

DM

# Determinação de Metais em Vinho da Madeira e Rum da Madeira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Nelson Luís da Silva Granel**  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

*A Nossa Universidade*

[www.uma.pt](http://www.uma.pt)

dezembro | 2018

IVBAM

INSTITUTO DO VINHO, DO BORDADO E  
DO ARTESANATO DA MADEIRA, IP - RAM



# **Determinação de Metais em Vinho da Madeira e Rum da Madeira**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Nelson Luís da Silva Granel**

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADOR

José Carlos Antunes Marques

CO-ORIENTADOR

Isabel Margarida Soares de Sousa Mesquita Spranger Delgado  
Ana Cristina Rebola Pereira



## Determinação de metais em Vinho da Madeira e Rum da Madeira

A parte experimental deste trabalho foi realizada  
no Laboratório Vitivinícola do Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da  
Madeira, IP-RAM (IVBAM, IP-RAM)



## Agradecimentos

A cooperação existente entre a Universidade da Madeira e o Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, IP-RAM (IVBAM, IP-RAM), que constituiu a base para surgimento deste trabalho é de extrema importância uma vez que permite colmatar através da investigação, algumas lacunas presentes no setor regional do vinho e das bebidas espirituosas a cargo deste Organismo, procurando oferecer respostas que contribuam para a sua resolução.

Ao longo destes meses de trabalho, contributos de natureza diversa devem ser mencionados, pois ajudaram a que fosse possível a realização desta dissertação de mestrado. Agradeço a disponibilidade de várias pessoas e entidades, em particular:

- Ao meu orientador principal, Professor Doutor José Carlos Marques, por me ter lançado este desafio e permitir trabalhar sob a sua orientação e com isso enriquecer a minha formação académica e científica;
- À minha coorientadora da UMa, Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Pereira, pela ajuda concedida no tratamento estatístico dos resultados, partilha de conhecimento, amizade e pelo acompanhamento concedido ao longo do trabalho;
- Aos restantes colegas do QSALab: Dr<sup>a</sup> Vanda Nulita Pereira, João Micael Leça, Maria João Carvalho, Andreia Miranda, Carolina Vieira, Isabel Freitas, Anísia Martins, Marcelo Rodrigues e Marcelo Gaspar pela amizade, pela partilha de conhecimento e pela interajuda demonstrada.

E porque o sucesso desta dissertação deve-se sobretudo à abertura demonstrada por parte da entidade que me acolheu e me permitiu realizar este trabalho, tenho o dever de fazer os seguintes agradecimentos:

- Um muito obrigado ao Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, IP-RAM (IVBAM, IP-RAM) pela confiança que me foi depositada para realizar este trabalho nas respetivas instalações, permitindo desta forma

contribuir e muito para o meu crescimento pessoal e profissional. Agradecer igualmente pelo fornecimento das amostras analisadas nos diferentes estudos;

- Um agradecimento muito especial à minha coorientadora do IVBAM, Engenheira Isabel Spranger Delgado da DSAQ, pela forma amável com que fui recebido, pela oportunidade e confiança que me foi depositada, e que em muito contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal e profissional e para o sucesso deste trabalho. Também agradecer pelo tempo despendido na revisão da minha tese;
- E como não podia deixar de ser, quero agradecer do fundo do coração ao fantástico corpo técnico do laboratório: Dr<sup>a</sup> Patrícia Reis, Dr<sup>a</sup> Magna Fernandes, Rosária Silva, Eng<sup>a</sup> Rita Alves, Dr<sup>a</sup> Raquel Silva e Carmo Freitas pelo enorme carinho com que fui recebido desde o primeiro momento, pela amizade, pelo conhecimento partilhado e sobretudo por me ajudarem na adaptação ao IVBAM, IP-RAM, aspeto que foi determinante para este sucesso. Um obrigado especial à Eng<sup>a</sup> Susana Goes Ferreira por todo o acompanhamento durante as várias etapas deste trabalho.

Quero agradecer também ao Laboratório Regional de Controlo de Qualidade da Água (LQA), através da Eng<sup>a</sup> Alexandra Reynolds e ao Dr. Leonardo Spínola, pela formação em absorção atómica e pelo esclarecimento de dúvidas ao longo da execução do trabalho, o que se mostrou fundamental para um melhor conhecimento da respetiva técnica. Agradecer também pelos documentos fornecidos acerca das validações de métodos.

Agradecer igualmente ao Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (IVDP), através da Dr<sup>a</sup> Manuela Simões, pela disponibilidade e abertura para o esclarecimento de dúvidas e aconselhamento das abordagens a adotar sobre os vinhos.

Agradeço à Madeira Wine Company S.A, em particular ao Eng.<sup>o</sup> Francisco Albuquerque e à Dr<sup>a</sup> Marisela Pontes, pelo fornecimento das amostras para as quantificações por colorimetria, essenciais para o estudo comparativo EAA (Espectrofotometria de Absorção Atómica) vs Colorimetria.

Finalmente um agradecimento especial às pessoas mais importantes da minha vida, à minha mãe e ao meu irmão, aos quais não podia deixar de manifestar uma

palavra de reconhecimento muito especial, por todo o apoio e amor incondicional e pela forma como, ao longo da minha vida, sempre me encorajaram e incentivaram a dar sempre o meu melhor. Obrigado por acreditarem sempre em mim.



## Resumo

Vários trabalhos têm sido publicados sobre a composição mineral dos vinhos. Dos elementos mais estudados, destacam-se cobre e ferro (em vinhos e aguardentes) e sódio unicamente nos vinhos.

No presente trabalho, as determinações analíticas destes metais, foram realizadas por Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) por chama, em Vinho da Madeira e Rum da Madeira (este último pela primeira vez). As implementações das metodologias da OIV apresentaram uma boa linearidade ( $R^2 > 0,999$ ), alta sensibilidade e precisão (boa repetibilidade e reprodutibilidade). As taxas de recuperação foram próximas dos 100 %. Uma vez validada e analisada a aplicabilidade das metodologias nas duas matrizes em estudo, foram estudadas as variações nos teores dos elementos referidos acima em amostras de Vinho da Madeira (41 amostras) e Rum da Madeira (34 amostras) com base em três parâmetros. Os resultados obtidos por EAA foram também comparados com os resultados por colorimetria para o cobre e ferro em Vinho da Madeira.

No Vinho da Madeira observou-se que apenas um dos produtores tem registos superiores ao limite máximo recomendado pela OIV para o cobre e sódio. O grau de doçura dos vinhos e a idade são variáveis a ter em consideração, sendo que vinhos mais doces e com um envelhecimento mais prolongado, são os que apresentam maiores teores de cobre, ferro e sódio.

Nas amostras de Rum da Madeira, a concentração de cobre é cerca de três vezes superior à do ferro, sendo as amostras de Rum da Madeira Natural aquelas que mais contribuem para esta situação. A nível do processo de maturação em casco, ambos os metais registam tendência crescente, mais significativa nos primeiros anos de envelhecimento.

A comparação dos resultados por EAA e por colorimetria em Vinho da Madeira demonstram que os valores quantificados são tendencialmente superiores na colorimetria para os dois elementos em análise.

**Palavras-Chave:** Vinho da Madeira; Rum da Madeira; Metais; Espectrofotometria de Absorção Atômica, Colorimetria



## Abstract

Several papers have been published on the mineral composition of wines. Among the most studied elements, copper and iron (in wines and spirits beverages) and sodium are only prominent in wines.

In the present work, the analytical determinations of these metals were performed by Flame Atomic Absorption Spectrometry (AAS) in Madeira Wine and Rum of Madeira (the latter for the first time). The implementations of the OIV methodologies presented good linearity ( $R^2 > 0.999$ ), high sensitivity and precision (good repeatability and reproducibility). Recovery rates were close to 100%. Once validated and analyzed the applicability of the same in the two matrices under study, the variations in the contents of the mentioned elements were studied in samples of Madeira Wine (41 bottles) and Rum of Madeira (34 bottles) based on three parameters. The results obtained by AAS were also compared with the results by colorimetry for copper and iron in Madeira Wine.

In Madeira Wine it was observed that only one of the producers has registrations above the maximum limit recommended by the OIV for copper and sodium. The degree of sweetness of wines and age are variables to be taken into consideration, with sweeter wines with a longer ageing, which have higher copper, iron and sodium contents.

In Rum of Madeira, the concentration of copper is about three times higher than that of iron, and the samples of Rum Natural are the ones that contribute most to this situation. In the oak wood maturation process, both metals have a growing tendency, more significant in the first years of ageing.

The comparison of the results by AAS and colorimetry in Madeira Wine shows that the quantified values tend to be higher in the colorimetry for the two elements under analysis.

**Keywords:** Madeira Wine; Rum of Madeira; Metals; Atomic Absorption Spectrophotometry, Colorimetry



## Índice

### Parte I – Introdução Geral

1. Âmbito e Objetivos.....	1
2. Vinho da Madeira.....	3
2.1. Definição e Caracterização do Vinho da Madeira .....	3
2.2. Produção e Envelhecimento do Vinho da Madeira .....	3
2.3. Investigação científica sobre o Vinho da Madeira.....	4
2.4. Legislação em vigor para o Vinho da Madeira.....	5
3. Rum da Madeira.....	7
3.1. Definição e Caracterização do Rum da Madeira .....	7
3.2. Produção e Envelhecimento do Rum da Madeira .....	8
3.3. Legislação em vigor para o Rum da Madeira.....	9
4. Análise de Vinhos por Espectrofotometria de Absorção Atómica: Revisão.....	10
5. Análise de Aguardentes não Vínicas por Espectrofotometria de Absorção Atómica: Revisão.....	18
6. Espectrofotometria de Absorção Atómica (EAA) .....	20
6.1. Aspetos Históricos .....	20
6.2. Princípio da técnica de Espectrofotometria de Absorção Atómica .....	21
6.3. Processo de Atomização .....	22

### Parte II - Implementação das Metodologias

Introdução .....	25
7. Materiais e Métodos .....	25
7.1. Reagentes.....	25
7.2. Amostras de Vinho da Madeira e Rum da Madeira .....	26
7.3. Equipamento e Condições operatórias .....	27
7.4. Preparação e análises das amostras por EAA.....	28

7.4.1.	Vinho da Madeira .....	28
7.4.2.	Rum da Madeira .....	29
7.5.	Análise das amostras por Colorimetria.....	29
7.5.1.	Vinho da Madeira .....	29
7.6.	Tratamento Univariado dos Dados.....	29
7.7.	Validação dos Métodos.....	30
7.7.1.	Gama de trabalho e Linearidade .....	30
7.7.2.	Teste de Homogeneidade de variâncias .....	31
7.7.3.	Limites Analíticos (LOD e LOQ) .....	32
7.7.4.	Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade).....	32
7.7.5.	Exatidão .....	33
7.7.6.	Fator de Desempenho (Z-Score).....	33

### **Parte III - Resultados e Discussão**

8.	Processo de Validação dos Métodos .....	37
8.1.	Ensaio Interlaboratoriais .....	39
8.2.	Efeito Matriz .....	40
8.3.	Aplicabilidade dos métodos de determinação de cobre e ferro em amostras de bebidas espirituosas através de ensaios interlaboratoriais .....	42
8.4.	Determinação de Cobre, Ferro e Sódio em amostras de Vinho da Madeira ..	43
8.4.1.	Comparação por produtor.....	43
8.4.2.	Comparação por Grau de Doçura.....	48
8.4.3.	Análise por Idade .....	50
8.5.	Comparação das quantificações EAA vs Colorimetria .....	51
8.6.	Determinação dos metais Cobre e Ferro em Rum da Madeira .....	54
8.6.1.	Análise por Produtor .....	54
8.6.2.	Análise por Tipo de Rum.....	56

8.6.3. Análise por Idade .....	57
--------------------------------	----

#### **Parte IV - Conclusões e Perspetivas Futuras**

9. Conclusões.....	63
10. Perspetivas Futuras .....	67
11. Bibliografia.....	69

#### **Parte V - Anexos**

Anexo I.....	79
Anexo II.....	86



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Limites máximos admissíveis pela OIV .....	6
<b>Tabela 2</b> - Dados relativos aos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos fortificados .....	11
<b>Tabela 3</b> - Dados relativos aos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos tranquilos de diferentes regiões.....	12
<b>Tabela 4</b> - Condições experimentais relativas à quantificação dos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos fortificados .....	14
<b>Tabela 5</b> - Condições experimentais relativas à quantificação dos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos tranquilos .....	15-17
<b>Tabela 6</b> - Teores de Cu e Fe registados na literatura para algumas amostras de cachaça determinados por EAA por chama .....	18
<b>Tabela 7</b> - Condições experimentais relativas à quantificação dos teores de Cu e Fe em amostras de cachaça .....	19-20
<b>Tabela 8</b> - Condições instrumentais utilizadas para a leitura de cobre, ferro e sódio ...	28
<b>Tabela 9</b> - Quadro-resumo dos parâmetros de validações de Cu, Fe e Na no Vinho da Madeira.....	38
<b>Tabela 10</b> - Resultados dos ensaios interlaboratoriais para Cu e Fe .....	39
<b>Tabela 11</b> : Taxas de recuperação obtidas no estudo de efeito matriz em vinhos fortificados no cobre .....	41
<b>Tabela 12</b> - Resultados de cobre e ferro em amostras do BIPEA utilizadas nos ensaios interlaboratoriais.....	42
<b>Tabela 13</b> : Comparação dos resultados das análises EAA vs Colorimetria.....	52
<b>Tabela 14</b> : Comparação dos resultados de Cu e Fe em amostras independentes.....	53
<b>Tabela 15</b> - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Cu nas amostras de Vinho da Madeira .....	79-80

**Tabela 16** - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Fe nas amostras de Vinho da Madeira ..... 81-82

**Tabela 17** - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Na nas amostras de Vinho da Madeira ..... 83-85

**Tabela 18** - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Cu nas amostras de Rum da Madeira ..... 86-88

**Tabela 19** - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Fe nas amostras de Rum da Madeira ..... 86-90

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema ilustrativo das várias etapas para a produção de Rum da Madeira..	8
<b>Figura 2:</b> Curvas de Distribuição Normal para as amostras utilizadas nos ensaios interlaboratoriais.....	39
<b>Figura 3:</b> Comparação da quantificação de cobre e ferro em diferentes produtores de Vinho da Madeira.....	44
<b>Figura 4:</b> Quantificações de Na nas amostras de Vinho da Madeira de vários produtores.....	47
<b>Figura 5:</b> Comparação dos teores de Cu e Fe entre amostras de várias doçuras-.....	48
<b>Figura 6:</b> Resultados de Na entre amostras de vários graus de doçura.....	49
<b>Figura 7:</b> Influência do fator idade nos teores de Cu e Fe.....	50
<b>Figura 8:</b> Impacto do fator idade nos teores de Na.....	50
<b>Figura 9:</b> Diferenças registadas nos teores de Cu e Fe entre empresas produtoras.....	54
<b>Figura 10:</b> Teores de Cu e Fe nas amostras de Rum da Madeira de acordo com o tipo de Rum.....	56
<b>Figura 11:</b> Comparação dos teores de Cu e Fe em função da Idade.....	58

## Índice de Equações

<b>Equação 1:</b> Cálculo do Valor PG.....	31
<b>Equação 2:</b> Cálculo do Limite de Detecção.....	32
<b>Equação 3:</b> Cálculo do Limite de Quantificação.....	32
<b>Equação 4:</b> Cálculo do Desvio Padrão Relativo.....	33

**Equação 5:** Cálculo da percentagem de recuperação.....33

**Equação 6:** Cálculo do fator de desempenho Z-Score.....34

## Lista de Abreviaturas

ALABE – Associação de Laboratórios de Enologia

BE – Bebidas Espirituosas

CEE – Comunidade Económica Europeia

CE – Comunidade Europeia

Cu – Cobre

EAA – Espectrofotometria de Absorção Atómica

Fe - Ferro

HNO<sub>3</sub> – Ácido Nítrico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogénio

IVBAM – Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, IP-RAM

IGP – Indicação Geográfica Protegida

IEC - Comissão Eletrotécnica Internacional

ISO – Organização Internacional para Padronização

L/min – Litros por minutos

LOD – Limite de Deteção

LOQ – Limite de Quantificação

Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – Nitrato de Magnésio

MΩ – MegaOhm

m/v – Massa por Volume

Na- Sódio

nm - Nanómetro

NP – Norma Portuguesa

OIV- Organização Internacional da Vinha e do Vinho

pg – Picograma

PG- Cálculo do valor da diferença de variância

$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  – Nitrato de Paládio

$R^2$  – Coeficiente de Correlação

RSD – Desvio Padrão Relativo

RAM – Região Autónoma da Madeira

s- Segundos

S- Cálculo da Variância

UE – União Europeia

$\mu\text{g/L}$  – Micrograma por Litro

## **Parte I – Introdução Geral**



## 1. Âmbito e Objetivos

Diversos elementos presentes na composição mineral de um vinho representam do ponto de vista da investigação em Química Enológica, diferentes graus de importância de acordo com as concentrações presentes. A determinação dos teores de alguns desses elementos, nomeadamente cobre e ferro é essencial para o controlo das suas concentrações, de modo a garantir a segurança e qualidade do produto. Nesse sentido, a OIV (Organização Internacional da Vinha e do Vinho), tem estabelecido restrições progressivamente mais exigentes a nível quantitativo para estes elementos (1).

Para além da importância do controlo destes parâmetros, de modo a constatar o cumprimento das normas em vigor, a determinação da composição mineral de um vinho pode representar igualmente um excelente parâmetro identificador da origem geográfica das uvas utilizadas na produção dos vinhos, contribuindo de forma substancial na caracterização e diferenciação de vinhos (2-5).

Até à data, apenas um artigo documenta os teores de alguns destes elementos no Vinho da Madeira, nomeadamente a análise de cerca de 21 amostras de vinho. Relativamente ao Rum da Madeira, não existem dados publicados sobre teores de metais nesta matriz, pelo que o presente trabalho foca-se na implementação de uma metodologia analítica que permitisse fazer um *screening* de alguns destes elementos em amostras destas duas matrizes: Vinho da Madeira e Rum da Madeira.

O trabalho desenvolvido contempla os seguintes objetivos: primeiro, as padronizações e validações das metodologias para os três metais na matriz Vinho da Madeira (sódio, cobre e ferro) e dois metais na matriz de Rum da Madeira (cobre e ferro), isto de modo a futuramente tornar-se um método de rotina nos dois produtos; em segundo lugar, a determinação destes metais em amostras correntes para o estudo das variações registadas nos teores de cobre, ferro e sódio nas duas bebidas com base em três variáveis de estudo, através de Espectrofotometria de Absorção Atómica (EAA). A escolha para o estudo nestas matrizes, deriva da importância que estes produtos representam para a economia e imagem internacional da Região, razão pela qual têm

vindo a ser objeto de vários estudos de caracterização e sobretudo da análise de processos para que sejam produtos cada vez mais evoluídos e que correspondam aos mais altos padrões de qualidade quer determinados pelas autoridades regionais e nacionais quer aos requisitos da União Europeia (EU) e da OIV. Os problemas de ordem toxicológica constatados para os vinhos e para as bebidas espirituosas determinam que metais, tais como cobre e ferro, representam elementos potenciais com implicações na qualidade dos respetivos produtos nomeadamente pelo aparecimento de casses cúpricas e férricas e, dessa forma, escolhidos para este estudo dos metais pela primeira vez analisados em diferentes variáveis de estudo. Especificamente no âmbito da Química Enológica, o sódio é de especial interesse uma vez que representa um possível indicador de ações enológicas não regulamentadas com influência nas características gustativas do vinho. Atualmente e a nível regional, não existe forma de determinar os teores destes elementos, não sendo possível constatar o cumprimento dos limites impostos ou recomendados para os vinhos fortificados e para bebidas espirituosas. Esta situação representa uma carência no setor vitivinícola e das bebidas espirituosas, preponderantes na economia da Região Autónoma da Madeira (RAM), pretendendo este trabalho suprimi-la. Foi ainda analisado a viabilidade da aplicação dos métodos e respetivas condições analíticas e instrumentais implementados para o Vinho da Madeira no caso do Rum da Madeira, nomeadamente na determinação de cobre e ferro. Por fim, comparou-se os resultados obtidos por Espectrofotometria de Absorção Atómica (método oficial da OIV) e o método por Colorimetria (método alternativo também reconhecido pela OIV e amplamente utilizado no sector vitivinícola), para quantificar cobre e ferro em amostras de Vinho da Madeira.

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, IP-RAM (IVBAM, IP-RAM) e realizado nas instalações do Laboratório Vitivinícola deste Organismo.

## 2. Vinho da Madeira

### 2.1. Definição e Caracterização do Vinho da Madeira

O Vinho da Madeira é uma bebida alcoólica fortificada/licorosa com um teor alcoólico entre 17 e 22% vol.. Desde o século XV até os tempos mais recentes, o Vinho da Madeira representa um produto de excelência, internacionalmente reconhecido, não apenas pelo seu contexto histórico mas também devido às suas características singulares, representando um produto com um valor significativo para a balança comercial da RAM (Portugal). As suas características, isto é, os sabores e aromas acentuados e intensos fazem com que esta bebida tenha uma grande versatilidade, permitindo-lhe ser servida como aperitivo, digestivo ou ainda no acompanhamento de refeições específicas. De destacar também a sua elevada longevidade, mesmo após a abertura da garrafa contrariamente aos vinhos tranquilos.

As particularidades evidenciadas pelo Vinho da Madeira resultam, em parte de alguns aspetos como a localização geográfica da região, o seu solo de origem basáltica, a proximidade do mar e as condições climáticas subtropicais (temperatura e humidade). Outro fatores com influência nas características singulares demonstradas por este vinho prende-se com as condições de vinificação e com o próprio processo de envelhecimento. O Vinho da Madeira pode ser produzido a partir de uma grande variedade de castas pertencentes à espécie *Vitis Vinífera* L. (6), dividindo-se estas em dois grandes grupos: o grupo das castas recomendadas e o grupo das castas autorizadas. No grupo das castas recomendadas destacam-se a Malvasia, o Verdelho, o Bual, o Terrantez e o Sercial. Já a casta tinta recomendada mais utilizada é a Tinta Negra.

### 2.2. Produção e Envelhecimento do Vinho da Madeira

O processo de vinificação do Vinho da Madeira é ímpar, sendo um dos factores que para além do tipo de envelhecimento a que este vinho é sujeito, permite-lhe alcançar um perfil aromático único.

Após as habituais etapas de colheita e processamento da uva, o mosto atinge a fase fermentativa. O período de extensão da fermentação é definido com base na variedade de uva e no tipo de vinho desejado, nomeadamente o grau de doçura, obtendo-se quatro estilos diferentes: vinhos secos (49,1 g/L), meio secos (64,8 g/L), meio doces (80 g/L) e doces (96,1 g/L). Ao atingir os valores de densidade e de grau Baumé desejados em função do tipo de doçura pretendido, a fermentação é interrompida pela adição de álcool vínico (com um teor em álcool mínimo de 96% em volume), elevando dessa forma o grau alcoólico do vinho para teores entre 17 e 22 % vol. (7).

Já quanto ao envelhecimento, este pode ocorrer por dois processos distintos: o processo de canteiro e o processo de estufagem. No caso do envelhecimento por canteiro, os vinhos selecionados são envelhecidos em cascos, normalmente nas zonas dos armazéns mais altas (por atingirem temperaturas mais elevadas) e onde se mantêm por um período mínimo de três anos. O envelhecimento oxidativo em casco a que estes vinhos estão sujeitos faz com que desenvolvam aromas intensos e complexos. Já no processo de envelhecimento por estufagem, o vinho é submetido a um envelhecimento térmico acelerado, não oxidativo, por um período nunca inferior a três meses, a uma temperatura entre os 45 e 50º Celsius.

Estes processos representam uma diferenciação que faz do Vinho da Madeira um vinho distinto (6,8,9).

### 2.3. Investigação científica sobre o Vinho da Madeira

O Vinho da Madeira constitui um produto altamente valorizado, quer pelas empresas produtoras desta bebida, quer para a própria imagem da Madeira enquanto destino turístico.

Por outro lado, este vinho tem constituído uma base importante para os estudos científicos desenvolvidos por investigadores da região, atendendo à complexidade do produto. Aliás, os trabalhos científicos sobre o Vinho da Madeira têm registado um aumento significativo nos últimos anos, promovendo deste modo um melhor

conhecimento sobre a composição do vinho ou, de modo particular, sobre alguns fenómenos que ocorrem durante a sua produção, principalmente durante a fase de envelhecimento (6,7). Acima de tudo, estes estudos garantem uma qualidade e um rigor científico que são fundamentais para o conhecimento destes vinhos fortificados. Atualmente, estão publicados um número bastante considerável de estudos sobre os Vinhos da Madeira, relacionados sobretudo com a determinação dos compostos que compõem o seu perfil sensorial (8-18). Outra área profundamente estudada diz respeito ao processo de estufagem, na qual foi avaliado o impacto que este processo de envelhecimento proporciona nas principais características e constituintes do Vinho da Madeira (19). Concretamente em relação ao estudo mineral deste produto, há somente um registo, datado de 2011, da determinação do teor mineral de uma série de elementos, entre os quais também se incluem os três metais estudados neste trabalho. O grupo de investigadores responsáveis por esse estudo avaliou 21 amostras de Vinho da Madeira aos quais foram determinados os teores médios de cobre, ferro e sódio. Os valores médios quantificados foram os seguintes: cobre (0,86 mg/L), ferro (3,02 mg/L) e sódio (50,1 mg/L) (20).

#### 2.4. Legislação em vigor para o Vinho da Madeira

Nas últimas décadas, têm ocorrido diversas alterações no que diz respeito ao setor vitivinícola na RAM, consequência, por um lado, das importantes reformas que a vitivinicultura tem sofrido no contexto do mercado nacional e europeu e, por outro lado, da dedicação e do dinamismo demonstrado pelos agentes económicos na potencialização de crescimento deste setor (21).

As normas legislativas atualmente em vigor para este setor são: o Regulamento (UE) nº 1308/2013, do Parlamento Europeu e do Conselho, aprovado a 17 de Dezembro de 2013 (22), que estabelece uma organização comum dos mercados dos produtos agrícolas e o Decreto Legislativo Regional nº 1/2015/M, de 9 de Janeiro (21), que define a orgânica do IVBAM, IP-RAM, tendo concentrado a gestão das áreas da vinha, do vinho, do bordado e do artesanato da Madeira a este Organismo.

Especificamente em relação ao Regulamento da Produção e do Comércio do Vinho da Madeira, todas as questões relacionadas com o processo produtivo, práticas enológicas autorizadas, envelhecimento e comercialização estão publicadas na Portaria nº38/2015 de 13 de Fevereiro (23,24), que Aprova as Regras Relativas à Designação, Denominação, Apresentação e Rotulagem do Vinho com Denominação de Origem “Madeira”.

Em 1995, a OIV, através da formulação de um relatório de dados, instituiu como prioridade o conhecimento sobre os teores de elementos minerais presentes no vinho. Com base em estudos sobre a identificação da origem da ocorrência dos metais, de modo a permitir o controlo desses teores, foram estabelecidos limites a partir de um maior conhecimento científico (25). Posto isso, no documento redigido pela OIV presente no anexo C do “Recueil des Methodes Internationales D'Analyses” – “Limites maximales acceptables de divers éléments” de 2015 (26) estão atualizados vários limites para alguns dos metais frequentemente presentes na composição mineral dos vinhos.

A tabela 1 resume os teores máximos recomendados por este Organismo relativamente aos elementos abordados no âmbito deste trabalho.

Tabela 1 – Limites máximos admissíveis pela OIV (Fonte: OIV, 2015 (26))

<b>Metal</b>	<b>Concentração máxima (mg/L)</b>
<b>Cu</b>	1
<b>Fe</b>	n.r
<b>Na</b>	80

n.r – não regulamentado

De salientar que a nível nacional ou regional, não existe legislação que defina limites para os teores destes metais em vinhos fortificados.

### 3. Rum da Madeira

#### 3.1. Definição e Caracterização do Rum da Madeira

O Rum da Madeira, tradicionalmente designado por aguardente de cana, é obtido a partir de dois processos: inicialmente por fermentação alcoólica e posteriormente por destilação do sumo de cana-de-açúcar. O produto final deve apresentar um teor alcoólico mínimo de 37,5 % por vol. (27). É uma bebida que apresenta a designação de Indicação Geográfica Protegida (IGP) produzida na RAM.

Fundamentalmente, o destilado apresenta-se límpido e brilhante e a cor final é dependente do tipo de rum produzido: variando de incolor a tons ligeiros amarelados para o Rum da Madeira Natural, de incolor a tons acastanhados para o Rum da Madeira Beneficiado ou de amarelado a tons acastanhados para o Rum da Madeira Envelhecido. Concretamente nas amostras de Rum da Madeira Envelhecido, a cor predominante deriva do estágio em cascos de madeira de carvalho durante o processo de envelhecimento (28).

Sendo um produto que deriva da cana-de-açúcar fermentada, o Rum da Madeira apresenta aromas característicos provenientes da matéria-prima, podendo no entanto apresentar algumas particularidades consoante o tipo de rum produzido:

- ⇒ **Rum da Madeira Natural:** apresenta aromas característicos provenientes da destilação da cana-de-açúcar fermentada conjuntamente com notas alcoólicas pungentes;
- ⇒ **Rum da Madeira Edulcorado/Beneficiado:** aromas característicos a partir da cana-de-açúcar fermentada. Apresenta um aroma mais neutro e macio ao olfato, fator determinado pelo tipo de edulcorante adicionado;
- ⇒ **Rum da Madeira Envelhecido:** aromas que derivam igualmente da destilação da cana-de-açúcar, apresentando um perfil sensorial de enorme complexidade derivado do tipo de envelhecimento, que confere ao produto aromas tostados, abaunilhados e caramelizados. Estes aromas são intensificados com o tempo de maturação, tornando-se mais complexos e ricos (28).

### 3.2. Produção e Envelhecimento do Rum da Madeira

Depois da apanha manual da cana-de açúcar, esta é sujeita a uma moagem. O mosto é posteriormente decantado, seguindo-se uma filtração, com o objetivo de o tornar o mais limpo e homogéneo possível. Antes do início da fermentação, é ainda ajustado o teor de açúcares, importante na otimização do processo fermentativo. Ocorre então o processo de fermentação, caracterizando-se este por ser um processo lento, que poderá levar alguns dias, dependendo das condições de temperatura (Figura 1).

Após a fermentação, o líquido pode ser sujeito a uma segunda decantação ainda antes de ser destilado, o que contribui para a manutenção da qualidade e sabor deste produto (28).

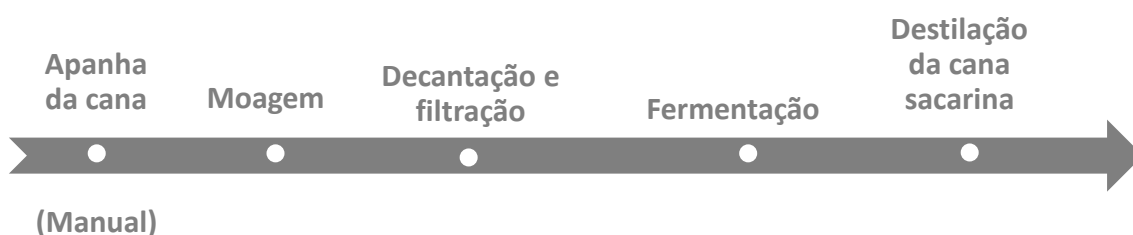


Figura 1- Esquema ilustrativo das várias etapas para a produção de Rum da Madeira (Fonte: Ficha Técnica IG Rum Madeira, 2014)

Assim, as características do Rum da Madeira provêm de dois factores distintos: do processo produtivo e do processo de envelhecimento.

Tal como o Vinho da Madeira, o rum é envelhecido em cascos de madeira de carvalho por um período mínimo de três anos. Derivado do contacto e do tempo de estágio, a bebida adquire uma vasta gama de aromas e sabores específicos característicos do Rum da Madeira, em virtude dos fenómenos oxidativos promovidos por este tipo de envelhecimento (28).

### 3.3. Legislação em vigor para o Rum da Madeira

Para o setor agrícola no âmbito europeu, as bebidas espirituosas representam uma importância extrema para todos os agentes económicos envolvidos, tendo as reformas implementadas neste setor vindo a contribuir para se atingir um elevado grau de proteção para os consumidores. Desta forma, o atual quadro jurídico-regulamentar passou a fixar critérios claros quanto à produção, designação, apresentação e rotulagem deste tipo de produtos (25).

O Regulamento (CE) n.º 110/2008, aprovado pelo Parlamento e pelo Conselho Europeu, a 15 de Janeiro (29), veio estabelecer as diretrizes aplicáveis à definição, designação, apresentação e rotulagem das bebidas espirituosas, bem como relativas à proteção das indicações geográficas de certas bebidas espirituosas tendo revogado o Regulamento (CEE) n.º 1576/89, do Conselho, de 29 de Maio (30) anteriormente em vigor. Dessa forma, o Rum da Madeira ostenta uma indicação geográfica registada no anexo III desse mesmo regulamento (29) e como tal, beneficia de uma série de proteções e reconhecimentos.

A nível regional, a produção e comercialização do Rum da Madeira está regulamentada pelo Decreto Legislativo Regional n.º 5/2011/M, de 15 de Março (27), redefinida a partir da Portaria n.º 68/85, de 21 de Junho, que estabelece as várias categorias de rum e as menções tradicionais correspondentes, bem como as demais regras de rotulagem que se aplicam ao Rum da Madeira, particularmente ao rum envelhecido (27). Tal como acontece no Vinho da Madeira, o Organismo de Controlo e Certificação deste setor é o IVBAM, IP-RAM.

Atualmente são escassos os documentos/normas legislativos relacionados com controlo dos elementos minerais nas bebidas espirituosas sendo uma matéria que carece de maior aprofundamento do conhecimento científico. Nos regulamentos referidos anteriormente, tanto no Regulamento (CE) n.º 110/2008 de 15 de Janeiro (29) como no Decreto Legislativo Regional n.º 5/2011/M, de 15 de Março (27), não se encontra mencionado em nenhum ponto, qualquer restrição regulamentar para os metais.

Todavia, com base na Instrução Normativa nº 13, de 29 de Junho da regulamentação brasileira, descrita no documento “Regulamento Técnico para Fixação

dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça” (31), estão impostas no seu ponto 5, algumas restrições para contaminantes inorgânicos entre os quais se destaca o cobre. De acordo com o referido documento, o limite máximo admissível para o cobre é 5 mg/L (de referir que no caso do ferro não está imposta qualquer restrição).

Pertencente à mesma categoria do Rum da Madeira, para a aguardente de medronho (proveniente do arbusto *Arbutus unedo* L) está previsto, no ponto 2 do artigo 3º do Decreto-Lei nº238/2000 de 26 de Setembro (32), um teor máximo admissível para o cobre de 15 mg/L.

Os dois valores acima referidos servirão como uma simples referência para a discussão das amostras de Rum da Madeira no ponto 8.6 deste trabalho.

#### **4. Análise de Vinhos por Espectrofotometria de Absorção Atômica: Revisão**

A determinação de metais nos vinhos tem sido objeto de crescente interesse do ponto de vista científico, uma vez que a sua complexação pode reduzir a sua toxicidade e biodisponibilidade (25). Atualmente a determinação analítica de elementos como o cobre, o ferro e o sódio em vinhos é realizada com recurso à técnica de EAA por chama ar-acetileno. A nível nacional encontram-se publicadas duas Normas Portuguesas (Cobre- NP 2442, 1988 (33); Ferro- NP 2280, 1988 (34)) para a determinação por EAA por chama para estes 2 metais, técnica que é também aplicada no método oficial do OIV (OIV-MA-AS322-06- Copper (35) e OIV-MA-AS322-05ª – Iron) (36).

O conhecimento sobre os teores existentes de cobre, ferro e sódio nas amostras de vinho é fundamental para avaliar o impacto da sua concentração no fator qualidade e nas características organoléticas. Se por um lado as concentrações de ferro e cobre estão diretamente relacionadas com a estabilidade e a evolução oxidativa dos vinhos, por outro lado, o sódio representa um parâmetro que pode indicar práticas enológicas não autorizadas (25,37,38). Por estes motivos, estes três elementos têm sido alvo de várias publicações em diferentes tipos de vinhos no âmbito da Química Enológica.

Os dois quadros abaixo apresentam os teores registados em diferentes estudos para vinhos fortificados e tranquilos. Referência para o único artigo publicado até este momento sobre a determinação de vários metais (alguns deles estudados neste âmbito) no Vinho da Madeira (20) e que naturalmente servirão como elemento comparativo para este trabalho.

Tabela 2- Dados relativos aos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos fortificados

Vinho Fortificado	Concentração (mg/L)			Referência
	Na	Fe	Cu	
Vinho da Madeira	50,10 ± 34,3	3,02 ± 1,33	0,86 ± 0,73	(20)
Vinho "Fino" Sherry (Jerez)	ND	[3,19-12,23]	[0,04-0,21]	(39)
Vinhos "Oloroso" Sherry (Jerez) Montilla-Moriles, Condado de Huelva)	Jerez: 90,60 ± 20,3	2,76 ± 1,08	1,06 ± 0,69	(40)
	Montilla: 127 ± 16,6	3,75 ± 1,43	0,79 ± 0,33	(40)
	Huelva: 54,70 ± 20,5	5,13 ± 1,56	0,82 ± 0,46	(40)
Vinho do Porto	ND	ND	[0,05-0,22]	(41)
Vinhos "Fino" Sherry (Jerez Manzanilla, Condado de Huelva)	Jerez: 33,25 ± 7,96	1,73 ± 0,7	0,30 ± 0,16	(42)
	Manza: 29,74 ± 4,11	1,84 ± 0,5	0,22 ± 0,15	(42)
	Huelva: 31,77 ± 10,51	3,83 ± 1,8	0,33 ± 0,25	(42)

ND- Não Determinado

Tabela 3- Dados relativos aos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos tranquilos de diferentes regiões

Vinho Tranquilo	Concentração (mg/L)						Referência
	Na		Fe		Cu		
Vinho Madeira	52,35 ± 24,0		1,42 ± 0,77		0,30 ± 0,25		(20)
Vinhos Açorianos (Pico)	50,14 ± 14,0		1,66 ± 1,11		0,14 ± 0,14		(20)
Vinhos Açorianos (Terceira)	53,53 ± 19,0		1,41 ± 0,84		0,31 ± 0,28		(20)
Vinho das Canarias (Tenerife: Tinto e Branco)	Tinto: 93,83 ± 40,0		2,8 ± 0,87		0,19 ± 0,15		(43)
	Branco: 82,17 ± 37,0		1,83 ± 0,84		0,26 ± 0,17		(43)
Vinho das Canarias (Gran Canaria)	89,0 ± 71,0		3,65 ± 1,29		0,12 ± 0,12		(44)
Vinho das Canarias (La Palma, Lanzarote: Seco e Doce)	69,69 ± 18,2	79,0 ± 34,0	2,42 ± 0,8	2,66 ± 1,0	0,10 ± 0,09	0,23 ± 0,14	(45)
	167,20 ± 29,9	164,47 ± 29,3	4,0 ± 2,5	2,0 ± 1,2	0,19 ± 0,16	0,44 ± 0,22	(45)
Vinhos Argentinos (Cordoba, San Juan, La rioja)	Córdoba: 36		3,73		<LOQ		(46)
	San Juan: 58		2,84		<LOQ		(46)
	La Rioja: 138		2,68		<LOQ		(46)
Vinhos Uruguaios (Tinto e Branco)	ND		Tinto: [1,03-4,64]		[0,03-0,33]		(49)
			Branco: [0,14-2,55]		[0,03-0,23]		
Vinhos Turcos (Cabernet, Merlot, Sauvignon Blanc, Chardonnay)	ND		Cabernet: 2,24 ± 0,26		0,1 ± 0,005		(48)
			Merlot: 1,83 ± 0,03		0,19 ± 0,01		(48)
			Sauvignon: 0,76 ± 0,08		0,31 ± 0,008		(48)
			Chardo: 1,27 ± 0,28		0,15 ± 0,002		(48)

ND- Não Determinado;  $LOQ_{(cobre)} = 0,15 \text{ mg/L}$  (46)

Existem duas abordagens principais para o pré-tratamento dos vinhos - digestão preliminar da amostra (ácida ou micro-ondas) e medição instrumental direta (após diluição) foram adotadas para a determinação por EAA em vinhos. As tabelas abaixo indicam as condições de pré-tratamento selecionadas e algumas condições analíticas e instrumentais usadas em diversas publicações referentes à determinação de minerais no vinho.

Tabela 4- Condições experimentais relativas à quantificação dos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos fortificados

Vinho Fortificado	Elemento	Comprimento de onda (nm)	Pré-tratamento	Tipo de análise	Supressores	LOD	Gama de trabalho	Referência
Vinho da Madeira	Na	589,0	Diluição com HNO <sub>3</sub>	Chama ar-acetileno	Cloreto de lítio	Não indica	Não indica	(20)
	Fe	248,3	Digestão por micro-ondas		Cloreto de lantânio			(20)
	Cu	324,8	Digestão por micro-ondas		Sem supressores			(20)
Vinhos "Oloroso" Sherry (Jerez, Montilla-Moriles, Condado de Huelva)	Fe	248,3	Digestão ácida com HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Chama ar-acetileno	Sem supressores	Não indica	Não indica	(40)
	Cu	324,8	Digestão ácida com HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Sem supressores			(40)
Vinho "Fino" Sherry (Jerez)	Fe	248,3	Sem pré-tratamento	Chama ar-acetileno	Sem supressores	Não indica	0,1-2 mg/L	(39)
	Cu	324,8	Sem pré-tratamento		Sem supressores		0,05-1mg/L	(39)
Vinho do Porto	Cu	324,8	Sem pré-tratamento		Sem supressores	Não indica	Não indica	(41)

Tabela 5- Condições experimentais relativos à quantificação dos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos tranquilos

Vinho Tranquilo	Elemento	Comprimento de onda (nm)	Pré-tratamento	Tipo de análise	Supressores	LOD	Gama de trabalho	Referência
<b>Vinho da Madeira</b>	Na	589,0	Diluição com HNO <sub>3</sub>	Chama ar-acetileno	Cloreto de lítio	Não indica	Não indica	(20)
	Fe	248,3	Digestão por micro-ondas		Cloreto de lantânio			(20)
	Cu	324,8	Digestão por micro-ondas		Sem supressores			(20)
<b>Vinhos Açorianos (Pico e Terceira)</b>	Na	589,0	Diluição com HNO <sub>3</sub>	Chama ar-acetileno	Cloreto de lítio	Não indica	Não indica	(20)
	Fe	248,3	Digestão por micro-ondas		Cloreto de lantânio			(20)
	Cu	324,8	Digestão por micro-ondas		Sem supressores			(20)
<b>Vinho Canarias (Tenerife)</b>	Na	589,0	Diluição com HNO <sub>3</sub>	Chama ar-acetileno	Cloreto de lítio	Não indica	Não indica	(43)
	Fe	248,3	Digestão por micro-ondas		Cloreto de lantânio			(43)

Tabela 5- Condições experimentais relativos à quantificação dos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos tranquilos (Continuação)

Vinho Tranquilo	Elemento	Comprimento de onda (nm)	Pré-tratamento	Tipo de análise	Supressores	LOD	Gama de trabalho	Referência
Vinho Canarias (Tenerife)	Cu	324,8	Digestão por micro-ondas	Chama ar-acetileno	Sem supressores	Não indica	Não indica	(43)
Vinho Canarias (Gran Canaria)	Na	589,0	Diluição com HNO <sub>3</sub>	Chama ar-acetileno	Cloreto de lítio	Não indica	Não indica	(44)
	Fe	248,3	Digestão por micro-ondas		Cloreto de lantânio			(44)
	Cu	324,8	Digestão por micro-ondas		Sem supressores			(44)
Vinho Canarias (La Palma, Lanzarote)	Na	589,0	Diluição com HNO <sub>3</sub>	Chama ar-acetileno	Cloreto de lantânio	Não indica	0,2-2,5 mg/L	(45)
	Fe	248,3	Digestão por micro-ondas		Cloreto de lantânio		0,1-3,5 mg/L	(45)
	Cu	324,8	Digestão por micro-ondas		Sem supressores		0,05-1 mg/L	(45)
Vinhos Argentinos (Córdoba, San Juan, La Rioja)	Na	589,0	Diluição com 1% HNO <sub>3</sub>	Chama ar-acetileno	Cloreto de céσιο	0,012 mg/L	Não indica	(46)

Tabela 5- Condições experimentais relativos à quantificação dos teores de Cu, Fe e Na em vários vinhos tranquilos (Continuação)

Vinho Tranquilo	Elemento	Comprimento de onda (nm)	Pré-tratamento	Tipo de análise	Supressores	LOD	Gama de trabalho	Referência
<b>Vinhos Argentinos</b> (Córdoba, San Juan, La Rioja)	Fe	248,3	Diluição com 1% HNO <sub>3</sub>	Chama ar-acetileno	Óxido de lantânio	0,16 mg/L	Não indica	(46)
	Cu	324,8	Diluição com 1% HNO <sub>3</sub>		Sem supressores	0,05 mg/L	Não indica	(46)
<b>Vinhos Uruguaios</b> (Tinto e Branco)	Fe	248,3	Sem pré-tratamento	Chama ar-acetileno	Sem supressores	0,02 mg/L	0,05-4 mg/L	(49)
	Cu	324,8				0,005 mg/L	0,02-1 mg/L	(49)
<b>Vinhos Portugueses</b> (Tinto e Branco)	Fe	248,3	Sem pré-tratamento	Chama ar-acetileno	Sem supressores	0,16 mg/L	1-10 mg/L	(47)
	Cu	324,8				0,01 mg/L	0,5-4 mg/L	(47)
<b>Vinhos Turcos</b> (Cabernet, Merlot, Sauvignon Blanc, Chardonnay)	Fe	248,3	Digestão ácida com HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Forno de grafite/C hama ar-acetileno	Sem supressores	0,06 mg/L	Não indica	(48)
	Cu	324,8	Digestão ácida com HNO <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Forno de grafite		0,001 mg/L		(48)

## 5. Análise de Aguardentes não Vínicas por Espectrofotometria de Absorção Atômica: Revisão

Embora o número de publicações não seja tão numeroso comparativamente aos vinhos, os metais presentes nas amostras de aguardente não vínica têm sido alvo de vários trabalhos. Incidindo maioritariamente sobre amostras da cachaça, alguns metais, sobretudo o cobre e ferro, têm sido determinados para conhecimento dos seus teores. Estes metais constituem uma preocupação, uma vez que resultam de contaminações provenientes das estruturas de destilação e pós-destilação (25). A tabela 6 indica os valores registados para ambos os metais.

Tabela 6- Teores de Cu e Fe registados na literatura para algumas amostras de cachaça determinados por EAA por chama

Aguardentes não vínicas	Concentração (mg/L)		
	Fe	Cu	Referência
Cachaça	-----	[ND-21,3]	(50)
Cachaça	[ND-3,58]	-----	(51)
Aguardente de medronho (método Oficial OIV e método de adição padrão)	<b>Met. Ofic.</b> [7,97-13,73] <b>Met. Adições</b> [11,14-16,38]	-----	(47)
Cachaça	-----	[0,66-6,64]	(52)
Cachaça e outras BE (Rums, Whisky, Vodka)	Cachaça [0,11-0,35]	Cachaça [1,67-5,01]	(53)
	BE: 0,19	BE: 1,64	(53)
Cachaça	-----	[0,8-6,9]	(54)
Cachaça	-----	[0,05-8,10]	(55)

ND- Não Detetável; BE-Bebidas Espirituosas

Em relação à matriz do Rum da Madeira, na presente data não há registos bibliográficos de estudos de metais. Neste sentido, este trabalho representa o primeiro estudo efetuado neste âmbito.

Algumas abordagens em relação ao pré-tratamento das amostras foram adotadas segundo vários registos presentes na literatura. A tabela abaixo resume os tratamentos adotados bem como algumas condições instrumentais e analíticas associadas.

Tabela 7- Condições experimentais relativas à quantificação dos teores de Cu e Fe em amostras de cachaça

Elemento	Pré-tratamento	Tipo de análise	Modificadores	Supressor	LOD	Gama de trabalho	Ref.
Fe	Eliminação do álcool	Forno de grafite	Zircónio	Sem supressores	0,0002 mg/L	Não indica	(51)
		Chama ar-acetileno	Sem modificadores		0,16 mg/L	1-5 mg/L	(47)
			Sem modificadores		ND	Não indica	(53)
	Análise direta	Forno de grafite	$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$		0,012 mg/L	0,002-0,05 mg/L	(56)

Elemento	Pré-tratamento	Tipo de análise	Modificadores	Supressores	LOD	Gama de trabalho	Ref
Cu	Sem pré-tratamento	Chama ar-acetileno	Sem modificadores	Sem supressores	0,05 mg/L	0,05-5 mg/L	(50)
	Eliminação do álcool		Sem modificadores		0,04 mg/L	0,5-4 mg/L	(47)
	Digestão por micro-ondas com $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$		Utilização de Ag como adição padrão		ND	0,1-4 mg/L	(52)
	Diluição com 0,2 % $\text{HNO}_3$	Forno de grafite	$\text{Pd}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$		0,092 mg/L	0,05-0,20 mg/L	(57)
	Diluição com 0,2 % $\text{HNO}_3$	Forno de grafite	$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$		0,14 mg/L	0-1,5 mg/L	(58)
	Diluição com 0,2 % $\text{HNO}_3$	Forno de grafite	$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$		0,022 mg/L	0,10-1 mg/L	(59)

Tabela 7- Condições experimentais relativas à quantificação dos teores de Cu e Fe em amostras de cachaça (Continuação)

Elemento	Pré-tratamento	Tipo de análise	Modificadores	Supressores	LOD	Gama de trabalho	Ref
Cu	Eliminação do álcool	Chama ar-acetileno	Sem modificadores	Sem supressores	ND	Não indica	(53)
						Não indica	(54)
						0,5-4 mg/L	(55)

ND- Não Determinado

## 6. Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA)

### 6.1. Aspectos Históricos

Em 1955, os primeiros trabalhos desenvolvidos por Alan Walsh e posteriormente por Alkemade & Miltz estabeleceram as bases da Espectrofotometria de Absorção Atômica. Essas bases criadas levaram Walsh a ilustrar uma concepção instrumental do equipamento muito semelhante daquela que existe atualmente (60,61).

A análise pela técnica da Espectrofotometria de Absorção Atômica ganhou uma importância relevante a partir de 1962 devido ao interesse na determinação do conteúdo mineral por parte de vários grupos de investigação facilitando deste modo a inserção da técnica nos laboratórios de análise. A evolução registada a nível instrumental proporcionou vários progressos importantes nomeadamente a construção de um sistema de atomização com queimador para chama com mistura  $C_2H_2/N_2O$  (acetileno-óxido nitroso) que atinge temperaturas mais elevadas (2926°C), relativamente às atingidas por misturas gasosas mais recorrentes na análise atual como ar-acetileno (2326°C). Este avanço foi muito importante na análise por chama, sobretudo na determinação de alguns metais pesados tais como o alumínio e chumbo (61,62). A evolução registada a nível instrumental da técnica de EAA não verificou-se somente pelo desenvolvimento técnico apurado ao longo dos anos, mas também pela necessidade em responder aos problemas encontrados, constituindo o primeiro aviso

prévio e crucial para a concretização do desenvolvimento desta técnica analítica (61,62).

## 6.2. Princípio da técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica

A EAA é uma técnica analítica que apresenta a capacidade para realizar determinações quantitativas de elementos com base na absorção da radiação incidida sobre os átomos livres no estado gasoso formadas a partir da amostra. A EAA é das técnicas analíticas mais utilizadas nas análises elementares de metais presentes em diversas concentrações (63,64).

O princípio da técnica de EAA baseia-se na emissão de um feixe luminoso de energia específico sobre a chama, emitido por uma lâmpada de cátodo oco que é composto por átomos do mesmo elemento a determinar, provocando a transição eletrónica da nuvem de átomos do analito da amostra levando à sua excitação eletrónica, permitindo desta forma a leitura da absorvância, que corresponde à concentração dos átomos presente na amostra a analisar (relação de proporcionalidade direta) (61,65).

A técnica de absorção atômica, embora seja considerada uma técnica rápida (as análises são realizadas apenas em segundos), acessível e por apresentar uma boa precisão, tem algumas limitações inerentes, nas quais se incluem: limites de quantificação moderados/altos e uso de gases tóxicos e inflamáveis. Dada a sua conceção, só permite analisar um elemento de cada vez, apresenta baixa eficiência (apenas uma pequena parte da amostra atinge a chama) e por consequência necessita volumes de amostra relativamente grandes.

Parâmetros como a seletividade e a precisão são aspetos essenciais na EAA. No entanto, é uma técnica suscetível de apresentar fontes de interferência de natureza diversa, que podem pôr em causa a falta de precisão na quantificação dos elementos. Frequentemente a fonte de interferência mais complexa é a interferência química, que acontece quando a temperatura da chama não é suficientemente quente para dissociar os átomos (61,66).

A EAA tem muitas utilidades em diferentes áreas da química, sendo disso exemplo as análises clínicas, a área ambiental, a área farmacêutica e a própria indústria (64).

### 6.3. Processo de Atomização

A atomização corresponde à etapa mais crítica na EAA por chama. A amostra é introduzida na chama presente no queimador sob forma de um aerossol (61). Com o auxílio do nebulizador, operado pela combinação de um oxidante gasoso, misturado com um combustível gasoso, a solução da amostra é aspirada e nebulizada na forma de uma nuvem de átomos através da câmara de nebulização/combustão que irá atingir a chama. A sensibilidade do método é condicionada fortemente pelas elevadas perdas de amostra durante a fase da nebulização e o reduzido tempo de permanência dos átomos na chama. Frequentemente, a chama mais utilizada é a de ar/acetileno que é utilizada para evaporar o solvente e dissociar a amostra dos átomos que a compõem (61). Esta etapa da evaporação do solvente na chama é denominada dessolvatação, produzindo um aerossol seco (suspensão de partículas sólidas). Sob elevadas temperaturas da chama, as partículas são posteriormente volatilizadas. Em seguida, o feixe de luz emitida pela fonte de radiação e na qual é absorvida pelos átomos livres presentes na chama, é direcionada para o monocromador, que isola o comprimento de onda específico de luz e atinge o detetor (61,64).

## **Parte II – Implementação das Metodologias**



## Introdução

Descreve-se nesta seção os princípios utilizados na implementação das metodologias aplicadas na quantificação dos elementos minerais (cobre, ferro e sódio em Vinho da Madeira e cobre e ferro em Rum da Madeira).

Dada a função regulamentar exercida pelo IVBAM, IP-RAM sobre os setores vitivinícola e das bebidas espirituosas, as metodologias testadas tiveram por base as indicadas pela OIV, através da determinação por EAA. Sempre que conveniente, foram realizadas as otimizações necessárias de modo a testar a aplicabilidade das metodologias nas amostras de Vinho da Madeira e Rum da Madeira, estas últimas realizadas pela primeira vez. Apesar da metodologia utilizada ter sido baseada na adotada pela OIV para vinhos, no caso do cobre foi estudado o efeito matriz no Vinho da Madeira.

As metodologias para a determinação dos metais em Vinho da Madeira e Rum da Madeira foram validadas tendo em consideração os parâmetros descritos para a validação de métodos pela OIV e pelo Guia da Relacre 2013. Após a implementação das metodologias, a aplicação dos métodos foi assegurada através da análise de 41 amostras de Vinhos da Madeira e 34 amostras de Rum da Madeira. Deste modo, tal implementação significa um recurso essencial na quantificação e respetivo controlo legislativo dos metais em vinhos fortificados e bebidas espirituosas.

## 7. Materiais e Métodos

### 7.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram de qualidade analítica com um grau de pureza superior a 99,5% e isentos o mais possível dos metais a analisar. Água Ultra-pura (18 M $\Omega$ ) foi obtida pelo aparelho Simplicity®UV (tipo 1) da Millipore (Milford, MA, EUA). As soluções stock de cobre, ferro e sódio foram adquiridas à Perkin Elmer Pure (Massachusetts, EUA) preparadas previamente em HNO<sub>3</sub> a 2% com uma concentração de 1 g/L. Para obter as soluções de calibração, diluições adequadas a partir das

soluções stock de cada metal foram preparadas em ácido nítrico a 2% da Chem-Lab (Washington D.C, EUA). Nos pontos de calibração do sódio, foi acrescentada uma quantidade de solução de cloreto de cézio (usada na supressão de ionização do sódio) fornecido pela Riedel-de Haen (Seezle, Alemanha) 50 g/L (m/v). Cada ponto de calibração foi lido em triplicado, dentro do intervalo de trabalho implementado para cada metal: 0,05-1 mg/L (para cobre), 0,1-1,5 mg/L (para ferro) e 0,2-2 mg/L (para sódio). Todo o material utilizado foi submetido a um processo de descontaminação durante a noite, utilizando para tal ácido nítrico diluído a 2% sendo de seguida lavado com água de qualidade tipo I.

## 7.2. Amostras de Vinho da Madeira e Rum da Madeira

Para a aplicação dos respetivos métodos, foram analisadas 41 amostras de Vinho da Madeira (9 amostras de vinho doce, 7 de vinho meio doce, 14 de vinho meio seco e 11 de vinho seco) provenientes de vários produtores locais, produzidas a partir de uvas *Vitis vinifera L.* e 34 amostras de Rum da Madeira (15 de Rum da Madeira Natural, 3 de Rum da Madeira Beneficiado e 16 de Rum da Madeira Envelhecido) produzidas a partir da cana-de-açúcar *Saccharum officinarum L.*, também fornecidos por empresas produtoras regionais. De modo a enriquecer o estudo, este foi feito utilizando diferentes prismas:

- No caso do vinho, consideram-se os fatores empresa produtora, doçura e idade;
- No caso do Rum, consideram-se os fatores empresa produtora, tipo de rum e idade

Além disto e para efeitos comparativos de métodos, foram avaliadas 19 amostras de Vinho da Madeira fornecidas por uma das empresas produtoras mais duas amostras independentes, de modo a comparar os resultados obtidos com o método de referência (EAA) e o método por colorimetria.

### 7.3. Equipamento e Condições operatórias

As análises dos teores minerais foram realizadas no Espectrofotómetro de Absorção Atómica PinAAcle 900T da Perkin Elmer, equipado com um sistema de atomização com queimador para chama. Para a emissão dos feixes luminosos foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco (Perkin Elmer Lumina™) uni elementar. A aspiração automática da amostra na chama é realizada por um tubo capilar anexado a um nebulizador de alta sensibilidade. No equipamento EAA estão também montadas linhas de ar comprimido e de acetileno equipado com dispositivo de controlo de pressão e manómetro. Um sistema de ventilação de gases (com capacidade de exaustão 30 m<sup>3</sup>/h) e um sistema de drenagem com tanque de recolha estão também associados ao equipamento. Para o controlo, aquisição e tratamento de dado é utilizado o software Syngistix for AA Version 3.1.0.1682. As análises de cobre e de ferro em amostras de Vinho da Madeira por colorimetria foram realizadas no Espectrofotómetro UV-Vis da marca Dynamica modelo Halo XB-10. As incinerações das amostras em cinzas brancas foram obtidas na mufla Optic Ivymen System SNOL 8,2/1100.

Como referido anteriormente e para a aplicação efetiva sobre amostras, foram utilizadas um conjunto de condições instrumentais pré-estabelecidas a adotar para a análise de cada elemento. Estas condições, referidas na tabela 8 foram aplicadas nas duas matrizes em estudo.

Tabela 8- Condições instrumentais utilizadas para a leitura de cobre, ferro e sódio

	<b>Cobre</b>	<b>Ferro</b>	<b>Sódio</b>
<b>Comprimento de onda de leitura</b>	324,8 nm	248,3 nm	589,6 nm
<b>Largura da fenda do monocromador</b>	0,7 nm	0,2 nm	0,2 nm
<b>Intensidade de corrente de lâmpada</b>	15 mA	11 mA	8 mA
<b>Fluxo de ar comprimido</b>	10 L/min	10 L/min	10 L/min
<b>Fluxo de acetileno</b>	2,5 L/min	2,5 L/min	2,98 L/min
<b>Tempo de Leitura</b>	3s	3s	5s
<b>Delay Time</b>	1s	1s	3s
<b>Gama de quantificação (mg/L)</b>	0,2-4	0,4-6	10-100
<b>Modo de Calibração</b>	Linear até zero	Linear até zero	Linear até zero
<b>Modo de Medição</b>	Área do pico	Área do pico	Área do pico

#### 7.4. Preparação e análises das amostras por EAA

##### 7.4.1. Vinho da Madeira

Para a determinação do teor dos elementos minerais por EAA foram realizadas 41 análises de Vinho da Madeira tendo em consideração as três perspetivas referidas anteriormente: empresa produtora, grau de doçura e idade. Para os três metais em análise, foram realizadas leituras no vinho (após diluição 1:4 para cobre e ferro e 1:50 para sódio).

A preparação das amostras para a leitura de cobre e ferro consiste na medição de 12,5 ml de cada vinho e perfazer o volume com água ultrapura até um volume de 50 ml. A análise realizada teve em conta a metodologia da OIV-MA-AS322-06- Copper (35) e OIV-MA-AS322-05 – Iron (36). Para a análise do conteúdo de sódio, a preparação das amostras foi ligeiramente diferente, em virtude da adição de um tampão ionizante (cloreto de cézio 50 g/L). Para um volume de 50 ml foram adicionados os seguintes reagentes, por esta ordem: 2,5 ml cloreto de cézio, 25 ml H<sub>2</sub>O ultra pura, 1 ml de amostra de vinho e perfazer o restante volume com H<sub>2</sub>O ultra pura. A análise realizada

teve em conta a metodologia da OIV-MA-AS322-03 – Sodium (67). As preparações das amostras foram realizadas sempre em duplicado e cada duplicado foi lido três vezes.

#### 7.4.2. Rum da Madeira

Com o intuito de quantificar cobre (OIV-MA-BS-30 (68)) e ferro (OIV-MA-BS-31 (69)), o tratamento das amostras de Rum da Madeira teve como base os protocolos descritos pela OIV para bebidas espirituosas. De modo a eliminar o álcool, 50 ml de cada amostra foram colocadas em banho-maria a uma temperatura de 95°C, até à obtenção de um volume de 10 ml. Em seguida foram adicionados 40 ml de H<sub>2</sub>O UP de modo a repor o volume inicial. No final, foram pipetados 12,5 ml da solução em suspensão e adicionados em balões de 50 ml, perfazendo o restante volume com H<sub>2</sub>O UP. As preparações das amostras foram realizadas sempre em duplicado e cada duplicado foi lido três vezes.

### 7.5. Análise das amostras por Colorimetria

#### 7.5.1. Vinho da Madeira

Para a quantificação colorimétrica dos teores de cobre e ferro e para efeitos de comparação de resultados com aqueles obtidos por EAA, foram analisadas 19 garrafas de Vinho da Madeira, todas de vinho corrente (3 anos), a maioria delas dos tipos seco e meio seco. As leituras das absorvâncias do cobre a 546 nm foram realizadas de acordo com o descrito pelo método/norma oficial portuguesa NP-2441 e a transmitância do ferro a 508 nm com o descrito na norma portuguesa NP-2443. Por cada garrafa, foi preparada apenas uma amostra e lida uma única vez.

### 7.6. Tratamento Univariado dos Dados

A análise estatística dos resultados das amostras de Vinho da Madeira e Rum da Madeira, com o intuito de avaliar as diferenças significativas entre os dados médios para cada variável nos dois produtos, foi realizada com uma análise de variância (one-way ANOVA). Esta análise estatística, juntamente com as comparações pelo teste

Tukey Pairwise, foi realizada utilizando o software Minitab®17.1.0. As médias que não partilham a mesma letra são significativamente diferentes considerando  $p < 0,05$  (Teste de Tukey).

## 7.7. Validação dos Métodos

Através da regulamentação descrita na NP EN ISO/IEC 17025, os laboratórios têm de cumprir com os requisitos sobre os ensaios e calibrações realizadas durante e depois da implementação do método. Com isto, os resultados obtidos durante a validação do método servem para avaliar a qualidade, fiabilidade e consistência dos resultados após a implementação das metodologias (70).

A metodologia para a determinação dos metais em Vinho da Madeira e Rum da Madeira foi validada com bases nos termos descritos na metodologia da OIV para a validação dos métodos analíticos OIV-MA-AS1-12 (71) e no Guia da Relacre 2013: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química (72). Os requisitos para a validação de métodos internos de ensaio compreendem o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros: gama de trabalho/linearidade, homogeneidade de variâncias, limiares analíticos (LOD e LOQ), precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade) e taxa de recuperação.

Após a validação, ocorreram participações em ensaios interlaboratoriais promovidos pela Associação de Laboratórios de Enologia (ALABE) para as determinações de cobre e ferro em vinhos licorosos, servindo estas como mais um indicador de fiabilidade dos métodos implementados durante o trabalho.

### 7.7.1. Gama de trabalho e Linearidade

A linearidade é calculada através da construção da curva de calibração obtida pela razão da concentração das cinco soluções padrão crescentes, contra o valor de absorvância correspondente. Com base nos fundamentos da regressão linear, o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), utilizado para avaliar o grau de linearidade dos pontos experimentais, deverá andar próximo de 1. Foi realizada pelo menos uma reta

de calibração em cada dia e os seus respetivos controlos (três controlos: duas concentrações correspondentes aos extremos da reta e um terceiro que fica no meio do mesmo) para confrontar com a reta obtida (71,72).

### 7.7.2. Teste de Homogeneidade de variâncias

As diferenças significativas nas variâncias entre os extremos da gama de trabalho são testadas efetuando a determinação do valor de PG (cálculo da razão das variâncias entre o ponto mais baixo e mais alto da gama de trabalho). Este teste foi realizado mediante a leitura de dez pontos experimentais, que representam os extremos da reta de calibração adotada (72).

$$a) \quad PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \qquad S_{i=1}^2 = \sum_{j=1}^{10} \frac{(y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

$$b) \quad PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \qquad \bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$$

#### Equação 1: Cálculo do Valor PG

(Fonte: Guia da Relacre 13)

sendo :

para  $i=1$  e  $i=10$ .

a) quando  $S_{10}^2 > S_1^2$

b) quando  $S_1^2 > S_{10}^2$

O valor determinado de PG é comparado com o valor tabelado na distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade:

- Se  $PG \leq F$  : não são significativas as diferenças de variância e assim a gama de trabalho está bem ajustada.
- Se  $PG > F$  : são significativas as diferenças de variância e como tal a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias entre o 1º e último padrão permitam obter  $PG \leq F$ .

### 7.7.3. Limiares Analíticos (LOD e LOQ)

O limite de deteção (LOD) corresponde ao menor teor medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito numa solução. O LOD pode ser estimado com base na equação abaixo (71,72):

$$LOD = \frac{3.3 \times s_0}{b}$$

**Equação 2:** Cálculo do Limite de Deteção (Fonte: Guia da Relacre 13)

Onde  $s_0$  representa o desvio padrão e  $b$  o declive da reta de calibração

O limite de quantificação (LOQ), por outro lado, indica a menor concentração a partir do qual é possível quantificar o analito na amostra. Este limiar, após ter sido determinado, é testado experimentalmente de modo a avaliar se o nível de exatidão e precisão é satisfatório. Este teste foi realizado através de uma série de padrões internos (cerca de dez), cuja concentração deverá ser próxima ou igual ao limiar de quantificação teórico. Segundo as recomendações presentes no guia da Relacre, o coeficiente de variação não deverá exceder os 10%. Os limites de quantificação foram estimados através da equação 3 (71,72).

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{b}$$

**Equação 3:** Cálculo do Limite de Quantificação (Fonte: Guia da Relacre 13)

Onde  $\sigma$  representa o desvio padrão e  $b$  o declive da reta de calibração

### 7.7.4. Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade)

Existem duas medidas para avaliar a precisão da metodologia, designadas por **repetibilidade e reprodutibilidade**.

A repetibilidade avalia o grau de concordância dos valores determinados para a mesma amostra através das mesmas condições de ensaio tendo sido avaliada por doze determinações repetidas e sucessivas de quatro amostras de vinho fortificado.

A reprodutibilidade avalia a dispersão dos valores determinados para a mesma amostra, em condições de ensaio diferentes. A reprodutibilidade foi avaliada pelas análises de quatro amostras de vinho fortificado em três dias diferentes. Estes dois parâmetros foram expressos como desvio padrão relativo (% RSD) (71,72).

$$\text{RSD} = \frac{s}{x} \times 100$$

**Equação 4:** Cálculo do desvio padrão relativo

onde  $x$  é o valor médio do conjunto de resultados e  $s$  é o desvio padrão associado.

7.7.5. Exatidão

Os testes de recuperação representam um indicador de avaliação da exatidão do método. Consiste na adição do analito de concentração conhecida na amostra e com isso permite obter informação fiável sobre a existência de possíveis interferências de matriz. A equação 5 demonstra o cálculo deste parâmetro:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{A_{adic} - A}{P_{adic}} \times 100$$

**Equação 5:** Cálculo da percentagem de recuperação

(Fonte: Guia da Relacre 13)

onde  $A$  é o valor obtido para a amostra inicial,  $A_{adic}$  é o valor obtido para a amostra fortificada e  $P_{adic}$  é a concentração do padrão adicionado (72).

7.7.6. Fator de Desempenho (Z-Score)

O fator de desempenho do método (z-score) representa a incerteza associada relativamente a um material certificado de referência. Este parâmetro é avaliado em ensaios interlaboratoriais através da seguinte equação:

$$z_i = \frac{x_i - x}{s}$$

**Equação 6:** Cálculo do fator de desempenho Z-Score

Onde  $x_i$  representa o valor medido experimentalmente,  $x$  representa o valor de referência e  $s$  representa o desvio-padrão (25).

Segundo a norma ISO 17043 (73), a avaliação do z-score em valor absoluto conduz as seguintes conclusões:

$|Z| \leq 2$  – Desempenho satisfatório

$2 < |Z| < 3$  – Desempenho questionável

$|Z| \geq 3$  – Desempenho insatisfatório

## **Parte III – Resultados e Discussão**



## 8. Processo de Validação dos Métodos

Com base nas metodologias adotadas pela OIV para a determinação de cobre, ferro e sódio, a aplicabilidade dos respectivos métodos para Vinho da Madeira e Rum da Madeira foi testada. Os parâmetros de validação foram avaliados segundo as normas indicadas pela OIV (71) e pelo Guia da Relacre 2013 (72). Várias curvas de calibrações foram obtidas pela média das absorvâncias de cinco padrões de calibração, preparados a partir de soluções padrão de cada metal em meio ácido. Cada padrão de calibração foi lido em triplicado. Observou-se um bom coeficiente de correlação para os três metais ( $R^2 > 0,999$ ), confirmando a linearidade dos métodos. As condições de sensibilidade foram avaliadas pelas determinações dos limiares analíticos LOD e LOQ. Ambos os limites revelaram-se baixos, o que demonstra a alta sensibilidade conferida pelos métodos para a quantificação destes teores. No conjunto dos três metais, as recuperações estiveram próximas dos 100%, enquanto a precisão do método (repetibilidade e reprodutibilidade) foi inferior a 9%.

LOD cobre= 0,012 mg/L, LOQ cobre= 0,05 mg/L;

LOD ferro= 0,029 mg/L, LOQ ferro= 0,1 mg/L;

LOD sódio= 0,038 mg/L, LOQ sódio= 0,2 mg/L.

A Tabela 9 descreve os resultados dos parâmetros de validação para os três metais.

Tabela 9- Quadro-resumo dos parâmetros de validações de Cu, Fe e Na no Vinho da Madeira

	Ensaio	Gama de trabalho (mg/L)	Coeficiente da reta ( $r^2$ )	Gama de quantificação (mg/L)	L.D	L.Q	RSD repetibilidade*				RSD Reprodutibilidade**				Recuperação***	
							Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 1	Amostra 2
<b>Produto</b>	Cu	[0,05-1]	0,99994	[0,2-4]	0,012	0,05	2%	2%	2%	4%	8%	7%	5%	4%	90%	92%
Vinho da Madeira	Fe	[0,1-1,5]	0,99985	[0,4-6]	0,029	0,1	4%	3%	2%	5%	3%	6%	3%	5%	103%	97%
	Na	[0,2-2]	0,99946	[10-100]	0,038	0,2	3%	2%	2%	3%	6%	5%	3%	4%	103%	100%

\* Repetibilidade: Calculado a partir de 12 preparações individuais/amostra (amostras de vinho com quatro concentrações distintas cobrindo toda a gama de trabalho)

\*\* Reprodutibilidade: 3-8 dias diferentes, cinco preparações individuais/amostra em duplicado (amostras de vinho com quatro concentrações distintas cobrindo toda a gama de trabalho)

\*\*\* Recuperação: realizados três spikes/amostra de vinho em dias diferentes. A concentração dos spikes são as seguintes: para cobre 0,5 e 0,25 mg/L respetivamente amostra 1 e 2. Para ferro 0,3 e 0,75 mg/L respetivamente. Por fim o sódio 40 e 45 mg/L respetivamente.

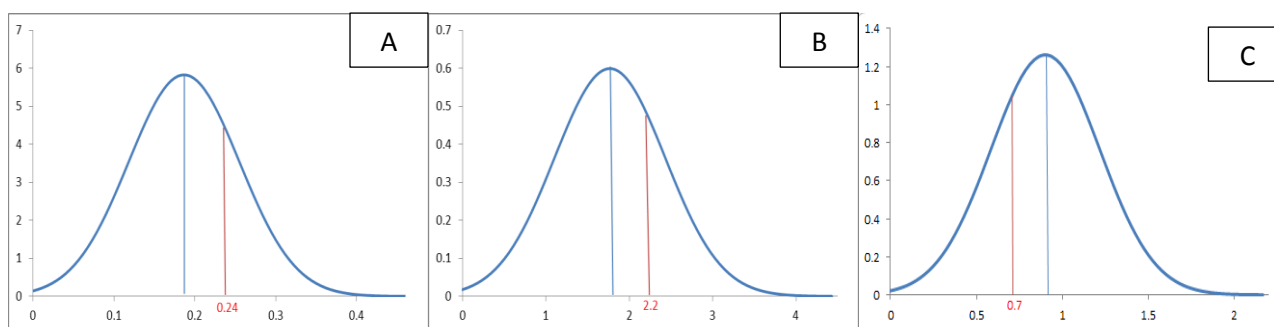
## 8.1. Ensaio Interlaboratoriais

A confiabilidade das quantificações determinadas pelas metodologias implementadas foi avaliada mensalmente (houve dois meses de interregno entre Agosto e Setembro) em ensaios interlaboratoriais de aptidão promovidas pela ALABE (Associação de Laboratórios de Enologia). Os métodos para a determinação de cobre e ferro (o sódio não é avaliado pela ALABE) foram submetidos a estes ensaios avaliando a comparação existente entre os valores medidos experimentalmente e o valor de referência fornecido pela ALABE, expresso pelo parâmetro Z-Score. Os resultados estão indicados na tabela abaixo.

Tabela 10- Resultados dos ensaios interlaboratoriais para Cu e Fe

Amostra	Resultado IVBAM, IP-RAM (mg/L)	Valor médio (ALABE) (mg/L)	Z-Score
VL 06/2018 (Cu)	0,24	0,18	0,64
VL 07/2018 (Cu)	<LOQ	-----	----
VL 07/2018 (Fe)	0,7	0,9	0,63
VL 10/2018 (Cu)	<LOQ	-----	-----
VL 10/2018 (Fe)	2,21	1,77	0,65

**Nota:** LOQ (Cobre): 0.05 mg/L



**Figura 2 :** Curvas de Distribuição Normal para as amostras utilizadas nos ensaios interlaboratoriais. A) Amostra VL 06/2018; B) Amostra VL 10/2018; C) Amostra VL 07/2018

Os resultados do Z-score (em valor absoluto) são satisfatórios para ambos os métodos de acordo com os critérios de aceitação da norma ISO 17043 (73) ( $|Z\text{-Score}| \leq 2$ ), o que demonstram a qualidade das análises laboratoriais e a sua confiabilidade na determinação destes parâmetros.

## 8.2. Efeito Matriz

O efeito matriz é um dos aspetos que pode originar alterações nos resultados obtidos, especialmente quando são analisadas amostras de alta complexidade, como vinhos fortificados. As interferências promovidas pela matriz do vinho podem ser eliminadas com base no pré-tratamento da amostra mais indicado (por exemplo digestão ácida) (65,87). Por forma a avaliar o efeito da diluição no tratamento das amostras em vinho fortificado, foi realizado um estudo sobre as possíveis interferências da matriz comparando as taxas de recuperação obtidas a partir de duas amostras de vinho fortificado da ALABE com valores de referência e aplicando dois tipos de diluições: 1:4 sendo a diluição efetiva do método e 1:8. As fortificações das amostras foram realizadas em duplicado e de modo a abranger toda a gama de trabalho (0,05-1 mg/L) definida na implementação do cobre (Tabela 11). Este estudo do efeito matriz realizado neste trabalho teve como base o teste definido para o estudo das interferências numa técnica analítica sugerido pelo Guia da Relacre.

Tabela 11: Taxas de recuperação obtidas no estudo de efeito matriz em vinhos fortificados no cobre

Identificação da amostra	Concentração da amostra não fortificada (mg/L)	Concentração da amostra após fortificada (mg/L)	Concentração adicionada à amostra (mg/L)	Recuperação (%)	Diluição
VL ALABE Julho 2017	0,39	0,75	0,35	102	1:4
		1,01	0,6	102	1:4
	0,18	0,33	0,15	103	1:8
		0,70	0,5	104	1:8
		1,01	0,8	104	1:8
	VL ALABE Outubro 2017	0,20	0,35	0,15	99
0,65			0,45	99	1:4
0,94			0,75	98	1:4
0,11		0,21	0,1	101	1:8
		0,32	0,2	105	1:8
		0,95	0,8	105	1:8

**Notas:** As várias concentrações adicionadas nas amostras de vinho fortificado foram a partir de uma solução padrão de cobre 5mg/L.

No presente estudo, foram registados valores de recuperações próximas dos 100% aplicando duas diluições distintas sobre duas amostras de vinho fortificado. Uma vez que os testes de recuperação representam um parâmetro da avaliação da exatidão da metodologia, e daí permitir avaliar o impacto que os possíveis interferentes da matriz possam ter na quantificação, considera-se deste modo, que as diluições praticadas minimizam as interferências da matriz, demonstrando assim a capacidade do método em analisar somente o analito. Tendo em consideração os mesmos resultados, considerou-se igualmente não ser necessário efetuar o estudo de efeito matriz para ferro e sódio.

### 8.3. Aplicabilidade dos métodos de determinação de cobre e ferro em amostras de bebidas espirituosas através de ensaios interlaboratoriais

As quantificações de cobre (68) e ferro (69) pela OIV em bebidas espirituosas foram adotadas neste trabalho para o estudo destes dois parâmetros em amostras de Rum da Madeira. Em relação aos vinhos fortificados e porque o Rum da Madeira é uma matriz mais alcoólica (cerca de 40-50% etanol por volume), foi adotada uma etapa adicional na preparação das amostras que corresponde à evaporação do álcool, com o intuito de não tornar instável a chama ar-acetileno (e por consequência a variação do sinal). Igualmente, o aumento do teor de etanol influencia grandemente as propriedades de transporte das amostras (74).

Para a determinação de ambos os metais, as condições instrumentais, de calibração e diluição praticadas foram as mesmas das utilizadas nas determinações dos mesmos em vinhos fortificados. Por forma a avaliar o possível impacto que a evaporação do teor alcoólico tem na quantificação de cobre e ferro, foram analisadas algumas amostras de BE incluídas nos ensaios interlaboratoriais promovidas pelo BIPEA, estando os resultados obtidos incluídos na tabela abaixo:

Tabela 12- Resultados de cobre e ferro em amostras do BIPEA utilizadas nos ensaios interlaboratoriais

Amostra	Resultado IVBAM, IP-RAM (mg/L)		Valor de Referência (BIPEA) (mg/L)		Z-Score	
	Cobre	Ferro	Cobre	Ferro	Cobre	Ferro
Amostra Rum nov-17	2,01	0,11	1,99	0,05* (+0,05)	0,08	----
Amostra Brandy mar-18	0,16	0,16	0,15	0,08* (+0,08)	0,14	----
Amostra Brandy mar-17	0,13	0,14	0,12	0,05* (+0,1)	0,22	----
Amostra Calvado out-17	0,53	0,12	0,50	0,04*(+0,1)	0,68	----

**\*Nota:** os teores de ferro nas amostras emitidos pelo BIPEA ficam abaixo do LOQ do método (0,1 mg/L).

Estes resultados indicam que os métodos implementados para vinhos fortificados podem ser aplicáveis a bebidas espirituosas, reforçando que o passo adicional da evaporação do etanol não compromete os resultados, conforme o comprovam os valores de Z-Score. Para além disso e para ambos os metais, os valores de RSD (%) individuais calculados para cada amostra de Rum da Madeira analisada, são inferiores ao valor da repetibilidade para os vinhos fortificados (Anexo III Tabelas 18 e 19). Assim sendo, optou-se por não realizar um processo de validação das metodologias para este tipo de amostras, não sendo necessários testes adicionais.

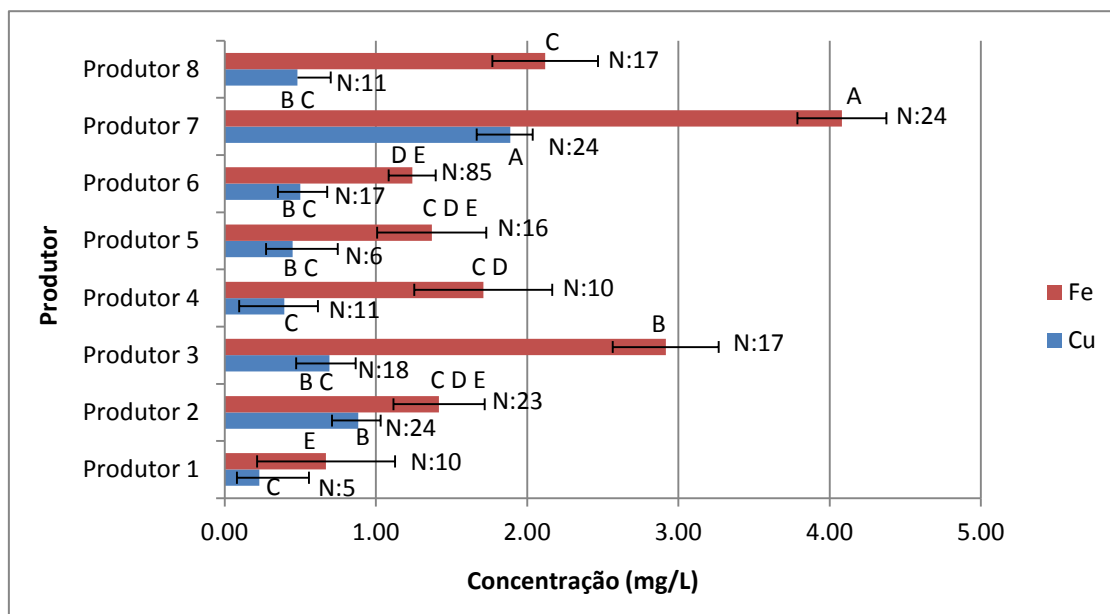
Para demonstrar que o método pode ser aplicável na quantificação de ferro para este tipo de amostras, foi realizada 1 spike individual para cada amostra, cuja concentração adicionada na amostra está indicada entre parênteses na tabela de modo a ser quantificável na gama de trabalho.

#### 8.4. Determinação de Cobre, Ferro e Sódio em amostras de Vinho da Madeira

##### 8.4.1. Comparação por produtor

No vinho, encontram-se solubilizados alguns elementos minerais sob a forma de sais orgânicos tais como tartaratos, malatos, acetatos e em sais minerais (tais como cloretos, sulfatos e fosfatos) (65,75). A interação entre os elementos minerais e outros compostos presentes nos vinhos, condiciona e muito a sua biodisponibilidade e o seu potencial toxicológico (65,76,77). É importante manter o controlo sobre os elementos minerais, uma vez que poderá originar fenómenos depreciativos com influência na qualidade como por exemplo turvações, precipitações e reações de oxidação, conforme o nível de concentrações presentes. Para a determinação dos teores minerais presentes no Vinho da Madeira, um conjunto de 41 amostras foram avaliadas e subdivididas tendo em consideração três fatores: o produtor, o grau de doçura e

envelhecimento (idade). As diferenças registadas nos teores de cobre e ferro estão ilustradas graficamente na figura 3.



**Figura 3:** Comparação da quantificação de cobre e ferro em diferentes produtores de Vinho da Madeira

No documento redigido pela OIV presente no anexo C do “Recueil des Methodes Internationales D’Analyses” – “Limites maximales acceptables de divers éléments” (26), estão impostos limites para alguns metais frequentemente analisados num vinho. O cobre, por se tratar de um elemento que em concentrações elevadas pode originar fenómenos de depreciação (como nebulosidade cúprica) (25,38), está naturalmente sob forte restrição (máximo 1 mg/L). Das oito empresas produtoras de Vinho da Madeira, existe uma enorme diferença no teor médio das garrafas do produtor 7 em relação às restantes. Pela análise da figura acima, o produtor 7 é o único cujas quantificações de cobre nas suas garrafas são superiores ao limite de 1 mg/L. Aliás, o teor médio das suas amostras representa quase duas vezes o limite máximo admissível. Pelos dados indicados no estudo estatístico realizados através do Teste de Tukey (o valor de N corresponde ao número de réplicas usado no estudo estatístico por cada produtor), os teores das amostras do produtor 7 são estatisticamente diferente em relação aos restantes produtores. De resto, todos os outros produtores registam médias inferiores a esse limite e sem qualquer diferença estatística entre si

segundo o Teste de Tukey. Os valores médios registados em todas as amostras analisadas neste estudo (0,7 mg/L) estão concordantes com os resultados determinados nos vinhos da Região da Macaronésia e na qual se incluem o Vinho da Madeira (0,86 mg/L) (20). Os valores registados para o Vinho da Madeira, tanto neste estudo como no primeiro trabalho (20), são superiores quando comparado com outros vinhos fortificados como “fino” sherry (0,04-0,33 mg/L) (39)(42) e “oloroso” sherry (0,79-0,82 mg/L) (40). Em comparação com o Vinho do Porto, os resultados demonstram estar acima dos valores para o cobre (0,05-0,22 mg/L) (41). Os teores verificados para cobre neste trabalho revelaram-se superiores aos vinhos tranquilos produzidas na região madeirense (0,3 mg/L) (20).

O aparecimento deste metal nos vinhos deve-se aos tratamentos fitossanitários com produtos que apresentam cobre (essencialmente sulfato de cobre) adicionados na preservação das uvas (77). Estes produtos contêm cobre sob forma iónica, o que poderá explicar a sua elevada capacidade em ser absorvido nas uvas (25,41, 78-80). Com base em alguns trabalhos, as concentrações de cobre nos mostos são bastante elevadas, na ordem dos 10-20 mg/L, precipitando a maior parte durante a fermentação na forma de sulfuretos insolúveis, originando assim vinhos com teores relativamente mais baixos. Esse decréscimo também é potenciado pela clarificação dos mostos com bentonites e géis (25,80). Os níveis elevados que foram encontrados nas amostras do produtor 7, podem então estar relacionados com possíveis contaminações provenientes do contacto dos vinhos com infraestruturas de vinificação durante a produção e conservação dos vinhos, nomeadamente válvulas ou torneiras contendo cobre (25,81).

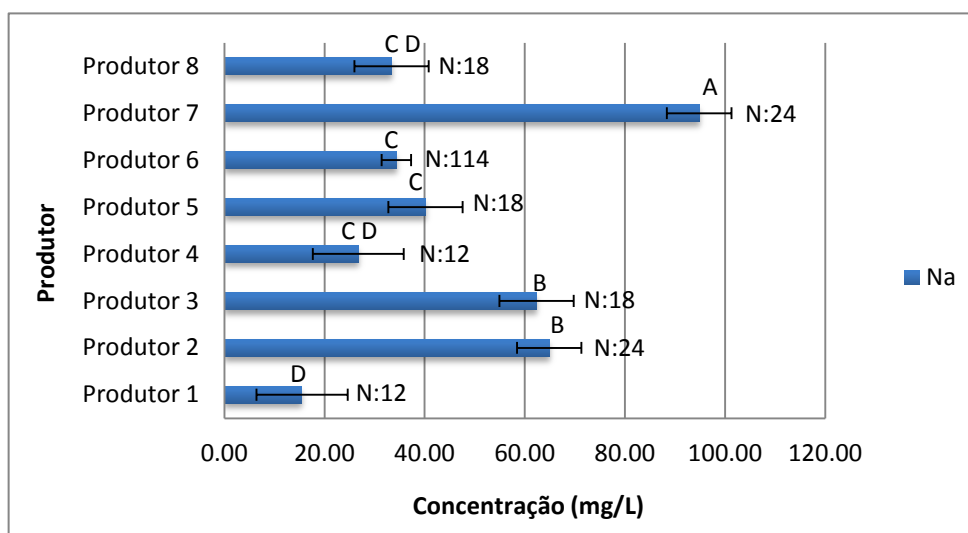
Em relação ao ferro, os valores determinados para os vinhos estudados estão compreendidos entre os 0,67 mg/L e os 4,08 mg/L, valores substancialmente superiores ao cobre, estando a maioria dentro da faixa de resultados (2-20 mg/L) determinados em alguns vinhos (25,82). Através do Teste de Tukey, as três empresas com maiores teores de ferro são estatisticamente diferentes entre si. Comparativamente aos teores de ferro analisados no primeiro estudo em Vinho da Madeira (3,02 mg/L) (20), a média dos teores de ferro analisados neste trabalho é inferior (1,91 mg/L). De acordo com os resultados acima, verifica-se a existência de um

padrão entre os 3 produtores com maiores de teores de ferro (situação igualmente constatada no cobre), nomeadamente os produtores 2,3 e 7. À semelhança do cobre, os níveis mais altos quantificados foram registados nas amostras no produtor 7 (4,08 mg/L), média ainda assim muito abaixo dos 10 mg/L a ter em consideração para vinhos (38). A OIV não contempla nenhuma restrição para este metal (26).

Diferentes fontes indicam duas origens para a ocorrência deste metal na constituição dos vinhos. Parte da concentração verificada é de natureza endógena, tendo o restante origem nos equipamentos e materiais utilizados no processo de vinificação, estabilização e conservação dos vinhos (25,80). Com a evolução registada no emprego de estruturas de vinificação de aço inoxidável, o risco de contaminações de ferro (e igualmente de cobre) é consideravelmente menor e como tal não é suscetível de os vinhos apresentarem altos teores. Por outro lado, o ferro desempenha funções importantes nas reações oxidativas atuando como catalisador (25,77). A mesma linha de raciocínio pode explicar as concentrações de ferro encontradas no Vinho da Madeira, com especial atenção no produtor 7. Como referido anteriormente, boa parte da presença de ferro advém das estruturas utilizadas na produção do vinho e por isso, o facto do produtor 7 apresentar concentrações mais elevadas em relação aos restantes, parece reforçar a ideia que as contaminações resultam do contacto com os tanques fermentativos e as estruturas para conservação dos vinhos, o que contribui para os altos níveis dos dois metais discutidos até este momento. Uma vez avaliado a variações de cobre e ferro por produtor e dada a concordância existente entre os produtores com maiores quantidades destes dois metais, a situação verificada poderá indicar o efeito das diferentes práticas enológicas adotadas pelos respetivos produtores com influência nos teores dos respetivos elementos, por exemplo, a composição dos agentes clarificantes.

O terceiro elemento estudado no Vinho da Madeira neste trabalho é um dos elementos alcalinos maioritários na composição do vinho. Constituindo um exemplo desses elementos maioritários, cujas concentrações podem variar entre os 10 mg/L e 1 g/L, o sódio à semelhança do potássio, magnésio e do cálcio, são fundamentais na organização mineral e na manutenção do pH do vinho, atuando como tampões ácido-base (25,65). Os resultados determinados nas amostras de Vinho da Madeira

analisadas neste estudo enquadram-se na gama referida anteriormente e na qual a média das concentrações das 41 amostras (46,53 mg/L) é próxima das 21 amostras de vinho licoroso segundo Pérez-Trujillo JP (20) (50,3 mg/L). No entanto, e se compararmos as quantificações sobre vinhos a partir de videiras localizadas em regiões do interior, é interessante constatar que o Vinho da Madeira contém mais sódio relativamente a vinhos de outras regiões (2-25 mg/L) (79,83,84). Avaliando fatores como relevo, clima subtropical e proximidade marítima, características climáticas encontradas na Madeira e que são próximas às encontradas na região de Canárias (20,45,85,86), os teores dos vinhos provenientes dessa região são semelhantes, o que parece indicar que os fatores em questão podem exercer impacto nos valores de sódio.



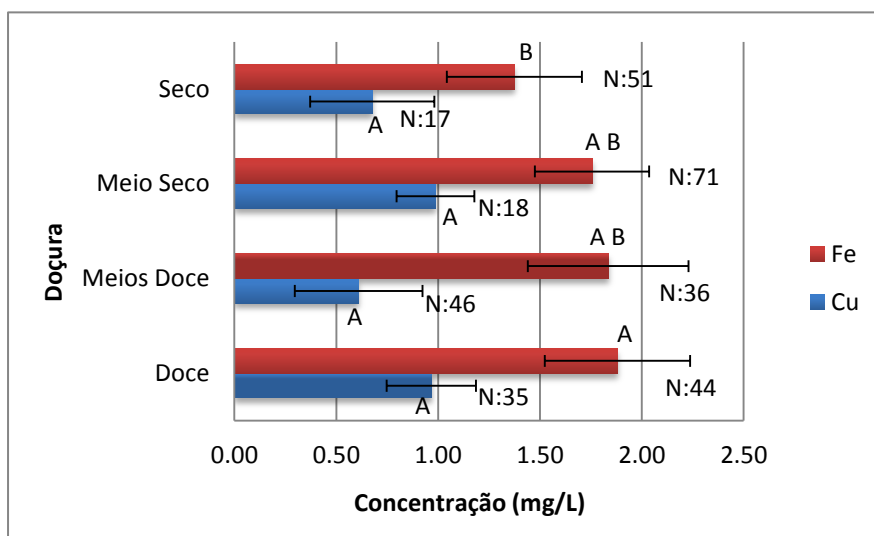
**Figura 4:** Quantificações de Na em amostras de Vinho da Madeira entre vários produtores

As amostras do produtor 7 são uma vez mais as que contêm mais teores de sódio, atingindo valores médios próximos dos 100 mg/L (94,83 mg/L) e com uma diferença média de quase 30 mg/L e significativamente diferente em relação ao segundo produtor (produtor 2) com mais sódio nos vinhos (64,9 mg/L), bem como relativamente ao produtor 3 (Figura 4). Mais uma vez e como constatado no cobre, este produtor ultrapassa o limite máximo recomendado pela OIV para a concentração de sódio excendentário nos vinhos: 80 mg/L (26). Contrariamente ao cobre e ferro, o

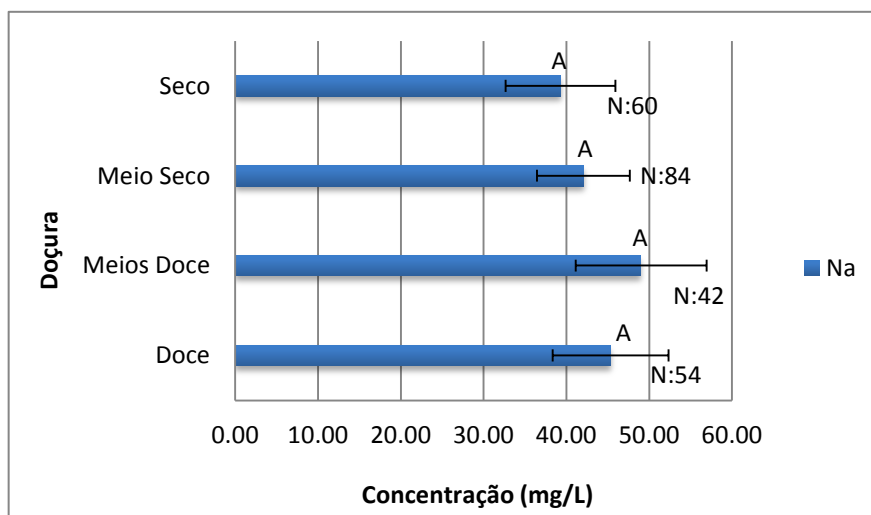
sódio não é um elemento que provenha do contacto resultante com infraestruturas de vinificação. Grande parte pode surgir das uvas, nomeadamente na absorção dos minerais presentes no solo onde se encontram as videiras (25). Posto isso, a razão do produtor 7 apresentar níveis de sódio mais altos poderá estar associado ao facto de que as uvas utilizadas na produção dos respectivos vinhos serem de zonas mais próximas ao mar e cujo efeito de maresia promove um forte impacto (neste caso um aumento) na concentração deste elemento nos vinhos.

#### 8.4.2. Comparação por Grau de Doçura

Outro parâmetro avaliado na comparação dos teores minerais é o grau de doçura. A doçura de um vinho é determinada pelo período de fermentação alcoólica, onde pela ação das leveduras, é transformado o açúcar do mosto em álcool. Vinhos doces requerem menos tempo de fermentação do que os secos. A comparação gráfica dos 3 elementos de acordo com a doçura do vinho está ilustrada nas figuras 5 e 6.



**Figura 5:** Comparação dos teores de Cu e Fe entre amostras de várias doçuras



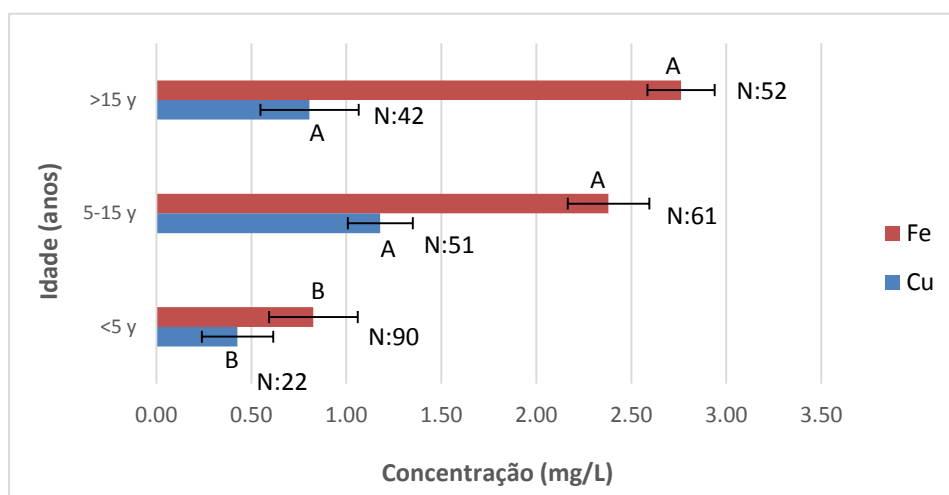
**Figura 6:** Resultados de Na entre amostras de vários graus de doçura

As diferenças verificadas nos três elementos denotam um aspeto sobretudo nos casos do ferro e sódio: vinhos com maiores quantidades de açúcar (doce e meio doce) são aqueles onde estes dois elementos se encontram em maiores quantidades. Já para o cobre, o panorama é um pouco diferente registando-se uma alternância entre as doçuras e os teores de cobre, situação que poderá estar associada ao tipo de amostragem utilizada no estudo. No caso de ferro, os resultados do Teste de Tukey, mostram que há diferenças significativas entre os vinhos do tipo doce e seco. Os mesmos resultados também indicam que para os elementos cobre e sódio, as médias obtidas não ilustram diferenças estatísticas para os vários graus de doçura. A mesma relação foi também verificada por Frías (45), onde foram feitas análises de vinhos doces e secos de três regiões das Canárias para diversos metais, entre os quais se incluem os três metais estudados neste trabalho. Através da seleção das uvas com diferentes e com estados de maturação idênticos, constata-se que o sódio, o ferro e o cobre estão presentes em quantidades superiores nos vinhos doces, comparativamente aos verificados nos vinhos secos (45). Não obstante ao referido anteriormente nas situações do cobre e ferro, ao nível das possíveis contaminações provenientes das estruturas de vinificação e dos tratamentos que são realizados na vinha, não é de descartar uma relação entre o período de fermentação e o conteúdo destes minerais. No decorrer da fermentação, o mosto é clarificado com recurso a

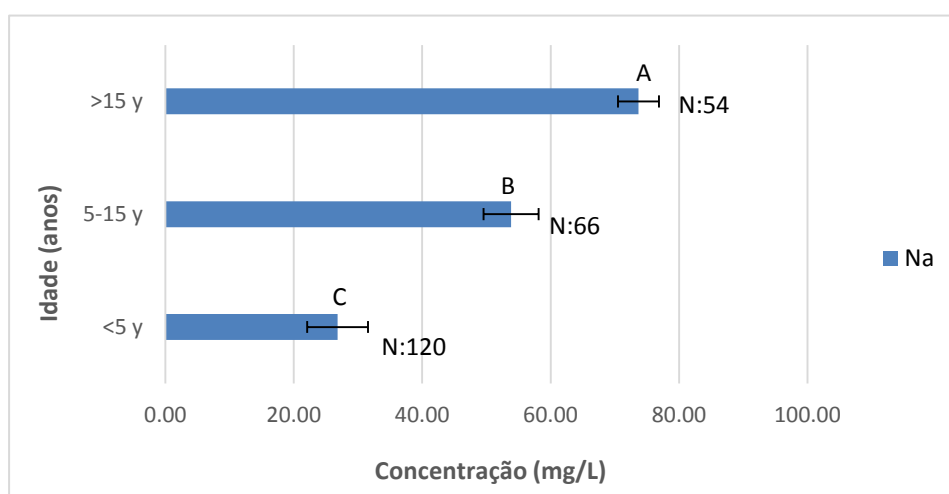
bentonites com o objetivo de eliminar as borras que provocam turvação na amostra. Deste modo, quanto mais tempo o mosto estiver a fermentar, maior quantidade de precipitado é formado, os quais podem incluir os elementos analisados anexados a outros compostos.

#### 8.4.3. Análise por Idade

Outro aspeto abordado tem a ver com a relação da idade do vinho com a presença de metais. O envelhecimento em cascos de madeira é um ponto marcador que permite a aquisição de uma complexidade aromática que torna o Vinho da Madeira um produto altamente reconhecido.



**Figura 7:** Influência do fator idade nos teores de Cu e Fe



**Figura 8:** Impacto do fator idade nos teores de Na

Contrariamente ao reportado ao nível da doçura, o fator idade mostra uma tendência da concentração dos três elementos, sendo os vinhos mais envelhecidos (>20 y) os que apresentam maiores teores de cobre, ferro e sódio comparativamente a vinhos mais jovens (<5 y). Um aspeto interessante neste estudo, é que a concentração desses teores indica um crescimento significativo nos primeiros anos de envelhecimento sobretudo até aos 15 anos. A partir dos 15 anos, o aumento registado não é tão evidente. No entanto, no caso do sódio, esse aumento é prolongado ao longo da idade com base nos dados da Fig.8. No cobre, amostras acima dos 20 anos verificaram uma ligeira descida. Um caso semelhante foi constatado nomeadamente em cobre e sódio em vinhos brancos provenientes de duas regiões do sul de Espanha. A análise de 47 amostras subdivididas, nas regiões de Montilla–Moriles e Villaviciosa, jovens e envelhecidas, demonstraram um registo significativo de aumento nos casos de cobre e sódio para os vinhos das duas regiões. Inversamente ao que foi verificado nos metais anteriores, o ferro diminui, sendo nos vinhos da localidade de Villaviciosa onde esse decréscimo foi estatisticamente significativo (7,34 mg/L para vinhos jovens e 5,8 mg/L para os envelhecidos) (85). Isto parece indicar que nos primeiros anos, o envelhecimento dos vinhos promove um impacto nos resultados, eventualmente associado a perdas de volume do vinho, nomeadamente água durante a maturação em casco por evaporação ou por difusão, o que poderá contribuir para o aumento da concentração dos teores dos três metais.

#### 8.5. Comparação das quantificações EAA vs Colorimetria

Embora a OIV estabeleça como método de referência para o controlo dos níveis de diversos metais nos vinhos a técnica EAA, a mesmo organismo contempla métodos alternativos para as análises de cobre e ferro, como por exemplo o método por colorimetria baseada na leitura das absorvâncias do cobre e da transmitância do ferro respectivamente promovidas pela complexação entre o metal e o reagente colorimétrico. As determinações foram realizadas através da preparação de uma única amostra por garrafa para efeitos de comparação com o método de absorção atómica. A comparação dos resultados entre as duas técnicas está ilustrada nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Comparação dos resultados das análises EAA vs Colorimetria

Produtor	Vinho	Concentração de Cu (mg/L) por EAA	Concentração de Cu (mg/L) por colorimetria	Concentração de Fe (mg/L) por EAA	Concentração de Fe (mg/L) por colorimetria
Produtor X	3 Anos Meio Seco E	0,89	0,94	1,38	1,21
	3 Anos Seco D	<LOQ	0,31	0,74	2,15
	3 Anos Doce A	<LOQ	0,21	0,42	0,68
	3 Anos Seco H	0,23	0,25	1,79	1,25
	3 Anos Meio Seco B	<LOD	0,19	0,41	1,69
	3 Anos Doce B	<LOD	0,32	<LOQ	0,83
	3 Anos Seco B	<LOQ	0,16	0,48	1,66
	3 Anos Seco E	<LOQ	0,18	0,96	1,61
	3 Anos Seco F	<LOQ	0,21	0,84	1,89
	3 Anos Seco G	<LOD	0,16	0,56	1,42
	3 Anos Seco A	<LOQ	0,28	1,40	2,87
	3 Anos Seco C	<LOQ	0,25	0,58	1,26
	3 Anos Meio Seco A	<LOQ	0,18	<LOQ	1,83
	3 Anos Meio Seco C	<LOD	0,21	0,42	1,20
	3 Anos Meio Seco D	<LOD	0,22	0,56	1,82
	Malvasia A	0,23	0,82	1,02	0,96
	Malvasia B	<LOQ	0,79	0,64	0,49
	5 Anos M/Seco	<LOQ	0,15	0,91	0,72
	15 Anos Bual	0,67	0,83	2,68	2,63

Tabela 14: Comparação dos resultados de Cu e Fe em amostras independentes

Amostra-Teste	Concentração de Cu (mg/L) por EAA	Concentração de Cu (mg/L) por colorimetria	Concentração de Fe (mg/L) por EAA	Concentração de Fe (mg/L) por colorimetria
15 Anos Doce A	0,67	0,83	2,68	2,63
15 Anos Meio Seco A	2,79	2,91	4,78	4,28

**Nota EAA:** LOD (cobre): 0,012 mg/L; LOQ (cobre): 0,05 mg/L; LOQ (Ferro): 0,1 mg/L.

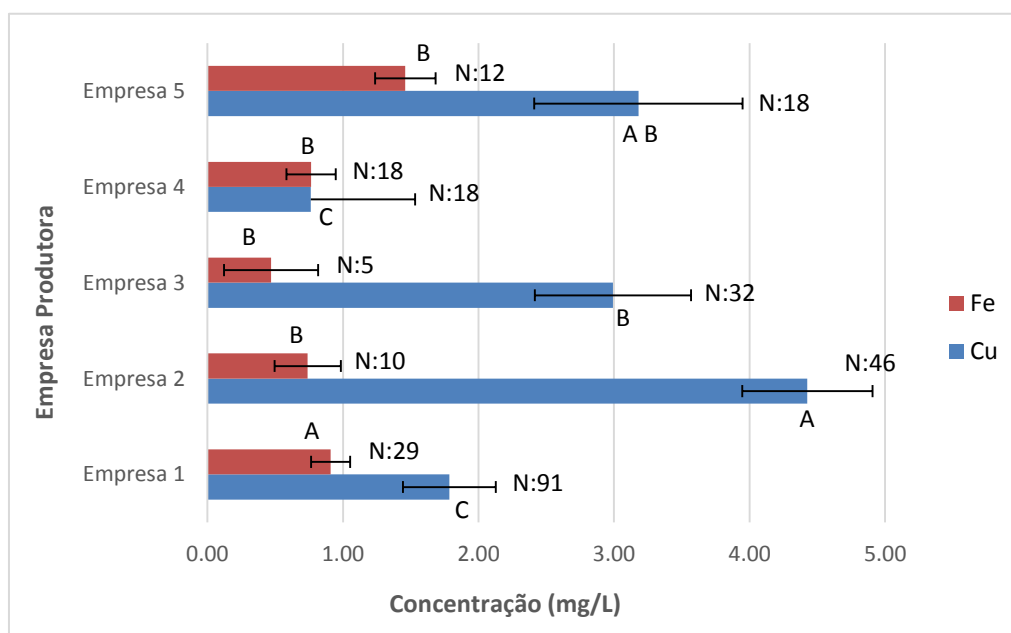
Os valores determinados nas amostras de Vinho da Madeira por EAA indicam que as concentrações de cobre, na sua maioria, estão abaixo dos limiares detetáveis ou quantificáveis pela metodologia. Apenas quatro amostras fornecidas pelo produtor X revelaram estar acima do limiar de quantificação do cobre por EAA (0,05 mg/L). No entanto, é de salientar que dentro destas quatro amostras quantificáveis, uma encontra-se próximo do limite máximo recomendado pela OIV referido para o cobre, 1 mg/L (26). Os resultados demonstram que os valores quantificados por colorimetria são tendencialmente superiores aos verificados pelo método de absorção atómica, demonstrando que o EAA tem um limite de sensibilidade maior (deteta valores mais baixos) e a colorimetria devido à menor sensibilidade apresenta valores superiores variando essa diferença entre 5 a 20%, em três das 4 amostras possíveis de comparar. Os resultados das restantes amostras não são comparáveis, relevando grandes diferenças entre as duas metodologias. O método por colorimetria indica a presença de cobre em todas as amostras analisadas, acima do LOQ da metodologia por EAA. Tal como o cobre, os dados determinados para ferro pelo método alternativo indicam concentrações mais elevadas, quando as mesmas amostras são analisadas por EAA (método oficial). As amostras analisadas apresentam valores entre 1,20 e 1,89 mg/L. A razão das diferenças entre as duas metodologias não foi objeto de análise no presente trabalho, contudo é possível acrescentar que a menor seletividade do método de colorimetria pode estar na base das diferenças encontradas.

## 8.6. Determinação dos metais Cobre e Ferro em Rum da Madeira

### 8.6.1. Análise por Produtor

No mesmo âmbito do estudo realizado no Vinho da Madeira, as determinações de cobre e ferro foram feitas em 34 amostras de Rum da Madeira pertencentes a cinco produtores distintos. O estudo incidiu sobre as diferenças registadas entre estes dois metais com base em três fatores: empresa produtora, tipo de rum e idade. As diferenças nos teores de cobre e ferro estão registadas abaixo.

Este estudo indica em primeira instância que o cobre é o elemento que se encontra em maior predominância, em detrimento do ferro (figura 9). O valor médio de todas as amostras analisadas indica que a presença de cobre, em média, é cerca de três vezes mais (2,63 mg/L) quando comparado com o ferro (0,87 mg/L).



**Figura 9:** Diferenças registadas nos teores de Cu e Fe entre empresas produtoras.

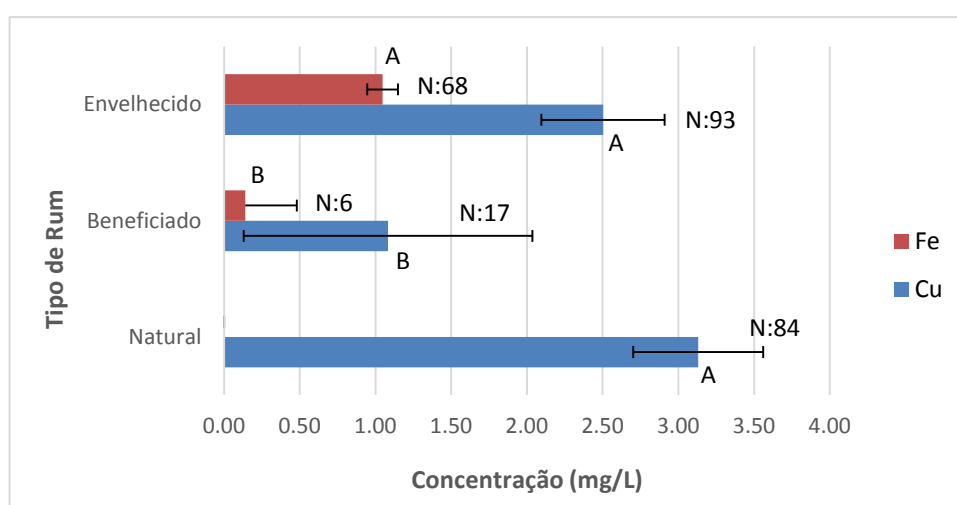
Avaliando os respetivos teores minerais em função dos vários produtores, a Empresa 2 é aquela que regista maiores teores cúpricos nas amostras com uma média registada de 4,43 mg/L, em termos médios mais 1,25 mg/L relativamente à 2ª empresa com valores mais elevados (Empresa 5). Ao nível do controlo legislativo de metais para amostras de aguardente não vínica (na qual se inclui o Rum da Madeira), e como anteriormente mencionado no ponto 3.3 da parte introdutória deste trabalho, não há qualquer restrição a nível regional, nacional ou mesmo europeu legislado para este tipo de aguardentes. Todavia, os valores determinados para o cobre respeitam o máximo de 5 mg/L de cobre imposto pela regulamentação brasileira para as aguardentes de cana e para a cachaça (valor utilizado como uma referência neste estudo) (31).

Para o ferro, as quantificações máximas analisadas foram registadas nas amostras da Empresa 5, com o valor médio a rondar os 1,46 mg/L. Esta média demonstra ser estatisticamente diferente em relação às restantes quatro empresas, os quais apresentam médias abaixo de 1 mg/L e com valores se encontram próximos entre si (estatisticamente não significativo) (Figura 9). Tal como acontece com o cobre, não há qualquer registo de limites recomendados para controlo de ferro nas amostras de Rum da Madeira ou para aguardentes não vínicas. Ainda que a regulamentação brasileira limite as contaminações de alguns metais, não indica no entanto qualquer restrição para o ferro (31).

Em síntese, nota ainda para a facto dos teores registados para os dois metais abordados neste estudo, estarem de acordo com alguns registos sobre o estudo da composição mineral para amostras de aguardente de cana e de cachaça (52,53,88) bem como para algumas aguardentes não vínicas internacionais (53).

### 8.6.2. Análise por Tipo de Rum

A segunda variável estudada nesta matriz diz respeito ao tipo de rum. Como referido anteriormente, o Rum da Madeira pode ser dividida em três tipos: Natural, sendo a bebida produzida e comercializada após a destilação, Edulcorado/Beneficiado, que segundo as práticas redigidas no Decreto Regional Legislativo nº5/2011/M (27), é autorizada a adição de caramelo e de alguns edulcorantes legais, com o objetivo de conferir cor e sabor respetivamente e por fim Envelhecidas que tal como o Vinho da Madeira, são envelhecidas em cascos de madeira de carvalho. A Figura 10 demonstra as diferenças registadas para ambos os metais.



**Figura 10:** Teores de Cu e Fe nas amostras de Rum da Madeira de acordo com o tipo de rum.

Com base nos resultados demonstrados, há vários aspetos interessantes. Em primeiro lugar, ao longo do processo de produção do Rum da Madeira, as amostras de Rum da Madeira Natural adquirem maiores teores de cobre (3,13 mg/L), quando comparadas com as amostras às quais são adicionados edulcorantes (1,08 mg/L) ou então envelhecidas (2,50 mg/L). Como verificado e com base na análise estatística, as médias das amostras de Rum da Madeira Natural e Envelhecidas são significativamente diferentes em relação às garrafas de Rum da Madeira Beneficiado. Segundo Kunigk (89) e Dos Santos (90), a presença de cobre nas bebidas espirituosas ocorre pelo facto dos alambiques serem construídos a partir de cobre, pois representa um elemento resistente à corrosão, apresenta boas propriedades de condutividade

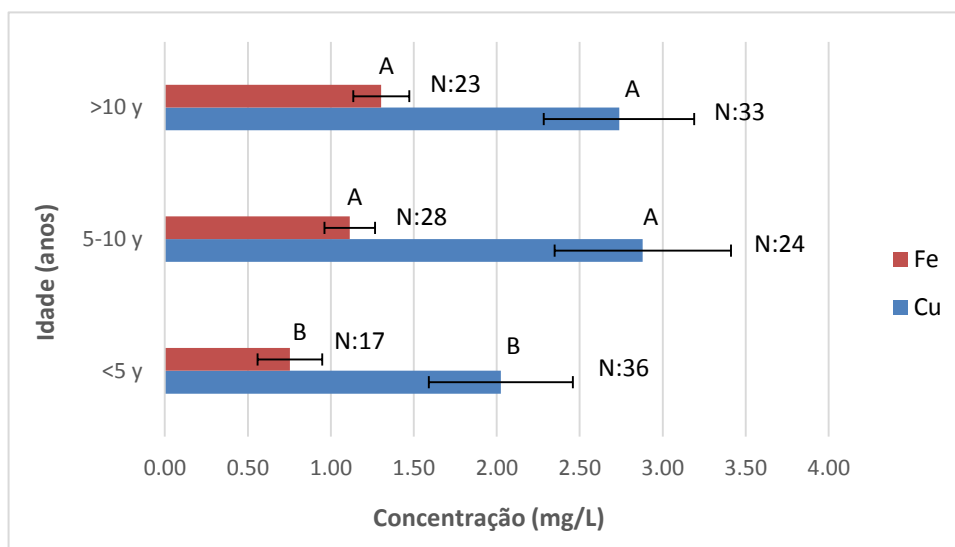
térmica, para além de catalisar reações que intensificam as propriedades organoléticas do produto (89,90). Portanto, o contacto da bebida com os alambiques cuja composição das ligas metálicas contem cobre, promove dessa forma o aparecimento deste metal no produto. Aliás, a tendência verificada no cobre é de um decréscimo não significativo ao longo das várias etapas de produção e envelhecimento, quando comparado com amostras de Rum da Madeira Natural e Envelhecidas. Contudo, de destacar que apenas foram analisadas três amostras de Rum da Madeira Beneficiado, todas do mesmo produtor, não sendo portanto representativa a amostragem realizada para este tipo de bebida.

Quanto ao ferro, este regista um comportamento inverso em relação ao cobre. Enquanto as amostras de Rum da Madeira Natural são as que apresentam maiores quantidades de cobre, por outro lado, estas mesmas amostras não contêm vestígios de ferro quantificáveis, indicando desta forma que durante o processo de produção, não há enriquecimento de ferro na bebida (Figura 10), indo ao encontro do reportado na bibliografia. De acordo com Curvelo-Garcia AS (25), nas amostras destiladas, não há qualquer sinal da presença de ferro. Contudo, neste estudo é perceptível o aparecimento de ferro nas amostras de Rum da Madeira Envelhecido cujos teores vão aumentando significativamente quando transitam para cascos de madeira de carvalho para envelhecer, por um período não inferior a três anos (Figura 10). O seu aparecimento, ainda que em níveis residuais, pode ocorrer devido ao transporte da bebida em estruturas de betão com superfícies sem qualquer isolamento, nos quais componentes estruturais em ferro estejam presentes, por exemplo, em bombas, sendo esse contacto essencial para o aparecimento deste metal na bebida (25).

### 8.6.3. Análise por Idade

O contacto da aguardente com os cascos de madeira durante o envelhecimento por via da solubilização e da difusão, faz com que seja extraído um vasto conjunto de compostos que se acumulam com os existentes na aguardente destilada, formando uma bebida com uma complexidade aromática enorme (25). Neste estudo, o impacto provocado pela permanência do Rum da Madeira em estruturas de madeira, foi

avaliado em termos de cobre e ferro, através da análise de várias garrafas envelhecidas.



**Figura 11:** Comparação dos teores de Cu e Fe em função da Idade.

Durante o envelhecimento, a situação constatada é que tanto no ferro como no cobre, as concentrações aumentam com a idade nos cascos de madeira. O aumento é estatisticamente mais significativo nos primeiros 10 anos de envelhecimento para os dois metais.

Já a partir dos 10 anos, continua a verificar-se um aumento nas concentrações de ferro (1,3 mg/L), ainda que ligeiro. Ao invés do ferro, o cobre e para o conjunto de amostras analisadas com idade superior a 10 anos, apresenta uma média ligeiramente mais baixa (2,74 mg/L) comparativamente à faixa etária 5-10 y (2,88 mg/L). O registo da concentração de cobre e ferro no Rum da Madeira poderá explicar-se pelo mesmo fenómeno verificado no Vinho da Madeira, dado que o processo de envelhecimento das duas bebidas é idêntico. A perda de volume da bebida, fundamentalmente por difusão da água através da madeira, que se trata de material semipermeável, promove uma concentração destes metais na bebida reflectindo-se num aumento das concentrações destes dois metais.

Ainda em relação ao ferro, é descrito na literatura que uma percentagem residual de ferro (0,2 a 0,5%) encontra-se nas estruturas de envelhecimento a partir da madeira de carvalho, sendo por isso passíveis de transferência para a aguardente durante o envelhecimento, isto apesar de se encontrar em concentrações mínimas (25).



**Parte IV – Conclusões e Perspetivas  
Futuras**



## 9. Conclusões

O cobre, ferro e sódio representam dos elementos mais investigados em laboratórios enológicos e de aguardentes não vínicas. A sua presença, sobretudo cobre e ferro em determinadas concentrações, pode afetar a qualidade e a estabilidade do produto final, estando a cargo das empresas produtoras a responsabilidade de determinar os pontos críticos das contaminações durante o processo produtivo e realizar as alterações necessárias em conformidade, ainda que para tal possa acarretar grandes custos para as empresas.

Neste estudo pretendia-se quantificar os teores de cobre, ferro (em Vinho da Madeira e Rum da Madeira) e sódio (apenas no Vinho da Madeira) presente na composição mineral de duas matrizes alcoólicas por Espectrofotometria de Absorção Atômica, e registar eventuais tendências sob o olhar de três perspetivas distintas. Para tal, foram quantificadas diversas amostras de Vinho da Madeira de diferentes empresas produtoras, de diferentes graus de doçura e diferentes idades. Quanto ao Rum da Madeira, foram analisadas amostras de diferentes produtores, de diferentes idades e diferentes tipos. Foi também feita a comparação das quantificações de acordo com as duas metodologias distintas (EAA vs Colorimetria), ainda que apenas para a determinação dos teores de cobre e ferro no Vinho da Madeira de um dos produtores locais.

Relativamente ao Vinho da Madeira, conclui-se que os teores de sódio são substancialmente superiores aos valores registados para cobre e ferro. Inclusivamente e com base nos valores obtidos, conclui-se ser o sódio, um dos elementos maioritariamente presentes na composição mineral deste produto, tal como tinha sido constatado em várias publicações anteriormente referidas. Apesar disto, o foco e a preocupação dos investigadores e das empresas recaem sobre os outros dois metais, em virtude das suas características e das suas implicações que têm sobre a qualidade do Vinho da Madeira. Os resultados demonstram que os teores para ambos os metais são baixos e na generalidade similares ao primeiro estudo realizado neste âmbito

sobre a mesma matriz (20). Apenas num produtor, a empresa nº7, foram quantificados valores mais altos para os três elementos em análise, tendo até ultrapassado os limites impostos para o cobre e sódio. No caso do ferro e apesar de não haver restrição, todas os produtores têm os seus teores abaixo dos 10 mg/L a ter em consideração para vinhos com base em diferentes autores. (38).

Relativamente à variável grau de doçura, tendencialmente os vinhos mais doces apresentam teores mais altos de ferro e sódio, em comparação com vinhos mais secos. No cobre, o panorama verificado é um pouco diferente, onde se regista uma alternância entre os graus de doçuras, situação a analisar futuramente. Neste parâmetro verifica-se uma diminuição significativa no ferro entre os vinhos doces e secos, situação que poderá indiciar que durante o processo fermentativo formam-se precipitados que contribuem para a redução deste elemento nos vinhos.

Relativamente ao fator idade, o envelhecimento apresenta um comportamento inverso ao grau de doçura. Ao longo desta etapa, os dados mostram indicações de concentração dos três elementos, sendo os vinhos mais velhos os que apresentam maiores teores de cobre, ferro e sódio. A concentração desses teores parece indicar um maior registo de crescimento nos primeiros anos de envelhecimento sobretudo até aos 15 anos fruto das perdas verificadas no vinho que promovem uma concentração em solução destes metais.

Quanto ao Rum da Madeira, o estudo pioneiro dos teores de cobre e ferro por produtor indicou em primeira instância, que o cobre é o metal que se encontra em maior concentração em detrimento do ferro (contrariamente ao concluído nos vinhos), representando em média o triplo do conteúdo médio verificado para o ferro. A Empresa 2 é a que regista maiores quantidades cúpricas nas suas amostras, enquanto que relativamente ao ferro, as quantificações máximas analisadas foram registadas nas amostras da Empresa 5. Os valores médios determinados para todas as empresas respeitam o máximo de 5 mg/L de cobre imposto pela regulamentação brasileira para as suas aguardentes de cana e para a cachaça. Tal como nos vinhos, não existem limitações em Rum da Madeira para este metal até à presente data.

Relativamente à variável “Tipo de Rum”, durante o processo produtivo, as amostras de Rum da Madeira Natural apresentam maiores teores de cobre comparativamente às amostras edulcoradas ou envelhecidas. O facto das amostras de Rum da Madeira Natural serem comercializadas após a fase de destilação, parece indicar que as contaminações por cobre são mais propícias durante a produção da bebida, derivado das estruturas de destilação (alambiques) construídas em cobre. Todavia, o que é verificado no ferro é um comportamento inverso em relação ao cobre. Se nas amostras de Rum da Madeira Natural, o cobre é o metal que mais presente, por outro lado, estas mesmas amostras não contêm vestígios de ferro. O que é perceptível neste trabalho, é que ao longo da produção desta bebida e na fase de envelhecimento, os teores de ferro vão registando um crescimento significativo.

Na idade, verifica-se que as concentrações de cobre e ferro aumentam, sendo mais notório nos primeiros 10 anos, situação constatada para ambos os vinhos. Nas amostras acima dos 10 anos, ainda é verificado um ligeiro aumento nas concentrações de ferro, ao invés do cobre, o qual a partir daí, apresenta uma média ligeiramente inferior ao conjunto de amostras com idade inferior. (5-10 y).

Na comparação entre as metodologias, o método de referência (EAA) e o método por colorimetria, feita sobre um conjunto de amostras de Vinho da Madeira fornecidas por um dos produtores locais, demonstra que os resultados quantificados por colorimetria são tendencialmente superiores às quantificações pelo método oficial para os dois metais. Uma diferença entre 5 a 20% foi registado em três das 4 amostras onde foi possível realizar uma análise comparativa no cobre. A base desta diferença verificada em ambos os metais poderá estar na menor seletividade proporcionada pelo método colorimétrico.



## 10. Perspetivas Futuras

Este trabalho pretende ser um ponto de partida para diferentes tomadas de decisão no que diz respeito à problemática dos metais e do seu controlo nas bebidas. Como constatado, a investigação sobre a composição mineral concretamente no Vinho da Madeira e Rum da Madeira não é tão abrangente como se exigiria. No único artigo publicado sobre este âmbito no Vinho da Madeira (20), são determinados diversos elementos em chama (sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco, manganês, estrôncio, lítio e rubídio). No entanto e até a presente data, não existe nenhum registo bibliográfico sobre uma classe específica de metais que apresentam uma densidade elevada, estando muitas vezes associado a poluições. Igualmente a toxicidade destes metais pesados em concentrações baixas, requerem desse modo, uma especial vigilância (25). O chumbo e o cádmio constituem elementos tóxicos, mesmo presentes em pequenas quantidades, o que inclusive originou uma publicação da OIV em 1995 (25). O chumbo, em virtude dos desenvolvimentos tecnológicos na vinificação, tem sido cada vez mais restringido na composição dos vinhos ao longo dos anos. Isto faz com que seja dos metais, dentro desta categoria, mais investigados nos vinhos (5,80). Dados publicados nos últimos anos revelam que os teores deste metal nos vinhos são na ordem dos  $\mu\text{g/L}$  (1,5,75), o que exige condições de sensibilidade que a chama não é capaz de determinar, dando lugar à determinação por forno de grafite (91). Por isso e dado o desconhecimento das concentrações e dos níveis de ocorrência destes dois metais existentes no Vinho da Madeira com vista a segurança do consumidor, é de todo o interesse a investigação e controlo nesta matéria.

Uma das fases críticas das contaminações de Rum da Madeira, especialmente por cobre, está associada ao processo de destilação. Como evidenciado neste trabalho, as amostras de Rum da Madeira Natural tem teores superiores deste elemento em relação às amostras de Rum da Madeira Beneficiado/Edulcorado e Envelhecido. Neste sentido é crucial entender no futuro os momentos durante o seu processo produtivo em que a bebida adquire um enriquecimento de cobre e, desta forma, evitar altas

concentrações nas garrafas. Através de colheita de frações da bebida nos alambiques no início, meio e fim da laboração e também das amostras armazenadas nos tanques, será possível avaliar em que momentos poderão ocorrer as contaminações, excluindo essas frações contaminantes e garantido desse modo teores mais baixos de cobre na bebida ou promovendo alterações no processo produtivo.

## 11. Bibliografia

1. Catarino S. A ocorrência de chumbo e cádmio em vinhos. Porto. Dissertação de Mestrado em Viticultura e Enologia. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2000.
2. Fournier JB, Hirsch O. The use of trace element data in the characterization of wines. In *Vino Anal Scien*. 1997. 532–535.
3. Medina AGB. Les Ions Métalliques dans la Différenciation des Vins Rouges des Trois Régions D'Appellation D 'Origine Rioja. *Connaiss Vigne Vin*. 1987;21:127–140.
4. Day MP, Zhang B-L, Martin GJ. The Use of Trace Element Data to Complement Stable Isotope Methods in the Characterization of Grape Musts. *Am J Enol Vitic*. 1994;45:79–85.
5. Catarino S, Curvelo-Garcia AS, Bruno de Sousa R. Revisão : Elementos Contaminantes. *Ciência Téc. Vitiv*. 2008;23:3–19.
6. Leça JM. Evolution of Ethyl Carbamate During Madeira Wine Ageing by GC-MS: A new methodology. Funchal. Master Dissertation in Applied Biochemistry. University of Madeira; 2014.
7. Miranda A. Olfactory perception threshold assessment of volatile acidity in Madeira wines. Funchal. Master Dissertation in Applied Biochemistry. University of Madeira; 2015.
8. Pereira V, Cacho J, Marques JC. Volatile profile of Madeira wines submitted to traditional accelerated ageing. *Food Chem*. 2014;162:122–134.
9. Elliott T. *The Wines of Madeira: An indispensable guide to the wines, grapes and producers*. 1 ed. Hampshire: Trevor Elliott Publishing; 2010.
10. Perestrelo R, Silva C, Câmara JS. A useful approach for the differentiation of wines according to geographical origin based on global volatile patterns. *J Sep Sci*. 2014;37:1974–1981.
11. Perestrelo R, Fernandes A, Albuquerque FF, Marques JC, Câmara JS. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Anal Chim Acta*. 2006;563:154–164.
12. Oliveira e Silva H, Guedes de Pinho P, Machado BP, Hogg T, Marques JC, Câmara JS et al. Impact of forced-aging process on Madeira wine flavor. *J Agric Food Chem*. 2008;56:11989–11996.

13. Campo E, Ferreira V, Escudero A, Marques JC, Cacho J. Quantitative gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines. *Anal Chim Acta*. 2006;563:180–187.
14. Câmara JS, Herbert P, Marques JC, Alves MA. Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines. *Anal Chim Acta*. 2004;513:203–207.
15. Câmara JS, Alves MA, Marques JC. Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. *Anal Chim Acta*. 2006;563:188–197.
16. Alves RF, Nascimento AMD, Nogueira JMF. Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Anal Chim Acta*. 2005;546:11–21.
17. Pereira V, Câmara JS, Cacho J, Marques JC. HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *J Sep Sci*. 2010;33:1204–1215.
18. Câmara JS, Marques JC, Alves MA, Silva Ferreira AC. 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone levels in fortified Madeira wines: Relationship to sugar content. *J Agric Food Chem*. 2004;52:6765–6769.
19. Pereira V. Effect of the Estufagem Process on Chemical Constituents of Madeira Wines. Funchal. PhD Thesis in Analytical Chemistry. University of Madeira; 2011.
20. Pérez-Trujillo JP, Conde JE, Pérez Pont ML, Câmara JS, Marques JC. Content in metallic ions of wines from the Madeira and Azores archipelagos. *Food Chem*. 2011;124:533–537.
21. Madeira AL. Decreto Legislativo Regional n.º 1-A/2015/M: Estatuto da Vinha e do Vinho da Região Autónoma da Madeira. *JORAM*. 1ª série-Nº7. Portugal; 2015: 3619–3634.
22. Europeu P. Regulamento (UE) Nº 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de Dezembro de 2013. *JO*. nº L 347. Belgica; 2013: 671–854.
23. Agricultura, Floresta e Pescas SR. Portaria n.º 86/99: Aprova o VQPRD "madeirense". *JORAM*. 1ª série-Nº50. Portugal; 1998: 2–4.
24. Ambiente e Recursos Naturais SR. Portaria nº38/2015: Aprova as Regras Relativas à Designação, Denominação, Apresentação e Rotulagem do Vinho com Denominação de Origem "Madeira." *JORAM*. 1ª série-Nº28 Portugal; 2015:2–4.
25. Curvelo-Garcia AS, Barros P. Química Enológica - Métodos Analíticos: Avanços recentes no controlo da qualidade de vinhos e de outros produtos vitivinícolas. 1º ed. Porto: Publindústria, Edições Técnicas, Lda; 2015.
26. OIV. Limites Maximales Acceptables. *Recueil des Methodes Internationales D'Analyses*. 1ºEd. Paris; 2015.

27. Legislativa A. Decreto Legislativo Regional n.º 5/2011/M: Confirma a indicação geográfica protegida do «Rum da Madeira» e regula a sua produção e comércio. DRE. 1.ª série — N.º 52. Portugal; 2011:1453–1456.
28. IVBAM. Ficha Técnica da IG Rum da Madeira. Portugal; 2014.
29. Europeu P. Regulamento (CE) N.º110/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Janeiro relativo à definição, designação, apresentação, rotulagem e protecção das indicações geográficas das bebidas espirituosas. JO. nº L 39. Belgica; 2008: 16–54.
30. Europeia CE. Regulamento (CEE) n.º 1576/89 do Conselho de 29 de Maio de 1989 que estabelece as regras gerais relativas à definição, à designação e à apresentação das bebidas espirituosas. JO. nº L 160. Belgica; 1989.
31. Agricultura, Pecuária e Abastecimento ME. Instrução Normativa Nº 13 de 29 de Junho de 2005 que aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. DOU - Seção I. Brasil; 2005: 2–7.
32. Desenvolvimento Rural e Pescas MA. Decreto-Lei n.º238/2000 de 26 de Setembro. DRE, 1.ª série — N.º 223. Portugal; 2000: 5145–5147.
33. Qualidade IP. Norma Portuguesa Nº2442. Bebidas alcólicas e espirituosas: Determinação de teor de cobre por espectrofotometria de absorção atómica. DRE. 3.ª série — N.º 276. Portugal; 1988
34. Qualidade IP. Norma Portuguesa Nº2280. Bebidas alcólicas e espirituosas: Determinação do teor de ferro por espectrofotometria de absorção atómica. DRE. 3.ª série — N.º 276 Portugal; 1988
35. OIV. OIV-MA-AS322-06 - Copper. Compendium of International Methods of Analysis. France; 2009.
36. OIV. OIV-MA-AS322-05A - Iron. Compendium of International Methods of Analysis. France; 2009.
37. Alexandre H, Charpentier C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. J Ind Microbiol Biotechnol. 1998;20:20–27.
38. Curvelo-Garcia AS, Catarino S. Os metais contaminantes dos vinhos. Origens da sua presença, teores, influência dos factores tecnológicos e definição de limites. Ciência e Téc. Vitiv. 1998;13:49–70.
39. Benítez P, Castro R, Antonio Sanchez Pazo J, Barroso CG. Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning. Food Res Int. 2002;35:785–791.
40. Paneque P, Álvarez-Sotomayor MT, Gomez IA. Metal contents in “oloroso” sherry wines and their classification according to provenance. Food Chem. 2009;117:302–305.

41. Azenha M, Vasconcelos MT. Assessment of the Pb and Cu in vitro availability in wines by means of speciation procedures. *Food Chem Toxicol.* 2000;38:899–912.
42. Álvarez M, Moreno IM, Jos Á, Cameán AM, Gustavo González A. Differentiation of two Andalusian DO “fino” wines according to their metal content from AAS by using supervised pattern recognition methods. *Microchem J.* 2007;87:72–76.
43. Conde JE, Estévez D, Rodríguez-Bencomo JJ, García-Montelongo F, Pérez-Trujillo JP. Characterization of Bottled Wines From the Tenerife Island (Spain) By Their Metal Ion Concentration. *Ital J Food Sci.* 2002;14:375–388.
44. Díaz C, Conde JE, Estévez D, Pérez Olivero SJ, Pérez-Trujillo JP. Application of multivariate analysis and artificial neural networks for the differentiation of red wines from the Canary Islands according to the island of origin. *J Agric Food Chem.* 2003;51:4303–4307.
45. Frías S, Conde JE, Rodríguez-Bencomo JJ, García-Montelongo F, Pérez-Trujillo JP. Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *Talanta.* 2003;59:335–344.
46. Fabani MP, Arrúa RC, Vázquez F, Diaz MP, Baroni MV, Wunderlin DA. Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. *Food Chem.* 2010;119:372–379.
47. Catarino S, Pinto D, Curvelo-Garcia AS. Validação e Comparação de Métodos de Análise em Espectrofotometria de Absorção Atômica com Chama para Doseamento de Cobre e Ferro em Vinhos e Aguardentes. *Ciência Téc. Vitiv.* 2003;18:65–76.
48. Alkiş IM, Öz S, Atakol A, Yilmaz N, Anli RE, Atakol O. Investigation of heavy metal concentrations in some Turkish wines. *J Food Compos Anal.* 2014;33:105–110.
49. Rivero Huguet EM. Monitoring of Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in Fine Uruguayan wines by Atomic Absorption Spectroscopy. *Atom Spectrosc.* 2004;25:177–184.
50. Pinto GF, Rocha SS, Canuto MH, Siebald HGL, Borda da Silva BJ. Determinação de cobre e zinco em cachaça por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama usando calibração com ajuste de matriz. *Analytica.* 2005;17:48-50
51. Canuto MH, Siebald HGL, Beininger MA, Bento J, Silva B. Determination of cadmium , iron and tin in home-made Brazilian sugar cane spirit , cachaça by graphite furnace absorption spectrometry using matrix matching calibration. *J Environ Sci Toxicol Food Technol.* 2015;9:55–61.
52. Miranda K, Dionísio AGG, Pereira-Filho ER. Copper determination in sugar cane spirits by fast sequential flame atomic absorption spectrometry using internal standardization. *Microchem J.* 2010;96:99–101.

53. Nascimento RF, Bezerra CWB, Furuya SMB, Schultz MS, Polastro LR, Lima Neto BS et al. Mineral profile of Brazilian Cachaças and other international spirits. *J Food Compos Anal.* 1999;12:17–25.
54. Almeida LF, Martins VL, Silva EC, Moreira PNT, Araujo MCU. Implementation of an automatic standard addition method in a flow-batch system: Application to copper determination in an alcoholic beverage by atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2003;486:143–148.
55. Labanca RA, Glória MBA, Gouveia VJP, Afonso RJDCF. Determinação dos teores de cobre e grau alcoólico em aguardentes de cana produzidas no estado de Minas Gerais. *Quim Nova.* 2006;29:1110–1113.
56. Oshita D, Oliveira AP, Gomes Neto JA, Moraes M. Determinação direta e simultânea de Al, As, Fe, Mn e Ni em Cachaça por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. *Eclét Quím.* 2003;28:91–96.
57. Caldas NM, Filho VRA, Neto JAG. Direct and simultaneous determination of As, Cu and Pb in Brazilian sugar cane spirits by graphite furnace AAS using tungsten permanent modifier with co-injection of Pd/Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. *Atom Spectrosc.* 2007;28:189–94.
58. Caldas NM, Raposo JL, Gomes Neto JA, Barbosa F. Effect of modifiers for As, Cu and Pb determinations in sugar-cane spirits by GF AAS. *Food Chem.* 2009;113:1266–1271.
59. Caldas NM, Oliveira SR, Gomes Neto JA. Feasibility of internal standardization in the direct and simultaneous determination of As, Cu and Pb in sugar-cane spirits by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2009;636:1–5.
60. Walsh A, Helton JP. *Handbook of Their Exhibition of Institute of Physics.* 1<sup>o</sup> Ed. Melbourne; 1954.
61. Almeida MMP. *Validação de Métodos Analíticos por Espectrofotometria de Absorção Atômica.* Santarém. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química. Instituto Politécnico de Tomar; 2013.
62. Redinha JS, Vasconcelos MT, Leitão MLP, Eusébio M, Ettlin D, Freire M. *Espectrofotometria de Absorção Atômica.* Coimbra; 1996.
63. Welz B, Sperling M. *Atomic Absorption Spectrometry.* 3<sup>o</sup> Ed. Ausburg. Wiley-VCH Editor; 1999.
64. Skoog D, West D, Holler FJ, Stanley RC. *Fundamentos de química analítica.* 8<sup>o</sup> Ed. Thomsom Editor. Echuca; 2006.
65. Véstia JLM. *Quantificação do ião cálcio nas uvas e vinhos brancos por espectroscopia de infravermelho.* Évora. Dissertação de Mestrado em Viticultura e Enologia. Universidade de Évora; 2016.

66. Elmer P. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry. J Chem Educ. 1972:250.
67. OIV. OIV-MA-AS322-03A - Sodium. Compendium of International Methods of Analysis. France; 2009.
68. OIV. OIV-MA-BS-30 Copper – Determination by atomic absorption. Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivinicultural Origin. France; 2009.
69. OIV. OIV-MA-BS-31 Iron – Determination by atomic absorption. Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivinicultural Origin. France; 2009.
70. Qualidade IP. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Portugal; 2013.
71. OIV. Practical guide for the validation, quality control, and uncertainty assessment of an alternative oenological analysis method. Compendium of International Methods of Analysis - OIV Guide for the validation. France; 2005.
72. Laboratórios Acreditados AP. Guia Relacre 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Fevereiro 2000. Relacre Editor. Lisboa; 2006.
73. Standardization OI. ISO/IEC 17043: Conformity assessment -- General requirements for proficiency testing. Switzerland; 2010
74. Aceto M, Abollino O, Bruzzoniti CM, Concetta M, Mentasti E, Sarzanini C et al. Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES): a review. Food Addit Contam. 2010;19:126–133.
75. Catarino S, Curvelo-Garcia AS, Bruno de Sousa R . Elementos contaminantes no vinho. Porto. Estação Vitivinícola Nacional; 2008.
76. Guardia M, Garrigues S. Handbook of Mineral Elements in Food. 1<sup>o</sup> Ed. Valencia Wiley Blackwell editor; 2015: 109-122.
77. Ribéreau Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. Handbook of enology: The chemistry of wine stabilization and treatments. 2<sup>o</sup> Ed. John Wiley& Sons Ltd editor. 2006.
78. Salvo F, La Pera L, Di Bella G, Nicotina M, Dugo G. Influence of different mineral and organic pesticide treatments on Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) contents determined by derivative potentiometric stripping analysis in Italian white and red wines. J Agric Food Chem. 2003;51:1090–1094.
79. Garcia Esparza MA. Copper content of grape and wine from Italian farms. Food Addit Contam. 2006;23:274–280.
80. Catarino S. Metais contaminantes nos vinhos. Ocorrência por influência das bentonites. Lisboa. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial Universidade Técnica de Lisboa; 2006.

81. Catarino S, Pimentel I, Curvelo-Garcia AS. Determination of copper in wine by ETAAS using conventional and fast thermal programs: Validation of analytical method. *Atom Spectrosc.* 2005;26:73–78.
82. Costa RCC, Cardoso MI, Araújo AN. Metals Determination in Wines by Sequential Injection Analysis With Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Am J Enol Vitic.* 2000;51:131–136.
83. Thiel G, Danzer K. Direct analysis of mineral components in wine by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). *Fresenius J Anal Chem.* 1997;357:553–557.
84. Vystavna Y, Rushenko L, Diadin D, Klymenko O, Klymenko M. Trace metals in wine and vineyard environment in southern Ukraine. *Food Chem.* 2014;146:339–344.
85. Paneque P, Álvarez-Sotomayor MT, Clavijo A, Gómez IA. Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing. *Microchem J.* 2010;94:175–179.
86. Barbaste M, Medina B, Sarabia L, Ortiz MC, Pérez-Trujillo JP. Analysis and comparison of SIMCA models for denominations of origin of wines from de Canary Islands (Spain) builds by means of their trace and ultratrace metals content. *Anal Chim Acta.* 2002;472:161–174.
87. Grindlay G, Mora J, Gras L, Loos-Vollebregt MTC. Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications. *Anal Chim Acta.* 2011;691:18–32.
88. Cardoso DR, Andrade Sobrinho LG, Leite Neto AF, Reche RV, Isique WD, Ferreira MMC et al. Comparison between cachaça and rum using pattern recognition methods. *J Agric Food Chem.* 2004;52:3429–3433.
89. Kunigk L, Dos Santos MCR, Jurkiewicz C. Remoção de íons de cobre de aguardente utilizando carvão ativo e resinas de troca iônica. *Acta Sci Technology.* 2011;33:101–106.
90. Dos Santos MCR. Quantificação e Remoção de Íons de Cobre em Aguardente de Cana-de-Açúcar. São Caetano do Sul. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos. Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia; 2009.
91. OIV. Criteria for the methods of quantification of lead in wine. *Compendium of International Analysis of Methods.* France; 2006.



## **Parte V- Anexos**



## Anexo I

Tabela 15 - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Cu nas amostras de Vinho da Madeira

Produtor	Vinho	Idade	Concentração Cu na garrafa (mg/L)	SD	RSD (%)
Produtor 1	Meio Seco	3 Anos	0,23	0,01	0,16
	Meio Doce	3 Anos	<LOQ		
Produtor 2	Doce	5 Anos	0,53	0,01	0,64
	Seco	10 Anos	0,59	0,01	0,88
	Meio Seco	25 Anos	0,96	0,01	0,16
Produtor 3	Meio Doce	5 Anos	1,27	0,004	1,37
	Terrantez	20 Anos	0,52	0,01	0,24
	Doce	15 Anos	1,07	0,01	1,12
	Meio Seco	20 Anos	0,67	0,01	1,04
Produtor 4	Meio Seco	5 Anos	0,52	0,01	0,64
	Meio Doce	3 Anos	0,27	0,01	0,32

Tabela 15 - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Cu nas amostras de Vinho da Madeira (Continuação)

Produtor	Vinho	Idade	Concentração Cu na garrafa (mg/L)	SD	RSD (%)
Produtor 5	Doce	20 Anos	0,45	0,2	0,32
	Meio Doce	3 Anos	<LOQ		
	Meio Seco	3 Anos	<LOQ		

Produtor 6	Meio Doce	43 Anos	<LOQ	0,01	0,16
	Terrantez Meio Doce	20 anos	0,29		
	Meio Seco	10 Anos	<LOQ		
	Meio Doce	10 anos	<LOQ		

Produtor 7	Meio Seco	30 Anos	1,79	0,01	0,32
	Meio Seco	15 Anos	2,21		
	Doce	15 Anos	2,79		
	TN Seco	87 Anos	1,21		

Produtor 8	Doce	11 Anos	<LOQ	0,01	0,16
	Doce	30 Anos	0,56		
	Doce	5 Anos	0,47		

LOQ (cobre): 0,05 mg/L.

Tabela 16 - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Fe nas amostras de Vinho da Madeira

Produtor	Vinho	Idade	Concentração Fe na garrafa (mg/L)	SD	RSD (%)
Produtor 1	Meio Seco	3 Anos	0,67	0,01	0,25
	Meio Doce	3 Anos	0,66	0,02	0,10

Produtor 2	Doce	5 Anos	2,57	0,03	0,44
	Seco	10 Anos	3,24	0,01	0,98
	Meio Seco	25 Anos	2,94	0,02	0,34

Produtor 3	Meio Doce	5 Anos	1,27	0,01	0,19
	Terrantez	20 Anos	1,34	0,01	0,88
	Doce	15 Anos	1,02	0,01	0,6
	Meio Seco	20 Anos	2,04	0,01	0,22

Produtor 4	Meio Seco	5 Anos	2,07	0,03	0,19
	Meio Doce	3 Anos	1,35	0,02	0,12

Tabela 16 - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Fe nas amostras de Vinho da Madeira (Continuação)

Produtor	Vinho	Idade	Concentração Fe na garrafa (mg/L)	SD	RSD (%)
<b>Produtor 5</b>	Doce	20 Anos	2,06	0,02	0,82
	Meio Doce	3 Anos	0,93	0,02	0,82
	Meio Seco	3 Anos	0,99	0,02	0,44

<b>Produtor 6</b>	Meio Doce	43 Anos	3,9	0,02	0,88
	Terrantez Meio Doce	20 Anos	2,67	0,03	0,6
	Meio Seco	10 Anos	1,36	0,02	0,66
	Meio Doce	10 Anos	2,16	0,02	0,19

<b>Produtor 7</b>	Meio Seco	30 Anos	4,38	0,01	1,45
	Meio Seco	15 Anos	4,01	0,02	0,64
	Doce	15 Anos	4,78	0,03	0,16
	TN Seco	87 Anos	3,16	0,02	0,32

<b>Produtor 8</b>	Doce	11 Anos	2,81	0,02	1,04
	Doce	30 Anos	2,45	0,01	0,89
	Doce	5 Anos	0,89	0,02	0,69

Tabela 17 - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Na nas amostras de Vinho da Madeira

Produtor	Vinho	Idade	Concentração Na na garrafa (mg/L)	SD	RSD (%)
Produtor 1	Meio Seco	3 Anos	15,66	0,06	0,06
	Meio Doce	3 Anos	15,37	0,11	0,18

Produtor 2	Doce	5 Anos	50,45	0,1	0,42
	Seco	10 Anos	60,84	0,13	0,81
	Meio Seco	25 Anos	75,75	0,13	2,90

Produtor 3	Meio Doce	5 Anos	51,47	0,11	0,94
	Terrantez	20 Anos	85,48	0,22	1,05
	Doce	15 Anos	59,19	0,07	1,17
	Meio Seco	20 Anos	63,46	0,34	0,99

Produtor 4	Meio Seco	5 Anos	26,27	0,16	1,04
	Meio Doce	3 Anos	27,22	0,06	0,55

Determinação de metais em Vinho da Madeira e Rum da Madeira

<b>Produtor</b>	<b>Vinho</b>	<b>Idade</b>	<b>Concentração Na na garrafa (mg/L)</b>	<b>SD</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>Produtor 5</b>	Doce	20 Anos	54,27	0,2	0,15
	Meio Doce	3 Anos	36,7	0,16	1,05
	Meio Seco	3 Anos	29,59	0,1	0,76
<b>Produtor 6</b>	Meio Doce	43 Anos	100,43	0,45	1,97
	Terrantez Meio Doce	20 Anos	74,43	0,22	0,33
	Meio Seco	10 Anos	36,53	0,1	0,78
	Meio Doce	10 Anos	37,55	0,09	1,14
	Meio Seco E	3 Anos	30,84	0,24	0,74
	Seco D	3 Anos	25,08	0,1	0,42
	Doce A	3 Anos	21,51	0,12	0,57
	Seco H	3 Anos	36	0,15	0,42
	Meio Seco B	3 Anos	25,73	0,08	0,29
	Doce B	3 Anos	22,23	0,21	0,94
	Seco B	3 Anos	24,25	0,2	0,84
	Seco E	3 Anos	35,18	0,29	0,82
	Seco F	3 Anos	23,84	0,15	0,61
Seco G	3 Anos	25,71	0,03	0,13	

Determinação de metais em Vinho da Madeira e Rum da Madeira

<b>Produtor</b>	<b>Vinho</b>	<b>Idade</b>	<b>Concentração Na na garrafa (mg/L)</b>	<b>SD</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>Produtor 6</b>	Seco A	3 Anos	39,38	0,18	0,47
	Seco C	3 Anos	30,59	0,06	0,21
	Meio Seco A	3 Anos	24,13	0,15	0,62
	Meio Seco C	3 Anos	26,1	0,17	0,65
	Meio Seco D	3 Anos	24,06	0,22	0,92
	Seco C	3 Anos	30,59	0,06	0,21
	Meio Seco A	3 Anos	24,13	0,15	0,62
	Meio Seco C	3 Anos	26,1	0,17	0,65
	Meio Seco D	3 Anos	24,06	0,22	0,92

<b>Produtor 7</b>	Meio Seco	30 Anos	70,91	0,21	1,89
	Meio Seco	15 Anos	115,95	0,35	2,95
	Doce	15 Anos	100,34	0,35	2,46
	TN Seco	87 Anos	92,12	0,26	1,18

<b>Produtor 8</b>	Doce	11 Anos	36,28	0,22	0,68
	Doce	30 Anos	46,42	0,15	0,04
	Doce	5 Anos	17,4	0,14	0,53

## Anexo II

Tabela 18 - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Cu nas amostras de Rum da Madeira

Empresa	Rum	Idade	Concentração Cu na garrafa (mg/L)	SD	RSD (%)
Empresa 1	Beneficiado	---	1,15	0,01	0,98
	Envelhecido	10 Anos	3,33	0,02	0,64
	Envelhecido	6 Anos	1,97	0,01	0,45
	Envelhecido	3 Anos	1,73	0,03	1,53
	Envelhecido	11 Anos	2,12	0,02	1
	Envelhecido	9 Anos	3,75	0,02	0,39
	Envelhecido	8 Anos	1,68	0,02	1,01
	Beneficiado	----	0,87	0,02	2,15
	Natural 1	----	1,3	0,02	1,86
	Natural 2	----	1,15	0,01	1,21
	Natural 3	----	1,59	0,01	0,68
	Natural 4	----	2,07	0,03	1,65
	Beneficiado	----	1,23	0,03	0,89
	Natural 5	----	1,5	0,02	1,4

Tabela 18 - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Cu nas amostras de Rum da Madeira (Continuação)

Empresa	Rum	Idade	Concentração Cu na garrafa (mg/L)	SD	RSD (%)
<b>Empresa 2</b>	Envelhecido	3 Anos	5,964	0,01	0,1
	Envelhecido	6 Anos	4,09	0,004	0,1
	Envelhecido	3 Anos	1,24	0,01	0,83
	Envelhecido	3 Anos	1,96	0,01	0,67
	Natural 1	----	8,7	0,11	1,83
	Natural 2	----	6,87	0,04	0,53
	Natural 3	----	3,88	0,03	0,73
	Natural 4	----	2,71	0,01	0,37

<b>Empresa 3</b>	Envelhecido	12 Anos	2,03	0,03	1,38
	Natural 1	----	8,18	0,06	1,07
	Natural 2	----	1,19	0,02	1,28
	Natural 3	----	3,15	0,01	0,35
	Natural 4	----	1,17	0,01	1,17
	Natural 5	----	1,35	0,02	1,27

<b>Empresa 4</b>	Envelhecido	3 Anos	0,64	0,01	0,78
	Envelhecido	3 Anos	0,61	0,01	2,11
	Natural	----	1,04	0,02	1,59

Tabela 18 - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Cu nas amostras de Rum da Madeira (Continuação)

<b>Empresa</b>	<b>Rum</b>	<b>Idade</b>	<b>Concentração Cu na garrafa (mg/L)</b>	<b>SD</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>Empresa 5</b>	Envelhecido	15 Anos	2,99	0,02	0,58
	Envelhecido	15 Anos	2,82	0,02	0,56
	Envelhecido	18 Anos	3,73	0,01	0,26

**Tabela 19** - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Fe nas amostras de Rum da Madeira

Empresa	Rum	Idade	Concentração Fe na garrafa (mg/L)	SD	RSD (%)
Empresa 1	Beneficiado	----	0,14	0,002	1,47
	Envelhecido	10 Anos	1,47	0,01	0,64
	Envelhecido	6 Anos	0,46	0,01	2,98
	Envelhecido	3 Anos	<LOD		
	Envelhecido	11 Anos	1,56	0,01	0,24
	Envelhecido	9 Anos	0,92	0,01	1,41
	Envelhecido	8 Anos	<LOQ		
	Beneficiado	----	<LOD		
	Natural 1	----	<LOD		
	Natural 2	----	<LOD		
	Natural 3	----	<LOD		
	Natural 4	----	<LOD		
	Natural 5	----	<LOD		

**Tabela 19** - Tabela detalhada sobre os resultados individuais de Fe nas amostras de Rum da Madeira (Continuação)

Empresa	Rum	Idade	Concentração Fe na garrafa (mg/L)	SD	RSD (%)
<b>Empresa 2</b>	Envelhecido	3 Anos	0,73	0,02	2,4
	Envelhecido	6 Anos	0,75	0,02	2,34
	Envelhecido	3 Anos	<LOQ		
	Natural 1	----	<LOD		
	Natural 2	----	<LOD		
	Natural 3	----	<LOD		
	Natural 4	----	<LOD		
<b>Empresa 3</b>	Envelhecido	12 Anos	0,47	0,01	1,6
	Natural 1	----	<LOQ		
	Natural 2	----	<LOD		
	Natural 3	----	<LOD		
	Natural 4	----	<LOD		
	Natural 5	----	<LOQ		
<b>Empresa 4</b>	Envelhecido	3 Anos	0,76	0,006	0,86
	Envelhecido	3 Anos	0,77	0,01	1,45
	Natural	----	<LOD		
<b>Empresa 5</b>	Envelhecido	15 Anos	1,12	0,01	1,15
	Envelhecido	15 Anos	1,45	0,01	0,99
	Envelhecido	18 Anos	1,81	0,01	0,78

LOD (ferro): 0,029 mg/L; LOQ (ferro): 0,1 mg/L

