

CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS E DERIVADOS¹

- MÉTODOS INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE APLICADOS À ENOLOGIA -



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

Usualmente as características cromáticas dos vinhos são quantificadas pela intensidade e pela tonalidade da cor. Para tal, recorre-se a métodos instrumentais de análise.

- Espectrofotometria de UV-Vis e infravermelho.

Exemplos de determinações em vinhos que recorrem a esta metodologia:

- Intensidade e tonalidade da cor;
- Polifenóis totais;
- Antocianas e taninos totais;
- Antocianas coradas;
- Pigmentos poliméricos;
- Determinação de compostos específicos e individuais.

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

Fundamentos:

- Verifica-se que um feixe de luz branca ao atravessar uma cuvete (usualmente de quartzo) contendo um líquido, a radiação emergente será menos intensa que a incidente.
- A redução é devida à reflexão na superfície da cuvete, à dispersão devido à presença de partículas em suspensão e fundamentalmente à absorção da energia pelo líquido.
- A absorção da energia nas regiões do espectro do visível e ultravioleta, depende do número e da forma como se encontram distribuídos os electrões das moléculas.

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

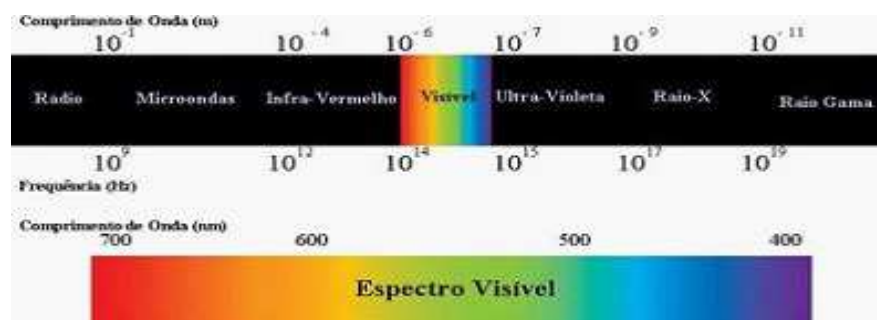
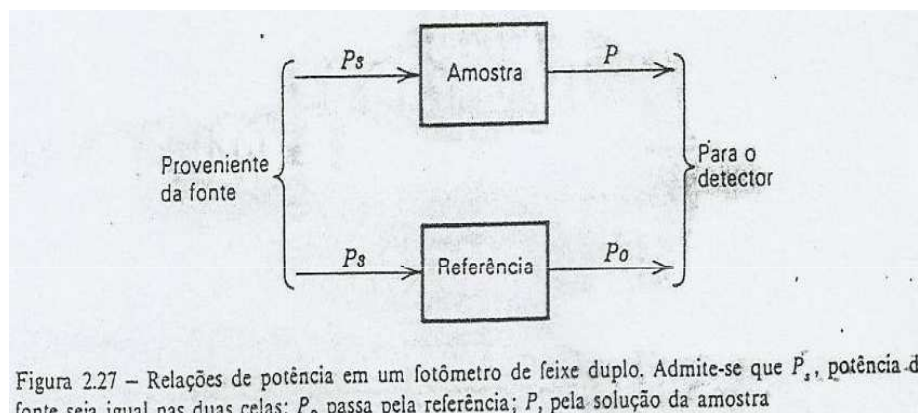


Tabela 2.1 – Regiões do espectro eletromagnético*

Nome	Limites de comprimento de onda		Limites de frequência, Hz**	Limites de número de onda, cm ⁻¹ **
	Unidades usuais	Metros		
Raios X	10^{-2} – 10^2 Å	10^{-12} – 10^{-8}	10^{16} – 10^{18}	
Ultravioleta afastado	10–200 nm	10^{-8} – 2×10^{-7}	10^{15} – 10^{16}	
Ultravioleta próximo	200–400 nm	2×10^{-7} – $4,0 \times 10^{-7}$	10^{15} – $7,5 \times 10^{14}$	
Visível	400–750 nm	$4,0 \times 10^{-7}$ – $7,5 \times 10^{-7}$	$7,5 \times 10^{14}$ – $4,0 \times 10^{14}$	25.000–13.000
Infravermelho próximo***	0,75–2,5 μ	$7,5 \times 10^{-7}$ – $2,5 \times 10^{-6}$	$4,0 \times 10^{14}$ – $1,2 \times 10^{14}$	13.000–4.000
Infravermelho médio***	2,5–50 μ	$2,5 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{14}$ – $6,0 \times 10^{12}$	4.000–200
Infravermelho afastado***	50–1000 μ	$5,0 \times 10^{-5}$ – 1×10^{-3}	6×10^{12} – 10^{11}	200–10
Microondas	0,1–100 cm	1×10^{-3} – 1	10^{11} – 10^8	10^5 – 10^2
Ondas de rádio	1–1000 m	1 – 10^3	10^8 – 10^5	

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis



Designa-se por características cromáticas dos vinhos, a sua luminosidade e a sua cromaticidade.

Luminosidade \longrightarrow **Transmitância**
Cromaticidade \longrightarrow **Comprimento de onda dominante (λ)**

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

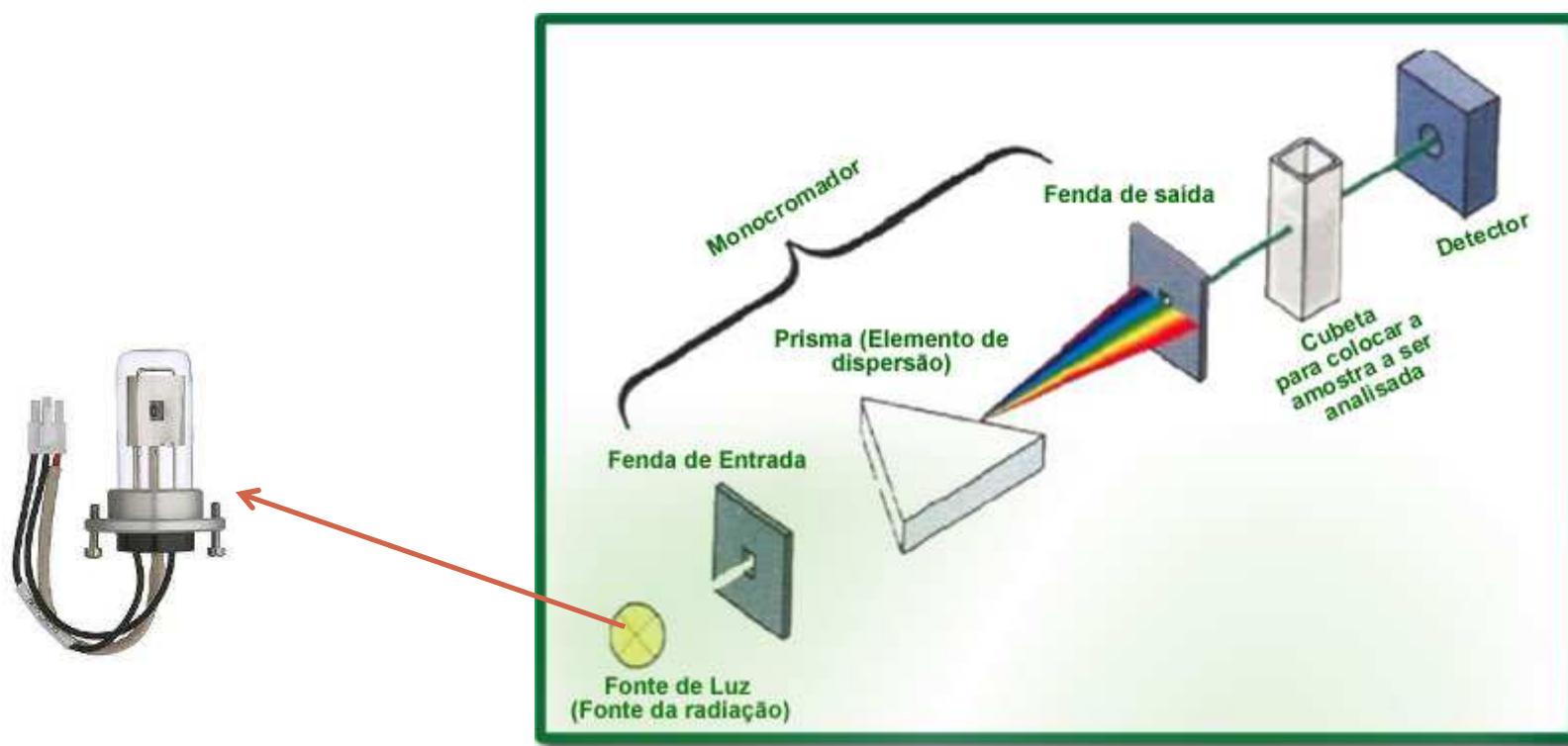
Equipamento:

- Fonte de radiação;
- Controle de intensidade;
- Controle de comprimento de onda;
- Recipiente da amostra;
- Recetor;
- Indicador.



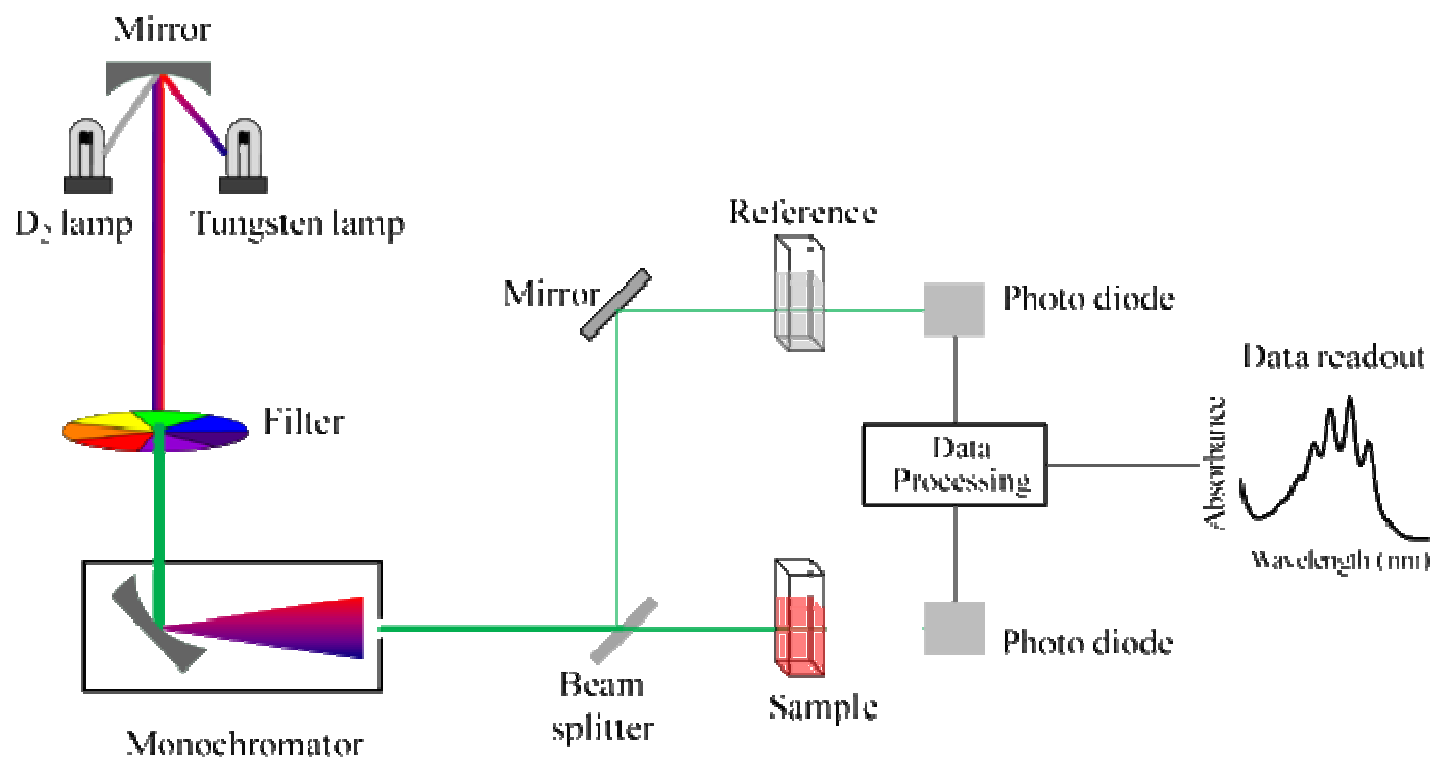
Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

- Fonte de radiação

Deve de apresentar uma luz constante, com um dado comprimento de onda.

O feixe de luz produzido, deve ter uma potência radiante suficiente de forma a seja realizada a deteção.

Lâmpada de *Deuterium* ——— região do ultravioleta

Lâmpada de *Tungsténio* ——— região do visível

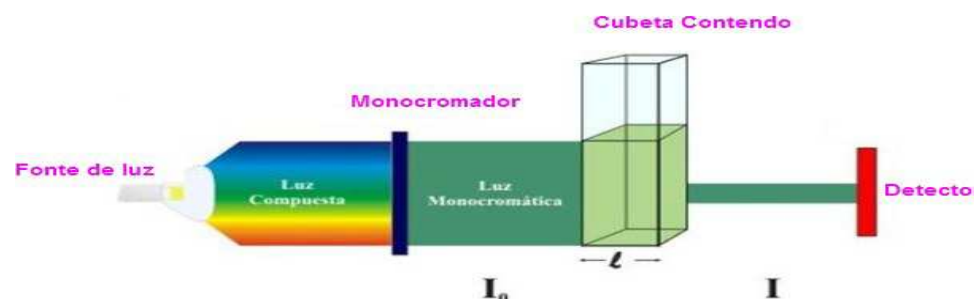
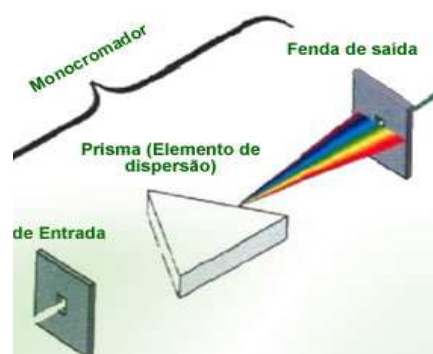


Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

- Controle de comprimento de onda (filtros)

Utilizam-se filtros óticos, que vão reter um determinado comprimento de onda, excetuando a banda de radiação que se pretende. Um dos mecanismos, consiste em monocromadores, que permitem uma separação estreita da faixa espectral de trabalho.



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

- Controle de comprimento de onda (filtros)

Os monocromadores, são utilizados em situações de radiação bastante complexa, permitindo uma separação estreita da faixa espectral de trabalho.

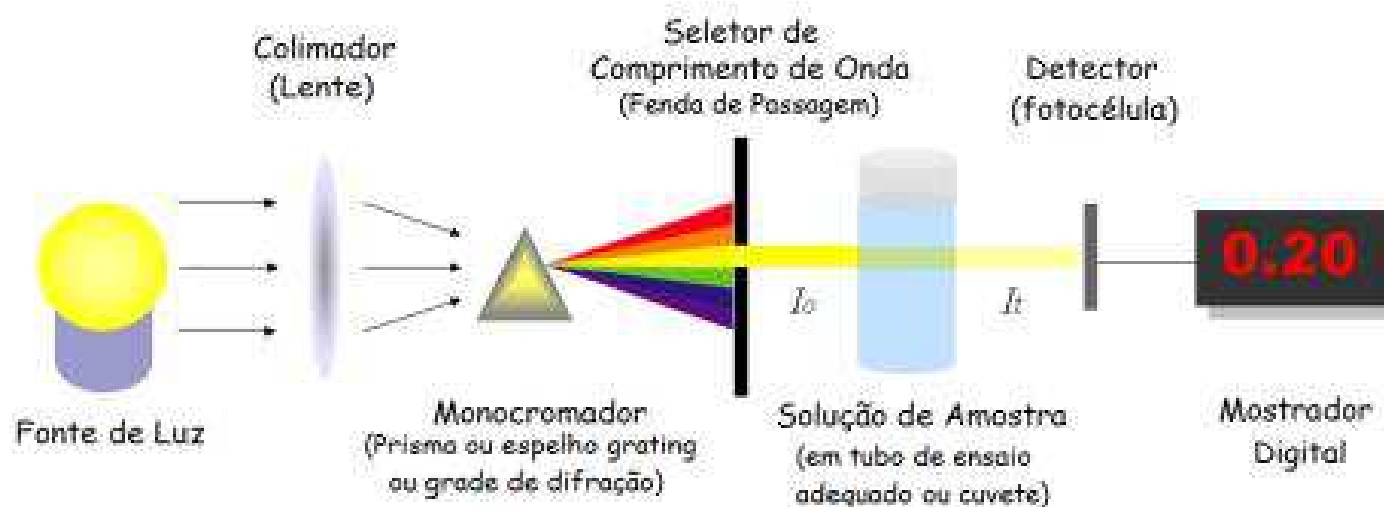
- Recipiente da amostra

Utilizam-se usualmente recipientes de quartzo ou de plástico (algum erro).



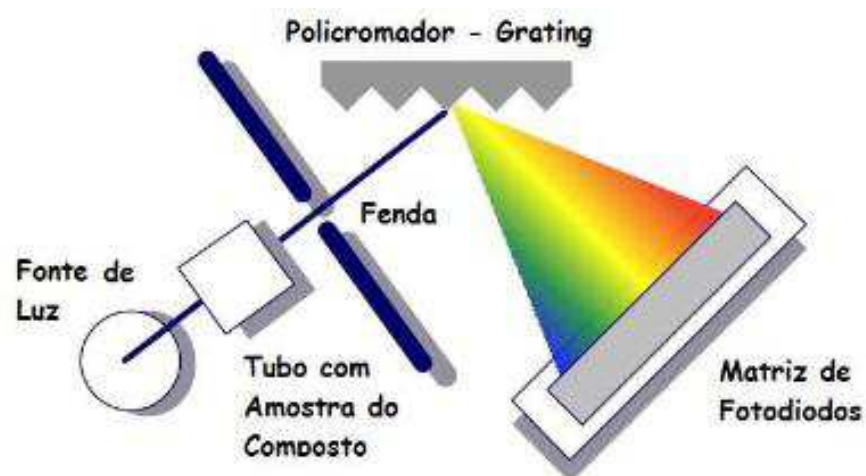
Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

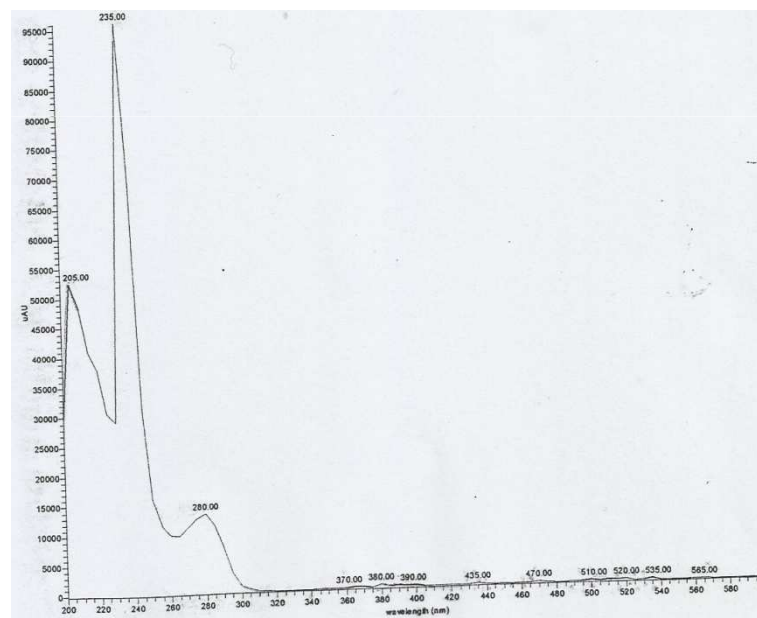
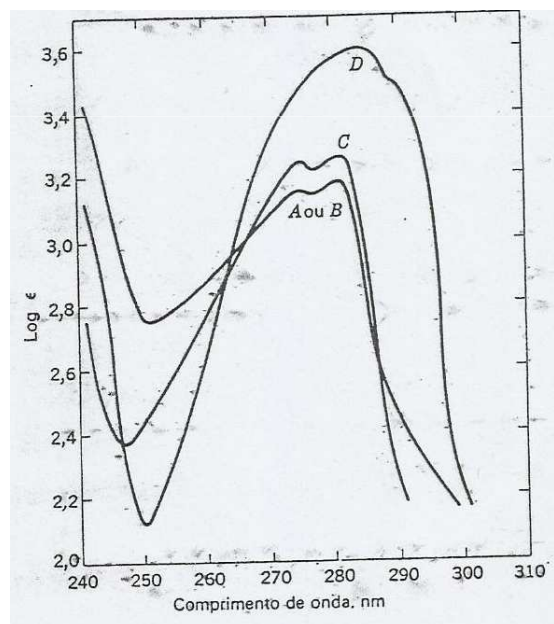


Capacidade de detetar vários comprimentos de onda simultaneamente.

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

- O comprimento de onda de absorção máxima de um composto fornece informações sobre o tipo de ligações entre as moléculas de um dado composto.

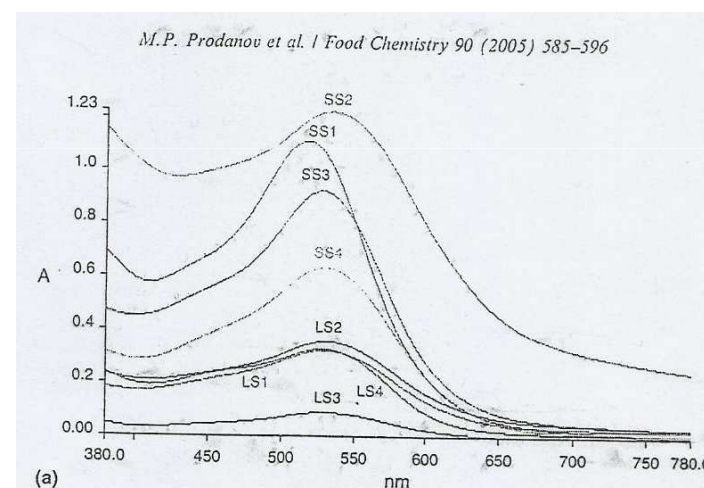


Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

Table 1. Identities and concentration of compounds found in Extract 4 "Anthocyanes"

Peak No.	Rt (min)	λ max (nm)	Compound
1	5.2	270	Gallic acid
2	5.7	280	Procyanidin trimer C2
3	6.6	280	(Epi)catechin-(epi)gallocatechin
4	8.2	280	Unknown (possible catechin-catechin sulphate)
5	11.1	280	Procyanidin tetramer
6	11.7	280	Procyanidin dimer (B1)
7	12.4	515	Delphinidin-3-glucoside
8	13.85	280	Catechin plus Procyanidin trimer
9	14.8	515	Cyanidin-3-glucoside
10	16.0	515	Petunidin-3-glucoside
11	16.1	280	Procyanidin trimer
12	16.5	280	Procyanidin dimer (B2)
13	18.1	280	Epicatechin
14	18.4	515	Peonidin-3-glucoside
15	19.3	525	Malvidin-3-glucoside
16	20.1	280	Procyanidin trimer
17	23.4	515	Vitisin A
18	23.6	365	Myricetin-3-glucoside
19	27.3	515	Peonidin-3-acetylglucoside
20	27.6	515	Malvidin-3-acetylglucoside
21	28.3	365	Quercetin-3-glucuronide
22	30.3	515	Malvidin-(caffeoyl)glucoside
23	31.2	515	Petunidin-3-(<i>p</i> -coumaroyl)glucoside
24	33.7	515	Peonidin-3-(<i>p</i> -coumaroyl)glucoside
25	34.1	515	Malvidin-3-(<i>p</i> -coumaroyl)glucoside



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

- A análise quantitativa da absorção de energia radiante pela matéria encontra-se regida pela *lei de Beer*.
- Incrementos sucessivos no número de moléculas de igual poder de absorção situadas no percurso de um feixe de radiação monocromática absorvem iguais frações de energia radiante que os atravessou.

$$A = a.b.c$$

A – absorvância (característica da amostra)

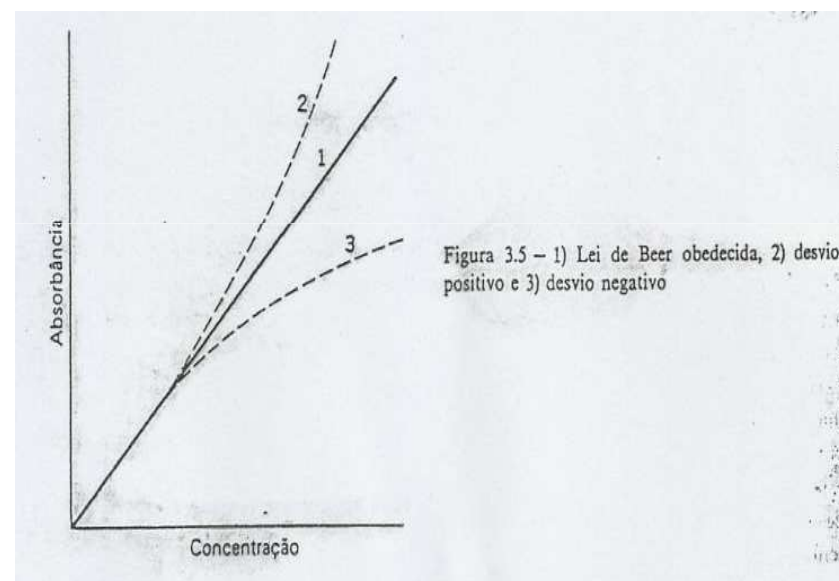
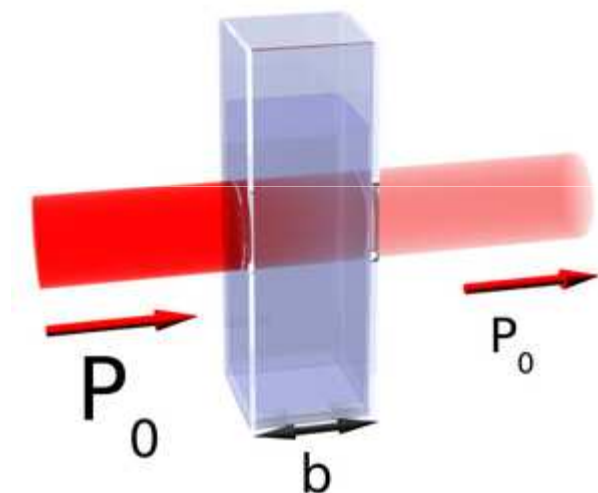
a – constante (absorvidade, característica da substância)

c – concentração

b – comprimento do percurso

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

Sistema de medição da cor pelo sistema L^* , a^* , b^* (CIE, 1976 ou CIELAB), representa melhor a percepção do olho humano relativamente à cor.

L^* - luminosidade (0 = preto, 100 = branco);

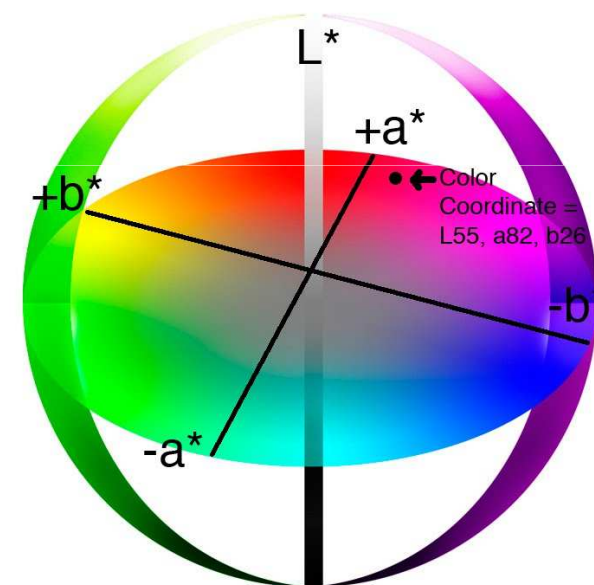
$a^* > 0$ = vermelho/púrpura;

$a^* < 0$ = verde;

$b^* > 0$ = amarelo;

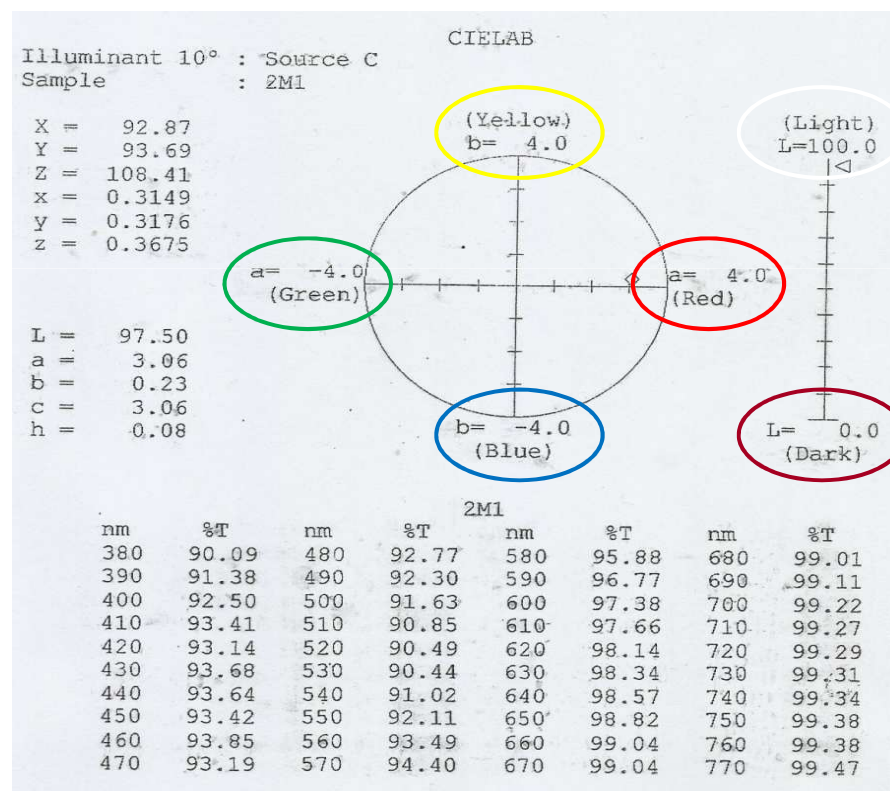
$b^* < 0$ = azul;

$a^* = b^* = 0$ = cor cinzenta



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de UV-Vis

Table 1 Evolution of chromatic coordinates (medium values of duplicate measurements) using CIELAB method in different model wine solutions containing malvidin-3-glucoside, (+)-catechin, and oak extract during 68 days of storage.

Model wine solutions	Chromatic coordinate evolution (storage days)								
	<i>L</i> [*]			<i>a</i> [*]			<i>b</i> [*]		
	1	24	68	1	24	68	1	24	68
Influence of oak extract									
Malvidin-3-glucoside alone	96.79	97.68	97.56	4.22	3.43	3.09	-0.19	-0.10	0.23
(+)-Catechin alone	99.77	100.26	99.65	-0.07	-0.01	0.0	0.85	0.38	0.25
Oak extract	97.85	94.31	93.65	-0.52	-2.89	-2.50	5.03	26.50	35.94
Malvidin-3-glucoside + (+)-catechin	99.63	98.79	97.89	0.67	1.47	1.47	-0.21	0.17	0.22
(+)-Catechin + oak extract	96.98	94.55	93.56	-2.35	-2.30	-1.90	25.06	24.94	27.91
Malvidin-3-glucoside + oak extract	96.13	80.16	79.80	7.97	5.02	-0.03	3.72	31.0	32.65
Malvidin-3-glucoside + (+)-catechin + oak extract	94.09	91.99	85.39	7.0	0.86	0.41	1.69	6.61	7.57
Influence of oxygen									
Malvidin-3-glucoside + oxygen	99.29	99.35	99.41	4.97	0.79	0.76	-0.24	0.10	0.42
Malvidin-3-glucoside + nitrogen	99.13	98.91	98.97	5.47	4.41	4.37	-0.21	-0.12	-0.21
Malvidin-3-glucoside + oak extract + oxygen	96.02	86.85	77.32	1.80	0.59	0.60	3.72	35.23	35.82
Malvidin-3-glucoside + oak extract + nitrogen	96.66	87.12	73.75	1.10	0.41	0.25	4.13	24.99	25.69

Jordão et al. (2006)

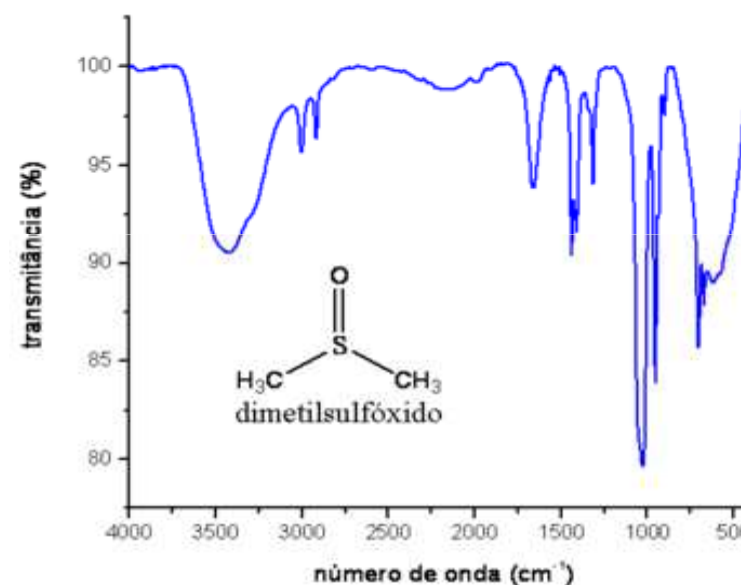
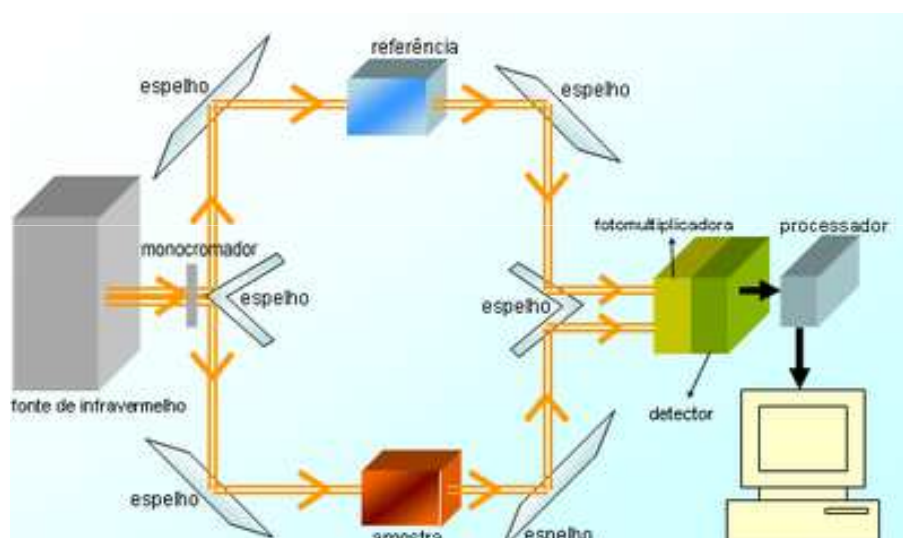
Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de infravermelho

- Técnica utilizada para a identificação de compostos orgânicos, assim como a visualização de estruturas moleculares desconhecidas.
- Os espectrofotómetros, apresentam os mesmos componentes dos restantes equipamentos que trabalham na região do visível e do ultravioleta.
- Pouca utilização na análise de rotina em enologia.

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de infravermelho



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

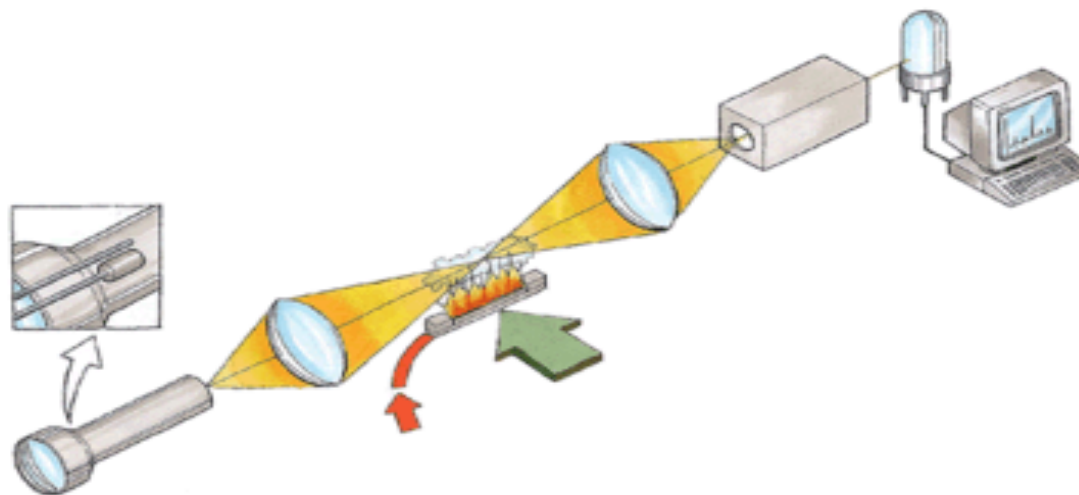
Análise instrumental – Espectrofotometria de absorção atômica

- Baseia-se na absorção de energia radiante por átomos neutros, não excitados, no estado gasoso.
- O elemento a determinar é levado à condição de uma dispersão atômica gasosa, através da qual se faz passar um feixe de radiação com comprimento de onda que possa ser convenientemente absorvido. Também a absorção atômica é gerida pela Lei de *Beer*.
- O processo mais usual, consiste em introduzir a solução da amostra, sob a forma de um aerossol numa chama apropriada.

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de absorção atômica

- Grande utilização em enologia, nomeadamente ao nível da determinação de elementos metálicos nos vinhos: catiões e aniões totais, ferro, cálcio, sódio, chumbo, cádmio, etc...



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de absorção atômica

Table 75. Flame Spectral Lines for Some Elements Used with AAS

Element	Wavelength (nm)	Best flame	Analytical sensitivity ($\mu\text{g/mL}$ for 1% abs.)	Detection limit ($\mu\text{g/mL}$)
Aluminum	309.3 (396.2) ^a	Acetylene–nitrous oxide	1.0	0.2
Arsenic	193.7	Hydrogen–argon	1.5	0.5
Calcium	422.7	Acetylene–nitrous oxide	0.02	0.005
Chromium	357.9	Acetylene–air	0.1	0.01
Copper	324.7	Acetylene–air	0.05	0.005
Iron	248.3	Acetylene–air	0.01	0.005
Potassium	766.5	Acetylene–air	0.05	0.005
Magnesium	285.2	Acetylene–air	0.005	0.001
Manganese	279.5	Acetylene–air	0.05	0.005
Molybdenum	313.3	Acetylene–nitrous	0.5	0.1



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

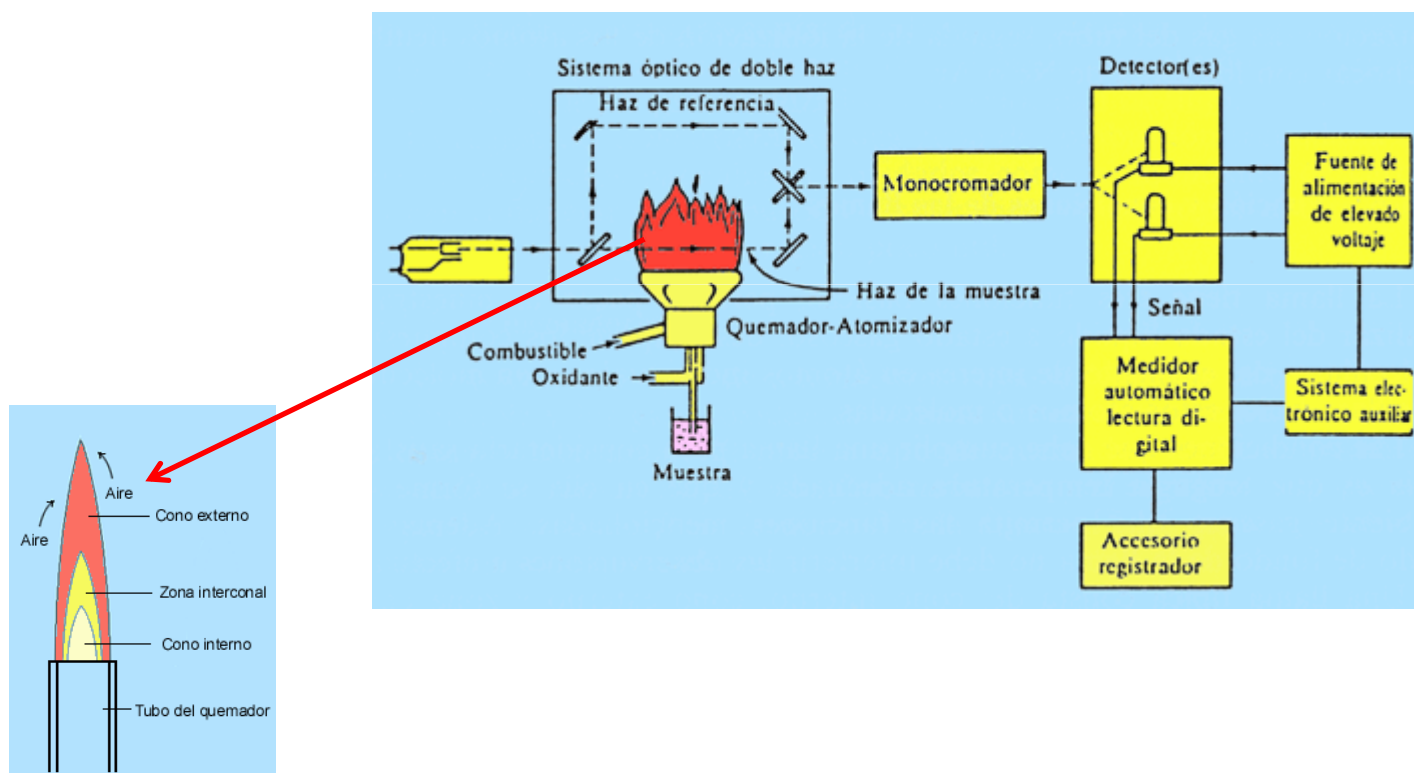
Análise instrumental – Espectrofotometria de absorção atômica

- Componentes básicos de um espectrofotómetro de absorção atómica:
 - Fonte de radiação;
 - Dispositivo de vaporização da amostra;
 - Monocromador;
 - Detetor;
 - Sistema de quantificação do sinal



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de absorção atômica



Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de absorção atômica

- **Fonte de radiação**

De forma ideal, devem de emitir radiação específica do elemento a determinar. Existem lâmpadas de zinco, cádmio, ...

- **Dispositivo de vaporização da amostra**

Introdução da amostra sob a forma de um aerossol na chama do combustor que se encontra no cominho óptico do feixe emitido pela fonte de radiação.

O sistema mais utilizado é o do nebulizador-combustor. O nebulizador deve de assegurar um fornecimento reproduzível do aerossol à chama, enquanto que o combustor deve produzir uma chama constante.

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de absorção atômica

- **Monocromador**

A função primordial consiste em separar o comprimento de onda necessário relativo à amostra relativamente ao emitido pela lâmpada.

- **Detetor**

No geral, os detetores são idênticos aos restantes espectrofotómetros de U-Vis.

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de absorção atômica

- **Exemplo da aplicação da espectrofotometria de absorção atômica na determinação do ferro nos vinhos:**
 - Método usual do OIV e método oficial Português (NP-2280).
 - Determinação realizada a 248.3 nm, com uma chama de ar-acetileno.
 - Pulverização direta da amostra na chama, sem qualquer tratamento prévio.
 - Possível interferência devido à presença de ácido cítrico (>200 mg/L).
 - Elaboração de uma curva de calibração do ferro para posterior determinação da concentração.

Métodos instrumentais de análise aplicados à enologia

Análise instrumental – Espectrofotometria de absorção atômica

- **Comprimento de onda para a determinação de vários metais em vinhos através da espectrofotometria de absorção atômica:**
 - **Potássio** (404.4 nm)
 - **Sódio** (330.2 nm)
 - **Cálcio** (422.7 nm)
 - **Magnésio** (285.0 nm)
 - **Cobre** (324.8 nm)