



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DETERMINAÇÃO DO $\delta^{13}\text{C}$ PARA AVALIAR A ORIGEM DO CO_2 DE
VINHOS ESPUMANTES.**

SUSIANE LEONARDELLI

CAXIAS DO SUL

2015

SUSIANE LEONARDELLI

**DETERMINAÇÃO DO $\delta^{13}\text{C}$ PARA AVALIAR A ORIGEM DO CO_2 DE
VINHOS ESPUMANTES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Regina Vanderlinde

Co-orientadora: Dra. Sandra Valduga Dutra

CAXIAS DO SUL

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

L581d Leonardelli, Susiane, 1983-
Determinação do $\delta^{13}\text{C}$ para avaliar a origem do CO_2 de vinhos
espumantes / Susiane Leonardelli. – 2015.
76 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Regina Vanderlinde ; coorientador: Profa. Dra.
Sandra Valduga Dutra.

1. Vinhos espumantes. 2. Dióxido de Carbono. 3. Biotecnologia. I.
Título.

CDU 2. ed.: 663.223

Índice para o catálogo sistemático:

1. Vinhos espumantes	663.223
2. Dióxido de Carbono	621.564.2
3. Biotecnologia	60

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Carolina Machado Quadros – CRB 10/2236.

SUSIANE LEONARDELLI

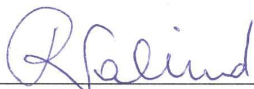
DETERMINAÇÃO DO $\delta^{13}\text{C}$ PARA AVALIAR A ORIGEM DO CO_2 DE VINHOS ESPUMANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

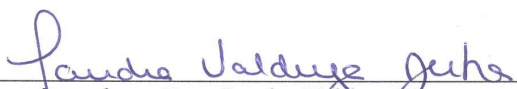
Orientadora: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

Co-orientadora: Dra. Sandra Valduga Dutra

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16 DE OUTUBRO DE 2015.



Orientadora: Profa. Dra. Regina Vanderlinde



Co-orientadora: Dra. Sandra Valduga Dutra



Prof. Dr. Marcelo Zacharias Moreira



Prof. Dr. Vitor Manfro



Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,
meus pais Iracema e Mário, minhas irmãs Cristiane e Letícia
e ao meu amor Eduardo Marcon.

Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, especialmente:

A Deus pelas oportunidades;

Aos meus pais, Iracema e Mário e às minhas irmãs Cristiane e Letícia pelo carinho e apoio;

Ao meu amor Eduardo, pela paciência, companheirismo, amor e compreensão;

À professora Dra. Regina Vanderlinde minha sincera admiração e agradeço pela oportunidade, pelos ensinamentos, orientação e confiança;

À Dra. Sandra Valduga Dutra pela co-orientação, colaboração, ensinamentos, confiança e amizade;

Aos professores Dr. Sérgio Echeverrigaray e Dr. Sidnei Moura e Silva pelo acompanhamento e sugestões e a secretária Lucimara Serafini Rech pelo apoio e informações;

Aos meus colegas, amigos e estagiários do Laboratório de Referência Enológica, em especial à Fernanda Spinelli, ao Gilberto Carnieli, ao Daniel de Siqueira Ferreira, à Vanessa Webber, à Mirella Kercher, ao Carlos André Roani e Plínio Manosso pelo apoio, colaboração, troca de conhecimentos, incentivo e amizade.

À Laurien Adami pelos ensinamentos, informações e troca de conhecimento em isótopos e espectrometria de massa de razão isotópica, por ter me ensinado a trabalhar com esta técnica e fazer me apaixonar pelo assunto.

Ao Jorge Luiz Oliveira Filho da Thermo Fisher Scientific, especialista em espectrômetro de massa de razão isotópica, pelos ensinamentos, troca de conhecimentos, orientação e incentivo.

Aos enólogos pela troca de informações e conhecimentos;

A Universidade de Caxias do Sul, ao Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN), à Secretaria de Agricultura e Pecuária do Rio Grande Sul, pela disponibilidade dos equipamentos, materiais, instalações e a oportunidade de realizar esta pesquisa.

A CAPES pelo auxílio financeiro;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 VINHO ESPUMANTE	13
2.1.1 Processos de elaboração de espumantes	14
2.1.1.1 Método tradicional	14
2.1.1.2 Método tanque ou Charmat	15
2.1.1.3 Método Asti	15
2.1.2 Principais cultivares utilizadas na produção de espumantes	15
2.2 ISÓTOPOS ESTÁVEIS	17
2.3 ESPECTRÔMETRO DE MASSA DE RAZÃO ISOTÓPICA	20
2.3.1 Cromatógrafo a gás	22
2.3.2 Analisador Elementar	22
2.4 DETECÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM ALIMENTOS E BEBIDAS ATRAVÉS DE RAZÃO ISOTÓPICA	24
2.5 DIÓXIDO DE CARBONO (CO ₂)	24
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4 CONCLUSÃO	47
5. PERSPECTIVAS	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
7. MATERIAL COMPLEMENTAR	64

LISTA DE TABELAS DA PUBLICAÇÃO

Tabela 1: Resultados da validação do método para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 .	36
Tabela 2: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e do etanol de vinhos tranquilos experimentais e diferença entre os dois.	38
Tabela 3: Variação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e do $\delta^{13}\text{C}$ do etanol após a segunda fermentação com adição de açúcar de planta C_4 .	41
Tabela 4: $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de espumantes experimentais e $\delta^{13}\text{C}$ do açúcar de cana.	42
Tabela 5: Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de espumantes comerciais brasileiros elaborados pelo método tradicional, tanque e Moscatel espumante.	43
Tabela 6: Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de espumantes comerciais, separando os métodos de elaboração e o país de origem do espumante.	44

LISTA DE QUADROS DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1: Principais cultivares para produção de espumantes distribuídas por clima.	16
Quadro 2: Abundância natural dos isótopos estáveis em átomos %.	17
Quadro 3: Exemplo de plantas mais comuns nos grupos C ₃ , C ₄ e CAM.	18

LISTA DE QUADROS DA PUBLICAÇÃO

Quadro 1: Resultados dos testes de robustez do método para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO ₂ .	36
---	----

LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1: Estatística de produção de espumantes e moscatéis de 2004 a 2014.	13
Figura 2: Variação da composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) no ambiente e na biosfera.	18
Figura 3: Esquema simplificado do ciclo de Calvin, plantas C_3 .	19
Figura 4: Esquema do ciclo de Hatch-Slack, plantas de ciclo C_4 .	19
Figura 5: Esquema de um espectrômetro de massa de razão isotópica.	21
Figura 6: Esquema de um cromatógrafo a gás - GasBench acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica.	22
Figura 7: Esquema de um analisador elementar - EA acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica.	23

LISTA DE FIGURAS DA PUBLICAÇÃO

Figura 1: Dispersão dos resultados entre o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e $\delta^{13}\text{C}$ do etanol de 39 vinhos tranquilos de diferentes cultivares.	40
Figura 2: Resultados do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e do Etanol para espumantes Moscatéis comerciais e representação dos limites de controle estimados para o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 .	45
Figura 3: Resultados da influência da adição do CO_2 gasoso industrial no $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e no pH do vinho e a correlação entre os resultados.	46

RESUMO

O aumento da produção e consumo de espumante é notório, são muitos países promissores na elaboração deste produto e o Brasil tem se destacado internacionalmente por apresentar espumantes de excelente qualidade. Neste trabalho foi validada e estabelecida uma metodologia para avaliar a origem do CO₂ dos vinhos espumantes, através da determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂, por espectrometria de massa de razão isotópica, visando o controle da adição ilegal de dióxido de carbono (CO₂) industrial. A caracterização do $\delta^{13}\text{C}$ foi baseada na diferença isotópica do ciclo fotossintético da planta que originou o produto, levando em consideração o processo de elaboração do espumante. Foram analisadas 5 amostras de CO₂ industrial, 6 amostras de água gaseificada artificialmente, 39 amostras de vinhos tranquilos (vinho sem CO₂ aparente) e 59 amostras de espumantes comerciais. Além disso, foi realizado um experimento com uma amostra de vinho base Chardonnay para verificar a variação isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ inicial (vinho base) e final (espumante). Observou-se que o $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ é seletivo quanto ao método de elaboração do vinho espumante, apresentando diferença entre os métodos tradicional, tanque e Asti (Moscatel). Foram encontrados valores mais negativos para $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ industrial diferenciando do CO₂ natural dos vinhos tranquilos, permitindo estabelecer um limite de controle entre -25‰ e -20‰ para os espumantes Moscatéis. Através do experimento realizado, com vinho e espumante da mesma cultivar (Chardonnay), foi verificada uma variação isotópica de aproximadamente 45% do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ inicial (-22,2‰) para o final (-12,3‰) da fermentação. Com estes parâmetros foi possível estimar o limite de controle de -14‰ para espumantes elaborados pelo método tradicional, sendo que, valores abaixo do estimado sugerem carbonatação. Seis amostras de espumantes comerciais das 59 analisadas apresentaram indícios de adulteração, com adição de CO₂ industrial e 3 espumantes Moscatéis apresentaram adição de açúcar de cana além do permitido em lei no Brasil. Desta forma, concluiu-se que o método é confiável e preciso para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ e foi possível caracterizar uma metodologia para avaliar a origem do CO₂, com limites estimados para espumantes elaborados pelo método tradicional e Moscatel.

Palavras-chaves: espumantes, $\delta^{13}\text{C}$, CO₂, adulteração

ABSTRACT

The increasing in sparkling wine production and consumption is visible, many countries are promising to make this product and the Brazil has been highlighted internationally by presenting excellent quality sparkling wine. In this study a method was validated and established to evaluate the CO₂ origin from the sparkling wines, through the CO₂ δ¹³C determination, by isotope ratio mass spectrometry, aiming the control adulteration with industrial carbon dioxide (CO₂). The δ¹³C characterization was based in the isotopic difference from the photosynthetic cycles of the plant that originated the product. Five industrial CO₂, six carbonated water, 39 still wine (wine without apparent CO₂) and 59 commercial sparkling wine were analyzed. Furthermore, an experiment with a Chardonnay base wine was realized to verify the δ¹³C isotopic variation from the beginning (base wine) and the final (sparkling wine) after the second fermentation. It was observed that the CO₂ δ¹³C is selective for the sparkling wine production method, presenting difference among the traditional, tank and Asti (Moscatel) sparkling wine. Values more negative for CO₂ δ¹³C from industrial CO₂ were found, distinguishing the natural CO₂ from still wine, allowing establish a limit of control between -25‰ to -20‰ for the Moscatel sparkling. Through the experiment realized, with the wine and sparkling wine from the same grape, could be verified that occurred CO₂ δ¹³C isotopic variation of approximately 45% from the beginning (-22,2‰) to the final (-12,3‰) of the fermentation. With this parameters it was possible to estimate the control limit of -14‰ for the sparkling wine produced by traditional method, values bellow suggest carbonation. Six commercial sparkling wine showed evidence of adulteration, with industrial CO₂ addition, and three Moscatéis sparkling presented results out of the highest control limit, in this Moscateis was found the sugar cane addition beyond that permitted by the Brazilian law. Therefore it was concluded that the method is appropriate and accurate for CO₂ δ¹³C determination and it was possible to establish a method to evaluate the CO₂ origin with limits estimates to Moscatéis and sparkling wine elaborated by the traditional method.

Keywords: Sparkling wine, δ¹³C, CO₂, adulteration.

1. INTRODUÇÃO

Os vinhos espumantes brasileiros têm apresentado papel expressivo no cenário mundial, com uma identidade única de sabores e aromas. A região sul do Brasil tem se destacado por apresentar características favoráveis para a produção do espumante. A qualidade desta bebida tem agradado o consumidor, o que pode ser constatado pelo aumento da comercialização nos últimos anos. Contudo, com a crescente demanda e o elevado consumo, começam a surgir algumas preocupações relativas à autenticidade do produto.

Em alguns países Europeus, já evidencia-se a necessidade de verificar a autenticidade do dióxido de carbono (CO_2) em vinhos espumantes. Isto porque, a correção de pressão com CO_2 industrial pode ser uma alternativa caso este não atinja a pressão mínima requerida no final do processo. No entanto, a prática de adicionar dióxido de carbono (CO_2) em espumantes não é legalmente permitida, e uma forma de controlar o processo de carbonatação é através da determinação da origem do CO_2 presente no espumante.

A determinação de isótopos estáveis surge como uma eficiente técnica para determinar a origem dos produtos, uma vez que, permite a diferenciação através do valor isotópico do ^{13}C . Desta forma, através da espectrometria de massa de razão isotópica é possível determinar a característica do CO_2 formado durante a fermentação, distinguindo quando proveniente de planta C_3 e C_4 ou da adição de CO_2 industrial.

Outro fator importante a considerar é a validação de um método analítico para determinação da razão isotópica do CO_2 , uma vez que é imprescindível que os resultados das análises sejam emitidos com qualidade e confiabilidade, o que está diretamente relacionado aos procedimentos de validação de métodos.

O objetivo geral deste trabalho foi validar e estabelecer uma metodologia para avaliar a origem do CO_2 dos vinhos espumantes, através da determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 , por espectrometria de massa de razão isotópica. Além disso, investigar o valor isotópico do CO_2 industrial, determinar o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de vinhos tranquilos (vinho sem CO_2 aparente), de vinho base e dos espumantes resultantes. Finalmente, aplicar a metodologia em espumantes comerciais e avaliá-los conforme os limites de controle estimados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VINHO ESPUMANTE

A primeira informação histórica sobre a preparação de vinhos espumantes remete ao século XVII na França; o abade Dom Perignon (1638-1715), monge beneditino, ao qual é atribuída a criação dos espumantes, na realidade lutou bravamente para evitar a formação de gás na garrafa. Porém, o real surgimento dos vinhos espumantes deve-se, primordialmente, a avanços tecnológicos não relacionados somente à produção do vinho, mas à produção de vidros mais resistentes e a utilização de rolhas de cortiça para o fechamento das garrafas (Lona 1999; Francioli *et al.*, 2003).

A produção de vinhos espumantes, no Brasil, iniciou em 1913, em Garibaldi no Rio Grande do Sul, com o imigrante italiano Manuel Peterlongo Filho, proveniente da região do Trento. A atividade foi continuada, posteriormente, por seu filho Armando Peterlongo. Nos últimos anos, a produção de espumantes no Brasil tem apresentado uma notória elevação, principalmente no Rio Grande do Sul (Rizzon *et al.*, 2000; Cainelli, 2009). Este aumento da produção pode ser observado através dos dados estatísticos entre o ano de 2004 a 2014, onde observou-se um aumento considerável de 160% na comercialização de espumantes e 514% no aumento da comercialização de Moscatéis, como pode ser observado na Figura 1 (IBRAVIN, 2015).

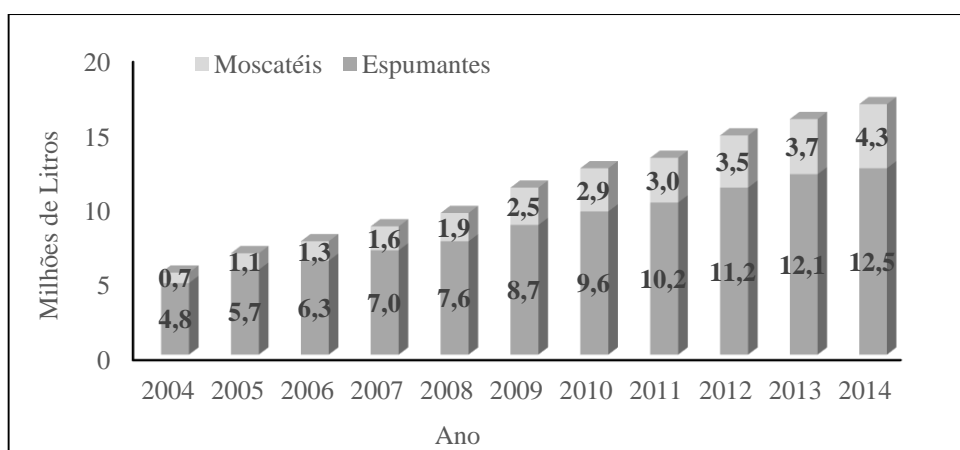


Figura 1: Estatística de produção de espumantes e moscatéis de 2004 a 2014. Fonte: adaptado de IBRAVIN, 2015.

As condições climáticas, a constituição varietal, as características organolépticas das uvas, as tecnologias para a produção e a interferência altamente profissional dos enólogos são alguns dos principais componentes que caracterizam o potencial que tem destacado o Brasil como um grande produtor de espumantes de alta qualidade (Cainelli, 2009).

2.1.1 Processos de elaboração de espumantes

A definição legal de espumantes é muito restritiva, variando de um país para outro, segundo suas denominações de origem. Contudo, os vinhos espumantes podem ser divididos basicamente em três métodos de elaboração: tradicional, tanque ou Charmat e Asti. No vinho espumante o CO₂ é resultante de uma segunda fermentação, que pode ser realizada na garrafa (tradicional) ou em grandes recipientes de aço inoxidável, hermeticamente fechados e resistentes à pressão (tanque). Enquanto que o espumante elaborado pelo método Asti é proveniente de uma única fermentação (Sousa, 2005; Flanzy, 2003; Pozo-Bayòn *et al.*, 2009).

2.1.1.1 Método tradicional

O método de produção tradicional consiste em realizar a segunda fermentação na própria garrafa, no qual o vinho base pode ser monovarietal ou uma mistura de cultivares, deve apresentar pouco açúcar residual, moderado conteúdo de álcool, baixa acidez volátil e deve estar livre de leveduras e bactérias. Devido ao prolongado contato com as leveduras o espumante pode desenvolver aromas complexos de biscoito e pão, os quais são os aromas autolíticos (Hui & Evranuz, 2012; Wine & Spirit, 2011).

O licor de tiragem é adicionado na garrafa. Este licor é uma mistura que contém mosto de uva, sacarose e leveduras, a qual produzirá a segunda fermentação, em quantidades específicas para produzir o CO₂ na proporção desejada (Rizzon *et al.*, 2000; Pozo-Bayòn *et al.*, 2009). Para induzir a segunda fermentação é requerido a adição de 24g.L⁻¹ de açúcar, proporção necessária para produzir seis atmosfera (Flanzy, 2003).

Após adicionar o licor de tiragem para iniciar a fermentação, as garrafas são seladas e armazenadas em temperaturas inferiores a 15°C, durante aproximadamente 60 dias até concluir a fermentação. Após, as mesmas são colocadas em pilhas separadas por madeiras para realizar a *rémuage*, no qual as garrafas são colocadas com o bico para baixo em pupitres e rotacionadas um quarto de volta cada, diariamente, permitindo a decantação dos sedimentos. Esse período, dura aproximadamente 20 dias e pode se estender até 56 dias, podendo o processo ser mecanizado (Jackson, 2008).

Os sedimentos decantados no gargalo da garrafa são congelados por imersão em banho criogênico, a cápsula é removida e o gás expulsa o resíduo congelado no gargalo. Geralmente, durante este processo de remoção do depósito de leveduras, também chamado de *dégorgement*, ocorre uma perda do vinho o qual é repostado usando um licor de expedição. O licor de expedição

pode ser espumante, vinho base, sacarose ou mosto de uva (parcialmente fermentado ou não), o qual dará a doçura desejada do vinho espumante. Finalmente, as garrafas são seladas com uma rolha de cortiça e uma gaiola de ferro para segurar a rolha (Hui & Evranuz, 2012).

2.1.1.2 Método tanque ou Charmat

O método charmat é caracterizado pela segunda fermentação realizada em tanques de inox, que suportam alta pressão, também denominados autoclaves ou tanques de pressão. O princípio de elaboração é o mesmo do método tradicional, pois o vinho base fermentado em ambiente fechado produz pressão por meio do CO₂, este é liberado na fermentação do vinho base pelas leveduras (Caliari, 2013).

Após a tomada de espuma ou segunda fermentação, o espumante é filtrado para eliminar sua turbidez, em condições isobáricas para não haver perda da pressão (Flanzy, 2003). O engarrafamento é feito em envasadora isobárica. Os licores de tiragem e expedição são semelhantes aos utilizados no método tradicional. Neste método, o envelhecimento sobre as leveduras geralmente é menor, o que propicia a elaboração do espumante jovem e frutado com características varietais (Jackson, 2008).

2.1.1.3 Método Asti

O produto resultante deste método é denominado de Asti espumante, nome protegido por uma denominação de origem da província de Asti na região do Piemonte – Itália. No Brasil este produto é denominado de Moscato espumante ou Moscatel espumante (Sousa, 2005).

O Moscatel espumante utiliza a técnica do método tanque, porém com uma única fermentação, onde conserva no vinho o aroma natural característico da uva Moscato, interrompendo a fermentação alcoólica e estabilizando o vinho com teor elevado de açúcares. Para controlar essa evolução, o vinho é submetido a clarificações e filtrações, operações repetidas cada vez que a fermentação adquire ritmo acelerado, eliminando-se assim, a maior parte das células de leveduras e com elas as substâncias nitrogenadas assimiláveis, conferindo ao vinho a estabilidade biológica desejável (Rizzon *et. al*, 2005)

2.1.2 Principais cultivares utilizadas na produção de espumantes

O vinho base para espumantes pode ser obtido de cultivares de uvas brancas ou tintas, as cultivares tintas são usadas na produção de espumantes rosados (parcialmente fermentadas

com a casca) e espumantes de cultivares brancas (fermentadas sem a casca) (Pozo-Bayòn *et al.*, 2009; Poerner, 2009). As características químicas e sensoriais do vinho espumante estão relacionadas às características do vinho base empregado, o qual pode ser varietal ou uma mistura de vinhos, denominado *assemblage* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

As principais cultivares de uvas utilizadas para a elaboração de espumantes pelo método clássico no mundo estão descritas no quadro 1 (Amerine & Winkler, 1994).

Quadro 1: Principais cultivares para produção de espumantes distribuídas por clima.

Frias	Moderadas	Quentes
Pinot Noir	Chenin Blanc	Parellada
Pinot Meunier	Chardonnay	Chardonnay
Pinot Blanc	Gamay	Xarello
Chardonnay	Pinot Noir	Macabeo (Viura)
Gammay	Pinot Meunier	Pinot Noir
		Chenin Blanc
		Pinot Meunier

Fonte: adaptado de Dry e Ewart (1985).

As principais cultivares utilizadas na elaboração do vinho espumante na Serra Gaúcha, situada no sul do Brasil, são a Riesling Itálico e a Chardonnay, entre as uvas brancas, e a Pinot Noir, entre as tintas e as cultivares Moscatos na elaboração do Moscatel. As cultivares de ciclo curto Chardonnay e Pinot Noir também participam da elaboração do *Champagne* na França. No caso da Pinot Noir, por ser uma cultivar de película tinta, o cuidado na extração do mosto para assegurar o mínimo de compostos fenólicos é fundamental para a qualidade do vinho espumante (Geisse, 2009; Meneguzzo, 2010).

Os isótopos estáveis são átomos do mesmo elemento químico. O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), isso porque ocupam a mesma posição na tabela periódica. A expressão estáveis significa que não emitem radiação, ou seja, não apresentam riscos de contaminação (Marchini *et al.*, 1997; Ducatti, 2007).

As propriedades de um elemento são determinadas pelo número de prótons do seu núcleo, enquanto que a massa atômica depende do número de prótons e de nêutrons. Os isótopos são átomos com mesmo número de prótons, mas que diferem em número de nêutrons, apresentando diferentes massas (Marchini *et al.*, 1997). A abundância dos isótopos estáveis dos elementos mais estudados, podem ser observados no Quadro 2.

Quadro 2: Abundância natural dos isótopos estáveis em átomos %.

Isótopo Leve		Isótopo Pesado	
Isótopo	Abundância Natural (%)	Isótopo	Abundância Natural (%)
¹² C	98,89	¹³ C	1,11
¹ H	99,96	² H	0,02
¹⁶ O	99,76	¹⁷ O	0,04
		¹⁸ O	0,20
¹⁴ N	99,63	¹⁵ N	0,37
³² S	95,02	³⁴ S	4,22

Fonte: Morrison e Boyd (1990).

2.2 ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Os isótopos estáveis são de especial interesse, para a pesquisa em diversas áreas do conhecimento e são encontrados naturalmente na litosfera, hidrosfera, atmosfera e biosfera. Estes isótopos revelam informações importantes a respeito do histórico e da origem de cada espécie química (Martin & Martin, 1991).

Os métodos para determinação dos isótopos estáveis baseiam-se na razão das medidas do isótopo mais pesado em relação ao mais leve, como por exemplo, ²H/¹H, ¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N, ¹⁸O/¹⁶O e ³⁴S/³²S. As determinações da razão isotópica podem ser realizadas usando ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS), técnicas que podem fornecer informações sobre a origem botânica e geográfica (Calderone *et al.*, 2007). Além disso, a análise de isótopos estáveis tem sido uma ferramenta útil para avaliar a adulteração e fraude de produtos alimentícios (Rossmann, 2001).

A abundância natural dos isótopos estáveis demonstram pequenas variações devido ao fracionamento que ocorre durante os processos químicos e físicos dos ciclos naturais. Estes processos são influenciáveis por fatores como umidade, temperatura, ventos e condições meteorológicas, podendo, desta forma, fornecer informações sobre a origem de um composto químico, através da análise da razão isotópica (Bréas *et al.*, 1994). Assim também, a composição isotópica dos metabólitos das plantas dependem do ciclo fotossintético e do meio ambiente, e os produtos alimentícios derivados são isotopicamente marcados e semelhantes às plantas geradoras (Licatti, 1997).

Foram identificados e caracterizados três ciclos fotossintéticos principais com base nos diferentes modos de assimilação do CO₂, o ciclo de Calvin, o ciclo de Hatch-Slack e o ciclo do Metabolismo Ácido das Crassuláceas, CAM (Crassulacean Acid Metabolism), que por sua vez

designam os diferentes tipos de plantas, como plantas C₃, C₄ e CAM (Deleens, 1976; Brugnoli & Farquhar, 1999; Ferreira, 2008). Esses três grupos de plantas caracterizam-se por possuírem valores de $\delta^{13}\text{C}$ bem distintos. A Figura 2 apresenta a variação da composição isotópica dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no ambiente e na biosfera.

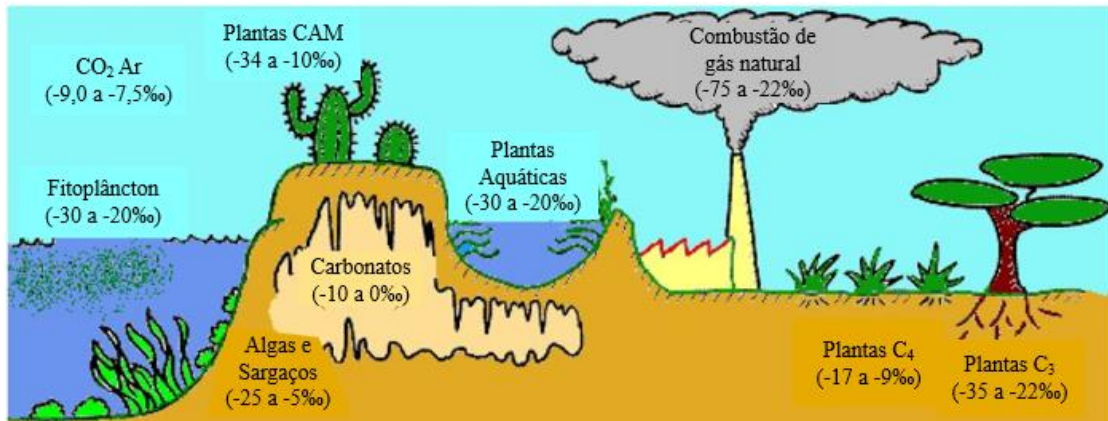


Figura 2: Variação da composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) no ambiente e na biosfera. Fonte: adaptado de Ferreira (2008).

Aproximadamente 95 % das espécies de plantas conhecidas pertencem ao grupo das plantas C₃, 1 % ao grupo das plantas C₄ e 4% são CAM. O quadro 3 mostra exemplos de plantas mais comuns nos três grupos descritos, C₃, C₄ e CAM (Osmond, Winter, Ziegler, 1982; Tolbert & Zelitch, 1983; Woodwell & Mackenzie, 1995).

Quadro 3: Exemplo de plantas mais comuns nos grupos C₃, C₄ e CAM.

Fracionamento Isotópico		
Plantas C ₃	Plantas C ₄	Plantas CAM
Beterraba, trigo, amendoim, cevada, batata, ameixa, uva, arroz, centeio, soja, feijão, girassol.	Cana-de-açúcar, milho-painço, sorgo.	Agave, ananás, cacto, baunilha.

Fonte: Teixeira & Ricardo (1983).

A maioria das plantas durante a fotossíntese segue basicamente duas vias de fixação do CO₂, ou seja, o CO₂ penetra nas plantas por difusão passando por rotas bioquímicas para produzir carboidratos. Nessas rotas, o primeiro composto orgânico sintetizado, pode conter três ou quatro átomos de carbono. No ciclo C₃ (ou Ciclo de Calvin), que utiliza a ribulose-1,5-bifosfato como molécula aceptora de CO₂ atmosférico, conforme a Figura 3, o primeiro composto sintetizado contém três átomos de carbono (Licatti, 1997).

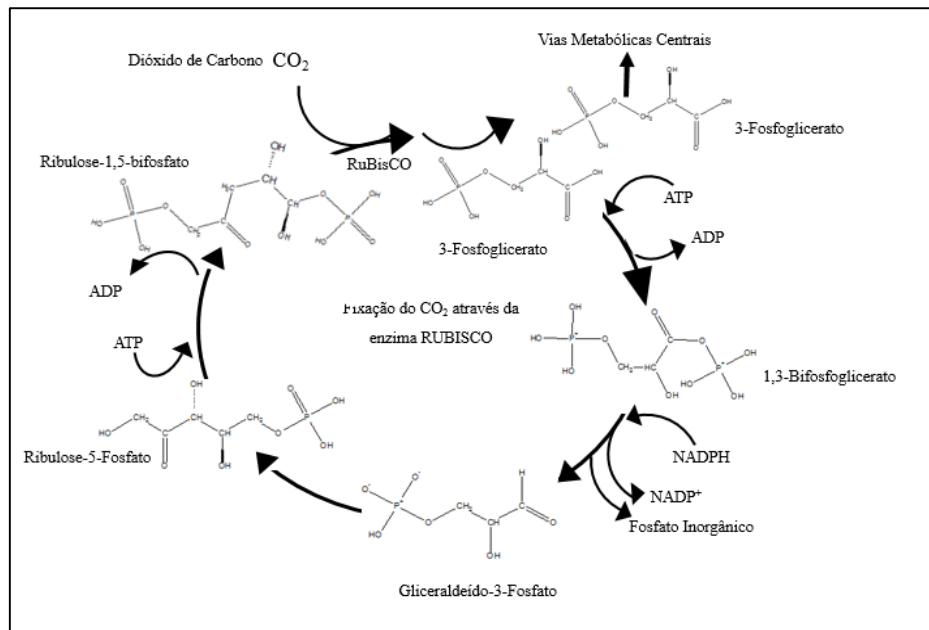


Figura 3: Esquema simplificado do ciclo de Calvin, plantas C_3 . Fonte: adaptado de Ferreira, 2008.

Por outro lado, um caminho alternativo, denominado ciclo C_4 (ou Ciclo de Hatch-slack), utiliza o oxalacetato como molécula aceptora de CO_2 , conforme Figura 4, os primeiros açúcares formados nesse ciclo possuem quatro carbonos (Licatti, 1997).

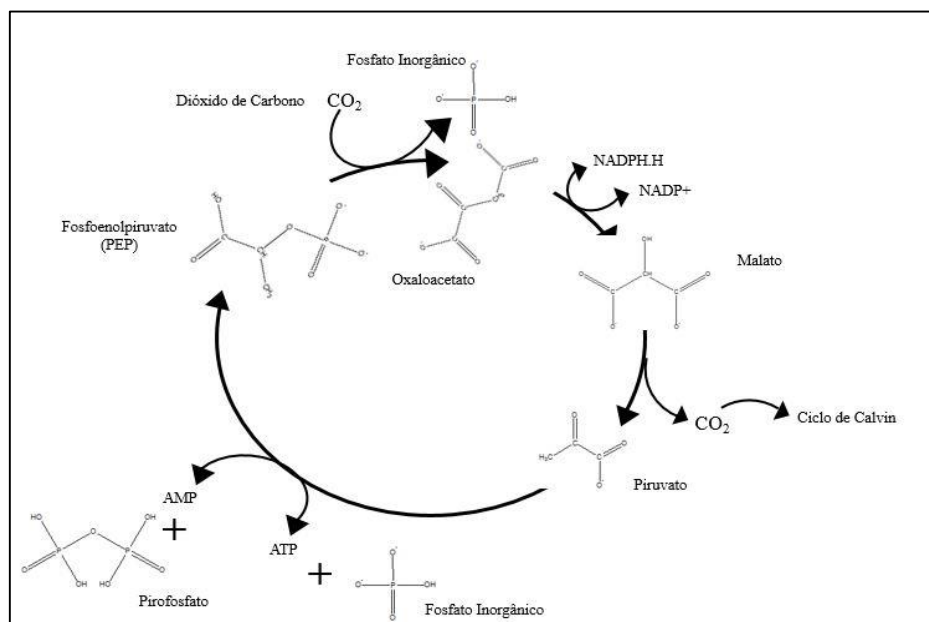


Figura 4: Esquema do ciclo de Hatch-Slack, plantas de ciclo C_4 . Fonte: adaptado de Ferreira (2008).

As plantas do ciclo fotossintético C_3 apresentam um maior fracionamento isotópico em relação as plantas do ciclo C_4 . A maioria das plantas superiores de florestas e cultivares de folhas largas (dicotiledôneas) são do ciclo C_3 , incluindo a videira, adaptadas às condições de

disponibilidade hídrica e temperaturas amenas, enquanto que, as plantas mais comuns em regiões que apresentam clima quente e em baixas latitudes, sob forte estresse hídrico, como nas savanas, principalmente as forrageiras e gramíneas como o milho e a cana-de-açúcar, são do ciclo C₄ (Kelly *et al.*, 2005; Licatti, 1997). Desta forma, a estabilidade da razão isotópica de carbono tem sido amplamente utilizada para rastrear a presença de açúcar e álcool derivados de plantas C₄ em bebidas que são tradicionalmente elaboradas com plantas C₃ (Rossmann, 2001; Martinelli *et al.*, 2003). No Brasil, o açúcar de cana é mais barato, sendo improvável a utilização de outros tipos de açúcares e raro o uso de açúcares de plantas C₃ (Martinelli *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, a determinação de isótopos estáveis apresenta-se como uma aliada na luta contra fraudes em produtos alimentícios industriais (Rossmann, 2001; Cabañero & Rupérez, 2012). A análise isotópica, talvez seja a mais sofisticada e específica técnica para estas avaliações e está sendo largamente aplicada (Simpkins *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2006). O desenvolvimento desta técnica iniciou-se nas ciências geológicas e rapidamente foi introduzida na área de alimentos e bebidas para a determinação da origem vegetal dos produtos e nos últimos anos vem tornando-se um interessante instrumento analítico para confirmar a qualidade dos produtos alimentícios (Karoui *et al.*, 2007; Diniz, 2009).

2.3 ESPECTRÔMETRO DE MASSA DE RAZÃO ISOTÓPICA

O espectrômetro de massa é conhecido pelo fato de obter medidas precisas em concentração isotópica muito baixa. Para esta determinação as amostras são convertidas em gases simples, tais como H₂, CO₂, N₂ e CO, dependendo da composição do material e do isótopo de interesse (Carter & Barwick, 2011).

Para analisar uma amostra por espectrometria de massa as suas moléculas necessitam ser ionizadas. Nos espectrômetros de massa de setor magnético os íons obtidos por ionização/fragmentação das moléculas são acelerados por um campo elétrico, defletidos por um campo magnético e finalmente, detectados, conforme Figura 5. Sendo assim, o espectrômetro de massa, basicamente, é constituído por 3 partes: a fonte, o analisador e um detector múltiplo de Faraday “Faraday cups” (Ferreira, 2008; Mucio & Jackson, 2009).

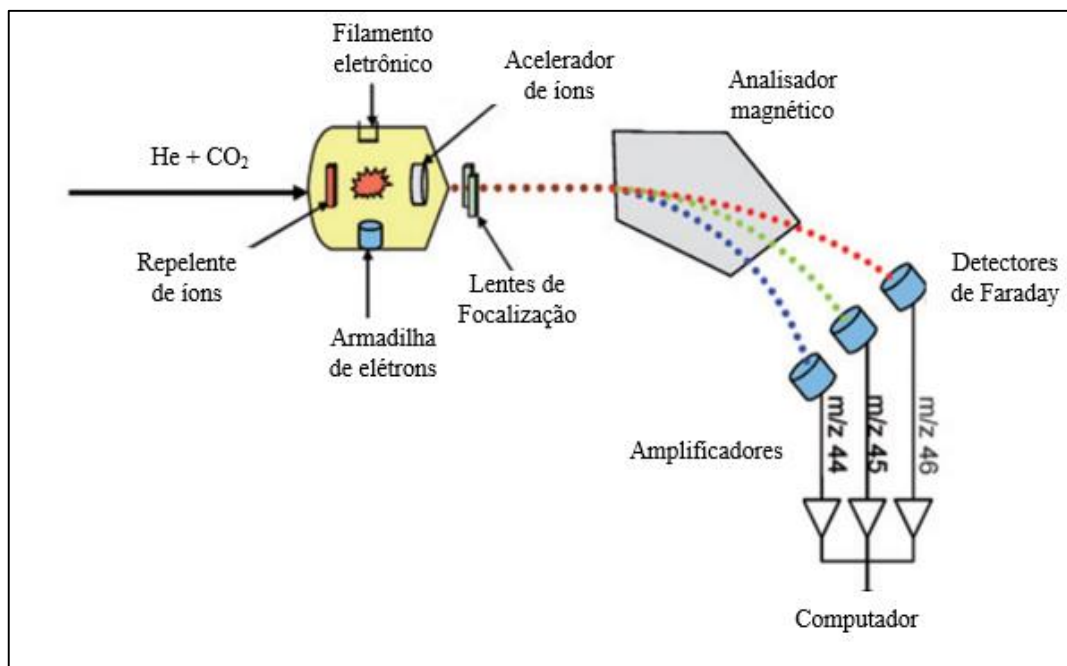
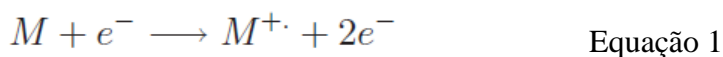


Figura 5: Esquema de um espectrômetro de massa de razão isotópica. Fonte: adaptado de Mucio & Jackson (2009).

A colisão ou uma grande aproximação entre um elétron e uma molécula da amostra pode originar a formação de um íon negativo (captação de um elétron) da molécula ou, pelo contrário, originar a remoção de um elétron da molécula e formar um íon positivo, conforme equação 1. Os íons positivos, com carga +1, são usados no espectrômetro (Ferreira, 2008).



Na determinação da razão isotópica, os compostos são analisados como gases resultantes de reações de combustão, pirólise ou equilíbrio, os quais são inseridos no espectrômetro de massa para separar as formas isotópicas de um determinado elemento (Jamin, 2002). A diferença relativa da razão isotópica é calculada conforme a equação 2. Onde R é a razão isotópica de dois isótopos nas substâncias B e D. Em função da diferença relativa ser pequena, a razão isotópica é comumente expressa com a unidade ‰ (0,001). Normalmente, os valores de delta são medidos relativos a um padrão internacional de referência, que substitui a substância D (IUPAC, 2008).

$$\frac{(R_B - R_D)}{R_D} \quad \text{Equação 2}$$

Diversas interfaces podem ser usadas para introduzir as amostras no espectrômetro de

massa de razão isotópica, como cromatografia líquida, cromatografia gasosa e analisador EA (UCSC, 2015).

2.3.1 Cromatógrafo a gás

O cromatógrafo a gás é utilizado para determinar $\delta^{18}\text{O}$ e δD de águas naturais, e $\delta^{13}\text{C}$ de carbono inorgânico dissolvido (DIC) em águas naturais, ou $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ de carbonatos inorgânicos.

Operacionalmente utiliza o gás de topo ou equilíbrio (“*headspace*”) interior que pode ser H_2 , N_2 , O_2 , N_2O ou CO_2 , de um frasco selado. O gás é arrastado em uma corrente contínua de hélio através de uma agulha de amostragem, passa por uma membrana Nafion para retirada da umidade. O volume é fixado em $100\mu\text{L}$ e segue para uma coluna cromatográfica gasosa para separação dos gases interferentes que podem comprometer as análises isotópicas. Passa novamente por uma membrana Nafion e é introduzida no espectrômetro de massa de razão isotópica por uma via ativa de divisão aberta *open Split*, conforme Figura 6 (UCSC, 2015).

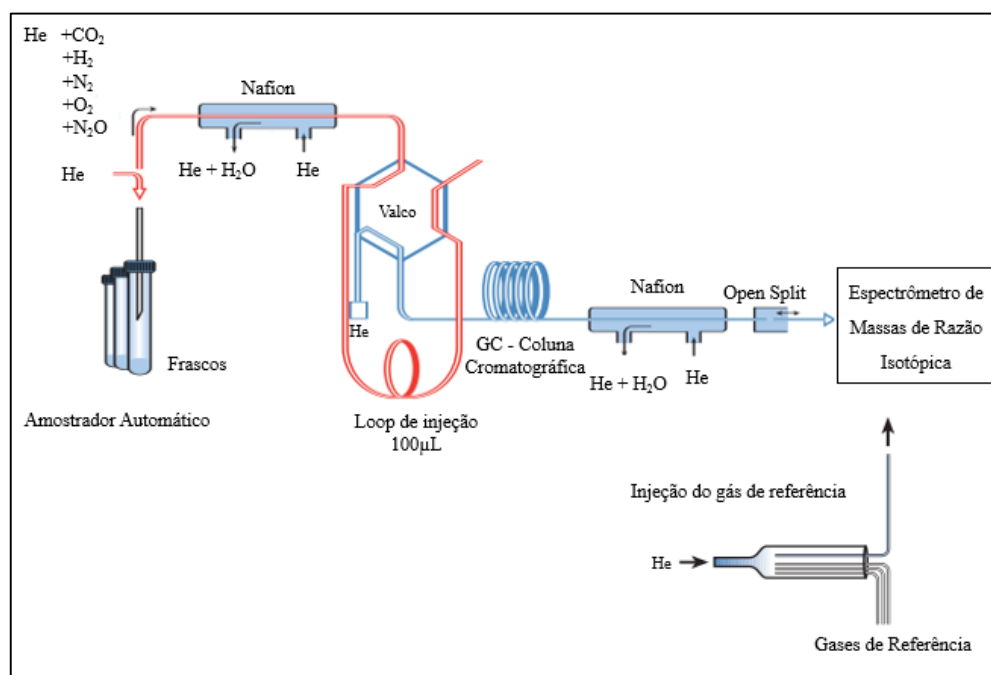


Figura 6: Esquema de um cromatógrafo a gás - GasBench acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica. Fonte: adaptado de UCSC (2015).

2.3.2 Analisador Elementar

O analisador elementar – EA é aplicável a uma ampla gama de materiais e é uma técnica de determinação da razão isotópica para amostras líquidas ou sólidas não voláteis. As

amostras são introduzidas no Analisador Elementar – EA, usando cápsulas de estanho (para carbono e nitrogênio) ou prata (para oxigênio e hidrogênio), ou ainda líquidos com viscosidade limitada podem ser injetados diretamente utilizando um sistema de entrada para líquidos (Carter & Barwick, 2011).

A amostra é inserida pelo amostrador automático, conforme a Figura 7, atravessa um reator de quartzo para produzir CO_2 , NO_x e H_2O . O reator permanece em temperaturas elevadas, entre 900°C a 1050°C , sob fluxo de oxigênio e tipicamente contém óxido de cobre e óxido de cobalto e prata. Em um segundo reator de quartzo é removido o excesso de oxigênio e ocorre a redução do NO_x para N_2 , este reator é normalmente completo com cobre reduzido de alta pureza. A água é separada por um *trap* contendo perclorato de magnésio (MgClO_4), finalmente o N_2 e o CO_2 são separados por uma coluna cromatográfica Porapak Q (Carter & Barwick, 2011; Muccio & Jackson, 2009).

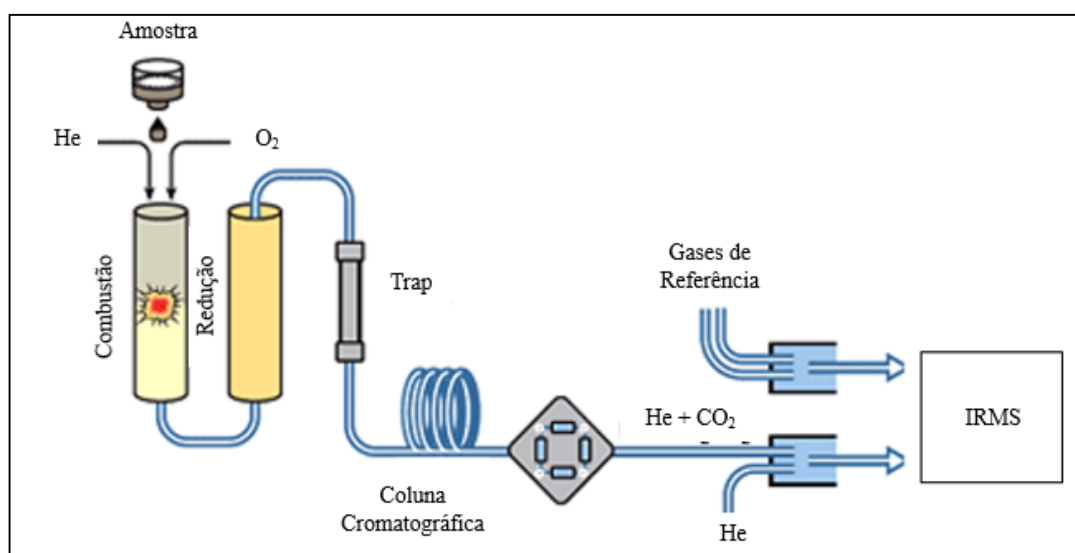


Figura 7: Esquema de um analisador elementar - EA acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica. Fonte: adaptado de UCSC (2015).

A amostra, por fim, é enviada ao espectrômetro de massa de razão isotópica, onde são medidas as razões do carbono, do azoto e do enxofre, comparativamente ao um gás de referência, como por exemplo o CO_2 para determinação do $\delta^{13}\text{C}$, previamente calibrado em relação aos padrões internacionais, os quais apresentam valor isotópico conhecido (Ferreira, 2008).

2.4 DETECÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM ALIMENTOS E BEBIDAS ATRAVÉS DE RAZÃO ISOTÓPICA

A autenticação definitiva e efetiva de produtos alimentícios requer o uso de técnicas analíticas altamente sofisticadas, pois os fraudadores empregam métodos de adulteração e falsificação que são cada vez mais difíceis de detectar. A determinação da autenticidade de gêneros alimentícios tem sido, e continua sendo uma questão pertinente (REID *et al.*, 2006; DINIZ, 2009).

As infrações levantam, ao mesmo tempo, dois problemas, um de saúde pública e outro de danos econômicos. Vários produtos (vinho, queijo, bebidas alcoólicas ou não, mel, entre outros) são potenciais alvos de falsificação. O desenvolvimento de novos métodos para a determinação de autenticidade de produtos alimentares continua em ritmo acelerado, com uma consciência cada vez maior por parte dos consumidores relativamente à segurança alimentar e ao problema da autenticidade. A aplicação dos métodos de análise de isótopos tornou-se uma arma crucial no combate à fraude por adulteração (Ferreira, 2008).

Através da técnica de determinação de isótopos estáveis pode-se medir quantitativamente a proporção de álcool de cana adicionado ao vinho (Ducatti, 2000). Da mesma forma, é possível distinguir o CO₂ do espumante proveniente da fermentação do açúcar presente no mosto, daquele originário do açúcar da cana adicionado. Essa diferenciação é possível devido a uva ser uma planta do ciclo fotossintético C₃, que apresenta uma razão isotópica de aproximadamente -28‰ e os seus subprodutos (açúcares, álcool, vinho, entre outros) tendem a apresentar o mesmo valor. Já a cana-de-açúcar e o milho são plantas do ciclo C₄, com valor isotópico de aproximadamente -9‰, permitindo assim a distinção entre as duas origens (González-Martin *et al.*, 1997; Cabañero *et al.*, 2007).

Estudos de $\delta^{13}\text{C}$ têm demonstrado que o conteúdo de CO₂ em vinhos obtidos da segunda fermentação apresentam valores entre -17‰ e -22‰ para o CO₂ de açúcares de planta C₃ (beterraba, uva), enquanto que, valores próximos de -9‰ quando o açúcar adicionado é de planta C₄ (cana, milho). Já valores de $\delta^{13}\text{C}$ abaixo de -30‰ ou acima de -7‰ poderia ser um indicativo de um vinho gaseificado com CO₂ industrial (Dunbar, 1982; González-Martin *et al.*, 1997; Cabañero *et al.*, 2007).

2.5 DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂)

O dióxido de carbono (CO₂) é um composto molecular em que os átomos de oxigênio

se ligam ao átomo de carbono através de duplas ligações (SENAI, 2014). É um gás incolor, inodoro, apolar e pouco tóxico, um óxido ácido. Encontra-se em pequenas concentrações no ar, aproximadamente 0,038% (Chang & Goldsby, 2013; UIG, 2008).

A concentração de CO₂ no ar atmosférico ou de fontes simples de combustão (aquecedores, caldeiras, fornos) não é suficiente para que se consiga uma recuperação de dióxido de carbono comercialmente viável. Para produzir em escala industrial é necessário que o CO₂ seja recuperado e purificado a partir de um volume elevado, com um fluxo rico em CO₂, em geral como subproduto de um processo. Assim, o CO₂ basicamente é formado por combustão e processos biológicos, os quais incluem a decomposição de material orgânico, a fermentação e a digestão. Outras atividades industriais, que produzem grandes quantidades de CO₂ são a produção de amônia e a produção de hidrogênio a partir de gás natural ou outras matérias-primas de hidrocarbonetos e também as fermentações em grande escala, onde produtos vegetais são transformados em etanol (UIG, 2008).

O CO₂ é um material versátil, sendo utilizado em muitos processos e aplicações. É comumente utilizado como matéria-prima para produção de produtos químicos, em extintores de incêndios, para carbonatação de bebidas como os refrigerantes, para congelamento, refrigeração e manutenção de produtos alimentares, para a melhoria da recuperação de petróleo, tratamento de água alcalina e conservante de alimentos em função de baixar o pH. É apropriado para conseguir refrescância, praticamente não tem sabor e está disponível a um custo razoável (UIG, 2008; Celestino, 2010).

O CO₂ é solúvel em água e o vinho apresenta em sua composição entre 85 a 90% de água. As soluções resultantes, da reação da água com o CO₂, são levemente ácidas, em função da formação do ácido carbônico (H₂CO₃), conforme equação 2. Esta reação justifica a razão pela qual a água que normalmente é neutra (pH = 7,0), quando exposta ao ar, apresenta pH ácido de aproximadamente 5,5 (Lenntech, 2014).



A adição de CO₂ em alimentos ou bebidas, reduz a proporção de oxigênio, aumentando assim a qualidade original do produto por inibição do crescimento de bactérias e fungos, proteção contra infestações por insetos, redução da perda de umidade e das alterações oxidativas e controle das atividades bioquímicas e enzimáticas que diminuem a senescência e o amadurecimento (Fellows, 2006; Cava *et al.*, 2009).

O CO₂ utilizado na indústria alimentícia, para carbonatação exógena, tem uma variação muito grande de valores $\delta^{13}\text{C}$. As principais fontes de CO₂ para este fim, provém de sedimentos de carbonatos, com valores de $-14\text{‰} < \delta^{13}\text{C} < +1\text{‰}$, ou combustão de gás natural (CO₂ técnico) $-75\text{‰} < \delta^{13}\text{C} < -22\text{‰}$ (Gaillard *et al.*, 2013; Meier-Augenstein, 1999; Winkler, 1984).

A carbonatação é um maneira relativamente simples de adicionar CO₂ a um vinho base. A adição de CO₂ apresenta-se vantajosa por tratar-se de um método rápido, relativamente barato, que permite controlar a quantidade de gás adicionado, e promover um enriquecimento do CO₂ conforme desejado no vinho base ou espumante. Além disso, a carbonatação de espumantes pode melhorar aroma e sabor e agregar valor aos produtos, quando ocorre uma falha de processo, sem um grande investimento envolvido (Lea & Piggott 2003; Pambianchi, 2007).

Quando o CO₂ é injetado no vinho, como por exemplo, o CO₂ proveniente da combustão de fósseis, o produto é classificado como vinho gaseificado ou frisante e não espumante, e os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ de variam entre -28‰ a -35‰ . Valores isotópicos próximos dos valores da uva pode ser um indicativo da presença de açúcar de beterraba para a segunda fermentação do espumante, uma vez que na Europa é utilizado esse tipo de açúcar. A beterraba é uma planta do ciclo fotossintético C₃ com uma composição isotópica similar à uva (Dunbar, 1982; González-Martin *et al.*, 1997).

Em muitos países, é muito comum utilizar açúcar de milho ou de cana-de-açúcar que são plantas de ciclo C₄, para a segunda fermentação, com valores mais altos de $\delta^{13}\text{C}$, o que permite distinguir o tipo de açúcar utilizado. No caso da injeção de CO₂ industrial, o rótulo do produto deve especificar claramente como um vinho gaseificado e não vinho espumante, isso porque o processo de carbonatação não é permitido para espumantes no Brasil (Dunbar, 1982; González-Martin *et al.*, 1997, Brasil 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados na forma de publicação a ser submetidos à Food Chemistry.

DETERMINAÇÃO DO $\delta^{13}\text{C}$ PARA AVALIAR A ORIGEM DO CO_2 DE VINHOS ESPUMANTES.

S. Leonardelli*, S. V. Dutra, G.J. Carnieli, F. Spinelli, D. S. Ferreira, L. Leonardelli, R.

Vanderlinde

Universidade de Caxias do Sul (UCS), Instituto de Biotecnologia; Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130; 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brasil. IBRAVIN/LAREN – Laboratório de Referência Enológica Evanir da Silva; Avenida da Vindima, 1855; Caxias do Sul, RS, Brasil.

*Correspondência para autor: S. Leonardelli, IBRAVIN/LAREN – Laboratório de Referência Enológica; Avenida da Vindima, 1855; CEP 95084-470, Caxias do Sul, RS, Brasil.

E-mail: susi.leonardelli@brturbo.com.br.

Resumo

O CO_2 dos espumantes é obtido de forma natural, a forma industrial aparece como uma alternativa economicamente viável quando este não é obtido naturalmente; entretanto, esta prática representa uma adulteração. O objetivo desta pesquisa foi validar e estabelecer uma metodologia para avaliar a origem do CO_2 dos vinhos espumantes, através da determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 , por espectrometria de massa de razão isotópica. Foi determinado o $\delta^{13}\text{C}$ de CO_2 industrial, vinhos tranquilos e espumantes experimentais e comerciais. Os resultados da validação do método foram considerados satisfatórios, com incerteza de medição de 0,40‰. Foi possível estabelecer parâmetros de controle para espumantes elaborados pelo método

tradicional (-14‰) e Moscatel (-25‰). Nove amostras de espumantes comerciais das 59 analisadas apresentaram indícios de adulteração. Concluiu-se que o método para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ mostra-se adequado e foi possível caracterizar uma metodologia para avaliar a origem do CO_2 com limites estimados para espumantes tradicionais e Moscatéis.

Palavras-chave: espumantes, $\delta^{13}\text{C}$, CO_2 , adulteração.

1 Introdução

A produção mundial de espumante apresentou um aumento de 40% de 2002 a 2013 e o seu consumo no mesmo período, de aproximadamente 30% [1]. O Brasil também apresentou um considerável aumento, sendo no período de 2004 a 2014 de 160% para espumantes e 514% para Moscatéis. A região sul do Brasil tem se demonstrado muito favorável para a produção de espumantes, com clima e solos adequados para este tipo de bebida, despertando o interesse dos consumidores. [2].

Os vinhos espumantes podem ser divididos basicamente em três métodos de elaboração: tradicional, tanque ou Charmat e Asti (Moscatel). O que os diferencia é a forma como é conduzida a segunda fermentação [3; 4]. No método tradicional a segunda fermentação é realizado na garrafa, enquanto que no método tanque a mesma é realizada em tanques de aço inoxidável, hermeticamente fechados e resistentes à pressão. Já o método Asti é similar ao método tanque, porém com uma única fermentação. No Brasil, o produto resultante deste método é denominado de Moscato espumante ou Moscatel espumante, pois o nome Asti é protegido por uma denominação de origem da província de Asti na região italiana do Piemonte [4; 5; 6; 7].

Com aumento da comercialização de espumantes surge a preocupação com a verificação da autenticidade deste produto, isso porque a adulteração é desleal com o consumidor e muitas vezes coloca em risco à saúde do mesmo. A fim de controlar a

autenticidade e qualidade destes produtos o desenvolvimento de novas técnicas analíticas são necessárias [8, 9]. A União Europeia proíbe o uso de CO₂ industrial em espumantes e frisantes, o Brasil não permite a adição de CO₂ industrial em espumantes, porém libera o uso em frisantes e vinhos gaseificados [10; 11].

A determinação de isótopos estáveis apresenta-se como uma eficiente e sofisticada técnica para verificar a autenticidade de alimentos e bebidas, e tem tido um grande destaque nos últimos anos [12]. O valor da razão isotópica do dióxido de carbono (CO₂) do espumante é definido pelo açúcar adicionado durante a segunda fermentação, com exceção do Moscatel, onde o valor do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ é proveniente da fermentação do açúcar natural da uva [13, 14].

A segunda fermentação é induzida pelos açúcares adicionados e tem por finalidade formar o CO₂ que ficará retido no líquido [15]. O açúcar utilizado para a segunda fermentação dos espumantes pode ser derivado de planta do ciclo fotossintético C₃, como a beterraba e a uva, com valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ variando entre -26‰ e -17‰ ou derivado de plantas C₄, como a cana de açúcar e milho, com $\delta^{13}\text{C}$ próximos de -9‰ [16, 17, 18].

Os processos de carbonatação direta, onde o CO₂ é injetado diretamente ao vinho, os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ variam entre $-14\text{‰} < \delta^{13}\text{C} < +1\text{‰}$ quando provenientes de sedimentos de carbonatos, ou de $-75\text{‰} < \delta^{13}\text{C} < -22\text{‰}$ quando da combustão de gás natural [19, 20, 21]. Em função da diferença isotópica existente, a determinação do carbono estável $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ pode ser um bom método para descobrir a origem do gás [15]. No caso de adição de CO₂ de origem industrial o produto deve trazer claramente no rótulo que se trata de vinho gaseificado e não vinho espumante [13].

O objetivo deste trabalho foi validar e estabelecer uma metodologia, inédita no Brasil, para avaliar a origem do CO₂ dos vinhos espumantes, através da determinação do $\delta^{13}\text{C}$, por espectrometria de massa de razão isotópica. Além disso, investigar o valor isotópico do CO₂ industrial, determinar o $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ de vinhos tranquilos e do vinho base e o espumante

resultante. Finalmente, aplicar a metodologia em espumantes comerciais e avaliá-los conforme os limites de controle estimados.

2 Materiais e métodos

2.1 Reagentes

Os gases utilizados foram Hélio 6.0 como gás de arraste (White Martins) e o CO₂ 4.8 como gás de referência (Air Liquide). O padrão certificado utilizado para a calibração do gás de referência foi a Sacarose IAEA-CH-6 RM 8542 do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST), com valor de $\delta^{13}\text{C}$ de -10,45‰.

2.2 Amostras

2.2.1 CO₂ industrial e água gaseificada artificialmente

Cinco amostras de CO₂ industrial de diferentes fornecedores e seis amostras de água artificialmente gaseificada foram analisadas para determinar o valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ industrial.

2.2.2 Vinhos tranquilos experimentais

Foram microvinificadas em laboratório 39 amostras de vinhos tranquilos da safra 2014 das cultivares Chardonnay, Moscato Branco, Glera, Riesling Itálico e Pinot Noir, uvas comumente utilizadas para a produção de espumantes.

2.2.3 Vinhos espumantes experimentais

Um experimento foi realizado para verificar o percentual de alteração do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ e do etanol após a segunda fermentação com açúcar de cana. Na primeira etapa foi preparado um vinho base da cultivar Chardonnay da safra 2014, e coletadas alíquotas da amostra para a determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ e do etanol. Posteriormente, foi adicionado 24 g.L⁻¹ de açúcar de cana juntamente com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para induzir a segunda fermentação

do vinho na garrafa; nesta etapa foram preparadas 18 amostras de espumantes para posterior análise.

Quatro outros espumantes experimentais também foram analisados, sendo um amostra elaborado com as cultivares 40% Chardonnay e 60% Pinot Noir da safra 2013, o segundo com 60% Chardonnay e 40% Pinot Noir safra 2011, o terceiro e o quarto com a cultivar Riesling Itálico da safra 2008. Estes quatro espumantes foram elaborados pelo processo tradicional.

2.2.4 Vinhos espumantes comerciais

Foram determinados o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e do etanol de 59 espumantes comerciais. Sendo, 41 espumantes brasileiros: 14 elaborados pelo método tradicional, 12 pelo método tanque e 14 Moscatéis; 12 espumantes argentinos: 5 tradicionais e 7 tanque e 6 espumantes chilenos: 3 tradicionais e 3 tanque.

2.3 Determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2

As amostras de vinhos e espumantes foram refrigeradas à temperatura entre 2 °C e 4 °C. Após, a amostra foi rapidamente transferida para um frasco de 12 mL e fechada com tampa e septo de teflon-silicone. Dessa alíquota, com o auxílio de uma seringa com estanque de gás, foram transferidos 50 μL da amostra para outro frasco preenchido com gás Hélio, através do sistema *flush and fill* [18].

Após o preparo, o frasco contendo a amostra foi colocado no amostrador automático a 27 °C, a amostra foi analisada por um cromatógrafo gasoso GasBench II (Thermo Electron, Bremen, Alemanha), acoplado ao espectrômetro de massa de razão isotópica Delta V Advantage (Thermo Electron, Bremen, Alemanha).

2.4 Determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do etanol

As amostras de vinho foram destiladas sob ação criogênica a -196 °C, com nitrogênio

líquido, e sob alto vácuo (10^{-2} mbar), foi utilizado 1,5 mL de vinho por 25 min.; 2 μ L de álcool foram injetados no analisador elementar – Flash EA (Thermo Electron, Bremen, Alemanha) e passaram pelo processo de combustão à 900 °C, em um tubo de quartzo contendo óxido de cobre e óxido de cobalto e prata com fluxo contínuo de 90 mL.min⁻¹ de Hélio. Em seguida, passou através da coluna de redução à 680 °C, contendo cobre reduzido e seguiu para um tubo de perclorato de magnésio para remover a umidade, então foi separado em uma coluna cromatográfica Porapak Q (Varian, Estados Unidos) à temperatura de 43 °C. Após, seguiu para ser analisada no espectrômetro de massa Delta Plus XL (Thermo Electron, Bremen, Alemanha), com triplo coletor de íons para medida do sinal da molécula do CO₂ formada na combustão [22, 23].

As amostras de espumantes foram submetidas a agitação por 60 min. para retirada do CO₂ e analisadas através da metodologia citada acima. Além disso, três amostras de açúcar de cana foram diluídas com água ultrapura a uma concentração de 0,06 g.mL⁻¹ e injetadas no analisador elementar para determinação do $\delta^{13}\text{C}$, sendo uma destas amostras de açúcar utilizada para elaborar o espumante experimental da safra 2014.

2.5 Configurações do espectrômetro de massa de razão isotópica e do GasBench para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂

O espectrômetro de massa de razão isotópica operou com pressão de 10^{-7} mbar e tensão elétrica de aceleração de 3.05 kV. O sinal do [CO₂]⁺ foi monitorado por três detectores de Faraday.

O fluxo de Hélio 6.0 foi mantido constante em 0,05 mL.min⁻¹ e operou acoplado a um GasBench, onde a agulha de transferência do amostrador automático coletou a amostra do gás de topo (*headspace*) do frasco e transferiu o CO₂ vagarosamente (2 mL.min⁻¹) para o capilar. A amostra gasosa seguiu para o *trap* de difusão (Nafion^R) para remover a água e após, para a válvula *Valco* e coluna cromatográfica. O *loop* de injeção foi fixado em 100 μ L; a coluna

cromatográfica utilizada para a separação dos gases foi uma PoraPlot Q 25 m, 0,32 mm (Varian, Estados Unidos). A coluna foi mantida com fluxo de Hélio contínuo de 2 mL.min⁻¹, com pressão em 10-12 psi e temperatura de 70 °C. A amostra passou novamente por uma membrana Nafion para retirar a umidade restante e foi introduzida no espectrômetro por uma via ativa de divisão aberta *open Split*.

O espectrômetro de massa, o GasBench e a aquisição dos dados foram controlados pelo software Isodat 2.5 (Thermo Electron). Foram realizadas 10 replicatas para cada amostra analisada. A razão isotópica foi obtida em relação à calibração do padrão internacional de Sacarose 8542 NIST e os resultados foram expressos em δ‰.

2.6 Validação do Método

A validação do método foi realizada para vinhos espumantes conforme os parâmetros estabelecidos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO [24].

2.6.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando as determinações de δ¹³C do CO₂ em vinho base da cultivar Chardonnay (amostra branco) e em espumante Moscatel, realizando oito repetições para cada amostra.

2.6.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da curva analítica de oito concentrações de CO₂ adicionadas a um vinho base, no intervalo de 2,5 a 50% de CO₂ em vinho. As concentrações de CO₂ foram injetadas no vinho com auxílio de uma seringa com estanque de gás, cada concentração foi analisada oito vezes. Os critérios para aceitação de linearidade foram a equação da reta ($y = ax + b$) e o coeficiente de determinação (R^2). O cálculo dos resíduos de

cada curva foi realizado através da diferença entre o valor médio observado e o valor real de cada concentração.

2.6.3 LD e LQ

Uma amostra de vinho adicionada de 2,5 % de CO₂ industrial foi usada, a fim de espectrômetro de massa de razão isotópica. O limite de detecção – LD foi estimado como três vezes o desvio padrão das repetições, enquanto que o limite de quantificação - LQ em cinco vezes o desvio padrão.

2.6.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da determinação do $\delta^{13}\text{C}$ utilizando um material de referência certificado, Sacarose IAEA-CH-6 RM 8542, diluída em água ultrapura em concentração de 0,06 g.mL⁻¹. Os valores médios e o desvio padrão de uma série de ensaios em replicata, foram comparados com os valores certificados do material de referência, calculando o índice Z (*Z-score*).

2.6.5 Precisão

Foram realizadas 50 determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ da mesma amostra e foi expressa pelo coeficiente de variação (desvio padrão relativo).

A repetitividade foi determinada através da análise de um espumante branco natural brut elaborado pelo método tradicional. Foram realizadas 10 repetições da mesma amostra, no mesmo dia e sob as mesmas condições, foi calculada para um nível de significância de 95%.

A precisão intermediária foi obtida realizando o mesmo ensaio em oito repetições em dias diferentes.

2.6.6 Robustez

Na avaliação da robustez do método foram testados parâmetros que poderiam interferir nos resultados das análises como: temperatura do amostrador (26,5°C, 27°C e 27,5°C), temperatura da amostra durante o preparo (2-4°C, 10-13°C, 19-22°C e 35-40°C), frascos novos e reutilizados, septos novos e reutilizados uma vez, volume de amostra (45µL, 50µL e 55µL), limpeza do frasco com Hélio no sistema *flush and fill*, estabilidade da amostra (dias 1, 2, 3, 6, 10, 30 e 62) e temperatura da coluna cromatográfica (65°C, 70°C e 75°C).

2.6.7 Incerteza de Medição

A incerteza de medição do método foi calculada com a utilização do software GUM Workbench Edu, específico para cálculo de incertezas.

2.7 Influência do CO₂ industrial no pH e no $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ do espumante

Foram preparadas seis amostras de vinho base Chardonnay com concentrações crescentes de CO₂ industrial simulando um aumento de pressão de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 atm.

2.8 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos ao teste T para amostras independentes e análise de variância ANOVA, complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, a correlação foi avaliada através da Correlação de Pearson, utilizando o software SPSS 20.0 para Windows.

3 Resultados e discussão

3.1 Validação do Método

O método para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ apresentou resultados dentro das

especificações exigidas (Tabela 1). A incerteza de medição do método calculada, considerando todas as possíveis interferências foi de 0,40‰ e está de acordo com Cabañero & Rupérez [25].

Tabela 1: Resultados da validação do método para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 .

Parâmetro	Resultados
Seletividade	Fcalculado 0,02 < Ftabelado 3,79. É seletivo.
Linearidade	$R^2 = 0,99$
LD	4%
LQ	5%
Exatidão (Z-score)	-1,41%, satisfatório $z \leq 2$
Precisão	0,59%, satisfatória conforme AOAC 2012 [37]
Repetibilidade	0,08‰
Precisão Intermediária	0,10‰

Robustez

Os resultados da robustez podem ser observados no Quadro 1:

Quadro 1: Resultados dos testes de robustez do método para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 .

Parâmetro Testado	Condições do Teste
Temperatura do Amostrador	Não influencia os resultados
Temperatura da amostra no preparo	Conforme a amostra aquece os resultados tornam-se mais negativos. Até a temperatura de 13°C não há interferência nos resultados.
Frascos novos e reutilizados	Interferem nos resultados, foi considerado como um componente da incerteza de medição.
Septos novos e reutilizados	Interferem nos resultados, portanto não devem ser reutilizados.
Volume de amostra	Não influencia

Limpeza do frasco com He	Interfere nos resultados, deve ser realizado o <i>flush and fill</i> , para remover o CO ₂ atmosférico, devido ao CO ₂ atmosférico contaminar o CO ₂ da amostra quando esta é colocada no frasco.
Estabilidade	A amostra manteve-se estável durante os 62 dias testados.
Temperatura da coluna cromatográfica	65°C – amostra apresentou instabilidade, com desvio padrão de 0,25‰ entre os resultados. Contudo, não há diferença nos resultados obtidos em 60°C quando comparado aos 70°C, recomendados no método. 75°C – há diferença quando comparado aos 70°C, entretanto, os resultados são mais estáveis, com desvio padrão de 0,05‰.

3.2 Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ industrial e da água gaseificada

As amostras de CO₂ industrial apresentaram média $\delta^{13}\text{C}$ de $-33,9 \pm 1,63\%$, com valores variando entre $-35,2$ e $-31,3\%$, confirmando estudo realizado por Redondo & Yélamos [26], os quais afirmaram que atualmente é improvável encontrarmos CO₂ industrial com $\delta^{13}\text{C}$ acima de -18% .

O CO₂ industrial pode ser obtido de diversas fontes, porém a mais importante tem sido de combustíveis fósseis, os quais apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ mais negativos que a maioria dos valores encontrados no ciclo geoquímico do carbono [26]. González-Martin *et al.* [27] encontraram para os combustíveis fósseis valores de $\delta^{13}\text{C}$ variando de -35 a -28% . As plantas de ciclo fotossintético C₃, como a uva, apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ pouco menos negativos que o CO₂ de origem industrial. Em função desta diferença, é possível detectar a adição do CO₂ industrial em produtos derivados de plantas C₃. Martinelli *et al.* [13] encontraram para algumas bebidas fermentadas brasileiras adicionadas de CO₂ industrial uma média de $-33,9 \pm 3,10\%$.

Amostras de água gaseificada artificialmente também foram analisadas para confirmar os resultados do CO₂ de origem industrial, a média encontrada foi de $-29,1 \pm 2,18\%$, com

valores entre -30,8 e -25,3‰. Os resultados encontrados são menos negativos quando comparados ao CO₂ industrial puro, porém, ainda assim mais negativos quando comparados aos valores médios da uva. Os resultados encontrados demonstram que o CO₂ de origem industrial pode ser diferenciado isotopicamente do CO₂ natural da uva.

3.3 Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ e do etanol de vinhos tranquilos

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ dos vinhos tranquilos da safra 2014 (Tabela 2) não diferenciaram as cultivares. Por outro lado, estes valores foram eficientes para diferenciar o $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ de origem industrial e da água gaseificada artificialmente em relação aos vinhos tranquilos. Os valores $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ natural dos vinhos encontrados em nosso estudo estão próximos ao reportado por Calderone *et al.* [28], que encontraram valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ de -22,0‰ para vinhos provenientes de fonte C₃.

Tabela 2: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ e do etanol de vinhos tranquilos experimentais e diferença entre os dois.

Cultivar	n	$\delta^{13}\text{C}$ do CO ₂ (‰)			$\delta^{13}\text{C}$ do Etanol (‰)			Dif. (‰)
		Min	Máx	Média±DP	Min	Máx	Média±DP	
Chardonnay	9	-24,6	-20,4	-23,4 ^{Aa} ±1,40	-30,0	-28,8	-29,3 ^{Ba} ±0,40	5,90
Moscato Branco	17	-24,7	-20,0	-22,7 ^{Aa} ±1,15	-28,6	-26,0	-27,6 ^{Bb} ±0,57	5,10
Glera	4	-24,7	-22,7	-24,0 ^{Aa} ±0,89	-29,8	-28,7	-29,2 ^{Ba} ±0,59	5,20
Riesling Itálico	4	-24,6	-23,0	-23,5 ^{Aa} ±0,74	-30,7	-29,9	-30,3 ^{Ba} ±0,35	6,80
Pinot Noir	5	-23,9	-20,9	-22,1 ^{Aa} ±1,26	-30,1	-28,3	-29,5 ^{Ba} ±0,83	7,40
Média				-23,1 ^A ±1,26			-29,2 ^B ±0,98	6,08

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna e médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey (P < 0,05).

Gaillard *et al.* [19] em estudo realizado com cidras encontraram uma média de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ de -22,6‰ e concluíram que não ocorre variação isotópica significativa entre os valores do início e do fim da fermentação. Sendo a maçã uma fruta proveniente de planta C₃, assim como a uva, estes resultados encontram-se muito próximos aos obtidos em nosso estudo. Desta

forma justifica-se a determinação de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 em vinhos tranquilos. Considerando os resultados obtidos em nosso estudo para o CO_2 industrial, conclui-se que o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 proveniente da carbonatação natural não pode apresentar valores abaixo do vinho base.

O vinho elaborado com a cultivar Moscato apresentou uma média de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de $-22,7\text{‰}$, sendo o vinho tranquilo a referência para estabelecer um limite para o espumante Moscatel. Isto porque, este tipo de espumante não passa pelo processo de adição de açúcar de cana para a segunda fermentação, sendo o CO_2 formado proveniente dos açúcares naturais da uva. Considerando o valor mais negativo de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 natural do vinho da cultivar Moscato que é $-24,7\text{‰}$, pode-se estimar que valores abaixo de -25‰ são um indicativo de adição do CO_2 de origem industrial. Este limite é próximo aos limites estipulados por Cabañero & Rupérez [25] para espumantes (-26‰) e por Gaillard *et al.* [19] para cidras ($-25,4\text{‰}$). No entanto, quando encontra-se valores superiores a -20‰ deve-se investigar também o $\delta^{13}\text{C}$ do etanol, uma vez que pode ser um indicativo da adição de açúcar de cana, além do permitido no Brasil.

A cultivar Chardonnay também é amplamente utilizada na produção de espumantes e apresentou resultado médio de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e do etanol de $-23,4\text{‰}$ e $-29,3\text{‰}$, respectivamente. Os valores $\delta^{13}\text{C}$ do etanol variaram de -30‰ a $-28,8\text{‰}$ confirmando estudo realizado por Comerlato [29] em vinhos desta cultivar. Uvas da cultivar Chardonnay provenientes da Itália e da França, apresentaram valores superiores aos encontrados em nosso estudo [30].

Os resultados encontrados em nosso estudo para $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e $\delta^{13}\text{C}$ do etanol em vinhos tranquilos, apresentam uma correlação de Pearson fraca (Figura 1), ou seja, somente 12% dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol são explicados pelo $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 . Isto porque, na reação química de formação do CO_2 e do etanol, durante a fermentação, ocorre um fracionamento isotópico. Este fracionamento é explicado por dois efeitos: termodinâmicos e cinéticos, onde a diferença baseia-se na energia livre dos isótopos, ou seja, o isótopo mais pesado tende a acumular-se nos compostos com energias de ligação mais forte [31, 32].

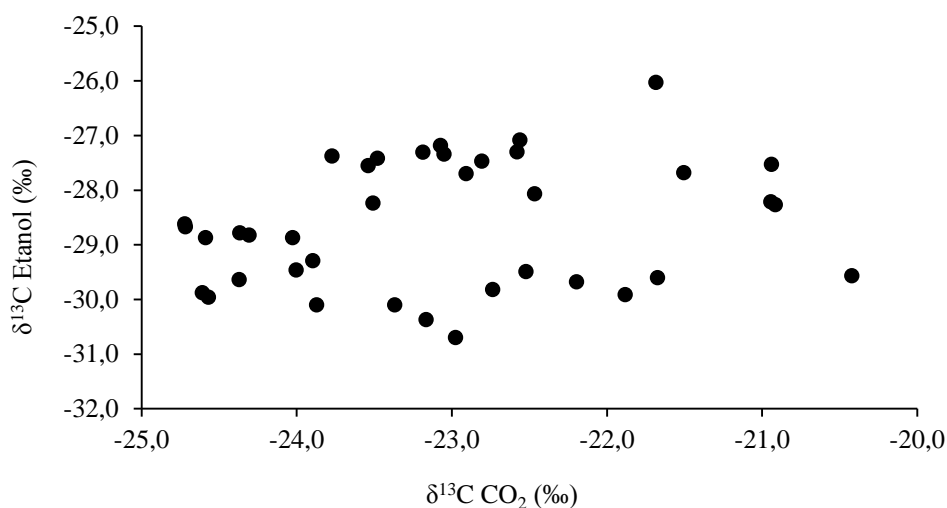


Figura 1: Dispersão dos resultados entre o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e $\delta^{13}\text{C}$ do etanol de 39 vinhos tranquilos de diferentes cultivares.

A diferença média entre o $\delta^{13}\text{C}$ do etanol e do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 natural dos vinhos de todas as cultivares estudadas foi de 6,08‰. A cultivar Moscato apresentou a menor diferença (5,10‰), porém mostra-se superior à diferença de 2‰ proposta por Martinelli *et al.* [13], estimada por um cálculo teórico.

Os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol obtidos neste trabalho com variação de -30,7‰ a -26‰ (Tabela 2), permaneceram próximos a estudos anteriores realizados por nossa equipe em vinhos brasileiros das cultivares Merlot e Cabernet Sauvignon das safras 2005 a 2008. Observa-se que há uma ampla variação dos valores encontrados, tanto neste estudo quanto nos resultados anteriores [33, 34]. Isto pode ser explicado pela influência da variabilidade genética em algumas reações bioquímicas que ocorrem nas plantas e provocam diferentes fracionamentos isotópicos do carbono durante a fixação do CO_2 [30].

3.4 Resultados do $\delta^{13}\text{C}$ de espumantes experimentais

A variação isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 (Tabela 3), entre o vinho base e o espumante elaborado pelo método tradicional, encontrada em nosso experimento foi de 45%. Assumindo que o valor mais negativo encontrado para vinhos tranquilos foi de -25‰, encontramos o limite mínimo de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 para este processo que é de aproximadamente -14‰; valores abaixo

desta estimativa são indicativo de gaseificação para o método de elaboração tradicional. A variação do $\delta^{13}\text{C}$ do etanol apresentou uma variação isotópica de 11%, inferior à variação encontrada para o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 .

Tabela 3: Variação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e do $\delta^{13}\text{C}$ do etanol após a segunda fermentação com adição de açúcar de planta C_4 .

Chardonnay	Vinho Base	Espumante	Variação Isotópica (%)	Variação Isotópica (‰)
$\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 (‰)	$-22,2 \pm 0,10$	$-12,3 \pm 0,39$	45	9,90
$\delta^{13}\text{C}$ do Etanol (‰)	$-27,8 \pm 0,04$	$-24,7 \pm 0,68$	11	3,10

Zang *et al.* [35] afirmam que o fracionamento entre carbono inorgânico dissolvido e o CO_2 em pH 2 varia de -1,3 a -1,2‰. Considerando um fracionamento de -1,2‰ entre a troca da fase líquida para gasosa do CO_2 , Martinelli *et al.* [13] concluíram, através de cálculos teóricos, que ao utilizar açúcares de planta C_4 para a segunda fermentação o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 deveria variar aproximadamente 2,2‰ do valor isotópico do açúcar.

A variação estimada não foi confirmada em nosso experimento, pois o açúcar utilizado para promover a segunda fermentação apresentou um valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ de $-11,6 \pm 0,09$ ‰ (Tabela 4). Utilizando a variação proposta de 2,2‰, o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 do espumante experimental da safra 2014 deveria apresentar um valor isotópico de -9,4‰. Porém, o valor isotópico encontrado em nosso estudo foi de $-12,3 \pm 0,39$ ‰ (Tabela 4), ou seja, 0,7‰ inferior ao $\delta^{13}\text{C}$ do açúcar utilizado para a segunda fermentação, não confirmando na prática a variação teórica calculada por Martinelli *et al.*[13].

Tabela 4: $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de espumantes experimentais e $\delta^{13}\text{C}$ do açúcar de cana.

Código	n	Espumante	Safra	$\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ do Etanol (‰)
1	1	60% Chardonnay e 40% Pinot Noir	2013	$-12,2^a \pm 0,04$	$-24,4^a \pm 0,05$
2	1	60% Chardonnay e 40% Pinot Noir	2011	$-12,2^a \pm 0,05$	$-25,4^a \pm 0,06$
3	2	Riesling Itálico	2008	$-10,7^c \pm 0,06$	$-19,0^b \pm 0,09$
4		$\delta^{13}\text{C}$ do Açúcar de cana		$-11,6^b \pm 0,01$	

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ($P < 0,05$).

Os espumantes 1 e 2 apresentaram valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de $-12,2\text{‰}$, configurando que valores menos negativos são característicos de CO_2 proveniente de açúcar de planta C_4 , como a cana-de-açúcar. O espumante de código 3 apresentou valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 ainda menos negativo quando comparado aos anteriores, indicando a adição de uma concentração maior de açúcar de cana para a segunda fermentação do espumante. O $\delta^{13}\text{C}$ do etanol comprova a concentração maior de açúcar de cana, pois também apresentou valor menos negativo. Estudos anteriores de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol demonstraram que os valores isotópicos estão relacionados com a composição isotópica do açúcar, a qual também varia com o ano de produção e a origem geográfica [36].

Dutra *et al.* [33] também encontraram diferença estatística entre safras para o $\delta^{13}\text{C}$ do etanol. No estudo, a safra 2007 apresentou valores menos negativos e caracterizou-se por um clima mais quente e úmido quando comparados à safra 2008. Diferenças nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ em regiões de clima mais quente e úmido também foram encontrados por Kosir *et al.* [37]. As determinações de razão isotópica devem ser realizadas para cada safra, uma vez que as condições meteorológicas influenciam na maturação das uvas [38].

3.5 Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ de espumantes comerciais

Observou-se que o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 é seletivo quanto ao método de elaboração do espumante, apresentando diferença significativa entre os métodos tradicional, tanque e

Moscatel espumante (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de espumantes comerciais brasileiros elaborados pelo método tradicional, tanque e Moscatel espumante.

Método	n	$\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 (‰)			$\delta^{13}\text{C}$ do Etanol (‰)		
		Min.	Máx.	Média \pm DP	Min.	Máx.	Média \pm DP
Tradicional	14	-13,4	-9,60	-11,6 ^a \pm 1,17	-26,7	-24,1	-26,0 ^a \pm 0,76
Tanque	13	-30,8	-10,4	-16,9 ^b \pm 5,87	-27,3	-23,0	-24,8 ^{ab} \pm 1,56
Moscatel	14	-25,8	-16,9	-21,8 ^c \pm 3,02	-26,3	-21,9	-24,6 ^b \pm 1,62

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ($P < 0,05$).

Os valores isotópicos mais negativos para o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 encontrados em nossa pesquisa, para os Moscatéis espumantes, corroboram os resultados encontrados por Martinelli *et al.* [13], para espumantes Asti italiano e Moscatel brasileiro, e Cabañero *et al.* [18], em estudo realizado com vinhos frísantes provenientes da Espanha, Portugal e Itália.

O CO_2 dos espumantes elaborados pelo método tradicional apresentaram valores isotópicos menos negativos quando comparados ao Moscatel. Os valores mais altos de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 encontrados no Tradicional indicam a influência do açúcar de cana (planta C_4) na formação do CO_2 . Os resultados encontrados são mais negativos quando comparado aos valores da metodologia proposta pela OIV [15], que para CO_2 de planta C_4 a faixa encontrada está entre -7‰ e -10‰.

Os valores encontrados para o $\delta^{13}\text{C}$ do etanol diferenciaram os espumantes elaborados pelo método tradicional do Moscatel espumante, os espumantes elaborados pelo método tanque não diferenciaram dos outros dois tipos de espumante.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 , considerando o país de origem do espumante e o método de elaboração tanque e tradicional, diferenciaram significativamente o Chile da Argentina e do Brasil (Tabela 6). A diferença encontrada pode ser devido à origem do açúcar utilizado para a segunda fermentação do espumante, visto que, Brasil e Argentina apresentam resultados

compatíveis com fermentação de açúcar de planta C₄, como a cana. Os espumantes chilenos, por sua vez, na maioria das amostras analisadas apresentou resultados próximos de açúcares de planta C₃, como a beterraba.

Tabela 6: Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ de espumantes comerciais, separando os métodos de elaboração e o país de origem do espumante.

País	Método de Elaboração do Espumante							
	Tradicional				Tanque			
	n	Min.	Máx.	Média ± DP (%)	n	Min.	Máx.	Média ± DP (%)
Brasil	14	-13,4	-9,60	-11,6 ^a ± 1,17	13	-30,8	-10,4	-16,9 ^a ± 5,87
Argentina	5	-12,2	-9,68	-11,0 ^a ± 0,92	7	-17,7	-11,0	-12,6 ^a ± 3,19
Chile	3	-23,3	-11,8	-18,2 ^{b±} 5,84	3	-45,6	-23,2	-23,8 ^b ± 0,86

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ($P < 0,05$). O resultado -45,6‰ encontrado para o Chile, trata-se de um valor discrepante, não sendo considerado no cálculo da média e desvio padrão (DP).

Os resultados encontrados para os espumantes chilenos apresentaram valores muito próximos aos encontrados por Martinelli *et al.* [13]. Conforme Draycott [39] na América do Sul o Chile e o Uruguai são produtores de açúcar de beterraba. Em nosso estudo também encontramos uma amostra de espumante chileno compatível com açúcar de planta C₄, sugerindo o uso de açúcar de cana para a segunda fermentação. Estes resultados indicam que o Chile utiliza açúcares de ambas as plantas, C₃ e C₄, tornando mais difícil o controle, exceto quando são encontrados resultados abaixo do esperado para plantas C₃, dificultando a aplicação da metodologia caracterizada em nosso trabalho e a utilização dos limites estimados.

Duas amostras apresentaram resultados $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ inferiores ao esperado considerando o processo de elaboração, sendo um espumante brasileiro (-30,8‰) e um chileno (-45,6‰). O espumante brasileiro apresenta valores próximos aos valores do CO₂ industrial encontrado no Brasil, já o espumante chileno apresenta resultados inferiores, indicando a utilização de CO₂ industrial com valores mais negativos. Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ dos

espumantes citados são um indicativo de carbonatação (gaseificação) quando comparados ao $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 encontrado para os vinhos tranquilos.

Os resultados encontrados para os espumantes argentinos assemelham-se muito aos brasileiros, indicando a utilização de açúcares de planta C_4 para a segunda fermentação. O método tradicional apresentou média de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de $-11 \pm 1,05\%$ e para os espumantes elaborados pelo método tanque foi de $-12 \pm 3,31\%$.

Um espumante brasileiro elaborado pelo método tanque apresentou $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de $-22,3\%$ e do etanol de $-24,5\%$. O valor do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 encontrado nesta amostra, é próximo do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de vinhos tranquilos, sem adição de açúcar de cana, entretanto, a utilização de açúcar de cana foi comprovada através da determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do etanol que apresentou 79,2% de C_3 . Neste caso, comprova-se a adição de açúcar de cana para a fermentação, portanto o valor de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 do espumante elaborado pelo método tanque deveria ser próximo de -16% . Desta forma, conclui-se que o resultado obtido representa adição de CO_2 de origem industrial.

O espumantes Moscatéis comerciais (Figura 2) avaliados apresentaram metade dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 dentro dos limites de controle estimados. Os resultados encontrados indicam um alerta para este tipo de produto, visto que 50% das amostras apresentam problemas.

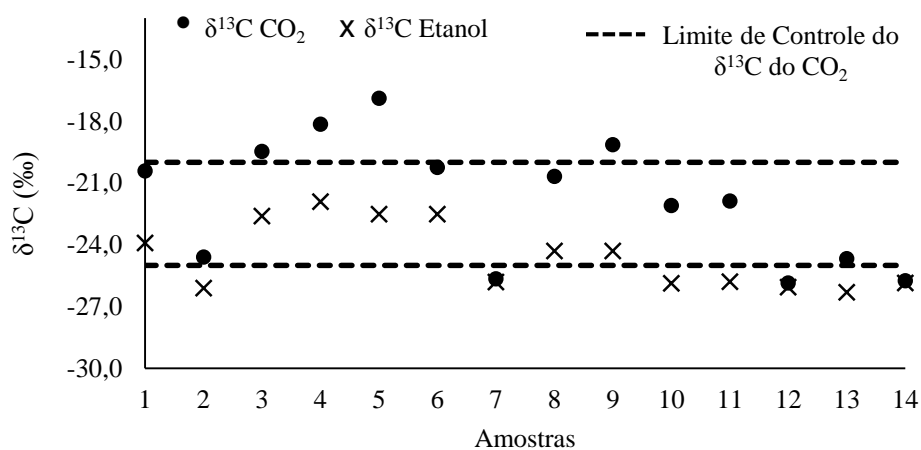


Figura 2: Resultados do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e do Etanol para espumantes Moscatéis comerciais e representação dos limites de controle estimados para o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 .

As amostras 7, 12 e 14 apresentaram resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 inferiores ao limite de controle estimado para o Moscatel espumante, ademais estes resultados estão muito próximos ao $\delta^{13}\text{C}$ do etanol, sugerindo adição de CO_2 industrial. Já as amostras 3, 4 e 5 apresentaram resultados acima do limite estimado; neste caso, o percentual de C_3 encontrado para os três espumantes foi de 68%, 63,7%, 64,7%, respectivamente, indicando a adição de açúcar de cana além do permitido no Brasil. A legislação brasileira permite o acréscimo em álcool, proveniente dos açúcares adicionados, de até 1,5% (v/v) para espumantes e 2% (v/v) para os Moscatéis [6]. A amostra 9 apresentou valor de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 também acima do limite de controle, contudo o $\delta^{13}\text{C}$ do etanol ficou dentro dos limites, neste caso, poderia ser uma influência da safra.

Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol são menos seletivos quando comparados ao $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 , com relação ao método de elaboração, entretanto, demonstra-se como uma importante ferramenta para auxiliar na confirmação da adição ilegal de CO_2 industrial.

3.6 Influência do CO_2 industrial no pH e no $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 do espumante

Os resultados obtidos das adições de CO_2 gasoso industrial em um vinho base apresentaram um coeficiente da correlação de Pearson, entre o pH e o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 , de 0,92, ou seja, há uma correlação forte entre o $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e o pH em função da concentração de CO_2 industrial adicionada. Através dos resultados obtidos foi elaborado o gráfico de dispersão (Figura 3).

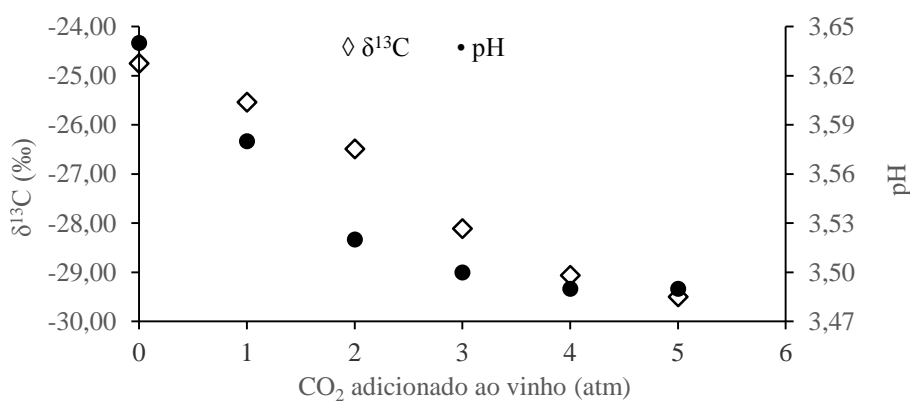


Figura 3: Resultados da influência da adição do CO_2 gasoso industrial no $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 e no pH do vinho e a correlação entre os resultados.

A adição do CO₂ industrial influenciou diretamente os resultados do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ e o pH do vinho, ocorrendo um decréscimo de ambos. Estes resultados, podem ser um aliado para a confirmação da gaseificação, desde que seja conhecido o pH inicial do vinho.

4 Conclusão

O método para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ mostrou-se adequado, pois apresenta exatidão, linearidade e precisão agregando confiabilidade aos resultados.

O CO₂ industrial apresentou valores de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ mais negativos quando comparados aos resultados encontrados para o vinho tranquilo e para o espumante.

Baseado nos resultados dos vinhos tranquilos e espumantes experimentais foi possível estabelecer uma metodologia para avaliar a origem do CO₂, com limites de controle de $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ estimados para espumantes elaborados pelo método tradicional e para o Moscatel espumante. O método de elaboração tanque origina CO₂ ora com valores característicos de planta C₃ ora de planta C₄, e algumas vezes uma combinação das duas fontes, dificultando estabelecer um limite para determinar a adição de CO₂ industrial. No caso do processo de elaboração tanque, sugere-se que seja avaliado o ¹⁴C para identificar a presença de CO₂ industrial.

Aplicando a metodologia estabelecida em nossa pesquisa em espumantes comerciais foi observado que 15% das amostras apresentaram indícios de adulteração, sendo 10% das amostras com adição de CO₂ industrial.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade de Caxias do Sul (UCS), ao Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Laboratório de Referência Enológica Evanir da Silva (LAREN) da

Secretaria de Agricultura e Pecuária do Estado do Rio Grande do Sul, pelo patrocínio das atividades e materiais necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

6 Referências

- [1] OIV - Office International de la Vigne et du Vin (2014). The sparkling wine Market. Disponível em < <http://www.oiv.int> >, acessado em 30.11.15.
- [2] Instituto Brasileiro Do Vinho. Comercialização de espumantes – Empresas do RS. Disponível em < <http://www.ibravin.org.br> >, acessado em 10.03.15.
- [3] Pozo-Bayón, M. A.; Martinez-Rodríguez, A.; Pueyo, E. Moreno-Arribas, M.V. Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, p. 289-299, 2009.
- [4] Sousa, S. I. (2005). **Espumante: o prazer é todo seu**. Editora Marco Zero. São Paulo, Brasil. ISBN 85-279-0384-9.
- [5] Stefenon C.A.; Colombo, M.; Bonesi, C. de M.; Marzarotto, V.; Vanderlinde, R.; Salvador. M. Henriques, J.P.A. (2010). Antioxidant activity of sparkling wines produced by Champenoise and Charmat methods. **Food Chemistry**, 119, 12-18.
- [6] Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Lei N° 10.970, de 12 de novembro de 2004. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providência. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em 25.02.15.
- [7] Torresi, S.; Frangipane, M. T.; Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. **Food Chemistry**, 129, 1232 – 1241.

- [8] Simpkins, W. A., Patel, G., Harrison, M., Goldberg, D. Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. *Food Chemistry*, v. 70, n. 03, p.385-390, 2000.
- [9] Reid, L. M.; O'donnell, Colm P.; Downey, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Food Science & Technology*, v. 17, n. 07, p.344-353, 2006.
- [10] EC Regulations: N° 1493/1999 de 17 de maio de 1999 on the common organization of the Market in wine. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu>.
- [11] Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Lei N° 10.970, de 12 de novembro de 2004. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providência. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em 25.02.15.
- [12] Ferreira, A.I.J.V. Espectrometria de Massas de Razões Isotópicas. *Tese de Doutorado*. Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa, Portugal, 2008. Disponível em <<http://hdl.handle.net/10451/1574>>, acessado em 22.03.15.
- [13] Martinelli, L. A.; Moreira, M.; Ometto, J. P. H. B.; Alcarde, A. R.; Rizzon, L. A, Stange, E.; Ehleringer, J.R. Stable Carbon Isotopic Composition of the Wine and CO₂ Bubbles of Sparkling Wines: Detecting C₄ Sugar Additions. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2625-2631, 2003.
- [14] Ducatti, C.; Nascimento, C. A.; Silva, E. T.; Martinez, J. C.; Martinez, M. G.; Llorca, R.; Araujo Netto, R. M.; Carnevalli, W. T. Metodologia de Análise da Razão Isotópica ¹³C e ¹²C em Produtos e Subprodutos das Plantas do Ciclo Fotossintético C₃ e C₄. *Diário Oficial da União*, v. 178, p. 17-19, 2000.

- [15] OIV - Office International de la Vigne et du Vin (2005). Resolution OENO 7/2005. Determination of the carbon isotope ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of CO_2 in sparkling wines method using isotope ratio mass spectrometry (IRMS). Disponível em <<http://www.oiv.org>>.
- [16] Dunbar, J. Use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for studying the origin of CO_2 in sparkling wines. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 311, 578- 580, 1982.
- [17] González-Martin, I.; González-Pérez, C.; Marques-Macias, E. Contribution to the study of the origin of CO_2 in Spanish sparkling wines by determination of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1149-1151, 1997.
- [18] Cabañero, A.I.; San-Hipólito, T.; Rupérez, M. (2007). GasBench/isotope ratio mass spectrometry: a carbon isotope approach to detect exogenous CO_2 in sparkling drinks. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 21: 3323-3328, 2007.
- [19] Gaillard, L.; Guyon, F.; Salagoity, M.; Médina, B. (2013). Authenticity of carbón dioxide bubbles in French ciders through multiflow-isotope ratio mass spectrometry measurements. *Food Chemistry*, 141, 2103-2107
- [20] Meier-Augenstein, W. (1999). Review: Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 842, 351-371.
- [21] Winkler, F.J.; (1984). *Cromatography and Mass Spectrometry in Nutrition Science and Food Safety*. Elsevier: Amsterdam, Holanda.
- [22] Brasil (2001). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa N° 04 de 05 de fevereiro de 2001. Dispõe sobre a metodologia de análise da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em produtos e sub-produtos das plantas do ciclo fotossintético C_3 e C_4 .
- [23] OIV – International Organisation of Vine and Wine. Resolution OENO 17/2001. Determination by isotope ratio mass spectrometry $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of wine ethanol or that obtained

through the fermentation of musts, concentrated musts or grape sugar. Disponível (on line) <http://www.oiv.int>.

- [24] INMETRO (2011). **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, Revisão 03 – FEV/2010. Documento de caráter orientativo.
- [25] Cabañero, A.I.; Rupérez, M. (2012). Carbon isotopic characterization of cider CO₂ by isotope ratio mass spectrometry: a tool for quality and authenticity assessment. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, v. 26, p. 1753-1760.
- [26] Redondo, R. & Yélamos, J.G (2005). Determination of CO₂ origin (natural or industrial) in sparkling bottle waters by ¹³C/¹²C isotope ratio analysis. *Food Chemistry*. v.92, p. 507-514.
- [27] González-Martin, I.; González-Pérez, C.; Marques-Macias, E. Contribution to the study of the origin of CO₂ in Spanish sparkling wines by determination of the ¹³C/¹²C isotope ratio. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1149-1151, 1997.
- [28] Calderone, G.; Guillou, C.; Reniero, F.; Naulet, N. (2007) Helping to authenticate sparkling drinks ¹³C/¹²C of CO₂ by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Food Research International* 40: 324-331.
- [29] Comerlato, E. (2005) Estudo das razões isotópicas do carbono, oxigênio e hidrogênio dos vinhos das principais áreas de cultivo do Rio Grande do Sul. Monografia. Instituto de Biotecnologia - Universidade de Caxias do Sul, 58p.
- [30] Rossmann, A.; Schimidt, H. L.; Reniero, F.; Versini, G.; Moussa, I.; Merle, M. H. (1996). Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from, Italy, France and Germany. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 203, 293-301.

- [31] Martinelli, L. A.; Ometto, J. P. H. B.; Ferraz, E. S.; Victoria, R. L.; Camargo, P. B.; Moreira, M. Z. (2009). *Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis*. Ed. Copyright, São Paulo, SP, 144p. ISBN 978-85-7975-024-3.
- [32] Peterson, B. J. & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual review of Ecology and Systematics*, 18, 293-320.
- [33] Dutra, S. V.; Adami, L.; Marcon, A. R.; Carnieli, G. J.; Roani, C. A.; Spinelli, F. R.; Leonardelli, S.; Vanderlinde, R. (2013). Characterization of wines according the geographical origin by analysis of isotopes and minerals and the influence of harvest on the isotope values. *Food Chemistry*, v. 141, p. 2148-2153.
- [34] Adami, L.; Dutra, S.V.; Marcon, A.R.; Carnieli, G.J.; Roani, C.A.; Vanderlinde, R. (2010). Geographic origin of southern Brazilian wines by carbon and oxygen isotope analyses. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 24, p. 2943–2948.
- [35] Zang, J. Quay, P. D.; Wilbur, D.O (1995). Carbon isotope fractionation during gas-water Exchange and dissolution of CO₂. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 107-114.
- [36] Guyon, F., Gaillard, L., S., Salagoity, M.H. & Médina, B. (2011). Intrinsic ratios of glucose, fructose, glycerol and ethanol ¹³C/¹²C isotopic ratio determined by HPLC-co-IRMS : Toward determining constants for wine authentication. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1551-1558.
- [37] Kosir, I. J., Kocjancic, M., Ogrinc, N., & Kidric, J. (2001). Use of SNIF-NMR and IRMS IN Combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines). *Analytica Chimica Acta*, 429, 195–206.
- [38] Martin, G. J., Mazure, M., Jouitteau, C., Martin, Y. L., Aguilé, L., & Allain, P. (1999). Characterization of the geographic origin of Bordeaux wines by a combined use of isotopic

and trace element measurements. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 409–417.

- [39] Draycott, A. P. (2006). Sugar beet. World Agriculture Series. Ed. John Wiley & Sons, 496 p. ISBN 140517336x, 9781405173360.

5. PERSPECTIVAS

- Determinar o ^{14}C , para verificar se é mais específico na diferenciação do que o ^{13}C ;
- Compor um banco de dados de $\delta^{13}\text{C}$ para cada safra e observar o comportamento da cultivar e da safra, para verificar se o limite estabelecido para controle do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 sofre mudanças significativas de acordo com a safra de produção.
- Compor um banco de dados com espumantes experimentais, para os métodos de elaboração tradicional e tanque, com a finalidade de testar se a adição de diferentes concentrações de açúcar de cana durante a segunda fermentação, influencia significativamente o valor isotópico do CO_2 .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amerine, M. A.; Winkler, A. J. (1944). **Composition and quality of musts and wines of California grapes**. Florida: University of California. *Hilgardia*, v. 15, p.493-673.
- Association of Official Analytical Chemists. **Guidelines for standard method performance requirements**, Official Methods of Analysis of AOAC International, v. 2, 2012.
- Brasil (1988). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria N° 229 de 25 de outubro de 1988. **Complementação de padrões de identidade e qualidade de vinho**.
- Brasil (2001). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa N° 04 de 05 de fevereiro de 2001. **Dispõe sobre a metodologia de análise da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em produtos e sub-produtos das plantas do ciclo fotossintético C_3 e C_4** .
- Brasil (2004). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Lei N° 10.970, de 12 de novembro de 2004. **Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências**.
- Brasil (2014). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto N° 8.198, de 20 de fevereiro de 2014. **Regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho**.
- Bréas, O.; Reniero, F.; Serrini, G. (1994). Isotope ratio mass spectrometry: analysis of wines from different european countries. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 8: 967-970.
- Brugnoli, E., Farquhar, G.D., (1999). Photosynthetic fractionation of carbon isotopes, in R.C. Leegood, T.D. Sharkey, von Caemmerer S. (eds.), *Advances in Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, v. 9, c. 17, p. 399–434.

- Cabañero, A.I.; San-Hipólito, T.; Rupérez, M. (2007). GasBench/isotope ratio mass spectrometry: a carbon isotope approach to detect exogenous CO₂ in sparkling drinks. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, 21: 3323-3328.
- Cabañero, A.I.; Rupérez, M. (2012). Carbon isotopic characterization of cider CO₂ by isotope ratio mass spectrometry: a tool for quality and authenticity assessment. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 26, p. 1753-1760.
- Cainelli, J.C. (2009). Conheça o espumante brasileiro. **Disponível (online)** <http://www.academia-vinhaevinho.com>. (13 de janeiro de 2014).
- Calderone, G.; Guillou, C.; Reniero, F.; Naulet, N. (2007) Helping to authenticate sparkling drinks ¹³C/¹²C of CO₂ by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. **Food Research International** 40: 324-331.
- Caliari, V.; Rosier, J.P.; Bordignon-Luiz, M.T. (2013). Vinhos Espumantes: Métodos de Elaboração. **Evidência**, Joaçaba v. 13 n. 1, p. 65-77.
- Carter, J.F. & Barwick, V.J. (Eds) (2011). Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry, FIRM. ISBN 978-0-948926-31-0
- Cava, A.J.; Silva, C.A.B.; Frias, J.R.C (2009). **Tecnologia de Alimentos**. Princípios e Aplicações. Editora Nobel, p.493, São Paulo, Brasil, 505p.
- Celestino, S. M. C. (2010). Produção de Refrigerante de Frutas. **Documentos / Embrapa Cerrados**, ISSN 1517-5111. **Disponível on line** www.cpac.embrapa.br/download/1738 (05 de novembro de 2014).
- Chang (2009) R. **Físico-Química para as Ciências Químicas e Biológicas**. Editora MacGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., v.1, 3ªedição, p. 211-217, 561p. São Paulo, SP, Brasil.
- Chang, R.; Goldsby, K.A. (2013). **Química**. Editora AMGH Editora Ltda. 11º Ed. Porto Alegre, Brasil, 1120p.
- Comerlato, E. Estudo das razões isotópicas do carbono, oxigênio e hidrogênio dos vinhos das principais áreas de cultivo do Rio Grande do Sul. 2005, 58f. **Dissertação de**

- Mestrado.** Instituto de Biotecnologia - Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil, 2005.
- Deleens, E. (1976). La discrimination du ^{13}C et les trois types de métabolisme des plantes, *Physiol. Vég.*, v. 14, p.641.
- Diniz, A.P.C. (2009). Aplicação da razão isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) para detecção de adulteração em bebidas à base de maracujá - *passiflora edulis sims. f. flavicarpa deg.* **Dissertação de Mestrado.** Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Botucatu, SP, Brasil.
- Draycott, A. P. (2006). Sugar beet. World Agriculture Series. Ed. John Willey & Sons, 496 p. ISBN 140517336x, 9781405173360.
- Ducatti, C.; Nascimento, C. A.; Silva, E. T.; Martinez, J. C.; Martinez, M. G.; Llorca, R.; Araujo Netto, R. M.; Carnevalli, W. T. (2000). Metodologia de Análise da Razão Isotópica ^{13}C e ^{12}C em Produtos e Subprodutos das Plantas do Ciclo Fotossintético C_3 e C_4 . **Diário Oficial da União**, v. 178, p. 17-19, 2000.
- Ducatti, C. (2007). Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 36, p.01-10.
- Dry, P.R.; Ewart, A.J.W. (1985). **Sites and variety selection for premium grapes for Australian sparkling wine.** Proceedings of the Australian Society of Viticulture.
- Dunbar, J. (1982). Use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for studying the origin of CO_2 in sparkling wines. Fresenius' **J. Anal. Chem.** 311, 578- 580.
- Dutra, S.V. (2011). Caracterização de Vinhos Brasileiros Utilizando as Metodologias de Análise Isotópica, Elementos Minerais e Ácidos Orgânicos. **Tese de Doutorado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Fellows, P. J. (2006). **Tecnologia Do Processamento De Alimentos.** 2º ed. Brasil, editora Artmed, 602p.
- Ferreira, A.I.J.V, (2008). Espectrometria de Massas de Razões Isotópicas. **Tese de Doutorado.** Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa, Portugal.

- Flanzy, C. (2003). **Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**. 2ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 783 p.
- Francioli, S.; Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Francioli, S. (2003). Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. **Am J. Enol. Vitec.** 54, 158-162
- Gaillard, L.; Guyon, F.; Salagoity, M.; Médina, B. (2013). Authenticity of carbón dioxide bubbles in French ciders through multiflow-isotope ratio mass spectrometry measurements. **Food Chemistry**, 141, 2103-2107
- Geisse, M. (2009). (Entrevistado) In: BARBOSA, C.A. Conheça Mario Geisse, referência em espumantes nacionais. **Disponível (online)** <http://vidaestilo.terra.com.br/homem/interna/0,,OI4062868-EI14236,00-Conheca+Mario+Geisse+referencia+em+espumantes+nacionais.html> (15 de janeiro de 2013).
- González-Martin, I.; González-Pérez, C.; Marques-Macias, E. (1997). Contribution to the study of the origin of CO₂ in Spanish sparkling wines by determination of the ¹³C/¹²C isotope ratio. **J. Agric. Food Chem.** 45, 1149-1151.
- Guyon, F., Gaillard, L., S., Salagoity, M.H. & Médina, B. (2011). Intrinsic ratios of glucose, fructose, glycerol and ethanol ¹³C/¹²C isotopic ratio determined by HPLC-co-IRMS : Toward determining constants for wine authentication. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 401, 1551-1558.
- Hui, Y.H. ; Evranuz, E.O. (2012). **Handbook of animal-based fermented food and beverage technology**. Florence, USA: Boca Raton, CRC Press Taylor e Francis Group.
- IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho. Comercialização de espumantes – Empresas do RS. Disponível (on line) <http://www.ibravin.org.br> (10 de maio 2015).
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. (2011). **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, Revisão 03 – FEV/2010. Documento de caráter orientativo.

- Jackson, R.S. ; (2008). **Wine Science Principles and Applications**. Califórnia, USA : Elsevier, 789p.
- Jamin, E. (2002). Isotopic analysis of wine and wine vinegar: new state of the art. XXVII world congress of vine and wine, Bratislava, Eslováquia. **Disponível (on line)** <http://www.eurofins.com> (15 de dezembro)
- Karoui, R.; Baerdemaeker, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p.621-640, 2007.
- Kelly, S.; Heaton, K.; Hoogewerff, J. (2005) Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. **Trends in Food Science & Technology**. 16, 555-567.
- Kosir, I. J.; Kocjancic; Ogrinc, N.; Kidric, J. (2001). Use of SNIF-NMR and IRMS in Combination with Chemometric methods for the Determination of Chaptalisation and Geographical Origin of Wines (the example of Slovenian wines). **Analytica Chimica Acta**. 429: 195-206.
- Lea, A.G.H; Piggott, J.R. (2003). **Fermented Beverage Production**. Editora Springer, 2º ed, 423p. ISBN-10 0306477068
- Lenntech (2014). Dióxido de carbono. **Disponível (on line)** <http://www.lenntech.es/dioxido-de-carbono> (07 de dezembro de 2014).
- Licatti, F. (1997). Isótopos estáveis do carbono (^{12}C , ^{13}C) em plantas dos ciclos bioquímicos C_3 e C_4 . **Monografia**. Instituto de Biociência, Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo, SP.
- Lona, A. A. L. (1999). **Vinhos – degustação, elaboração e serviço**, 4º edição. Porto Alegre: AGE editora. 151 p.
- Marchini, J. S.; Basile Filho, A.; Vannucchi, H. Darmaun, D.; Krempf, M. Utilização de espectrometria de massa para o estudo do metabolismo protéico e aminoacídico, em medicina. **Medicina, Ribeirão Preto**, 30: 494-507.
- Martin, M. L. & Martin, G. J. (1991). **Deuterium NMR In: study of site-specific natural isotope fraction (SNIF-NMR)**. Université de Nantes. França.

- Martinelli, L. A.; Ometto, J. P. H. B.; Ferraz, E. S.; Victoria, R. L.; Camargo, P. B.;
Moreira, M. Z. (2009). Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis. Ed.
Copyright, São Paulo, SP, 144p. ISBN 978-85-7975-024-3.
- Martinelli, L.A.; Moreira, M.; Ometto, J.P.H.B.; Alcarde, A.R.; Rizzon, L.A; Stange, E.;
Ehleringer, J.R. (2003). Stable Carbon Isotopic Composition of the Wine and CO₂
Bubbles of Sparkling Wines: Detecting C₄ Sugar Additions. **J. Agric. Food Chem.**
51, 2625-2631.
- Meier-Augenstein, W. (1999). Review: Applied gas chromatography coupled to isotope
ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 842, 351-371.
- Meneguzzo, J. (2010) Caracterização Físico-Química e Sensorial dos Vinhos Espumantes
da Serra Gaúcha. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade
de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Morrison, R. T.; Boyd, R. N. (1990). **Química Orgânica**. 9º ed. Lisboa: Fundação
Calouste Gulbenkian, 1639p.
- Mucio, Z. & Jackson, G.P. (2008). Isotope ratio mass spectrometry. **Analyst**, 134, 213-
222. **DOI:** 10.1039/B808232D
- OIV – International Organisation of Vine and Wine. Resolution OENO 17/2001.
Determination by isotope ratio mass spectrometry ¹³C/¹²C of wine ethanol or that
obtained through the fermentation of musts, concentrated musts or grape sugar.
Disponível (on line) <http://www.oiv.int>.
- OIV Resolution OENO 7/2005. (2005). Determination of the carbon isotope ration
¹³C/¹²C of CO₂ in sparkling wines method using isotope ratio mass spectrometry
(IRMS). Included in the Annex C of Compendium of International Methods of
Analysis of Musts and Wines. **Disponível (on line)** <http://www.oiv.org> (29 de
novembro).
- Osmond, C.B.; Winter, K.; Ziegler. (1982). Functional significance of different pathways
of CO₂ fixation in photosynthesis. In *Physiological Plant Ecology II. Water Relations*

and Carbon Assimilation, ed. Lange, O. L., Nobel, P. S., Osmond, C. B. & Ziegler, H. p. 479-547, Springer-Verlag, Berlin.

Pambianchi, D. (2007). Force-Carbonating Wine to Sparkle: Technique. Winemaker.

Disponível (on line) <https://winemakermag.com/306-force-carbonating-wine-to-sparkle-technique> (30 de junho).

Peterson, B. J. & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. Annual review of Ecology and Systematics, 18, 293-320.

Poerner, N.; Composição mineral e diferenciação de vinhos-base produzidos em duas regiões do estado do Rio Grande do Sul e de vinhos espumantes provenientes de diferentes países. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Rio Grande Sul, 2009, 83f.

Pozo-Bayón, M. A.; Martínez-Rodríguez, A.; Pueyo, E. Moreno-Arribas, M.V. (2009) Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 289-299.

Rede Metrológica do Rio Grande Do Sul. (2013). RM 68 – Incerteza de medição: guia prático do avaliador de laboratórios. Revisão 05. **Disponível (on line)** http://www.redemetrologica.com.br/uploads/pages/15/1405816078_DOC_128 (15 de julho).

Redondo, R. & Yélamos, J.G (2005). Determination of CO₂ origin (natural or industrial) in sparkling bottle waters by ¹³C/¹²C isotope ratio analysis. **Food Chemistry**. v.92, p. 507-514.

Reid, Linda M.; O'donnell, Colm P.; Downey, Gerard, (2006). Recent technological advances for the determination of food authenticity. Trends In Food Science & Technology, v. 17, n. 07, p.344-353.

Ribéreau-Gayon, P. *et al.* (2006). **Handbook of Enology: the Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments**. 2. ed. Nova Jersey: Wiley & Sons, 2006.

- Rizzon, L.A.; Meneguzzo, J.; Abarzua, C.E. (2000). **Elaboração de vinho espumante na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho.
- Rizzon, L. A.; Meneguzzo, J.; Gasparin, A. M. (2005). **Elaboração de vinho moscatel espumante**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. (Documento 51). Disponível on line <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Doc51>>.
- Rossmann, A.; Schmidt, H. L.; Reniero, F.; Versini, G.; Moussa, I.; Merle, M. H. (1996). Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from, Italy, France and Germany. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 203, 293-301.
- Rossmann, A (2001) Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**. v.17, p. 347-381.
- Santos, C. (2007). Estatística Descritiva – Manual de Auto-aprendizagem. 2º edição, Editora Edições Sílabo. Lisboa, Portugal, 312p.
- SENAI - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial. Gás Carbônico. Biblioteca Digital - Livros SENAI – Fundamentos. Disponível on line <http://www.infosolda.com.br/biblioteca-digital/livros-senai/fundamentos> (05 de outubro de 2014).
- Simpkins, Wayne A., Patel, G., Harrison, M., Goldberg, D. (2000). Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. **Food Chemistry**, v. 70, n. 03, p.385-390.
- Sousa, S. I. (2005). **Espumante: o prazer é todo seu**. Editora Marco Zero. São Paulo, Brasil. ISBN 85-279-0384-9.
- Teixeira, A. R., Ricardo, C. P. P., (1983). **Fotossíntese**. 2º edição. Didáctica Editora, Lisboa, Portugal, 301p.
- Tolber, N. E. & Zelitch, I. (1983). Carbon metabolismo. In *CO₂ and Plants: The Response of Plants to Rising Levels of atmospheric carbon dioxide*, ed. E. R. Lemon, p. 21-64. Westview Press, Boulder, Colo.
- UCSC - University of Califórnia - Stable Isotope Laboratory (2015). Gas Bench Principles. **Disponível (on line)** <http://es.ucsc.edu/>

UIG, Universal Industrial Gases, Inc. LLC (2008). Carbon Dioxide (CO₂) Properties, Uses, Applications. **Disponível (online)** <http://www.uigi.com/carbondioxide.html>

Winkler, F.J.; (1984). **Cromatography and Mass Spectrometry in Nutrition Science and Food Safety**. Elsevier: Amsterdam, Holanda.

7. MATERIAL COMPLEMENTAR

7.1 Materiais e Métodos

A validação e as análises foram realizadas no Laboratório de Referência Enológica Evanir da Silva (LAREN) da Secretaria de Agricultura e Pecuária do Rio Grande do Sul, em Caxias do Sul.

Comparação entre os métodos de preparo da amostra

Inicialmente foi definido o método de preparo da amostra a ser utilizado na determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 . Para isto, testaram-se duas formas de preparo, o método de preparo de amostra direto, conforme Cabañero *et al.* (2007) e o método de preparo submetendo a amostra por 10 minutos em um ultrassom para extração do CO_2 , conforme Gaillard *et al.* (2013). Utilizou-se a mesma amostra de espumante, um vinho espumante Moscatel rosado e 10 repetições para cada processo de preparo.

Preparo da amostra direto

As amostras de espumantes foram refrigeradas à temperatura entre 2°C e 4°C, para aumentar a solubilidade do CO_2 , após a amostra foi rapidamente transferida para um frasco de 12mL e fechada com tampa e septo de teflon-silicone. Dessa alíquota, com o auxílio de uma seringa, foram transferidos 50 μL da amostra para outro frasco preenchido com gás Hélio, através do sistema *flush and fill* (CABAÑERO *et al.* 2007). O frasco contendo a amostra foi colocado no amostrador automático, onde foi analisado por um cromatógrafo gasoso GasBench, acoplado ao espectrômetro de massa de razão isotópica, foram realizadas dez repetições para avaliação.

Preparo da amostra submetendo ao ultrassom

As amostras de espumantes foram refrigeradas à temperatura de 4°C, rapidamente transferida para um frasco de 12mL e fechada com tampa e septo de teflon-silicone. Dessa alíquota, com auxílio de uma seringa, foram transferidos 200 μL da

amostra para outro frasco preenchido com gás Hélio, através do sistema *flush and fill*. O frasco contendo a amostra foi colocado no banho de ultrassom por 10 minutos (GAILLARD *et al.* 2013). Em seguida, foi colocado no amostrador automático, onde foi analisado por um cromatógrafo gasoso GasBench acoplado ao espectrômetro de massa de razão isotópica, foram realizadas dez repetições para comparar com o método de preparo direto.

Validação do Método

Definido o método a ser utilizado, iniciaram-se os testes de validação.

Seletividade

A seletividade foi avaliada realizando as determinações em um vinho base da cultivar Chardonnay e em um espumante Moscatel, foi aplicado o teste F, para analisar a variância e verificar se há diferença significativa entre elas, conforme a equação 1.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{\text{Variância}_{\text{maior}}}{\text{Variância}_{\text{menor}}} \quad \text{Equação 1}$$

Linearidade

Através dos resultados obtidos no teste F da seletividade, foi realizada a curva analítica com oito concentrações, cada concentração foi analisada oito vezes. O cálculo dos resíduos de cada curva foi realizado através da diferença entre o valor médio observado e o valor real de cada concentração, pela equação da reta de regressão, para cada concentração da curva analítica. Após a obtenção dos resultados, foi elaborado um gráfico dos resíduos, relacionando o resíduo com a concentração do padrão.

LD e LQ

Uma amostra de vinho adicionada de 2,5 % de CO₂ industrial foi usada, a fim de espectrômetro de massa de razão isotópica. O limite de detecção – LD foi estimado como três vezes o desvio padrão das repetições, enquanto que o limite de quantificação - LQ em cinco vezes o desvio padrão.

Exatidão

A exatidão foi avaliada utilizando um material de referência certificado, onde os valores médios e o desvio padrão de uma série de ensaios em replicata, foram comparados com os valores certificados do material de referência, para esta comparação foi utilizado o índice Z (*Z-score*), conforme a equação 5.

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad \text{Equação 5}$$

Sendo:

X_{lab} = valor obtido pelo laboratório;

X_v = valor aceito como verdadeiro;

S = desvio padrão do ensaio de proficiência.

A avaliação é feita com o seguinte critério de decisão:

- $|z| \leq 2$: resultado satisfatório;
- $2 < |z| < 3$: resultado questionável;
- $|z| \geq 3$: resultado insatisfatório.

Precisão

A precisão foi determinada pelas três formas mais comuns de expressá-la que são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade (MAPA, 2011). Sendo usualmente expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação (CV), usualmente é expresso em % conforme a equação 6, também conhecido como desvio padrão relativo (DPR) (INMETRO, 2011).

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde: DP = desvio padrão e CMD = concentração média determinada.

Foram analisadas 50 repetições, e após, foi calculado o coeficiente de variação conforme a equação 6.

Repetitividade

A repetitividade foi determinada através da análise de um espumante branco natural brut elaborado pelo método tradicional. Foram realizadas 10 repetições da mesma amostra, no mesmo dia e sob as mesmas condições, foi calculada para um nível de significância de 95% conforme a equação 7.

$$r = 2,8 * S_r \quad \text{Equação 7}$$

Sendo:

S = desvio padrão amostral associado aos resultados considerados.

Precisão intermediária

Precisão intermediária foi obtida realizando o mesmo ensaio em oito repetições em dias diferentes e foi avaliada através do cálculo da equação 8.

$$Spi_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=k}^t \sum_{k=1}^n (Y_{jk} - \bar{Y}_j)^2} \quad \text{Equação 8}$$

t = total de amostras ensaiadas (não confundir com o t de *Student*);

n = total de ensaios efetuados por amostra;

j = nº da amostra, $j = 1, t$;

k = nº do ensaio da amostra j , $k = 1, n$;

Y_{jk} = valor do resultado k para a amostra j ;

\bar{Y}_j = representa a média aritmética dos resultados da amostra j (INMETRO, 2011).

Robustez

Na avaliação da robustez do método foram testados parâmetros que poderiam interferir nos resultados das análises como: temperatura do amostrador (26,5°C, 27°C e 27,5°C), temperatura da amostra durante o preparo (2-4°C, 10-13°C, 19-22°C e 35-40°C),

frascos novos e reutilizados, septos novos e reutilizados uma vez, volume de amostra (45 μ L, 50 μ L e 55 μ L), limpeza do frasco com Hélio no sistema *flush and fill*, estabilidade da amostra (dias 1, 2, 3, 6, 10, 30 e 62) e temperatura da coluna cromatográfica (65°C, 70°C e 75°C).

Incerteza de Mediação

A incerteza de medição do método foi calculada com a utilização do software GUM Workbench Edu, específico para cálculo de incertezas. A distribuição dos dados foi considerada conforme a RM 68 da Rede Metrológica do Rio Grande do Sul.

7.2 Resultados e Discussão

7.2.1 Comparação entre os métodos de preparo da amostra

Observou-se que há diferença estatística significativa entre os dois métodos de preparo, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Comparação do método de preparo da amostra.

Preparo da Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ do CO_2
Método Direto	-24,4 ^a \pm 0,06
Método Ultrassom	-24,7 ^b \pm 0,06

Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente através do Teste t de Student - dados pareados, $p < 0,05$.

O método direto apresenta picos de análise com uma configuração uniforme, conforme podemos observar na Figura 1, o resultado médio encontrado foi de -24,4‰ \pm 0,06‰, optamos por utilizar este método em nossa pesquisa. Além disso, como não ocorre manipulação da amostra, ou seja, a amostra é simplesmente transferida para o frasco de análise, conclui-se que não há alteração ou fracionamento isotópico da amostra.

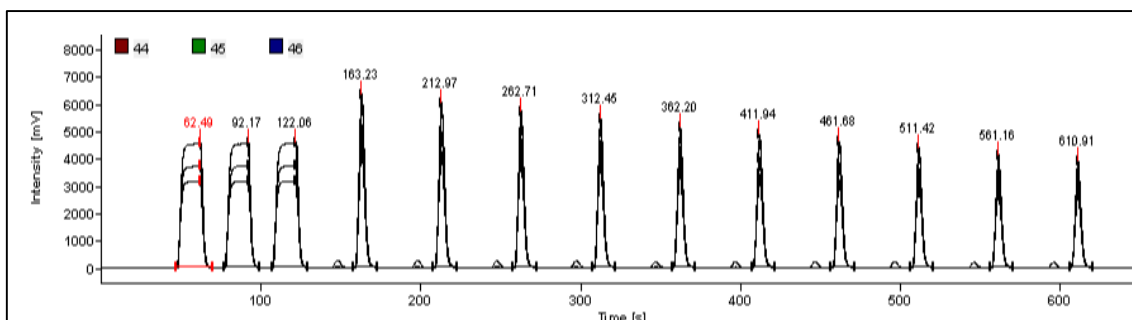


Figura 1: Cromatograma de análise do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de um espumante, preparado conforme o método direto.

No método de ultrassom ocorre saturação do primeiro pico de amostra, conforme observado na Figura 2. Isto pode ocorrer em função do volume utilizado ou ainda pelo fato da amostra ser submetida por 10 minutos ao banho de ultrassom para promover a extração do CO_2 , fazendo com que acumule uma concentração muito grande de CO_2 no frasco. O sistema automaticamente diluí a amostra para continuar a determinação, o que explica a configuração dos últimos nove picos.

O fato da amostra ser submetida ao banho de ultrassom também promove uma alteração da razão isotópica, pois a temperatura do banho atinge aproximadamente $40\text{ }^\circ\text{C}$, e isto torna os valores mais negativos, $-24,7\% \pm 0,06\%$, quando comparados ao método direto.

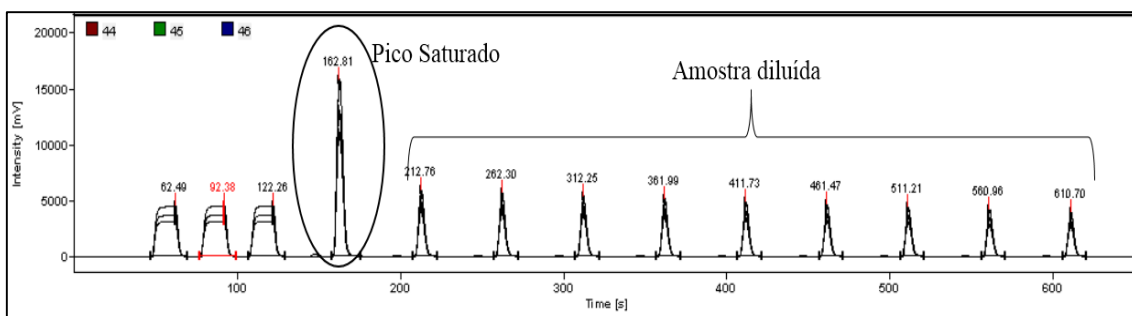


Figura 2: Cromatograma de análise do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 de um espumante, preparado conforme o método de ultrassom.

7.2.2 Validação do método direto

O desempenho do método foi avaliado através da seletividade, linearidade, faixa de trabalho, tendência, exatidão, recuperação, precisão, repetibilidade e precisão intermediária, conforme Quadro 1 e robustez, conforme Quadro 2. Baseado nos dados da validação foi calculada a incerteza de medição do método.

Quadro 1: Resultado da validação do método direto para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 .

Parâmetro	Resultados
Seletividade	$F_{\text{calculado}} 0,02 < F_{\text{tabelado}} 3,79$. É seletivo
Linearidade	$R^2 = 0,98$
LD	4 %
LQ	5 %
Exatidão (Z-score)	-1,41%, satisfatório $z \leq 2$
Precisão	0,59 %, satisfatória conforme AOAC 2012 [37]
Repetibilidade	0,08 ‰
Precisão Intermediária	0,10 ‰

O método mostrou-se seletivo tanto para o vinho base como para o espumante Moscatel. A seletividade foi comprovada através do teste F de Fisher-Snedecor, sendo que o $F_{\text{calculado}}$ foi de 0,02 menor do que o F_{tabelado} que é de 3,79, ou seja, a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo.

Considerando os resultados da seletividade, conclui-se que a linearidade poderia ser realizada tanto no vinho como no Espumante. Sendo assim, a linearidade foi preparada com oito concentrações crescentes de CO_2 em um vinho base da cultivar Pinot Noir. O método apresentou resultados lineares até a concentração de 50% de CO_2 adicionada ao vinho com $R^2 = 0,99$, conforme Figura 3. O perfil dos resíduos, conforme a Figura 4, mostraram-se aleatórios, o que significa a ausência de erros sistemáticos, confirmando a linearidade e boa reprodução do método.

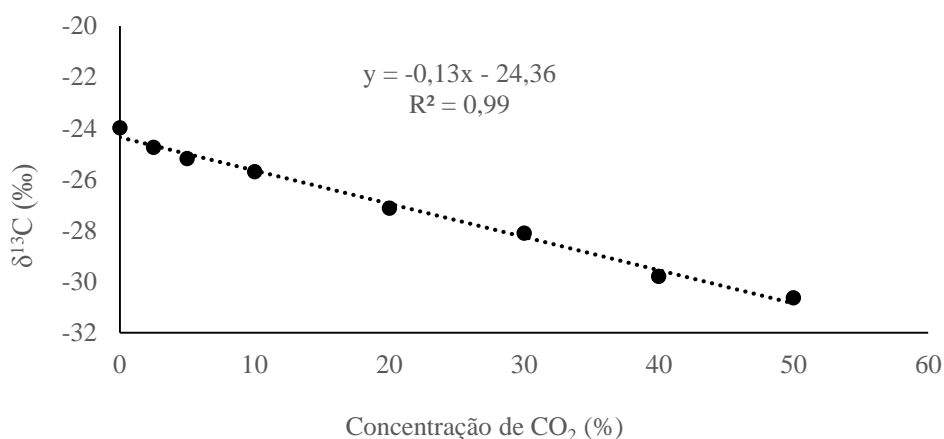


Figura 3: Representação da linearidade do método em vinho Pinot Noir.

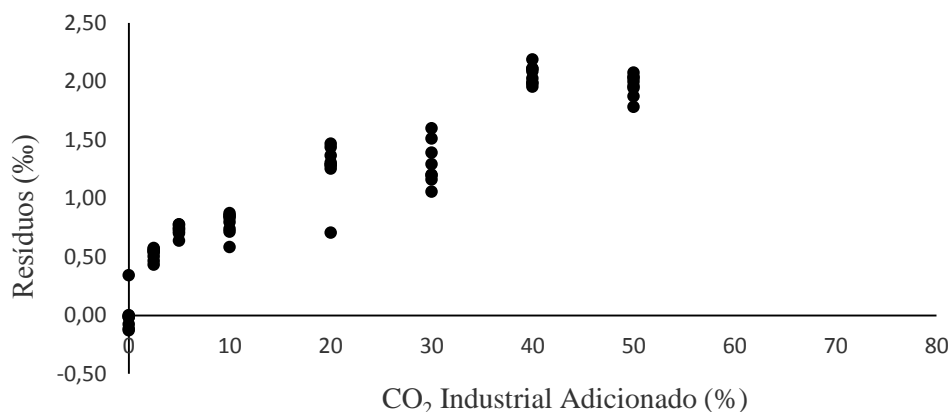


Figura 4: Representação gráfica dos resíduos relacionados com a concentração de CO₂ adicionado a um vinho base da cultivar Pinot Noir.

O limite de detecção encontrado foi de 4% e o limite de quantificação 5%.

A exatidão foi avaliada através do índice Z-score, onde o valor encontrado foi de -1,41, considerado satisfatório, pois $z \leq 2$.

A precisão foi considerada satisfatória, demonstrando repetitividade tanto do método quanto do analista, com coeficiente de variação de 0,59%. O critério de aceitação para o coeficiente de variação, com uma concentração de 100% do analito é no máximo de 1,3%, conforme o Quadro 2 (AOAC, 2012).

Quadro 2: Critérios de aceitação da precisão.

Concentração (%)	Desvio Padrão Relativo
100%	1,3
10%	1,9
1%	2,7
0,10%	3,7
100ppm	5,3
10ppm	7,3
1ppm	11,0
100ppb	15,0
10ppb	21,0
1ppb	30,0

Fonte: AOAC (2012)

O limite de repetitividade foi de 0,08% e a precisão intermediária calculada foi de 0,10%, inferior a encontrada por Cabañero *et. al* (2007).

7.2.3 Resultados da robustez

Para avaliar a robustez do método foram testadas as pequenas, conforme pode ser observado no Quadro 4.

Quadro 4: Resumo dos resultados dos testes da robustez.

Parâmetro Testado	Condições do Teste
Temperatura do Amostrador	Não interfere nos resultados
Temperatura da amostra no preparo	Conforme a amostra aquece os resultados tornam-se mais negativos. Até a temperatura de 13°C não há interferência nos resultados.
Frascos novos e reutilizados	Interferem nos resultados, foi considerado como um componente da incerteza de medição.
Septos novos e reutilizados	Interferem nos resultados, portanto não devem ser reutilizados.
Volume de amostra	Não interfere
Limpeza do frasco com He	Interfere nos resultados, deve ser realizado o <i>flush and fill</i> , para remover o CO ₂ atmosférico, devido ao CO ₂ atmosférico contaminar o CO ₂ da amostra quando esta é colocada no frasco.
Estabilidade	A amostra manteve-se estável durante os 62 dias testados.
Temperatura da coluna cromatográfica	65°C – amostra apresentou instabilidade, com desvio padrão de 0,25‰ entre os resultados. Contudo, não há diferença nos resultados obtidos em 60°C quando comparado aos 70°C, recomendados no método. 75°C – há diferença quando comparado aos 70°C, entretanto, os resultados são mais estáveis, com desvio padrão de 0,05‰.

Observou-se que variações na temperatura do amostrador (27°C) não influenciam os resultados.

A variação de temperatura de transferência da amostra para o frasco de análise, não apresentou diferença significativa entre as faixas de temperatura de 2°C a 4°C (recomendado pelo método) e 10°C a 13°C. Contudo, conforme a temperatura aumenta os resultados tendem a ficar mais negativos, como observado para as faixas de temperaturas de 20°C a 22°C e 35°C a 40°C, que apresentaram diferença significativa quando comparados a temperatura de 2°C a 4°C. Por conseguinte, o fator temperatura de preparo da amostra interfere nos resultados, devendo ser mantida entre 2°C e 4°C e não excedendo 13°C.

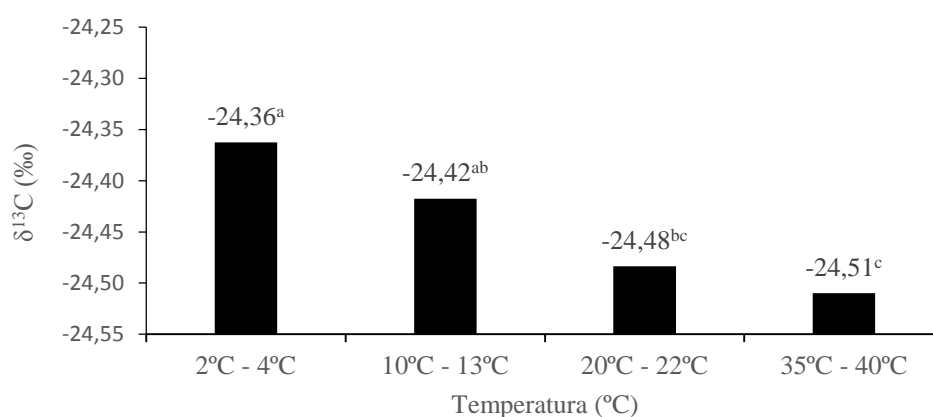


Figura 5: Variação da temperatura da amostra durante a transferência para o frasco. Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ($p < 0,05$)

A limpeza do frasco com gás Hélio antes de colocar a amostra é importante para remover o CO₂ atmosférico contido no frasco inicialmente, uma vez que há diferença significativa entre os resultados obtidos realizando o *flush and fill* com Hélio, ou seja, o ar atmosférico interfere nos resultados. Portanto, é necessário realizar o *flush and fill* antes de colocar a amostra no frasco, para evitar que o CO₂ atmosférico presente no frasco de análise contamine a amostra.

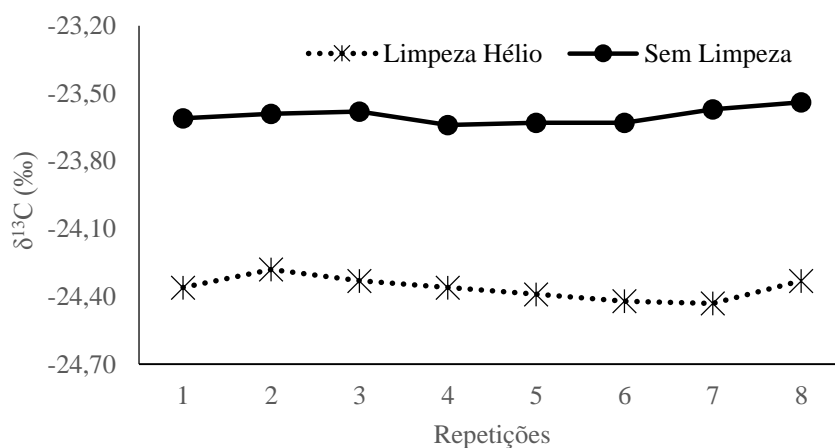


Figura 6: Valores encontrados quando realiza-se *flush and fill* para limpeza do frasco com He, previamente à adição da amostra, comparados à quando a limpeza não é realizada.

A amostra manteve-se estável durante os 62 dias testados, desde que mantida em frasco vedado e refrigerada, apresentou um valor médio de $-24,4 \pm 0,10\%$, sendo que o desvio padrão do espectrômetro de massa de razão isotópica é considerado $0,20\%$.

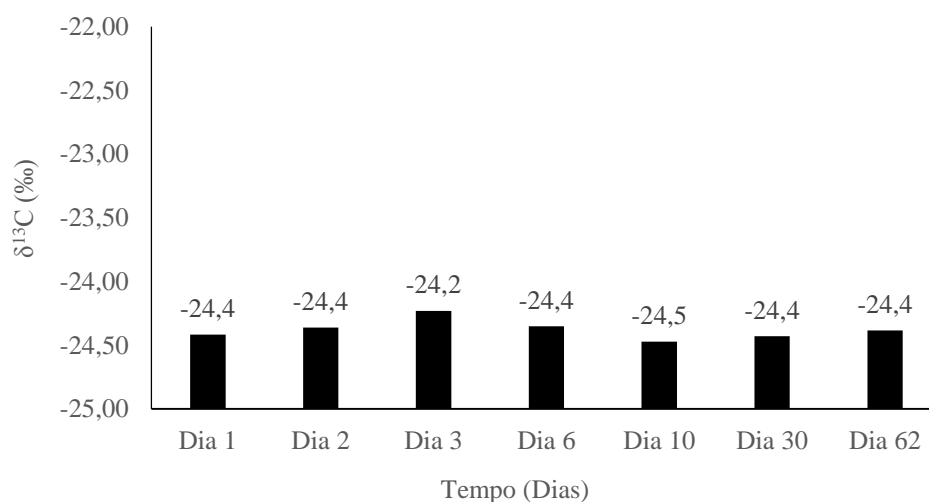


Figura 7: Estabilidade da amostra avaliada até 62 dias após aberta.

Variações de 5°C na temperatura da coluna cromatográfica, definida no método como sendo 70°C , não interferem significativamente nos resultados. Contudo, na temperatura de 65°C ocorre uma variação entre os resultados, com um desvio padrão de $0,25\%$, o que demonstra uma instabilidade na amostra. Na temperatura de 75°C o desvio padrão encontrado entre os resultados foi de $0,05\%$, apresentando maior estabilidade.

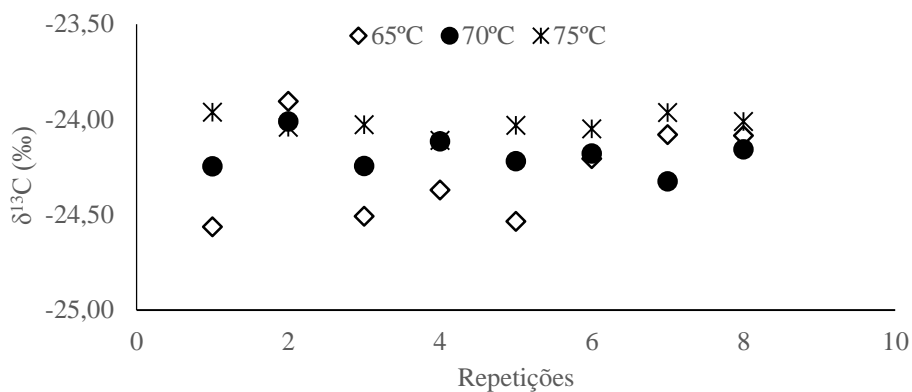


Figura 8: Temperatura da coluna cromatográfica avaliada em 65 °C, 70 °C e 75 °C.

7.2.4 Incerteza de Medição

A incerteza de medição do método, para determinação do CO₂ em vinhos e espumantes, considerando todas as possíveis interferências, foi de 0,40‰.

7.2.5 Espumantes Comerciais – Tabela Completa

Tabela 2: Resultados do δ¹³C do CO₂ e do etanol para os espumantes comerciais. (continua)

País de Origem	n	Método	δ ¹³ C CO ₂	δ ¹³ C Etanol
Brasil	1	Tradicional	-10,7	-26,4
Brasil	2	Tradicional	-10,5	-24,1
Brasil	3	Tradicional	-9,6	-25,3
Brasil	4	Tradicional	-11,4	-25,2
Brasil	5	Tradicional	-12,1	-26,7
Brasil	6	Tradicional	-12,2	-26,6
Brasil	7	Tradicional	-13,4	-26,6
Brasil	8	Tradicional	-12,3	-26,4
Brasil	9	Tradicional	-10,9	-25,4
Brasil	10	Tradicional	-12,8	-26,0
Brasil	11	Tradicional	-11,4	-26,5
Brasil	12	Tradicional	-11,7	-26,6
Brasil	13	Tradicional	-9,7	-26,3
Brasil	14	Tradicional	-13,1	-25,9
Brasil	15	Charmat	-22,3	-24,5
Brasil	16	Charmat	-13,2	-23,5

(conclusão)

País de Origem	n	Método	$\delta^{13}\text{C CO}_2$	$\delta^{13}\text{C Etanol}$
Brasil	17	Charmat	-16,1	-24,3
Brasil	18	Charmat	-30,8	-26,2
Brasil	19	Charmat	-21,2	-24,9
Brasil	20	Charmat	-10,4	-24,1
Brasil	21	Charmat	-13,9	-23,0
Brasil	22	Charmat	-10,5	-23,7
Brasil	23	Charmat	-19,4	-27,3
Brasil	24	Charmat	-19,6	-26,9
Brasil	25	Charmat	-11,5	-25,7
Brasil	26	Charmat	-18,1	-24,1
Brasil	27	Charmat	-12,6	-24,1
Brasil	28	Moscatel	-20,4	-23,9
Brasil	29	Moscatel	-24,6	-26,1
Brasil	30	Moscatel	-19,5	-22,6
Brasil	31	Moscatel	-18,1	-21,9
Brasil	32	Moscatel	-16,9	-22,5
Brasil	33	Moscatel	-20,2	-22,5
Brasil	34	Moscatel	-25,7	-25,8
Brasil	35	Moscatel	-20,7	-24,3
Brasil	36	Moscatel	-19,1	-24,3
Brasil	37	Moscatel	-22,1	-25,9
Brasil	38	Moscatel	-21,9	-25,8
Brasil	39	Moscatel	-25,8	-26,0
Brasil	40	Moscatel	-24,7	-26,3
Brasil	41	Moscatel	-25,7	-25,9
Argentina	42	Tradicional	-11,2	-26,1
Argentina	43	Tradicional	-12,2	-25,9
Argentina	44	Tradicional	-9,7	-25,7
Argentina	45	Tradicional	-10,9	-25,9
Argentina	46	Tradicional	-11,2	-25,7
Argentina	47	Charmat	-16,4	-25,5
Argentina	48	Charmat	-11,8	-26,3
Argentina	49	Charmat	-17,7	-25,6
Argentina	50	Charmat	-9,7	-25,7
Argentina	51	Charmat	-9,9	-25,9
Argentina	52	Charmat	-11,0	-24,7
Argentina	53	Charmat	-11,5	-26,0
Chile	54	Tradicional	-11,8	-25,4
Chile	55	Tradicional	-23,3	-25,4
Chile	56	Tradicional	-19,6	-27,0
Chile	57	Charmat	-24,4	-28,0
Chile	58	Charmat	-45,6	-27,9
Chile	59	Charmat	-23,2	-24,2