



CATÓLICA  
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE MULTI-ELEMENTAR PARA ANÁLISE  
DE VINHOS, MOSTOS E AGUARDENTES USANDO A TÉCNICA DE  
ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO ÓTICA POR PLASMA ACOPLADO  
INDUTIVAMENTE (ICP-OES)

por

Maria do Rosário Marques de Queirós Rodrigues Salcedas

Julho de 2022





# CATÓLICA

## ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

### VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE MULTI-ELEMENTAR PARA ANÁLISE DE VINHOS, MOSTOS E AGUARDENTES USANDO A TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO ÓTICA POR PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP-OES)

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica  
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Maria do Rosário Marques de Queirós Rodrigues Salcedas

Orientador (Universidade): Doutor António Rangel

Supervisora (Empresa): Doutora Olena Shevchuk



## Resumo

Pela importância do teor mineral nos vinhos em termos de segurança alimentar e qualidade é imperativo que os laboratórios possuam métodos validados para a sua análise e controlo, garantindo a aplicabilidade do ensaio para implementação em trabalho de rotina. O presente trabalho pretende validar um método de análise multi-elementar por ICP-OES em vinhos, mostos e aguardentes. Estudaram-se parâmetros de validação como seletividade e especificidade, quantificação, limiares analíticos, precisão e exatidão. Validou-se o método para quatro elementos: cálcio, ferro, cobre e potássio. Comprovou-se a especificidade do método pela obtenção de taxas de recuperação próximas de 100%. Verificou-se que as funções de calibração seguem um comportamento linear e calcularam-se os limites de deteção e quantificação, que demonstraram a precisão dos valores reportados na gama de trabalho aplicada. Demonstrou-se que o elemento mais sensível é o ferro e o menos sensível é o potássio. O método revelou-se preciso pela obtenção de coeficientes de variação dentro do limite estipulado e a exatidão foi comprovada através da participação em ensaios laboratoriais com a realização de testes de aptidão.

**Palavras-chave: vinho, ICP-OES, quantificação, análise multi-elementar, validação de método**



## **Abstract**

Due to the importance of mineral content in wines in terms of food safety and quality, it is mandatory that laboratories have validated methods for their analysis and control, guaranteeing the applicability of the test for routine implementation. The present work intends to validate a multi-element analysis method by ICP-OES in wines, musts and spirits. Validation parameters such as selectivity and specificity, quantification, detection and quantification limits, precision and accuracy were studied. The method was validated for four elements: calcium, iron, copper and potassium. The specificity of the method was confirmed by obtaining recovery rates close to 100%. It was verified that the calibration functions follow a linear behavior, and the detection and quantification limits were calculated, which demonstrated the accuracy of the reported values in the applied working range. It was revealed that the most sensitive element is iron and the least sensitive is potassium. The precision of the method was attested by obtaining coefficients of variation within the stipulated limit and the accuracy was proven through participation in interlaboratory tests.

**Key words: wine, ICP-OES, quantification, multi-elemental analysis, validation of method**



## Agradecimentos

Com a finalização deste relatório, não posso deixar de sublinhar os meus agradecimentos a algumas pessoas que, direta ou indiretamente, me ajudaram e estiveram presentes neste percurso tão importante da minha vida académica.

Começo por referir o meu orientador neste trabalho, o Professor Doutor António Rangel a quem agradeço a sua disponibilidade, o saber transmitido e a ajuda prestada.

À minha co-orientadora e supervisora na Sogrape, a Doutora Olena Shevchuk a quem agradeço por me ter guiado e encorajado neste trabalho, pela ajuda incansável e persistente que tornou possível a conclusão deste projeto e pelo excelente apoio e confiança.

À Engenheira Cristina Fernandes pela oportunidade de poder estagiar numa das maiores e mais prestigiadas empresas no setor vitivinícola.

A todos os colegas de laboratório, ao Elias, à Vera, ao Nuno, ao Rui, ao Vítor, à Ana Carla e à Celeste, com quem partilhei estes últimos meses, quero agradecer a simpatia e incentivo.

A todos os meus professores, pelo conhecimento transmitido ao longo do meu percurso académico, o meu sincero obrigada.

Às amigas que criei neste mestrado e que conto levar para a vida. Obrigada meninas!

À minha família de um modo geral, que esteve sempre presente quando deles precisei e à minha mãe "Becky" de um modo especial, por ter estado sempre ao meu lado, incentivando-me e fazendo-me acreditar que conseguia chegar ao fim.

Ao Miguel, pela excelente companhia, carinho, paciência, estímulo e apoio demonstrados ao longo destes anos.

Por último, mas nem por isso menos importante, um agradecimento muito, muito especial a duas mini-pessoas que, embora tão pequeninas, com o seu sorriso e alegria tornaram este período mais leve e mais colorido. Obrigada Teresinha e Afonso.



# Índice

Resumo.....	v
Abstract .....	vii
Agradecimentos.....	ix
1. O vinho.....	1
1.1. Classificação de produtos vínicos.....	1
1.2. Mineralização nos vinhos .....	3
1.2.1. Ocorrência quantitativa.....	4
1.2.2. Necessidade de quantificação e definição de limites.....	5
1.2.3. Análise individual de elementos.....	7
1.3. O vinho e o seu impacto na saúde .....	14
2. Espectrometria de emissão atómica por plasma acoplado indutivamente - ICP OES.....	15
2.1. Componentes do ICP e princípio de funcionamento .....	15
2.2. Interferências .....	21
2.3. Vantagens e limitações da técnica ICP-OES.....	21
3. Validação de métodos de análise .....	23
3.1. Avaliação indireta.....	23
3.1.1. Especificidade e Seletividade.....	23
3.1.2. Quantificação .....	23
3.1.2.1. Curvas de calibração .....	23
3.1.2.1.1. Gama de trabalho .....	24
3.1.2.1.2. Linearidade.....	25
3.1.2.1.3. Limiares analíticos do método de ensaio .....	26
3.1.2.1.3.1. Limite de deteção (LD).....	26
3.1.2.1.3.2. Limite de quantificação (LQ) .....	26
3.1.2.2. Sensibilidade .....	27
3.1.3. Precisão .....	27
3.1.3.1. Repetibilidade .....	27
3.1.3.2. Precisão intermédia .....	28
3.2. Avaliação direta.....	28
3.2.1. Exatidão.....	28
3.2.1.1. Avaliação de desempenho.....	28
3.2.1.2. Erro normalizado .....	29
4. Materiais e Métodos.....	30
4.1. Desenvolvimento e otimização do método.....	30

4.2.	Reagentes e materiais .....	30
4.3.	ICP-OES .....	30
4.4.	Preparação de soluções-padrão.....	31
4.5.	Preparação de padrão interno .....	32
4.6.	Preparação de amostras .....	32
5.	Resultados.....	33
5.1.	Validação do método .....	33
5.1.1.	Avaliação indireta .....	33
5.1.1.1.	Quantificação .....	33
5.1.1.1.1.	Curvas de calibração .....	33
5.1.1.1.1.1.	Gama de trabalho.....	36
5.1.1.1.1.2.	Linearidade .....	37
5.1.1.1.1.3.	Limite de deteção e limite de quantificação .....	37
5.1.1.1.1.4.	Sensibilidade.....	38
5.1.1.2.	Seletividade e Especificidade .....	38
5.1.1.3.	Precisão .....	41
5.1.1.3.1.	Repetibilidade .....	41
5.1.1.3.2.	Precisão intermédia .....	42
5.1.2.	Avaliação direta .....	43
5.1.2.1.	Exatidão.....	43
6.	Discussão .....	45
6.1.	Otimização do método.....	45
6.1.1.	Mostos .....	45
6.1.2.	Aguardentes.....	45
6.2.	Validação do método .....	46
6.3.	Comparação entre método OIV e método implementado no laboratório Sogrape....	50
7.	Conclusão.....	52
8.	Trabalho futuro .....	54
	Bibliografia.....	55
	ANEXOS.....	63
	<b>Anexo I:</b> Certificação de solução monoelementar de Al 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	64
	<b>Anexo II:</b> Certificação de solução monoelementar de As 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	65
	<b>Anexo III:</b> Certificação de solução monoelementar de Ca 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	66
	<b>Anexo IV:</b> Certificação de solução monoelementar de Cd 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	67
	<b>Anexo V:</b> Certificação de solução monoelementar de Co 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	68

<b>Anexo VI:</b> Certificação de solução monoelementar de Cr 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	69
<b>Anexo VII:</b> Certificação de solução monoelementar de Cu 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%. ....	70
<b>Anexo VIII:</b> Certificação de solução monoelementar de Fe 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	71
<b>Anexo IX:</b> Certificação de solução monoelementar de K 10000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	72
<b>Anexo X:</b> Certificação de solução monoelementar de Mg 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	73
<b>Anexo XI:</b> Certificação de solução monoelementar de Mn 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%. ....	74
<b>Anexo XII:</b> Certificação de solução monoelementar de Na 10000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%. ...	75
<b>Anexo XIII:</b> Certificação de solução monoelementar de Ni 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	76
<b>Anexo XIV:</b> Certificação de solução monoelementar de Pb 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%.....	77
<b>Anexo XV:</b> Certificação de solução monoelementar de Y 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%. ....	78
<b>Anexo XVI:</b> Certificação de solução monoelementar de Zn 1000 mg/L em HNO <sub>3</sub> 2%. ....	79

## Lista de Figuras

Figura 2-1 - Componentes maioritários e layout de um equipamento ICP-OES. Retirado de (Boss & Fredeen, 2004) .....	15
Figura 2-2 - Representação esquemática do nebulizador de tubo concêntrico. Retirado de (Skoog, et al., 2018).....	17
Figura 2-3 - Representação dos passos de formação de ICP: (A) fluxo de Ar tangencial, (B) aplicação de corrente para carregar bobina para gerar campo eletromagnético no topo da tocha, (C) aplicação de "Tesla spark", (D) indução de ionização de Ar por colisão, (E) formação de plasma. Retirado de (Beauchemin, 2020) .....	18
Figura 2-4 - Zonas constituintes do ICP com a temperatura verificada em cada local aproximadamente. (à esquerda) Modos de visualização do plasma. (à direita). Retirado de (Fernández-Sánchez, 2018).....	19
Figura 2-5- Processos que ocorrem durante a atomização. Adaptado de (Boss & Fredeen, 2004) e (Skoog, et al., 2018).....	20
Figura 5-1: Representação gráfica da curva de calibração do Ca. ....	34
Figura 5-2: Representação gráfica da curva de calibração do Fe.....	35
Figura 5-3: Representação gráfica da curva de calibração do Cu. ....	35
Figura 5-4: Representação gráfica da curva de calibração do K.....	36
Figura 5-5: Espectro do analito Ca com representação dos picos referentes aos padrões de calibração e comprimento de onda de quantificação – 317,933 nm. ....	38
Figura 5-6: Espectro do analito Fe com representação dos picos referentes aos padrões de calibração e comprimento de onda de quantificação – 259,939 nm.....	39
Figura 5-7: Espectro do analito Cu com representação dos picos referentes aos padrões de calibração e comprimento de onda de quantificação – 327,393 nm. ....	39
Figura 5-8: Espectro do analito K com representação dos picos referentes aos padrões de calibração e comprimento de onda de quantificação – 766,490 nm. ....	40



## Lista de Tabelas

Tabela 1-1: Elementos no vinho: níveis de ocorrência, fontes da sua presença e contaminação e efeitos no vinho ou na saúde (quando presentes em concentrações elevadas).....	5
Tabela 4-1: Condições de operação do ICP-OES e configurações instrumentais.....	31
Tabela 4-2: Concentrações dos elementos nos padrões P1-P4. ....	32
Tabela 5-1: Parâmetros de intensidade, concentração e erro residual nos padrões referentes ao Ca a 317,933 nm. ....	33
Tabela 5-2: Parâmetros de intensidade, concentração e erro residual nos padrões referentes ao Fe a 259,939 nm.....	33
Tabela 5-3: Parâmetros de intensidade, concentração e erro residual nos padrões referentes ao Cu a 327,393 nm. ....	34
Tabela 5-4: Parâmetros de intensidade, concentração e erro residual nos padrões referentes ao K a 766,490 nm.....	34
Tabela 5-5: Parâmetros das curvas de calibração para Ca, Fe, Cu e K.....	36
Tabela 5-6: Leituras consecutivas do padrão 1 e padrão 4 e variâncias, valor de PG e valor de F na distribuição de Fisher. ....	36
Tabela 5-7: Parâmetros de desvios-padrão residuais, diferenças de variâncias e valor-teste PG para estudo de linearidade para o K. ....	37
Tabela 5-8: Valores obtidos para o limite de deteção e de quantificação para os 4 analitos. ..	37
Tabela 5-9: Valor da sensibilidade para os 4 elementos. ....	38
Tabela 5-10: Percentagem de recuperação dos 4 analitos em 4 tipos de amostra - vinho tinto (18908), vinho branco (18909), vinho rosé (18907) e vinho do Porto (18858).....	40
Tabela 5-11: Resultados do ensaio de repetibilidade, limite de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade para a amostra de vinho rosé. ....	41
Tabela 5-12: Resultados do ensaio de repetibilidade, limite de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade para a amostra de vinho tinto.....	42
Tabela 5-13: Resultados do ensaio de precisão intermédia, limite de precisão intermédia e coeficiente de variação de precisão intermédia para a amostra de vinho licoroso. ....	42
Tabela 5-14: Resultados do ensaio de precisão intermédia, limite de precisão intermédia e coeficiente de variação de precisão intermédia para a amostra de vinho de mesa. ....	43
Tabela 5-15: Resultados z-score dos ensaios interlaboratoriais BIPEA para os 4 analitos numa ampla gama de amostras. (VM – vinho de mesa, VL – vinho licoroso e E - espumante).44	
Tabela 5-16: Resultados z-score dos ensaios interlaboratoriais ALABE para os 4 analitos numa ampla gama de amostras. (VM – vinho de mesa, VL – vinho licoroso).....	44
Tabela 6-1: Resultados de repetibilidade, LD, LQ e taxa de recuperação no método de OIV e método implementado na Sogrape.....	51



## **Lista de abreviaturas**

**Al** – Alumínio

**Ar** - Árgon

**As** - Arsénio

**B** – Boro

**Ba** – Bário

**Be** – Berílio

**Bi** - Bismuto

**Br** - Bromo

**Ca** – Cálcio

**Cd** - Cádmio

**Co** - Cobalto

**Cr** – Crómio

**Cs** - Césio

**Cu** - Cobre

**Fe** – Ferro

**F** - Flúor

**Ga** – Gálio

**Hg** - Mercúrio

**I** – Iodo

**ICP-OES** – Espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente

**IRZ** - *Initial radiation zone*

**K** - Potássio

**LD** - Limite de deteção

**Li** - Lítio

**LQ** - Limite de quantificação

**Mg** - Magnésio

**Mn** – Manganês

**Mo** - Molibdénio

**Na** – Sódio

**NAZ** - *Normal analytical zone*

**Ni** – Níquel

**OIV** - Organização Internacional da Vinha e do Vinho

**P** - Fósforo

**Pb** – Chumbo

**Rb** – Rubídio

**RF** - Radiofrequência

**S** – Enxofre

**Sb** - Antimónio

**Se** - Selénio

**Si** – Silício

**Sn** - Estanho

**Sr** – Estrôncio

**Tl** – Tálíio

**U** - Urânio

**V** – Vanádio

**W** - Tungsténio

**Y** - Ítrio

**Zn** – Zinco

## 1. O vinho

O vinho é uma das bebidas mais consumidas no mundo e o seu aparecimento remonta aos primórdios civilizacionais (Gayon, 2005). Para além da elevada importância social e económica, tem também um papel de relevância na vertente cultural, com associação ao misticismo (“dádiva de deuses”) e religiosidade (“sangue de Cristo”), contribuindo para enaltecer a bebida que é “fruto da videira e do trabalho do Homem” (IVV, 2018). O vinho é uma bebida alcoólica resultante da fermentação, por ação de leveduras, dos açúcares naturais presentes no sumo de uva. A sua composição é complexa contendo, para além de água e etanol, uma grande variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas (Ribereau-Gayon, et al., 2006).

### 1.1. Classificação de produtos vínicos

Os produtos de origem vínica produzidos e comercializados em Portugal são os vinhos tranquilos, vinhos generosos, vinhos espumantes, vinhos frisantes e espirituosos – aguardente vínica, *brandy* e aguardente bagaceira.

Os vinhos tranquilos são aqueles que não recebem adição de álcool vínico nem contêm gás dióxido de carbono (Infovini, 2009). São comumente designados por vinhos de mesa, apesar de a designação já não ser reconhecida (IVV, 2018). Dentro desta categoria reconhecem-se os vinhos brancos, tintos e rosés. Os **vinhos brancos** podem ser feitos a partir da fermentação de uvas brancas e de uvas de castas tintas vinificadas sem pele. São vinhos límpidos, apresentam várias tonalidades cromáticas (desde o branco-água ao dourado forte) e são bastante suaves e aromáticos (Infovini, 2009) (Afonso, 2015). Os **vinhos tintos** são produzidos a partir da fermentação de uvas tintas. A paleta de cores vai desde o vermelho rubi, com mais ou menos transparência até ao vermelho-escuro, podendo apresentar alguma opacidade. Os tintos jovens são suaves, mais delicados, aromáticos e frutados. Quanto aos envelhecidos têm um aroma mais intenso e complexo, são aveludados e encorpados (Infovini, 2009) (Afonso, 2015). Os **vinhos rosés** sofrem um processo diferente de fermentação: utilizam-se castas tintas e após um período de tempo retiram-se as peles das uvas (depois de ter sido transferida alguma cor rosada), seguindo depois um processo de fermentação sem peles. A cor deste vinho vai desde o rosa-pálido ao vermelho-claro. Conjugua características de leveza e suavidade com o sabor aromático e frutado (Afonso, 2015) (Infovini, 2009).

Os vinhos generosos ou licorosos resultam da adição de álcool (álcool puro ou aguardente) durante a fermentação, de modo a suspender o processo, o que implica que o vinho contenha mais teor de açúcar e de álcool. Neste grupo incluem-se os vinhos do Porto, da

Madeira e o Moscatel (Afonso, 2015). Quanto aos vinhos do Porto, estes podem ser divididos em duas categorias mediante o tipo de envelhecimento: vinhos amadurecidos em madeira (*wood matured*) e vinhos amadurecidos em garrafa (*bottle matured*). Destaca-se o Ruby, feito a partir de uvas tintas e que amadurece por períodos curtos, de dois ou três anos, apresenta uma cor rubi intensa e o sabor remete a frutos vermelhos (Martins, 2011). O estilo Tawny é obtido por lotação de vinhos de grau de maturação variável (IVV, 2018) e estagia em pipas de carvalho. O contacto do vinho com a madeira e oxigénio influencia os perfis de cor (dourado/âmbar) e aroma/flavor (frutos secos e madeira) (Martins, 2011). O Branco apresenta-se em vários estilos por variações na vinificação que permitem a obtenção tanto de vinhos com aromas frescos e exuberantes como outros com aromas a frutos secos e com um perfil tradicional. Podem ser categorizados de acordo com o grau de doçura (extrasseco, seco, meio-seco, doce e muito doce ou lágrima) e mediante o período de envelhecimento (IVDP, 2022). Finalmente, o vinho do Porto Rosé é obtido por maceração pouco intensa de uvas tintas e sem promoção de fenómenos de oxidação durante a conservação, sendo que são considerados vinhos sem envelhecimento, pelo que são consumidos jovens (IVDP, 2022). Nas categorias especiais de vinho do Porto, destacam-se os Vintage, *Late Bottled Vintage* (LBV), data de colheita, indicação de idade (10, 20, 30 e 40 anos), *Crusted* e Reserva (Diário da República, 2009).

Os vinhos espumantes são caracterizados pela presença de dióxido de carbono, originário da fermentação secundária, que lhes atribui a bolha e espuma característica, com influência no seu aspeto, gosto e tipo. Segundo o Regulamento da EU 1308/2013, Anexo VII, Parte II, ponto 4) c), deve apresentar uma sobrepressão não inferior a 3 bar (a 20°C) (Regulamento (UE) n° 1308/2013, 2013). Em Portugal, produzem-se vinhos espumantes brancos, tintos e rosés (Infovini, 2009).

Os vinhos frisantes apresentam algum desprendimento de gás pela presença de dióxido de carbono proveniente da fermentação. O Regulamento da EU 1308/2013, Anexo VII, Parte II, ponto 8) c), refere que este deve apresentar uma sobrepressão em recipientes fechados entre 1 a 2,5 bar (a 20°C) (Regulamento (UE) n° 1308/2013, 2013).

No ramo das bebidas espirituosas destacam-se as aguardentes de origem vínica, onde se encontram as aguardentes vínicas, os *brandys* e as aguardentes bagaceiras. A **aguardente vínica**, segundo o Decreto-Lei 390/86, de 21 de novembro no Art. 3° - 1 é uma bebida espirituosa obtida por destilação exclusiva de vinho ou por redestilação de destilados com um teor alcoólico máximo de 80% (v/v) a 20°C (Decreto-lei 390/86, 1986). Segundo o mesmo Decreto, descrito no Art. 5°, o **brandy** é um produto com um teor alcoólico mínimo de 35%

(v/v) (a 20°C), obtido a partir de aguardente vínica com estágio mínimo de seis meses em vasilhas de carvalho, sendo que podem ser adicionados beneficiadores e aditivos (Decreto-lei 390/86, 1986). **Aguardente bagaceira** (ou bagaço de uva), segundo o Art. 6º do Decreto-Lei n.º390/86, é uma bebida obtida a partir de bagaço de uvas fermentadas e destiladas com teor alcoólico mínimo de 40% (v/v) e máximo de 60% (v/v) (a 20°C) (Decreto-lei 390/86, 1986).

## 1.2. Mineralização nos vinhos

A composição mineral dos vinhos reflete a origem e o percurso do vinho desde o bago até ao copo e pode ser influenciado por diversos fatores (Gadzhieva, 2016). O conteúdo mineral do vinho contribui fortemente para as suas características sensoriais, com influência substancial nos perfis de cor, limpidez, gosto e aroma. Revela também importância a nível de segurança pois a concentração em que os elementos se encontram podem desencadear problemas de ordem toxicológica e legal.

O conteúdo elementar que compõe o vinho pode ser originário de fontes naturais (primária) ou antropogénicas (secundária). Os metais de origem primária provêm do solo onde a vinha está cultivada e estão relacionados com o tipo de solo, a variedade e maturação das uvas, bem como com as condições climáticas verificadas durante o crescimento e maturação das uvas – as vias precursoras do conteúdo mineral que alcança o vinho, vindo do solo (Kunkee & Eschnauer, 2003) (Hernandez, et al., 1996). Os metais de origem secundária resultam de práticas humanas verificadas durante as etapas de produção do vinho, englobando práticas vitivinícolas para proteção e crescimento da vinha, tais como a aplicação de fertilizantes, pesticidas e fungicidas; práticas enológicas relacionadas com o contacto prolongado do vinho com o material constituinte de máquinas, barris, pipas e outros utensílios usados durante as etapas de produção desde a vindima até ao armazenamento e contaminação ambiental proveniente de emissões de veículos ou indústrias (Pohl, 2007) (Aceto, et al., 2003).

O conteúdo metálico dos vinhos é de extrema importância e tem influência significativa na qualidade, estabilidade e valor nutricional dos mesmos (Ivanova-Petropulos, et al., 2016). Os metais presentes no mosto e no vinho apresentam-se sob a forma de catiões e a sua carga é neutralizada maioritariamente por aniões derivados de ácidos orgânicos (Moreno & Peinado, 2012). Os metais são essenciais para o crescimento da vinha, participam em diversas reações redox e são imprescindíveis para processos e metabolismo das células e crescimento de leveduras, sendo indispensáveis para uma eficiente fermentação alcoólica (Tariba, 2011). Por exemplo, potássio (K), magnésio (Mg), sódio (Na) e cálcio (Ca) estabelecem o equilíbrio iónico e mantêm o pH necessário no ambiente das células das leveduras. Outros elementos como cobre

(Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) são necessários para a ativação da metaloenzima prostética. Apesar da necessidade evidente e contributo positivo destes componentes para o crescimento da vinha e produção do vinho, também a conservação e características organoléticas do mesmo podem estar comprometidas pela presença excessiva de algumas substâncias minerais. A precipitação de tartarato de K e Ca, com conseqüente alteração de pH pode levar a dois efeitos indesejáveis – promoção da oxidação de Cu e Fe e fenómenos de turvação por formação de névoa provocados por alumínio (Al), Cu e Fe (Pohl, 2007). Metais como Fe, Cu e Mn podem formar complexos com aminoácidos e polifenóis, que ocorrem durante a maturação e envelhecimento do vinho e determinam as características de envelhecimento, aroma, sabor e cor do vinho (Tariba, 2011). A cor pode ser afetada pela formação de complexos de metais e matéria orgânica. Al, Cu, Fe e Mg podem ligar-se a antocianinas e taninos levando a pequenas alterações na cor do vinho. A atividade de Fe(II) e Cu(II) com quercetina e rutina contribui para o *browning* em vinhos brancos (Fabjanowicz & Płotka-Wasyłka, 2021). O *browning* é o resultado de complexas reações enzimáticas que ocorrem durante o processamento, envelhecimento e armazenamento, que promovem alterações na cor do vinho, pelo aparecimento de cor castanha, diminui o brilho e aumenta o índice de escurecimento, deteriorando a qualidade e afetando a comercialização do vinho (Salacha, et al., 2008).

#### 1.2.1. Ocorrência quantitativa

Os elementos constituintes do vinho podem ser agrupados de acordo com a sua ocorrência quantitativa. Os elementos maioritários em concentrações desde 10 mg/L até 1 g/L e onde se incluem alguns metais alcalinos e alcalino-terrosos, tais como Na, K, Mg, Mg e Ca, responsáveis pela “estrutura metálica” dos vinhos e pela sua capacidade tampão. Incluem-se também neste grupo outros, tais como, silício (Si) sob a forma de ácido silícico, fósforo (P) tanto na forma mineral (fosfatos) como orgânica, enxofre (S) sob a forma de sulfatos, sulfitos e outras espécies, e cloro (Cl) presente em cloretos. Os elementos minoritários que se encontram em concentrações entre 0,1 mg/L e 10 mg/L, incluindo boro (B) sob a forma de ácido bórico, Al, Mn, Fe, Cu, Zn, rubídio (Rb), estrôncio (Sr) e molibdénio (Mo). Definidos como elementos vestigiais, com concentrações geralmente inferiores a 100µg/L distinguem-se os elementos lítio (Li), vanádio (V), crómio (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), gálio (Ga), arsénio (As), selénio (Se), céσιο (Cs), bário (Ba), chumbo (Pb), bromo (Br), iodo (I) e flúor (F). Em teores inferiores a 1µg/L destacam-se os elementos berílio (Be), cádmio (Cd), antimónio (Sb), tungsténio (W), mercúrio (Hg), tálio (Tl), bismuto (Bi), urânio (U) e lantanídeos, característicos de terras raras, e definidos como sub-vestigiais (Catarino & Curvelo-Garcia, 2011).

### 1.2.2. Necessidade de quantificação e definição de limites

O conteúdo metálico dos vinhos é de grande relevância tanto para produtores, enólogos e comerciantes como para consumidores (Frías, et al., 2003). A presença de elementos e a concentração em que estes se encontram têm efeitos diretos na qualidade de mostos e vinhos, além de que podem afetar a saúde humana, pelo que os vinhos devem ser submetidos a um controlo analítico rigoroso. Estes devem estar em conformidade com os regulamentos existentes, garantindo a segurança alimentar e devem ser garantidos parâmetros de tolerância para outros metais dado que o seu conteúdo tem grande influência em características organoléticas e de estabilidade, com impacto comercial direto (Waterhouse & Laurie, 2006). Atualmente existe regulamentação que impõe certos limites legais para concentrações de alguns elementos. Depreende-se, no entanto, que com a crescente preocupação com a saúde e o levantamento de questões ambientais a lista de elementos de necessária monitorização e imposição de limites sofrerá alterações ao longo do tempo podendo conduzir ao aumento de elementos sob regulamentação ou a alterações do ponto de vista do valor máximo aceitável. Exemplo disso é o Regulamento da União Europeia 2021/1317 de 9 de agosto de 2021 que altera os teores máximos de chumbo em certos géneros alimentícios, incluindo o vinho (Comissão Europeia, 2021). Até à data, a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) define os valores máximos de concentração para os elementos Cu, Zn, As, Cd e Pb (OIV, 2015). De seguida, apresenta-se, por ordem alfabética de abreviatura, uma descrição pormenorizada de 15 elementos e um quadro-resumo apresentado na Tabela 1-1.

Tabela 1-1: Elementos no vinho: níveis de ocorrência, fontes da sua presença e contaminação e efeitos no vinho ou na saúde (quando presentes em concentrações elevadas).

Elemento	Níveis de ocorrência	Fontes	Efeitos no vinho/na saúde
<b>Al</b>	0,1-5,40 mg/L	pesticidas com Al, partículas de terra, superfícies de Al, bentonites, taninos, auxiliares de filtração	turvação e gostos e aromas depreciativos
<b>As</b>	geralmente <0,02 mg/L	herbicidas e fungicidas (com arseniato de sódio), bentonites	risco de intoxicação
<b>Ca</b>	50-140 mg/L	uvas, carbonato de cálcio	descaracterização dos vinhos, fenómenos de turvação precipitação
<b>Cd</b>	0,28-5 µg/L	minérios de Zn, poluição atmosférica, inseticidas e fungicidas, materiais com Zn, aço inoxidável	fenómenos de toxicidade
<b>Co</b>	1-20 µg/L	ligas metálicas com Co, bentonites	risco de toxicidade

<b>Cr</b>	4-224 µg/L	aço inoxidável, contaminação dos solos, envelhecimento em garrafa	risco de toxicidade
<b>Cu</b>	0,1-0,2 mg/L	sprays sulfato de cobre, contacto com superfícies de cobre, estanho ou bronze	turvação (casse cúprica) risco de intoxicação
<b>Fe</b>	2-20 mg/L	partículas de terra, equipamento de vinificação, manuseamento e transporte, materiais e auxiliares tecnológicos	turvações e alterações de cor – casse branca e casse azul
<b>K</b>	0,5-2 g/L	solo, variedade e tipo de uva, fertilização do solo, práticas vitivinícolas aplicadas	aumento de pH - instabilidade microbiana, impacto na cor e sabor
<b>Mg</b>	60-150 mg/L	uvas e solo, práticas de viticultura e vinificação (como aplicação de fertilizantes)	atributo sensorial negativo – <i>salty</i>
<b>Mn</b>	1-3 mg/L	solo, produtos fitossanitários, bentonites, enzimas pectolíticas	fenómenos de oxidação
<b>Na</b>	10-40 mg/L	bissulfito de sódio, bentonites e ambiental (proximidade ao mar)	atributo depreciativo - <i>salty</i>
<b>Ni</b>	1-466 µg/L	solo, produtos fitossanitários, poluição atmosférica, bentonites, garrafas de vidro (pigmentos com Ni), aço inoxidável	formação de <i>haze</i> e alterações indesejáveis no aroma e sabor implicações toxicológicas e fisiológicas
<b>Pb</b>	1-620 µg/L	poluição atmosférica (proximidades a vias rodoviárias, fundições e incineradoras), fitossanitários (como arseniato de chumbo), ligas metálicas (com Pb), materiais em bronze e latão, garrafas de cristal, bentonites, cápsulas Pb-Sn, revestimentos cerâmicos	efeitos patológicos (sistema sanguíneo, sistema nervoso, sistema renal e cardiovascular e a nível neurológico e psicomotor)
<b>Zn</b>	0,125-9,40 mg/L	fungicidas à base de ditiocarbamato, equipamento à base de ligas metálicas com Zn	formação de <i>haze</i> , sensação de adstringência fenómenos de toxicidade

### 1.2.3. *Análise individual de elementos*

#### *Alumínio (Al)*

O Al é um elemento naturalmente presente nas uvas, mas a sua presença no vinho é maioritariamente de origem exógena e deve-se essencialmente ao emprego de pesticidas com Al na sua composição, partículas de terra, contacto do vinho com superfícies de Al e a utilização de bentonites, taninos e auxiliares de processos de filtração (McKinnon, et al., 1992) (Catarino, 2006). O uso de bentonites tem sido destacado como a mais destacável fonte de contaminação de Al e têm-se observado aumentos significativos do teor deste elemento em vinhos (Nicolini, et al., 2004) (Catarino, et al., 2008). A sua biodisponibilidade deve-se à grande capacidade de combinar com ácidos orgânicos, entre os quais o ácido tartárico. Publicações revelam que a sua concentração nos vinhos geralmente é inferior a 2mg/L (Interesse, et al., 1984) (Seruga, et al., 1998) (Taylor, et al., 2003) (Jos, et al., 2004) (Catarino, et al., 2006a). Pode desencadear fenómenos de instabilidade físico-química como turvação, bem como atribuir gostos e aromas depreciativos ao vinho, quando presente em quantidades superiores a 10mg/L (Lay & Meyer, 1989) (Scollary, 1997) (Seruga, et al., 1998).

#### *Arsénio (As)*

A presença de As no vinho pode ter origem no solo e dever-se à utilização de herbicidas e fungicidas (com arseniato de sódio na sua composição) e bentonites (Herce-Pagliai, et al., 2002) (Catarino, 2006). O seu teor no vinho é normalmente inferior a 0,02mg/L (Greenough, et al., 1997) (Herce-Pagliai, et al., 2002) (Taylor, et al., 2003) (Jos, et al., 2004) (Thiel, et al., 2004), podendo ser superior em vinhos provenientes de vinhas tratadas com sais arseniosos (Ribereau-Gayon, et al., 2006) (E Schnauer, 1982). Há um predomínio das formas orgânicas nos vinhos, como resultado da biometilação pelas leveduras durante a fermentação, enquanto nos mostos há uma prevalência significativa das formas inorgânicas (Herce-Pagliai, et al., 2002). É um elemento relacionado com um elevado número de intoxicações e problemas de saúde, isto é, as formas inorgânicas de As podem causar intoxicação aguda ou crónica e está relacionado a vários tipos de cancro, maioritariamente ao cancro de pele (Herce-Pagliai, et al., 2002) (Larsen, et al., 2002). Constitui um perigo para a saúde quando a concentração é superior a 1 mg/L. A OIV definiu que o limite máximo para a concentração de As no vinho é de 0,2 mg/L (OIV, 2015).

#### *Cálcio (Ca)*

A principal fonte de Ca é a uva. Em menor escala, este pode ser proveniente de contaminação através do solo e do cimento de tanques de armazenamento, menos comum

atualmente pelo decréscimo do uso (Rankine, 1989). Pode ter origem em produtos enológicos pela adição de carbonato de cálcio para desacidificação, que resulta na precipitação de tartarato de cálcio. O conteúdo de Ca em vinhos varia entre 50-140 mg/L (Frias, et al., 2001) (Trujillo, et al., 2011) (Moreno & Peinado, 2012). No entanto, doses excessivas podem descaracterizar os vinhos e desencadear fenómenos de turvação devido ao excesso do elemento (Rizzon & Gasparin, 2005). Os fenómenos de instabilidade por risco de precipitação podem ser significativos com níveis de Ca de 60 mg/L no vinho tinto e 80 mg/L no vinho branco (Moreno & Peinado, 2012).

#### *Cádmio (Cd)*

O Cd é considerado extremamente tóxico, bio acumulativo e cancerígeno e pode entrar no organismo quer por via respiratória, oral como cutânea, sendo, por óbvias razões de segurança e controlo um dos metais contaminantes mais investigados (Cabanis, et al., 1996) (Larsen, et al., 2002). A sua toxicidade deve-se principalmente ao facto de ser um inibidor de enzimas (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Está associado a minérios de Zn e geralmente sob a forma de sulfureto ( $CdSO_4$ ), chegando ao vinho por absorção radicular. A sua presença está associada a locais com elevada poluição atmosférica, à utilização de inseticidas e fungicidas e ao contacto com materiais com Zn na sua composição e aço inoxidável (Curvelo-Garvia, 1988) (Catarino, 2000). Durante a fermentação alcoólica e com o decorrer da mesma há uma eliminação significativa de Cd (Catarino, 2000). Estudos publicados desde o início do século demonstram teores em vinho geralmente inferiores a 5  $\mu\text{g/L}$ , (Catarino, 2000) (Barbaste, et al., 2003) (Taylor, et al., 2003) (Lima, et al., 2004) (Thiel, et al., 2004) sendo que melhores condições de elaboração e processamento podem justificar o alcance e a tendência crescente para uma diminuição nos teores de Cd (Ribereau-Gayon, et al., 1982). Um estudo realizado com 95 vinhos portugueses revelou um teor médio de 0,28  $\mu\text{g/L}$  e um teor máximo de 1,24  $\mu\text{g/L}$  (Catarino & Curvelo-Garcia, 1999) (Catarino, 2000).

#### *Cobalto (Co)*

O Co é um elemento essencial, no entanto, potencialmente tóxico se ingerido em quantidades excessivas, cuja toxicidade é manifestada pela ocorrência de reações alérgicas (Berg & Licht, 2002). A sua presença exógena em vinhos deve-se sobretudo a ligas metálicas com Co (Curvelo-Garvia, 1988) e à utilização de bentonites (Nicolini, et al., 2004). Os dados referidos na literatura de estudos realizados em vinhos revelam que geralmente os níveis deste elemento se encontram abaixo de 10  $\mu\text{g/L}$  (Soares, et al., 1995) (Greenough, et al., 1997) (Gómez, et al., 2004) (Thiel, et al., 2004) (Catarino, 2006) (Catarino, et al., 2008).

### *Crómio (Cr)*

O Cr é um elemento essencial ao metabolismo da glucose, colesterol e proteínas (Hurrell et al., 2001) e pode existir em diferentes estados de oxidação. O Cr(III) é essencial para organismos vivos, no entanto, o Cr (VI) é cancerígeno e pode causar danos no DNA (Templeton & Fujishiro, 2017). A forma química mais frequente no vinho é Cr(III), com toxicidade reduzida, não devendo, no entanto a sua ingestão exceder 200 µg diários (Lendinez, et al., 1998). Estima-se que a principal origem de contaminação seja a dissolução de Cr pelo contacto com aço inoxidável (E Schnauer, 1982) (Médina & Sudraud, 1980), podendo também ser proveniente do envelhecimento do vinho em garrafa. (Médina & Sudraud, 1980) e ter como fonte a contaminação dos solos. A sua presença no vinho está normalmente abaixo de 60 µg/L (Médina & Sudraud, 1980) (Ribéreau-Gayon, et al., 1982) (Greenough, et al., 1997) (Lendinez, et al., 1998) (Kristl, et al., 2002) (Huguet, 2004)

### *Cobre (Cu)*

Trata-se de um oligoelemento fundamental nos tecidos vegetais dado que é um cofator de diversas reações enzimáticas. No entanto, quando em doses altas torna-se tóxico, o que justifica a necessidade de imposição de um limite legal (Ribéreau-Gayon, et al., 1982). A OIV impõe um limite de 1 mg/L para os vinhos, à exceção dos vinhos licorosos cujo limite é 2 mg/L (OIV, 2015). O Cu pode vir das uvas, mas a maior provém de tratamentos com sprays de sulfato de cobre (Ribéreau-Gayon, et al., 1982) (Scollary, 1997). A sua concentração nos mostos é de cerca de 10 a 20 mg/L, sendo que grande parte é eliminado por redução durante a fermentação, por precipitação de sulfuretos insolúveis que são eliminados com leveduras e borras que adsorvem o cobre, originando vinho com teores de Cu na ordem dos 0,1 a 0,2 mg/L (Ribéreau-Gayon, et al., 1982) (Taylor, et al., 2003). A concentração de Cu pode aumentar durante a conservação e envelhecimento do vinho pelo contacto do mesmo com superfícies de cobre, estanho ou bronze (Ribéreau-Gayon, et al., 1982). Nos vinhos licorosos esta concentração pode aumentar pela adição de aguardente (Almeida, et al., 1994). Mesmo quando presente em concentrações baixas, Cu atua como catalisador de oxidação em vinhos (Scollary, 1997) e também promove a ocorrência de casse férica (Ribéreau-Gayon, et al., 1982). Pode causar turvação (casse cúprica) quando em teores superiores a 1 mg/L, fenómeno acelerado durante o envelhecimento pela luz, na ausência de ar e altas temperaturas (Scollary, 1997).

### *Ferro (Fe)*

O Fe encontra-se presente no vinho normalmente entre 2 a 20 mg/L. Este teor advém, em pequena percentagem, das uvas (2 a 5 mg/L) (Curvelo-Garvia, 1988) (Taylor, et al., 2003),

sendo que o restante provém do solo, do equipamento de vinificação, manuseamento e transporte bem como de materiais e auxiliares tecnológicos (Curvelo-Garcia & Catarino, 1998) (Ribereau-Gayon, et al., 2006). O Fe está presente no vinho sob a forma de cloreto ferroso e férrico, mantendo um equilíbrio. A relação  $(\text{Fe}^{3+})/(\text{Fe}^{2+})$  depende das condições de armazenamento, especialmente da concentração de dióxido de enxofre livre (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Quando presente em teores de 10 a 20 mg/L pode provocar turvações ou alterações da cor (Curvelo-Garvia, 1988). A forma  $\text{Fe}^{3+}$  é a responsável pela ocorrência de casse férrica. Em vinhos conservados sem contacto com ar, o Fe encontra-se sob a forma de Fe(II), solúvel. Quando se verifica arejamento, este é oxidado a Fe(III), potenciando fenómenos de alteração. Nos vinhos brancos, ocorre a reação de  $\text{Fe}^{3+}$  com ácido fosfórico, originando um coloide instável que precipita – casse branca. Nos vinhos tintos reage com fenóis, originando um complexo que precipita, levando ao aumento da intensidade da cor – casse azul (Ribereau-Gayon, et al., 2006). O Fe é também um catalisador de fenómenos de oxidação e intervém também em processos de envelhecimento (Cacho, et al., 1995). De realçar que o crescente emprego de aço inoxidável reduziu o excesso de Fe e conseqüentemente a probabilidade de ocorrência de casse férrica (Ribereau-Gayon, et al., 1982). Não se prevê possíveis perigos de origem toxicológica tendo em conta os teores em que se encontra presente nos vinhos (Curvelo-Garvia, 1988)

#### *Potássio (K)*

O K é um elemento dominante no vinho, presente em concentrações de 0,5 a 2 g/L, com uma média de 1 g/L (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Desempenha um papel importante na regulação do pH e acidez do mosto e do vinho. É um importante cofator para uma grande variedade de enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa, biossíntese proteica e metabolismo dos hidratos de carbono (Rebordinos, et al., 2022). O teor de K no vinho é dependente do nível de potássio no solo, da variedade e tipo de uva, da fertilização do solo e de práticas vitivinícolas aplicadas (Jordão & Cosme, 2022). Altas concentrações de K podem ter um impacto significativo na qualidade do vinho. O K pode combinar-se com o ácido tartárico e formar bitartarato de potássio, composto insolúvel, que resulta num aumento de pH. Valores de pH elevados favorecem a instabilidade microbiana e têm impacto na cor e sabor do vinho (Navarro & Navarro, 2022).

#### *Magnésio (Mg)*

O Mg tem funções estruturais e metabólicas essenciais e é imprescindível para o crescimento de leveduras. É um macroelemento que estabelece o ambiente metálico catiónico

necessário nas células da levedura (juntamente com o K) (Rebordinos, et al., 2022). É também um macroelemento essencial para o desenvolvimento da videira pois representa um papel crucial na fotossíntese (Gerendás & Führs, 2013) (Maathuis, 2009). O Mg está naturalmente presente nos bagos de uva, no entanto, pode haver um aumento deste elemento pelas práticas de viticultura e vinificação aplicadas (Jordão & Cosme, 2022). O vinho contém entre 60 a 150 mg/L de Mg e as concentrações deste não diminuem durante a fermentação ou o envelhecimento do vinho visto que os sais de Mg são solúveis (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Em vinhos espumantes, o Mg pode ter um efeito na efervescência (Maujean, et al., 1988). Altas concentrações de Mg podem estar associadas a um atributo sensorial negativo, por conferirem características *salty* (Cabello-Pasini, et al., 2012).

#### *Manganês (Mn)*

O Mn é um elemento presente nos vinhos em concentrações de 1 a 3 mg/L (Ribereau-Gayon, et al., 2006). De realçar que as sementes contêm três vezes Mn do que as peles e cerca de 30 vezes mais do que a polpa, (Moreno & Peinado, 2012) o que justifica os valores mais elevados verificados em vinhos tintos pelas técnicas de vinificação aplicadas nos mesmos (Ribereau-Gayon, et al., 2006). A presença deste elemento no vinho deriva principalmente do conteúdo de manganês presente no solo da vinha. Por outro lado, pode ser de natureza exógena, pela utilização de produtos fitossanitários, e utilização de produtos enológicos como bentonites e enzimas pectolíticas (Cabrera-Vique, et al., 2000). O Mn revela interveniência nos processos de oxidação. Este favorece a formação de acetaldeído, com efeito nos compostos fenólicos e taninos (Cacho, et al., 1995). Trata-se de um oligoelemento de especial importância no organismo e essencial em baixos teores, sendo que a deficiência ou o excesso deste elemento podem ter impacto negativo no metabolismo cerebral (Cabrera-Vique, et al., 2000).

#### *Sódio (Na)*

O Na está presente em quantidades pequenas no vinho, entre 10 a 40 mg/L (Ribereau-Gayon, et al., 2006). No entanto, pode existir em concentrações maiores como resultado de práticas vitivinícolas, como a utilização de bissulfito de sódio ou bentonites. Além disso, vinhos produzidos em locais com aproximação geográfica do mar podem apresentar maiores teores de Na (Moreno & Peinado, 2012). Pode ter efeitos no perfil sensorial dos vinhos, quando em concentrações altas, atribuindo-lhes características descritas como *salty* (Cabello-Pasini, et al., 2012).

#### *Níquel (Ni)*

O Ni contribui em mecanismos fisiológicos das plantas, no metabolismo do azoto e como catalisador enzimático (Boschetti, et al., 2014). É um dos elementos cuja essencialidade ou toxicidade está amplamente relacionada com as concentrações em que este se encontra. É um metal pesado essencial em baixas concentrações, mas tóxico em elevadas. Estudos realizados indicam sérias implicações toxicológicas e fisiológicas pela exposição a este metal, sendo que este pode afetar múltiplos órgãos (Das, et al., 2019). A presença de Ni nos vinhos pode ser de natureza endógena, por absorção de componentes do solo pela raiz da videira, ou de natureza exógena pela utilização de produtos fitossanitários, contaminação atmosférica (principalmente nas proximidades a zonas com elevado tráfego rodoviário), bentonites e conservação e envelhecimento em garrafas de vidro (pelos pigmentos com Ni usados na sua produção) (Teissèdre, et al., 1998) (Catarino & Curvelo-Garcia, 2011). No entanto, tudo indica que a principal fonte de contaminação deste metal pesado seja a utilização de equipamentos em aço inoxidável (Teissèdre, et al., 1998). Tendo em conta a acidez do vinho, pode corroer equipamento de vinificação feito de ferro e ligas metálicas, como bronze e, como consequência, o Ni (a par de outros) pode dissolver no vinho (Moreno & Peinado, 2012). A presença de Ni pode contribuir para formação de *haze* e alterações indesejáveis no aroma e sabor dos vinhos (Tariba, 2011). Estudos publicados indicam que o teor deste elemento está entre 1 e 466 µg/L (Interesse, et al., 1984) (Greenough, et al., 1997) (Pérez-Jordán, et al., 1999) (Taylor, et al., 2003) (Jos, et al., 2004) (Catarino, et al., 2006b) (Gonzalez, et al., 2021)

#### *Chumbo (Pb)*

O Pb é o foco de diversos estudos pela sua toxicidade e implicações fisiológicas. Os efeitos patológicos do Pb atingem diversos sistemas e órgãos: sistema sanguíneo, sistema nervoso, sistema renal e cardiovascular e a nível neurológico e psicomotor (Carmen de la Torre, 1997). Este encontra-se presente nos solos maioritariamente sob a forma de sulfuretos, carbonatos e sulfatos. A maior parte da exposição humana ao chumbo (aproximadamente 80%) é através da ingestão de alimentos (Ribereau-Gayon, et al., 2006). A principal fonte de contaminação deste elemento no vinho é a poluição atmosférica (Médina, et al., 2000), associada a proximidades a vias rodoviárias, fundições e incineradoras. Foram identificadas como fontes de contaminação a utilização de fitossanitários (como arseniato de chumbo), contacto com ligas metálicas que contêm chumbo, bronze e latão, conservação em garrafas de cristal, bentonites, cápsulas de chumbo e estanho (Pb-Sn) e revestimentos cerâmicos (Catarino & Curvelo-Garcia, 2011). No decorrer da fermentação alcoólica e etapas subsequentes parte do Pb é removido pela precipitação sob a forma de sulfuretos, precipitação com macromoléculas

do vinho e absorção e adsorção das leveduras (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Tem-se observado uma diminuição da ocorrência deste elemento em vinhos, associado à eliminação de fontes de contaminação. Estudos variados indicam que a concentração no vinho é geralmente inferior a 100 µg/L (Larsen, et al., 2002) (Stockley, et al., 2022) (Taylor, et al., 2003) (Gómez, et al., 2004) (Jos, et al., 2004) (Lima, et al., 2004), havendo, porém, estudos que demonstram a existência de vinhos com teores mais elevados (Catarino & Curvelo-Garcia, 1999) (Galani-Nikolakaki, et al., 2002) (Barbaste, et al., 2003) (Castiñeira, et al., 2004). Tem-se verificado também uma redução progressiva do nível máximo aceitável de Pb no vinho. O Regulamento (UE) 2021/1317 da Comissão de 9 de agosto de 2021 reduziu os teores máximos do vinho produzido a partir de uvas de 0,2 mg/kg para 0,1 mg/kg e fixou um teor máximo de 0,15 mg/kg para os vinhos licorosos/generosos, limites aplicados a partir da vindima de 2022 (Comissão Europeia, 2021).

#### Zinco (Zn)

O Zn encontra-se naturalmente presente sob a forma de sulfuretos. Trata-se de um oligoelemento imprescindível para o desenvolvimento e crescimento vegetal. A deficiência em Zn pode ter implicações no tamanho da videira, disposição e cor das folhas e malformações nas raízes (Ribereau-Gayon, et al., 2006). A sua presença pode ser de natureza endógena, pela assimilação pelas raízes da videira; e de natureza exógena, pela aplicação de fungicidas à base de ditiocarbamato (Salvo, et al., 2003), e contacto com equipamento à base de ligas metálicas que contêm Zn (Curvelo-Garvia, 1988) (Ribereau-Gayon, et al., 2006). No decorrer da fermentação alcoólica, há uma redução significativa no teor de Zn, pela insolubilidade do sulfureto (Curvelo-Garvia, 1988). O teor de Zn está amplamente dependente da intensidade aplicada em processos de maceração, extração e solubilização dado que este está maioritariamente presente nas películas e grainhas da uva (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Teores elevados de Zn nos vinhos podem conduzir a fenómenos de instabilidade físico-química, pela formação de *haze*, (Tariba, 2011) e afetar as características sápidas dos vinhos, pela promoção de sensação de adstringência (Fournier, et al., 1998). É também um elemento de especial interesse pela sua toxicidade quando ingerido excessivamente. A OIV impõe como limite máximo admissível em vinhos 5 mg/L (OIV, 2015), sendo que a bibliografia indica que a maioria dos vinhos analisados se encontra abaixo do limite estabelecido (Gómez, et al., 2004) (Greenough, et al., 1997) (Frías, et al., 2003) (Taylor, et al., 2003) (Catarino, et al., 2006a), havendo, no entanto, estudos que revelam vinhos com teores acima do limite estabelecido (Sudraud, et al., 1995).

### 1.3. O vinho e o seu impacto na saúde

O vinho destaca-se como uma fonte de compostos orgânicos e inorgânicos biologicamente ativos potencialmente benéficos para a saúde, como antioxidantes, polifenóis, vitaminas e minerais (German & Walzem, 2000). A aparente influência positiva na saúde humana foi descrita em diversos estudos que revelam o potencial benefício do consumo baixo a moderado, especialmente vinho tinto rico em polifenóis (Guilford & Pezzuto, 2011). Há evidência que suporta a conexão entre o consumo moderado e uma diminuição do risco de contrair doenças cardiovasculares (de Caetano, et al., 2016), Diabetes *mellitus* tipo 2 (Caimi, et al., 2003a), e certos tipos de cancro (Bianchini & Vainio, 2003). Há ainda associações a uma melhoria nas funções cognitivas (Arteroa, et al., 2015), e funciona como um importante adjuvante na dieta – combate a obesidade e o ganho de peso (Stockley, et al., 2022).

Quanto ao conteúdo metálico, para além dos efeitos na qualidade do vinho, os metais presentes têm também impacto na saúde humana. O consumo moderado de vinho pode contribuir para a ingestão diária de metais essenciais, incluindo Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni e Zn (Eschnauer & Neeb, 1988). Elementos como Cu, Fe e Zn são necessários em processos fisiológicos e apresentam benefícios nutricionais, no entanto, as concentrações destes devem ser mantidas abaixo do limite aceitável, pois a sua ingestão excessiva pode conduzir a fenómenos de toxicidade. Por exemplo, a ingestão de vinho com conteúdo elevado de Cu pode criar desconfortos gastrointestinais e a sua ingestão prolongada pode danificar fígado e rins (WHO - World Health Organization, 1998). Por outro lado, há também elementos potencialmente tóxicos e que não apresentam quaisquer benefícios nutricionais ou valor fisiológico, como Al, As, Cd e Pb e cuja ingestão elevada ou exposição prolongada pode representar um risco para a saúde humana (Solfrizzi, et al., 2006) (Ng, et al., 2003) (Telišman, et al., 2001) (WHO - World Health Organization, 2010) (WHO - World Health Organization, 1992).

## 2. Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente - ICP OES

O ICP-OES é uma técnica analítica que permite a determinação de elementos em concentrações vestigiais em diversos tipos de amostra. O princípio da técnica baseia-se na excitação de elétrons do átomo por uma descarga de radiofrequência (RF) (Majumdar & Dubey, 2017) que, quando retornam do estado excitado para o estado fundamental, emitem energia a um determinado comprimento de onda característico (Olesik, 1991). Tendo em conta que o número total de fótons é diretamente proporcional à concentração do elemento na amostra analisada, obtém-se informação quantitativa acerca da concentração do elemento em análise pela intensidade emitida no comprimento de onda relativo ao elemento (Fernández-Sánchez, 2018).

### 2.1. Componentes do ICP e princípio de funcionamento

O ICP-OES é constituído pelos seguintes componentes: gerador de radiofrequências (RF), indutor para formar o plasma, tocha, bomba peristáltica, sistema de introdução de amostra (inclui nebulizador, câmara de nebulização e injetor), colimador (lentes e espelhos), sistema de dispersão e um detetor, representados na Figura 2-1.

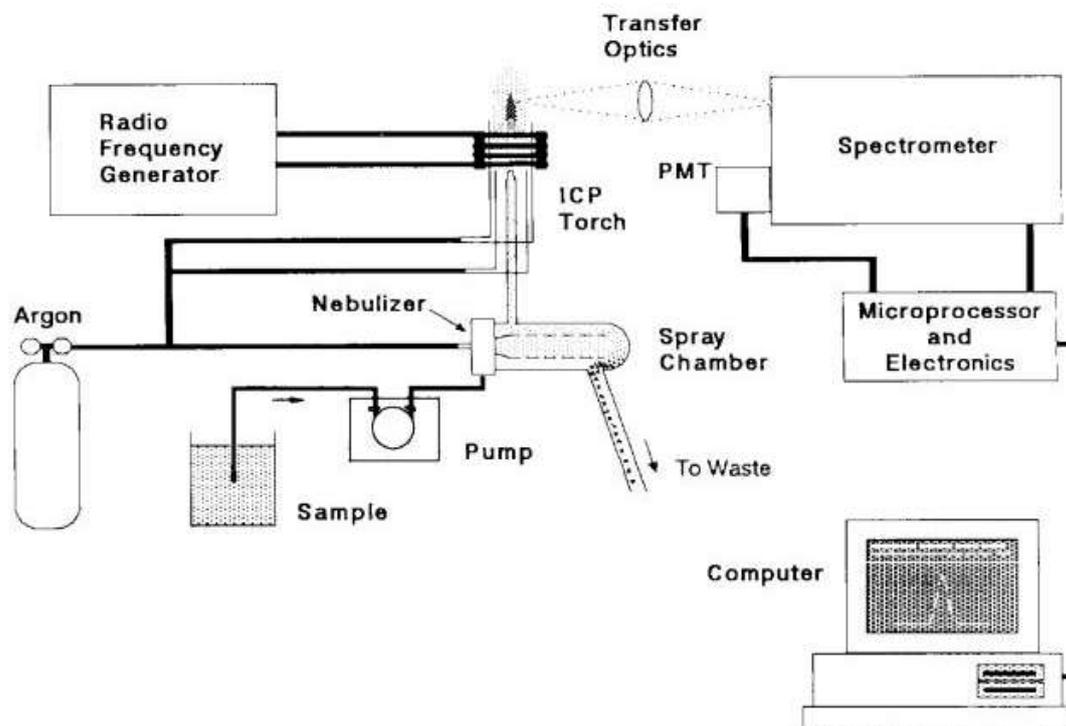


Figura 2-1: Componentes maioritários e layout de um equipamento ICP-OES. Retirado de (Boss & Fredeen, 2004)

O gás utilizado é o argônio por ser quimicamente inerte e apresentar uma elevada energia de ionização (15,6 eV). Apresenta outras vantagens como: emissão de um espectro relativamente simples, com pouca interferência espectral na emissão; capacidade de atomizar,

ionizar e excitar uma grande parte dos elementos da tabela periódica e baixo custo relativamente a outros gases raros (Boumans, 1987).

Pelo princípio de funcionamento da técnica, é possível aferir que as amostras sofrem processos físico-químicos para que seja possível fazer a sua leitura. Uma amostra aquosa, como o vinho, sofre processos de transformação ao longo do sistema em diversos componentes do ICP-OES.

A introdução da amostra tem como objetivo transferir uma porção reprodutível e representativa da mesma no plasma, com eficiência e livre de interferências, sendo que depende inteiramente do tipo de amostra, tanto pelo estado físico e químico do analito como pelo tipo de matriz (Skoog, et al., 2018). No caso de amostras aquosas, como o vinho e num atomizador contínuo, como o plasma, o modo de introdução de amostra mais comum é o nebulizador (Skoog, et al., 2018). Para automatização de análises por ICP, são utilizados *auto samplers* que, controlados pelos comandos do computador, encaminham a amostra através de tubos plásticos de diâmetros específicos (Whitman College, 2017), que são comprimidos sequencialmente pela bomba peristáltica, aspirando a amostra até ao nebulizador. A bomba peristáltica assegura que o fluxo é constante, garantindo que este é independente das características da amostra analisada, como viscosidade e tensão superficial (Boss & Fredeen, 2004). No nebulizador pneumático de tubo concêntrico, que é constituído por dois tubos finos, a amostra é aspirada através de um tubo capilar por um fluxo de alta pressão de Ar que flui e circunda o capilar concentricamente, potenciando uma pressão reduzida na ponta permitindo a aspiração da amostra - efeito *Bernoulli* (Skoog, et al., 2018). A alta velocidade do fluxo de Ar (aproximadamente 1 L/min) na ponta potencia a quebra da amostra aquosa em *droplets*, convertendo-a num *spray* (Skoog, et al., 2018). A representação deste tipo de nebulizador encontra-se apresentada na Figura 2-2.

A câmara de nebulização está colocada entre o nebulizador e a tocha com a finalidade de conduzir a amostra nebulizada até à tocha ICP (Jin, et al., 1991). Esta garante que apenas os *droplets* mais pequenos são direcionados para o canal central do plasma através do tubo injetor da tocha, enquanto os maiores são removidos pelo dreno (Fassel & Kniseley, 1974) (Fernández-Sánchez, 2018). Isto pode comprometer a eficiência quando os volumes de amostra são reduzidos ou a medição é feita próximo do limite de deteção (Hou & Jones, 2000). A câmara de nebulização tem ainda a função de estabilizar o fluxo da amostra, suavizando o pulsar decorrente do bombeamento da mesma (Boss & Fredeen, 2004).

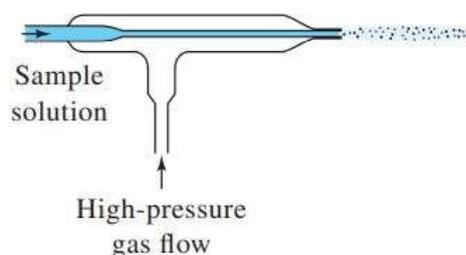


Figura 2-2 - Representação esquemática do nebulizador de tubo concêntrico.  
Retirado de (Skoog, et al., 2018).

O plasma de Ar é criado na tocha, que é composta por três tubos concêntricos de sílica fundida. Estes são frequentemente referidos como tubos de gás externo, intermediário e interno (ou injetor) (Fernández-Sánchez, 2018). O fluxo de gás externo (10-15 L/min) sustém a alta temperatura do plasma e posiciona-o de maneira que fique afastado das paredes da tocha, evitando que derreta e de modo a facilitar a observação do sinal. O fluxo interno de Ar (0.5-1.5 L/min) entra no canal central do plasma, transporta o aerossol da amostra e ajuda manter a forma angular do plasma. O fluxo de gás intermediário, também designado como auxiliar (0-1.5 L/min), tem a função de elevar e posicionar o fluxo de gás (Hou & Jones, 2000). A parte superior da tocha é envolvida por uma bobina de cobre de duas ou três voltas e conectada a um gerador de radiofrequência (RF). A oscilação de RF da corrente na bobina produz um campo eletromagnético intenso no topo da tocha. Inicia-se a ionização por uma *spark* de uma *Tesla coil*, que ioniza alguns átomos de Ar na bobina, que são posteriormente acelerados no campo magnético ionizando mais átomos de Ar com a colisão, resultando numa reação em cadeia, formando o plasma (Beauchemin, 2020). A representação dos passos de geração do ICP encontra-se esquematizada na Figura 2-3.

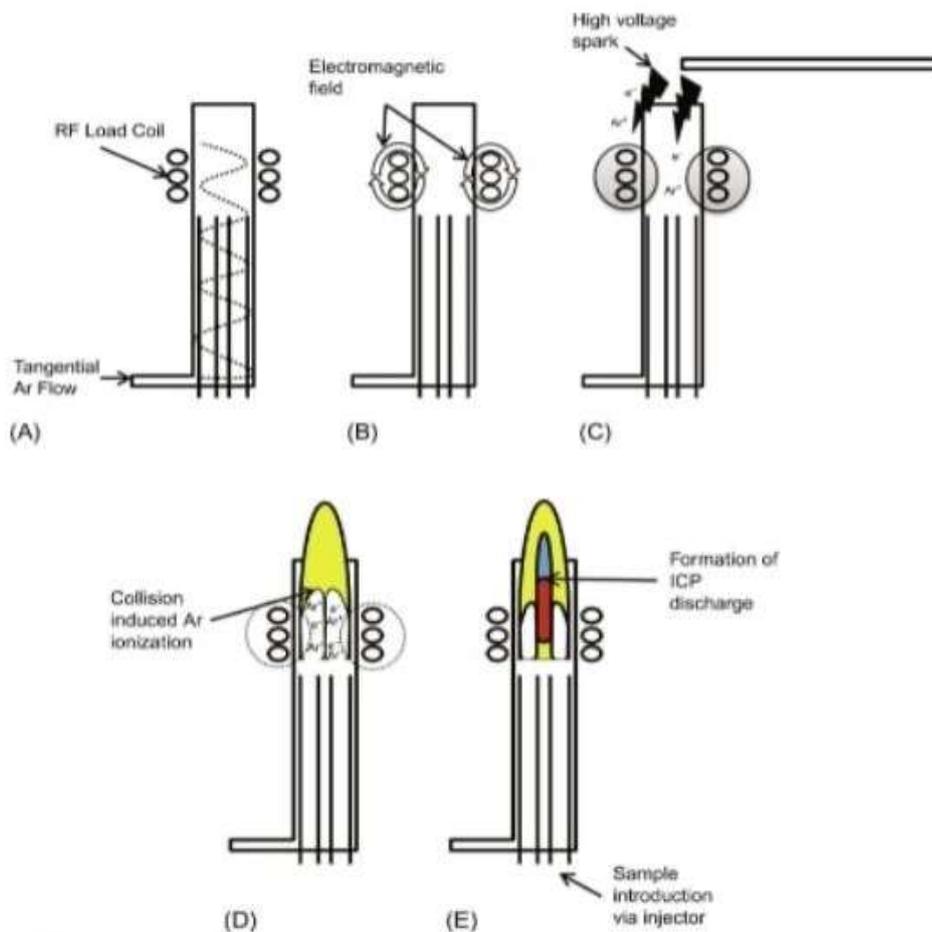


Figura 2-3 - Representação dos passos de formação de ICP: (A) fluxo de Ar tangencial, (B) aplicação de corrente para carregar bobina para gerar campo eletromagnético no topo da tocha, (C) aplicação de "Tesla spark", (D) indução de ionização de Ar por colisão, (E) formação de plasma. Retirado de (Beauchemin, 2020)

No seu núcleo, o plasma acoplado indutivamente sustém uma temperatura de aproximadamente 10000 K e ocorrem três processos – inicialmente ocorre a dessolvatação, pela remoção do solvente, resultando em partículas sólidas microscópicas, seguidamente dá-se a vaporização, formando moléculas gasosas e posteriormente ocorre a atomização, resultando em átomos livres (Beauchemin, 2020). Finalmente ocorre a excitação e ionização dos átomos, seguida da emissão de radiação provocada pelas espécies excitadas, pelo seu retorno ao estado fundamental pela emissão de um fóton (Hou & Jones, 2000). Estes processos ocorrem na *initial radiation zone* (IRZ) e *normal analytical zone* (NAZ), onde a temperatura é de 6000-8000 K (Beauchemin, 2020), representadas na Figura 2-4. Na Figura 2-5 encontra-se representado o esquema de processos que ocorrem no ICP-OES.

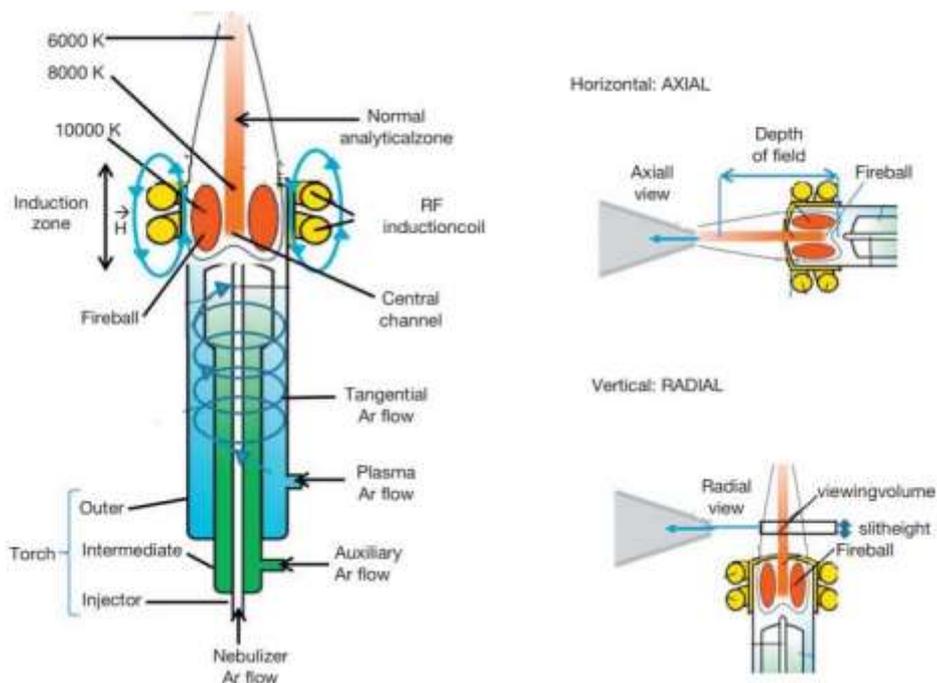


Figura 2-4: Zonas constituintes do ICP com a temperatura verificada em cada local aproximadamente. (à esquerda) Modos de visualização do plasma. (à direita). Retirado de (Fernández-Sánchez, 2018)

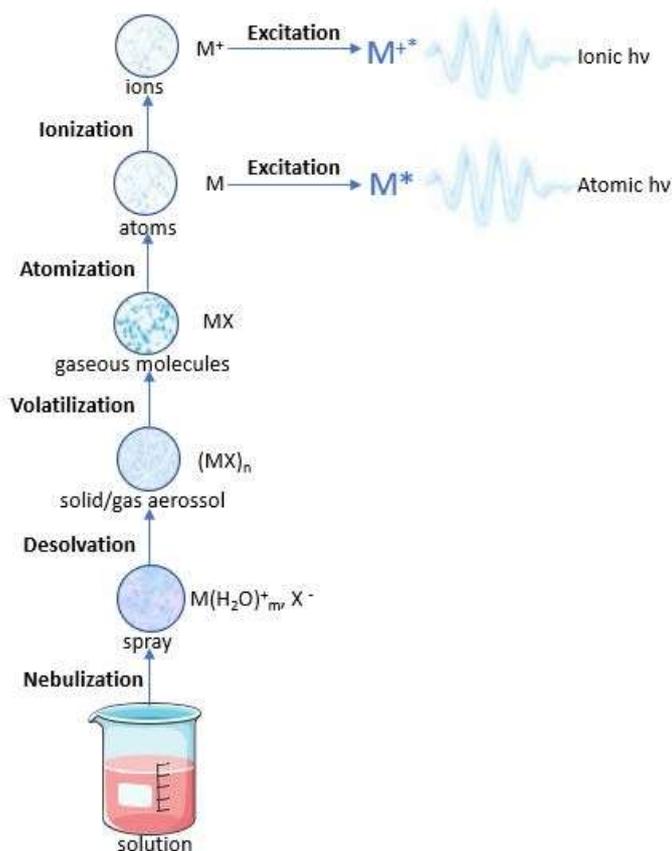


Figura 2-5: Processos que ocorrem durante a atomização. Adaptado de (Boss & Fredeen, 2004) e (Skoog, et al., 2018).

Para observar emissão do ICP é possível utilizar duas configurações – radial (lateral do plasma) ou axial (extremidade do plasma), esquematizadas na Figura 2-4 e uma combinação das duas, designada por *dual view*. No modo radial, visualiza-se o plasma lateralmente, num ângulo de  $90^\circ$  (Beauchemin, 2020). Este modo de visualização restringe o volume observado e limita o efeito de potenciais interferências espectrais e de *background* (Hou & Jones, 2000). No modo de visualização axial, observa-se em alinhamento com o plasma. Este modo oferece melhor sensibilidade e limite de detecção (LD), no entanto, há um aumento de possíveis interferências espectrais e de matriz (Hou & Jones, 2000). O sistema *dual view* permite ao analista alternar entre os dois modos de visualização, mediante o analito.

Posteriormente, a emissão do analito deve ser diferenciada da emissão de outro analito ou de possíveis interferências, usando um espectrômetro. O feixe policromático é dirigido para as redes de difração, onde se dá a dispersão em comprimentos de onda, originando vários feixes monocromáticos que chegam ao detector. O monocromador permite a medição de um comprimento de onda de cada vez de modo sequencial, enquanto os policromáticos permitem a detecção simultânea de vários comprimentos de onda (Fernández-Sánchez, 2018) Os fótons emitidos são convertidos em sinais eletrônicos para que possam ser medidos. O sinal é

amplificado e processado e exibido no computador para posterior análise. Cada linha espectral obtida é específica de cada elemento presente na amostra. Pela intensidade das linhas espectrais, é possível concluir acerca da presença quantitativa de cada analito na amostra, pela relação proporcional e direta entre intensidade e concentração (Boumans, 1987).

## 2.2. Interferências

As interferências associadas ao ICP-OES podem ser de dois tipos: não espectrais e espectrais. As **interferências não espectrais** podem ser de natureza física ou química. As interferências físicas prendem-se com diferenças nas propriedades físicas entre amostras e padrões de calibração como viscosidade, tensão superficial, volatilidade, teor de sólidos, que podem criar diferenças significativas na eficiência de formação e fluxo de aerossóis, afetando o sinal (Fernández-Sánchez, 2018). Quanto às interferências químicas, estas podem ocorrer quando estão presentes elementos facilmente ionizáveis, como metais alcalinos, podendo suprimir ou intensificar as intensidades emitidas (Hou & Jones, 2000) (Morishige & Kimura, 2008). Para suprimir a existência de interferências não espectrais podem incluir-se certas práticas: diluição de amostras, correspondência de matrizes, padrão interno e adição padrão (Fernández-Sánchez, 2018). As condições operacionais podem influenciar os efeitos de matriz sendo que a otimização da *flow rate*, da potência do RF e a altura de visualização do plasma poderão minimizar estas interferências (Beauchemin, 2020) (Fernández-Sánchez, 2018). As **interferências espectrais** que podem ocorrer no ICP-OES são interferências de *background* e sobreposição de linhas emitidas por outros elementos. As interferências espectrais de *background* podem resultar dos espectros de emissão de Ar, bandas de espécies moleculares e de solventes orgânicos. A sobreposição de linhas emitidas por outros elementos ocorre quando um outro elemento constituinte da matriz emite no mesmo comprimento de onda relativo a um analito (Fernández-Sánchez, 2018).

## 2.3. Vantagens e limitações da técnica ICP-OES

O ICP-OES é uma técnica que se caracteriza pela alta seletividade para muitos elementos e pela capacidade de determinação multielementar simultânea e com boa precisão (Satyanarayana & Durani.S., 2010) (Fernández-Sánchez, 2018), podendo ser aplicada numa ampla gama de amostras (Khan, et al., 2021). A eficiência de atomização e ionização para análise de vários analitos em diversas amostras deve-se principalmente à elevada temperatura do plasma que reduz ou elimina possíveis interferências químicas em amostras complexas (Boss & Fredeen, 2004). Outra vantagem é o facto de o aerossol ser introduzido no centro da fonte de energia aumentando o tempo de residência do elemento, reduzindo interferências de

matriz (Boss & Fredeen, 2004). A conjugação de sistemas de introdução de amostras com tempos de lavagem rápidos e detecção simultânea garantem a rapidez da análise (Olesik, 1991).

As maiores limitações associadas ao ICP-OES são as interferências de background, com efeitos diretos na sensibilidade e nos limites de detecção e a sobreposição espectral, condicionando a precisão e exatidão do método (Olesik, 2020). Uma limitação do ICP-OES comparativamente com o ICP-MS são os limites de detecção, que na técnica de espectrometria de emissão atômica são superiores e descritos para uma variedade de elementos na gama dos ppm e ppb. Estes podem, no entanto, ser melhorados por otimização de preparação de amostra ou de parâmetros do processo, pela adequação do modo de visualização do plasma ou do tempo de aquisição (Bartsch, et al., 2017) (Olesik, 2020).

### 3. Validação de métodos de análise

A validação de um método pretende demonstrar que um ensaio tem as características necessárias para garantir resultados confiáveis e com a qualidade exigida e que a metodologia analítica é exata e reprodutível (Relacre, 2000). Um método de ensaio está sujeito a erros, sistemáticos ou aleatórios, que podem ter alterações significativas em resultados. Pela validação, pretende-se avaliar a eficiência de um método nas análises diárias num laboratório, garantindo a fiabilidade dos resultados obtidos (Eurachem, 2000).

A validação do método foi feita segundo a Norma ISSO 17025:2017 que afere os requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Segundo a Norma, *“as características de desempenho podem incluir, sem, contudo, se limitarem, a: intervalo de medição, exatidão incerteza de medição dos resultados, limite de deteção, limite de quantificação, seletividade do método, linearidade, repetibilidade ou reprodutibilidade, robustez face a influências externas ou sensibilidade cruzada a interferências da matriz da amostra ou do objeto de ensaio e erro de medição sistemático”* (ISO/IEC, 2017).

#### 3.1. Avaliação indireta

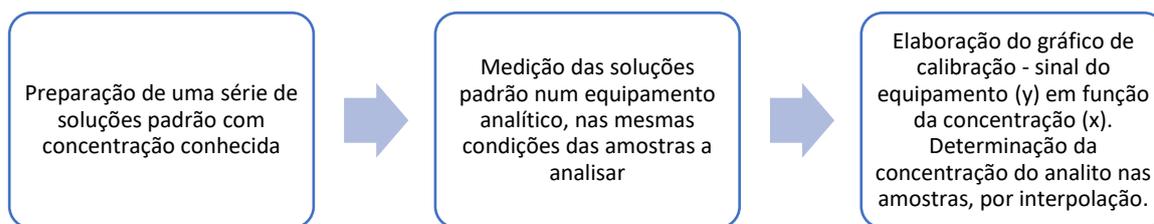
##### 3.1.1. Especificidade e Seletividade

Uma amostra pode ter na sua constituição, além dos analitos alvo de ensaio, uma matriz complexa com componentes que possam afetar a medição, como é o caso do vinho. Entende-se por **seletividade** e **especificidade** como a capacidade de um método identificar e distinguir um analito específico numa matriz complexa, sem que haja interferência de outros componentes, garantindo que o sinal obtido é proveniente do analito que se pretende identificar/quantificar (Relacre, 2000) (Eurachem, 2000). Deve então averiguar-se a possível interferência de outras substâncias presentes na amostra, utilizando uma matriz complexa. Para isso, realiza-se um teste de recuperação utilizando uma série de amostras com a mesma matriz e onde se faz variar a concentração de analito, em gamas conhecidas – adição padrão. Considera-se como específico e seletivo um método cujas taxas de recuperação são próximas de 100% (Relacre, 2000).

##### 3.1.2. Quantificação

###### 3.1.2.1. Curvas de calibração

Em análises quantitativas, a calibração é um processo que demonstra a relação entre a concentração de um determinado componente e a intensidade da resposta obtida (Relacre, 2000). O procedimento para obtenção de uma calibração analítica é o seguinte:



A forma algébrica da equação de uma reta de calibração é dada pela expressão:  $y = a + bx$ , onde **a** representa a ordenada na origem e **b** o declive da reta. O coeficiente de correlação, ( $\rho$ ) é um dos parâmetros que permite avaliar uma calibração analítica, sendo que em análise química, os coeficientes de correlação devem apresentar valores superiores a 0,995 (Relacre, 2000).

#### 3.1.2.1.1. Gama de trabalho

A um método quantitativo está associado um intervalo de concentrações em que é possível quantificar o analito. No limite inferior dessa gama os fatores limitantes são os limites de deteção e quantificação e no limite superior como fator limitante tem-se a capacidade de resposta do equipamento. Pressupõe-se que na gama de trabalho a relação entre a concentração do analito e a intensidade medida seja linear e onde a sensibilidade é considerada constante (INMETRO, 2003). A gama de trabalho deve ser ajustada de modo a abranger o intervalo de concentrações geralmente verificados nas amostras para as quais o método será usado. Quando estamos perante um método que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho deve ser avaliada pelo **teste de homogeneidade de variâncias** (Relacre, 2000).

No caso de modelos lineares, recomenda-se a norma ISO 8466-1. Esta norma recomenda o recurso a pelo menos cinco pontos de calibração distribuídos de igual modo na gama de concentrações. O primeiro e o último padrão são analisados em 10 réplicas independentes (ISO 8466-1, 1990). Determinam-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão do seguinte modo:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (1)$$

sendo que  $i$  - o número do padrão e  $j$  - o número de repetição efetuadas para cada padrão

As variâncias são testadas com o intuito de verificar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho, através do cálculo do valor teste PG:

$$a) PG = \frac{S_M^2}{S_m^2} \quad (2)$$

$$b) PG = \frac{S_m^2}{S_M^2} \quad (3)$$

,onde  $S_m^2$  representa as variâncias associadas ao padrão mais baixo e  $S_M^2$  representa as variâncias associadas ao padrão mais concentrado e aplica-se a) quando  $S_M^2 > S_m^2$  e b) quando  $S_m^2 > S_M^2$

Compara-se o valor obtido de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade e as conclusões possíveis são as seguintes: (Relacre, 2000)

- Se  $PG \leq F$ , então as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada
- Se  $PG > F$ , então há diferenças significativas nas variâncias e a gama de trabalho deve ser reduzida até que se verifique que  $PG \leq F$ .

#### 3.1.2.1.2. Linearidade

A linearidade de um método analítico é a capacidade deste para produzir respostas diretamente proporcionais à concentração do analito alvo (INMETRO, 2003). De acordo com a norma ISO 8466-1, a linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico. Através do conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear (ISO 8466-1, 1990) e a função de calibração não linear (ISO 8466-2, 1993), bem como os respectivos desvios-padrão residuais,  $S_{y/x}$  e  $S_{y2}$ . A diferença das variâncias ( $DS^2$ ) é dada pela equação 4: (Relacre, 2000)

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2 \quad (4)$$

onde N é o número de padrões de calibração.

Seguidamente calcula-se o valor teste – PG pela expressão seguinte: (Relacre, 2000)

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (5)$$

Finalmente, compara-se o valor de PG obtido com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, sendo que: (Relacre, 2000)

- Se  $PG \leq F$ , então a função de calibração é linear
- Se  $PG > F$ , então a função de calibração é não linear.

3.1.2.1.3. Limiares analíticos do método de ensaio

3.1.2.1.3.1. Limite de deteção (LD)

Entende-se por limite de deteção como o teor mínimo a partir do qual é possível detetar a presença do analito em análise. De realçar que uma leitura inferior ao limite de deteção não implica uma ausência do analito – apenas permite concluir que a concentração do analito é inferior a determinado valor (Relacre, 2000).

O limite de deteção, pode ser obtido a partir de:

$$LD \cong X_0 + 3,3\sigma_0 \quad (6)$$

onde  $X_0$  é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos e  $\sigma_0$  representa o desvio padrão associado a  $X_0$

No caso em que o método envolve uma reta de calibração linear, o LD pode obter-se por:

$$LD = \frac{[3,3 \times S_{y/x}]}{b} \quad (7)$$

onde  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração e  $b$  é o declive da mesma.

3.1.2.1.3.2. Limite de quantificação (LQ)

Entende-se por limite de quantificação como a menor concentração medida a partir da qual é possível quantificar, com determinada precisão e exatidão, a presença do analito (Relacre, 2000).

O limite de quantificação pode ser calculado por:

$$LQ = X_0 + 10\sigma_0 \quad (8)$$

onde  $X_0$  é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos e  $\sigma_0$  representa o desvio padrão associado a  $X_0$ .

No caso em que o método envolve uma reta de calibração linear, o LQ pode também obter-se por:

$$LQ = \frac{[10 \times S_{y/x}]}{b} \quad (9)$$

onde  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração e  $b$  é o declive da mesma.

### 3.1.2.2. Sensibilidade

A sensibilidade pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido  $\Delta L$  e a variação da concentração  $\Delta C$  correspondente a esse acréscimo, avaliando a capacidade do equipamento para distinguir pequenas diferenças de concentração do analito e traduzindo-se no seguinte: (Relacre, 2000)

$$Sensib. = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (10)$$

Dado que a sensibilidade corresponde à derivada de primeira ordem da curva de calibração numa zona de concentração, quando estamos perante um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo da gama de trabalho e traduzida pelo declive da reta de calibração (Relacre, 2000).

### 3.1.3. Precisão

A precisão assume-se como a avaliação de dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões. Esta dispersão pode ser avaliada por duas medidas - repetibilidade e reprodutibilidade, podendo avaliar-se a variabilidade intra laboratorial designada por precisão intermédia (Relacre, 2000).

#### 3.1.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições mantidas constantes e estáveis, como mesmo laboratório, equipamento, analista, e reagentes, em curtos intervalos de tempo. O limite de repetibilidade ( $r$ ) é o valor máximo admissível para a diferença absoluta entre dois ensaios, determinada para o nível de confiança de 95%. A estimativa  $S_{ri}^2$  de um método pode ser determinada através da média ponderada das variações de  $w$  séries de análises estudadas nas condições de repetibilidade (Relacre, 2000). Assim, a variância associada à repetibilidade do método de ensaio, para cada nível  $i$  de concentração é:

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) \times S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)} \quad (11)$$

onde  $S_{ri}^2$  - variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;  $S_{wi}^2$  - variância associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;  $(n_{wi} - 1)$  - graus de liberdade da série de análises;  $p$  - número de Laboratórios participantes. (Relacre, 2000)

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade ( $r$ ) é calculado por:

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_{ri} = 1,96 \times \sqrt{2} \times S_{ri} \quad (12)$$

onde,  $S_{ri}$  – desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados. Posto isto, tem-se que:

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (13)$$

Deve-se, também, considerar o coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ), que é numericamente igual à razão entre o desvio-padrão da repetibilidade  $S_{ri}$ , e a média dos resultados  $\bar{x}$ , como descrito na seguinte equação 14:

$$\%CV_r = 100 \times \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \quad (14)$$

### 3.1.3.2. Precisão intermédia

Define-se como a precisão estimada sobre uma mesma amostra e utilizando o mesmo método de ensaio e realizada no mesmo laboratório, com uma ou mais condições alteradas, tais como diferentes analistas e equipamentos e/ou diferentes dias (Relacre, 2000).

## 3.2. Avaliação direta

### 3.2.1. Exatidão

A exatidão de um método exprime a concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro, podendo, para o efeito, ser utilizados materiais de referência certificados (MRC), ser efetuados ensaios interlaboratoriais e testes comparativos (Relacre, 2000). Quando são realizados ensaios interlaboratoriais, pode recorrer-se a ensaios do tipo de aptidão ou do tipo de normalização (Relacre, 2000).

#### 3.2.1.1. Avaliação de desempenho

O desempenho do laboratório pode ser avaliado pelo *z-score*, da seguinte forma:

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (15)$$

onde,  $X_{lab}$  é valor obtido pelo laboratório;  $X_v$  é valor definido como verdadeiro e  $S$  pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial ou a incerteza de  $X_v$ .

A avaliação é feita segundo a seguinte escala:

$|Z| \leq 2 \rightarrow$  Satisfatório

$2 < |Z| \leq 3 \rightarrow$  Questionável

$|Z| > 3 \rightarrow$  Incorreto

#### 3.2.1.2. Erro normalizado

O valor aceite como verdadeiro ( $X_v$ ) deve estar dentro do intervalo de incerteza ( $U_{lab}$ ) do resultado  $X_{lab}$ . Quando tal não se verifica, recorre-se ao erro normalizado ( $En$ ) no sentido de avaliar o desempenho: (Relacre, 2000)

$$En = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 - U_{ref}^2}} \quad (16)$$

Onde,  $U_{ref}$  é a incerteza associada ao valor verdadeiro. Faz-se a avaliação mediante o resultado de  $En$  sendo que: se  $|En| \leq 1$ , então  $U_{lab}$  está bem estimada.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Desenvolvimento e otimização do método

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método preciso e sensível para quantificar 15 elementos. O método foi desenvolvido tendo em conta as indicações da marca Monitorizaram-se soluções-padrão com os elementos para diferentes linhas de emissão a fim de identificar o comprimento de onda em que não se observassem interferências e que oferecesse uma boa linha de base, o menos ruidosa possível, para a quantificação do analito. Adequaram-se as condições de operação relacionadas com a bomba peristáltica, parâmetros do espectrómetro e condições do plasma. Foram selecionados os modos de visualização para os diversos elementos: radial para os elementos Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn e radial atenuado para Ca, K, Mg e Na e definiram-se os modos de processamento e medição do pico: integração em área para Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn e em altura para Ni, Pb e Zn. Fez-se correção de background com dois pontos para o pico correspondente a cada analito.

### 4.2. Reagentes e materiais

Os padrões de calibração multielementares e o padrão interno (ítrio) foram preparados a partir de soluções standard monoelementares certificadas, com concentrações de 1000 ou 10000 mg/L (CPAchem, Stara Zagora, Bulgária), cujas certificações se encontram em ANEXOS. Ácido nítrico 65% foi adquirido de Merck, Darmstadt, Alemanha e etanol absoluto anidro foi adquirido de Carlo Erba Reagents, Val de REUIL, França. Água ultrapura, desmineralizada ( $> 18 \text{ m}\Omega$ ) foi obtida com recurso ao sistema de tratamento de água Millipore (Millipore, Bedford, MA, EUA).

### 4.3. ICP-OES

A espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente foi conduzida com o Avio 220 Max ICP-OES associado a um auto *sampler* S23 (PerkinElmer, Waltham, MA USA). As condições de operação encontram-se destacadas na Tabela 4-1. A intensidade espectral foi a média de 3 leituras replicadas por amostra. Os comprimentos de onda de emissão usados para quantificação dos diversos elementos estão representados na Tabela 4-1.

Tabela 4-1: Condições de operação do ICP-OES e configurações instrumentais.

ICP OES	Avio 220 Max ICP-OES
Potência RF (W)	1400
Fluxo gás plasma (L/min)	12
Fluxo de gás auxiliar (L/min)	0,3
Fluxo de gás nebulizador (L/min)	0,40
Caudal da bomba (mL/min)	0,50
Posição visualização da tocha (mm)	14
Número de réplicas	3
Tempo de lavagem (s)	25
Comprimento de onda (nm)	<u>396,153</u> (Al), <u>193,696</u> (As), <u>317,933</u> (Ca), <u>226,502</u> (Cd), <u>228,616</u> (Co), <u>267,716</u> (Cr), <u>327,393</u> (Cu), <u>259,939</u> (Fe), <u>766,490</u> (K), <u>285,213</u> (Mg), <u>257,610</u> (Mn), <u>589,592</u> (Na), <u>231,604</u> (Ni), <u>220,354</u> (Pb), <u>213,857</u> (Zn)

#### 4.4. Preparação de soluções-padrão

Os padrões de calibração multielementares foram preparados a partir de soluções standard monoelementares certificadas dos elementos em estudo. Foram preparados em balões de 100 mL e adicionou-se 10 mL de etanol para que a solução contivesse 10% etanol (v/v) e fez-se o volume com solução de ácido nítrico 2% (v/v). Fez-se uma compatibilidade de matriz pela adição de etanol, com o objetivo de minimizar as diferenças nas intensidades de emissão devido a alterações na viscosidade das soluções orgânicas durante a nebulização e o ácido nítrico é adicionado para estabilizar as soluções. A concentração de cada elemento nos padrões de P1 a P4 encontra-se apresentada na Tabela 4-2, sendo que o P0 é o branco e se trata apenas de solução de ácido nítrico 2% e etanol a 10%.

Tabela 4-2: Concentrações dos elementos nos padrões P1-P4.

	<b>mg/L</b>			
	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>
<b>Pb</b>	0,025	0,08	0,14	0,2
<b>Fe</b>	0,5	3	6	10
<b>Ca</b>	10	50	100	150
<b>Cu</b>	0,1	0,5	1,25	2
<b>K</b>	500	800	1100	1500
<b>Zn</b>	0,1	1,5	3	5
<b>Co</b>	0,01	0,15	0,3	0,5
<b>Mn</b>	0,1	1,5	3	5
<b>Cd</b>	0,001	0,005	0,0125	0,02
<b>Na</b>	10	50	125	200
<b>As</b>	0,01	0,15	0,3	0,5
<b>Ni</b>	0,01	0,15	0,5	1
<b>Al</b>	0,1	0,3	0,6	1
<b>Mg</b>	10	50	125	200
<b>Cr</b>	0,01	0,15	0,3	0,5

#### 4.5. Preparação de padrão interno

Utilizou-se a técnica de padrão interno para corrigir diferenças de matriz e minimizar erros aleatórios que pudessem surgir entre as amostras de vinhos de mesa, licorosos e espirituosos. Para esse efeito, adicionou-se um elemento que não estivesse presente na amostra e que não apresentasse interferências espectrais significativas nas linhas de emissão dos analitos em estudo. Utilizou-se o ítrio (Y) como padrão interno numa concentração de 10 ppm em solução de ácido nítrico 2%. O padrão interno é aplicado a todas as soluções (padrões e amostras) durante a medição por ICP-OES, através da adição por um terceiro canal na bomba peristáltica para que chegue ao nebulizador como uma mistura homogénea.

#### 4.6. Preparação de amostras

As amostras são centrifugadas a 8500 rpm durante 5 minutos. Quanto às amostras de vinho de mesa e vinho do Porto, estas são lidas sem qualquer diluição prévia, enquanto os mostos são diluídos numa razão de 5:20 e as aguardentes sofrem uma diluição de acordo com o seu teor alcoólico de modo que este se aproxime do grau alcoólico dos padrões e restantes amostras. Aguardentes com teor alcoólico a rondar os 40° sofrem uma diluição de 5:20 e aguardentes com teor alcoolométrico perto dos 70° são sujeitas a uma diluição de 2:20. Os vinhos frisantes e espumantes são sujeitos inicialmente a um banho de ultrassom para degaseificação por 10 minutos a uma frequência de 37 kHz.

## 5. Resultados

### 5.1. Validação do método

#### 5.1.1. Avaliação indireta

##### 5.1.1.1. Quantificação

###### 5.1.1.1.1. Curvas de calibração

Depois de definido o comprimento de onda para quantificação dos analitos em vinhos, procede-se para a calibração. Na Tabela 5-1, Tabela 5-2, Tabela 5-3 e Tabela 5-4 estão destacadas as concentrações dos padrões e respectivas intensidades corrigidas, bem como o erro residual inerente a cada. Na Figura 5-1, Figura 5-2, Figura 5-3 e Figura 5-4 apresentam-se as representações gráficas das curvas de calibração do elementos de Ca, Fe, Cu e K, respetivamente com a intensidade em função da concentração do elemento nos padrões em mg/L, bem como as equações das retas e os coeficientes de correlação.

Tabela 5-1: Parâmetros de intensidade, concentração e erro residual nos padrões referentes ao Ca a 317,933 nm.

Amostra	Ca 317.933 (cps)	Intensidade corrigida	Concentração (mg/L)	Concentração calculada (mg/L)	% Erro residual
Calibração P0	1577,8	0,0	0,000	-0,619	N/A
P1	44979,6	44979,6	10,000	11,086	-3,66
P2	195305,6	195305,6	50,000	50,207	2,16
P3	380505,0	380505,0	100,000	98,402	-0,56
P4	582330,1	582330,1	150,000	150,924	0,02

Tabela 5-2: Parâmetros de intensidade, concentração e erro residual nos padrões referentes ao Fe a 259,939 nm.

Amostra	Fe 259.939 (cps)	Intensidade corrigida	Concentração (mg/L)	Concentração calculada (mg/L)	% Erro residual
Calibração P0	1543,1	0,0	0,000	-0,015	N/A
P1	39187,5	39187,5	0,500	0,484	-3,29
P2	242904,4	242904,4	3,000	3,075	2,50
P3	468543,2	468543,2	6,000	5,945	-0,91
P4	788164,4	788164,4	10,000	10,011	0,11

Tabela 5-3: Parâmetros de intensidade, concentração e erro residual nos padrões referentes ao Cu a 327,393 nm.

Amostra	Cu 327.393 (cps)	Intensidade corrigida	Concentração (mg/L)	Concentração calculada (mg/L)	% Erro residual
Calibração P0	402,6	0,0	0,000	-0,004	N/A
P1	4384,4	4384,4	0,100	0,107	6,52
P2	20076,1	20076,1	0,500	0,503	0,56
P3	49234,2	49234,2	1,250	1,239	-0,87
P4	79593,6	79593,6	2,000	2,006	0,29

Tabela 5-4: Parâmetros de intensidade, concentração e erro residual nos padrões referentes ao K a 766,490 nm.

Amostra	K 766.490 (cps)	Intensidade corrigida	Concentração (mg/L)	Concentração calculada (mg/L)	% Erro residual
Calibração P0	1736,6	0,0	0,000	-10,101	N/A
P1	351816,3	351816,3	500,000	506,759	1,35
P2	572287,1	572287,1	800,000	830,657	3,83
P3	733385,6	733385,6	1100,000	1067,330	-2,97
P4	1031539,8	1031539,8	1500,000	1505,354	0,36

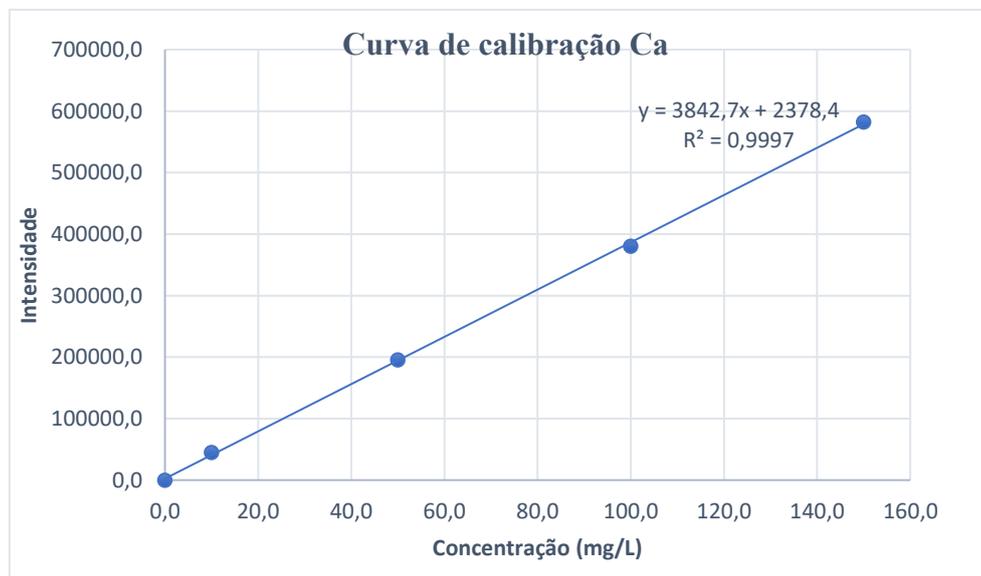


Figura 5-1: Representação gráfica da curva de calibração do Ca.

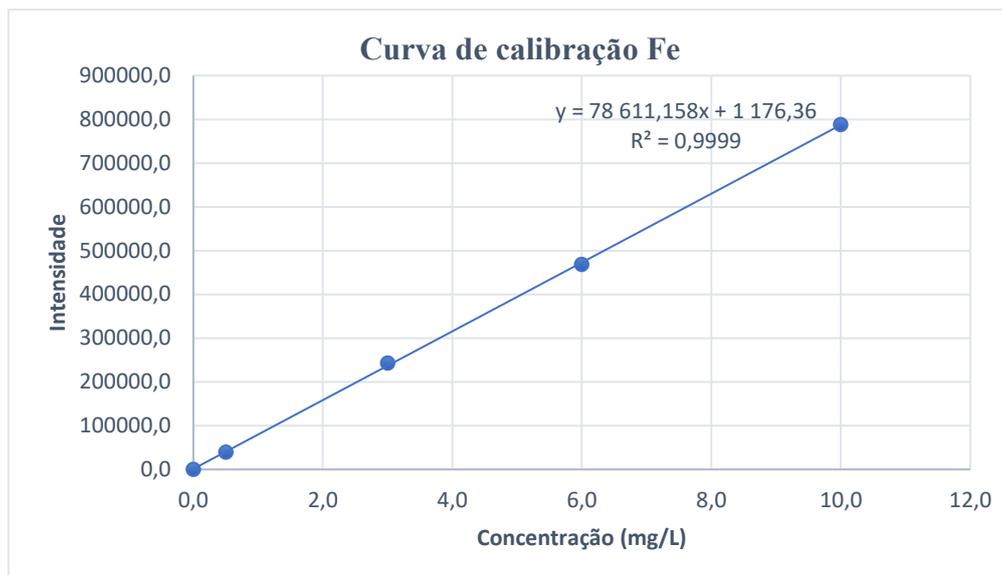


Figura 5-2: Representação gráfica da curva de calibração do Fe.

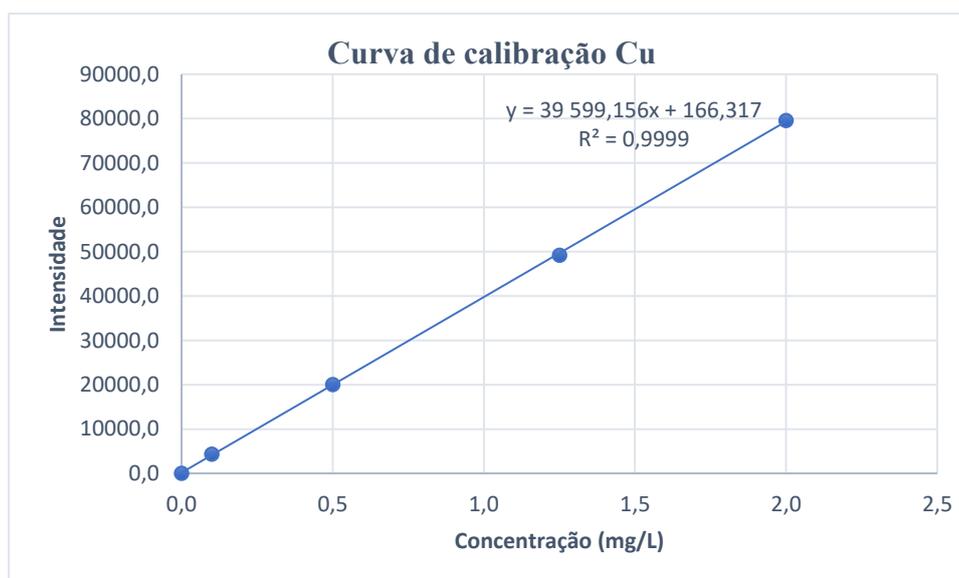


Figura 5-3: Representação gráfica da curva de calibração do Cu.

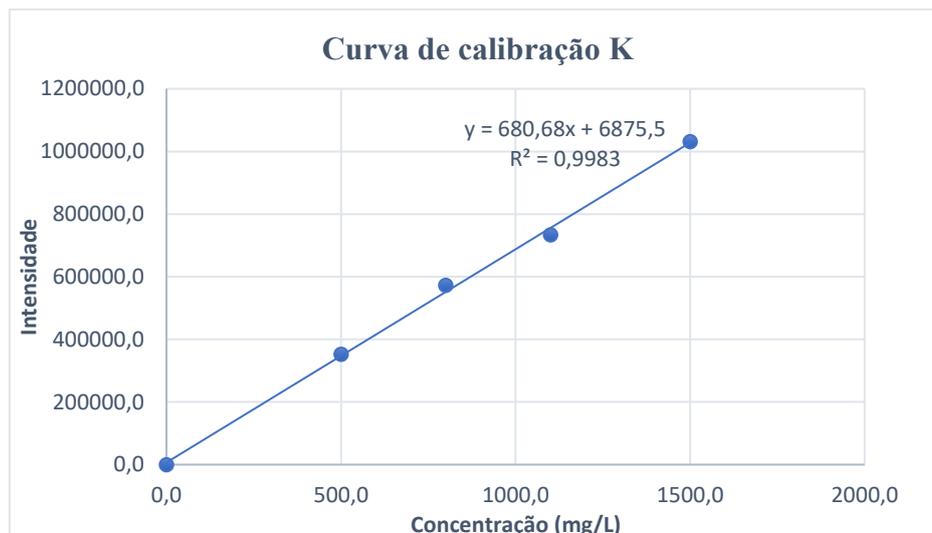


Figura 5-4: Representação gráfica da curva de calibração do K.

Na Tabela 5-5 apresentam-se os parâmetros das curvas de calibração dos 4 elementos.

Tabela 5-5: Parâmetros das curvas de calibração para Ca, Fe, Cu e K.

	Ca	Fe	Cu	K
<b>Declive</b>	3842,7	78 611,16	39599,16	680,68
<b>Ordenada na origem</b>	2378,4	1 176,36	166,32	6875,5
<b>Coefficiente de correlação</b>	0,9997	0,9999	0,9999	0,9983
<b>S<sub>y/x</sub></b>	4967,55	4361,37	338,99	18363,93

#### 5.1.1.1.1. Gama de trabalho

Na Tabela 5-6 estão apresentadas as leituras associadas ao padrão mais baixo – P1 – e ao padrão mais concentrado – P4 - para avaliação de homogeneidade de variâncias. Em destaque o valor de PG e o valor tabelado de F na distribuição de Fisher.

Tabela 5-6: Leituras consecutivas do padrão 1 e padrão 4 e variâncias, valor de PG e valor de F na distribuição de Fisher.

Elemento	Ca		Fe		Cu		K	
	P1 c (mg/L)	P4 c (mg/L)						
1	10,159	149,118	0,484	9,337	0,113	1,871	516,815	1483,926
2	10,046	145,848	0,468	9,361	0,116	1,856	512,144	1468,582
3	9,987	142,790	0,462	9,325	0,113	1,814	502,689	1486,204
4	10,011	148,545	0,466	9,360	0,109	1,855	500,220	1496,505
5	10,280	144,786	0,480	9,348	0,109	1,852	506,773	1503,359
6	10,123	148,756	0,467	9,398	0,111	1,847	510,124	1492,938
7	10,071	147,448	0,455	9,368	0,112	1,813	512,848	1503,044
8	10,151	146,385	0,466	9,068	0,110	1,936	520,458	1502,080

9	9,882	147,383	0,457	9,312	0,103	1,863	495,056	1483,796
10	9,968	146,962	0,465	9,340	0,106	1,855	518,356	1501,538
$S^2_m / S^2_M$	$1,31 \times 10^{-2}$	3,80	$8,01 \times 10^{-5}$	$8,52 \times 10^{-3}$	$1,29 \times 10^{-5}$	$1,16 \times 10^{-3}$	68,80	130,98
<b>PG</b>	289,99		106,28		90,07		1,90	
<b>F<sub>tab</sub></b>	3,179							

Para Ca, Cu e Fe,  $PG > F_{tab}$ , logo não há homogeneidade de variâncias.  
Para K,  $PG < F_{tab}$ , logo há homogeneidade de variâncias.

#### 5.1.1.1.1.2. Linearidade

O tipo de função de calibração é testado através do estudo do parâmetro da linearidade, cujos resultados do modelo estatístico se encontram destacados na Tabela 5-7, sendo que apenas se efetuou o teste da linearidade para o K, dado que foi o único elemento em que se verificou a homogeneidade de variâncias.

Tabela 5-7: Parâmetros de desvios-padrão residuais, diferenças de variâncias e valor-teste PG para estudo de linearidade para o K.

<b>K</b>	
<b>S<sub>y/x</sub></b>	18363,93
<b>S<sub>y2</sub></b>	21842,75
<b>Nº de pontos</b>	5
<b>DS<sup>2</sup></b>	57490037
<b>PG</b>	0,120497
<b>F<sub>tab</sub></b>	6,388

Como  $PG < F_{tab}$ , então a função de calibração é linear

#### 5.1.1.1.1.3. Limite de deteção e limite de quantificação

Efetuar-se os cálculos do limite de deteção e de quantificação através dos parâmetros das retas de calibração. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 5-8.

Tabela 5-8: Valores obtidos para o limite de deteção e de quantificação para os 4 analitos.

<b>Elemento</b>	<b>Ca</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>K</b>
<b>LD</b>	4,27 mg/L	0,18 mg/L	0,028 mg/L	89,03 mg/L
<b>LQ</b>	12,93 mg/L	0,55 mg/L	0,086 mg/L	269,79 mg/L

#### 5.1.1.1.1.4. Sensibilidade

Estando perante um modelo linear, a sensibilidade diz-se constante ao longo da gama de trabalho e corresponde, em valor, ao declive da reta, cujo valor se encontra representado na Tabela 5-9.

Tabela 5-9: Valor da sensibilidade para os 4 elementos.

Elemento	Ca	Fe	Cu	K
Sensibilidade	3842,7 mg/L	78611 mg/L	39599,2 mg/L	680,68 mg/L

#### 5.1.1.2. Seletividade e Especificidade

Apresentam-se na Figura 5-5, Figura 5-6, Figura 5-7 e Figura 5-8 os picos correspondentes aos analitos Ca, Fe, Cu e K, respetivamente, com representação dos picos referentes aos padrões de calibração e correção de *background* com dois pontos.

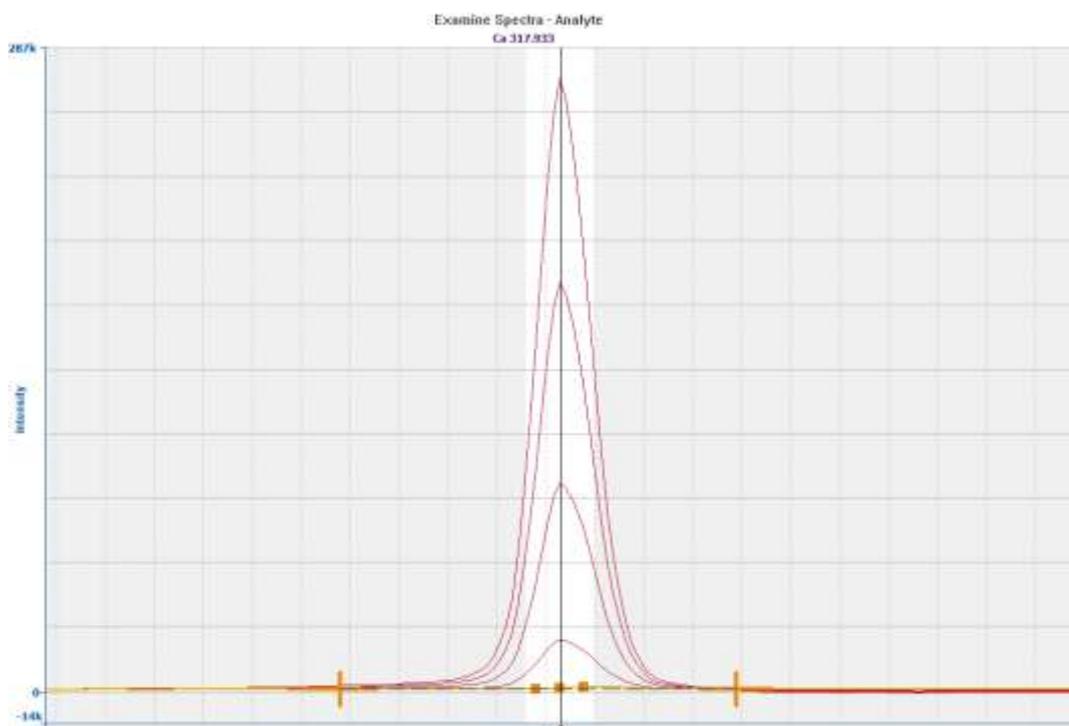


Figura 5-5: Espectro do analito Ca com representação dos picos referentes aos padrões de calibração e comprimento de onda de quantificação – 317,933 nm.

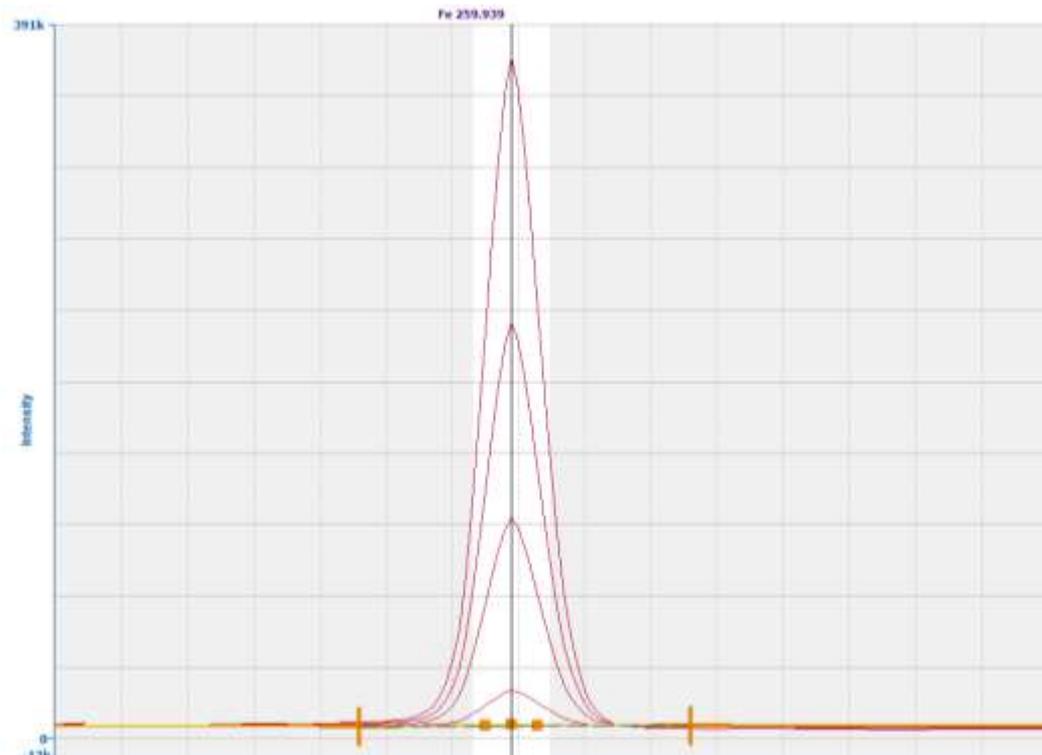


Figura 5-6: Espectro do analito Fe com representação dos picos referentes aos padrões de calibração e comprimento de onda de quantificação – 259,939 nm

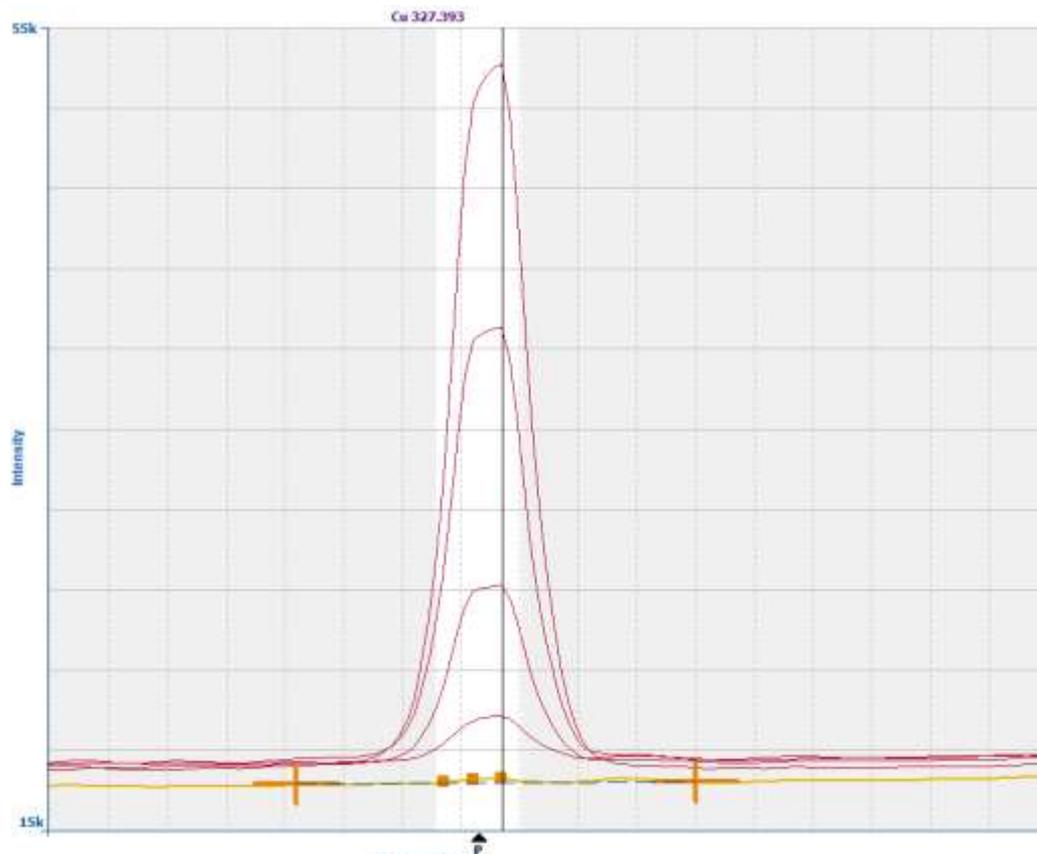


Figura 5-7: Espectro do analito Cu com representação dos picos referentes aos padrões de calibração e comprimento de onda de quantificação – 327,393 nm.

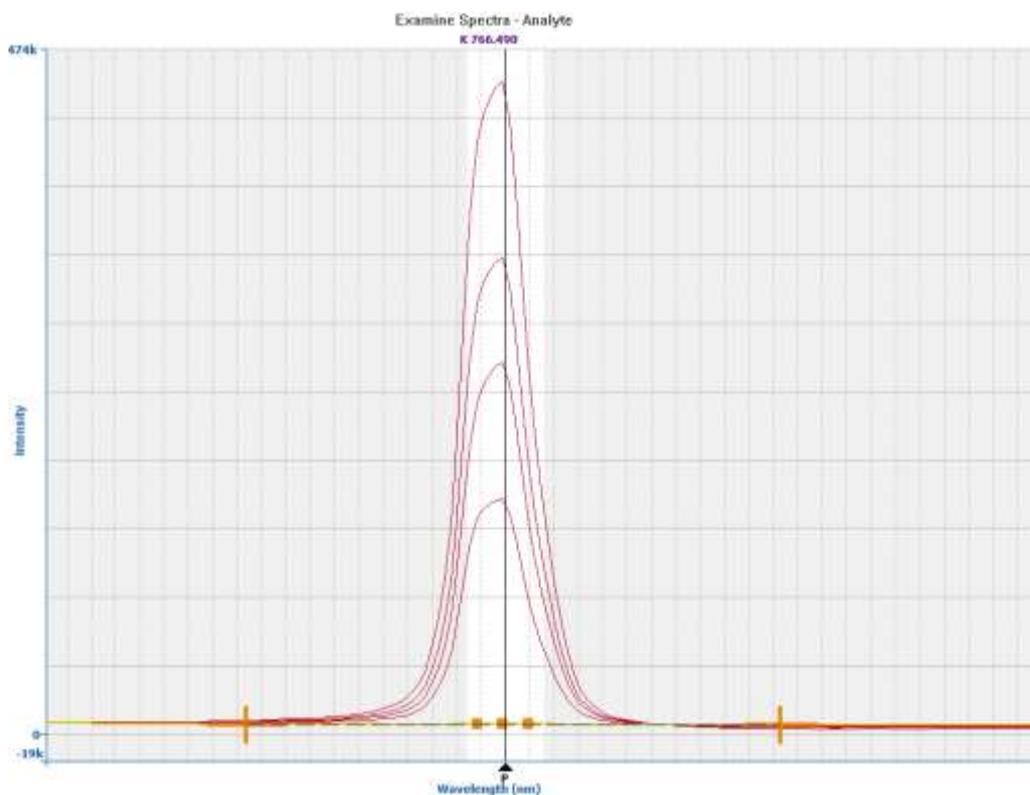


Figura 5-8: Espectro do analito K com representação dos picos referentes aos padrões de calibração e comprimento de onda de quantificação – 766,490 nm.

Na Tabela 5-10 apresentam-se os resultados obtidos para a percentagem de recuperação dos elementos em 4 tipos de amostras, isto é, amostras de vinho tranquilo tinto, branco, rosé e vinho do Porto.

Tabela 5-10: Percentagem de recuperação dos 4 analitos em 4 tipos de amostra - vinho tinto (18908), vinho branco (18909), vinho rosé (18907) e vinho do Porto (18858).

Amostra	% Recuperação							
	18907		18908		18909		18858	
<b>Ca</b>	99,34	98,69	102,31	102,23	99,06	96,80	108,23	104,95
<b>Fe</b>	98,09	99,13	98,43	98,68	99,08	98,93	93,91	95,19
<b>Cu</b>	93,76	99,76	96,34	99,27	102,17	108,05	93,12	93,10
<b>K</b>	96,16	96,86	101,78	100,56	98,30	96,42	96,14	92,56

### 5.1.1.3. Precisão

O estudo da precisão foi efetuado avaliando os parâmetros de repetibilidade e precisão intermédia.

#### 5.1.1.3.1. Repetibilidade

Na Tabela 5-11 e Tabela 5-12 estão apresentados os valores do desvio padrão de repetibilidade ( $S_{ri}$ ), o valor de repetibilidade ( $r$ ) e respetivo coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ). Também destacadas estão as diferenças, em módulo, entre dois valores consecutivos. O parâmetro foi avaliado em duas amostras distintas, sendo que se avaliou uma amostra de vinho rosé e vinho tinto em 10 medições consecutivas.

Tabela 5-11: Resultados do ensaio de repetibilidade, limite de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade para a amostra de vinho rosé.

Ca		Fe		Cu		K	
$X_i$ (mg/L)	$ X_{i+1} - X_i $						
93,608	1,154	3,055	0,022	0,044	0,004	503,830	10,658
92,454	1,150	3,032	0,011	0,048	0,004	493,172	7,299
93,603	0,022	3,022	0,038	0,044	0,000	500,471	0,285
93,582	0,438	2,983	0,040	0,043	0,003	500,756	0,176
94,019	0,574	2,943	0,024	0,040	0,002	500,932	0,803
93,446	3,611	2,967	0,054	0,043	0,003	501,735	12,438
89,835	3,316	3,021	0,064	0,040	0,007	489,297	8,633
93,151	1,723	3,085	0,077	0,047	0,001	497,930	13,434
94,873	0,292	3,008	0,044	0,046	0,001	511,364	8,816
94,581		3,052		0,044		502,548	
$\bar{X}$ (mg/L)	93,315	$\bar{X}$ (mg/L)	3,017	$\bar{X}$ (mg/L)	0,044	$\bar{X}$ (mg/L)	500,20
$s_{ri}$	1,329	$s_{ri}$	0,041	$s_{ri}$	0,002	$s_{ri}$	5,66
$CV_r$ (%)	1,42	$CV_r$ (%)	1,36	$CV_r$ (%)	5,40	$CV_r$ (%)	1,13
$r$	3,721	$r$	0,115	$r$	0,007	$r$	15,84

Tabela 5-12: Resultados do ensaio de repetibilidade, limite de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade para a amostra de vinho tinto.

Ca		Fe		Cu		K	
$X_i$ (mg/L)	$ X_{i+1} - X_i $						
75,501	0,280	1,157	0,0193	0,063	0,001	1163,658	0,534
75,781	1,168	1,176	0,0227	0,065	0,004	1163,124	8,940
74,613	0,587	1,153	0,0324	0,061	0,001	1154,185	7,497
75,200	1,176	1,186	0,0271	0,060	0,004	1161,682	3,980
74,024	0,294	1,159	0,0104	0,064	0,003	1157,702	11,161
74,318	1,506	1,148	0,0116	0,061	0,002	1146,541	0,975
72,812	0,646	1,137	0,0087	0,063	0,003	1147,516	14,919
72,166	0,542	1,128	0,0177	0,060	0,000	1132,597	2,612
72,707	0,803	1,146	0,0134	0,060	0,002	1135,209	16,769
71,904		1,159		0,058		1151,978	
$\bar{X}$ (mg/L)	73,903	$\bar{X}$ (mg/L)	1,155	$\bar{X}$ (mg/L)	0,062	$\bar{X}$ (mg/L)	1151,42
$s_{ri}$	1,345	$s_{ri}$	0,016	$s_{ri}$	0,002	$s_{ri}$	10,47
$CV_r$ (%)	1,82	$CV_r$ (%)	1,41	$CV_r$ (%)	3,25	$CV_r$ (%)	0,91
$r$	3,766	$r$	0,045	$r$	0,006	$r$	29,31

#### 5.1.1.3.2. Precisão intermédia

Na Tabela 5-13 e Tabela 5-14 estão apresentados os valores do desvio padrão de precisão intermédia ( $S_{pi}$ ), o valor de precisão intermédia ( $r$ ) e respetivo coeficiente de variação de precisão intermédia ( $CV_{pi}$ ). O parâmetro foi avaliado em duas amostras distintas, sendo que se avaliou uma amostra de vinho de mesa e vinho licoroso ao longo dos dias.

Tabela 5-13: Resultados do ensaio de precisão intermédia, limite de precisão intermédia e coeficiente de variação de precisão intermédia para a amostra de vinho licoroso.

Elemento	Ca	Fe	Cu	K
$X_1$ (mg/L)	80,99	0,41	0,13	836,06
$X_2$ (mg/L)	82,39	0,40	0,15	801,51
$X_3$ (mg/L)	78,03	0,39	0,13	792,26
$X_4$ (mg/L)	80,19	0,44	0,13	814,94
$X_5$ (mg/L)	82,77	0,43	0,15	843,54
$X_6$ (mg/L)	79,90	0,43	0,13	779,98

X <sub>7</sub> (mg/L)	82,34	0,44	0,13	797,96
X <sub>8</sub> (mg/L)	80,73	0,46	0,14	794,85
X <sub>9</sub> (mg/L)	80,46	0,43	0,15	839,70
X <sub>10</sub> (mg/L)	86,15	0,47	0,17	921,62
$\bar{X}$ (mg/L)	81,39	0,43	0,14	822,24
$s_{ri}$	2,07	0,02	0,01	39,16
CV <sub>r</sub> (%)	2,54	5,47	8,64	4,76
$r$	5,80	0,07	0,03	109,65

Tabela 5-14: Resultados do ensaio de precisão intermédia, limite de precisão intermédia e coeficiente de variação de precisão intermédia para a amostra de vinho de mesa.

Elemento	Ca	Fe	Cu	K
X <sub>1</sub> (mg/L)	73,04	0,80	0,05	640,73
X <sub>2</sub> (mg/L)	71,61	0,88	0,07	644,61
X <sub>3</sub> (mg/L)	70,35	0,79	0,06	655,82
X <sub>4</sub> (mg/L)	71,86	0,89	0,06	653,96
X <sub>5</sub> (mg/L)	75,32	0,90	0,08	676,52
X <sub>6</sub> (mg/L)	69,40	0,88	0,07	654,25
X <sub>7</sub> (mg/L)	71,09	0,92	0,07	656,81
X <sub>8</sub> (mg/L)	70,36	0,94	0,09	645,92
X <sub>9</sub> (mg/L)	72,18	0,89	0,08	655,69
X <sub>10</sub> (mg/L)	80,01	0,97	0,10	726,80
$\bar{X}$ (mg/L)	72,52	0,88	0,07	661,11
$s_{ri}$	2,94	0,05	0,01	23,76
CV <sub>r</sub> (%)	4,06	6,00	15,74	3,59
$r$	8,25	0,15	0,033	66,52

## 5.1.2. Avaliação direta

### 5.1.2.1. Exatidão

Na Tabela 5-15 e Tabela 5-16 encontram-se os resultados obtidos para o z-score dos ensaios interlaboratoriais do ALABE e BIPEA para as diversas amostras. De salientar que as células em branco podem significar que não se quantificou o analito na respetiva amostra ou que não houve laboratórios suficientes para ser calculado o *z-score*.

Tabela 5-15: Resultados z-score dos ensaios interlaboratoriais BIPEA para os 4 analitos numa ampla gama de amostras. (VM – vinho de mesa, VL – vinho licoroso e E - espumante).

	Janeiro		Fevereiro			Março		Abril		Maio	
	<i>z-score</i>										
	VM	VL	VM	VL	E	VM	VM	VM	VL	VM	VM
<b>Ca</b>	-0,93	0,86	-0,50		-0,46	0,00	0,55			0,24	-0,25
<b>Fe</b>	-0,40	-0,29	-1,23		-0,67	-0,25	-0,33	-0,17		-0,57	-0,29
<b>Cu</b>	0,00	1,07	-0,83	-2,13	0,00	-0,50		-0,33			-0,67
<b>K</b>	-0,84	0,57	-0,86		-0,41	-0,68	-0,64	-0,88		-0,53	-0,64

Tabela 5-16: Resultados z-score dos ensaios interlaboratoriais ALABE para os 4 analitos numa ampla gama de amostras. (VM – vinho de mesa, VL – vinho licoroso)

	Janeiro		Fevereiro		Março		Abril		Maio	
	<i>z-score</i>									
	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL
<b>Ca</b>			-0,13	0,68	-0,55	0,55			0,14	0,4
<b>Fe</b>		0,22	-0,38	-0,32	-0,49					
<b>Cu</b>	-0,59	0,08							-0,22	

## 6. Discussão

### 6.1. Otimização do método

#### 6.1.1. Mostos

O método foi otimizado para análise de mostos. Os mostos apresentam algumas diferenças de matriz, quando comparados com o vinho. Apresentam um teor mais elevado de açúcar e menor grau alcoólico. Por essa razão, foi necessário fazer compatibilidade de matriz para análise no ICP-OES. Posto isto, testou-se a sua diluição com água e com solução de ácido nítrico 2% e etanol 10%. A sua diluição com ácido nítrico 2% e etanol 10% apresentou taxas de recuperação do ítrio mais próximas de 100%, com valores entre 93 e 100%, enquanto a sua diluição em água promovia taxas de recuperação do padrão interno mais baixas, entre 70 e 77%. Sendo que a percentagem de recuperação do ítrio deve ser o mais próxima de 100% e que internamente se considerou como aceites recuperações entre 80 a 120%, a diluição dos mostos a aplicar no método foi com solução de ácido nítrico 2% e etanol 10%.

#### 6.1.2. Aguardentes

Houve a necessidade de otimizar o método para ensaios com aguardentes. O método descrito revelou-se eficaz na quantificação de Fe e Cu em aguardentes e *brandys*, no entanto, não se revelou exato e preciso na quantificação de Ca neste tipo de amostras. A otimização do método para aguardentes atravessou diferentes fases e foram estudadas diversas variáveis. Posto isto elaboraram-se padrões cujo único analito presente era o Ca em duas gamas de concentração: 1; 2,5; 5 e 10 mg/L e com 1; 2; 4 e 6 mg/L para os padrões 1, 2, 3 e 4, respetivamente. Testaram-se também diferentes diluições de acordo com o grau alcoólico das amostras. Para amostras com teor alcoolométrico próximo dos 40° testou-se a sua diluição numa razão de 10:20 e 5:20 e para as amostras cujo teor alcoolométrico estava na gama dos 70° diluiu-se numa razão de 5:20 e 2:20. No que concerne a estes dois parâmetros concluiu-se que a elaboração de padrões nas concentrações mais baixas e a maior diluição das amostras, isto é, numa razão de 5:20 e de 2:20 para amostras com grau alcoólico de 40 e 70° respetivamente ofereciam resultados. A diluição permitiu aproximar a taxa de recuperação de ítrio dos 100%. Um outro parâmetro de teste foi o comprimento de onda usado para o padrão interno e para a quantificação de Ca. Concluiu-se que o conjunto que oferecia melhores resultados era a determinação de Ca a 422,673 nm e de padrão interno a 324,227 nm, já que foi o que resultou em valores mais próximos dos obtidos pelo método de absorção atômica. Selecionados os comprimentos de onda, monitorizaram-se soluções-padrão para testar o modo de visualização do plasma, sendo que a visualização em modo axial proporcionou sinais de intensidade mais elevados e uma maior robustez, e já que teoricamente melhora os limites de deteção. Outro

parâmetro de teste foi a elaboração de padrão interno na mesma matriz dos padrões, isto é, mantendo a concentração de 10 ppm mas em solução de HNO<sub>3</sub> 2% e etanol 10%. O padrão interno em matriz semelhante aos padrões promoveu taxas de recuperação mais próximas de 100% tanto nos padrões de calibração como nas amostras e conduziu a uma melhor precisão de resultados, destacada por uma melhoria nos RSDs. Finalmente foi elaborado um teste de recuperação de Ca numa amostra de aguardente e obteve-se uma taxa de recuperação de analito de 85%. No entanto, é imperativa a realização de mais testes para certificar que os parâmetros otimizados permitem a quantificação precisa de Ca em aguardentes, nomeadamente através da realização de testes comparativos entre ICP e absorção atómica.

## 6.2. Validação do método

A validação foi feita por avaliação direta e indireta e envolveu o estudo dos parâmetros de especificidade e seletividade, retas de calibração, limites de deteção e quantificação e avaliação da precisão e exatidão.

Seguindo as instruções da marca no equipamento, foram monitorizadas soluções-padrão com os elementos para diferentes linhas de emissão com o objetivo de identificar o comprimento de onda em que não se observassem interferências e que oferecesse uma boa linha de base, o menos ruidosa possível, para a quantificação mais precisa do analito. Os espectros com os comprimentos de onda identificados estão apresentados na Figura 5-1, Figura 5-2, Figura 5-3 e Figura 5-4, com os picos correspondentes às leituras dos padrões de calibração, bem como a correção de background feita para cada analito.

Um parâmetro de interesse na validação de um método é a gama de trabalho. Pela análise da Tabela 5-6, verifica-se que, para os elementos Ca, Fe e Cu, o valor de PG é superior ao tabelado na distribuição de Fisher e, portanto, as variâncias são estatisticamente diferentes, com 95% de confiança. Isto quer dizer que existem diferenças significativas entre a variabilidade no padrão mais baixo (P1) e no padrão mais alto (P4). Como se pode verificar, as variâncias associadas ao padrão mais concentrado são superiores em duas ordens de grandeza às variâncias associadas ao padrão menos concentrado, significando que o desvio padrão associado à concentração aumenta ao longo da reta, proporcionalmente ao aumento da concentração. Verifica-se então que para os elementos Fe, Ca e Cu há uma heterocedasticidade de variâncias, enquanto no elemento K se verifica uma homecedasticidade de variâncias, já que o valor de PG é inferior ao valor tabelado na distribuição de Fisher, como apresentando na Tabela 5-6. Quando os valores apresentam heterocedasticidade, deve proceder-se ao ajuste da gama de trabalho até que não se verifiquem diferenças significativas entre os padrões extremos ou então proceder-se

à elaboração de uma reta de calibração ponderada, pela atribuição de pesos diferentes aos padrões, atribuindo um maior peso aos pontos com menor incerteza associada (Miller & Miller, 2010). Tendo em conta que as amostras analisadas no laboratório apresentam valores que se estendem ao longo de uma grande gama de concentrações, o ajuste não seria vantajoso na medida em que significaria que se perderia a eficácia nas análises próximas do limite inferior ou superior, pelo ajuste do padrão mais baixo ou mais concentrado, respetivamente. A elaboração de uma reta de calibração ponderada não seria favorável para este tipo de ensaio, já que se pretende que o método e a obtenção de resultados sejam o mais automatizados possível e a ponderação implicaria um tratamento de dados posterior a cada análise. Tendo em conta o verificado, prosseguiu-se de forma distinta para os 4 analitos, utilizando duas abordagens para a avaliação do parâmetro da linearidade

O parâmetro da linearidade permite testar o tipo de função de calibração, permitindo averiguar se o método analítico produz respostas diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo, cujo critério está dependente do teste da homogeneidade de variâncias. Sendo que apenas se verificou a homogeneidade de variâncias para o elemento K, apenas se aplicou o teste de linearidade de Mandel a este analito. Pela análise da Tabela 5-7, verificou-se que o valor de PG obtido é inferior ao valor de F tabelado na distribuição de Fisher, garantindo que a função de calibração é linear. A linearidade pode também ser avaliada recorrendo à representação das curvas de calibração e pela análise do coeficiente de correlação, sendo que este deve ser superior a 0,995. Este critério de avaliação do modelo linear deve ser analisado de modo crítico, já que pode garantir que há uma boa correlação entre a intensidade e a concentração, mas pode não ser indicativo de linearidade (Relacre, 2000). Pela observação das curvas de calibração dos 4 elementos, representadas na Figura 5-1, Figura 5-2, Figura 5-3 e Figura 5-4 e pela análise dos coeficientes de correlação verifica-se que todos apresentam uma boa correlação entre a intensidade e a concentração, com coeficientes superiores a 0,995 e que a função aparenta seguir um modelo linear. Pela análise dos parâmetros de calibração destacadas na Tabela 5-5, e tendo em conta que as curvas de calibração seguem um modelo linear, sendo a sensibilidade constante ao longo da gama de trabalho e correspondente ao declive da reta, é possível deduzir que o elemento que apresenta maior sensibilidade é o Fe, dado que apresenta um declive superior e o elemento menos sensível é o K, cujo declive da reta é o menor.

Os limiares analíticos do método de ensaio são de grande importância, na medida em que permitem identificar o teor mínimo a partir do qual se deteta a presença do analito em

análise, definido como LD, e a menor concentração a partir da qual é possível quantificar, com determinada precisão e exatidão, a presença do analito, definido como LQ. Sendo que o método envolve uma curva de calibração linear, obtiveram-se estes limites de acordo com os parâmetros obtidos nas retas. Pela análise da Tabela 5-8, podemos concluir que os elementos que apresentam melhor LD e LQ são o Cu e o Fe e o elemento que apresenta um LD maior é o K, o que era presumível tendo em conta que se verificou como sendo o elemento com uma sensibilidade mais baixa. Assim sendo, é possível reportar valores a partir de teores de 0,55; 12,93; 0,085 e 269,80 mg/L para o Fe, Ca, Cu e K, respetivamente, sendo que a gama de valores entre LD e LQ deve apenas ser entendida como uma zona de deteção e não quantificação. A obtenção destes valores permite garantir a precisão de resultados reportados na gama em que os elementos se encontram nas amostras.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 5-10 é possível inferir que o método é seletivo e específico para os elementos Ca, Fe, Cu e K. É de notar que o método consegue detetar e quantificar os analitos na presença de outros elementos da matriz, bem como de possíveis interferentes da amostra. Os testes de recuperação foram feitos pela adição de *spikes* a 4 tipos de amostras, isto é, adicionaram-se volumes de solução monoelementar de concentração conhecida a amostras de vinho tranquilo tinto, branco, rosé e vinho do Porto. Adicionaram-se os *spikes* em balões de 500mL e procedeu-se posteriormente à leitura das amostras fortificadas em dois tubos diferentes, no sentido de descartar a possibilidade de haver contaminações nos mesmos. Tendo em conta que o valor da recuperação deve ser entre os 80 e 120 %, foi possível comprovar a seletividade do método para os 4 analitos em estudo e nos 4 tipos de amostras de vinho dado que se obtiveram percentagens de recuperação dentro dos limites estipulados.

A precisão neste método analítico foi avaliada pelo estudo dos parâmetros da repetibilidade e precisão intermédia.

Avaliou-se a repetibilidade, pela análise de dois tipos de amostra distintos, vinho tranquilo tinto e rosé em 10 medições consecutivas e sob as mesmas condições, efetuadas pelo mesmo analista e utilizando sempre o mesmo equipamento. Avaliando os resultados referentes a este parâmetro, através da análise da Tabela 5-11 e Tabela 5-12, é possível verificar uma concordância entre medições consecutivas e efetuadas sob as mesmas condições para os 4 analitos em estudo e nas duas amostras, já que o módulo da diferença entre dois valores consecutivos é sempre inferior ao limite de repetibilidade. Pela análise dos coeficientes de

variação de repetibilidade obtidos, conclui-se que estes são aceitáveis dado que apresentam valores baixos e sempre inferiores a 10% para todos os elementos nas diferentes amostras estudadas. Apesar dos resultados favoráveis será necessário fazer mais testes de avaliação de repetibilidade ao longo da gama de trabalho.

Um outro parâmetro para avaliação da precisão é a precisão intermédia, que se refere à precisão estimada sobre uma mesma amostra, fazendo variar uma condição. A avaliação deste parâmetro é um bom indicativo da precisão associada ao método, na medida em que espelha a rotina de um laboratório, sendo representativa da variabilidade de resultados associadas a ensaios diários. Neste estudo optou-se por se fazer variar o fator tempo, sendo que se analisaram duas amostras distintas, de vinho tranquilo branco e vinho licoroso ao longo dos dias. Foram lidas 3 réplicas por amostra, como estabelecido no método para análises diárias. Assim sendo, efetuaram-se 10 medições sobre duas amostras, durante um período de tempo executadas pelo mesmo analista. Guias com metodologias propostas para a validação de métodos analíticos indicam que o valor do coeficiente de variação não deve ultrapassar os 15%, com exceção de quando este é calculado próximo do limite de quantificação, sendo que, nesse caso, são aceites valores de CV até aos 20% (Huber, 2010). Pela análise da Tabela 5-13 e Tabela 5-14 referentes aos elementos Ca, Fe, Cu e K para os dois tipos de amostra analisados, podemos afirmar que os valores obtidos para o coeficiente de variação estão dentro do limite estabelecido, sendo que apenas se obteve um valor superior a 15%, que é, no entanto, facilmente justificável pela proximidade ao limite de quantificação de Cu. Os resultados demonstraram-se aceitáveis, no entanto, devem ser realizados mais testes nomeadamente a avaliação da precisão em padrões baixos, altos e com concentração intermédia, para garantir a precisão dos resultados ao longo de toda a gama de trabalho, já que a precisão é dependente da concentração do analito (Curvelo-Garcia & Barros, 2015).

Para avaliar a exatidão, isto é, a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor considerado como aceite, foram efetuados ensaios interlaboratoriais. O laboratório participa com regularidade em ensaios interlaboratoriais promovidos por entidades reconhecidas, como BIPEA (*Bureau Interprofessionel d'Études Analytiques*) e ALABE (Associação dos Laboratórios de Enologia), com o intuito de avaliar o seu desempenho, através de ensaios de aptidão. Avaliou-se o desempenho do laboratório pela análise de diversas amostras ao longo dos meses e, observando os resultados destacados na Tabela 5-15 e Tabela 5-16 é possível comprovar-se que o desempenho do laboratório é satisfatório, já que os valores de z-score obtidos são todos inferiores a 2, à exceção de uma amostra de vinho fortificado com *spikes* cujo

resultado do z-score em relação ao Cu se revelou questionável. Pela análise global dos resultados, é demonstrada uma concordância entre o valor obtido e o valor considerado como verdadeiro estabelecido no ensaio.

### 6.3. Comparação entre método OIV e método implementado no laboratório Sogrape

A OIV propõe um método para análise de elementos minerais no vinho usando o ICP-OES (OIV, 2013). Este método permite a quantificação de 11 elementos (K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, Al, Sr, Ba) e implica a diluição de todas as amostras numa razão de 1:5. O método propõe a utilização de dois padrões internos (Sc 335,372 nm e Cs 697,327 nm) e a adição de um terceiro canal na bomba peristáltica para um *buffer* iónico. A aplicação do método de análise no presente trabalho teve como base indicações propostas pelo modelo publicado pela OIV – utilizado como referência – mas com algumas alterações, com vista à otimização do mesmo. A otimização do método proposto pela OIV de análise multielementar de vinhos usando o ICP-OES permitiu a adaptação do mesmo para a sua aplicação em análises diárias de vinhos no laboratório da empresa. Para isso, e tendo em conta as indicações propostas para a determinação da concentração de diversos elementos, fizeram-se alterações com o intuito de o adaptar às necessidades e exigências do dia-a-dia de um laboratório com análises rotineiras aplicadas a um elevado número de amostras. Assim sendo, tornou-se o método mais rápido, capaz de quantificar mais elementos, com menos diluições e menos tratamento de amostras, bem como exigindo um menor gasto de reagentes.

Como forma de avaliar a capacidade de o método implementado responder favoravelmente às exigências laboratoriais, é importante comparar os resultados obtidos com os resultados da validação do método proposto pela OIV. Na Tabela 6-1 estão representados os resultados obtidos para os parâmetros de repetibilidade, limite de deteção, limite de quantificação e taxa de recuperação nos dois métodos. Pela análise dos resultados apresentados é possível verificar que a adaptação do método conduziu a melhores coeficientes de variação de repetibilidade para todos os analitos em estudo, já que se obtiveram valores inferiores a 10% para os 4 elementos. As taxas de recuperação obtidas estão dentro dos limites estabelecidos e demonstraram a seletividade do método, em concordância com as obtidas no método OIV. Quanto aos limiares analíticos do método, nos estudos da OIV não foram calculados para os elementos Ca e K, sendo que são considerados como elementos maioritários e o LD e LQ não se demonstram tão relevantes, já que são elementos que se manifestam no vinho em teores mais elevados. Comparando os valores obtidos para os elementos Cu e Fe, é possível verificar-se que os limites calculados para o Cu são muito próximos aos obtidos no método OIV e os obtidos

para o Fe, apesar de ligeiramente superiores não demonstram diferenças significativas. Assim sendo, é possível comprovar que a adaptação do método para um ensaio mais rápido e com menor gasto de reagentes promoveu resultados semelhantes.

Tabela 6-1: Resultados de repetibilidade, LD, LQ e taxa de recuperação no método de OIV e método implementado na Sogrape.

<b>Método OIV</b>				
<b>Analito</b>	<b>Repetibilidade (CVr %)</b>	<b>LD (mg/L)</b>	<b>LQ (mg/L)</b>	<b>Taxa de recuperação</b>
<b>Ca</b>	3,5	-	-	80-120%
<b>Fe</b>	2,2	0,08	0,25	80-120%
<b>Cu</b>	13,4	0,03	0,10	80-120%
<b>K</b>	2,3	-	-	80-120%
<b>Método Sogrape</b>				
<b>Analito</b>	<b>Repetibilidade (CVr %)</b>	<b>LD (mg/L)</b>	<b>LQ (mg/L)</b>	<b>Taxa de recuperação</b>
<b>Ca</b>	1,42/1,82	4,27	12,93	95-110%
<b>Fe</b>	1,36/1,41	0,18	0,55	90-105%
<b>Cu</b>	5,40/3,25	0,028	0,086	90-115%
<b>K</b>	1,13/0,91	89,03	269,79	90-105%

## 7. Conclusão

O conteúdo mineral dos vinhos tem influência direta na qualidade dos mesmos e a concentração em que estes estão presentes pode ter impacto na saúde humana, pelo que a determinação e quantificação mineral é fundamental. A técnica ICP-OES permite retirar informação quantitativa acerca dos elementos em estudo pela intensidade emitida no comprimento de onda relativo ao elemento. O ICP-OES foi adquirido e implementado no laboratório da Sogrape Vinhos pelas suas vantagens em relação ao método anteriormente utilizado para análise de metais, a absorção atómica. Este método permite uma análise multielementar simultânea e, por essa razão, naturalmente mais rápida para implementação num laboratório com um elevado número de amostras diárias e diversos elementos para análise. O analista despendia muito tempo na análise de metais em vinhos pelo método de absorção atómica, pelo que a implementação da análise por ICP-OES permite a rentabilização do mesmo, permitindo a realização de outras tarefas e ensaios laboratoriais.

Durante o desenvolvimento e com o objetivo de implementação de um novo método analítico foi necessário fazer a validação do mesmo. A validação foi feita de acordo com o definido na Norma ISSO 17025:2017 que afere os requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração e tendo em conta as indicações especificadas no Guia Relacre 13.

O objetivo do trabalho era fazer a validação para os 15 elementos abordados em detalhe no capítulo 1, o que não foi possível, dado que os primeiros resultados não se revelaram satisfatórios e, por essa razão, era necessário preparar novos padrões, o que não foi exequível pois algumas soluções monoelementares não chegaram em tempo útil. Posto isto, foi feita a validação do método para quantificação de 4 elementos – Ca, Cu, Fe e K a fim de garantir a fiabilidade de resultados e avaliar a eficiência do método para que a empresa pudesse substituir o equipamento de EAA-chama, anteriormente utilizado para análise destes elementos em vinhos, mostos e aguardentes. A validação foi feita por avaliação direta e indireta e envolveu o estudo dos parâmetros de especificidade e seletividade, retas de calibração, limites de deteção e quantificação, precisão e exatidão.

O estudo das curvas de calibração permitiu concluir sobre a boa correlação verificada entre a intensidade e a concentração e a avaliação do parâmetro da linearidade em diferentes abordagens (desvio-padrão residual e coeficiente de correlação e análise visual das curvas de calibração) permitiu aferir acerca da capacidade de o método promover resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos alvo de estudo.

A análise dos resultados permite confirmar que o método é específico e seletivo para os 4 analitos, já que foi possível identificar e distinguir os elementos nas diferentes matrizes complexas, garantindo que o sinal provinha do analito a quantificar. Comprovou-se a seletividade e especificidade do método pelos ensaios de recuperação, dado que se obtiveram taxas de recuperação próximas de 100%. A análise das curvas de calibração permitiu concluir que a função segue um comportamento linear em todos os elementos e que se verifica uma boa correlação entre a intensidade e a concentração. Analisando os declives, foi possível concluir que o analito com maior sensibilidade é o Fe e o elemento menos sensível é o K.

Quanto aos limiares analíticos do método de ensaio, foi possível verificar que estes permitem a quantificação precisa em toda a gama de vinhos de mesa e vinhos licorosos, garantindo segurança dos valores reportados a partir de teores de 0,55; 12,93; 0,085 e 269,80 mg/L para o Fe, Ca, Cu e K respetivamente.

A precisão do método foi avaliada pela precisão intermédia e repetibilidade. Quanto à repetibilidade, verificou-se que os resultados são aceitáveis já que se obtiveram coeficientes de variação de repetibilidade inferiores a 10% e se verificou uma concordância entre medições consecutivas. A análise dos resultados dos ensaios de precisão intermédia, fazendo variar os dias de análise, permitiu concluir que os coeficientes de variação de precisão intermédia estão dentro dos limites estabelecidos já que são inferiores a 15% para os analitos Ca, Fe e K e inferior a 20 % para o Cu.

Para avaliação da exatidão do método recorreu-se a ensaios interlaboratoriais para elaboração de testes de aptidão. Pela análise dos z-score obtidos ao longo dos meses para as diversas amostras, é possível concluir-se que o método é exato, já que se obtiveram valores satisfatórios, cujo z-score é inferior a 2, e apenas um valor questionável, cujo valor de z-score se encontra entre 2 e 3.

Em jeito de conclusão e apesar de serem necessários mais testes e ensaios, nomeadamente para tornar para tornar o método apto para as diferentes matrizes e para quantificação de mais elementos, é possível inferir que a validação do método comprovou que este é preciso e exato para implementação no laboratório para análises diárias para os 4 elementos – Ca, Fe, Cu e K.

## 8. Trabalho futuro

Um trabalho, depois de determinado o tema, inicia-se invariavelmente pela pesquisa e definição de objetivos, planeamento e estruturação de etapas. Ambiciona-se que todos os objetivos sejam cumpridos em tempo útil, o que nem sempre é exequível, ficando a ressalva que metas por atingir significam também perspectivas de trabalho futuro e hipóteses de melhoria. Assim sendo, destaco dois caminhos que permitiriam amplificar o potencial do método, oferecendo ao laboratório uma excelente ferramenta para quantificação de analitos de forma rápida e eficaz, em toda a amostragem.

Tendo em vista a aplicação do método nos vários produtos víquicos de análise diária no laboratório, é necessário validar o método para a análise de Ca em aguardentes. O método descrito permite a quantificação dos restantes metais, no entanto, não se revelou eficiente na quantificação de Ca em aguardentes e *brandys*, sendo que esta continua a ser feita pelo método de absorção atómica, já que os resultados obtidos não eram concordantes com os verificados pelo método de absorção atómica. Foi possível otimizar-se alguns parâmetros do método para quantificação de Ca em aguardentes pelo estudo de parâmetro como diluições, gama de trabalho, comprimento de onda de quantificação, modo de visualização de plasma e adaptação de padrão interno, no entanto, não foi possível testá-lo quanto seria necessário para garantir a fiabilidade dos resultados e posteriormente validá-lo. É por isso de extrema importância que mais ensaios sejam feitos para garantir que o método promove resultados exatos e precisos e que é possível a sua aplicação nas diferentes matrizes, isto é, vinhos tranquilos, vinhos licorosos, mostos e aguardentes.

Como perspectiva futura de continuação do trabalho desenvolvido até então, seria importante a validação do método para os restantes elementos abordados na introdução teórica deste relatório, como previsto, sendo que as condições do método e a gama de concentrações dos elementos já se encontram definidas. As atuais e crescentes preocupações com a saúde e o levantamento de questões ambientais pode ser indicativo de que a lista de elementos de necessária monitorização será alargada e os limites máximos admitidos legalmente sofrerão alteração. A validação do método para os 15 elementos abordados permitiria à empresa estar “um passo à frente” e, por mesmo isso, preparada para as eventuais alterações e exigências legais.

## Bibliografia

- Aceto, M. D. G., Preedy, V. R. & Watson, R. R., 2003. Metals in Wine.
- Afonso, J., 2015. *Entender de Vinho*. 6ª ed. s.l.:A Esfera dos Livros.
- Almeida, A., Cardoso, M. & Lima, J., 1994. Determination of copper in Port wine and Madeira by electrothermal atomization AAS. *Atomic Spectroscopy*, Volume 2, pp. 73-77.
- Anon., 1986. Decreto-lei 390/86, de 21 de Novembro. *Diário da República*, 21 Novembro.
- Arteroa, A., Artero, A., Tarínd, J. J. & Cano, A., 2015. The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas*.
- Barbaste, M., Médina, B. & Perez-Trujillo, J., 2003. Analysis of arsenic, lead and cadmium in wines from the Canary Islands, Spain, by ICP-MS. *Food Additives and Contaminants*, Volume 20, pp. 141-148.
- Bartsch, N., Asendorf, S. & Cassap, M., 2017. *ICP-OES detection limits versus speed of analysis*. Bremen, Alemanha, Thermo Fisher Scientific.
- Beauchemin, D., 2020. *Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES*. 1ª ed. s.l.:Elsevier.
- Berg, T. & Licht, D., 2002. International legislation on trace elements as contaminants in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, Volume 19, pp. 916-927.
- Bianchini, F. & Vainio, H., 2003. Wine and resveratrol: Mechanisms of cancer prevention?. *Eur. J. Cancer Prev.*
- Boschetti, W. et al., 2014. Simultaneous determination of Mo and Ni in wine. *Analytical Methods*, 6(12), pp. 4247-4256.
- Boss, C. B. & Fredeen, K. J., 2004. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*. 3ª ed. s.l.:Perkin Elmer.
- Boumans, P., 1987. *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy*. s.l.:John Wiley & Sons.
- Cabanis, M., Teissèdre, P. & Cabanis, J., 1996. Toxicite du Cadmium. *Feuillet Bleu de l'OIV*, Volume 18.
- Cabello-Pasini, A., Macías-Carranza, V., Siqueiros-Valencia, A. & Huerta-Díaz, M. A., 2012. Concentrations of Calcium, Magnesium, Potassium, and Sodium in Wines from Mexico. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 64, pp. 280-284.
- Cabrera-Vique, C., Teissèdre, P., Cabanis, M. & Cabanis, J., 2000. Manganese determination in grapes and wines from different regions of France. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 51, pp. 103-107.
- Cacho, J. et al., 1995. Iron, copper and manganese influence on wine oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 46, pp. 380-384.
- Caimi, G., Carollo, C. & Lo Presti, R., 2003a. Diabetes mellitus: Oxidative stress and wine. *Drugs Exp. Clin. Res.*
- Carmen de la Torre, M., 1997. Les contaminants du vin, aspects toxicologiques et de sécurité alimentaire. *Analisis*, Volume 25, pp. M21-M26.
- Castiñeira, M. d. M., Feldmann, I., Jakubowski, N. & Andersson, J. T., 2004. (2004). Classification of German White Wines with Certified Brand of Origin by Multielement Quantitation and Pattern Recognition Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), pp. 2962-2974.

- Catarino, S., Capelo, J. L., Curvelo-Garcia, A. S. & de Sousa, R. B., 2006a. Evaluation of contaminant elements in Portuguese wines and origin must by high intensity focused ultrasound combined with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 40(2), pp. 91-100.
- Catarino, S. C. G., 2006. Metais contaminantes nos vinhos - ocorrência por influência de bentonites.
- Catarino, S. & Curvelo-Garcia, A., 1999. Les teneurs en plomb et en cadmium de quelques vins portugais. *Feuille Vert de l'OIV*, Volume 1081.
- Catarino, S., Curvelo-Garcia, A. & de Sousa, R. B., 2006b. Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A comparison of two calibration approaches. *Talanta*, Volume 70, pp. 1073-1080.
- Catarino, S. & Curvelo-Garcia, A. S., 2011. Composição mineral do vinho – Ocorrência de metais contaminantes. Novembro, p. 49.
- Catarino, S. et al., 2008. Effect of Bentonite Characteristics on the Elemental Composition of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 56, pp. 158-165.
- Catarino, S. S. G., 2000. *A ocorrência de chumbo e cádmio em vinhos*. Dissertação de Mestrado em Enologia e Viticultura, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Comissão Europeia, 2021. REGULAMENTO (UE) 2021/1317 DA COMISSÃO. *Jornal Oficial da União Europeia*, 9 Agosto.
- Curvelo-Garcia, A. & Barros, P., 2015. *Química enológica - métodos analíticos: Avanços recentes no controlo da qualidade de vinhos e de outros produtos vitivinícolas*. s.l.:Engebook/Publindustria.
- Curvelo-Garcia, A. & Catarino, S., 1998. Os metais contaminantes dos vinhos: origens da sua presença, teores, influência dos factores tecnológicos e definição de limites (revisão bibliográfica crítica). *Ciência e Técnica Vitivinícola*, Volume 13, pp. 49-70.
- Curvelo-Garcia, A. S., 1988. *Controlo da Qualidade dos Vinhos: Química Enológica, Métodos analíticos*. s.l.:Instituto da Vinha e do Vinho.
- Das, K. K. et al., 2019. Primary concept of nickel toxicity – an overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30(2), pp. 141-152.
- de Caetano, G. et al., 2016. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document.
- Decreto-lei 390/86, 1986. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. *Diário da República*, 21 Novembro. Série I(269).
- Diário da República, 2009. Decreto-lei 173/2009, de 3 de Agosto. *Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas*, Série I (148/2009).
- Eschnauer, H., 1982. Trace elements in must and wine: primary and secondary contents. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 33, pp. 226-230.
- Eschnauer, H. & Neeb, R., 1988. Micro-element analysis in wine and grapes. Em: Berlin: Springer-Verlag: Linskens HI, Jackson JF, editors, pp. 67-91.
- Eurachem, 2000. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.
- Fabjanowicz, M. & Płotka-Wasyłka, J., 2021. Metals and metal-binding ligands in wine: Analytical challenges in identification. *Trends in Food Science and Technology*, pp. 382-390.

- Fassel, V. A. & Kniseley, R. N., 1974. Inductively coupled plasma. Optical emission spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 46(13), pp. 1110A-1120a.
- Fernández-Sánchez, M. L., 2018. Optical Atomic Emission Spectrometry—Inductively Coupled Plasma. Em: P. Worsfold, A. Alan Townshend & C. Poole, eds. *Encyclopedia of Analytical Science*. s.l.:Elsevier, pp. 210-215.
- Fournier, J.-B., Hirsch, O. & Martin, G., 1998. Analyse du zinc, du cuivre et du plomb dans le vin. Rapport entre les concentrations totales analysées para spectrométrie d'absorption atomique et les concentrations des ions libres déterminées par polarographie. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, Volume 32, pp. 45-50.
- Frías, S. et al., 2003. Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *Talanta*, 6 Fevereiro.Issue 59(2):335-44.
- Frías, S., Trujillo, J. P., Peña, E. & Conde, J., 2001. Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic conten. *European Food Research and Technology*, 213(2), pp. 145-149.
- Gadzhieva, A., 2016. Iron, copper and zinc determination in wine using flame atomic absorption spectroscopy. *Applications Chemist, Thermo Fisher Scientific*.
- Galani-Nikolakaki, S., Kallithrakas-Kontos, N. & Katsanos, A., 2002. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *Science of The Total Environment*, 285(1-3), pp. 155-163.
- Gayon, P. R., 2005. O Vinho. Em: *O Vinho*. s.l.:Publicações Europa América, p. 7.
- Gerendás, J. & Führs, H., 2013. The Significance of Magnesium for Crop Quality. *Plant and Soil*, 368(1-2), pp. 101-128.
- German, J. B. & Walzem, R. L., 2000. The Health Benefits of Wine. *Annual Review of Nutrition*, Issue 20(1).
- Gómez, M., Feldmann, I., Jakubowski, N. & Andersson, J., 2004. Classification of german white wines with certified brand of origin by multielement quantitation and pattern recognition techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 52, pp. 2962-2974.
- Gonzalez, P. A. et al., 2021. Elemental composition, rare earths and minority elements in organic and conventional wines from volcanic areas: The Canary Islands (Spain). *PLoS ONE*, 16(11).
- Greenough, J., Longerich, H. & S.E., J., 1997. Element fingerprinting of Okanagan Valley wines using ICP-MS: Relationships between wine composition, vineyard and wine colour.. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Volume 3, pp. 75-83.
- Guilford, J. M. & Pezzuto, J. M., 2011. Wine and Health - a Review.
- Herce-Pagliai, C. et al., 2002. Determination of total arsenic, inorganic and organicspecies in wine. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), pp. 542-546.
- Hernandez, G. G., de la Torre, A. H. & Leon, J. J. A., 1996. Quantity of K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Pb, Zn and ashes in DOC Tacoronte-Acentejo (Canary Islands, Spain) musts and wines. *Z Lebensm Unters Forsch*, Issue 203(6):517-21.
- Hou, X. & Jones, B. T., 2000. Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry. Em: R. Meyers, ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, pp. 9468-9485.
- Huber, L., 2010. Validation of Analytical Methods. *Agilent Technologies*.

- Huguet, M. E. R., 2004. Monitoring of Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in fine Uruguayan wines by atomic absorption spectroscopy. *Atomic Spectroscopy*, 25(4), pp. 177-184.
- Infovini, 2009. *O portal do vinho português*. [Online]  
Available at: <https://www.infovini.com/pagina.php?codNode=18009>  
[Acedido em 24 Março 2022].
- INMETRO, 2003. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. *Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial*, Issue DOQ-CGCRE-008.
- Interesse, F. S., Lamparelli, F. & Alloggio, V., 1984. Mineral Contents of some Southern Italian Wines. *Z Lebensm Unters Forsch*, Volume 178, pp. 272-278.
- IPortWine.com, 2022. *Tipos de Vinhos do Porto*. [Online]  
Available at: <https://iportwine.com/pt/academia/tipos-vinho-porto/>  
[Acedido em 5 Abril 2022].
- ISO 8466-1, 1990. *Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*, Genève: International Organization for Standardization.
- ISO 8466-2, 1993. *Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 2: Calibration strategy for non-linear second order calibration functions*, Genève: International Organization for Standardization.
- ISO/IEC, 1., 2017. *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*, s.l.: s.n.
- Ivanova-Petropulos, V. et al., 2016. Optimization and Validation of a Microwave Digestion Method for Multi-element Characterization of Vranec Wines. *Food Analytical Methods*, Issue 9, pp. 48-60.
- IVDP, 2022. *Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto - Vinhos do Porto*. [Online]  
Available at: <https://www.ivdp.pt/pt/vinhos/vinhos-do-porto/introducao/>  
[Acedido em 5 Abril 2022].
- IVV, 2018. *A Vinha e o Vinho em Portugal*. [Online]  
Available at: <https://www.ivv.gov.pt/np4/47/>  
[Acedido em 3 Março 2022].
- IVV, 2018. *DOP "Porto"*. [Online]  
Available at: <https://www.ivv.gov.pt/np4/286/>  
[Acedido em 5 Abril 2022].
- IVV, 2018. *Instituto da Vinha e do Vinho: Produção de Aguardentes de Origem Vínica*. [Online]  
Available at: <https://www.ivv.gov.pt/np4/7701.html>  
[Acedido em 24 Março 2022].
- IVV, 2018. *Instituto do Vinho e da Vinha: Rotulagem - Indicações Obrigatórias*. [Online]  
Available at: <https://www.ivv.gov.pt/np4/7707.html>  
[Acedido em 24 Março 2022].
- Jin, Q., Zhu, C. H., Border, M. W. & Hieftje, G. M., 1991. A microwave plasma torch assembly for atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 46(3), pp. 417-430.
- Jordão, A. M. & Cosme, F., 2022. Grape Maturation. Em: V. K. Joshi, ed. *Concise Encyclopedia of Science and Technology of Wine*. s.l.:CRC Press Taylor and Francis Group.

- Jos, A. et al., 2004. Differentiation of sparkling wines (cava and champagne) according to their mineral content. *Talanta*, Volume 63, pp. 377-382.
- Khan, S. R., Sharma, B., Chawla, P. A. & Bhatia, R., 2021. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES): a Powerful Analytical Technique for Elemental Analysis. *Food Analytical Methods*, Volume 15, pp. 666-688.
- Kristl, J., Veber, M. & Slekovec, M., 2002. The application of ETAAS to the determination of Cr, Pb and Cd in samples taken during different stages of the winemaking process. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(3), pp. 200-204.
- Kunkee, R. E. & Eschnauer, H. R., 2003. Wine, sixth edition Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Em: Weinheim: Wiley-VCH, pp. 393-431.
- Larsen, E. et al., 2002. Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark. *Food Additives and Contaminants*, Volume 19, pp. 33-46.
- Lay, H. & Meyer, L., 1989. The distribution of aluminium in marc, yeast, wine and deposit. *Wein-Wissenschaft, Wiesbaden*, Volume 44, pp. 173-176.
- Lendinez, E., Lopez, C., Cabrera, C. & Lorenzo, M., 1998. Determination of chromium in wine and other alcoholic beverages consumed in Spain by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of AOAC international*, Volume 8, pp. 1043-1047.
- Lima, M. et al., 2004. Determination of lead and cadmium in vineyard soils, grapes and wines of the Azores. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, Volume 38, pp. 163-170.
- Maathuis, F. J. M., 2009. Physiological Functions of Mineral Macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), pp. 250-258.
- Majumdar, A. J. & Dubey, N., 2017. Applications of inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-OES) in impurity profiling of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, 8(1).
- Martins, J. P., 2011. *O Prazer do Vinho do Porto*. s.l.:Livros d'Hoje.
- Maujean, A., Gomerieux, T. & Garnier, J., 1988. *Bull OIV*, Volume 61, pp. 683-684.
- McKinnon, A. J., Cattrall, R. W. & Scollary, G. R., 1992. Aluminum in Wine - Its Measurement and Identification of Major Sources. *American Journal of Viticulture and Enology*, Janeiro, Volume 43, pp. 166-170.
- Médina, B. et al., 2000. Influence of atmospheric pollution on the lead content of wines. *Food Additives and Contaminants*, Volume 25, pp. 435-445.
- Médina, B. & Sudraud, P., 1980. Teneur des vins en chrome et en nickel. Causes d'enrichissement. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, Volume 14, pp. 79-96.
- Miller, J. N. & Miller, J. C., 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6<sup>a</sup> ed. s.l.:Pearson.
- Moreno, J. & Peinado, R., 2012. *Enological Chemistry*. s.l.:AP.
- Morishige, Y. & Kimura, A., 2008. Ionization Interference in Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy. *SEI Technical Review*, Issue 66, pp. 106-111.

- Navarro, G. & Navarro, S., 2022. Winemaking Problem: Stuck and Sluggish Fermentation. Em: V. Joshi, ed. *Concise Encyclopedia of Science and Technology of Wine*. s.l.:CRC Press Taylor and Francis Group, pp. 297-308.
- Ng, J., Wang, J. & Shraim, A., 2003. A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*, Volume 52(9), pp. 1353-1359.
- Nicolini, G., Larcher, R., Pangrazzi, P. & Bontempo, L., 2004. Changes in the contents of micro- and trace- elements in wine due to winemaking treatments. *Vitis*, 43(1), pp. 41-45.
- OIV, 2013. *Analysis of mineral elements in wines using ICP-AES. Method OIV-MA-AS322-13*. [Online]  
Available at: <https://www.oiv.int/public/medias/2575/oiv-ma-as322-13-en.pdf>  
[Acedido em 30 3 2022].
- OIV, 2015. *International Code of Oenological Practices: Maximum acceptable limits*. [Online]  
[Acedido em 18 Março 2022].
- Olesik, J. W., 1991. Elemental Analysis Using ICP-OES and ICP/MS. *Analytical Chemistry*, Volume 63, pp. 12A-21A.
- Olesik, J. W., 2020. ICP-OES Capabilities, Developments, Limitations, and Any Potential Challengers?. *Spectroscopy*, 35(6), pp. 18-21.
- Pérez-Jordán, M. Y. et al., 1999. Inductively coupled plasma mass spectrometry analysis of wines. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14(1), pp. 33-39.
- Pohl, P., 2007. What do metals tell us about wine?. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(9).
- Rankine, B. C., 1989. *Making good wine - a manual of winemaking practice for Australia and New Zealand*. Melbourne: SunBooks.
- Rebordinos, L., Rodríguez, M. E., Cordero-Bueso, G. & Cantoral, J., 2022. Understanding Wine Yeasts. Em: V. Joshi, ed. *Concise Encyclopedia of Science and Technology of Wine*. s.l.:CRC Press, Taylor and Francis Group, pp. 231-241.
- Regulamento (UE) n° 1308/2013, 2013. Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, 17 dezembro.
- Relacre, 2000. *Guia Relacre 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química*, s.l.: s.n.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P. & Ribéreau-Gayon, P., 1982. *Sciences et techniques du vin. Tome 1– Analyse et contrôle des vins*. 2nd ed. Paris: Dunod.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdiou, D., 2006. *Handbook of Enology - The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*. Chichester(West Sussex): John Wiley and Sons, Ltd.
- Rizzon, L. A. & Gasparin, A. M., 2005. The calcium carbonate in the desacidification of isabella wine. *Ciência Rural*, 35(3), pp. 720-723.
- Sabin, G. P., 2007. Desenvolvimento e validação de método utilizando SPE E GC-MS para a determinação multirresíduo de pesticidas em água potável. *Dissertação de Mestrado*.
- Salacha, M.-I., Kallithraka, S. & Tzourou, I., 2008. Browning of white wines: correlation with antioxidant characteristics, total polyphenolic composition and flavanol content. *International Journal of Food Science & Technology*, Volume 43, pp. 1073-1077.

- Salvo, F. et al., 2003. Influence of different mineral and organic pesticide treatments on Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) contents determined by derivative potentiometric stripping analysis in Italian white and red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 51, pp. 1090-1094.
- Satyanarayana, K. & Durani, S., 2010. Separation and inductively coupled plasma optical emission spectrometric (ICP-OES) determination of trace impurities in nuclear grade uranium oxide. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Volume 285, pp. 659-665.
- Scollary, G., 1997. Metals in wine: contamination, spoilage and toxicity. *Analysis*, 25(3).
- Seruga, M., Grgic, J., Zdravko, G. & Seruga, B., 1998. Aluminium content of some croatian wines. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 94(19), pp. 336-340.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R., 2018. An Introduction to Optical Atomic Spectrometry. Em: *Principles of Instrumental Analysis*. 7<sup>a</sup> ed. Boston, EUA: Cengage Learning, pp. 231-252.
- Soares, M., Bastos, M. & Ferreira, M., 1995. Quantification of Ag, Co, Si, and Zn in Port Wine by atomic absorption spectrometry. *Atomic Spectrometry*, Volume 6, pp. 256-260.
- Solfrizzi, V. et al., 2006. Macronutrients, aluminium from drinking water and foods, and other metals in cognitive decline and dementia. *Journal of Alzheimer's disease*, Volume 10 2-3, pp. 303-30.
- Stockley, C., Antoce, A. O. & Kosti, R. I., 2022. Wine: Therapeutic Potential. Em: V. K. Joshy, ed. *Concise Encyclopedia of Science and Technology of Wine*. s.l.:CRC Press - Taylor & Francis Group.
- Sudraud, P., Médina, B. & Grenon, J. P., 1995. Teneurs en éléments minéraux des vins. *Feuille Vert de l'OIV*, Volume 984.
- Tariba, B., 2011. Metals in Wine - Impact on Wine Quality and Health Outcomes.
- Taylor, V., Longrich, H. & Greenough, J., 2003. Multielement analysis of Canadian wines by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and multivariate statistics. *Journal of Agricultural and Food*, Volume 51, pp. 856-860.
- Teissèdre, P., Cabrera, V. C., Cabanis, M. & Cabanis, J., 1998. Determination of nickel in French wines and grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 49, pp. 205-210.
- Telišman, S., Jurasović, J., Pizent, A. & Cvitković, P., 2001. Blood Pressure in Relation to Biomarkers of Lead, Cadmium, Copper, Zinc, and Selenium in Men without Occupational Exposure to Metals. *Environmental Research*, Volume 87, pp. 57-68.
- Templeton, D. M. & Fujishiro, H., 2017. Terminology of elemental speciation – an IUPAC perspective. *Coordination Chemistry Reviews*, Volume 352.
- The Australian Wine Research Institute, s.d. *Calcium Instability*. [Online] Available at: [https://www.awri.com.au/industry\\_support/winemaking\\_resources/fining-stabilities/hazes\\_and\\_deposits/calcium\\_instability/](https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/fining-stabilities/hazes_and_deposits/calcium_instability/) [Acedido em 17 Março 2022].
- Thiel, G., Geisler, G., Bleschschmidt, I. & Danzer, K., 2004. Determination of trace elements in wines and classification according to their provenance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume 378, pp. 1630-1636.
- Trujillo, J. P. P. et al., 2011. Content in metallic ions of wines from the Madeira and Azores archipelagos. *Food Chemistry*, 124(2), pp. 533-537.
- Waterhouse, A. L. & Laurie, V. F., 2006. Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, Issue 57, pp. 306-313.

Whitman College, 2017. *Chapter 4 - Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*.

[Online]

Available at: [https://www.whitman.edu/chemistry/edusolns\\_software/FAAS\\_ICP\\_2017/CH4\\_ICP-AES\\_2017.pdf](https://www.whitman.edu/chemistry/edusolns_software/FAAS_ICP_2017/CH4_ICP-AES_2017.pdf)

[Acedido em 23 Março 2022].

WHO - World Health Organization, 1992. Cadmium. *Environmental Health Criteria*, 134.

WHO - World Health Organization, 1998. Copper. *Environmental Health Criteria*, 200.

WHO - World Health Organization, 2010. *Exposure to lead: a major public health concern*, Geneva: s.n.

## ANEXOS

Anexo I: Certificação de solução monoelementar de Al 1000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.



page 1 of 2  
Version 1

Certificate  
of Analysis

**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**

Solution of Aluminium(Al) concentration 1000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>

Lot N: 793686

Ref N: C002.2NP.L1

Certification Date: 04.01.2022

Barcode: 83118593

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
Al	999.0 ± 4.4 <sup>(y)</sup>	NIST SRM No 3101a Lot 140903; NIST SRM No 3168a Lot 120629

Notes:

(y) WQP 5.15.1.24 The certified value was obtained by a weighted mean of the results of two independent calibration methods among: Classical Volumetric, Primary Gravimetric, Instrumental (ICP/OES, ICP/MS or IC)

Density\* 1.011 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

Starting Material, Purity\* Batch

Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 99.999% 82107611

\* These values are not certified

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024

Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening)

**Concept of Certification and traceability statement:**

This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MOhm deionised water and filtered through a 0.2 micron filter.

The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor  $k = 2$ , which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 4/02

Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM)

The metrological traceability is using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.

The measurement results are traceable to SI. All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to DKD, and are checked daily.

Class A laboratory glassware is used.

The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**

Calibration of ICP/OES, AAS

Validation of analytical methods

Preparation of "working reference samples"

Detection limit and linearity studies

This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

**Instructions for the correct use of this reference material:**

This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**

This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept in its original packaging, tightly closed stored, as written in the section: Storage Conditions. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should



CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1836)

CPAchem Ltd  
www.cpachem.com  
e-mail: info@cpachem.com; tel: +359 42 80 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: acad2@wanadoo.fr; tel: 01 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33

**Anexo II: Certificação de solução monoelementar de As 1000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.**



Certificate  
of Analysis

**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**  
Solution of Arsenic(As) concentration 1000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>

Lot N: 793687  
Barcode: 83135538

Ref N: C003.2NP.L1

Certification Date: 04.01.2022

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
As	1003.7 ± 4.3 <sup>(M)</sup>	NIST SRM No 3103a Lot 100618

Notes:

(a) WQP 5.15.1.1 The certified value was obtained using ICP/OES or ICP/MS calibration

Density\* 1.015 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

Starting Material, Purity*	Batch
As 99.996%	B2115593

\* These values are not certified

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024

Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening)

**Concept of Certification and traceability statement:**

This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MΩm deionised water and filtered through a 0.2 micron filter.

The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor  $k = 2$ , which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 402

Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM)

The metrological traceability is using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.

The measurement results are traceable to SI. All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to DKD, and are checked daily.

Class A laboratory glassware is used.

The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**

Calibration of ICP/OES, AAS

Preparation of "working reference samples"

This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

Validation of analytical methods

Detection limit and linearity studies

**Instructions for the correct use of this reference material:**

This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**

This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept in its original packaging, tightly closed stored, as written in the section: Storage Conditions. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should be tightly sealed and the bottle should be stored in refrigerator to minimize transpiration rate. The laboratory performs stability tests according to MOP 5.14.1 therefore solutions with one and the same bar-code number might have different expiration dates.



CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1836)

CPAchem Ltd.  
www.cpachem.com  
e-mail: info@cpachem.com; tel.: +359 42 60 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: ascd2@wanadoo.fr; tel.: +33 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33

Anexo III: Certificação de solução monoelementar de Ca 1000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.



Certificate  
of Analysis

**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**

**Solution of Calcium(Ca) concentration 1000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>**

Lot N: 793689

Ref N: C009.2NP.L1

Certification Date: 04.01.2022

Barcode: 83114991

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
Ca	1000.0 ± 2.5 <sup>(y)</sup>	NIST SRM No 3109a Lot 130213; NIST SRM No 3168a Lot 120629

**Notes:**

(y) WQP 5.15.1.24 The certified value was obtained by a weighted mean of the results of two independent calibration methods among: Classical Volumetric, Primary Gravimetric, Instrumental (ICP/OES, ICP/MS or IC)

Density\* 1.015 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

Starting Material, Purity*	Batch
CaCO <sub>3</sub> 99.994%	82107550

\* These values are not certified

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024

Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening )

**Concept of Certification and traceability statement:**

This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MOhm deionised water and filtered through a 0.2 micron filter.

The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor k = 2, which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 4/02

Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM)

The metrological traceability is assured using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.

The measurement results are traceable to SI.

All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to DKD, and are checked daily.

Class A laboratory glassware is used.

The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**

Calibration of ICP/OES, AAS

Preparation of "working reference samples"

This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

Validation of analytical methods

Detection limit and linearity studies

**Instructions for the correct use of this reference material:**

This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**

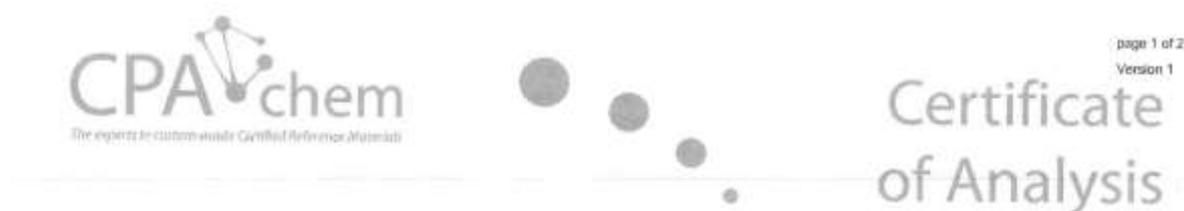
This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept



CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1836)

CPAchem Ltd  
www.cpacchem.com  
e-mail: info@cpacchem.com; tel.:+359 42 60 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: acsd2@wanadoo.fr; tel.:01 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33

Anexo IV: Certificação de solução monoelementar de Cd 1000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.



**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**  
Solution of Cadmium(Cd) concentration 1000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>

Lot N: 793888  
Barcode: 83121791

Ref N: C010.2NP.L1

Certification Date: 04.01.2022

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
Cd	995.1 ± 3.6 <sup>M</sup>	NIST SRM No 3108 Lot 130116; NIST SRM No 3168a Lot 120629

Notes:

(y) WQP 5.15.1.24 The certified value was obtained by a weighted mean of the results of two independent calibration methods among: Classical Volumetric, Primary Gravimetric, Instrumental (ICP/OES, ICP/MS or IC)

Density\* 1.009 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

Starting Material, Purity\* Batch  
Cd 99.999% 82088095

\* These values are not certified

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024

Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening )

**Concept of Certification and traceability statement:**

This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MOhm deionised water and filtered through a 0.2 micron filter.

The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor k = 2, which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 4/02

Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM4)

The metrological traceability is using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.

The measurement results are traceable to SI. All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to DKD, and are checked daily.

Class A laboratory glassware is used.

The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**

Calibration of ICP/OES, AAS

Preparation of "working reference samples"

This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

Validation of analytical methods

Detection limit and linearity studies

**Instructions for the correct use of this reference material:**

This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**

This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept in its original packaging, tightly closed stored, as written in the section: Storage Conditions. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should



CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1836)

CPAchem Ltd  
www.cpachem.com  
e-mail: info@cpachem.com; tel.: +359 42 80 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: acsd2@wanadoo.fr; tel.: 01 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33

**Anexo V: Certificação de solução monoelementar de Co 1000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.**



Certificate  
of Analysis

**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**

**Solution of Cobalt(Co) concentration 1000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>**

Lot N: 793690

Ref N: C012.2NP.L1

Certification Date: 04.01.2022

Barcode: 83121005

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
Co	999.8 ± 2.5 <sup>kl</sup>	NIST SRM No 3113 Lot 190630; NIST SRM No 3168a Lot 120629

**Notes:**

(y) WQP 5.15.1.24 The certified value was obtained by a weighted mean of the results of two independent calibration methods among: Classical Volumetric, Primary Gravimetric, Instrumental (ICP/OES, ICP/MS or IC)

Density\* 1.011 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

**Starting Material, Purity\* Batch**

Co 99.994% 82094232

\* These values are not certified

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024

Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening)

**Concept of Certification and traceability statement:**

This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MOhm deionised water and filtered through a 0.2 micron filter.

The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor  $k = 2$ , which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 4/02

Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM)

The metrological traceability is using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.

The measurement results are traceable to SI. All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to DKD, and are checked daily. Class A laboratory glassware is used.

The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**

Calibration of ICP/OES, AAS

Validation of analytical methods

Preparation of "working reference samples"

Detection limit and linearity studies

This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

**Instructions for the correct use of this reference material:**

This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**

This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept in its original packaging, tightly closed stored, as written in the section: Storage Conditions. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should



CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1836)

CPAchem Ltd  
www.cpachem.com  
e-mail: info@cpachem.com; tel.: +359 42 60 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: acsd2@wanadoo.fr; tel.: 01 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33

Anexo VI: Certificação de solução monoelementar de Cr 1000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.



page 1 of 2  
Version 1

# Certificate of Analysis

## CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

Solution of Chromium(Cr) concentration 1000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>

Lot N: 793691

Ref N: C013.2NP.L1

Certification Date: 04.01.2022

Barcode: 83116872

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
Cr	1001.6 ± 4.1 <sup>kl</sup>	NIST SRM No 3112a Lot 030730; NIST SRM No 3188a Lot 120629

**Notes:**

(y) WQP 5.15.1.24 The certified value was obtained by a weighted mean of the results of two independent calibration methods among: Classical Volumetric, Primary Gravimetric, Instrumental (ICP/OES, ICP/MS or IC)

Density\* 1.013 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

Starting Material, Purity\* Batch

Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 99.999% 82085827

\* These values are not certified

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024

Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening)

**Concept of Certification and traceability statement:**

This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MΩcm deionized water and filtered through a 0.2 micron filter.

The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor k = 2, which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 402

Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM)

The metrological traceability is using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.

The measurement results are traceable to SI. All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to DKD, and are checked daily.

Class A laboratory glassware is used.

The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**

Calibration of ICP/OES, AAS

Preparation of "working reference samples"

This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

Validation of analytical methods

Detection limit and linearity studies

**Instructions for the correct use of this reference material:**

This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**

This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept in its original packaging, tightly closed stored, as written in the section: Storage Conditions. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should



CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1836)

CPAchem Ltd  
www.cpachem.com  
e-mail: info@cpachem.com; tel.: +359 42 80 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: acsd2@wanadoo.fr; tel.: 01 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33



Anexo VIII: Certificação de solução monoelementar de Fe 1000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.



page 1 of 2  
Version 1

Certificate  
of Analysis

**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**  
Solution of Iron(Fe) concentration 1000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>

Lot N: 793693  
Barcode: 83125188

Ref N: C019.2NP.L1

Certification Date: 04.01.2022

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
Fe	998.1 ± 2.5 <sup>(y)</sup>	NIST SRM No 3126a Lot 140812; NIST SRM No 3168a Lot 120629

Notes:

(y) WQP 5.15.1.24 The certified value was obtained by a weighted mean of the results of two independent calibration methods among: Classical Volumetric, Primary Gravimetric, Instrumental (ICP/OES, ICP/MS or IC)

Density\* 1.010 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

Starting Material, Purity\* Batch

Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 99.999% 82104306

\* These values are not certified.

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024

Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening)

**Concept of Certification and traceability statement:**

This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MOhm deionised water and filtered through a 0.2 micron filter.

The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor  $k = 2$ , which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 4/02

Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM)

The metrological traceability is using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.

The measurement results are traceable to SI. All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to UKD, and are checked daily.

Class A laboratory glassware is used.

The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**

Calibration of ICP/OES, AAS

Preparation of "working reference samples"

This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

Validation of analytical methods

Detection limit and linearity studies

**Instructions for the correct use of this reference material:**

This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**

This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept in its original packaging, tightly closed stored, as written in the section: Storage Conditions. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should



CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1835)

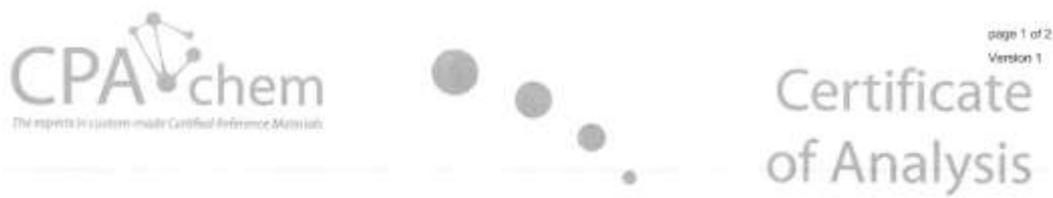
CPAchem Ltd  
www.cpachem.com  
e-mail: info@cpachem.com; tel: +359 42 60 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: acad2@wanadoo.fr; tel: 01 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33







**Anexo XII: Certificação de solução monoelementar de Na 10000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.**



**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**  
Solution of Sodium(Na) concentration 10000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>

Lot N: 793700 Ref N: C135.2NP.L1 Certification Date: 04.01.2022  
Barcode: 83132346

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
Na	9986 ± 30 <sup>14</sup>	NIST SRM No 3152a Lot 120715

Notes:  
(a) WQP 5.15.1.1 The certified value was obtained using ICP/OES or ICP/MS calibration

Density\* 1.029 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

Starting Material, Purity*	Batch
NaNO <sub>3</sub> 99.997%	82104733

\* These values are not certified

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024 Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening )

**Concept of Certification and traceability statement:**  
This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MOhm deionised water and filtered through a 0.2 micron filter.  
The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor k = 2, which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 402  
Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM)  
The metrological traceability is using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.  
The measurement results are traceable to SI. All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to DKD, and are checked daily.  
Class A laboratory glassware is used.  
The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**  
Calibration of ICP/OES, AAS Validation of analytical methods  
Preparation of "working reference samples" Detection limit and linearity studies  
This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

**Instructions for the correct use of this reference material:**  
This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**  
This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept in its original packaging, tightly closed stored, as written in the section: Storage Conditions. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should be tightly sealed and the bottle should be stored in refrigerator to minimize transpiration rate. The laboratory performs stability tests according to MQP 5.14.1 therefore solutions with one and the same bar-code number might have different expiration dates.



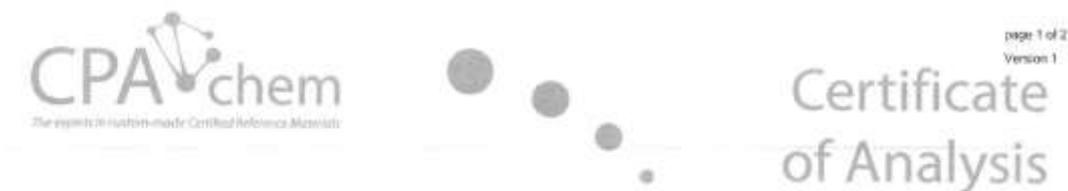
CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1836)

CPAchem Ltd  
www.cpachem.com  
e-mail: info@cpachem.com; tel: +359 42 60 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: acid2@wvnadoo.fr; tel: 01 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33





Anexo XV: Certificação de solução monoelementar de Y 1000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.



page 1 of 2  
Version 1

**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**  
Solution of Yttrium(Y) concentration 1000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>

Lot N: 793701 Ref N: C067.2NP.L5 Certification Date: 04.01.2022  
Barcode: 83122910

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
Y	1001,3 ± 2,8 <sup>01</sup>	NIST SRM No 3167a Lot 120314; NIST SRM No 3168a Lot 120629

Notes:  
(y) WQP 5.15.1.24 The certified value was obtained by a weighted mean of the results of two independent calibration methods among: Classical Volumetric, Primary Gravimetric, Instrumental (ICP/OES, ICP/MS or IC)

Density\* 1.009 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

Starting Material, Purity*	Batch
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 99.95%	82110598

\* These values are not certified

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024 Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening.)

**Concept of Certification and traceability statement:**  
This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MOhm deionised water and filtered through a 0.2 micron filter.  
The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor k = 2, which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 4/02  
Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM)  
The metrological traceability is using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.  
The measurement results are traceable to SI. All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to DKD, and are checked daily.  
Class A laboratory glassware is used.  
The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**  
Calibration of ICP/OES, AAS Validation of analytical methods  
Preparation of "working reference samples" Detection limit and linearity studies  
This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

**Instructions for the correct use of this reference material:**  
This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**  
This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept in its original packaging, tightly closed stored, as written in the section: Storage Conditions. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should



CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1834)



CPAchem Ltd  
www.cpachem.com  
e-mail: info@cpachem.com; tel: +359 42 60 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: acsd2@wanadoo.fr; tel: 01 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33

Anexo XVI: Certificação de solução monoelementar de Zn 1000 mg/L em HNO<sub>3</sub> 2%.



**CERTIFIED REFERENCE MATERIAL**  
Solution of Zinc(Zn) concentration 1000 mg/l Matrix: 2% HNO<sub>3</sub>

Lot N: 793698  
Barcode: 83134463

Ref N: C069.2NP.L1

Certification Date: 04.01.2022

Component	Certified Value and uncertainty [mg/l]	Metrological traceability
Zn	1000.9 ± 2.6 (y)	NIST SRM No 3168a Lot 120629

Notes:

(y) WQP 5.15.1.24 The certified value was obtained by a weighted mean of the results of two independent calibration methods among: Classical Volumetric, Primary Gravimetric, Instrumental (ICP/OES, ICP/MS or IC)

Density\* 1.010 g/cm<sup>3</sup> at 20°C

Starting Material, Purity*	Batch
Zn 99.992%	82113735

\* These values are not certified

Storage Conditions: Store under normal laboratory conditions, at temperatures between 15° to 25°C

Shelf-life: 04.02.2024

Date of opening: .....

(Recommended period of use should not exceed 12 month(s) from date of opening)

**Concept of Certification and traceability statement:**

This certified reference material (CRM) is produced using a high purity starting material, acid from sub-boiling and 18 MOhm deionised water and filtered through a 0.2 micron filter.

The reported expanded uncertainty of measurement is stated as the standard uncertainty of measurement multiplied by the coverage factor k = 2, which for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%. The standard uncertainty of measurement has been determined in accordance with EA 402

Property of the result of a measurement whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties (ISO VIM)

The metrological traceability is using certified reference material traceable to SI of NIST (SRM) or BAM (CRM). All contributions in relation to the certification of standard solutions are considered when evaluating the uncertainty.

The measurement results are traceable to SI. All analytical balances used for the preparation of the solution are calibrated yearly under an in-house procedure with analytical weights, traceable to DKD, and are checked daily.

Class A laboratory glassware is used.

The results from temperature measurement are traceable to SI. The thermometers used for solution's calibration are calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory. The ambient conditions are controlled with a hygrometer calibrated from an ISO 17025 accredited laboratory.

**Intended use: For Laboratory Use Only**

Calibration of ICP/OES, AAS

Preparation of "working reference samples"

This statement is not intended to restrict the use for other purposes.

Validation of analytical methods

Detection limit and linearity studies

**Instructions for the correct use of this reference material:**

This certified reference material can be used directly or can be diluted in an appropriate high purity matrix. Only a clean class A glassware should be used. Do not pipet from container. Obtained concentration (in mg/l) after dilution is a result from the multiplication of certified value of CRM concentration and the CRM's volume used for dilution and divided into the flask's volume used for dilution.

**Stability and storage:**

This CRM is with a guaranteed stability until ±0.5% of the certified concentration within its shelf life. Stability is guaranteed, provided that the solution is kept in its original packaging, tightly closed stored, as written in the section: Storage Conditions. If storage of a partially used bottle is necessary, the cap should be tightly sealed and the bottle should be stored in refrigerator to minimize transpiration rate. The laboratory performs stability tests according to MQP 5.14.1 therefore solutions with one and the same bar-code number might have different expiration dates.



CPAchem Ltd. is accredited to  
ISO 17034 (Cert No AR-1835) and ISO/IEC 17025 (Cert No AT-1830)

CPAchem Ltd  
www.cpacchem.com  
e-mail: info@cpacchem.com; tel.: +359 42 60 77 16  
for France, Belgium and Switzerland:  
e-mail: accs2@wanadoo.fr; tel.: 01 30 57 57 32 / fax: 01 30 57 57 33