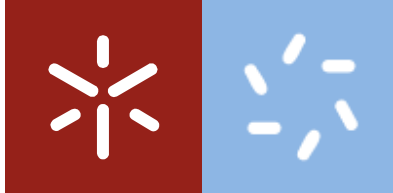




Universidade do Minho
Escola de Ciências

Cátia Sofia Marques Silvestre

**Validação de um método para determinação
de ácidos orgânicos e sulfato em vinhos por
Eletroforese capilar**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Cátia Sofia Marques Silvestre

**Validação de um método para determinação
de ácidos orgânicos e sulfato em vinhos por
Eletroforese capilar**

Dissertação de Mestrado
em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho realizado sob orientação de:
Professora Doutora Ana Paula Bettencourt
Dra. Ana Oliveira

DECLARAÇÃO

Nome: Cátia Sofia Marques Silvestre

Título de Dissertação: Validação de um método para determinação de ácidos orgânicos e sulfato em vinhos por Eletroforese capilar

Orientadores: Professora Doutora Ana Paula Bettencourt e Dra. Ana Oliveira

Ano de conclusão: 2017

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura:

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Ana Paula Bettencourt e Dra. Ana Oliveira, pelo acompanhamento, orientação, disponibilidade, competência científica, bem como pelas críticas construtivas, correções e sugestões durante o desenvolvimento de todo o projeto.

Ao Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, IVDP, I.P. em particular à Engenheira Natália, Engenheiro Bento Amaral e Engenheiro Tomás Simões pela oportunidade de desenvolver este projeto com todo o equipamento e material necessário à sua execução.

A todos os colegas de trabalho, em especial ao Sr. Nuno Carvalho e ao Sr. Paulo Pereira pela disponibilidade prestada sempre que necessário.

Aos meus amigos pela amizade, auxílio, incentivo e apoio em todas as situações ao longo deste percurso.

Por último, um especial agradecimento aos meus pais e irmãos pelo incentivo, amor, confiança e apoio na superação de obstáculos impostos ao longo do todo o meu percurso académico.

A todos o meu sincero Obrigada.

Resumo

A produção de vinhos de qualidade requer um equilíbrio entre os açúcares, os ácidos e outros componentes que conferem sabor ao vinho.

Os ácidos orgânicos contribuem maioritariamente para a composição, estabilidade e para as qualidades organoléticas dos vinhos, sendo que as suas propriedades conservantes contribuem para a estabilidade microbiológica e físico-química dos vinhos. São vários os ácidos orgânicos que se encontram presentes no vinho e podem ter origem nas uvas ou nos processos de fermentação alcoólica e malolática. A análise dos ácidos orgânicos em amostras de vinho é uma determinação de elevado interesse na indústria de produção de vinho.

O presente trabalho, desenvolvido no Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (IVDP), teve como objetivo a validação de um método analítico para a quantificação dos ácidos tartárico, málico, cítrico, fórmico, succínico, láctico, glucónico e acético e do ião sulfato por Eletroforese capilar (EC). A quantificação destes compostos foi realizada em amostras de vinagres de vinho do Porto e em amostras de vinhos do Porto e do Douro de diferentes matrizes, como vinhos licorosos, vinhos tintos, frisantes, entre outros. Este método apresenta uma boa resolução, permite uma quantificação eficiente de todos os compostos e envolve um processo de preparação da amostra simples.

A validação do método incluiu a avaliação de vários parâmetros de desempenho do método como a sensibilidade, os limiares analíticos, a precisão e a veracidade. O método de análise apresenta um bom desempenho, incluindo uma boa linearidade e limiares analíticos satisfatórios. O método é preciso, tanto em condições de repetibilidade como de precisão intermédia e exato com recuperações entre 90-100% para todos os analitos.

Foram comparados os resultados obtidos, para a análise das mesmas amostras, pelo método em estudo com os resultados obtidos pelo método implementado pelo IVDP. Verificou-se que os resultados dos dois métodos eram equivalentes para todos os analitos considerados, com exceção dos ácidos tartárico e cítrico.

O laboratório do IVDP participou em ensaios interlaboratoriais no âmbito *do Bureau Interprofessionnel d'Études Analytiques* (BIPEA) para a determinação do ácido acético, e os valores de concentração obtidos apresentam boa concordância com os valores de referência, mostrando que o método é exato.

Abstract

The production of high quality wines requires a balance between sugars, acids and other components that grant its flavor to wine.

Organic acids contribute mostly to the composition, stability and organoleptic qualities of wine, being their preservative properties that contribute to the microbiological and physicochemical stability of wines. There are several organic acids present in wine that may come from grapes or from the processes of alcoholic and malolactic fermentation. The quantification of organic acids in wine samples is a high interest analysis for wine industry.

The objective of this work, developed at IVDP, was the validation of an analytical method for quantification of tartaric, malic, citric, formic, succinic, lactic, gluconic and acetic acid and also sulfate ion by capillary electrophoresis (CE). The quantification of these compounds was carried out on samples of Porto wine vinegars and also in samples of Porto and Douro wines from different matrices, including liqueurs, red and sparkling wines, among others. This method presents good resolution, allows efficient quantification of all compounds, and involves a simple sample preparation process.

The validation of this method, included the evaluation of several performance characteristics of the method such as sensitivity, analytical thresholds, precision and trueness. The analytical method showed good performance, including good linearity and satisfactory analytical thresholds. The method is precise, both under repeatability and intermediate precision condition, and is also accurate with recoveries between 90-100 % for all analytes.

The results obtained for the analysis of the same samples by the method under study and by a method implemented in IVDP laboratory were compared. The results of the two methods were found to be equivalent for all the considered analytes, with the exception of tartaric and citric acids.

The IVDP laboratory participated in interlaboratory comparisons within the Bureau Interprofessionnel d'Études Analytiques (BIPEA) for the determination of acetic acid, and the concentration values obtained are in very close agreement to the reference values, showing that the method is accurate.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de abreviaturas e siglas	xv
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, IVDP	3
1.2. O Vinho	4
1.2.1. Definição	4
1.2.2. Introdução histórica	5
1.3. O Vinho do Porto	5
1.4. O vinho do Douro	9
1.5. Classificação dos vinhos	10
1.6. Processo de Vinificação do Vinho do Porto	11
1.6.1. Vinificação	11
1.6.2. Aguardentação ou Benefício	12
1.6.3. Envelhecimento	13
1.7. Vinagres de vinho do Porto	13
1.7.1. Tipos de Vinagres	14
1.7.2. Fermentação acética	14
1.8. Ácidos Orgânicos e Ião Sulfato em Vinhos	15
1.8.2. Ácido málico	17
1.8.3. Ácido Cítrico	18
1.8.4. Ácido Fórmico	18
1.8.5. Ácido Succínico	19
1.8.6. Ácido Láctico	19
1.8.7. Ácido Glucónico	20
1.8.8. Ácido Acético	20
1.8.9. Sulfato	21
1.9. Relevância das análises dos ácidos orgânicos em estudo	21
1.10. Eletroforese Capilar	22
1.10.1. Eletroforese Capilar de Zona (CZE)	24
1.11. Técnicas analíticas alternativas para análise de ácidos orgânicos em vinhos	32

Capítulo 2 – Materiais e Métodos	37
2.1 Reagentes e Solvente.....	39
2.2 Materiais e equipamento.....	39
2.3 Preparação de soluções.....	40
2.3.1 Preparação de soluções padrão de calibração.....	40
2.3.2 Preparação de soluções padrão de verificação.....	42
2.4 Amostras.....	43
2.4.1 Recolha de amostras.....	43
2.4.2 Preparação de amostras.....	43
2.5 Condições instrumentais.....	44
2.6 Análise de amostras.....	45
Capítulo 3 – Discussão e Resultados	47
3.1 Validação do método.....	49
3.1.1. Curva de Calibração-linearidade.....	50
3.1.2. Sensibilidade.....	54
3.1.4. Gama de trabalho.....	55
3.1.5. Limiares analíticos do método de ensaio: Limites de deteção e de quantificação.....	58
3.1.6. Precisão.....	59
3.1.6.1. Repetibilidade.....	59
3.1.6.2. Precisão intermédia.....	65
3.1.7. Ensaio de Recuperação.....	68
3.1.8. Materiais de referência externos (MRE).....	72
3.1.9. Comparação entre o método utilizado e o método implementado no IVDP.....	74
3.1.10. Ensaio interlaboratoriais- Bipea.....	77
3.2. Análise de amostras.....	79
Capítulo 4 - Conclusão	85
Capítulo 5 – Referências Bibliográficas	89
Anexos	99

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Limite analítico de ácido acético em vinagres de vinho	15
Tabela 1.2. Limites analíticos estabelecidos pela Legislação Portuguesa	22
Tabela 1.3. Métodos de deteção e respetivos valores de limite de deteção (mg/L) ³¹	30
Tabela 1.4. Limites de deteção e quantificação de cada ácido analisado por HPLC ⁶⁰	35
Tabela 2.1. Reagentes utilizados e respetivo grau de pureza	39
Tabela 2.2. Massa de ácidos orgânicos e ião sulfato a pesar para a preparação das soluções-mãe e concentração das soluções a preparar	40
Tabela 2.3. Volumes utilizados na preparação de 10,00 ±0,04 mL de cada uma das soluções intermédias de calibração, a partir das soluções-mãe.....	41
Tabela 2.4. Gama de concentrações utilizada na preparação dos padrões de calibração de cada analito 41	
Tabela 2.5. Volumes utilizados para a preparação dos padrões de calibração em balões volumétricos de 5,00±0,025 mL	42
Tabela 2.6. condições instrumentais utilizadas no sistema de eletroforese capilar	44
Tabela 3.1. Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a determinação de cada um dos analitos por EC, os valores de incerteza são apresentados para um nível de confiança de 95%.....	53
Tabela 3.2. Valores do coeficiente de correlação (r), $t_{\text{calculado}}$ e t_{tabelado} para o teste de significância de avaliação da correlação (equação 8)	54
Tabela 3.3. Valores de sensibilidade do método para análise dos diferentes analitos por EC	55
Tabela 3.4. Valores dos parâmetros média, desvio padrão (s) e variância (s ²) obtidos para o primeiro (P1V) e último padrão (P5V) na avaliação da gama de trabalho, assim como a variação permitida para a concentração (± 10 %).....	56
Tabela 3.5. Valores de parâmetros para o cálculo do teste de homogeneidade de variâncias para o ácido cítrico e para o ácido fórmico.....	57
Tabela 3.6. Avaliação do ajuste da gama de trabalho com base nos resultados do teste de homogeneidade de variâncias (teste F)	57
Tabela 3.7. Limites de deteção e quantificação estimados a partir das retas de calibração traçadas, para a determinação de cada analito	59
Tabela 3.8. Resultados do estudo de repetibilidade, desvio padrão de repetibilidade (s), limite de repetibilidade (r) e coeficiente de variação de reptibilidade para os padrões de verificação 1 (P1V) e 5 (P5V)	60
Tabela 3.9. Resultados do estudo de repetibilidade, desvio padrão de repetibilidade (Sr), limite de repetibilidade (r) e coeficiente variação de repetibilidade para as amostras analisadas.....	61
Tabela 3.10. Valores de limite de repetibilidade e coeficientes de variação médios para cada analito.	64

Tabela 3.11. Resultados do estudo de precisão intermédia, desvio padrão de precisão intermédia (s_{pi}), limite de precisão intermédia (L_{pi}) e coeficiente de variação para as amostras analisadas (CV_{pi}).	65
Tabela 3.12. Parâmetros determinados no estudo de precisão intermedia do MRE.	58
Tabela 3.13. Resultados dos ensaios de recuperação, com indicação da fortificação efetuada nas amostras, recuperação (R) e média dos valores de recuperação para as amostras analisadas.	69
Tabela 3.14. Médias de recuperação para as matrizes apresentadas na tabela anterior	71
Tabela 3.15. Critérios de aceitação do material de referência externo.....	72
Tabela 3.16. Erro relativo para cada analito determinado por análise do MRE.....	73
Tabela 3.17. Valores de t determinados para análise do teste de hipóteses, para N=14	74
Tabela 3.18. Valores de t tabelado, para um nível de confiança de 95%, e valores de t experimental.	77
Tabela 3.19. Valores de concentração de ácido acético obtidos pelo método em estudo e os valores do circuito Bipea ($V_{circuito}$), em mg/L.....	78
Tabela 3.20. Valores obtidos para o Teste F: duas amostras para variâncias, para um nível de 95%.....	79
Tabela 3.21. Valor de t tabelado, para um nível de confiança de 95% e valor de t determinado.	79
Tabela 3.22. Resultados obtidos na análise em duplicado de diferentes matrizes.	80
Tabela I. Valores de incertezas do volume das micropipetas utilizadas de acordo com a informação do fabricante.....	105
Tabela II. Resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias.....	107
Tabela III. Resultados obtidos para o estudo de repetibilidade para compostos analisados	109
Tabela IV. Resultados obtidos para o estudo de precisão intermédia para os compostos analisados	111
Tabela V. Resultados obtidos no estudo da recuperação para diferentes matrizes para os analitos estudados	115

Índice de figuras

Figura 1.1. Edifício do Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I.P., no Porto.....	4
Figura 1.2. Diferentes categorias do Vinho do Porto relativamente ao envelhecimento ⁸	6
Figura 1.3. Esquema do Processo de Vinificação do Vinho do Porto ¹	12
Figura 1.4. Estrutura química do ácido tartárico ²⁴	16
Figura 1.5. Estrutura química do ácido málico ²⁴	17
Figura 1.6. Estrutura química do ácido cítrico ²⁴	18
Figura 1.7. Estrutura química do ácido fórmico ²⁴	18
Figura 1.8. Estrutura química do ácido succínico ²⁴	19
Figura 1.9. Estrutura química do ácido láctico ²⁴	19
Figura 1.10. Estrutura química do ácido glucónico ²⁴	20
Figura 1.11. Estrutura química do ácido acético ²⁴	20
Figura 1.12. Estrutura química do ião sulfato ²⁴	21
Figura 1.13. Capilar inserido no respetivo suporte.....	25
Figura 1.14. Ocorrência do fluxo eletrosmótico ³⁶	26
Figura 1.15. Perfis de velocidade de fluxo eletrosmótico (EOF) e fluxo laminar, e respetivos picos característicos ³¹	27
Figura 1.16. Representação de um sistema de deteção UV-Vis.....	31
Figura 1.17. Diagrama do sistema de eletroforese capilar de zona ⁵¹	32
Figura 2.1. Vial para introdução da amostra no sistema de eletrofoerese capilar.....	44
Figura 3.1. Electroferograma obtido por análise de soluções padrão de ácido tartárico, málico e cítrico e ião sulfato.....	51
Figura 3.2. Curvas de calibração da razão da área dos analitos/área do padrão interno em função da razão da concentração dos analitos/concentração do padrão interno para os nove ácidos orgânicos e o ião sulfato. Curva A- Ácidos tartárico, málico, cítrico e ião sulfato. Curva B- Ácidos fórmico, succínico, láctico e glucónico. Curva C- Ácido acético.....	52
Figura 3.3. Representação gráfica dos valores obtidos para o método em estudo em função dos valores obtidos para o método validado no IVDP, para as mesmas amostras.....	75
Figura 3.4. Representação gráfica das concentrações obtidas pelo método de determinação do ião sulfato em estudo em função das concentrações obtidas pelo método validado no IVDP.....	76
Figura I. Electroferograma obtido na análise de soluções padrão dos ácidos fórmico, succínico, láctico e glucónico.....	101
Figura II. Electroferograma de uma amostra de vinho Tranquilo.....	101
Figura III. Electroferograma de uma amostra de vinagre de vinho.....	101

Lista de abreviaturas e siglas

A_i	Área do pico do analito a quantificar
A_p	Área do pico do padrão interno
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
b	Ordenada na origem da reta de calibração
BIPEA	<i>Bureau Interprofessionnel des Etudes Analytiques</i>
C_i	Concentração do analito
C_p	Concentração de padrão interno
CIRDD	Comissão interprofissional da Região Demarcada do Douro
CV	Coeficiente de variação
CVr	Coeficiente de variação de repetibilidade
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DD	Diferença de duplicados
CZE	Eletroforese capilar de zona (<i>Capillary zone electrophoresis</i>)
EC	Eletroforese capilar
EOF	Fluxo eletroosmótico (<i>Electroosmotic flow</i>)
ER	Erro relativo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IV	Infravermelho
IVDP I.P.	Instituto dos Vinhos do Douro e Porto, Instituto Público
LBV	<i>Late Bottled Vintage</i>
Ldd	Limite de deteção
Ldq	Limite de quantificação
Lpi	Limite de precisão intermédia
m	Declive da reta de calibração
MRE	Material de Referência Externo
OIV	<i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>
Ppm	Partes por milhão
P1V	Padrão 1 de verificação
P5V	Padrão 5 de verificação
PI	Padrão interno

R (%)	Recuperação
r	Limite de repetibilidade
r	Coeficiente de correlação
RDD	Região Demarcada do Douro
s	Desvio padrão
s ²	Variância
S _a	Incerteza associada à ordenada na origem
S _b	Incerteza associada ao declive
S _{y/x}	Desvio padrão residual da curva de calibração
UV-Vis	Ultravioleta- Visível
% vol	Teor alcoólico

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1 - Introdução

O autor é inteiramente responsável pela informação constante deste texto, incluindo a recolhida junto do Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, IP. O Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, IP não é responsável pela informação constante deste texto.

No presente capítulo será feita uma breve apresentação do Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I. P., empresa onde esta dissertação se desenvolveu, bem como o enquadramento teórico sobre o tema.

Será feita uma abordagem relativamente aos Vinhos do Douro e do Porto, assim como os principais processos envolvidos na produção destes produtos, e aos vinagres de Vinho do Porto.

Ainda será apresentado o estado de arte dos métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de ácidos orgânicos e sulfato em vinhos e vinagres.

O presente trabalho teve como principal objetivo a validação de um método para a determinação dos teores de ácidos orgânicos (tartárico, málico, cítrico, fórmico, succínico, acético, láctico e glucónico) e de sulfatos em vinagres e vinhos do Porto e do Douro de diferentes matrizes, por Eletroforese Capilar (EC) com o método de deteção de UV-Vis. Aplicaram-se parâmetros de controlo de qualidade de forma a validar o método utilizado e os respetivos resultados obtidos.

1.1. Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, IVDP

Em 1933 foi fundado o Instituto do Vinho do Porto, prosseguindo as competências de regulamentação e controlo na Região Demarcada do Douro, de forma a fiscalizar a qualidade do Vinho do Porto, garantir a sua origem e combater a fraude e falsificações nos mercados externos.

Em 2003, o modelo institucional foi alterado dando origem ao Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto pela fusão por incorporação da Comissão Interprofissional da Região Demarcada do Douro (CIRDD), em que a gestão das denominações de origem Porto e Douro e da indicação geográfica Duriense foram atribuídas a um único organismo de caráter público¹.

O Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I. P., designado por IVDP, I. P., é um instituto público, integrado na administração indireta do Estado, dotado de autonomia administrativa e financeira e património próprio, sendo um instituto público de natureza interprofissional.

O IVDP, I. P., é um organismo central com jurisdição sobre todo o território nacional com sede em Peso da Régua e dispõe de um serviço desconcentrado, a delegação do Porto, apresentada na figura 1.1.



Figura 1.1. Edifício do Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I.P., no Porto.

Ao IVDP, I. P. cabe promover o controlo da qualidade e quantidade dos vinhos do Porto, regulamentando o processo produtivo, bem como a proteção e defesa das denominações de origem Douro e Porto e indicação geográfica Duriense.

Promove também a imagem de prestígio internacional para as denominações de origem Porto e Douro, e pretende aumentar a perceção de valor pelos consumidores, baseada numa forte diferenciação dos produtos no respeito dos conceitos de denominação de origem¹.

O Laboratório do Instituto dos Vinhos do Douro e Porto está integrado no Sistema Português da Qualidade, desde 1994, pela Acreditação junto do Instituto Português de Acreditação (IPAC) de acordo com as disposições contidas no documento normativo NP EN ISO/IEC 17025: 2005 para diversos ensaios, em Vinhos licorosos, Vinhos do Porto, Vinhos do Douro e Aguardentes.

O laboratório do instituto é pioneiro em Portugal na obtenção de um Certificado de Qualificação, dentro do setor vitivinícola, designadamente dos vinhos licorosos e aguardentes. Encontra-se disponível para a prestação de serviços analíticos, tanto para o setor do vinho do Porto como também para o setor vitivinícola nacional em geral¹.

1.2. O Vinho

1.2.1. Definição

O vinho é um produto muito mais complexo e heterogéneo do que qualquer outra bebida². Por definição, o vinho é um produto obtido pelo processo de vinificação/fermentação alcoólica, total ou parcial de uvas frescas, provenientes de vários tipos de castas (*Vitis Vinifera*), cujos bagos são esmagados, prensados ou transformados por outros processos tecnológicos permitidos por lei.

O vinho é composto fundamentalmente por: água, álcool etílico, ácidos orgânicos fixos (como o ácido tartárico, entre outros), ácidos orgânicos voláteis (ácido acético), ácidos minerais, sais ácidos, glicerina, que confere a macieza e o aveludado, taninos, que conferem a adstringência,

matéria corante, matérias minerais e matérias azotadas e vitaminas ².

1.2.2. Introdução histórica

O vinho possui uma longínqua importância histórica, constituindo um elemento fundamental da cultura gastronómica, e remonta a diversos períodos da humanidade. A nível histórico, não é possível precisar a sua origem, visto que o vinho nasceu antes da escrita. Do ponto de vista enológico, supõe-se que este produto surgiu por acaso, por esquecimento de uvas amassadas num recipiente, onde sofreram processos de fermentação. Contudo, a sua produção apenas teve início após a Sedentarização, que possibilitou o cultivo das videiras³.

A primeira referência à produção vinícola em Portugal é de 989, segundo o Livro de *Datas do Convento de Fiães*³.

Em Portugal, a longa tradição da viticultura estende-se por todo o território nacional, fazendo parte da cultura e história do país. Apesar da sua pequena dimensão territorial, Portugal está entre os países que produzem mais vinho no mundo, tendo em 2008 ocupado a décima posição a nível mundial e a quinta posição a nível europeu⁴.

A Região Demarcada do Douro (RDD) é a mais antiga região demarcada e regulamentada de vinhos do mundo e destaca seus produtos pela qualidade, devido à tradição associada ao processo produtivo, iniciado no século XII, e ao controlo rigoroso do órgão regulador, o Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (IVDP)⁵.

1.3. O Vinho do Porto

O Vinho do Porto é um vinho licoroso, produzido na Região Demarcada do Douro, na acidentada zona montanhosa do Alto Douro, no nordeste de Portugal, onde se faz vinho há pelo menos dois mil anos. A sua produção realiza-se sob condições peculiares derivadas de fatores naturais e de fatores humanos. Em 1756, as vinhas do vinho do Porto no Douro tornaram-se a primeira área vitivinícola no mundo a ser legalmente demarcada. Da mesma forma que todos os outros grandes vinhos clássicos, o vinho do Porto deve as suas distintas características a uma associação única de clima, solo, casta e tradição⁶.

O processo de fabrico, baseado na tradição, inclui a lotação de vinhos, que consiste na elaboração de um lote através da mistura de dois ou mais vinhos, a paragem da fermentação do mosto pela adição de uma porção de aguardente vínica (benefício ou aguardentação) e o envelhecimento¹. Tal processo fará com que o vinho retenha a doçura natural da uva, tornando-se rico, redondo e macio na boca ⁶.

Capítulo 1 - Introdução

O Vinho do Porto distingue-se dos vinhos comuns pelas suas características particulares: uma enorme diversidade de tipos em que surpreende com uma riqueza e intensidade de aroma incomparáveis, uma persistência muito elevada tanto de aroma como de sabor, um teor alcoólico elevado (compreendido entre os 19 e os 22% vol.), numa vasta gama de doçuras e grande diversidade de cores. Existe um conjunto de designações que possibilitam a identificação dos diferentes tipos de Vinho do Porto.

A cor dos diferentes tipos de Vinho do Porto pode variar entre o retinto e o alourado-claro, sendo possíveis todas as tonalidades intermédias (tinto, tinto-alourado, alourado e alourado-claro).

Os Vinhos do Porto Branco apresentam tonalidades diversas (branco pálido, branco palha e branco dourado), intimamente relacionadas com a tecnologia de produção. Quando envelhecidos em casco, durante muitos anos, os vinhos brancos adquirem, por oxidação natural, uma tonalidade alourada-claro semelhante à dos vinhos tintos muito velhos.

Em termos de doçura, o vinho do porto pode ser muito doce, doce, meio-seco, seco ou extra seco. A doçura do vinho constitui uma opção de fabrico, condicionada pelo momento de interrupção da fermentação.

Mediante todos os fatores que contribuem para a produção do inigualável Vinho do Porto, como as castas usadas para a sua elaboração, a seleção das uvas e a vinificação, também o armazenamento de cada vinho é diferente, resultando em vinhos com características distintas, promovendo diferentes tipos de Vinho do Porto⁷.

Os Vinhos do Porto podem ser divididos em duas categorias consoante o processo de envelhecimento ocorra em madeira ou em garrafa, como se pode observar pela figura 1.2.



Figura 1.2. Diferentes categorias do Vinho do Porto relativamente ao envelhecimento⁸.

Envelhecimento em madeira

Relativamente ao processo de envelhecimento em madeira, os Vinhos do Porto podem ser classificados como Tawny, Branco e Rosé, cujas principais características são descritas de seguida¹.

Tawny

Este tipo de vinho é obtido por lotação de vinhos de grau de maturação variável (normalmente com uma idade média de três anos), conduzida através do envelhecimento em cascos ou tonéis. São vinhos em que a cor apresenta evolução, devendo integrar-se nas subclasses de cor tinto-alourado, alourado ou alourado-claro, tal tonalidade deve-se ao processo de oxidação forçado durante o envelhecimento, através de transfegas.

Os aromas lembram os frutos secos e a madeira e quanto mais envelhecido o vinho mais estas características se acentuam. As categorias existentes são: Tawny, Tawny Reserva, Tawny com Indicação de Idade (10 anos, 20 anos, 30 anos e 40 anos) e Colheita. São vinhos de lotes de vários anos, excepto os Colheita (vinhos de uma só colheita envelhecidos em cascos por um período mínimo de sete anos), que se assemelham a um Tawny com Indicação de Idade com o mesmo tempo de envelhecimento. Quando engarrafados estão prontos para serem consumidos.

Branco

O Vinho do Porto branco, produzido a partir das clássicas castas brancas de vinho do Porto, apresenta-se em vários estilos, nomeadamente associados a períodos de envelhecimento mais ou menos prolongados e diferentes graus de doçura, que resultam do modo como é conduzida a sua elaboração. A nível de doçura, o Vinho do Porto branco divide-se em Extra Seco, Seco, Doce e Lágrima.

Aos vinhos tradicionais, juntaram-se os vinhos de aroma floral e complexo com um teor alcoólico mínimo de 16,5% (Vinho do Porto Branco Leve Seco) capazes de responder à procura de vinhos menos ricos em álcool.

Envelhecimento em garrafa

Relativamente ao processo de envelhecimento em garrafa, os Vinhos do Porto podem ser

Capítulo 1 - Introdução

classificados como Ruby, Vintage, Crusted e Late Bottled Vintage (LBV)¹.

Ruby

Neste tipo de vinhos procura-se sustentar a evolução da sua cor tinta, mais ou menos intensa, e manter o aroma frutado e vigor dos vinhos jovens. A sua cor assemelha-se à pedra preciosa rubi, devido ao facto do seu processo de envelhecimento requerer pouca ou nenhuma oxidação (geralmente até três anos em madeira). Para o estilo Ruby, por ordem crescente de qualidade, inserem-se as seguintes categorias: Ruby, Reserva, Late Bottled Vintage (LBV) e Vintage. Os vinhos das melhores categorias, principalmente o Vintage, e em menor grau o LBV, poderão ser guardados, pois o seu envelhecimento em garrafa é bom.

Vintage

Este tipo de vinho é produzido a partir de uvas de um único ano e engarrafado dois a três anos após a vindima, evolui gradualmente durante 10 a 50 anos em garrafa. O encanto do Porto Vintage reside no facto de ser atrativo em praticamente todas as fases da sua vida em garrafa. Nos primeiros cinco anos mantém a intensidade rubi das cores originais, aromas exuberantes a frutos vermelhos e silvestres e o sabor do chocolate negro. Após dez anos desenvolve tons vermelho granada e atinge uma deliciosa plenitude de aromas e sabores a frutos maduros.

À medida que o vinho se aproxima da maturidade, a cor evolui para os tons âmbar ricos e a sua fruta adquire maior subtilidade e complexidade e o seu depósito torna-se mais pesado.

Crusted

Estes vinhos não são produzidos a partir de vinhos de um único ano mas, da mesma forma que os vinhos do Porto Vintage, são capazes de envelhecer em garrafa. Os vinhos Crusted não são filtrados antes do engarrafamento e, por essa razão, formam um depósito natural na garrafa à medida que envelhecem.

Late Bottled Vintage (LBV)

É um Porto Ruby de um só ano, selecionado pela sua elevada qualidade é inicialmente envelhecido em barris de madeira durante quatro a seis anos. Após esse período é engarrafado e o seu envelhecimento é feito em garrafa. O Porto LBV apresenta cores vermelho rubi intensas, é muito encorpado e rico, e tem a particularidade de estilo e personalidade de um vinho de uma só colheita.

Sem envelhecimento

Rosé

O vinho Rosé é um Porto fresco, suave versátil, sendo uma inovação recente dos Vinhos do Porto.

A sua cor rosada é obtida por maceração pouco intensa de uvas tintas e em que não se promovem fenómenos de oxidação durante a sua conservação. Os vinhos Rosé são vinhos para serem consumidos novos com boa exuberância aromática com notas de cereja, framboesa e morango.

1.4. O vinho do Douro

A região do Douro demarca-se segundo o eixo do rio Douro, estendendo-se desde a fronteira com Espanha até cerca de noventa quilómetros de distância da cidade do Porto e encontra-se dividido em três sub-regiões: Baixo Corgo, Cima Corgo e Douro Superior, sendo que o Baixo Corgo é a sub-região mais fresca e chuvosa, mais fértil e com maior densidade de vinhas.

É uma das regiões mais ricas em castas autóctones, com centenas de castas únicas e uma área extensa de vinhas velhas, por vezes plantadas com dezenas de castas misturadas.

Nas duas últimas décadas os vinhos tranquilos do Douro têm conquistando consideração e independência, afirmando-se hoje como fonte de notoriedade redobrada para a região⁸.

Os vinhos durienses dividem-se em três grandes categorias: os vinhos Tintos, os Brancos e os Rosados.

Vinhos Tintos

Os vinhos Tintos são produzidos a partir de castas autóctones, sendo a Touriga Nacional, Touriga Franca, Tinta Roriz (Aragonez), Tinta Barroca e Tinto Cão, aquelas com maior expressão. A grande maioria dos vinhos resulta de um lote de várias castas, com uma complexidade e riqueza ímpares, que lhes conferem um perfil característico do Douro. Existem ainda vinhos monovariais, produzidos apenas com uma casta, principalmente das três primeiras mencionadas.

Os vinhos Tintos jovens, consumidos nos primeiros anos após a vindima, distinguem-se pela cor rubi e pelo aroma de frutos vermelhos, que podem ser complementados por notas florais e de madeira.

Um outro tipo de vinhos tintos são os Tintos de guarda, assinalados no rótulo como “Reserva” ou “Grande Reserva”, têm uma cor e um aroma mais complexos e intensos. Quando

Capítulo 1 - Introdução

novos, é comum surgirem notas de frutos silvestres, chocolate, violeta e madeira, sendo vinhos de grande estrutura e com taninos.

No seu apogeu, que pode levar quase uma década a atingir, apresentam aromas delicados e subtis mas de grande complexidade.

Vinhos Brancos

Os vinhos Brancos são produzidos por lotação de várias castas como a Malvasia Fina, o Viosinho, o Gouveio e o Rabigato.

Os vinhos Brancos jovens apresentam uma cor pálida e aromas frutados e florais, no palato são equilibrados mostrando a sua juventude.

Relativamente aos vinhos Brancos de guarda, apresentam boa intensidade aromática e boa complexidade e uma cor dourada e aromas tostados, adquiridos pelo tempo de fermentação em madeira. A maioria destes vinhos ostenta a designação "Reserva" e "Grande Reserva", tal como os vinhos Tintos de guarda.

Vinhos Rosados

A região do Douro tem visto nascer um número cada vez maior de vinhos rosados, acompanhando a tendência de consumo mundial.

Estes vinhos produzidos a partir de uma maceração ligeira de uvas tintas, apresentam uma cor rosada e aromas frutados (framboesa e cereja) combinados com a doçura e acidez. Estes vinhos devem ser consumidos um a dois anos após a colheita.

Na região duriense produzem-se ainda, no entanto com menos expressão, o Moscatel do Douro, o Espumante do Douro, o vinho novo (vinho da última vindima) bem como o Colheita Tardia, elaborado com uvas colhidas após a época das vindimas, sobrematuradas ¹.

1.5. Classificação dos vinhos

Os vinhos do Douro e do Porto podem ser classificados como: Vinhos tranquilos, licorosos, espumantes e frisantes ^{9,10}.

Vinhos Tranquilos

Os vinhos tranquilos são todos aqueles que não apresentam gás e podem ser vinhos tintos, brancos ou rosé.

Capítulo 1 - Introdução

Estes vinhos apresentam um teor alcoólico superior a 1,2% vol. e igual ou inferior a 18% vol¹¹.

Vinhos licorosos

Os vinhos licorosos apresentam elevado teor alcoólico, com o mínimo de 13% e máximo de 18% vol. É um tipo de vinho especial em que, não excluindo situações convenientemente definidas na legislação comunitária, a fermentação natural do mosto das uvas é interrompida pela adição de aguardente vínica, tal como sucede no Vinho do Porto.

Vinhos espumantes

Os vinhos espumantes distinguem-se pela presença de dióxido de carbono proveniente da fermentação secundária, que lhes atribui a típica “bolha” e espuma e dividem-se em vinhos espumantes naturais e vinhos espumantes gaseificados. O vinho espumante natural resulta de uma primeira ou segunda fermentação em garrafas ou outros recipientes fechados, obtidos pelo processo clássico, com açúcar natural de uva ou adição de açúcar. Já o vinho espumante gaseificado, resulta da introdução de dióxido de carbono puro.

Estes vinhos apresentam um teor alcoólico superior a 1,2% vol. e igual ou inferior a 15% vol¹¹.

Os vinhos espumantes naturais deverão indicar na rotulagem, o método obedecido na sua elaboração e os vinhos espumantes gaseificados deverão trazer a declaração expressa "Espumante gaseificado"⁹.

Vinhos frisantes

Os vinhos frisantes são vinhos levemente gasosos, não excedendo 1,5 atm em dióxido de carbono (CO₂). Nestes vinhos, o gás é produzido naturalmente pelo processo de fermentação da uva, contendo praticamente cerca de metade da quantidade de CO₂ encontrado nos vinhos espumantes.

1.6. Processo de Vinificação do Vinho do Porto

1.6.1. Vinificação

A vinificação corresponde a todo o processo que conduz à elaboração/produção do vinho, iniciando-se pela triagem das uvas para posterior avaliação (peso e grau alcoólico provável), de acordo com o tipo de vinho que se pretende obter. A partir deste ponto dá-se início ao processo

Capítulo 1 - Introdução

de transformação até obtenção do produto final¹².

Atualmente a maior parte dos vinhos é obtida em centros de vinificação, tecnologicamente muito avançados, que permitem associar a qualidade à rentabilidade, sendo que a maior parte das operações se encontra mecanizada ¹.

O Vinho do Porto é um vinho licoroso, em que processo de vinificação difere do seguido pelos vinhos comuns, devido ao facto de requerer um tempo muito curto de fermentação e maceração (2 a 3 dias) aliado ao facto da adição de aguardente dever respeitar certas regras ajustadas ao longo dos anos pela tradição e prática.

Tradicionalmente, nos processos de vinificação utilizados para produção de alguns tipos de vinho do Porto, as uvas são esmagadas em lagares, sendo esta operação designada por pisa, tradicionalmente executada por homens ou por modelos mecânicos que simulam a mesma operação. Após o primeiro esmagamento, o mosto em fermentação permanece em repouso durante algumas horas e é novamente esmagado até à altura em que o mosto em fermentação é separado das partes sólidas, a fim de ser adicionada a aguardente¹.

A figura 1.3 esquematiza todo o processo de vinificação do Vinho do Porto.

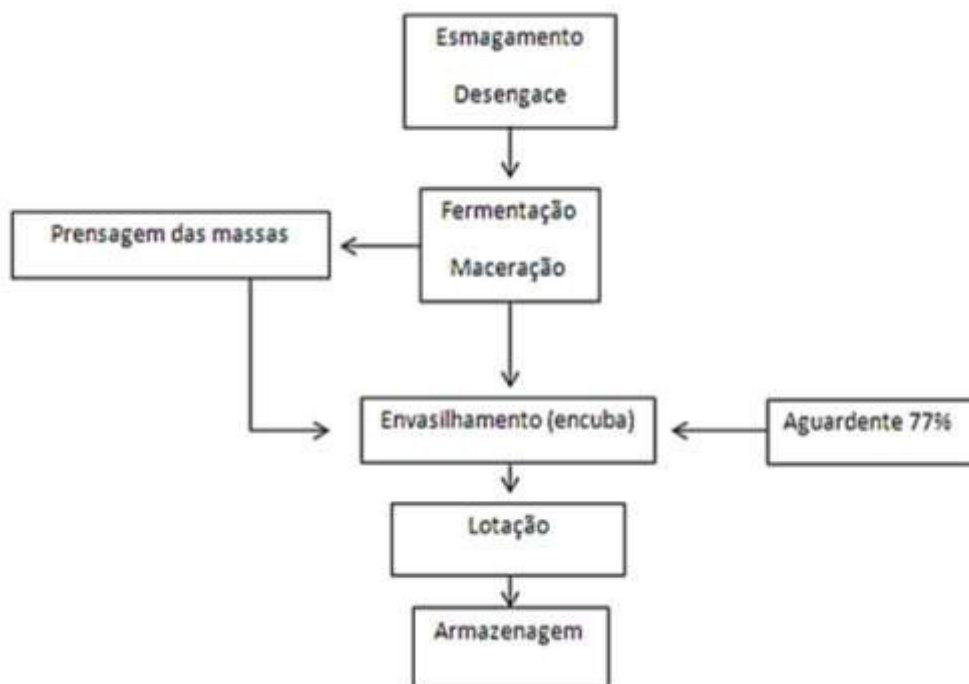


Figura 1.3. Esquema do processo de vinificação do Vinho do Porto ¹.

1.6.2. Aguardentação ou Benefício

A aguardentação ou benefício corresponde ao processo de adição de aguardente ao

mosto em fermentação.

A aguardentação confere ao vinho características organolépticas peculiares, melhora a estabilidade químico-enológica e permite controlar o grau de doçura final do vinho.

Deste modo, a fermentação deve estender-se até ao momento em que a quantidade de açúcares não fermentados confere ao vinho a doçura desejada¹.

O mosto em fermentação é separado das partes sólidas e transportado para cubas, onde a fermentação é interrompida pela adição de aguardente vínica (benefício) em determinadas proporções⁹.

A escolha do tipo de aguardente a adicionar deve ser criteriosa, pois a sua composição química e o seu potencial aromático são importantes para a obtenção de um vinho de elevada qualidade.

1.6.3. Envelhecimento

O processo de envelhecimento de um Vinho do Porto pode durar dezenas de anos e é orientado de forma diferente conforme o tipo de vinho pretendido.

Este processo é importante visto que tem uma influência benéfica no seu perfil aromático e gustativo¹³.

O seu notável potencial de envelhecimento e o facto de ser fortificado significam que o vinho do Porto continuará a melhorar no casco ou na garrafa por muito mais tempo que a maioria dos outros vinhos. A escolha do período de envelhecimento e do recipiente no qual envelhece irá determinar as características de cada vinho do Porto ⁶.

À medida que o vinho do Porto envelhece, os seus intensos sabores frutados gradualmente dão lugar à suavidade aveludada e ao carácter opulento e complexo que se desenvolve com a idade. Simultaneamente também ocorrem alterações no aspeto do vinho, no entanto, a velocidade com que ocorre vai depender do recipiente no qual o vinho do Porto é envelhecido.

1.7. Vinagres de vinho do Porto

A história do vinagre está estreitamente relacionada com a história do vinho. Segundo a definição internacional de vinagre e o Decreto-Lei n.º 174/2007, o vinagre é o líquido apto para consumo humano, produzido exclusivamente de produtos de origem agrícola, sujeitos

Capítulo 1 - Introdução

a processos biológicos de dupla fermentação, alcoólica e acética ¹¹. Estas matérias-primas devem ser produtos de origem agrícola, em conveniente estado de maturação e que se apresentem isentos de substâncias ou de matérias estranhas à sua normal composição, bem como de microrganismos patogénicos ou de substâncias derivadas destes, em níveis que possam ser prejudiciais à saúde do consumidor ¹⁴.

O vinagre é considerado um condimento, pois a sua principal finalidade é atribuir gosto e aroma aos alimentos ¹⁰.

1.7.1. Tipos de Vinagres

Embora o termo vinagre corresponda ao produto obtido por fermentação acética (acetificação) do vinho, a matéria-prima utilizada para sua elaboração varia em função da disponibilidade do produto de cada país, existindo vinagre de vinho, arroz, cereais, malte, sidra, mel, do álcool de cana-de-açúcar, entre outros¹⁵.

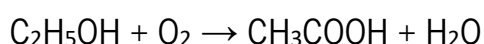
Os vinagres analisados neste projeto foram os vinagres de vinho, e podem ser classificados como ¹⁴:

- Vinagre de Vinho Tinto, Branco ou Espumante: obtido pela fermentação acética de vinho tinto, branco ou espumante, respetivamente;
- Vinagre Balsâmico Tradicional de Modena (originário da localidade italiana Modena): obtido a partir de mosto de vinho branco estabilizado e envelhecido em barris de madeira;
- Vinagre Balsâmico de Modena (originário das localidades italianas Modena e/ou Reggio Emilia): obtido da mesma forma que o Vinagre Balsâmico Tradicional de Modena, contudo, no fim do processo é misturado com vinagre de vinho tinto;
- Condimento Balsâmico Branco: obtido pela mistura de vinagre de vinho branco com mosto de uvas já fermentado;

A nível nacional destaca-se o vinagre de vinho, mais propriamente o vinagre de vinho branco, que representa cerca de 80% do total de vendas de vinagre em Portugal¹⁴.

1.7.2. Fermentação acética

O vinagre, como anteriormente referido, é um produto obtido exclusivamente da fermentação acética do vinho, que resulta da transformação do etanol em ácido acético por bactérias acéticas, cuja respetiva equação química é apresentada a seguir:



A produção de vinagre é um processo aeróbio em que o etanol (do fermentado alcoólico) é oxidado a acetaldeído e este em ácido acético por bactérias acéticas, dando origem a vinagre, por uma reação exotérmica.

Existem três processos básicos para acetificação^{10,15}:

- Processo Orléans ou lento: Este processo resulta em produtos melhores e mais apropriados para vinagres de uva e de frutas;
- Processo Alemão ou rápido: Este processo apresenta vantagens de maior rapidez de fermentação, maior rendimento, no entanto a qualidade do vinagre é inferior;
- Processo submerso: Atualmente, a rapidez na produção industrial do vinagre determina a preferência por este processo que utiliza a fermentação acética submersa. Através do mesmo é possível reduzir as perdas de substâncias voláteis por evaporação para 3% a 5%. No entanto, o vinagre produzido apresenta-se turvo e com qualidade inferior ao obtido pelo método lento.

O ácido acético é o principal componente do vinagre e é reconhecido como um composto antimicrobiano eficaz que previne o crescimento de organismos patogênicos¹⁶ e a deterioração em alimentos fermentados, no entanto, o aumento do seu teor pode deteriorar bebidas como o vinho, mesmo que em concentrações baixas como 1,2-1,4 g/L¹⁷.

Na tabela 1.1. encontra-se o valor limite de ácido acético em vinagres de acordo com a legislação portuguesa.

Tabela 1.1. Limite analítico de ácido acético em vinagres de vinho.

Parâmetro	Limite	Base Jurídica
Ácido acético	≤ 60 g/l	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III- 17 b)

1.8. Ácidos Orgânicos e Ião Sulfato em Vinhos

A produção de vinhos de qualidade requer um equilíbrio entre os açúcares, os ácidos e outros componentes que conferem sabor ao vinho¹⁸.

A análise dos ácidos orgânicos em amostras de vinho é uma determinação de elevado interesse

na indústria de produção de vinho¹⁹.

Os ácidos orgânicos contribuem maioritariamente para a composição, estabilidade e para as qualidades organolépticas dos vinhos¹³, sendo que as suas propriedades conservantes também contribuem para a estabilidade microbiológica e físico-química dos vinhos, pelo que é essencial dispor de uma informação rápida e de uma metodologia de quantificação eficaz²⁰.

A perceção do sabor ácido do vinho é condicionada pela concentração de iões H⁺ em solução, ou seja, pela acidez real ou pH, sendo que os ácidos que mais influenciam este último são os ácidos málico, láctico e tartárico.

O nível de acidez nas uvas constitui um dos critérios que determina a época de colheita ideal¹⁹.

O teor de ácidos orgânicos no vinho está relacionado com a região e com o clima durante o crescimento e amadurecimento das uvas. Geralmente, os vinhos provenientes de regiões mais quentes contêm mais ácido tartárico, contudo o ácido málico predomina nos vinhos de regiões mais frias²¹.

São vários os ácidos orgânicos que se encontram presentes no vinho e podem ser provenientes da uva ou dos processos de fermentação alcoólica e malolática²². Os ácidos estudados e quantificados neste projeto por Eletroforese Capilar foram os seguintes: tartárico, málico, cítrico, fórmico, succínico, láctico, glucónico e acético. Simultaneamente aos ácidos referidos, também foi estudado e quantificado o ião sulfato.

1.8.1. Ácido tartárico

O ácido tartárico é um componente natural das uvas, assim como das amoras, groselhas e arandos. Este composto é utilizado na indústria farmacêutica e alimentar, constituindo um produto importante na preparação do vinho, tendo em conta que não afeta intensamente o seu sabor e quando em níveis excessivos, pode ser removido por estabilização, onde a matéria insolúvel suspensa no vinho é removida previamente ao engarrafamento²³. Na figura 1.4 é apresentada a estrutura química do ácido tartárico.

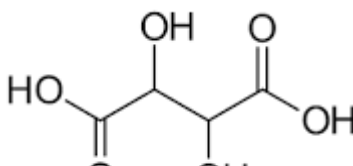


Figura 1.4. Estrutura química do ácido tartárico²⁴.

Capítulo 1 - Introdução

O ácido tartárico da uva é o isómero L (+), sendo a videira um dos poucos vegetais onde este ácido está presente em quantidades elevadas²⁵.

É o principal ácido do vinho, pois é o ácido que figura em maior quantidade no vinho (2 a 5 g/L), e é dos ácidos mais fortes e resistentes ao ataque pelas bactérias.

Contudo, este ácido dificulta a estabilização do vinho devido à baixa solubilidade dos seus sais, pois o enriquecimento em etanol do vinho em relação ao mosto, diminui a solubilidade dos tartaratos (de cálcio) e bitartaratos (de potássio) ocorrendo precipitação por vezes quando menos se desejaria (quando uma garrafa de vinho é colocada no frigorífico, por exemplo).

O ácido metatartárico pode ser adicionado ao vinho antes do engarrafamento, atuando como um colóide protetor, ligando-se aos centros de nucleação dos cristais de bitartaratos, impedindo o posterior crescimento destes e precipitação²⁶.

1.8.2. Ácido málico

O isómero L (-) do ácido málico está presente nas folhas e frutos, é um dos ácidos mais difundidos na natureza e possui pouca resistência à oxidação.

O ácido málico é abundante na uva verde e a sua concentração vai diminuindo ao longo da maturação até cerca de 1 a 8 g/L no mosto. As leveduras degradam também uma pequena parte (entre 10 e 25% do total) em ácido pirúvico, que participa posteriormente no ciclo da fermentação alcoólica, tendo como produto o etanol.

O processo de fermentação malolática é considerado o método mais indicado para reduzir naturalmente a acidez do vinho, pois consiste na transformação do ácido málico em ácido láctico, com libertação de CO₂, operada por bactérias lácticas. Deste modo, diminui o sabor ácido do vinho, melhora a estabilidade microbiana e modifica o carácter organoléptico do vinho²². Neste processo, o ácido é transformado em ácido láctico L (+) pelas bactérias lácticas²⁶. Na figura 1.5 é apresentada a estrutura química do ácido málico.

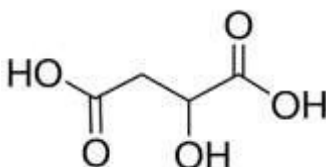


Figura 1.5. Estrutura química do ácido málico²⁴.

1.8.3. Ácido Cítrico

O ácido cítrico é muito comum em frutos cítricos, no entanto encontra-se também nas uvas mas em concentrações bastante menores. Este composto é frequentemente utilizado pelos produtores de vinho, em que é adicionado aos vinhos de forma a aumentar a acidez total. Contudo, é menos frequente a sua utilização em comparação com os ácidos tartárico e málico, pois pode conferir um sabor cítrico acentuado ao vinho.

O limite de ácido cítrico em vinhos de acordo com a legislação portuguesa é ≤ 1 g/L.

O ácido cítrico é adicionado após a fermentação alcoólica ser concluída, pois, caso contrário, a levedura poderá converter o ácido cítrico em acético. Na união europeia, o uso deste ácido para acidificação do vinho foi proibido, contudo, é permitido o seu uso limitado para remoção de excesso de ferro e cobre do vinho ²⁷.

Na figura 1.6. é apresentada a estrutura química do ácido cítrico.

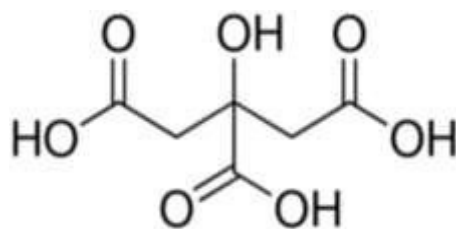


Figura 1.6. Estrutura química do ácido cítrico²⁴.

1.8.4. Ácido Fórmico

O ácido fórmico é o mais simples dos ácidos carboxílicos²⁸. Este ácido ocorre naturalmente como um intermediário do metabolismo celular e é produzido pela degradação de alguns aminoácidos bem como certos compostos orgânicos como o metanol²⁹.

Em elevadas concentrações pode ser perigoso, no entanto, em reduzidas concentrações pode ser bastante útil, já que é utilizado pelo humanos como conservante alimentar, visto que se trata de uma substância antibacteriana ²⁸. Em vinhos, a concentração de ácido fórmico é, geralmente, muito reduzida e não está presente em todos os vinhos.

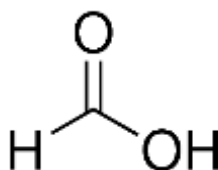


Figura 1.7. Estrutura química do ácido fórmico²⁴.

1.8.5. Ácido Succínico

O ácido succínico é um subproduto da fermentação alcoólica. Pode também formar-se a partir dos ácidos glutâmico e málico. Contrariamente aos ácidos descritos anteriormente, é um ácido muito estável aos ataques bacterianos. Além disso, o seu paladar não é verdadeiramente ácido mas salino, amargo e intenso. De todos os ácidos presentes no vinho, é o de sabor mais rico ²⁶. Na figura 1.8 apresenta-se a estrutura química do ácido succínico.

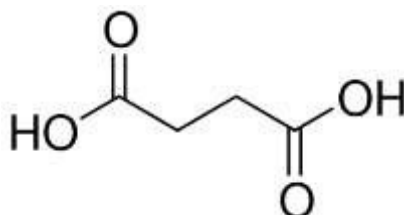


Figura 1.8. Estrutura química do ácido succínico²⁴.

1.8.6. Ácido Láctico

O ácido láctico não se encontra na uva, é resultado da ação das leveduras pela via do ácido pirúvico na fermentação alcoólica, ocorrendo em qualquer vinho, com concentrações de 0,2 a 0,4 g/L²⁶.

Nos vinhos submetidos a fermentação malolática, a concentração de ácido láctico acresce de 1 a 2,5 g/L. Contudo, podem ocorrer outras reações indesejáveis desencadeadas por ataque bacteriano, também com formação de ácido láctico.

O ácido láctico formado pelas leveduras é, principalmente, o enantiómero D (-), enquanto que o enantiómero L (+) é o único produzido pelas bactérias. Na figura 1.9. é apresentada a estrutura química do ácido láctico.

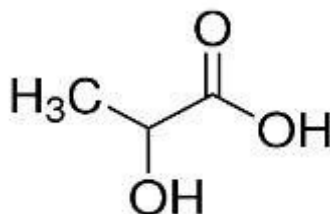


Figura 1.9. Estrutura química do ácido láctico²⁴.

1.8.7. Ácido Glucónico

O ácido glucónico encontra-se presente nos mostos e nas uvas.

Nos vinhos, a partir de uma colheita saudável madura, o seu conteúdo não excede os 200-300 mg/L³⁰.

O ácido glucónico é considerado um indicador de contaminação das uvas e a quantificação do seu teor é um parâmetro específico e importante para determinar o estado das uvas utilizadas para a produção de vinho, pois pode afetar a qualidade organoléptica do vinho.

O ácido glucónico e os sais de gluconato ocorrem muito na natureza pois tais espécies derivam da glucose por oxidação. Na figura 1.10. é apresentada a estrutura química do ácido glucónico.

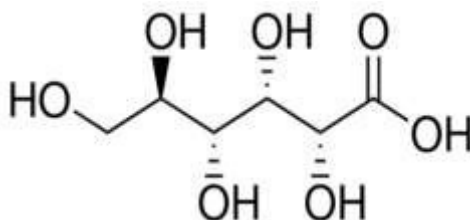


Figura 1.10. Estrutura química do ácido glucónico²⁴.

1.8.8. Ácido Acético

O ácido acético é o principal componente da acidez volátil do vinho.

Na destilação do vinho, o ácido é volatilizado e recolhido no condensado, o que não acontece com os ácidos fixos (ácidos orgânicos da uva e originários da fermentação)²⁶.

O seu teor nos vinhos é muito variável, consoante o tipo de matriz dos mesmos.

Este ácido ocorre pelas mesmas vias de formação do ácido láctico acrescido da via das bactérias acéticas.

A presença deste ácido nos vinhos provoca uma alteração do gosto, conferindo um sabor amargo. Na figura 1.11. encontra-se a estrutura química do ácido acético.

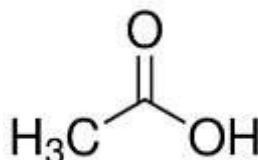


Figura 1.11. Estrutura química do ácido acético ²⁴.

1.8.9. Sulfato

Os sulfitos, devido às suas propriedades antioxidantes e antibacterianas, são frequentemente utilizados como conservantes na produção de vinho, bem como na maioria das indústrias alimentares.

Nos vinhos, o sulfito desempenha um papel importante na prevenção da sua oxidação.

A quantidade de sulfitos presente nos vinhos encontra-se regulamentada em todo o mundo. Qualquer vinho que contenha mais de 10 mg/L de dióxido de enxofre deve conter essa informação no seu rótulo.

O sulfito, quando o vinho é exposto ao ar, é oxidado a sulfato, baixando o pH do vinho, conferindo-lhe um paladar “seco”, termo usado para traduzir a sensação gustativa que ocorre quando se prova um vinho com pH muito baixo. Por esta razão, o vinho branco não pode ser conservado em cascos de madeira, pois a oxidação ocorre a um ritmo mais acelerado. Na figura 1.12. apresenta-se a estrutura química do ião sulfato.

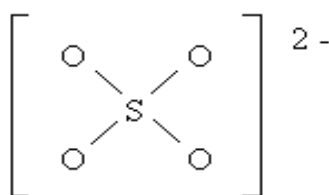


Figura 1.12. Estrutura química do ião sulfato ²⁴.

1.9. Relevância das análises dos ácidos orgânicos em estudo

Os ácidos orgânicos são de enorme importância na expressão do perfil sensorial dos vinhos.

Alguns dos ácidos anteriormente mencionados desempenham um importante papel químico nos vinhos, como, por exemplo, diminuem o pH durante a fermentação de modo a que as bactérias indesejáveis de contaminação não possam sobreviver e atuam como conservantes após a fermentação. A importância dos diversos ácidos prossegue no decurso da maturação.

A quantificação dos ácidos orgânicos constitui um fator fundamental na análise dos mostos e vinhos por razões de preservação e estabilidade do produto. O doseamento destes ácidos é imposto por razões de controlo.

A análise dos ácidos orgânicos constitui, também, um aspeto muito importante para o combate à fraude e adulteração dos vinhos do Douro e do Porto, com vista a defender o prestígio

do vinho do Porto e o valor desta denominação de origem¹.

Na tabela 1.2. são descritos os limites analíticos para o sulfato e ácido cítrico, para os vinhos, e o limite analítico de ácido acético para os vinagres, de acordo com a legislação portuguesa, não havendo valores legislados para os restantes ácidos.

Tabela 1.2. Limites analíticos estabelecidos pela Legislação Portuguesa.

Parâmetro	Matriz	Limite	Base jurídica
Sulfatos (expresso em sulfato de potássio)	Vinhos	≤ 2 g/L	Portaria n° 334/94, de 31 de Maio
Ácido Cítrico	Vinhos	≤ 1g/L	Reg. (CE) n° 606/2009, Anexo I A - 24
Ácido Acético	Vinagres	≤ 60 g/L	Reg. (CE) n° 491/2009, Anexo III- 17 b)

1.10. Eletroforese Capilar

Neste projeto utilizou-se a técnica de Eletroforese Capilar de Zona (CZE) a qual será dado ênfase na introdução. Contudo, consoante o tipo de analito a analisar, existem outras técnicas analíticas baseadas nos princípios da Eletroforese como a Eletroforese Capilar em Gel (CGE), a Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC), a Cromatografia Eletrocinética Capilar (CEC) e a Isotacoforese Capilar (CITP)³¹.

A eletroforese é definida como uma técnica de separação baseada na diferença de velocidade de migração de compostos iónicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico. A Eletroforese foi desenvolvida pelo químico sueco Arne Tiselius, pioneiro na utilização desta técnica como ferramenta de separação, aplicando-a em proteínas presentes no sangue³¹.

Ao longo dos anos, esta técnica foi aperfeiçoada com o objetivo de se obter uma maior eficiência e diminuição dos efeitos térmicos provenientes da aplicação de um campo elétrico³¹.

Com esta finalidade e com o avanço instrumental das técnicas de eletroforese permitiu a introdução de colunas capilares no sistema eletroforético, e esta técnica foi denominada Eletroforese capilar.

A Eletroforese capilar surgiu após décadas de aperfeiçoamento da técnica de eletroforese, na década de 80, e rapidamente se expandiu para diversas áreas científicas incluindo a Química Analítica, Biotecnologia e Ciências Farmacêuticas³².

Esta técnica resulta da junção dos mecanismos de separação da eletroforese com os

Capítulo 1 - Introdução

conceitos de instrumentação e automação da cromatografia¹⁹ e tem ganho uma importância considerável como técnica de separação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, proteínas, ácidos nucleicos e mesmo de células e vírus, aliado à boa resolução, simplicidade e facilidade de preparação de amostra³³.

Este rápido avanço da técnica decorreu não só da simplicidade instrumental como da variedade dos modos de separação que se podem efetuar num único capilar e da diversidade de compostos que são possíveis de analisar em diferentes matrizes em cada modo^{19,34}.

Na eletroforese capilar, o processo de separação baseia-se na diferença das mobilidades eletroforéticas, resultando em diferentes velocidades de migração das espécies iónicas ou ionizáveis na solução-tampão eletroforética contida no capilar, por atração ou repulsão sob ação de um campo elétrico e, dependendo também das diferenças do tamanho do soluto e carga a dado pH.

O contínuo aperfeiçoamento da técnica e as suas vastas aplicações permitem que a eletroforese capilar apresente características como o baixo custo analítico, a simplicidade na operação e manuseio e o tempo de análise relativamente curto. A reduzida quantidade de reagentes e solventes orgânicos utilizados, permite que esta técnica se enquadre nos parâmetros da Química Verde, sendo que um capilar de 50 cm e 50 µm de diâmetro interno contém um volume de 1 µL sendo apenas injetados volumes na ordem dos nanolitros.

A eletroforese capilar apresenta inúmeras características e vantagens associadas, as quais se destacam^{31,35}:

- A elevada resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados ($100-1000 \text{ V cm}^{-1}$), resultando em separações de alta eficiência, pois geralmente excede 10^5 pratos teóricos
- Fácil preparação da amostra
- Requer um pequeno volume de amostra (apenas 1-50 nL da amostra é injetado) sendo a injeção direta.
- A deteção é realizada no capilar, com um detetor externo (Diode Array Detector, DAD)
- Instrumentação automatizada

1.10.1. Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

Atualmente, a eletroforese capilar de zona (CZE) é a técnica de eletroforese capilar mais utilizada, devido à rapidez e facilidade do processo de separação de uma variada gama de compostos.

A frequência de análises de ácidos orgânicos em bebidas recorrendo a esta técnica tem aumentado, bem como o desenvolvimento de vários métodos para a sua determinação em diferentes matrizes, como o vinho, cerveja, leite, sumos de fruta, entre outros³³.

Neste modo de análise, a amostra é injetada no capilar previamente preenchido com solução tampão, e a sua composição é constante em toda a região de separação³⁶. Aplica-se um potencial que gera um campo elétrico, fazendo com que os diferentes analitos migrem para zonas distintas dentro do capilar, consoante as diferentes mobilidades efetivas, resultantes das mobilidades eletroforéticas e eletrosmóticas.

- **Capilares**

A maioria dos capilares utilizados para a eletroforese capilar são constituídos por sílica fundida, contendo grupos silanol na sua superfície que, na presença de um meio eletroforético, podem ser ionizados³⁷.

O formato de capilar faz com que a eletroforese se possa aplicar a uma variada gama de analitos.

Os capilares utilizados em eletroforese capilar apresentam, geralmente, um diâmetro interno entre 20 a 100 μm ³⁸.

A utilização de capilares tem inúmeras vantagens, particularmente em relação aos efeitos prejudiciais do aquecimento de Joule, calor gerado quando uma corrente elétrica flui através de um condutor, como, neste caso, um capilar com tampão. Quanto menor o diâmetro do capilar, mais eficiente será a dissipação do calor, deste modo, pode ser aplicado um potencial mais elevado para uma separação mais rápida e eficiente.

Relativamente ao comprimento dos capilares, normalmente, está compreendido entre 30 a 60 cm⁴⁰.

A resolução numa separação por eletroforese capilar de zona é independente do comprimento do capilar³⁹.

Na imagem 1.13 apresenta-se um capilar utilizado no presente trabalho, inserido no respetivo suporte do equipamento de eletroforese capilar.

Capítulo 1 - Introdução



Figura 1.13. Capilar inserido no respetivo suporte.

A interface entre as paredes do capilar de sílica fundida e a solução tampão resulta na formação de três camadas, a superfície de sílica negativamente carregada, consequente da ionização dos grupos silanol, a camada fixa (camada rígida ou plano interno de Helmholtz) que contém cátions do tampão, atraídos pela superfície negativamente carregada, e a camada difusa de cátions (e respetiva esfera de hidratação), segunda camada de cátions formada para neutralizar todas as cargas negativas ⁴¹, adjacente à superfície de sílica que tendem a migrar em direção ao cátodo, quando é aplicada uma tensão. Esta migração resulta numa migração de fluidos através do capilar.

A utilização de capilares de sílica fundida na execução da técnica introduz a geração do fluxo eletrosmótico (EOF), fluxo do líquido no capilar, consequente da carga da superfície no interior da parede do capilar ³¹.

O fluxo eletrosmótico resulta do efeito do campo elétrico aplicado na solução contida no capilar.

Sob condições aquosas, a maioria das superfícies sólidas possuem uma carga excessiva, que pode resultar da ionização da superfície ou da adsorção de espécies iónicas na superfície. Em capilares de sílica ambos os processos podem ocorrer, contudo o EOF é mais fortemente controlado por um maior número de grupos silanol (SiOH) que podem existir na forma aniónica (SiO) ³⁶.

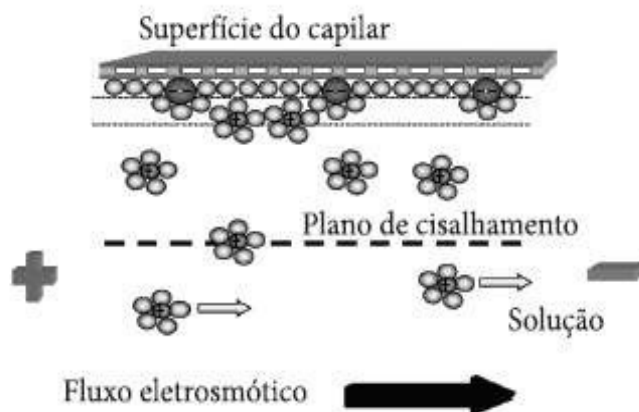


Figura 1.14. Ocorrência do fluxo eletrosmótico ³⁶.

O fluxo eletrosmótico permite que aniões e catiões sejam separados na mesma sequência.

Os catiões são atraídos para o cátodo, como se pode observar na figura 1.14, e a sua velocidade é aumentada pelo fluxo eletrosmótico.

Os aniões, embora eletroforéticamente sejam atraídos para o ânodo, são varridos para o cátodo com o fluxo do meio eletroforético. Sob estas condições, os catiões com maior razão carga/massa migram primeiro, seguidos dos catiões com a razão carga/massa mais reduzida.

Os componentes neutros migram posteriormente pois a sua razão carga/massa é zero, e seguidamente ocorre a migração dos aniões.

Os aniões migram por último, sendo que os aniões com a razão carga/massa mais reduzida migram primeiro, seguidos dos aniões cuja mesma razão é mais elevada ⁴², como se pode verificar na figura 1.16.

Contudo, é possível alterar a razão carga/massa de muitos íões, ajustando o pH do meio de modo a afetar a ionização e, conseqüentemente, a mobilidade eletroforética⁴³.

A magnitude do fluxo eletrosmótico, em termos de velocidade (V_{EOF}) ou mobilidade (μ_{EOF}), pode ser expressa segundo as equações 1 e 2 ⁴³:

$$V_{EOF} = (\epsilon \xi / \eta) E \quad \text{Equação 1}$$

$$\mu_{EOF} = (\epsilon \xi / \eta) \quad \text{Equação 2}$$

Capítulo 1 - Introdução

Onde:

v - Velocidade do fluxo eletrosmótico

ϵ - Constante Dielétrica do eletrólito

ξ - Potencial Zeta (V) (medida da carga na parede do capilar)

η - Viscosidade da solução-tampão (poise, P)

E - Potencial aplicado (V/cm)

De acordo com as equações 1 e 2, o fluxo eletrosmótico é diretamente proporcional ao potencial zeta (ξ). Este potencial consiste na diferença de potencial existente próxima à superfície do capilar, gerada a partir da dupla camada elétrica e é gerado em todo o comprimento do capilar. O potencial zeta depende da carga na superfície da parede do capilar e a carga depende do pH⁴⁴.

O perfil de velocidade do fluxo eletrosmótico é um perfil plano, o que permite que as moléculas se movimentem a velocidades muito próximas, independentemente da posição radial do analito³¹. Esta característica permite uma maior eficiência na separação, pois não promove o alargamento dos picos, originando perfis destes mais estreitos⁴¹. Desta forma, a Eletroforese capilar distingue-se de outros métodos, como a Cromatografia líquida de alta eficiência, que apresenta um perfil laminar/ parabólico, característico do fluxo gerado por pressão ³⁶.

Na figura 1.15 apresenta-se um esquema relativo ao perfil plano, gerado pelo fluxo eletrosmótico e o perfil laminar ou parabólico, característico de um fluxo gerado por pressão.

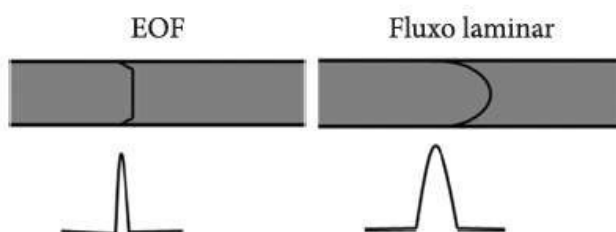


Figura 1.15. Perfis de velocidade de fluxo eletrosmótico (EOF) e fluxo laminar, e respectivos picos característicos ³¹.

Embora a ocorrência do fluxo eletrosmótico seja benéfico, o seu controlo é crucial. Este fluxo, pode ser demasiado rápido a valores de pH elevados, resultando na eluição dos solutos antes que a separação ocorra. De outro modo, a baixo ou moderado valor de pH, a baixa carga negativa no interior do capilar pode conduzir à adsorção de solutos catiónicos ³⁶.

As condições que afetam a carga na as paredes do capilar também afetam o soluto, assim como o pH da solução-tampão. Deste modo, é necessário otimizar as condições do fluxo e as

propriedades da mobilidade do soluto para a obtenção de separações eficientes.

Modos de injeção da amostra

Na eletroforese capilar, a introdução da amostra constitui um parâmetro importante na exatidão e precisão quantitativa das análises⁴⁵.

O volume de amostra injetada não depende apenas do tempo e pressão da injeção, mas também do tamanho e diâmetro do capilar, da viscosidade da amostra e da diferença de pressão usada, consoante o método de injeção selecionado⁴⁶.

A injeção da amostra, em eletroforese capilar pode ser realizada por injeção hidrodinâmica, por diferença de pressão, ou por injeção eletrocinética, por aplicação de um potencial elétrico.

- **Injeção hidrodinâmica**

A injeção hidrodinâmica é o método de injeção da amostra mais utilizado e comum nos equipamentos comerciais sendo o método utilizado neste trabalho. Pode ser realizada individualmente ou em sequência, sendo que em sequência possibilita um maior número de análises num determinado período de tempo ⁴⁷.

Neste método, a amostra é introduzida no capilar por aplicação de pressão no vial da amostra, forçando-a fisicamente para o interior do capilar.

O volume de amostra utilizando este método, dependerá da constituição do equipamento, nomeadamente do comprimento e diâmetro do capilar, da pressão aplicada e do tempo durante a qual é aplicada e ainda da viscosidade da amostra³¹.

O volume da amostra pode então ser estimado segundo a equação 3:

$$V = \frac{\Delta p d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

V- Volume de amostra injetado

Δp - Pressão aplicada

d- Diâmetro do capilar

t- Tempo de injeção

η - Viscosidade da amostra

L- Comprimento do capilar

- **Injeção Eletrocinética**

Na injeção eletrocinética, a amostra é injetada no capilar por aplicação de um potencial.

O volume da amostra injetada dependerá do diâmetro do capilar, do campo elétrico aplicado, do tempo de injeção e da mobilidade dos componentes, ou seja, componentes da amostra que apresentem mobilidades diferentes, serão injetados em diferentes quantidades ⁴⁶.

A quantidade injetada de um componente da amostra pode ser estimada segundo a equação 4:

$$Q = (\mu_e + \mu_{eo}) E \pi r^2 C t \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

Q- Quantidade injetada

μ_e - Mobilidade eletroforética

μ_{eo} - Mobilidade eletroosmótica

E- Potencial Elétrico

r- Raio do capilar

C- Concentração de um composto na amostra

t- Tempo de injeção

- **Deteção do analito**

Atualmente existem vários métodos de deteção utilizados em Eletroforese capilar que podem ser classificados em métodos óticos, eletroquímicos e ainda outros métodos como a espectrometria de massa.

Os métodos de deteção óticos incluem a absorção de radiação no Ultravioleta-Visível (UV/Vis) ou infravermelho (IV), a espectroscopia de fluorescência e Raman, entre outros.

Nos métodos de deteção eletroquímicos incluem-se os métodos amperométricos, os potenciométricos e os condutimétricos.

Podem ser acoplados à eletroforese capilar sistemas de espectrometria de massa (MS), de fotometria de chama e de ressonância magnética nuclear⁴⁸.

Os métodos de deteção mais comuns em eletroforese capilar são os métodos UV-Vis, de fluorescência, espectrometria de massa, amperométricos e condutimétricos, e serão abordados neste trabalho.

Capítulo 1 - Introdução

Para a escolha do método de detecção adequado à análise deve-se priorizar, primeiramente, o facto dos compostos apresentarem características que permitam ser detetados pelo método em questão, a sensibilidade e seletividade do método, e a capacidade de fornecer dados quantitativos³⁶.

Na tabela 1.3. apresentam-se os métodos de detecção frequentemente utilizados em eletroforese capilar e os respetivos limites de detecção.

Tabela 1.3. Métodos de detecção e respetivos valores de limite de detecção (mol/L) ³¹.

Método de detecção	Limite de detecção (mol/L)
UV-Vis	$10^{-5} - 10^{-7}$
Fluorescência	$10^{-13} - 10^{-16}$
Espetrometria de Massa	$10^{-8} - 10^{-10}$
Amperométrico	$10^{-7} - 10^{-10}$
Condutimétrico	$10^{-7} - 10^{-9}$

- **Deteção UV-Vis**

O detetor de UV-Vis é o mais utilizado em sistemas de eletroforese capilar devido à sua ampla aplicação, simplicidade e custo relativamente baixo, e foi o detetor utilizado neste trabalho⁴⁹.

De modo a promover uma eficiente separação e evitar a perda de sensibilidade, a deteção é efetuada diretamente no capilar, através de uma janela do capilar óticamente transparente, janela de deteção, pois não possui o revestimento externo.

Contudo, este método apresenta uma limitação relativamente à sensibilidade, que se deve ao reduzido percurso ótico, consequência do pequeno diâmetro interno do capilar³². Esta limitação pode ser parcialmente compensada pela elevada eficiência da técnica de eletroforese capilar e com a possibilidade de se usar comprimentos de onda baixos na região do UV ⁵⁰.

A fonte de radiação UV é, geralmente, uma lâmpada de deutério, com um intervalo de comprimento de onda entre 190 a 380 nm. Esta radiação é focada e direcionada por duas lentes para os filtros de seleção de comprimento de onda e posteriormente incide na janela de deteção do capilar.

A radiação não absorvida pela amostra continua o percurso através de um cabo de fibra ótica até ao fotodiodo, onde a radiação é convertida num sinal elétrico, que será processado pelo software utilizado⁵⁰.

Na figura 1.16 está representado um esquema do sistema de deteção UV-Vis.

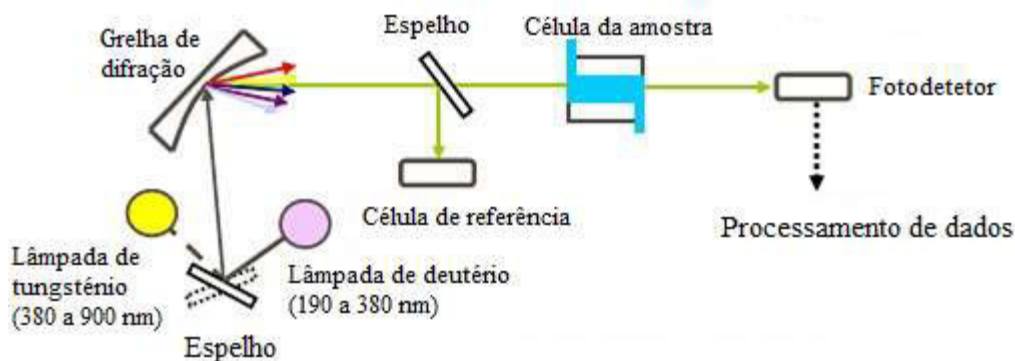


Figura 1.16. Representação de um sistema de detecção UV-Vis.

Para os detetores de UV-Vis, a absorvância da solução de analito é traduzida pela Lei de Lambert-Beer, apresentada na equação 5:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

A-Absorvância

ϵ -Absortividade molar do analito

C-Concentração molar do analito

l-Percurso ótico

A detecção UV-Vis pode ser realizada de forma direta e indireta.

A detecção direta é utilizada quando as espécies a analisar apresentam absorção na região do ultravioleta e/ou visível. Neste caso, utiliza-se uma solução-tampão que não absorva nessa região, de modo a não interferir na análise ³¹.

A detecção indireta, utilizada neste trabalho, é aplicada em analitos que não absorvam na região do ultravioleta e/ou visível ou que a absorção seja pouco intensa e é utilizada para a análise de catiões e aniões inorgânicos, ácidos carboxílicos, amins de cadeia curta e aminoácidos. Para este método ser utilizado, um dos componentes da solução-tampão deve apresentar absorção nesta região de comprimento de onda.

Nesta situação, o eletroferograma apresentará um pico negativo, que corresponde ao analito⁴⁹.

Capítulo 1 - Introdução

Na figura 1.17 apresenta-se um diagrama relativo ao sistema de eletroforese capilar de zona.

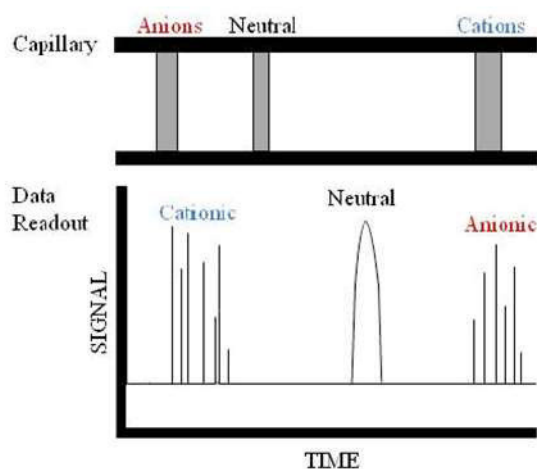


Figura 1.17. Diagrama do sistema de eletroforese capilar de zona⁵¹.

Nesta imagem é possível verificar a separação de aniões, catiões e compostos neutros em diferentes zonas do capilar. Na parte inferior do diagrama apresenta-se o respetivo eletroferograma, em que inicialmente, com menor tempo de migração, surgem os picos dos catiões, seguidos dos neutrões, e por fim os picos dos aniões, com um tempo de migração superior, pois foram os últimos a eluir no capilar.

1.11. Técnicas analíticas alternativas para análise de ácidos orgânicos em vinhos

Para a quantificação de ácidos orgânicos em vinho podem ser usadas, para além da técnica de Eletroforese Capilar, técnicas alternativas como a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a utilização de Biossensores, os métodos gravimétricos, entre outros. Em geral estas técnicas têm a capacidade de separar e, simultaneamente, determinar esses mesmos compostos.

Para a análise de ácidos orgânicos em vinhos, a Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) recomenda algumas técnicas e métodos alternativos, as quais são apresentadas a seguir.

Capítulo 1 - Introdução

- Para a separação e determinação simultânea dos ácidos orgânicos do vinho a OIV recomenda a utilização de HPLC, em que os ácidos são detetados por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).

Este método pode ser aplicado para quantificação dos ácidos málico e tartárico, usando uma coluna de fase reversa C₈, e para os ácidos cítrico e láctico, usando uma coluna com resina de troca iônica. A determinação destes ácidos é realizada com referência a um padrão externo, analisado sob condições semelhantes. Este método também pode ser utilizado para a quantificação dos ácidos acético e succínico⁵².

- Como o ácido tartárico pode ser precipitado na forma de tartarato de cálcio, a OIV sugere a sua determinação gravimétrica. Em condições de precipitação (pH, volume total utilizado, concentração dos iões precipitantes) a precipitação de tartarato de cálcio é completa enquanto estiver presente em solução. Quando, no processo de armazenamento ou produção é adicionado ácido meta-tartárico ao vinho, a precipitação do tartarato é incompleta, devendo ser primeiramente hidrolisado⁵³.
- Para o ácido láctico é sugerido um método enzimático que envolve que o ácido láctico total seja oxidado por nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) a piruvato numa reação catalisada pela D-lactate desidrogenase (D-LDH). A quantidade de NADH formada, medida pelo aumento da absorvância a um comprimento de onda de 340 nm, é proporcional à quantidade de lactato originalmente presente⁵⁴.
- Para a determinação do ácido cítrico são sugeridos dois métodos, um método químico e um enzimático.

O método químico, requer a oxidação do ácido a acetona, que posteriormente é separada por destilação. O acetaldeído é oxidado a ácido acético e a acetona é determinada por iodometria⁵⁵.

De outro modo, o método enzimático envolve a conversão do ácido a oxaloacetato e acetato, catalisada por citratoliase (CL). Na presença de malato desidrogenase (MHD) e lactato desidrogenase (LHD), o oxaloacetato é reduzido a L-malato e L-lactato por NAHD. A quantidade de NADH oxidada a NAD⁺ é proporcional à quantidade de ácido cítrico presente. A oxidação de NAHD é medida pela redução da absorvância observada a um comprimento de onda de 340 nm⁵⁶.

Capítulo 1 - Introdução

- Também para a determinação do ácido málico são apresentados, pela OIV, dois métodos: um método colorimétrico para determinação de ácido málico total e um método enzimático para determinação de ácido D-málico.

No primeiro método acima referido o ácido málico, separado através de uma coluna de troca aniônica, é determinado colorimetricamente no eluente, medindo a intensidade da coloração amarela formada devido à reação do ácido málico com o ácido cromotrópico na presença de ácido sulfúrico concentrado (96%). Para correção dos interferentes, subtrai-se a absorvância obtida usando ácido sulfúrico (86%) com a absorvância obtida usando ácido sulfúrico (96%) visto que o ácido málico não reage quando a concentração de ácido sulfúrico 86% ⁵⁷.

Relativamente ao método enzimático, o ácido D-málico, na presença de D-malato desidrogenase (D-MDH), é oxidado a oxalo-acetato por NAD, posteriormente transformado em piruvato e dióxido de carbono.

A formação de NADH, medida pelo aumento da absorvância ao comprimento de onda de 334 nm, 340 nm ou 365 nm, é proporcional à quantidade de ácido D-málico presente ⁵⁷.

Com o mesmo objetivo de análise têm sido publicados trabalhos que apresentam métodos e técnicas alternativas, e são apresentados de seguida.

Foi proposto um método que recorre a biossensores para a determinação de ácido málico e glucónico em vinhos, tendo sido obtidos resultados bastante satisfatórios.

Neste estudo foi desenvolvido um método amperométrico seletivo para a determinação de dois ácidos.

Este método envolveu um biossensor com um *design screen-printed* constituído por dois eléctrodos de trabalho, em que um dos eléctrodos foi modificado com nanopartículas de ouro, tetratiofulvaleno (TTF) e uma enzima oxirredutora de malato de quinona para deteção de ácido málico.

O segundo eléctrodo de trabalho foi modificado com TTF e enzima gluconato desidrogenase para a deteção de ácido glucónico.

As respostas do biossensor a ambos os ácidos resultaram em correntes anódicas, sendo os limites de deteção de 1,89 μM e 0,79 μM para o ácido málico e glucónico, respetivamente⁵⁹.

Capítulo 1 - Introdução

Foi proposto um método que envolve um novo bioanalizador com um biossensor amperométrico integrado para determinação de ácido L-málico.

Neste estudo, foi construído um biossensor constituído por um filme de ouro depositado num elétrodo de disco de aço inoxidável em que se imobilizou enzimas de malato desidrogenase (MHD) e diaforase (DP) com o mediador redox (TTF).

Os autores procederam à realização de uma calibração com soluções padrão de ácido L-málico, em que a curva de calibração apresentou uma gama de trabalho de $2,0 \times 10^{-3}$ – $4,0 \times 10^{-3}$ g/L.

A resposta do biossensor exibiu ótimos resultados analíticos em termos de sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade das medições. As suas características analíticas e operacionais demonstraram que o bioanalizador com o biossensor integrado é um instrumento simples, rápido e promissor para a rotina de controlo de vinhos ⁶⁰.

Foi publicado um estudo que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência, para determinação dos ácidos tartárico, málico, láctico, cítrico e succínico.

A separação cromatográfica envolveu a utilização de uma coluna de fase reversa, uma fase móvel constituída por acetonitrilo e ácido fórmico em água, em eluição isocrática com deteção ao comprimento de onda de 212 nm. A preparação da amostra apenas envolveu a sua filtração e diluição.

A curva analítica para cada ácido orgânico foi obtida considerando a concentração dos analitos e a área dos picos, verificando-se uma relação linear entre os dois parâmetros.

Os limites de deteção e quantificação de cada ácido são apresentados na tabela 1.4.

Tabela 1.4. Limites de deteção e quantificação de cada ácido analisado por HPLC ⁶⁰.

	Ácido tartárico	Ácido málico	Ácido láctico	Ácido cítrico	Ácido succínico
LDD (mg/L)	2,6	4,2	4,7	5,4	5,4
LDQ (mg/L)	13,0	20,9	31,6	7,3	7,2

A determinação simultânea dos ácidos orgânicos foi conseguida com um tempo total de 16 minutos.

O método apresentou bons resultados em todas as etapas da validação, nomeadamente sensibilidade, precisão, exatidão e robustez, demonstrando a possibilidade da sua ampla utilização para a análise de ácidos orgânicos em vinhos tintos e brancos.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Neste capítulo descrevem-se os procedimentos utilizados para determinação do ião sulfato e dos ácidos tartárico, málico, cítrico, fórmico, succínico, láctico, glucónico e acético em vinhos e vinagres, bem como os materiais e reagentes necessários para a sua análise, por Eletroforese capilar com detetor UV-Vis.

2.1 Reagentes e Solvente

Neste trabalho foi utilizada água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação *Millipore Milli-Q System*.

Os reagentes utilizados e respetivo grau de pureza encontram-se descritos na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Reagentes utilizados e respetivo grau de pureza.

Compostos	Grau de pureza (%)
Sulfato de sódio anidro	99.0
Ácido tartárico	99.7
Ácido málico	99.0
Ácido cítrico	99.5
Ácido fórmico	99.4
Ácido succínico	99.5
Ácido láctico	95.0
Gluconato de sódio	99.0
Acetato de sódio	99.3
Octanoato de sódio-Padrão interno	Incluído no Kit utilizado, já preparado

2.2 Materiais e equipamento

Os equipamentos utilizados em todo este trabalho foram os seguintes:

- Sistema de Eletroforese Capilar, marca *Beckman Coulter*, modelo P/ACE MDQ equipado com amostrador automático, detetor UV-Vis e acoplado ao *software 32 Karat 8.0* para análise e recolha de dados.
- Sistema de degaseificação de amostras: linha de hélio munida de dispositivo de controlo de pressão
- Beckman Coulter Anion Analysis Kit, constituído por: Capilar com diâmetro interno de 75µm, Rinse Solution (água), Anion Separation Buffer (solução tampão), Anion Coating (solução acondicionadora), Conditioner-Na (hidróxido de sódio 0,1N), Anion Internal Standard (padrão interno, octanoato de sódio 30 mM), Anion Organic Test Mix (solução teste).
- Balança analítica Mettler Toledo modelo ML 204/01 com uma incerteza expandida de 0,000083 g
- Micropipetas Socorex- Acura manual 825 de 10-100 µL e 100-1000 µL.

2.3 Preparação de soluções

2.3.1 Preparação de soluções padrão de calibração

Foram preparadas as soluções-mãe de cada ácido orgânico e sulfato, em balões volumétricos de $100,0 \pm 0,1$ mL.

Inicialmente foram pesados cada um dos compostos numa balança analítica e posteriormente dissolvidos em balões volumétricos com água ultrapura. As massas de ácidos a pesar e o correspondente valor exato de concentração são apresentados na tabela 2.2. Ao longo do estágio foram preparadas diversas soluções-mãe e, naturalmente, em todas as preparações a massa de composto efetivamente pesada bem como a concentração final diferem. No entanto, em todas as soluções esses valores estiveram de acordo com os dados apresentados na tabela 2.2.

Tabela 1.2. Massa de ácidos orgânicos e ião sulfato a pesar para a preparação das soluções-mãe e concentração das soluções a preparar.

Composto	Massa (g)	Concentração Final (g/L)
Sulfato de sódio	0,400	4,00
Ácido tartárico	0,600	6,00
Ácido málico	0,600	6,00
Ácido cítrico	0,100	1,00
Ácido fórmico	0,500	5,00
Ácido succínico	0,100	1,00
Ácido láctico	0,550	5,00
Ácido glucónico	0,550	5,00
Ácido acético	0,500	4,00

A partir de cada solução-mãe, para cada composto, preparou-se a solução intermédia de calibração em balões de $10,000 \pm 0,040$ mL. Os volumes utilizados na preparação destas soluções encontram-se descritos na tabela 2.3.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Tabela 2.3. Volumes utilizados na preparação de $10,00 \pm 0,04$ mL de cada uma das soluções intermédias de calibração, a partir das soluções-mãe.

Padrão	Sulfato (μL)	Tartárico (μL)	Málico (μL)	Cítrico (μL)	Succínico (μL)	Lático (μL)	Glucónico (μL)	Fórmico (μL)	Acético (μL)
Balão $10,000 \pm 0,040$ mL	1000	1000	1000	2500	2500	1000	1000	1000	500

As soluções-mãe e soluções intermédias foram armazenadas no frigorífico a uma temperatura média de 4°C e protegidas da luz, com exceção das soluções intermédias de ácido fórmico, lático, glucónico e acético que eram preparadas diariamente, devido à sua instabilidade.

Os padrões de calibração foram preparados por diluição das soluções intermédias de cada ácido e sulfato, com água ultrapura em balões de $5,000 \pm 0,025$ mL.

As gamas das concentrações utilizadas na preparação dos padrões encontram-se descritas na tabela 2.4.

Tabela 2.4. Gama de concentrações dos padrões de calibração de cada analito.

Composto	Gama de concentrações (mg/L)
lão sulfato	3,88-31,1
Ácido tartárico	12,0-84,0
Ácido málico	11,9-83,2
Ácido cítrico	4,99-19,9
Ácido fórmico	10,0-60,1
Ácido succínico	2,50-25,0
Ácido lático	10,2-61,0
Ácido glucónico	4,46-35,7
Ácido acético	1,27-10,9

Para o traçado de cada reta de calibração foram preparados cinco padrões na gama indicada na tabela 2.4, em balões de $5,000 \pm 0,025$ mL. Os volumes de solução intermédia bem como o volume de octanoato de sódio, padrão interno (PI), utilizado encontram-se descritos na tabela 2.5. As incertezas do volume das micropipetas encontram-se nos Anexos.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Tabela 2.5. Volumes utilizados para a preparação dos padrões de calibração em balões volumétricos de $5,00 \pm 0,025$ mL.

Padrão (μ L)	Sulfato	Tartárico	Málico	Cítrico	Succínico	Lático	Glucónico	Fórmico	Acético	PI
1	50,0	100,0	100,0	100,0	50,0	100,0	50,0	100,0	35,0	
2	100,0	200	200	200	100,0	200	100,0	200	75,0	
3	200	300	300	250	250	300	200	300	100,0	23,2
4	300	500	500	300	400	400	300	400	200	
5	400	700	700	400	500	600	400	600	300	

2.3.2 Preparação de soluções padrão de verificação

Com o objetivo de avaliar a estabilidade do método e das soluções padrão foram preparadas soluções padrão de verificação.

Para a preparação das soluções-padrão de verificação utilizou-se um procedimento idêntico ao utilizado na preparação de soluções padrão. Assim, prepararam-se novas soluções-mãe de verificação por pesagem dos ácidos orgânicos e sulfato em balões volumétricos de $100,0 \pm 0,1$ mL, de acordo com o descrito na tabela 2.2.

Preparou-se a solução intermédia de verificação para cada composto, a partir da respetiva solução-mãe, em balões de $10,000 \pm 0,040$ mL. Os volumes utilizados são os mesmos que os descritos na tabela 2.3., com exceção do ácido acético, em que se utilizaram 1000 μ L de solução-mãe.

Por diluição da solução intermédia de verificação de cada composto, prepararam-se dois padrões de diferentes concentrações, Padrão 1 de Verificação (P1V), padrão de concentração mais baixa, e Padrão 5 de Verificação (P5V), padrão de concentração mais elevada, em que os volumes medidos para a preparação das soluções são iguais aos descritos na tabela 2.4. para o padrão 1 e 5, respetivamente, com exceção do ácido acético, em que para P1V se utilizou 50 μ L de solução intermédia de verificação de ácido acético e para P5V utilizou-se 450 μ L da mesma solução.

Diariamente eram preparadas as soluções intermédias dos ácidos fórmico, lático, glucónico e acético, pois, segundo o estudo de precisão intermédia dos padrões de verificação realizado inicialmente, os valores apresentados pelos ácidos mencionados não se encontravam dentro dos limites de concentração aceitáveis pelo Instituto, devido à instabilidade das soluções.

2.4 Amostras

2.4.1 Recolha de amostras

No IVDP, diariamente entram no sistema novas amostras de vinhos de diferentes matrizes (vinhos tranquilos, bebidas espirituosas, espumantes, vinhos licorosos, entre outros) para diversas análises.

Foram selecionadas amostras de vinho com diferentes matrizes e vinagres para apresentar neste trabalho.

2.4.2 Preparação de amostras

A preparação de todas as amostras de vinho envolveu uma diluição da amostra, com um fator de diluição de 50, em balões volumétricos de $5,000 \pm 0,025$ mL, pipetou-se, através de micropipetas, 100 μ L de amostra e 23,2 μ L de padrão interno e diluiu-se em água ultrapura. As amostras de vinho e vinagre foram então colocadas em vials de vidro, frascos de 2 mL com tampa para amostrador automático, como se pode verificar na figura 2.1., e foram analisadas por injeção hidrodinâmica no sistema de Eletroforese capilar.

A preparação de amostras de vinagre envolveu três diluições independentes da amostra, com fator de diluição de 50, 250 e 500, ou seja, para uma amostra de vinagre teríamos três balões volumétricos de $5,000 \pm 0,025$ mL com volumes de amostra diferentes. Nas três preparações os volumes de amostra foram 100 μ L, 20 μ L e 10 μ L, contendo 23,2 μ L de padrão interno e diluídos em água ultrapura.

Para preparar a amostra de vinagre para a determinação dos ácidos tartárico, málico, cítrico, fórmico, succínico, glucónico e ião sulfato pipetou-se 100 μ L da amostra, 23,2 μ L de padrão interno e diluiu-se com água ultrapura, com um fator de diluição de 50.

A preparação da amostra para determinar o ácido láctico envolveu a diluição de 20 μ L de amostra com 23,2 μ L de padrão interno e diluídos em água ultra-pura, em balões de $5,000 \pm 0,025$ mL, com um fator de diluição de 250.

A preparação da amostra a utilizar para a determinação de ácido acético, envolvia a diluição de 10 μ L de amostra e 23,2 μ L de padrão interno e posterior diluição em água ultrapura, em balões de $5,000 \pm 0,025$ mL, com uma fator de diluição de 500.



Figura 2.1. Vial para introdução da amostra no sistema de eletroforese capilar.

2.5 Condições instrumentais

As condições instrumentais utilizadas no sistema de eletroforese capilar durante este trabalho encontram-se descritas na tabela 2.6.

Tabela 2.6. condições instrumentais utilizadas no sistema de eletroforese capilar.

Condições	
Modo de Separação	Eletroforese capilar de zona (CZE)
Solução Tampão	Tampão para separação de aniões (incluído no kit utilizado)
Capilar	Tipo: Sílica fundida Diâmetro interno: 75 µm Comprimento total: 70 cm Comprimento efetivo: 50 cm
Injeção Hidrodinâmica (por pressão)	0,1 psi durante 10 segundos
Voltagem	30 kV
Temperatura	25°C
Comprimento de onda de detecção	230 nm

Sempre que se utilizava um capilar novo, com as características mencionadas na tabela 2.6, procedia-se a um acondicionamento do capilar. Este processo consiste em fazer uma lavagem do capilar com hidróxido de sódio 0,1 N (Conditioner-Na) durante 1 minuto com uma pressão de 20 psi, aguardar 4 minutos e fazer a lavagem novamente com hidróxido de sódio 0,1 N por 30 segundos e por fim a lavar com água (Rinse solution) durante 1 minuto a 20 psi.

Em todas as análises, antes de se iniciar a sequência de análise, o capilar era submetido a um acondicionamento da sequência. Este condicionamento consistia numa lavagem com hidróxido de sódio 0,1 N por 1 minuto, depois com água (Rinse solution) durante 1 minuto, seguido de lavagem com a solução condicionadora (Anion Coating) por 30 segundos e lavagem com a solução tampão durante 30 segundos. Posteriormente ocorria lavagem com a solução

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

tampão (Buffer) com potencial aplicado de 30 kV durante 10 minutos, seguida de lavagem com hidróxido de sódio 0,1 N por 30 segundos e finalmente com água (Rinse solution) durante 30 segundos, com uma pressão de 20 psi em cada passo. Este acondicionamento era também realizado quando se utilizava um novo capilar.

Entre injeções, o capilar foi acondicionado com hidróxido de sódio 0,1 N durante 30 segundos, com água durante 30 segundos, seguida de lavagem com a solução condicionadora por 30 segundos e passagem de solução tampão durante 30 segundos, com uma pressão de 20 psi em cada passo.

2.6 Análise de amostras

A identificação dos picos dos ácidos e íão sulfato foi realizada por comparação dos seus tempos de migração com os tempos dos padrões individuais injetados sob as mesmas condições. Para a quantificação, em cada eletroferograma obtido, procedeu-se à integração dos picos correspondentes a cada composto para obter a respetiva área.

Em cada sequência de análise de amostras, incluíam-se duplicados de determinadas amostras, Padrões de Verificação 1 e 5 e Material de Referência Externo (MRE).

Capítulo 3

Discussão e Resultados

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para a análise de 9 analitos, os ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico, láctico, glucónico, fórmico, acético e o ião sulfato em vinhos pelo método de eletroforese capilar (EC), bem como a validação do método, fazendo-se referência aos parâmetros de desempenho aplicados.

Será também avaliado o desempenho do método recorrendo a amostras utilizadas em circuitos interlaboratoriais, amostras de vinhos de diferentes matrizes e vinagres por comparação dos resultados obtidos pelo método com os obtidos com um método implementado e validado pelo IVDP, I.P. para a análise dos ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico, láctico, glucónico e ião sulfato.

3.1 Validação do método

A validação de um método analítico é fundamental para implementar um sistema de controlo de qualidade num laboratório analítico.

A exigência na obtenção de resultados analíticos fidedignos tem aumentado, verificando-se a necessidade crescente de se adquirir dados analíticos comparáveis, rastreáveis e fiáveis e que possuam exatidão e precisão adequadas à finalidade em questão⁶¹.

Para a obtenção de dados confiáveis, primeiramente, é necessário proceder à validação do método analítico a ser utilizado. Para tal, os laboratórios devem dispor de meios e critérios objetivos, para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados satisfatórios⁶².

A validação de um método analítico consiste num processo pelo qual é estabelecido, no laboratório em estudo, que as características de desempenho do método atendem aos requisitos das aplicações analíticas pretendidas⁶³.

Para tal avaliação, é necessário recorrer ao estudo dos parâmetros de desempenho do método. No presente trabalho foram estudados os seguintes parâmetros: Curva de calibração (e linearidade), sensibilidade, Gama de trabalho, Limite de deteção e Limite de quantificação, Repetibilidade e Precisão Intermédia. Foram ainda realizados ensaios de recuperação e ensaios interlaboratoriais, foram utilizados materiais de referência externos (MRE), e os resultados obtidos por este método foram comparados com os resultados de um método validado habitualmente utilizado no IVDP. Foram ainda realizados ensaios em duplicado com amostras de vinho com diferentes características. Cada um destes parâmetros será definido posteriormente e os respetivos resultados apresentados e discutidos.

3.1.1. Curva de Calibração-linearidade

A calibração, constitui um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração de substância conhecida, através de uma curva de calibração⁶².

Neste processo, as soluções padrão de calibração são medidas em determinado equipamento analítico, sob as mesmas condições das amostras a analisar.

Foram construídas as curvas de calibração para os analitos em estudo, para isso foram utilizadas cinco soluções padrão contendo na sua composição os 9 analitos em estudo, às quais se adicionou um volume rigorosamente conhecido de padrão interno. Para todas as soluções padrão foram feitas 5 injeções, e na mesma sequência de análise incluíram-se os padrões de verificação e o MRE, sendo que para estes últimos eram feitas 2 injeções.

Através dos eletroferogramas obtidos foram determinadas as áreas correspondentes aos picos dos 8 ácidos e do íão sulfato. Os analitos presentes nas amostras foram identificados por comparação do seu tempo de retenção com o das correspondentes soluções padrão. Na figura 3.1. apresenta-se um eletroferograma obtido para a análise de uma solução padrão de ácido tartárico, málico e cítrico, íão sulfato e padrão interno (octanoato de sódio). Na figura pode-se ver os picos correspondentes aos 4 analitos assim como o pico correspondente ao padrão interno. Representaram-se graficamente as razões das áreas dos analitos pela área do padrão interno em função das razões das respectivas concentrações e calcularam-se as correspondentes regressões lineares. As retas são calculadas pelo *software* do equipamento e são do tipo de equação seguinte:

$$\frac{A_i}{A_p} = m \frac{C_i}{C_p} + b \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

A_i – área do pico do analito a quantificar

A_p – área do pico do padrão interno

C_i – concentração do analito

C_p – concentração de padrão interno

m – declive da reta de calibração

b - ordenada na origem da reta de calibração

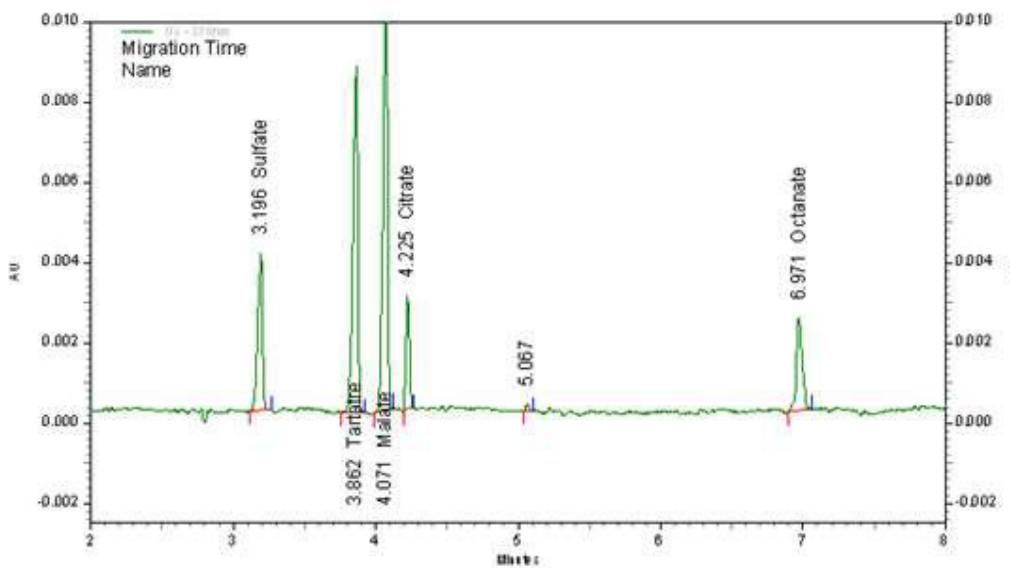


Figura 3.1. Eletroferograma obtido por análise de soluções padrão de ácido tartárico, málico e cítrico e íão sulfato.

Foram construídas três curvas de calibração com diferentes conjuntos de analitos, visto que se a calibração fosse realizada incluindo todos os analitos, poderia ocorrer desdobramento de alguns picos. Foi construída uma curva de calibração com quatro analitos, os ácidos tartárico, málico, cítrico e íão sulfato (curva de calibração A), uma outra curva também com os ácidos fórmico, succínico, láctico e glucônico (curva de calibração B) e a última curva foi construída com apenas um analito, o ácido acético (curva de calibração C).

Durante o presente trabalho realizaram-se várias calibrações para todos os analitos. Assim, seguidamente serão apresentados três exemplos das três curvas de calibração efetuadas, sendo que se apresentam as curvas de calibração A e B em dois gráficos para facilitar a visualização.

As curvas de calibração obtidas para os nove compostos estão apresentadas na figura 3.2.

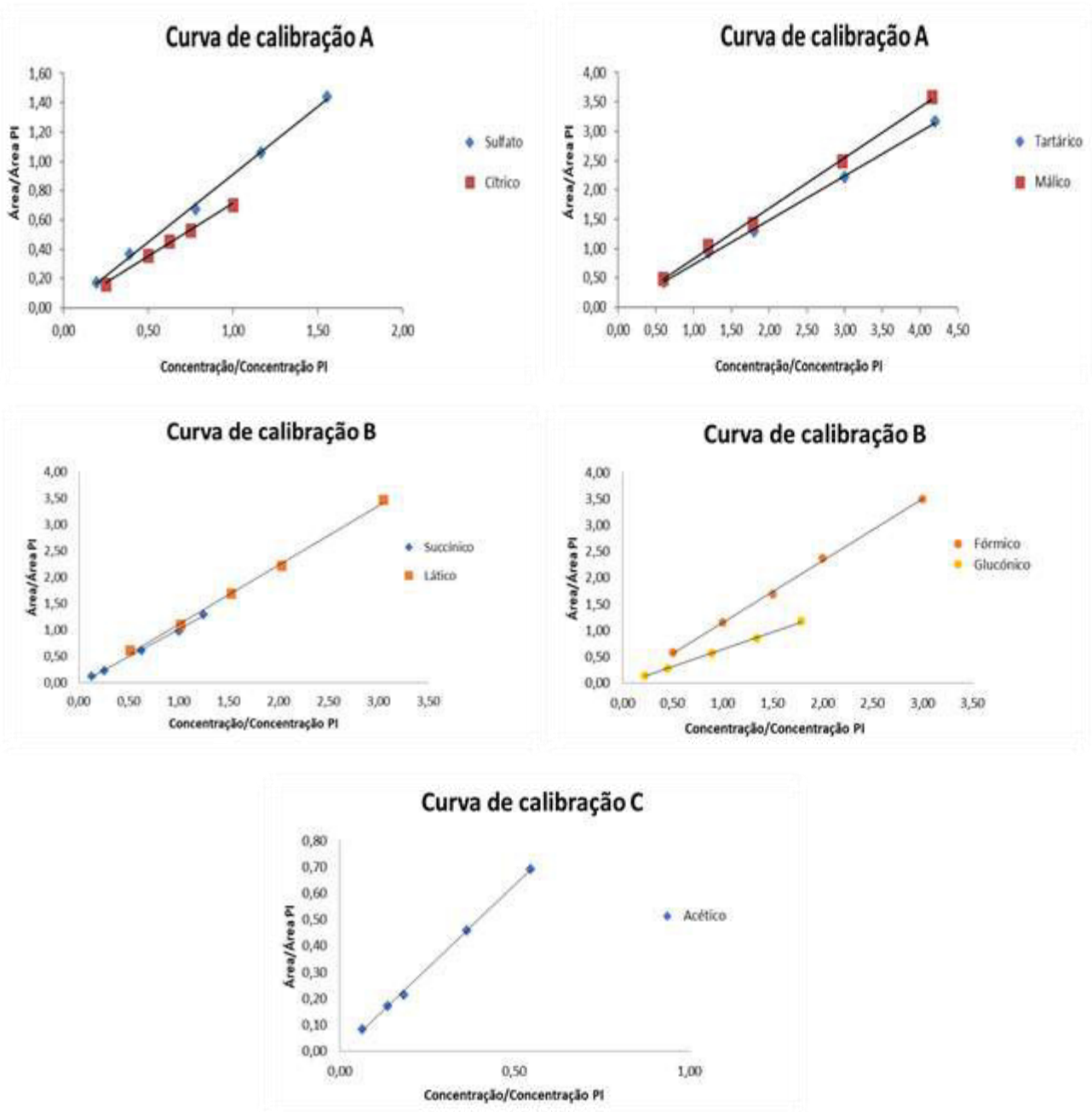


Figura 3.2. Curvas de calibração da razão da área dos analitos/área do padrão interno em função da razão da concentração dos analitos/concentração do padrão interno para os nove ácidos orgânicos e o íão sulfato. Curva A- Ácidos tartárico, málico, cítrico e íão sulfato. Curva B- Ácidos fórmico, succínico, láctico e glucónico. Curva C- Ácido acético.

As equações das retas de calibração obtidas, bem como o coeficiente de determinação (r^2) de cada uma das retas encontram-se apresentadas na tabela 3.1.

As equações das retas obtidas são do tipo da equação 6 anteriormente apresentada.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

De forma a avaliar a qualidade das retas obtidas para os diferentes analitos, foi calculada a incerteza associada ao declive, a incerteza associada à ordenada na origem assim como o desvio padrão relativo do declive, cujos resultados se apresentam na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a determinação de cada um dos analitos por EC, os valores de incerteza são apresentados para um nível de confiança de 95%.

	Analito	Equação da reta de calibração	r	S _b (%)
	lão sulfato	$A_i/A_o = (0,925 \pm 0,070) C_i/C_o - (0,010 \pm 0,067)$	0,9991	2,4
A	Ácido tartárico	$A_i/A_o = (0,752 \pm 0,044) C_i/C_o - (0,02 \pm 0,11)$	0,9995	1,9
	Ácido málico	$A_i/A_o = (0,862 \pm 0,070) C_i/C_o - (0,03 \pm 0,17)$	0,9990	2,6
	Ácido cítrico	$A_i/A_o = (0,722 \pm 0,070) C_i/C_o - (0,008 \pm 0,047)$	0,998	3,0
	Ácido fórmico	$A_i/A_o = (1,174 \pm 0,064) C_i/C_o - (0,02 \pm 0,11)$	0,9996	1,7
B	Ácido succínico	$A_i/A_o = (1,031 \pm 0,095) C_i/C_o - (0,021 \pm 0,076)$	0,998	2,9
	Ácido láctico	$A_i/A_o = (1,127 \pm 0,086) C_i/C_o - (0,01 \pm 0,16)$	0,9991	2,4
	Ácido glucónico	$A_i/A_o = (0,659 \pm 0,038) C_i/C_o - (0,015 \pm 0,041)$	0,9995	1,8
C	Ácido acético	$A_i/A_o = (1,270 \pm 0,067) C_i/C_o - (0,004 \pm 0,021)$	0,9996	1,7

De acordo com a tabela 3.1 verifica-se que os resultados são satisfatórios, tendo em conta que os valores de coeficiente de correlação são muito próximos de 1 e superiores a 0,995, valor aconselhado pelo Guia Relacre 13 ⁶³.

Considerando a incerteza calculada para a ordenada na origem, verifica-se que é superior ao respetivo valor de ordenada na origem, ou seja, o intervalo de confiança inclui o ponto (0;0) para todos os compostos.

Verifica-se que os valores obtidos para o desvio padrão relativo do declive das curvas de calibração, são satisfatórios dado que todos são inferiores a 3%.

Linearidade

A linearidade de um método analítico é definida como a sua capacidade para obter resultados diretamente proporcionais à concentração de analito ⁶⁴.

Para este método, a linearidade foi avaliada por visualização dos gráficos obtidos e através dos coeficientes de correlação de cada gráfico.

Verifica-se que as curvas de calibração de todos os compostos apresentam linearidade na gama de trabalho estudada, tendo em conta que todos os valores de coeficiente de correlação foram superiores a 0,998.

Para avaliar se a correlação (r) obtida é significativa, realizou-se também um teste de

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

significância (teste t). Tendo como hipótese nula $H_0: r = 0$, ou seja, não há correlação, determinou-se o valor de t pela expressão apresentada de seguida, para n-2 graus de liberdade:

$$t = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{Equação 7}$$

Os resultados obtidos para o teste de t são apresentados na tabela 3.2, assim como o valor de t tabelado, para um nível de significância de 0,05.

Tabela 3.2. Valores do coeficiente de correlação (r), $t_{\text{calculado}}$ e t_{tabelado} para o teste de significância de avaliação da correlação (equação 8).

Analito	r	t calculado	t tabelado (95%)
Ião sulfato	0,9991	41,663	
Ácido tartárico	0,9995	52,285	
Ácido málico	0,9990	39,577	
Ácido cítrico	0,998	32,913	
Ácido fórmico	0,9996	59,742	2,069
Ácido succínico	0,998	33,909	
Ácido láctico	0,9991	41,532	
Ácido glucónico	0,9995	54,879	
Ácido acético	0,9996	60,395	

Como todos os valores de t calculados são superiores ao valor de t tabelado, rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que existe correlação entre a razão das áreas e a razão das concentrações para todos os compostos.

3.1.2. Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Este parâmetro é definido como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração ⁶².

Sendo que apenas temos equações de primeiro grau, a sensibilidade corresponde ao

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

declive da reta de calibração. Na tabela 3.3. apresentam-se os valores de sensibilidade do método para a análise dos diferentes analitos.

Tabela 3.3. Valores de sensibilidade do método para a análise dos diferentes analitos por EC.

Analito	Sensibilidade
Ácido tartárico	0,752
Ácido málico	0,862
Ácido cítrico	0,722
lão sulfato	0,925
Ácido fórmico	1,174
Ácido succínico	1,031
Ácido láctico	1,127
Ácido glucónico	0,659
Ácido acético	1,270

Através dos valores apresentados na tabela 3.3., verifica-se que o método é mais sensível para a análise de determinados analitos, destacando-se o ácido acético, o ácido fórmico, o ácido láctico e ainda, com um valor ligeiramente mais reduzido, o ácido succínico, sendo que o ácido glucónico é o analito para o qual o método apresenta menor sensibilidade.

3.1.3. Gama de trabalho

A gama de trabalho escolhida foi baseada no histórico de valores obtidos pelo laboratório do IVDP.

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias (teste F) ⁶³.

Para tal, utiliza-se o primeiro e o último padrão, que são analisados em 10 réplicas independentes. Na tabela 3.4. são apresentados os valores obtidos para a análise do primeiro e último padrão em termos de média, desvio padrão (s) e variância (s²).

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Tabela 3.4. Valores dos parâmetros média, desvio padrão (s) e variância (s²) obtidos para o primeiro (P1V) e último padrão (P5V) na avaliação da gama de trabalho, assim como a variação permitida para a concentração (± 10 %).

Amostra	Sulfato	Tartárico	Málico	Cítrico	Succínico	Acético	Lático	Glucónico	Fórmico	
P1V	Média (mg/L)	3,54	12,06	12,32	4,34	2,60	3,91	10,00	4,59	7,04
	s (mg/L)	0,27	0,49	0,35	0,31	0,14	0,094	0,19	0,22	0,17
	S ² (mg/L) ²	0,072	0,238	0,120	0,097	0,019	0,0088	0,035	0,050	0,029
	P1V+10% (mg/L)	3,89	13,27	13,55	4,77	2,86	4,30	11,00	5,05	7,74
	P1V-10% (mg/L)	3,19	10,85	11,09	3,91	2,34	3,52	9,00	4,13	6,34
P5V	Média	33,5	86,3	86,2	19,19	22,85	35,49	58,1	32,94	36,29
	s (mg/L)	1,0	1,9	1,8	0,51	0,68	0,51	1,3	0,69	0,64
	S ² (mg/L) ²	1,10	3,46	3,41	0,264	0,466	0,260	1,80	0,472	0,406
	P5V+10% (mg/L)	36,8	94,9	94,8	21,11	25,13	39,04	63,9	36,23	39,92
	P5V-10% (mg/L)	30,1	77,7	77,9	17,27	20,56	31,94	52,3	29,65	32,66

Recorrendo às ferramentas de Excel realizou-se o teste de homogeneidade das variâncias. Este teste permite avaliar a gama de trabalho e consiste em testar as variâncias para examinar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho efetuando o cálculo do valor de PG, que se apresenta na equação 8 e 9, sendo que a equação 8 se aplica quando $S_{10}^2 > S_1^2$ e a equação 9 se aplica quando $S_1^2 > S_{10}^2$.

Compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher, para n-1 graus de liberdade.

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad \text{Equação 8}$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad \text{Equação 9}$$

Na tabela 3.5. apresentam-se dois analitos para os quais se realizou o teste F, através dos quais se verifica se a gama de trabalho utilizada para cada analito está ajustada. Os resultados para os restantes analitos encontram-se apresentados nos Anexos.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Tabela 3.5. Valores de parâmetros para o cálculo do teste de homogeneidade de variâncias para o ácido cítrico e para o ácido fórmico.

Cítrico			Fórmico		
	Cítrico (mg/l)	Cítrico (mg/l)		Fórmico (mg/l)	Fórmico (mg/l)
Média	19,1864	4,3359	Média	36,2874	7,0368
Variância	0,2636	0,09713	Variância	0,4062	0,0294
Observações	10	10	Observações	10	10
gl	9	9	gl	9	9
PG	2,714		PG	13,801	
P(F<=f) uni-caudal	0,0765		P(F<=f) uni-caudal	0,000294	
F crítico uni-caudal	3,179		F crítico uni-caudal	3,179	

Nota: gl- graus de Liberdade, F- razão das variâncias, F crítico- valor tabelado da distribuição F de Fisher

Pela análise dos exemplos apresentados verifica-se que para o ácido cítrico, o valor de PG para a razão das variâncias é menor que o valor de F tabelado (para n-1 graus de liberdade), logo as variâncias não diferem significativamente e a gama de trabalho está bem ajustada. No entanto, para o ácido fórmico a razão das variâncias é superior ao valor de F tabelado, o que indica que as variâncias (a variância do padrão 5 é superior à do padrão 1) e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a razão entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão tenha um valor inferior ao valor de F tabelado.

Na tabela 3.6. são apresentadas as conclusões dos resultados do teste F relativamente ao ajuste da gama de trabalho para todos os analitos.

Tabela 3.6. Avaliação do ajuste da gama de trabalho com base nos resultados do teste de homogeneidade de variâncias (teste F).

Analito	Gama de trabalho
Ião Sulfato	Não ajustada
Ácido tartárico	Não ajustada
Ácido málico	Não ajustada
Ácido cítrico	Ajustada
Ácido fórmico	Não ajustada
Ácido succínico	Não ajustada
Ácido láctico	Não ajustada
Ácido glucónico	Ajustada
Ácido acético	Não ajustada

Verifica-se que a gama de trabalho, por este teste, apenas se encontra ajustada para os ácidos cítrico e glucónico, sendo que para os restantes ácidos e para o ião sulfato a gama de trabalho deveria ser reduzida.

O laboratório impõe que a variação da concentração do analito das 10 injeções seja menor que 10% nos padrões extremos da curva de calibração. Analisando os dados da tabela 3.4 observa-se que este critério é verificado para todos os analitos, assim conclui-se que a gama de trabalho é adequada para todos os analitos.

Durante o presente trabalho, as gamas de trabalho de todos os analitos não sofreram alterações, tendo em conta que são analisadas, no laboratório do IVDP, uma vasta gama de matrizes de vinho, pelo que a concentrações dos ácidos mencionados variam bastante e, deste modo, as gamas de trabalho podem abranger uma maior variedade de amostras em análise.

3.1.5. Limiares analíticos do método de ensaio: Limites de deteção e de quantificação

O limite de deteção (Ldd) corresponde ao teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável, mas não necessariamente quantificada como um valor exato ^{61,62}.

Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito a medir, apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, que a sua concentração será inferior a um certo valor.

O limite de quantificação (Ldq) corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma dada precisão e exatidão.

Estes parâmetros foram estimados a partir dos parâmetros das retas de calibração dos analitos em estudo com recurso às equações 10 e 11:

$$Ldd = \frac{3,3S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 10}$$

$$Ldq = \frac{10S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 11}$$

Em que, $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e b ao declive da reta.

Os valores obtidos foram convertidos tendo em conta a concentração do padrão interno.

Os valores de limite de deteção e quantificação obtidos para as três curvas de calibração apresentadas anteriormente, encontram-se descritos na tabela 3.7.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Tabela 3.7. Limites de deteção e quantificação estimados a partir das retas de calibração traçadas, para cada analito.

Analito	Limite de deteção (mg/L)	Limite de quantificação (mg/L)
Ião Sulfato	2,1	6,5
Ácido tartárico	3,6	11
Ácido málico	4,7	14
Ácido cítrico	1,4	4,2
Ácido fórmico	2,1	6,4
Ácido succínico	1,8	5,6
Ácido láctico	3,1	9,4
Ácido glucónico	1,3	4,0
Ácido acético	0,42	1,3

Obtiveram-se limites de deteção relativamente baixos, destacando-se o ácido acético, que apresenta o valor mais baixo de Ldd, seguidamente dos ácidos glucónico e cítrico. O mesmo acontece para os limites de quantificação, em que esses mesmos ácidos apresentaram os valores mais baixos.

Contrariamente, para os ácidos málico e tartárico obtiveram-se os valores de Ldd e Ldq mais elevados.

Verifica-se também que em determinados ácidos, como o ácido málico, succínico e ião sulfato, os valores de Ldq são superiores ao respetivo valor do Padrão 1, padrão de menor concentração. Para poder contornar esse facto, poderia-se assumir o valor de limite de quantificação como o padrão de menor valor de concentração para a gama de trabalho dos ácidos referidos.

3.1.6. Precisão

A precisão de um método analítico permite avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. No presente trabalho o estudo da precisão do método foi avaliado em condições de repetibilidade e de precisão intermédia com padrões e amostras de vinhos e vinagre.

3.1.6.1. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, tão estáveis quanto o possível, sobre uma mesma amostra.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Para avaliar a repetibilidade do método, analisaram-se as soluções padrão de verificação 1 e 5, contendo todos os analitos, e analisaram-se amostras de vinhos de diferentes matrizes e vinagres, sob condições de repetibilidade. Foram realizadas 10 réplicas independentes.

Com base no valor médio das concentrações e respetivo desvio padrão, determinaram-se o limite de repetibilidade (r) e o coeficiente de variação de repetibilidade (CVR), cujas equações são apresentadas a seguir:

$$r = 2,8 \times Sr \quad \text{Equação 12}$$

$$CVR = \frac{Sr}{\bar{x}} * 100 \quad \text{Equação 13}$$

Sendo Sr o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerado e \bar{x} o valor médio das concentrações.

Na tabela 3.8. apresentam-se os resultados de repetibilidade para os padrões de verificação 1 e 5.

Tabela 3.8. Resultados do estudo de repetibilidade, desvio padrão de repetibilidade (s_r), limite de repetibilidade (r) e coeficiente de variação de repetibilidade para os padrões de verificação 1 (P1V) e 5 (P5V).

	Analito	Média de concentração (mg/L)	s_r (mg/L)	r (mg/L)	CVR (%)
P1V	lão sulfato	3,54	0,27	0,75	7,6
	Ácido tartárico	12,06	0,49	1,37	4,0
	Ácido málico	12,32	0,35	0,97	2,8
	Ácido cítrico	4,34	0,31	0,87	7,2
	Ácido succínico	2,60	0,14	0,39	5,3
	Ácido acético	3,913	0,094	0,26	2,4
	Ácido láctico	10,00	0,19	0,52	1,9
	Ácido glucónico	4,59	0,22	0,63	4,9
	Ácido fórmico	7,04	0,17	0,48	2,4
P5V	lão sulfato	33,5	1,1	2,94	3,1
	Ácido tartárico	86,3	1,9	5,21	2,2
	Ácido málico	86,2	1,8	5,17	2,1
	Ácido cítrico	19,19	0,51	1,44	2,7
	Ácido succínico	22,85	0,68	1,91	3,0
	Ácido acético	35,49	0,51	1,43	1,4
	Ácido láctico	58,1	1,3	3,76	2,3
	Ácido glucónico	32,94	0,69	1,92	2,1
	Ácido fórmico	36,29	0,64	1,78	1,8

Verifica-se que para o padrão de verificação 1, obtiveram-se valores de coeficiente de

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

variação um pouco mais elevados comparando com os valores obtidos para o padrão de verificação 5, para todos os analitos. Para o padrão de verificação 1, os valores de CVr para o ácido cítrico e ião sulfato apresentam os valores mais elevados. Contudo, pode-se concluir que os resultados de repetibilidade dos padrões de verificação 1 e 5 são satisfatórios, visto que todos os valores de CVr apresentados são inferiores a 11%, valor estabelecido pela *AOAC International*⁶⁵.

Para o estudo da repetibilidade, foram também analisadas uma amostra de vinagre e amostras de vinhos de diferentes matrizes, nomeadamente vinhos tranquilos, vinho aromatizado, vinho licoroso (mais de 40 anos) e Colheita 1900, cujos resultados são apresentados na tabela 3.9. Os valores apresentados já estão convertidos para a diluição efetuada às amostras.

Com a mesma finalidade, foram também analisadas amostras de matrizes como vinho tinto e rosado do Douro, vinho do Porto Rosé, entre outras, e os resultados obtidos são apresentados nos Anexos.

Nos resultados obtidos, foi aplicado o teste de Grubbs para a eliminação de valores aberrantes.

Tabela 3.9. Resultados do estudo de repetibilidade, desvio padrão de repetibilidade (s_r), limite de repetibilidade (r) e coeficiente de variação de repetibilidade para as amostras analisadas (CVr).

Ião sulfato					
Matriz	Média (g/L)	s_r (g/L)	r (g/L)	CVr (%)	
Vinho Branco-Tranquilo	0,184	0,010	0,03	5,7	<Ldq (Ldq=0,33 g/L)
Vinho aromatizado	0,499	0,028	0,08	5,6	
Vinho Licoroso (+40anos)	0,504	0,052	0,15	10	
Vinho Licoroso- Colheita 1900	1,033	0,046	0,13	4,4	
Vinagre	0,442	0,031	0,09	7,1	
Ácido tartárico					
Vinho Branco-Tranquilo	1,719	0,038	0,11	2,2	
Vinho aromatizado	1,012	0,032	0,090	3,2	
Vinho Licoroso (+40anos)	0,733	0,034	0,094	4,6	
Vinho Licoroso- Colheita 1900	1,080	0,050	0,14	4,6	

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Vinagre	1,203	0,051	0,14	4,3	
Ácido málico					
Vinho Branco-Tranquilo	2,415	0,026	0,071	1,1	
Vinho aromatizado	0,452	0,015	0,042	3,3	<Ldq (Ldq=0,72 g/L)
Vinho Licoroso (+40anos)	1,125	0,038	0,106	3,4	
Vinho Licoroso- Colheita 1900	1,391	0,041	0,116	3,0	
Vinagre	0,648	0,023	0,065	3,6	<Ldq (Ldq=0,72 g/L)
Ácido cítrico					
Vinho Branco-Tranquilo	0,210	0,011	0,031	5,3	
Vinho aromatizado	0,401	0,025	0,071	6,3	
Vinho Licoroso (+40anos)	0,313	0,021	0,057	6,6	
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,445	0,066	0,184	15	
Vinagre	0,142	0,016	0,044	11	<Ldq (Ldq= 0, 20 g/L)
Ácido fórmico					
Vinho Branco-Tranquilo	0,050	0,026	0,072	51	<Ldq (Ldq=0,32 g/L)
Vinho aromatizado	0,060	0,005	0,013	8,0	<Ldq (Ldq=0,32 g/L)
Vinho Licoroso (+40anos)	0,332	0,014	0,039	4,2	
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,400	0,020	0,057	5,1	
Vinagre	0,177	0,013	0,036	7,1	<Ldq (Ldq=0,32 g/L)
Ácido succínico					
Vinho Branco-Tranquilo	0,38	0,011	0,032	3,0	
Vinho aromatizado	0,365	0,022	0,062	6,0	

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Vinho Licoroso (+40anos)	0,387	0,031	0,086	8,0	
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,39	0,10	0,28	26	
Vinagre	0,461	0,024	0,067	5,2	
Ácido láctico					
Vinho Branco-Tranquilo	0,1343	0,0092	0,026	6,9	<Ldq (Ldq=0,47 g/L)
Vinho aromatizado	0,448	0,011	0,030	2,4	<Ldq (Ldq=0,47 g/L)
Vinho Licoroso (+40anos)	0,825	0,024	0,068	2,9	
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,781	0,035	0,099	4,5	
Vinagre	1,434	0,053	0,15	3,7	
Ácido glucónico					
Vinho Branco-Tranquilo	0,150	0,018	0,049	12	<Ldq (Ldq=0,20 g/L)
Vinho aromatizado	2,466	0,080	0,22	3,2	
Vinho Licoroso (+40anos)	0,917	0,046	0,13	5,0	
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,83	0,086	0,24	10	
Vinagre	0,36	0,052	0,15	15	
Ácido acético					
Vinho Branco-Tranquilo	0,190	0,0089	0,025	4,7	
Vinho aromatizado	0,270	0,012	0,033	4,3	
Vinho Licoroso (+40anos)	0,792	0,028	0,078	3,5	
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,672	0,028	0,079	4,2	
Vinagre	10,92	0,212	0,60	2,0	

Analisando os valores dos coeficientes de variação verifica-se que praticamente todos podem ser considerados satisfatórios pois são menores ou relativamente próximos de 11% (valor estabelecido pela *AOAC International*). Verifica-se que foram obtidos valores superiores de

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

coeficientes de variação para os ácidos fórmico e succínico em determinadas amostras.

O valor de coeficiente de variação para a análise do ácido fórmico na matriz de vinho branco-Tranquilo (51%) é mais elevado que em todas as restantes matrizes, o que pode ser explicado pelo facto do valor de concentração obtido ser muito inferior ao limite de quantificação do método (considerando a diluição realizada para a análise do vinho). Verifica-se o mesmo para o valor do CVr para o ácido succínico na matriz Vinho licoroso- Colheita 1900, no entanto este apresenta um valor inferior.

Este facto pode estar diretamente relacionado com a dificuldade de integração dos picos nos eletroferogramas destas matrizes, associada a picos pouco resolvidos, principalmente para o ácido fórmico.

Comparando os resultados obtidos para os coeficientes de variação de repetibilidade dos padrões de verificação 1 e 5, com os valores de coeficientes de variação de repetibilidade das amostras verifica-se que estes últimos são consideravelmente superiores, o que é espectável devido à complexidade das matrizes das amostras comparativamente à dos padrões.

Na tabela 3.10. apresentam-se os valores de limite de repetibilidade de cada analito e os respetivos coeficientes de variação (CVr), calculados pelas médias dos valores de r de todas as amostras analisadas para o estudo de repetibilidade e dos correspondentes coeficientes de variação (CV).

Tabela 3.10. Valores de limite de repetibilidade (r) coeficientes de variação médios (CVr) para cada analito (de modo semelhante à tabela anterior).

Analito	r (g/L)	CVr (%)
Ião sulfato	0,069	7,7
Ácido tartárico	0,15	3,8
Ácido málico	0,12	3,9
Ácido cítrico	0,090	8,4
Ácido fórmico	0,048	4,6
Ácido succínico	0,083	7,1
Ácido láctico	0,10	3,4
Ácido glucónico	0,15	8,2
Ácido acético	0,10	3,3

Pode-se verificar que o limite de repetibilidade para a análise do ácido fórmico é inferior ao de todos os outros analitos, contrariamente aos ácidos tartárico e glucónico que apresentaram valores de limite de repetibilidade superiores aos dos restantes analitos.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Relativamente aos valores de coeficiente de variação, o ácido acético apresenta o valor mais reduzido, enquanto que ácido cítrico apresenta o valor mais elevado de coeficiente de variação de todos os analitos, podendo estar associado com o facto do pico do ácido cítrico estar mal resolvido.

3.1.6.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia corresponde à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar, tais como diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes épocas e com ou sem verificação da calibração. Esta medida de precisão é considerada como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e como tal, a mais aconselhável para avaliar a precisão ⁶².

Para este estudo foram analisadas uma amostra de vinagre de vinho do Porto e amostras de vinho em diferentes matrizes, efetuando-se 12 a 14 ensaios sobre as mesmas, dependendo da amostra, durante um período de tempo alargado, com o mesmo método, o mesmo equipamento e o mesmo analista. Aos resultados obtidos, foi aplicado o teste de Grubbs para a eliminação de valores aberrantes.

Os resultados obtidos para o estudo de precisão intermédia para as diferentes matrizes, algumas comuns às apresentadas no estudo de repetibilidade, encontram-se na tabela 3.11. Os resultados das restantes amostras analisadas encontram-se nos Anexos. O limite de precisão intermédia (L_{pi}) apresentado na tabela foi calculado a partir da equação 12, apresentada no presente capítulo, utilizando o desvio padrão de precisão intermédia (s_{pi}), calculado a partir os valores de concentração obtidos para cada matriz.

Tabela 3.11. Resultados do estudo de precisão intermédia, desvio padrão de precisão intermédia (s_{pi}), limite de precisão intermédia (L_{pi}) e coeficiente de variação para as amostras analisadas (CV_{pi}).

Ião sulfato				
Tipo de vinho	Média (g/L)	S_{pi} (g/L)	(L_{pi}) (g/L)	CV_{pi} (%)
Vinho Branco-Colheita Tardia	0,554	0,045	0,12	8,1
Vinho aromatizado	0,459	0,035	0,098	7,7
Vinho Licoroso	0,535	0,051	0,14	9,5

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

(+40anos)				
Vinho Licoroso- Colheita 1900	1,022	0,084	0,24	8,3
Vinagre	0,479	0,034	0,096	7,2
Ácido tartárico				
Vinho Branco-Colheita Tardia	1,30	0,10	0,28	7,8
Vinho aromatizado	0,969	0,047	0,13	4,8
Vinho Licoroso (+40anos)	0,713	0,062	0,17	8,3
Vinho Licoroso- Colheita 1900	1,100	0,080	0,22	7,3
Vinagre	1,164	0,037	0,10	3,2
Ácido málico				
Vinho Branco-Colheita Tardia	1,14	0,18	0,49	15
Vinho aromatizado	0,433	0,029	0,081	6,7
Vinho Licoroso (+40anos)	1,111	0,097	0,27	8,8
Vinho Licoroso- Colheita 1900	1,45	0,14	0,38	9,4
Vinagre	0,606	0,031	0,087	5,1
Ácido cítrico				
Vinho Branco-Colheita Tardia	0,653	0,090	0,25	14
Vinho aromatizado	0,354	0,061	0,17	17
Vinho Licoroso (+40anos)	0,265	0,047	0,13	18
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,349	0,032	0,086	8,8
Vinagre	0,141	0,014	0,039	9,9
Ácido fórmico				
Vinho Branco-Colheita Tardia	0,076	0,011	0,032	15
Vinho aromatizado	0,069*	0,015	0,041	21
Vinho Licoroso	0,338	0,038	0,11	11

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

(+40anos)				
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,441	0,061	0,17	14
Vinagre	0,172	0,014	0,040	8,2
Ácido succínico				
Vinho Branco-Colheita Tardia	0,887	0,062	0,17	7,0
Vinho aromatizado	0,393	0,016	0,043	4,0
Vinho Licoroso (+40anos)	0,392	0,049	0,14	12
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,511	0,055	0,16	10
Vinagre	0,446	0,020	0,055	4,4
Ácido láctico				
Vinho Branco-Colheita Tardia	0,109*	0,030	0,083	27,3
Vinho aromatizado	0,445	0,033	0,091	7,3
Vinho Licoroso (+40anos)	0,697	0,049	0,14	7,0
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,782	0,046	0,13	5,9
Vinagre	1,23	0,13	0,36	10,3
Ácido glucónico				
Vinho Branco-Colheita Tardia	4,2	1,1	3,1	26
Vinho aromatizado	1,82	0,49	1,4	27
Vinho Licoroso (+40anos)	0,71	0,16	0,44	22
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,60	0,14	0,40	24
Vinagre	0,341	0,059	0,16	17
Ácido acético				
Vinho Branco-Colheita Tardia	1,90	0,12	0,34	6,5
Vinho aromatizado	0,286	0,032	0,091	11
Vinho Licoroso (+40anos)	0,776	0,058	0,16	7,5
Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,738	0,098	0,27	13
Vinagre**	-	-	-	-

* Valor inferior ao limite de quantificação

**Não quantificado; Amostras: Vinho aromatizado e Vinagre- 12 ensaios realizados; Amostras: Vinho Branco-Colheita Tardia, Vinho Licoroso (+40anos) e Vinho Licoroso-Colheita 1900- 14 ensaios realizados.

Verifica-se que os valores de coeficiente de variação de precisão intermédia das matrizes de Vinho branco- Colheita tardia, Vinho licoroso (+40 anos) e Vinho licoroso-Colheita 1900 apresentam os valores mais elevados, no geral, para todos os analitos comparativamente às restantes matrizes. Relativamente a estas duas últimas matrizes referidas, tal facto pode estar

relacionado com a complexidade das amostras.

Verifica-se também que, em termos de analito, a análise do ácido glucónico é o que apresenta maiores valores de coeficiente de variação para as matrizes analisadas, que pode estar associado à dificuldade na integração do pico em algumas amostras.

Contudo, no geral, em condições de precisão intermédia o método é preciso.

Realizou-se o estudo de precisão intermédia para o material de referência externo (MRE) utilizado neste trabalho, em 14 dias. Os resultados obtidos de precisão intermédia do MRE encontram-se na tabela 3.12, em que o valor de limite de precisão intermédia (Lpi) foi calculado pela equação 3 deste capítulo.

Tabela 3.12. Parâmetros determinados no estudo de precisão intermedia do MRE.

	Sulfato	Tartárico	Málico	Cítrico	Succínico	Acético	Lático	Glucónico
Média (g/L)	0,246	1,659	1,106	0,462	0,313	0,507	0,238	0,261
Desvio padrão	0,021	0,098	0,054	0,028	0,020	0,040	0,037	0,0126
Lpi	0,058	0,27	0,15	0,078	0,057	0,11	0,10	0,035
CV (%)	8,5	5,9	4,9	6,0	6,5	7,8	16	4,8

Verifica-se que ácido glucónico apresentou o valor de limite de precisão intermédia (Lpi) mais baixo de todos analitos, assim como o respetivo valor de CV (%), contrariamente ao verificado no estudo de precisão intermédia das amostras, em que o ácido glucónico apresentou o valor de CV mais elevado de todos os analitos.

O ácido láctico foi o analito que obteve um valor de CV mais elevado, sendo que todos os outros analitos apresentam um valor inferior a 9%.

3.1.7. Ensaio de Recuperação

Os ensaios de recuperação permitem avaliar o efeito de matriz, uma possível fonte de erro neste tipo de análises. Para tal, utiliza-se uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração dos analitos adicionados em proporções conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho ⁶².

As percentagens de recuperação para cada analito foram calculadas através da equação 14.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

Em que C_1 corresponde à concentração de analito determinada na amostra fortificada, C_2 corresponde à concentração de analito determinada na amostra e C_3 à concentração da fortificação.

Para avaliar o efeito de matriz analisaram-se várias matrizes de vinho e, para fortificação das amostras, foram utilizados dois níveis de concentração diferentes correspondentes aos padrões (P1V e P5V). Algumas das amostras selecionadas não tinham na sua composição todos os analitos antes da fortificação. Na tabela 3.13 apresentam-se os valores de fortificação, percentagens de recuperação (R%), a média das percentagens de recuperação e incerteza associada, calculada pela equação 15:

$$u_{rec} = \frac{s_{rec}}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 15}$$

Onde s_{rec} corresponde ao desvio padrão dos valores de recuperação obtidos e n é o número de amostras fortificadas.

Os valores de média das percentagens de recuperação e incertezas associadas são apresentadas na tabela 3.13, que correspondem a todos os valores de todas as amostras analisadas para este estudo, não correspondendo apenas às amostras apresentadas na mesma.

Tabela 3.13. Resultados dos ensaios de recuperação, com indicação da fortificação efetuada nas amostras, recuperação (R) e média dos valores de recuperação para as amostras analisadas.

Analito	Matriz	Fortificação (mg/L)	R (%)	Média de R (%)
Íão Sulfato	Vinho efervescente	13,8	92,3	95,7± 5,4
	Vinho licoroso (+40anos)	12,2	110,4	
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	12,2	122,4	
	Vinagre	14,1	97,0	
	Vinho tinto	13,8	108,4	
Ácido tartárico	Vinho efervescente	38,2	97,1	98,9±4,2

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

	Vinho licoroso (+40anos)	33,9	116,1	
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	33,9	114,2	
	Vinagre	39,2	113,1	
	Vinho tinto	38,2	108,1	
	Vinho efervescente	39,7	95,9	
Ácido málico	Vinho licoroso (+40anos)	34,7	117,5	98,6±4,1
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	34,7	117,3	
	Vinagre	40,0	108,8	
	Vinho tinto	39,7	102,6	
	Vinho efervescente	8,5	95,6	
Ácido cítrico	Vinho licoroso (+40anos)	7,9	112,6	99,8±4,3
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	7,9	117,1	
	Vinagre	9,3	108,1	
	Vinho tinto	8,5	106,9	
	Vinho efervescente	17,8	115,4	
Ácido fórmico	Vinho licoroso (+40anos)	17,8	113,0	98,1±5,5
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	15,0	125,5	
	Vinagre	18,5	114,6	
	Vinho tinto	18,3	90,7	
	Vinho efervescente	11,6	104,1	
Ácido succínico	Vinho licoroso (+40anos)	11,6	109,0	96,2±2,8
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	11,9	99,7	
	Vinagre	10,7	111,7	
	Vinho tinto	12,4	98,7	
	Vinho efervescente	28,0	53,8	
Ácido láctico	Vinho licoroso (+40anos)	28,0	54,0	90,6±5,0
	Vinho Licoroso-	29,7	95,1	

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

		Colheita 1900		
Ácido glucónico	Vinagre	27,3	127,1	95,0±6,0
	Vinho tinto	30,6	98,1	
	<hr/>			
	Vinho efervescente	16,9	86,1	
	Vinho licoroso (+40anos)	15,0	121,5	
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	15,0	112,4	
	Vinagre	16,6	106,9	
	Vinho tinto	16,9	107,2	
	<hr/>			
	Vinho efervescente	18,3	91,9	
Ácido acético	Vinho licoroso (+40anos)	15,9	119,3	99,5±3,9
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	15,9	122,2	
	Vinagre	17,2	98,6	
	Vinho tinto	18,3	102,6	
	<hr/>			

As taxas médias de recuperação obtidas encontram-se entre 90 e 100 %. Estes valores são satisfatórios uma vez que se encontram dentro do intervalo 80-110 %, valor recomendado pela *AOAC International*⁶⁵.

Os analitos que apresentaram melhores resultados nos ensaios de recuperação foram os ácidos tartárico, málico, cítrico e acético. Estes resultados podem estar diretamente relacionados com o facto de estes analitos apresentarem picos intensos, no caso dos ácidos tartárico, málico e acético, e bem resolvidos, o que torna mais fácil a sua diferenciação da restante matriz através do eletroferograma.

De modo a avaliar as recuperações de cada matriz, determinou-se as médias de recuperação para cada uma e os valores obtidos estão apresentados na tabela 3.14.

Tabela 3.14. Médias de recuperação para as matrizes apresentadas na tabela anterior.

Matriz	Média de R (%)	s (%)
Vinho efervescente	95	16
Vinho licoroso (+40anos)	108	20
Vinho Licoroso- Colheita 1900	114,0	9,8
Vinagre	109,5	8,4
Vinho tinto	102,6	5,6

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Analisando a tabela 3.14 verifica-se que a matriz de Vinho Licoroso- Colheita 1900 apresentou um valor mais elevado da média da recuperação que as restantes matrizes, encontrando-se apenas esta matriz fora do intervalo estabelecido para a recuperação pela *AOAC International*⁶⁵. Este valor era espectável tendo em conta os valores apresentados anteriormente na tabela 3.13, dado que para a maioria dos analitos, esta matriz apresentou valores de recuperação superiores a 100%.

O Vinho Licoroso (+40 anos) apresentou um valor de média de recuperação satisfatório (está contido no intervalo 80-110%), contudo o respetivo valor de desvio padrão é o mais elevado, o que indica que há grande variação na taxa de recuperação de analito para analito.

Observa-se um comportamento semelhante para o Vinho efervescente, onde a média de recuperação é satisfatória, contudo apresenta um valor de desvio padrão elevado.

Para o Vinagre, o valor de média de recuperação está contido no intervalo 80-100% e é uma das matrizes que apresenta menor valor de desvio padrão.

O Vinho tinto foi a matriz que obteve melhores resultados para os dois parâmetros apresentados, obteve bom resultado de média de recuperação, próximo de 100%, não apresentando grandes variações de recuperação de analito para analito, concluindo-se que para o vinho tinto não se observa efeito de matriz.

3.1.8. Materiais de referência externos (MRE)

A utilização de um material de referência externo (MRE) permite uma avaliação direta do método⁶². No presente trabalho, a análise do MRE permitiu conhecer a sua veracidade do método, definida como sendo a concordância entre a média dos resultados obtidos de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro. Em todas as sequências de trabalho incluía-se uma amostra de MRE com o objetivo de avaliar o desempenho do método e equipamento.

O MRE foi adquirido pelo laboratório do IVDP e os critérios de aceitação são os definidos no certificado que o acompanha, apresentados na tabela 3.15. O MRE adquirido não contém ácido fórmico na sua composição.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Tabela 3.15. Concentração e critérios de aceitação do material de referência externo analisado.

	Sulfato (mg/L) *	Tartárico (g/ L)	Málico (g/ L)	Cítrico (g/L)	Succínico** (g/ L)	Acético (g/ L)	Láctico (g/ L)	Glucónico (g/ L)
Concentração	219	1,7	1,200	0,620	-	0,260	0,200	0,240
Tolerância	65	0,3	0,200	0,050	-	0,040	0,300	0,040

*Valor expresso em SO₄.

**Valor não indicado no certificado.

De forma a avaliar a veracidade dos resultados obtidos da análise do MRE procedeu-se à determinação do Erro relativo e ao Teste de hipótese (Teste t).

Erro Relativo

O erro relativo (Er), permite avaliar a exatidão do método de ensaio e é determinado através da equação 16, expresso em percentagem:

$$Er = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \times 100 \quad \text{Equação 16}$$

Em que X_{lab} corresponde ao valor obtido experimentalmente (ou média aritmética dos valores obtidos) e X_v corresponde ao valor certificado do MRE.

Na tabela 3.16. apresentam-se os valores de erro relativo para cada um dos analitos, em que, para X_{lab} se utilizou a média dos valores obtidos por avaliação da precisão intermédia.

Tabela 3.16. Erro relativo para cada analito determinado por análise do MRE.

	Sulfato	Tartárico	Málico	Cítrico	Acético	Láctico	Glucónico
Er (%)	12,4	2,4	7,8	25,4	94,9	18,8	8,6

Analisando os resultados apresentados na tabela 3.16, verifica-se que o valor de erro relativo para o ácido acético (94,9%) é muito elevado. Este resultado pode dever-se ao facto de este material não ser adequado para a determinação de ácido acético pois poderá ter ocorrido acetificação do material de referência utilizado, visto que quando se iniciou a análise do ácido acético no MRE, este já tinha algum tempo não sendo os resultados semelhantes ao valor de referência.

O valor de erro relativo para o ácido cítrico (25,4%) também é bastante superior aos valores obtidos para os restantes analitos, o que poderá dever-se à dificuldade de integração dos picos.

Teste de hipóteses- Teste t

O teste de hipóteses permite averiguar a existência de erros sistemáticos associados à metodologia praticada. O parâmetro t é determinado pela equação 17:

$$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \cdot \sqrt{N}}{S_{X_{lab}}} \quad \text{Equação 17}$$

Onde N é o número de amostras ensaiadas e $S_{X_{lab}}$ o desvio padrão associado à média dos valores do laboratório (X_{lab}).

Foram determinados os valores do parâmetro t que estão apresentados na tabela 3.17.

Tabela 3.17. Valores de t determinados para análise do teste de hipóteses, para N=14.

	Sulfato	Tartárico	Málico	Cítrico	Acético	Lático	Glucónico
t	4,865	1,577	6,511	21,146	23,273	3,830	6,161

Comparando os valores obtidos de t, para um nível de confiança de 95% com o valor de t tabelado ($t_{tab} = 2,16$) conclui-se que o valor obtido de t para todos os analitos, com exceção do ácido tartárico, é superior ao valor de t_{tab} , ou seja, ficou estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos, concluindo-se que o ensaio não é satisfatório.

O ácido tartárico foi o analito que apresentou melhores resultados, dado que não ficou evidenciada a existência de erros sistemáticos, para um nível de significância de 0,05, pelo teste t, e apresentou um valor de erro relativo mais baixo comparativamente aos restantes analitos.

3.1.9. Comparação entre o método utilizado e o método implementado no IVDP

A comparação de métodos é um parâmetro importante na validação de um método interno de ensaio, consistindo na comparação dos resultados obtidos a partir desse método com os resultados conseguidos através de um método tomado como referência, neste caso o método o método de eletroforese capilar implementado e validado no laboratório do IVDP ⁶³.

Este parâmetro permite avaliar o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao método implementado

no laboratório do IVDP.

Compararam-se os resultados obtidos para a análise de várias amostras para todos os analitos, com a exceção do ácido acético e fórmico, sendo que para a análise dos ácidos succínico, láctico e glucónico realizou-se um menor número de ensaios.

Na figura 3.3. apresenta-se uma representação gráfica dos valores obtidos para o método em estudo em função dos valores obtidos para o método validado no IVDP, para as mesmas amostras.

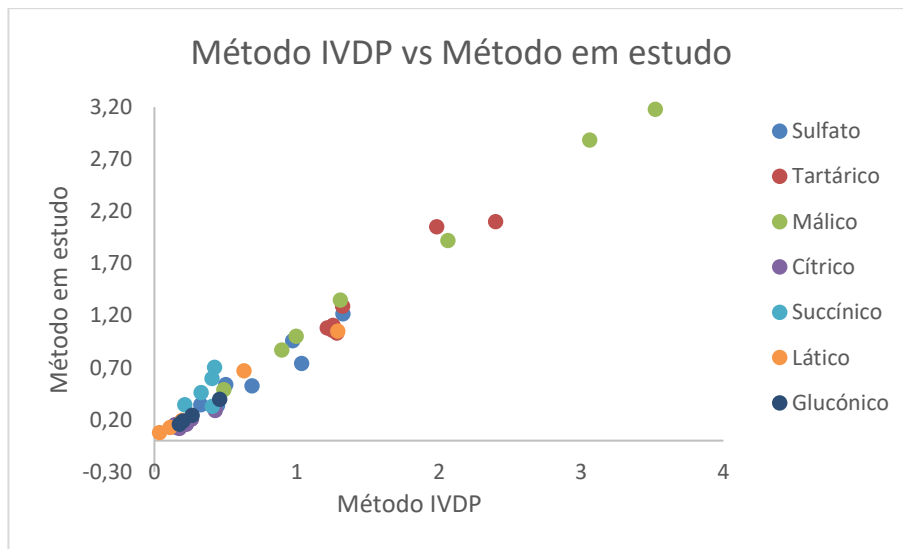


Figura 3.3. Representação gráfica dos valores obtidos para o método em estudo em função dos valores obtidos para o método validado no IVDP, para as mesmas amostras.

Verifica-se que a dispersão dos pontos no gráfico é reduzida, o que sugere que os valores obtidos pelo método validado do IVDP e para o método em estudo são semelhantes, para as mesmas amostras analisadas.

Para avaliar o desempenho do método para cada analito representaram-se graficamente os valores obtidos pelo método em estudo em função dos valores obtidos pelo método validado no IVDP para cada analito. Como exemplo, apresenta-se na figura 3.4. o gráfico obtido para a análise do ião sulfato.

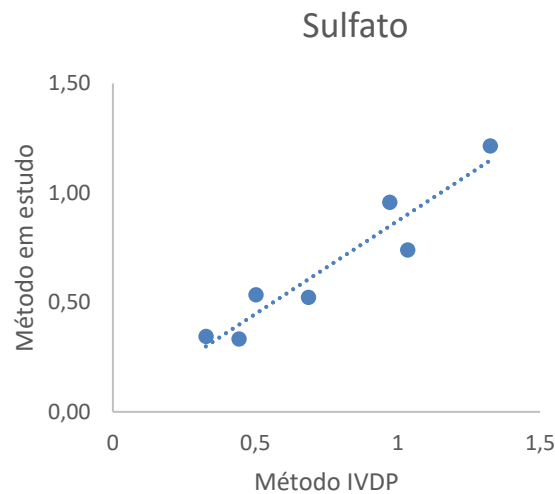


Figura 3.4. Representação gráfica das concentrações obtidas pelo método de determinação do ião sulfato em estudo em função das concentrações obtidas pelo método validado no IVDP.

Analisando o gráfico verifica-se que para este analito, as concentrações obtidas para ambos os métodos são próximas.

De modo a avaliar se as diferenças de concentração obtidas por ambos os métodos são significativas, realizou-se o Teste t das diferenças.

Teste t das diferenças

Este teste aplica-se quando se pretende comparar dois métodos sobre amostras similares, na mesma gama de concentração, pois assenta no pressuposto que quaisquer erros aleatórios e/ou sistemáticos são independentes da concentração⁶², e é determinado pela equação 18.

$$t_{exp} = \frac{Dm}{Sm} \sqrt{N} \quad \text{Equação 18}$$

Em que Dm corresponde à média aritmética das diferenças, Sm corresponde ao desvio padrão associado à média das diferenças e N é o n^o de amostras ensaiadas pelos dois métodos.

Os valores de t determinados para cada analito pela equação (18) são apresentados na tabela 3.18, assim como o valor de t tabelado para um nível de confiança de 95%, para N-1 graus de liberdade.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Tabela 3.18. Valores de t tabelado, para um nível de confiança de 95%, e valores de t experimental.

Analito	t_{exp}	t_{tab}
Sulfato	2,073	2,4469
Ácido tartárico	3,013	
Ácido málico	1,773	
Ácido cítrico	3,262	2,776
Ácido succínico	2,211	
Ácido láctico	0,539	3,1824
Ácido glucónico	2,785	

Verifica-se que, relativamente aos ácidos tartárico e cítrico, como o valor de t_{exp} é superior a t_{tab} , os resultados provenientes de ambos os métodos apresentam desvios significativos para estes dois analitos.

Para os restantes analitos, como o valor de t_{exp} é inferior ao valor de t_{tab} , conclui-se que os resultados provenientes dos dois métodos, estatisticamente, não apresentam desvios significativos, concluindo-se que os resultados obtidos pelos dois métodos são equivalentes.

3.1.10. Ensaio interlaboratoriais- BIPEA

Os ensaios interlaboratoriais consistem na organização, realização e avaliação de ensaios no mesmo item ou material, por dois ou mais laboratórios, de acordo com condições pré-determinadas⁶².

O laboratório do IVDP participou em ensaios interlaboratoriais no âmbito do *Bureau Interprofessionnel d'Études Analytiques* (BIPEA), relativamente à determinação do ácido acético.

Na tabela 3.19 apresentam-se os valores obtidos pelo método em estudo e os valores de referência do circuito BIPEA, para as diferentes matrizes de vinho, assim como a média, o desvio padrão e o erro relativo.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Tabela 3.19. Valores de concentração de ácido acético obtidos pelo método em estudo e os valores do circuito Bipea (Vcircuito), em mg/L.

[ácido acético] (mg/L)		
Matriz	Método em estudo	Vcircuito
Vinho tinto-tranquilo	0,51	0,50
Vinho Naturalmente Doce	0,63	0,59
Vinho branco-tranquilo-	0,32	0,30
Vinho tranquilo	0,52	0,49
Vinho fortificado	0,49	0,49
Vinho aromatizado	0,22	0,20
Vinho efervescente	0,35	0,31
Média	0,44	0,41
Desvio padrão	0,14	0,14
Er (%)	5,9	

Verifica-se que os valores de concentração obtidos e os valores de referência são bastante próximos, sendo que o valor de desvio padrão de ambas as amostras é aproximadamente o mesmo. Relativamente ao valor de erro relativo (Er) verifica-se que é satisfatório, uma vez que o valor de Er estipulado pelo Guia Relacre 13 é de 5%, contudo é um valor meramente indicativo, podendo-se concluir que o método em estudo é exato.

Como o valor de erro relativo de ácido acético é satisfatório, indica que o método em estudo tem um bom desempenho. Tendo em conta o facto do valor de erro relativo muito elevado determinado na análise de MRE (apresentado na secção 3.18) para o ácido acético, comprova que o MRE utilizado não é adequado para a análise deste analito, visto que o método apresenta um bom desempenho pela análise de ensaios interlaboratoriais.

Apesar da proximidade dos valores de desvio padrão do método em estudo e dos valores do circuito Bipea, procedeu-se à análise pelo Teste F, para avaliar a proximidade estatística dos mesmos, recorrendo à equação 19. Os valores obtidos são apresentados na tabela 3.20.

$$F = \frac{S_{circuito}^2}{S_{Método}^2} \quad \text{Equação 19}$$

Em que $S_{circuito}^2$ corresponde à variância dos valores do circuito e $S_{Método}^2$ corresponde à variância dos valores obtidos pelo método em estudo.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Tabela 3.20. Valores obtidos para o Teste F: duas amostras para variâncias, para um nível de 95%.

	IVDP	Vcircuito
Média (mg/L)	0,435	0,411
Variância (mg/L)	0,0197	0,0198
F	1,00	
F crítico	4,284	

Como o valor de F obtido é inferior ao valor de F crítico, os desvios padrão dos dois métodos não são estatisticamente diferentes, logo utilizamos o teste t de Student para comparar os resultados obtidos pelos dois métodos diferentes e averiguar até que ponto são equivalentes, usando a seguinte equação:

$$t_{exp} = \frac{X_{m1} - X_{m2}}{S \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad \text{Equação 20}$$

Em que X_{m1} e X_{m2} correspondem aos valores da média das concentrações do método em estudo e do método do circuito Bipea, S é o desvio padrão e n o número de ensaios. O valor de t determinado pela equação (10) é apresentado na tabela 3.21, assim como o valor de t tabelado para um nível de confiança de 95%, para n_1+n_2-2 graus de Liberdade.

Tabela 3.21. Valor de t tabelado, para um nível de confiança de 95% e valor de t determinado.

t_{tab}	t_{exp}
2,18	0,32

Verifica-se que o valor de t_{exp} é inferior ao valor de t_{tab} , portanto, os resultados provenientes dos do método em estudo e os valores de referência, estatisticamente não apresentam desvios significativos, o que indica que o método apresenta um bom desempenho.

3.2. Análise de amostras

Durante todo o estágio analisaram-se amostras de vinhos de diversas matrizes e vinagre de vinho do Porto.

Em todas as sequências de amostras analisadas uma das amostras era selecionada aleatoriamente e era incluído um duplicado na sequência de trabalho.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

A análise de duplicados foi realizada com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do operador na preparação das amostras.

Analisaram-se amostras em duplicado de diversas matrizes, contudo, na tabela 3.22 apresentam-se os resultados obtidos apenas para algumas das matrizes analisadas. Na mesma tabela apresentam-se a média dos duplicados da amostra, o coeficiente de variação, determinado com o valor de desvio padrão das concentrações dos duplicados e a sua média, para cada amostra, a diferença de duplicados (DD), e os valores de limite de repetibilidade para cada analito.

Tabela 3.22. Resultados obtidos na análise em duplicado de diferentes matrizes.

Analito	Matriz	Média (g/L)	DD (diferença de duplicados) (g/L)	CV(%)	r (g/L)
Ião sulfato	Vinho Licoroso- Colheita 1900	1,902	0,080	3,0	0,07
	Vinho aromatizado Colheita tardia	0,8751	0,0069	0,6	
	Douro-Tinto	1,015	0,039	2,7	
	Douro-Rosado	0,507	0,038	5,2	
	Vinho Licoroso (+40anos)	0,381	0,012	2,1	
	Vinho Licoroso (+40anos)	1,05	0,25	17,0	
Ácido tartárico	Vinho Licoroso- Colheita 1900	1,1223	0,0092	0,6	0,15
	Vinho aromatizado Colheita tardia	0,993	0,081	5,8	
	Douro-Tinto	1,3175	0,0054	0,3	
	Douro-Rosado	1,366	0,025	1,3	
	Vinho Licoroso (+40anos)	1,760	0,073	2,9	
	Vinho Licoroso (+40anos)	0,78	0,15	13,3	
Ácido málico	Vinho Licoroso- Colheita 1900	1,476	0,030	1,5	0,12
	Vinho aromatizado Colheita tardia	0,431	0,0344	5,6	
	Douro-Tinto	1,2117	0,013	0,8	
	Douro-Tinto	0,106	0,010	6,7	

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Ácido cítrico	Douro-Rosado	1,06	0,057	3,8	0,09
	Vinho Licoroso (+40anos)	1,26	0,21	11,9	
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,3398	0,0056	1,2	
	Vinho aromatizado	0,370	0,010	2,0	
	Colheita tardia	0,6245	0,0073	0,8	
	Douro-Tinto	0,0453	0,0061	9,6	
	Douro-Rosado	0,217	0,016	5,1	
Ácido succínico	Vinho Licoroso (+40anos)	0,2646	0,0468	12,5	0,08
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,5315	0,0047	0,6	
	Vinho aromatizado	0,413	0,046	7,8	
	Colheita tardia	0,9583	0,0077	0,6	
	Douro-Tinto	0,8375	0,0041	0,3	
	Douro-Rosado	0,6462	0,024	2,7	
Ácido acético	Vinho Licoroso (+40anos)	0,43	0,11	17,6	0,10
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,756	0,018	1,7	
	Vinho aromatizado	0,302	0,0260	6,1	
	Colheita tardia	2,144	0,036	1,2	
	Douro-Tinto	0,52233	0,00083	0,1	
	Douro-Rosado	0,398	0,018	3,2	
Ácido láctico	Vinho Licoroso (+40anos)	0,882	0,073	5,8	0,10
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,821	0,010	0,9	
	Vinho aromatizado	0,408	0,026	4,6	
	Colheita tardia	0,091	0,017	13,2	
	Douro-Tinto	1,308	0,086	4,7	

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Ácido glucónico	Douro-Rosado	0,805	0,021	1,9	0,15
	Vinho Licoroso (+40anos)	0,82	0,25	22,0	
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,53	0,12	16,5	
	Vinho aromatizado	1,403	0,052	2,6	
	Colheita tardia	3,770	0,069	1,3	
	Douro-Tinto	0,226	0,033	10,2	
	Douro-Rosado	0,1799	0,0033	1,3	
Ácido fórmico	Vinho Licoroso (+40anos)	0,56	0,12	15,1	0,05
	Vinho Licoroso- Colheita 1900	0,4739	0,0026	0,4	
	Vinho aromatizado	0,0818	0,0086	7,4	
	Colheita tardia	0,0872	0,0095	7,7	
	Douro-Tinto	<Ldd	<Ldd	<Ldd	
	Douro-Rosado	<Ldd	<Ldd	<Ldd	
	Vinho Licoroso (+40anos)	0,314	0,040	9,0	

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que os valores das diferenças de duplicados (DD) para os ácidos tartárico, cítrico, acético, glucónico e fórmico são inferiores aos limites de repetibilidade correspondentes, para todas as matrizes, o que indica que a precisão dos resultados obtidos é adequada.

Para o íão sulfato, o valor da diferença de duplicados (DD) é superior ao limite de repetibilidade para as matrizes de Vinho licoroso (+40 anos) e Vinho Licoroso-Colheita 1900, o que indica que os resultados desta análise, nestas matrizes, apresentam precisão inferior à estabelecida. O mesmo acontece para a análise dos ácidos málico, succínico e láctico na matriz de Vinho licoroso (+40 anos). Verifica-se ainda que a diferença de duplicados (DD) para a análise do ácido láctico na matriz Vinho licoroso-Colheita 1900 também apresenta um valor superior ao limite de repetibilidade.

Estes resultados sugerem que os ensaios realizados em Vinho licoroso (+40 anos)

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

apresentam maior dispersão (menor precisão) pois foi nesta matriz que se observaram valores de diferenças de duplicados de vários analitos superiores aos limites de repetibilidade. Este facto provavelmente está relacionado com o facto desta matriz ser mais complexa, sendo mais complicado determinar com precisão as áreas dos picos nos eletroferogramas.

Relativamente aos valores de coeficiente de variação, a matriz de Colheita tardia apresentou um valor de CV de 13,2% para o ácido láctico, superior a 10%, contudo o valor obtido é relativamente próximo.

A matriz de Vinho Licoroso (+40anos) foi a que obteve valores de coeficiente de variação mais elevados, sendo que os valores de CV foram superiores a 10% para todos os analitos, com a exceção do ácido fórmico e acético.

A partir dos resultados obtidos para as amostras analisadas, pode-se verificar que o ácido fórmico não se encontra presente em todas as matrizes de vinho. Este composto é mais comum e apresenta um valor de concentração superior para vinhos mais antigos, como o Vinho Licoroso (+40 anos) e Colheita de 1900.

Tendo em conta os valores legislados, para vinhos, de ácido cítrico (≤ 1 g/L) e de sulfato (≤ 2 g/L), verifica-se que todas as amostras analisadas estão de acordo com a legislação, visto que apresentam valores inferiores aos valores estipulados pela mesma.

Capítulo 4

Conclusão

Capítulo 4 – Conclusão

No âmbito do trabalho realizado, pretendeu-se a validação de um método analítico de Eletroforese capilar (EC) para a quantificação dos ácidos tartárico, málico, cítrico, fórmico, succínico, láctico, glucónico e acético e para a quantificação do ião sulfato em amostras de diferentes matrizes em vinhos do Porto e do Douro e em vinagres do vinho do Porto. O método estudado e aqui descrito é simples de executar, envolve uma simples preparação das amostras e requer um reduzido consumo de reagentes. Este método mostrou a capacidade de separação e quantificação simultânea dos ácidos orgânicos considerados, assim como para o ião sulfato, sendo capaz de analisar as matrizes de vinho mais complexas.

O desempenho e eficiência do método foi demonstrada através da análise de vários parâmetros de desempenho, apresentando uma ampla gama de trabalho. A linearidade do método é satisfatória para todos os compostos em estudo, na gama de trabalho utilizada, verificando-se que a concentração dos padrões se correlaciona linearmente com a resposta em termos de área de pico em que se obtiveram valores de coeficiente de correlação superiores a 0,995.

Os limites de deteção e de quantificação obtidos foram apropriados para a quantificação da maioria dos analitos nas amostras analisadas e satisfatórios, visto que se encontram abaixo dos valores limite descritos na legislação, relativamente ao ácido cítrico e ião sulfato.

O método apresenta ainda, no geral, uma repetibilidade e precisão intermédia satisfatórias. Nos ensaios de recuperação realizados, as taxas de recuperação obtidas encontram-se dentro do intervalo de 90% e, aproximadamente, 100%, estando dentro do intervalo estipulado para a gama de concentrações analisada, podendo-se concluir que o método não apresenta efeitos de matriz significativos.

Por análise de MRE, o ácido glucónico foi o analito que apresentou valores mais satisfatórios, em termos de valor de Lpi, assim como o respetivo valor de CV(%). Contrariamente, para o ácido acético, o valor de erro relativo obtido foi muito superior aos restantes, ou seja, os valores de concentração obtidos para este analito durante o período de tempo considerado, variaram bastante, o que supõe que este material pode não ser adequado para a determinação de ácido acético.

Para determinadas amostras, compararam-se os resultados obtidos pelo método estudado e pelo método implementado no IVDP, verificando-se a proximidade entre os mesmos. Os resultados provenientes dos dois métodos não apresentaram desvios significativos para a maioria dos analitos, com a exceção dos ácidos tartárico e cítrico.

A exatidão do método foi comprovada recorrendo à participação em ensaios

Capítulo 4 – Conclusão

interlaboratoriais, em que se verificou a proximidade entre os valores obtidos pelo método estudado e os valores de referência, em que se confirmou que, estatisticamente, os valores não apresentam desvios significativos.

Esta análise permitiu confirmar a suposição apresentada na análise de MRE relativamente ao ácido acético, confirmando que este material não é adequado para a quantificação deste analito, tendo em conta que o método apresenta um bom desempenho pela análise de ensaios interlaboratoriais.

Assim, o método pode ser facilmente empregue em análises de rotina e no controlo de qualidade, de vinhos do Porto e Douro.

Todos os objetivos propostos neste trabalho foram atingidos, sendo que, num trabalho futuro, poderia realizar-se a otimização do método estudado.

A realização deste trabalho foi bastante enriquecedora, visto que coloquei em prática conhecimentos teóricos adquiridos durante o meu percurso académico, aliando ao facto de se ter realizado em ambiente empresarial, que permitiu adquirir experiência laboratorial, uma maior autonomia e desenvolver a capacidade de trabalhar em equipa.

De modo a que se possa dar continuidade a este estudo, seria interessante a otimização do método estudado para os analitos considerados, bem como a validação de um método para a determinação de outros ácidos orgânicos presentes em vinhos e o estudo de um método para a análise de ácidos orgânicos em diferentes vinagres de Vinho do Porto.

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

1. Instituto dos Vinhos do Douro e Porto. Disponível em: <http://www.ivdp.pt> [consultado a 28-11-2016]
2. Sirén H, Sirén K, Sirén J. Evaluation of organic and inorganic compounds levels of red wines processed from Pinot Noir grapes. *Analytical Chemistry Research* ,3. 2015; 26–36.
3. Fernandes S. Desenvolvimento de um método de análise de Pesticidas na Indústria Vitivinícola. Universidade do Minho. 2010. Dissertação de Mestrado.
4. Ferreira C. Extração em meio aquoso e concentração por processos de membranas de fibras solúveis a partir do bagaço de uva branca. Instituto Superior Técnico de Lisboa. 2013. Dissertação de Mestrado.
5. Inhan L., Ferreira J, Marques C, Rebelo J. Paradoxo de inovação no cluster do vinho: caso da Região Demarcada do Douro. *Rev. adm. Empres.* v.53. 2013; 256-271.
6. História do Vinho do Porto. Disponível em: <http://www.taylor.pt/> [consultado a 28-11-2016]
7. Sandler M, Pinder R. *Wine- A Scientific Exploration*, Taylor & Francis Group, 2003
8. Wines of Portugal. Vinho do Porto. Disponível em: <http://www.winesofportugal.info/> [consultado a 29-11-2016]
9. Infovini. Tipos de vinho. Disponível em: <http://www.infovini.com/> [consultado a 6-12-2016]
10. Neme A. Processamento de Vinhos e vinagre. Universidade Federal do Tocantins. 2007, Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos.
11. Decreto-Lei n.º 300/99 de 5 de Agosto de 1999- Artigo 2º
12. Vinificação. Disponível em: <http://www.vinhomadeira.pt/> [consultado a 30-11-2016]

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

13. Makris DP, Karvela E, Kefalas P, Moutounet M. Extraction of phenolics in liquid model matrices containing oak chips: Kinetics, liquid chromatography–mass spectroscopy characterisation and association with in vitro antiradical activity. *Food chemistry*, v.110.2008; 263-272.
14. Costa V. Análise do processo de fabrico de vinagres. Universidade de Lisboa. 2014. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar.
15. Sistema de produção de vinagre. Disponível em:
<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/Vinagre/index.htm> [consultado a 8-05-2017]
16. Araújo L. Estudo da produção e do envelhecimento do vinagre de Laranja Lima., Universidade Federal de Alagoas.2012. Dissertação de Mestrado.
17. Gullo M, Verzelloni E, Canonico M. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry* ,49. 2014;1571–1579.
18. Volschenk H, Vuuren H. J.J, Viljoen-Bloom M. Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* Vol. 27. 2006.
19. Castiñeira A, Peña R. M, C. Herrero C, García-Martín S. Analysis of Organic Acids in Wine by Capillary Electrophoresis with Direct UV Detection, *J. Food Compos Anal.* 2002; 15, 319–331.
20. Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. *Handbook of enology.* Wiley, vol.2, nº2. 2006.
21. Zeravik J, Fohlerova Z, Milovanovic M, Kubesa O, Zeisbergerova M, Lacina K, Petrovic A., Skladal Z. Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. *Food chemistry.* V.194. 2015; 432-440.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

22. Instituto da Vinha e do Vinho. Disponível em: <http://www.iwv.min-agricultura.pt> [consultado a 29-12-2016]
23. Mallet S., Arellano M, Boulet J.C, Couderc F. Determination of tartaric acid in solid wine residues by capillary electrophoresis and indirect UV detection. J Chromatogr A. vol. 853. 1999;181-184.
24. Sigma-Aldrich. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com> [consultado a 10-01-2017]
25. Lima L, Schuler A, Guerra N, Pereira G, Lima T, Rocha H. Otimização e validação de método para a determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. Quim. Nova. vol. 33. 2010; 1186-1189.
26. Alpuim J. Aprendendo a Química do Vinho, nº 65. 1997.
27. Acids and wine. Winemaking. Disponível em: <http://winemaking.jackkeller.net/acid.asp> [consultado a 18/01/2017).
28. Formic acid- Pubchem. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/formic_acid#section=Top [consultado a 29/05/17]
29. Formic Acid (Formate)-Assay Procedure, K-Form 06/15. Disponível em: <https://www.megazyme.com/> [consultado a 29/05/17]
30. OIV- Recueil international des methodes d'analyses- Acide gluconique .2000.
31. Spudeit D, Dolzan M, Micke G. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. Scientia Chrom. Vol 4, nº4. 2012; 287-297
32. Tagliaro F, S. Turrina S, Smith F.P. Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis. Forensic Science International. v.77. 1996; 211-29.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

33. Mato I, Huidobro J.F, Simal-Lozano J, Sancho M. Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. vol.565 2006; 190–197.
34. Tavares M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química Nova*.vol.20, 1997; 493-511.
35. Esteves V, Lima S, Lima D, Duarte A. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. *Analytica Chimica Acta*. vol. 513. 2004; 163–167.
36. High Performance Capillary Electrophoresis, Agilent Technologies, Inc. 2009-2014; Second completely revised edition by Henk H. Lauer and Gerard P. Rozing
37. Pharmaceutical Analysis System- System Overview. Disponível em: <https://www.beckmancoulter.com> [consultado a 1/06/17)
38. Colombara R., Tavares M.M.F, Massaro S. Determinação simultânea de aniões por eletroforese capilar: características e aplicações. *Química Nova*, vol.20. 1997; 363-373.
39. CE Solutions-1. Disponível em: www.sepscience.com [consultado a 5/06/2017]
40. CE Solutions- The CE Capillary-3. Disponível em: www.sepscience.com [consultado a 5/06/2017]
41. Graef L. Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha. Universidade Federal do Paraná. 2007. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
42. Whatley H. Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. 2001.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

43. Li S.F.Y. Capillary electrophoresis-principles, practice and applications. Journal of chromatography library. vol. 52. 1992.
44. Heller M. Eletroforese capilar aplicada ao estudo de adulterações em amostras de uísques. Universidade federal de Santa Catarina. 2010. Dissertação de Mestrado em Química.
45. Krivacsy Z, Gelencser A, Hlavay J, Kiss G, Sarvari Z. Electrokinetic injection in capillary electrophoresis and its application to the analysis of inorganic compounds. J Chromatogr A. vol.834. 1999; 21–44
46. CE Solutions- Injection Precision and Sensitivity-5.sepscience.com – CE Solutions- Injection Precision and Sensitivity-5
47. Ciura K, Pawelec A, Foraita M, Markuszewski M, Nowakowska J, Wielgomas B, Prahl A, Dziomba S. Evaluation of sample injection precision in respect to sensitivity in capillary electrophoresis using various injection modes. J. Sep. Sci. vol.40. 2017; 1167–1175
48. Spengler C. Desenvolvimento de equipamento e eletroforese capilar com detecção por condutividade sem contacto para separação de iões inorgânicos. Universidade Feral de Santa Maria, 2009. Dissertação de mestrado
49. Omar M, Elbashir A, Schmitz O. Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food. Food Chemistry. vol 214. 2017; 300–307
50. CE Solutions- Detection in Capillary Electrophoresis-6. Disponível em: www.sepscience.com [consultado a 10/06/2017]
51. Tejerina K. Validação de métodos para a análise de estatinas em medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Universidade de São Paulo. 2011. Dissertação de Mestrado.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

52. Organic acids- Compendium of international methods of analysis– OIV, OIV-MA-AS313-04: R2009
53. Tartaric acid- Compendium of international methods of analysis – OIV, OIV-MA-AS313-05A: R2009
54. Lactic acid- Enzymatic method, Compendium of international methods of analysis – OIV, OIV-MA-AS313-07: R2009
55. Citric acid -Chemical method, Compendium of international methods of analysis – OIV, OIV-MA-AS313-08: R2009
56. Citric acid- Enzymatic method, COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF ANALYSIS – OIV, OIV-MA-AS313-09: R2009
57. Total Malic Acid- Compendium of international methods of analysis – OIV, OIV-MA-AS313-10: R2009
58. D-Malic acid- Enzymatic method- Compendium of international methods of analysis – OIV, OIV-MA-AS313-12A: R2009
59. Molinero-Abad B, Alonso-Lomillo M, Domínguez-Renedo O, Arcos-Martínez M.J. Simultaneous amperometric determination of malic and gluconic acids in wine using screen-printed carbon electrodes. *Sensors and Actuators B*. vol.211. 2015; 250–254,
60. Vargas E, Ruiz M. A, Ferrero F. J, Campuzano S, Ruiz-Valdepeñas Montiel V, Reviejo A.J, Pingarrón J.M. Automatic bionalyzer using an integrated amperometric biosensor for the determination of L-malic acid in wines., *Talanta*. Vol. 158. 2016;6–13.
61. Ribani M, Bottoli C, Collins C, Jardim I, Melo L. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Quim. Nova*, Vol. 27, nº 5. 2004; 771-780.
62. Relacre Guia 13 (2013) -Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

63. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Eurochem. 2014.
64. Ludwing Hubeer AT. Validation of Analytical Methods. LabComplicance. 2001.
65. Guidelines of standard method performance requirements. Official Methods of Analysis. 2016.

Anexos

Anexo A: Exemplos de eletroferogramas obtidos

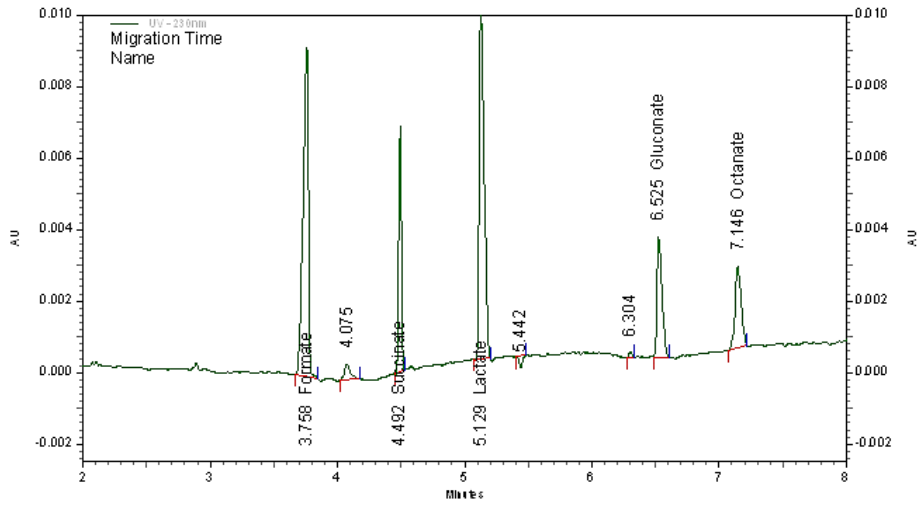


Figura I. Eletroferograma obtido na análise de soluções padrão dos ácidos fórmico, succínico, láctico e glucónico.

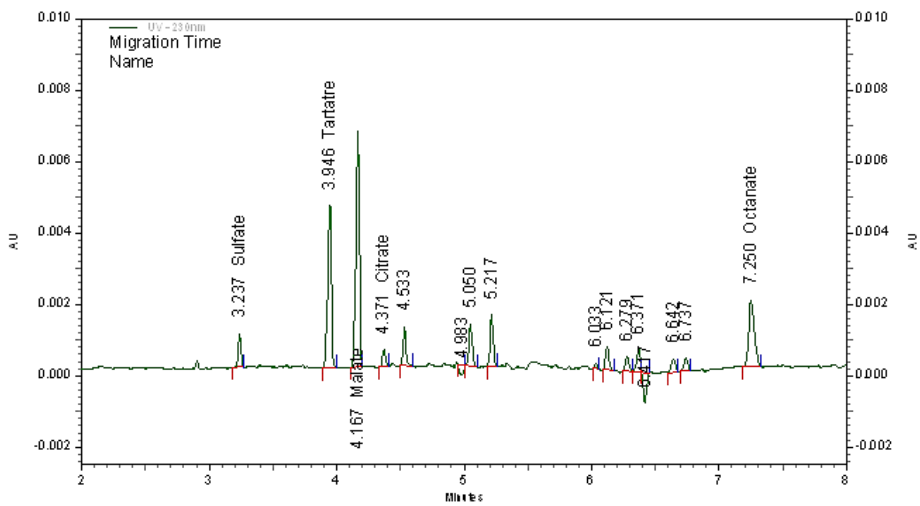


Figura II. Eletroferograma de uma amostra de vinho Tranquilo.

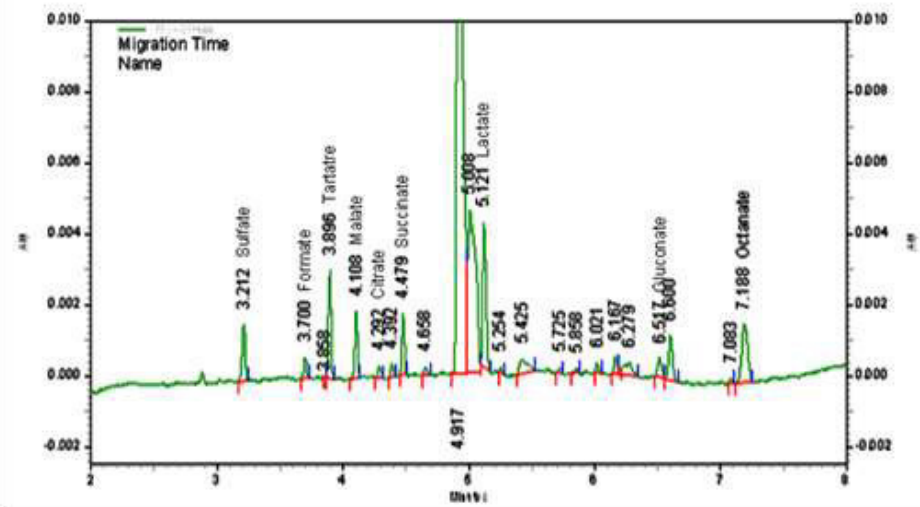


Figura III. Eletroferograma de uma amostra de vinagre de vinho.

Anexo B: Equações

Definição	Equação	Nº
Desvio padrão residual da curva de calibração	$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$	21
Incerteza associada à ordenada na origem	$s_a = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}; a \pm t_{sa}$	22
Incerteza associada ao declive	$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}; b \pm t_{sb}$	23

Anexos

Anexo C: Incertezas do volume das micropipetas utilizadas.

Tabela I. Valores de incertezas do volume das micropipetas utilizadas de acordo com a informação do fabricante.

Vol. μl	Div. μl	Bias (% Err. Rel.)			Precisão (CV %)		
		Vol. Mín.	Vol. Méd.	Vol. Máx.	Vol. Mín.	Vol. Méd.	Vol. Máx.
10-100	0.1	< \pm 1.5%	< \pm 1.2%	< \pm 0.8%	<1.0%	<0.6%	<0.2%
100-1000	1	< \pm 1.5%	< \pm 1.0%	< \pm 0.5%	<0.5%	<0.4%	<0.2%

Anexos

Anexo D: Gama de trabalho -Teste F: duas amostras para variâncias.

Tabela II. Resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias.

Sulfato			Acético		
	<i>Sulfato (mg/l)</i>	<i>Sulfato (mg/l)</i>		<i>Acético (mg/l)</i>	<i>Acético (mg/l)</i>
Média	33,4864	3,537	Média	35,4934	3,9132
Variância	1,102882489	0,072476667	Variância	0,260022489	0,008796844
Observações	10	10	Observações	10	10
gl	9	9	gl	9	9
PG	15,21706971		PG	29,5586094	
P(F<=f) uni-caudal	0,000198444		P(F<=f) uni-caudal	1,24944E-05	
F crítico uni-caudal	3,178893104		F crítico uni-caudal	3,178893104	

Tartárico			Lático		
	<i>Tartárico (mg/l)</i>	<i>Tartárico (mg/l)</i>		<i>Lático (mg/l)</i>	<i>Lático (mg/l)</i>
Média	86,2954	12,0589	Média	58,1011	9,9968
Variância	3,457189378	0,2378441	Variância	1,799060989	0,034650622
Observações	10	10	Observações	10	10
gl	9	9	gl	9	9
PG	14,53552717		PG	51,92001971	
P(F<=f) uni-caudal	0,00023879		P(F<=f) uni-caudal	1,09916E-06	
F crítico uni-caudal	3,178893104		F crítico uni-caudal	3,178893104	

Málico			Glucónico		
	<i>Málico (mg/l)</i>	<i>Málico (mg/l)</i>		<i>Glucónico (mg/l)</i>	<i>Glucónico (mg/l)</i>
Média	86,1786	12,3237	Média	4,5871	9,9968
Variância	3,413484933	0,120132233	Variância	0,0503901	0,034650622
Observações	10	10	Observações	10	10
gl	9	9	gl	9	9
PG	28,41439669		PG	1,454233626	
P(F<=f) uni-caudal	1,478E-05		P(F<=f) uni-caudal	0,292937561	
F crítico uni-caudal	3,178893104		F crítico uni-caudal	3,178893104	

Anexos

Succínico		
	<i>Succínico (mg/l)</i>	<i>Succínico (mg/l)</i>
Média	22,846	2,5979
Variância	0,466325111	0,019156544
Observações	10	10
gl	9	9
PG	24,34286165	
P(F<=f) uni-caudal	2,84353E-05	
F crítico uni-caudal	3,178893104	

Anexos

Anexo E: Repetibilidade

Tabela III. Resultados obtidos para o estudo de repetibilidade para os compostos analisados.

Sulfato					Ácido málico				
Tipo de vinho	Média(g/l)	s	r	CV%	Tipo de vinho	Média(g/l)	s	r	CV%
Tinto-Douro	0,14394	0,01182	0,03	8,2	Tinto-Douro	0,1177	0,0160	0,0448	13,59152
Rosé- VP	0,1474	0,0170	0,05	11,5	Vinho aromatizado	0,4521	0,0151	0,0424	3,34797
Espumante-Douro	0,15401	0,01412	0,04	9,2	Vinagre	0,6477	0,0231	0,0647	3,56724
Rosado-Douro	0,1655	0,0098	0,03	5,9	Rosé- VP	0,7728	0,0828	0,2320	10,72037
VB-ENS-Tranquilo	0,1837	0,0105	0,03	5,7	Vinho licoroso(+40anos)	1,1251	0,0378	0,1057	3,35613
VB-ENS-Tranquilo	0,2844	0,0263	0,07	9,3	Espumante-Douro	1,3070	0,0690	0,1932	5,28031
Vinagre	0,4418	0,0313	0,09	7,1	Colheita 1900	1,3911	0,0414	0,1160	2,97695
Vinho aromatizado	0,4987	0,0282	0,08	5,6	Rosado-Douro	1,6979	0,0352	0,0987	2,07568
Vinho licoroso(+40anos)	0,5039	0,0525	0,15	10,4	VB-ENS-Tranquilo	2,4153	0,0256	0,0715	1,05785
Colheita 1900	1,0331	0,0457	0,13	4,4	VB-ENS-Tranquilo	2,4515	0,0568	0,1589	2,31493

Ácido tartárico					Ácido cítrico				
Tipo de vinho	Média(g/l)	s	r	CV%	Tipo de vinho	Média(g/l)	s	r	CV%
Vinho licoroso(+40anos)	0,733	0,034	0,094	4,5948	Tinto-Douro	0,055	0,009	0,026	16,9
Vinho aromatizado	1,012	0,032	0,090	3,1837	Rosé- VP	0,060	0,009	0,025	15,0
Colheita 1900	1,080	0,050	0,139	4,6004	Vinagre	0,142	0,016	0,044	11,0
Rosé- VP	1,105	0,049	0,137	4,4208	Espumante-Douro	0,1983	0,0146	0,041	7,3
Tinto-Douro	1,109	0,046	0,128	4,1225	VB-ENS-Tranquilo	0,210	0,011	0,031	5,3
Vinagre	1,203	0,051	0,144	4,2780	Rosado-Douro	0,216	0,013	0,036	6,0
Rosado-Douro	1,234	0,032	0,089	2,5759	VB-ENS-Tranquilo	0,271	0,016	0,046	6,0
VB-ENS-Tranquilo	1,719	0,038	0,106	2,1943	Vinho licoroso(+40anos)	0,313	0,021	0,057	6,6
VB-ENS-Tranquilo	1,935	0,056	0,156	2,8859	Vinho aromatizado	0,401	0,025	0,071	6,3
Espumante-Douro	3,220	0,156	0,437	4,8492	Colheita 1900	0,445	0,066	0,184	14,7

Ácido succínico					Ácido acético				
Tipo de vinho	Média(g/l)	s	r	CV%	Tipo de vinho	Média(g/l)	s	r	CV%
VB-ENS-Tranquilo	0,2423	0,0139	0,0390	5,7456	VB-ENS-Tranquilo	0,190	0,009	0,025	4,66318
Rosé- VP	0,2821	0,0221	0,0620	7,8453	Vinho aromatizado	0,270	0,012	0,033	4,30024
Vinho aromatizado	0,3646	0,0220	0,0616	6,0306	Espumante-Douro	0,272	0,008	0,023	2,95976
VB-ENS-Tranquilo	0,3796	0,0114	0,0320	3,0132	VB-ENS-Tranquilo	0,287	0,010	0,028	3,47896
Vinho licoroso(+40anos)	0,3866	0,0309	0,0864	7,9853	Rosado-Douro	0,508	0,012	0,035	2,44444
Colheita 1900	0,3924	0,1003	0,2808	25,5541	Tinto-Douro	0,601	0,015	0,041	2,43634
Rosado-Douro	0,4008	0,0077	0,0215	1,9154	Colheita 1900	0,672	0,028	0,079	4,17543
Vinagre	0,4610	0,0240	0,0673	5,2100	Vinho licoroso(+40anos)	0,792	0,028	0,078	3,53984
Espumante-Douro	0,7260	0,0379	0,1060	5,2147	Vinagre	10,919	0,215	0,602	1,97059
Tinto-Douro	0,9649	0,0257	0,0719	2,6603					

Ácido láctico					Ácido glucónico				
Tipo de vinho	Média(g/l)	s	r	CV%	Tipo de vinho	Média(g/l)	s	r	CV%
Rosé- VP	0,0666	0,0072	0,0201	10,7949	Rosado-Douro	0,13819	0,01607	0,04500	11,63042

Anexos

Rosado-Douro	0,1011	0,0065	0,0183	6,4603	VB-ENS-Tranquilo	0,15032	0,01763	0,04936	11,72832
VB-ENS-Tranquilo	0,1343	0,0092	0,0258	6,8652	Espumante-Douro	0,19566	0,02113	0,05918	10,80181
VB-ENS-Tranquilo	0,3485	0,0088	0,0245	2,5112	Tinto-Douro	0,22579	0,01623	0,04545	7,18839
Espumante-Douro	0,3669	0,0198	0,0553	5,3847	VB-ENS-Tranquilo	0,33231	0,03177	0,08896	9,56121
Vinho aromatizado	0,4477	0,0108	0,0303	2,4169	Vinagre	0,35750	0,05242	0,14678	14,66379
Colheita 1900	0,7808	0,0354	0,0990	4,5294	Rosé- VP	0,50540	0,03135	0,08777	6,20259
Vinho licoroso(+40anos)	0,8246	0,0243	0,0680	2,9441	Colheita 1900	0,83381	0,08643	0,24200	10,36553
Vinagre	1,4341	0,0533	0,1493	3,7180	Vinho licoroso(+40anos)	0,91758	0,04602	0,12886	5,01565
Tinto-Douro	1,7651	0,0591	0,1654	3,3471	Vinho aromatizado	2,46583	0,07952	0,22266	3,22498

Ácido fórmico

Tipo de vinho	Média(g/l)	s	r	CV%
VB-ENS-Tranquilo	0,05	0,03	0,07	51,2
Vinho aromatizado	0,06	0,00	0,01	8,0
Vinagre	0,18	0,01	0,04	7,1
Vinho licoroso(+40anos)	0,33	0,01	0,04	4,2
Colheita 1900	0,40	0,02	0,06	5,1

Anexos

Anexo F: Precisão intermédia

Tabela IV. Resultados obtidos para o estudo de precisão intermédia para os compostos analisados.

Sulfato					Ácido tartárico				
Tipo de vinho	Média(g/l)	S.	Lpi	CV%	Tipo de vinho	Média(g/l)	S.	Lpi	CV%
Douro-Rosado	0,197	0,036	0,102	18,4	Vinho licoroso(+40anos)	0,713	0,062	0,166	8,3
semi-sparkling	0,246	0,021	0,058	8,5	Vinho aromatizado	0,969	0,047	0,131	4,8
Douro-Branco	0,251	0,027	0,077	10,9	Colheita 1900-Lágrima	1,100	0,080	0,224	7,3
Bebida espirituosa	0,253	0,021	0,062	8,7	Vinagre	1,164	0,037	0,104	3,2
Frisante (ENS)	0,266	0,031	0,088	11,8	Colheita tardia-VB-2012	1,298	0,101	0,282	7,8
Vinho branco	0,298	0,028	0,079	9,4	Vinho Licoroso-ENS	1,333	0,119	0,333	8,9
Vinho Licoroso-ENS	0,307	0,035	0,099	11,5	Douro-Tinto	1,412	0,078	0,218	5,5
Douro-Tinto	0,308	0,029	0,081	9,3	Frisante (ENS)	1,452	0,146	0,409	10,1
Efervescente(ENS)	0,335	0,049	0,136	14,5	Vinho Tinto (ENS)	1,487	0,115	0,321	7,7
Vinho Tinto (ENS)	0,358	0,049	0,138	13,7	Efervescente(ENS)	1,607	0,098	0,275	6,1
Efervescente (ENS)	0,443	0,056	0,156	12,6	semi-sparkling	1,660	0,098	0,274	5,9
Vinho aromatizado	0,459	0,035	0,098	7,7	Douro-Rosado	1,706	0,095	0,265	5,5
Vinagre	0,479	0,034	0,096	7,2	Douro-Branco	1,828	0,106	0,295	5,8
Vinho licoroso(+40anos)	0,535	0,051	0,143	9,5	Vinho branco	2,013	0,075	0,209	3,7
Colheita tardia-VB-2012	0,554	0,045	0,125	8,1	Bebida espirituosa	2,072	0,114	0,319	5,5
Colheita 1900-Lágrima	1,022	0,084	0,237	8,3	Efervescente (ENS)	2,691	0,217	0,608	8,1

Ácido málico					Ácido cítrico				
Tipo de vinho	Média(g/l)	S.	Lpi	CV%	Tipo de vinho	Média(g/l)	S.	Lpi	CV%
Douro-Tinto	0,116	0,007	0,019	6,0	Douro-Tinto	0,050	0,008	0,023	16,2
Bebida espirituosa	0,155	0,022	0,061	14,1	Bebida espirituosa	0,097	0,027	0,075	27,9
Vinho Tinto (ENS)	0,197	0,031	0,086	15,6	Vinho Licoroso-ENS	0,111	0,045	0,125	40,5
Efervescente (ENS)	0,390	0,034	0,095	8,7	Vinho Tinto (ENS)	0,121	0,054	0,150	44,5
Vinho aromatizado	0,433	0,029	0,081	6,7	Vinagre	0,141	0,014	0,039	9,9
Vinagre	0,606	0,031	0,087	5,1	Douro-Branco	0,158	0,015	0,043	9,7
Douro-Rosado	1,061	0,054	0,151	5,1	Douro-Rosado	0,204	0,015	0,043	7,5
semi-sparkling	1,100	0,054	0,151	4,9	Efervescente(ENS)	0,215	0,046	0,128	21,3
Vinho licoroso(+40anos)	1,111	0,097	0,273	8,8	Vinho branco	0,228	0,031	0,087	13,6
Colheita tardia-VB-2012	1,136	0,175	0,490	15,4	Efervescente (ENS)	0,265	0,041	0,114	15,4
Frisante (ENS)	1,263	0,113	0,315	8,9	Vinho licoroso(+40anos)	0,265	0,047	0,132	17,8
Douro-Branco	1,346	0,046	0,127	3,4	Colheita 1900-Lágrima	0,349	0,032	0,086	8,8
Colheita 1900-Lágrima	1,451	0,136	0,382	9,4	Vinho aromatizado	0,354	0,061	0,172	17,4
Vinho branco	2,456	0,088	0,245	3,6	Frisante (ENS)	0,423	0,062	0,234	14,6
Vinho Licoroso-ENS	2,852	0,287	0,804	10,1	semi-sparkling	0,460	0,028	0,078	6
Efervescente(ENS)	3,137	0,181	0,507	5,8	Colheita tardia-VB-2012	0,653	0,090	0,251	13,8

Ácido succínico					Ácido láctico				
Tipo de vinho	Média(g/l)	S.	Lpi	CV%	Tipo de vinho	Média(g/l)	S.	Lpi	CV%
Vinho Licoroso-ENS	0,013	0,020	0,064	155,5	Vinho Licoroso-ENS	0,080	0,022	0,061	27,2
Vinho branco	0,272	0,023	0,061	8,4	Colheita tardia-VB-2012	0,109	0,030	0,083	27,3
semi-sparkling	0,310	0,020	0,057	6,5	Douro-Branco	0,115	0,022	0,063	19,5

Anexos

Efervescente(ENS)	0,322	0,026	0,071	7,9	semi-sparkling	0,240	0,037	0,103	15,5
Douro-Branco	0,338	0,010	0,028	3,0	Efervescente(ENS)	0,253	0,036	0,101	14,2
Frisante (ENS)	0,356	0,038	0,106	10,6	Vinho branco	0,358	0,036	0,101	10,1
Vinho licoroso(+40anos)	0,392	0,049	0,137	12,5	Vinho aromatizado	0,445	0,033	0,091	7,3
Vinho aromatizado	0,393	0,016	0,043	4,0	Frisante (ENS)	0,681	0,043	0,121	6,4
Efervescente (ENS)	0,398	0,056	0,156	14,0	Vinho licoroso(+40anos)	0,697	0,049	0,136	7,0
Vinagre	0,446	0,020	0,055	4,4	Colheita 1900-Lágrima	0,782	0,046	0,128	5,9
Colheita 1900-Lágrima	0,511	0,055	0,155	10,9	Douro-Rosado	0,800	0,046	0,129	5,7
Douro-Rosado	0,628	0,027	0,077	4,4	Efervescente (ENS)	0,830	0,042	0,118	5,1
Bebida espirituosa	0,650	0,040	0,111	6,1	Bebida espirituosa	1,169	0,139	0,389	11,9
Vinho Tinto (ENS)	0,789	0,054	0,151	6,9	Vinagre	1,234	0,127	0,357	10,3
Douro-Tinto	0,840	0,030	0,084	3,6	Douro-Tinto	1,270	0,049	0,137	3,9
Colheita tardia-VB-2012	0,887	0,062	0,174	7,0	Vinho Tinto (ENS)	1,397	0,172	0,482	12,3

Ácido glucónico

Tipo de vinho	Média(g/l)	S.	Lpi	CV%
Efervescente(ENS)	0,145	0,050	0,141	34,8
Douro-Rosado	0,177	0,008	0,024	4,8
Douro-Tinto	0,245	0,014	0,039	5,7
Vinho branco	0,250	0,064	0,180	25,7
Vinho Tinto (ENS)	0,297	0,056	0,158	19,0
Bebida espirituosa	0,327	0,058	0,164	17,9
Efervescente (ENS)	0,336	0,081	0,228	24,2
Vinagre	0,341	0,059	0,165	17,3
Frisante (ENS)	0,583	0,135	0,377	23,1
Colheita 1900-Lágrima	0,599	0,141	0,395	23,5
Vinho licoroso(+40anos)	0,708	0,156	0,438	22,1
Vinho aromatizado	1,817	0,489	1,370	26,9
Colheita tardia-VB-2012	4,241	1,091	3,056	25,7
semi-sparkling	0,260	0,013	0,035	4,8

Ácido fórmico

Tipo de vinho	Média(g/l)	S.	Lpi	CV%
Vinho aromatizado	0,069	0,015	0,041	21,1
Colheita tardia-VB-2012	0,076	0,011	0,032	14,9
Vinagre	0,172	0,014	0,040	8,2
Vinho licoroso(+40anos)	0,338	0,038	0,107	11,3
Colheita 1900-Lágrima	0,441	0,061	0,170	13,8

Anexos

Ácido acético

Tipo de vinho	Média(g/l)	S.	Lpi	CV%
Vinho Licoroso-ENS	0,103	0,041	0,115	40,0
Douro-Branco	0,207	0,008	0,021	3,7
Efervescente (ENS)	0,232	0,037	0,105	16,1
Vinho aromatizado	0,286	0,032	0,091	11,4
Vinho branco	0,286	0,031	0,086	10,7
Efervescente(ENS)	0,331	0,047	0,130	14,1
Bebida espirituosa	0,498	0,047	0,133	9,5
semi-sparkling	0,510	0,040	0,111	7,8
Colheita 1900-Lágrima	0,738	0,098	0,273	13,2
Vinho licoroso(+40anos)	0,776	0,058	0,163	7,5
Vinho Tinto (ENS)	3,281	1,163	3,257	35,5
Douro-Rosado	0,781	0,398	1,114	50,9
Frisante (ENS)	0,813	0,439	1,230	54,0
Douro-Tinto	1,015	0,408	1,143	40,2
Colheita tardia-VB-2012	1,901	0,123	0,344	6,5

Anexos

Anexo G: Recuperação

Tabela V. Resultados obtidos no estudo da recuperação para diferentes matrizes para os analitos estudados.

Amostra	Sulfato inicial (mg/L)	Adição (mg/L)	Sulfato final (mg/L)	R%
	a	b	C	(c-a)/b*100
Colheita tardia-Vinho Branco	5,73	13,51	17,20	84,9
Efervescente	4,15	13,51	16,38	90,5
Vinho Branco-Tranquilo	2,99	14,71	16,02	88,6
Vinho aromatizado	4,92	14,71	19,30	97,8
Efervescente	3,35	13,83	16,12	92,3
Vinho Tinto	3,53	13,83	18,52	108,4
Vinho licoroso (+40 anos)	5,16	12,17	18,59	110,4
Colheita 1900	9,44	12,17	24,34	122,4
Frisante	2,67	16,70	12,43	58,4
Bebida espirituosa	2,54	16,10	17,14	90,7
Vinagre	4,40	14,11	18,09	97,0

Média	95,7
Desvio	17,0

Amostra	Tartárico inicial (mg/L)	Adição (mg/L)	Tartárico final (mg/L)	R%
	a	b	C	(c-a)/b*100
Frisante	13,89	42,59	38,19	57,0
Vinho Branco- Tranquilo	20,60	44,49	55,46	78,4
Efervescente	25,96	39,02	59,06	84,8
Vinho aromatizado	10,19	44,49	50,91	91,5
Bebida espirituosa	21,35	45,52	63,47	92,5
Colheita tardia-Vinho Branco	12,54	39,02	49,02	93,5
Efervescente	15,63	38,21	52,72	97,1
Vinho Tinto	14,68	38,21	55,98	108,1
Vinagre	11,02698	39,16	55,32	113,1
Colheita 1900	10,56	33,88	49,25	114,2
Vinho Licoroso (+40 anos)	6,93	33,88	46,27	116,1

Média	98,9
Desvio	13,2

Anexos

Amostra	Málico inicial (mg/L)	Adição (mg/L)	Málico final (mg/L)	R%
	a	b	c	(c-a)/b*100
Frisante	11,8578	41,82	36,15	58,1
Vinho Branco-Tranquilo	24,58	45,37	59,32	76,6
Efervescente	3,7116	39,43	38,49	88,2
Bebida espirituosa	1,44179	46,22	43,80	91,7
Colheita tardia -Vinho Branco	11,49	39,43	48,28	93,3
Vinho aromatizado	1,88	45,37	44,79	94,6
Efervescente	32,01	39,68	70,05	95,9
Vinho tinto	2,16	39,68	42,87	102,6
Vinagre	6,13	40,04	49,72	108,8
Colheita 1900	14,85	34,74	55,60	117,3
Vinho Licoroso (+40 anos)	11,75	34,74	52,57	117,5

Média	98,6
Desvio	13,0

Amostra	Cítrico inicial (mg/L)	Adição (mg/L)	Cítrico final (mg/L)	R%
	a	b	C	(c-a)/b*100
Frisante	3,4	10,5	10,4	66,7
Vinho branco- Tranquilo	1,9	9,7	10	79,7
Efervescente	2,5	8,9	10,1	85,5
Bebida espirituosa	0,9	10,9	11	88,1
Colheita tardia -Vinho Branco	6	8,9	14	89,3
Efervescente	2,1	8,5	10	95,6
Vinho tinto	1,0	8,5	10	106,9
Vinagre	2	9,3	12	108,1
Vinho Licoroso (+40 anos)	2,5	7,9	11,4	112,6
Vinho aromatizado	1,14	9,7	12,3	115,2
Colheita 1900	3,4	7,9	12,6	117,1

Média	99,8
Desvio	13,7

Anexos

Amostra	Succínico inicial (mg/L)	Adição (mg/L)	Succínico final (mg/L)	R%
	a	b	c	(c-a)/b*100
Vinho tinto	7,800	12,424	20,064	98,7
Vinho aromatizado	3,73	12,424	15,85	97,5
Vinho branco-Tranquilo	2,42	12,424	14,07	93,8
Efervescente	3,72	12,424	15,29	93,1
Colheita tardia- Vinho branco	8,42	12,424	18,98	84,9
Vinho Licoroso (+40 anos)	4,00	11,56	16,60	109,0
Efervescente	3,25	11,56	15,29	104,1
Colheita 1900	5,70	11,88	17,54	99,7
Bebida espirituosa	6,97	11,88	18,90	100,4
Frisante	4,08	12,02	16,34	102,0
Vinagre	4,67	10,68	16,60	111,7

Média	96,2
Desvio	10,6

Amostra	Láctico inicial (mg/L)	Adição (mg/L)	Láctico final (mg/L)	R%
	a	b	c	(c-a)/b*100
Vinho tinto	15,25	30,61	45,28	98,1
Vinho aromatizado	4,62	30,61	33,48	94,3
Vinho branco-Tranquilo	4,11	30,61	31,81	90,5
Efervescente	8,39	30,61	36,39	91,5
Colheita tardia- Vinho branco	1,21	30,61	27,48	85,8
Vinho Licoroso (+40 anos)	6,84	28,00	21,96	54,0
Efervescente	2,36	28,00	17,43	53,8
Colheita 1900	8,50	29,37	36,43	95,1
Bebida espirituosa	12,11	29,37	40,60	97,0
Frisante	6,8575	28,57	37,1040	105,9
Vinagre	11,3585	27,28	46,0165	127,1

Média	90,6
Desvio	18,6

Anexos

Amostra	Fórmico inicial (mg/L)	Adição (mg/L)	Fórmico final (mg/L)	R%
	a	b	C	(c-a)/b*100
Vinho tinto	0,00	18,28	16,59	90,7
Vinho aromatizado	0,62	18,28	17,72	93,5
Vinho branco-Tranquilo	0,00	18,28	17,35	94,9
Efervescente	0,00	18,28	12,48	68,3
Colheita tardia- Vinho branco	0,62	18,28	11,86	61,5
Vinho Licoroso (+40 anos)	3,56	17,76	23,63	113,0
Efervescente	0,00	17,76	20,50	115,4
Colheita 1900	5,12	15,03	23,97	125,5
Bebida espirituosa	0,00	15,03	19,75	131,4
Frisante	6,86	17,25	20,08	76,66
Vinagre	1,88	18,53	23,11	114,61

Média	98,1
Desvio	20,5

Amostra	Glucónico inicial (mg/L)	Adição (mg/L)	Glucónico final (mg/L)	R%
	a	b	c	(c-a)/b*100
Frisante	5,32	16,60	15,70	62,5
Colheita tardia- Vinho branco	35,25	10,20	41,99	66,1
Vinho branco-Tranquilo	2,01	17,79	16,26	80,1
Efervescente	2,35	16,88	16,88	86,1
Efervescente	2,89	10,20	12,00	89,3
Bebida espirituosa	2,09	16,23	17,95	97,7
Vinagre	2,97	16,60	20,72	106,9
Vinho tinto	3,21	16,88	21,31	107,2
Vinho Licoroso- Colheita 1900	5,87	15,02	22,75	112,4
Vinho aromatizado	11,74	17,79	32,15	114,8
Vinho Licoroso (+40 anos)	6,33	15,02	24,57	121,5

Média	95,0
Desvio	19,8

Anexos

Amostra	Acético inicial (mg/L)	Adição (mg/L)	Acético final (mg/L)	R%
	a	b	c	$(c-a)/b*100$
Frisante	9,006	18,908	19,000	52,9
Efervescente	2,190	18,150	17,500	84,4
Colheita tardia- Vinho branco	19,468	18,150	35,821	90,1
Efervescente	3,423	18,290	20,230	91,9
Vinho branco-Tranquilo	2,898	19,770	21,098	92,1
Bebida espirituosa	5,344	20,630	25,270	96,6
Vinho aromatizado	1,904	19,770	21,098	97,1
Vinagre	9,608	17,150	26,520	98,6
Vinho tinto	39,380	18,290	58,140	102,6
Vinho Licoroso (+40 anos)	10,171	15,890	29,130	119,3
Vinho Licoroso- Colheita 1900	8,753	15,890	28,165	122,2

Média	99,5
Desvio	12,3