degradação de compostos orgânicos, sem a necessidade da adição de ácidos concentrados, o que contribui para um processo mais verde, reflexo de uma menor geração de resíduos. Outros estudos também já evidenciaram a dependência do pH na taxa de degradação de estruturas orgânicas, uma vez que afetam a protonação das espécies e conseqüentemente a geração dos radicais hidroxila. Essa condição já é vista durante a decomposição de derivados fenólicos e outros demais componentes orgânicos presentes em cerveja após irradiação UV 254 nm direta combinada ao oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A peroxidação foto assistida por sua vez, é responsável pela mineralização das amostras, tendo como produto final a formação de CO<sub>2</sub> e água [164].

O sistema fechado favorece a minimização de erros decorrentes de contaminações, uma vez que a etapa de digestão se sucede em ambiente fechado, minimizando seu contato com o operador. Ademais, o custo operacional baixo favorece sua aplicação, haja vista a necessidade de uma única lâmpada UV de baixa pressão com possibilidade de análises simultâneas.

O peróxido de hidrogênio 70% apresenta um alto potencial oxidativo, o que faz com que não sejam necessários a adição de outros agentes, uma vez que a sua combinação com lâmpada UV já é suficiente para a geração de espécies reativas que desencadeiam reações que levam a destruição do conteúdo orgânico. Em contrapartida, salienta-se o cuidado em relação aos potenciais riscos laboratoriais sujeitos a sua aplicação, haja vista a possibilidade de projeção quando submetidos a uma alta pressão.

## 15. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O estudo teve como foco o desenvolvimento de um sistema fechado para degradação de amostras, onde foi evidenciado um bom desempenho analítico, apresentando boa precisão e exatidão.

As técnicas de planejamento experimental evidenciaram a significância dos fatores estudados, em que as variáveis volume de peróxido de hidrogênio e tempo de irradiação UV demonstram um papel importante na redução dos teores orgânicos das amostras, consequência da alta geração de radicais hidroxila no meio.

O emprego de processos oxidativos avançados mediante associação UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrou ser eficiente na decomposição da matriz de amostras de cerveja. No entanto, a faixa de pH teve um papel significativo na cinética de degradação, sendo favorecida em ambiente alcalino, exibindo uma maior redução do carbono orgânico total. O método proposto recomendou um período de digestão de 45 minutos, a fim de que todo componente orgânico possa ser eliminado.

A metodologia desenvolvida para determinação de cromo em amostras de bebida apresentou bons resultados, o qual tem como vantagens a ausência de ácidos minerais, operação em ambiente fechado, o que reduz possíveis contaminações, sem a necessidade de manuseio de amostras. Dessa maneira, o emprego de ETAAS para quantificação pode ser realizado, alcançando baixos limites de detecção.

## 16. CONCLUSÃO

A proposta do capítulo de revisão foi trazer uma visão ampla sobre alternativas que podem ser aplicadas no procedimento de preparo e análise de amostras em vinhos para determinação de metais. Esse estudo visou atualizar revisões anteriores inserindo metodologia novas como: polímeros impressos e foto-oxidação assistida com peróxido concentrado.

O método analítico desenvolvido mostrou-se eficiente na determinação de Cr e Pb em diferentes amostras de bebidas alcoólicas. Apresentando excelentes resultados de precisão, exatidão e limite de quantificação adequados para a quantificação de todos os íons estudados. Os valores encontrados foram inferiores aos limites permitidos de acordo com as legislações vigentes.

As técnicas de otimização utilizando ferramentas quimiométricas, planejamento fatorial completo, mostraram-se eficiente na otimização dos fatores estudados.

O sistema fechado com a utilização de peróxido de hidrogênio 70 % (m/m) e lâmpada UV mostrou-se eficiente no processo de mineralização das amostras estudadas. Diminuindo a concentração de teor carbono residual obtidos e eliminação do efeito de matriz nas análises.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] MCGOVERN, P.E.; FLEMING, S.J.; KATZ, S.H. **The Origins and Ancient History of Wine**. Taylor & Francis e-Library, 2005.

[2] LEÃO, P.C.S, “Breve Histórico da Vitivinicultura e a sua Evolução na Região Semiárida Brasileira”, An. da Acad. Pernambucana Ciência Agronômica, vol. 7, p. 81–85, 2010.

[3] MCGOVERN, Patrick E. **Ancient wine: The Search for the origins of viniculture**. Princeton University Press, 2003.

[4] W. V. Situation, “2017 World Vitiviniculture Situation oiv Statistical report on World Vitiviniculture © OIV Statistical Report on World Vitiviniculture OIV Statistical Report on World Vitiviniculture ©”, 2018

[5] CANIZO, Brenda V.; ESCUDERO, Leticia B.; PELLERANO, Roberto G.; *et al.* **Quality monitoring and authenticity assessment of wines: Analytical and chemometric methods**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816681-9.00010-2>>.

[6] OIV, “State of the Vitiviniculture World Market 2014”, 37th World Congr. Vine Wine, no November, p. 14, 2014.

[7] IOV, “2019 Statistical Report on World Vitiviniculture”, Int. Organ. Vine Wine, p. 23, 2019, doi: 64/19/6835 [pii]n10.1158/0008-5472.CAN-04- 1678.

[8] BRASIL. Lei nº 7.678 de 08 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho e da outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, 09 nov. 1988.

[9] BRASIL. Decreto nº 8.198 de 20 de fevereiro de 2014. Regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Diário Oficial da União. Brasília, 21 fev. 2004. Seção 1, p.1

[10] BRASIL. Instrução normativa nº 24 de 08 de setembro de 2005. Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres.

[11] SUMMARY, Executive; MONITORING, Wine Process; QUALITY, Wine; *et al.* Wine Analysis: from 'Grape to Glass' An analytical testing digest of the wine manufacturing process. 2016.

[12] JACKSON, Ronald S. **Nature and Origins of Wine Quality**. [s.l.: s.n.], 2017.

[13] BRASIL. Lei nº 10.970 de 12 de novembro de 2004. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho e das outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, 16 nov. 2004.

[14] BRASIL. Instrução Normativa nº 14 de 08 de fevereiro de 2018. Estabelece a complementação dos padrões de qualidade do vinho e derivados da uva e do vinho comercializados em todo território nacional, produzidos no Brasil e importados. Diário Oficial da União. Brasília. 09 mar. 2018. Seção 1, p. 4-6.

[15] LIMA, Luciana Leite de Andrade; FILHO, Artur Bibiano de Melo. **Tecnologia de bebidas**. [s.l.: s.n.], 2011. Disponível em: <[https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiZ1Kii1YvQAhUMIZAKHbprDekQFggdMAA&url=%2Finterstitial%3Furl%3Dhttp%3A%2F%2F200.17.98.44%2Fpronatec%2Fwp-content%2Fuploads%2F2013%2F06%2FTecnologia\\_de\\_Bebidas.pdf&](https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiZ1Kii1YvQAhUMIZAKHbprDekQFggdMAA&url=%2Finterstitial%3Furl%3Dhttp%3A%2F%2F200.17.98.44%2Fpronatec%2Fwp-content%2Fuploads%2F2013%2F06%2FTecnologia_de_Bebidas.pdf&)>

[16] GAUTO, M.A.; ROSA, G.R. Processos e operações unitárias da indústria química. Rio de Janeiro: Editora Ciência Moderna Ltda, 2011.

[17] CARLESSO, Reimar. Absorção de água pelas plantas: água disponível versus extraível e a produtividade das culturas. **Ciência Rural**, v. 25, n. 1, p. 183–188, 1995.

[18] JACKSON, Ronald S. **Chemical Constituents of Grapes and Wine**. [s.l.: s.n.], 2014.

[19] CHEYNIER, Véronique; SCHNEIDER, Rémi; SALMON, Jean Michel; *et al.* Chemistry of wine. **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**, v. 3, p. 1119–1172, 2010.

[20] SUBSTANCES, Mineral; COMPOUNDS, Nitrogen; COMPOUNDS, Volatile; *et al.* Composition of Wine. **Enological Chemistry**, p. 41–52, 2012.

[21] GRINDLAY, Guillermo; MORA, Juan; GRAS, Luis; *et al.* Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 691, n. 1–2, p. 18–32, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.050>>.

[22] BUTNARIU, Monica; BUTU, Alina. **Qualitative and quantitative chemical composition of wine**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816681-9.00011-4>>.

[23] MACHADO, Hussen; NAGEM, Tanus Jorge; PETERS, Vera Maria; *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico: [revisão]. **Bol. Centro Biol. Reprod**, p. 39–33, 2008.

[24] SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P. *et al.* FARMACOGNOSIA Do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.

[25] MARKOSKI, Melissa M.; GARAVAGLIA, Juliano; OLIVEIRA, Aline; *et al.* Molecular properties of red wine compounds and cardiometabolic benefits. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 9, p. 51–57, 2016.

[26] COSTA FREITAS, A. M.; GOMES DA SILVA, M. D.R.; CABRITA, M. J. **Sampling techniques for the determination of volatile components in grape juice, wine and alcoholic beverages**. [s.l.]: Elsevier, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.10126-7>>.

[27] KOKOSA, John M. **Dispersive liquid-liquid microextraction**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00016-5>>.

[28] PRZYJAZNY, Andrzej. **Extraction | Liquid-phase microextraction**. 3. ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12678-2>>.

[29] MARTÍNEZ, David; GRINDLAY, Guillermo; GRAS, Luis; *et al.* Determination of cadmium and lead in wine samples by means of dispersive liquid–liquid microextraction coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p. 178–183, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.013>>.

[30] ESCUDERO, Leticia B.; MARTINIS, Estefanía M.; OLSINA, Roberto A.; *et al.* Arsenic speciation analysis in mono-varietal wines by on-line ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 484–490, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.054>>.

[31] CAMEL, Valérie. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. 7, p. 1177–1233, 2003.

[32] HU, B.; HE, M. Pre-concentration and sample treatment techniques for trace element analysis. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, v. 3, p. 365–394, 2012.

[33] FELIX, C.S.A.; SILVA, L.A.; LEMOS, V.A.; FERREIRA, S.L.C. “CO CO”, 2018.

[34] HAUPT, K., Peer Reviewed: Molecularly Imprinted Polymers: The Next Generation, **Anal. Chem.** 75 (2003) 376 A-383 A.

[35] ANSARI, Saeedeh. Application of magnetic molecularly imprinted polymer as a versatile and highly selective tool in food and environmental analysis: Recent developments and trends. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 90, p. 89–106, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.001>>.

[36] LIU, Houmei; JIN, Pian; ZHU, Fucheng; *et al.* A review on the use of ionic liquids in preparation of molecularly imprinted polymers for applications in solid-phase extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 134, p. 116132, 2021.

[37] NISHIDE, Hiroyuki; DEGUCHI, Jichio; TSUCHIDA, Eishun. Selective Adsorption of Metal Ions on Crosslinked Poly(Vinylpyridine) Resin Prepared With a Metal Ion As a Template. **Chemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 169–174, 1976.

[38] NISHIDE, Hiroyuki; DEGUCHI, Jichio; TSUCHIDA, Eishun. Adsorption of Metal Ions on Crosslinked Poly(4-Vinylpyridine) Resins Prepared With a Metal Ion As Template. **J Polym Sci Polym Chem Ed**, v. 15, n. 12, p. 3023–3029, 1977.

[39] BRANGER, Catherine; MEOUCHE, Walid; MARGAILLAN, André. Recent advances on ion-imprinted polymers. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 6, p. 859–875, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.03.021>>.

[40] RAO, T. Prasada; KALA, R.; DANIEL, S. Metal ion-imprinted polymers-Novel materials for selective recognition of inorganics. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 2, p. 105–116, 2006

[41] LOFGREEN, Jennifer E.; OZIN, Geoffrey A. Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol-gel silica. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 3, p. 911–933, 2014.

[42] MITREVA, Mariya; DAKOVA, Ivanka; KARADJOVA, Irina. Iron(II) ion imprinted polymer for Fe(II)/Fe(III) speciation in wine. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 238–244, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.01.023>>.

[43] F. Na, R. D. E. Poluentes, e D. E. Á. Residuais, “Revisão”, vol. 38, no 3, p. 393–398, 2015.

[44] DOS SANTOS, Walter N.L.; BRANDÃO, Geovani C.; PORTUGAL, Lindomar A.; *et al.* A photo-oxidation procedure using UV radiation/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for decomposition of wine samples - Determination of iron and manganese content by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 601–604, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2009.04.012>>.

[45] DUGO, G.; DI BELLA, G.; RANDO, R.; *et al.* **Sample preparation for the determination of metals in food samples**. [s.l.]: Elsevier, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.10146-2>>.

[46] MATZEK, Laura W.; CARTER, Kimberly E. Activated persulfate for organic chemical degradation: A review. **Chemosphere**, v. 151, p. 178–188, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.055>>.

[47] BULDINI, Pier Luigi; CAVALLI, Silvano; LAL SHARMA, Jawahar. Determination of transition metals in wine by IC, DPASV-DPCSV, and ZGFAAS coupled with UV photolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1993–1998, 1999.

[48] F. Vicari, A. D. Angelo, A. Galia, P. Quatrini, e O. Scialdone, “Co Co”, 2016.

[49] MATUSIEWICZ, Henryk. Wet digestion methods. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 41, p. 193–233, 2003.

[50] FERREIRA, Sergio L.C.; SILVA, Laiana O.B.; DE SANTANA, Fernanda A.; *et al.* A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 307–310, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.08.015>>.

[51] MÜLLER, Edson I.; MESKO, Márcia F.; MORAES, Diogo P.; *et al.* **Wet Digestion Using Microwave Heating**. [s.l.]: Elsevier, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59420-4.00004-0>>.

[52] PYRZYŃSKA, Krystyna. Analytical methods for the determination of trace metals in wine. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 69–83, 2004.

[53] IVANOVA, E. H. Atomic absorption spectrometry/Principles and Instrumentation. **Encyclopedia of Analytical Science**, 149–156, 2005 doi:10.1016/b0-12-369397-7/00024-8

[54] BORGES, D. L. G.; WELZ, B.; HEITMANN, U. **Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua**. n. 1, 2005.

[55] SHALTOUT, Abdallah A.; BOUSLIMI, Jamel; BESBES, Hatem. The challenges of Se quantification in bean samples using line and continuum sources atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 328, n. April, p. 127124, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127124>>.

[56] ARI, Betül; BAKIRDERE, Sezgin; ATAMAN, O. Yavuz. Development of sensitive analytical methods for the determination of thallium at trace levels by slotted quartz tube flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic**

**Spectroscopy**, v. 171, n. July, p. 105937, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105937>>.

[57] AMORIM, Fábio Alan Carqueija; LOBO, Ivon Pinheiro; SANTOS, Vera Lucia C.S.; *et al.* Espectrometria de absorção atômica: O caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1784–1790, 2008.

[58] MOLDOVAN, Mariella. **Atomic Absorption Spectrometry-Flame**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.00022-6>>.

[59] J.A.C. Broekaert, *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*, 20 Edição, **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co**, 2002

[60] LEMOS, Valfredo A.; DE LA GUARDIA, Miguel; FERREIRA, Sérgio L.C. An on-line system for preconcentration and determination of lead in wine samples by FAAS. **Talanta**, v. 58, n. 3, p. 475–480, 2002.

[61] BOSCHETTI, William; RAMPAZZO, Roger T.; DESSUY, Morgana B.; *et al.* Detection of the origin of Brazilian wines based on the determination of only four elements using high-resolution continuum source flame AAS. **Talanta**, v. 111, p. 147–155, 2013.

[62] BURYLIN, Mikhail; PUPYSHEV, Aleksandr. Atomic absorption spectrometry | electrothermal. **Encyclopedia of Analytical Science**, v. 1, n. September 2018, p. 117–128, 2019.

[63] AJTONY, Zsolt; SZOBOSZLAI, Norbert; SUSKÓ, Eموke Klaudia; *et al.* Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content. **Talanta**, v. 76, n. 3, p. 627–634, 2008.

[64] RESANO, M.; FLÓREZ, M. R.; GARCÍA-RUIZ, E. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 88, p. 85–97, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2013.06.004>>.

[65] DESSUY, Morgana B.; VALE, Maria Goreti R.; SOUZA, Anderson S.; *et al.* Method development for the determination of lead in wine using electrothermal atomic absorption spectrometry comparing platform and filter furnace atomizers and different chemical modifiers. **Talanta**, v. 74, n. 5, p. 1321–1329, 2008.

[66] MOLLO, Alicia; SIXTO, Alexandra; FALCHI, Lucía; *et al.* Zinc determination in Tannat wine by direct injection onto graphite tube: Electrothermal AAS as an alternative to flame AAS. **Microchemical Journal**, v. 135, p. 239–244, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.09.008>>.

[67] BONCHIN, Sandra L.; ZOOROB, Grace K.; CARUSO, Joseph A. Atomic emission spectrometry | methods and instrumentation. **Encyclopedia of Analytical Science**, v. 1, p. 177–186, 2019.

[68] FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, María Luisa. **Atomic emission spectrometry | inductively coupled plasma**. 3. ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14542-1>>.

[69] MAKONNEN, Yoseif; BEAUCHEMIN, Diane. **The inductively coupled plasma as a source for optical emission spectrometry and mass spectrometry**. [s.l.]: Elsevier B.V., 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59482-2.00001-4>>.

[70] “Principios De Análisis Instrumental 5a Edición (Skoog, Holler, Nieman) By Polyto.pdf”

[71] ŠELIH, Vid S.; ŠALA, Martin; DRGAN, Viktor. Multi-element analysis of wines by ICP-MS and ICP-OES and their classification according to geographical origin in Slovenia. **Food Chemistry**, v. 153, p. 414–423, 2014.

[72] PÉREZ-ÁLVAREZ, E. P.; GARCIA, R.; BARRULAS, P.; *et al.* Classification of wines according to several factors by ICP-MS multi-element analysis. **Food Chemistry**, v. 270, n. January 2018, p. 273–280, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.087>>.

[73] JUNG, Mun Yhung; KANG, Ju Hui; CHOI, Yun Seo; *et al.* 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**, v. 274, n. March 2018, p. 20–25, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.114>>.

[74] FU, Liang; SHI, Shuyun. A novel strategy to determine the compositions of inorganic elements in fruit wines using ICP-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 299, n. February, p. 125172, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125172>>.

[75] CAPITÁN-VALLVEY, Luis Fermín; LÓPEZ-RUIZ, Nuria; MARTÍNEZ-OLMOS, Antonio; *et al.* Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 23–56, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>>.

[76] DANTAS, Hebertty V.; BARBOSA, Mayara F.; PEREIRA, Anderson; *et al.* An inexpensive NIR LED Webcam photometer for detection of adulterations in hydrated ethyl alcohol fuel. **Microchemical Journal**, v. 135, p. 148–152, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.08.014>>.

[77] MASAWAT, Prinya; HARFIELD, Antony; NAMWONG, Anan. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. **Food Chemistry**, v. 184, p. 23–29, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.089>>.

[78] SOARES, Samara; LIMA, Manoel J.A.; ROCHA, Fábio R.P. A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 195–199, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.029>>.

[79] GONZALEZ, R.C; WOODS, R.E. Woods, **Processamento Digital De Imagens**, 3o Edição, Pearson, São Paulo, 2010.

[80] SANTOS NETO, Joao H.; PORTO, Icaro S.A.; SCHNEIDER, Mateus P.; *et al.* Speciation analysis based on digital image colorimetry: Iron (II/III) in white wine. **Talanta**, v. 194, p. 86–89, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.102>>.

[81] PÉREZ-BERNAL, Juan Luis; VILLAR-NAVARRO, Mercedes; MORALES, M. Lourdes; *et al.* The smartphone as an economical and reliable tool for monitoring the browning process in sparkling wine. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 141, p. 248–254, 2017gal

[82] MAYER, Heidi; MARCONI, Ombretta; FLORIDI, Simona; *et al.* Determination of Cu(II) in Beer by Derivative Potentiometric Stripping Analysis. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, n. 4, p. 332–336, 2003.

[83] IBANEZ, Jorge G.; CARREON-ALVAREZ, Alejandra; BARCENA-SOTO, Maximiliano; *et al.* Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 672–683, 2008.

[84] PYRZYNSKA, Krystyna. Chemical speciation and fractionation of metals in wine. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2007.

[85] GALLO, Monica; FERRARA, Lydia; NAVIGLIO, Daniele. **An Overview of Natural Beverages**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816689-5.00001-8>>.

[86] TARIBA, Blanka. Metals in wine - Impact on wine quality and health outcomes. **Biological Trace Element Research**, v. 144, n. 1–3, p. 143–156, 2011.

[87] ABDULLA, Mohamed. **Chapter 13 - Lead**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805378-2.00014-0>>.

[88] CARRINGTON, C. D.; BOLGER, P. M. Toxic Metals: Lead. **Encyclopedia of Food Safety**, v. 2, p. 349–351, 2014.

[89] FERREIRA, Sergio L.C.; BEZERRA, Marcos A.; SANTOS, Adilson S.; *et al.* Atomic absorption spectrometry – A multi element technique. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 1–6, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.012>>.

[90] BUTCHER, David J. Recent highlights in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 52, n. 9, p. 755–773, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/05704928.2017.1303504>>.

[91] LO DICO, Gianluigi Maria; GALVANO, Fabio; DUGO, Giacomo; *et al.* Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. **Food Chemistry**, v. 245, p. 1163–1168, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.052>>.

[92] HUBER, Charles S.; VALE, Maria Goreti R.; DESSUY, Morgana B.; *et al.* Sample preparation for arsenic speciation analysis in baby food by generation of substituted arsines with atomic absorption spectrometry detection. **Talanta**, v. 175, p. 406–412, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.055>>.

[93] HARTWIG, Carla Andrade; PEREIRA, Rodrigo Mendes; NOVO, Diogo La Rosa; *et al.* Green and efficient sample preparation method for the determination of catalyst residues in margarine by ICP-MS. **Talanta**, v. 174, p. 394–400, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.037>>.

[94] GODSHAW, Joshua; HOPFER, Helene; NELSON, Jenny; *et al.* Comparison of dilution, filtration, and microwave digestion sample pretreatments in elemental profiling of wine by ICP-MS. **Molecules**, v. 22, n. 10, 2017.

[95] DE OLIVEIRA, Richard Macedo; ANTUNES, Ana Clara Nascimento; VIEIRA, Mariana Antunes; *et al.* Evaluation of sample preparation methods for the determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 402–409, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.09.018>>.

[96] CAPELO-MARTÍNEZ, J. L.; XIMÉNEZ-EMBÚN, P.; MADRID, Y.; *et al.* Advanced oxidation processes for sample treatment in atomic spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 331–340, 2004.

[97] TROJANOWICZ, Marek; BOBROWSKI, Krzysztof; SZOSTEK, Bogdan; *et al.* A survey of analytical methods employed for monitoring of Advanced Oxidation/Reduction Processes for decomposition of selected perfluorinated environmental pollutants. **Talanta**, v. 177, p. 122–141, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.002>>.

[98] YÁÑEZ, Jorge; SANDOVAL, Claudio; MANSILLA, Héctor D.; *et al.* New approach for understanding the fundamental chemistry of the oxidative sample digestion in spectrochemical analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 51, n. 10, p. 791–798, 2016.

[99] BENDICHO, Carlos; PENA, Francisco; COSTAS, Marta; *et al.* Photochemistry-based sample treatments as greener approaches for trace-element analysis and speciation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 681–691, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.003>>.

[100] HAVIA, Johanna; NIEMELÄ, Matti; PERÄMÄKI, Paavo. Nano-TiO<sub>2</sub> catalyzed UV-LED sample pretreatment method for decomposition of humic substances in natural water samples. **Microchemical Journal**, v. 133, n. 2016, p. 645–649, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.042>>.

[101] LAGLERA, Luis M.; CAPRARA, Salvatore; MONTICELLI, Damiano. Towards a zero-blank, preconcentration-free voltammetric method for iron analysis at picomolar concentrations in unbuffered seawater. **Talanta**, v. 150, p. 449–454, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.060>>.

[102] BRANDÃO, Geovani C.; AURELIANO, Márcio De O.; CELESTE DA SILVA SAUTHIER, Maria; *et al.* Photo-oxidation using UV radiation as a sample preparation procedure for the determination of copper in fruit juices by flame atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 4, n. 3, p. 855–858, 2012.

[103] ALMEIDA, C. Marisa; VASCONCELOS, M. Teresa S.D. Advantages and limitations of the semi-quantitative operation mode of an inductively coupled plasma-mass spectrometer for multi-element analysis of wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 463, n. 2, p. 165–175, 2002.

[104] MANDELLI, Dalmo; CHIACCHIO, Karyna C.; KOZLOV, Yuriy N.; *et al.* Hydroperoxidation of alkanes with hydrogen peroxide catalyzed by aluminium nitrate in acetonitrile. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 47, p. 6693–6697, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.09.058>>.

[105] TRUJILLANO, Raquel; VICENTE, Miguel A.; RIVES, Vicente; *et al.* Preparation, alumina-pillaring and oxidation catalytic performances of synthetic Ni-saponite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 117, n. 1–2, p. 309–316, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.004>>.

[106] FERREIRA, Sergio Luis Costa; PORTUGAL, Lindomar Andrade; MATOS, Geraldo Domingues; *et al.* Aluminium as chemical modifier for the determination of lead in sugar cane spirits using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 3, n. 5, p. 1168–1171, 2011.

[107] JUNIOR, Mario M.S.; SILVA, Laiana O.B.; LEÃO, Danilo J.; *et al.* Analytical strategies for determination of cadmium in Brazilian vinegar samples using et AAS. **Food Chemistry**, v. 160, p. 209–213, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.090>>.

[108] FERREIRA, S. L.C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

[109] FERREIRA, Sergio Luis Costa; KORN, Maria das Graças Andrade; FERREIRA, Hadla Sousa; *et al.* Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, n. 5, p. 475–491, 2007.

[110] FERREIRA, Sérgio L.C.; DE JESUS, Robson M.; MATOS, Geraldo D.; *et al.* Multivariate optimization and validation of an analytical method for the determination of cadmium in wines employing ET AAS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 788–794, 2009.

[111] DE ZAN, María M.; TEGLIA, Carla M.; ROBLES, Juan C.; *et al.* A novel ion-pairing chromatographic method for the simultaneous determination of both nicarbazin components in feed additives: Chemometric tools for improving the optimization and validation. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 142–150, 2011.

[112] CALDAS, Luiz Fernando S.; DE PAULA, Carlos Eduardo R.; BRUM, Daniel M.; *et al.* Avaliação de diferentes métodos para a determinação de cobre em óleo mineral isolante por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 776–782, 2014.

[113] TEÓFILO, Reinaldo F.; FERREIRA, Márcia M.C. Chemometrics II: Spreadsheets for experimental design calculations, A tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

[114] FERREIRA, Sergio L.C.; LEMOS, Valfredo A.; DE CARVALHO, Vanessa S.; *et al.* Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176–182, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.002>>.

[115] SAMMANI, Mohamad Subhi; CLAVIJO, Sabrina; PORTUGAL, Lindomar; *et al.* Use of multiresponse statistical techniques to optimize the separation of diosmin, hesperidin, diosmetin and hesperitin in different pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography with UV-DAD. **Talanta**, v. 167, n. February, p. 695–702, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.069>>.

[116] AUGUGLIARO, Vincenzo; LITTER, Marta; PALMISANO, Leonardo; *et al.* The combination of heterogeneous photocatalysis with chemical and physical operations: A tool for improving the photoprocess performance. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 7, n. 4, p. 127–144, 2006.

[117] DIAS, Fábio de Souza; LOVILLO, Miguel Palma; BARROSO, Carmelo Garcia; *et al.* Optimization and validation of a method for the direct determination of catechin and epicatechin in red wines by HPLC/fluorescence. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 17–20, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2010.01.004>>.

[118] FERREIRA, Sérgio L.C.; SOUZA, Anderson S.; BRANDAO, Geovani C.; *et al.* Direct determination of iron and manganese in wine using the reference element technique and fast sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 74, n. 4, p. 699–702, 2008.

[119] MUTIC, Jelena; MANOJLOVIC, Dragan; KOVACEVIC, Renata; *et al.* Feasibility of the internal standardization in direct determination of arsenic in wine samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 1, p. 11–14, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2010.10.004>>.

[120] IGLESIAS, Mònica; BESALÚ, Emili; ANTICÓ, Enriqueta. Internal standardization-atomic spectrometry and geographical pattern recognition techniques for the multielement analysis and classification of Catalonian red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 219–225, 2007.

[121] GUO, Wei; WU, Zhiwei; HU, Shenghong; *et al.* Gas collision for improving the precision and accuracy of  $^{11}\text{B}/^{10}\text{B}$  ratios determination in ICP-QMS and its application to determining wine provenance. **RSC Advances**, v. 6, n. 53, p. 47394–47401, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6RA05172C>>.

[122] VIRGILIO, Alex; GONÇALVES, Daniel A.; MCSWEENEY, Tina; *et al.* Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 982, p. 31–36, 2017.

[123] VIRGILIO, Alex; SCHIAVO, Daniela; NÓBREGA, Joaquim A.; *et al.* Evaluation of standard dilution analysis (SDA) of beverages and foodstuffs by ICP OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 6, p. 1216–1222, 2016.

[124] SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 9ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2015.

[125] INMETRO: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Inmetro. Rio de Janeiro, Março, 2006.

[126] BARBOSA, Uenderson A.; DOS SANTOS, Ivanice F.; DOS SANTOS, Ana M.P.; *et al.* Determination of Lead in Iron Supplements by Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 49, n. 6, p. 799–807, 2016.

[127] BORGES, Aline R.; BECKER, Emilene M.; DESSUY, Morgana B.; *et al.* Investigation of chemical modifiers for the determination of lead in fertilizers and limestone using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction and slurry sampling. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 92, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2013.11.001>>.

[128] LIMA, Ariana M.S.; ARAÚJO, Dominique G.G.R.; FERREIRA, Sérgio L.C. Use of tartaric acid-citric acid-sucrose as chemical modifier for the determination of lead in several matrices employing ET AAS. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 368–372, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.12.032>>.

[129] CAMPOS, Náira S.; DE OLIVEIRA, Marcione A.L.; IZUMI, Celly M.S.; *et al.* Alkaline solubilization of chicken tissues monitored by raman spectroscopy followed by pb determination by GF AAS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 2, p. 353–362, 2018.

[130] BRITO, NATILENE MESQUITA; DE AMARANTE JUNIOR, OZELITO POSSIDÔNIO; POLESE, LUCIANA; *et al.* Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

[131] MARTÍNEZ, David; GRINDLAY, Guillermo; GRAS, Luis; *et al.* Determination of cadmium and lead in wine samples by means of dispersive liquid–liquid microextraction coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p. 178–183, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.013>>.

[132] ELÇI, Latif; ARSLAN, Zikri; TYSON, Julian F. Determination of lead in wine and

rum samples by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 2–3, p. 880–885, 2009.

[133] LARA, R.; CERUTTI, S.; SALONIA, J. A.; *et al.* Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 293–297, 2005.

[134] IVANOVA-PETROPULOS, Violeta; JAKABOVÁ, Silvia; NEDELKOVSKI, Dusko; *et al.* Determination of Pb and Cd in Macedonian Wines by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS). **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 1947–1952, 2015.

[135] BAKIRCIOGLU, Yasemin; SEGADE, Susana Rio; YOURD, Emily R.; *et al.* Evaluation of Pb-Spec® for flow-injection solid-phase extraction preconcentration for the determination of trace lead in water and wine by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 485, n. 1, p. 9–18, 2003.

[136] KINAREE, Samat; CHANTHAI, Saksit. Ultra-trace determination of Pb(II) and Cd(II) in drinking water and alcoholic beverages using homogeneous liquid-liquid extraction followed by flame atomic absorption spectrometry. **Chemical Papers**, v. 68, n. 3, p. 342–351, 2014.

[137] TOBISZEWSKI, Marek. Metrics for green analytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 2993–2999, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6AY00478D>>.

[138] GAŁUSZKA, Agnieszka; MIGASZEWSKI, Zdzisław; NAMIEŚNIK, Jacek. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

[139] POHL, Pawel. Determination and fractionation of metals in beer: A review. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 25, n. 6, p. 693–703, 2008.

[140] WUNDERLICH, Sascha; BACK, Werner. General Aspects of Beer and Constituents - Beer Making, Hops and Yeast. **Beer in Health and Disease Prevention**, n. i, p. 3–16, 2009.

[141] SAKELLARI, Aikaterini; KARAVOLTSOS, Sotirios; PLAVŠIĆ, Marta; *et al.* Copper complexing properties, trace metal content and organic matter physico-chemical characterization of Greek beers. **Microchemical Journal**, v. 135, p. 66–73, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.010>>.

[142] VINCENT, John B.; BROWN, Silas. **Introduction: A history of chromium studies (1955–2007)**. Second Edition. [s.l.]: Elsevier B.V., 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64121-2.00001-5>>.

[143] FENG, Weiwei; DING, Yangyang; ZHANG, Weijie; *et al.* Chromium malate alleviates high-glucose and insulin resistance in L6 skeletal muscle cells by regulating glucose uptake and insulin sensitivity signaling pathways. **BioMetals**, v. 31, n. 5, p. 891–908, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10534-018-0132-4>>.

[144] JAMILIAN, Mehri; ZADEH MODARRES, Shahrzad; AMIRI SIAVASHANI, Mehrnush; *et al.* The Influences of Chromium Supplementation on Glycemic Control, Markers of Cardio-Metabolic Risk, and Oxidative Stress in Infertile Polycystic ovary Syndrome Women Candidate for In vitro Fertilization: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Biological Trace Element Research**, v. 185, n. 1, p. 48–55, 2018.

[145] POHL, Pawel. Metals in beer. **Beer in Health and Disease Prevention**, p. 349–358, 2008.

[146] CEKIC, Vlada; VASOVIC, Velibor; JAKOVLJEVIC, Vida; *et al.* Hypoglycaemic action of stevioside and a barley and brewer's yeast based preparation in the experimental model on mice. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 11–16, 2011.

[147] MARTIN, Julie; WANG, Zhong Q.; ZHANG, Xian H.; *et al.* Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 8, p. 1826–1832, 2006.

[148] CEFALU, William T.; ROOD, Jennifer; PINSONAT, Patricia; *et al.* Characterization of the metabolic and physiologic response to chromium supplementation in subjects with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 59, n. 5, p. 755–762, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2009.09.023>>

[149] GONCHARUK, V. V.; SOBOLEVA, N. M.; NOSONOVICH, A. A. Photooxidative destruction of organic compounds by hydrogen peroxide in water. **Journal of Water Chemistry and Technology**, v. 32, n. 1, p. 17–32, 2010.

[150] BRANDÃO, Geovani C. *et al*, Photo-oxidation using UV radiation as a sample preparation procedure for the determination of copper in fruit juices by flame atomic absorption spectrometry, **Analytical Methods**, v. 4, n. 3, p. 855–858, 2012.

[151] RITSEMA, R.; VAN HEERDE, E. Determination of total arsenic in urine by hydride AAS after UV-digestion. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 358, n. 7–8, p. 838–843, 1997.

[152] LIANG, Robert; VAN LEUWEN, Jocelyn C.; BRAGG, Leslie M.; *et al*. Utilizing UV-LED pulse width modulation on TiO<sub>2</sub> advanced oxidation processes to enhance the decomposition efficiency of pharmaceutical micropollutants. **Chemical Engineering Journal**, v. 361, n. December 2017, p. 439–449, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.065>>.

[153] BARTH, Rolf F.; ADAMS, Dianne M.; SOLOWAY, Albert H.; *et al*. Determination of Boron in Tissues and Cells Using Direct-Current Plasma Atomic Emission Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 890–893, 1991.

[154] MULLER, Edson I.; SOUZA, Juliana P.; MULLER, Cristiano C.; *et al*. Microwave-assisted wet digestion with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at high temperature and pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP-OES and ICP-MS. **Talanta**, v. 156–157, p. 232–238, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.019>>.

[155] MULLER, Edson I.; MULLER, Cristiano C.; SOUZA, Juliana P.; *et al*. Green microwave-assisted wet digestion method of carbohydrate-rich foods with hydrogen peroxide using single reaction chamber and further elemental determination using ICP-OES and ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 257–261, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.06.012>>.

[156] MULLER, Edson I.; SOUZA, Juliana P.; ANSCHAU, Kellen F.; *et al*. Determination of Br, Cl and I in honey using ICP-based techniques following microwave-assisted wet digestion with alkaline H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a single reaction chamber. **Analytical Methods**, v. 9, n. 4, p. 649–654, 2017.

[157] DOS SANTOS, Walter Nei Lopes; DE FREITAS SANTOS JÚNIOR, Aníbal; SILVA, Laiana Oliveira Bastos; *et al.* Multivariate optimization of a digestion procedure for bismuth determination in urine using continuous flow hydride generation and atomic fluorescence spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 147–152, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.07.023>>.

[158] ALELUIA, Augusto C.M.; DE SANTANA, Fernanda A.; BRANDAO, Geovani C.; *et al.* Sequential determination of cadmium and lead in organic pharmaceutical formulations using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 157–161, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.09.001>>.

[159] FERREIRA, Sergio L.C.; CAIRES, Adriana O.; BORGES, Thaise da S.; *et al.* Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 163–169, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.004>>.

[160] MASSART, B. G. M. VANDEGINSTE, L. M. C. BUYDENS, S. DE JONG, P. J. LEWI, and J. SMEYERS-VERBEKE. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Data Handling in Science and Technology Volume 20A. Elsevier: Amsterdam, 1997, Xvii + 867 pp. ISBN 0-444-89724-0.

[161] FERREIRA, S.LC. Introdução às técnicas de planejamento de experimentos, 1a. ed., Editora Vento Leste, Salvador, Brasil, 2015.

[162] SANTOS, Larissa R.dos; MASCARENHAS, Artur J.S.; SILVA, Luciana A. Preparation and evaluation of composite with a natural red clay and TiO<sub>2</sub> for dye discoloration assisted by visible light. **Applied Clay Science**, v. 135, p. 603–610, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2016.11.002>>.

[163] UNION, International; PURE, O F; CHEMISTRY, Applied; *et al.* QUALITY ASSURANCE SCHEMES FOR ANALYTICAL LABORATORIES \* HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE- LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS ( IUPAC Technical Report ) Harmonized guidelines for single-laboratory ( IUPAC Technical Report ). v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

[164] SHEN, Yung-Shuen; LIN, Chi-Chang. The Effect of pH on the Decomposition of Hydrophenols in Aqueous Solutions by Ultraviolet Direct Photolysis and the Ultraviolet-Hydrogen Peroxide Process. **Water Environment Research**, v. 75, n. 1, p. 54–60, 2003.