



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DETERMINAÇÃO DE ÁGUA EXÓGENA EM SUCO DE UVA
ATRAVÉS DA RAZÃO ISOTÓPICA DO $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$**

MIRELLA MALLMANN KERCHER

CAXIAS DO SUL

2019

MIRELLA MALLMANN KERCHER

**DETERMINAÇÃO DE ÁGUA EXÓGENA EM SUCO DE UVA
ATRAVÉS DA RAZÃO ISOTÓPICA DO $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$**

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: Prof.^a Dr.^a Regina Vanderlinde

CAXIAS DO SUL

2019

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

K39d Kercher, Mirella Mallmann

Determinação de água exógena em suco de uva através da razão isotópica do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ / Mirella Mallmann Kercher. – 2019.
80, [9] f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Regina Vanderlinde.

1. Suco de uva. 2. Isótopos. 3. Biotecnologia. I. Vanderlinde, Regina, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 634.8.077

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

MIRELLA MALLMANN KERCHER

**DETERMINAÇÃO DE ÁGUA EXÓGENA EM SUCO DE UVA ATRAVÉS DA
RAZÃO ISOTÓPICA DO $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$**

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: Prof^a. Dr^a. Regina Vanderlinde

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 06 DE DEZEMBRO DE 2019.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Regina Vanderlinde

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva (UCS)

Prof. Dr. Vitor Manfroi (UFRGS)

Prof. Dr. Giuliano Elias Pereira (Embrapa Uva e Vinho)

*Dedico este trabalho à minha querida mãe Elmi.
Obrigada pelo apoio incondicional e por sempre acreditar em mim.
Obrigada por tudo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Regina Vanderlinde, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, e, principalmente, por me apresentar à esse maravilhoso e apaixonante mundo da uva e do vinho. Minha eterna gratidão e admiração!

À Susiane Leonardelli por ter me ensinado tudo sobre esse mundo à parte dos isótopos e IRMS. Susi, obrigada pela paciência, confiança e exemplo. Meus sinceros agradecimentos por toda ajuda e ideias agregadoras na elaboração deste trabalho. Te admiro muito!

Aos professores que fizeram parte da banca de acompanhamento, Prof.^a Dr.^a Miriam Salvador e Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva; e da banca final, Prof. Dr. Vitor Manfroi (UFRGS) e Prof. Dr. Giuliano Elias Pereira (Embrapa Uva e Vinho).

Ao Laboratório de Referência Enológica (LAREN) pela oportunidade da realização desta pesquisa. Aos colegas e estagiários, as “antigas safras” e a “nova safra” e a todos que passaram por lá. Obrigada pelo auxílio, incentivo e ótima convivência, que foram essenciais para a realização deste trabalho. Agora vai pessoal!

Grata aos meus colegas do LAREN, Gilberto Cargnel e Fernanda Spinelli, e à Sandra Valduga Dutra pela revisão e sugestões ao trabalho, e principalmente, pelos ensinamentos sobre enologia!

Agradeço ao Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN), a Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande Sul (SEAPDR) e a Plínio Manosso, pela disponibilidade dos equipamentos, materiais, instalações e auxílio na coleta das amostras. Grata também aos produtores que forneceram as amostras de uvas utilizadas neste trabalho.

Meu agradecimento à Universidade de Caxias do Sul (UCS), à Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à Lucimara Serafini Rech pela atenção e prestatividade.

Gratidão àqueles que sempre torceram pelas minhas conquistas: meu pai Ivo e a minha irmã Nalu!

Finalmente, e acima de tudo, agradeço a minha mãe Elmi, minha primeira professora, quem me ensinou a importância dos estudos! Graças a seus esforços pude chegar até aqui. Obrigada por sempre acreditar em mim e por ser meu maior exemplo. Espero que fique orgulhosa. Obrigada por tudo!

“O preço de qualquer coisa é a quantidade de vida que você troca por isso.”

(Henry David Thoreau)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 HISTÓRIA DA VITICULTURA NO BRASIL	14
3.2 SUCO DE UVA.....	16
3.2.1 Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) para suco de uva	17
3.3 VARIEDADES UTILIZADAS NA ELABORAÇÃO DE SUCO DE UVA.....	18
3.3.1 Isabel	19
3.3.2 Bordô.....	20
3.3.3 Niágara Branca	21
3.3.4 Concord	21
3.4 ELABORAÇÃO DE SUCO DE UVA.....	22
3.4.1 Recepção, desengace e esmagamento.....	23
3.4.2 Maceração e tratamento térmico	23
3.4.3 Tratamento enzimático	24
3.4.4 Esgotamento, prensagem e centrifugação	25
3.4.5 Clarificação, filtração e corte do suco.....	25
3.4.6 Pasteurização e engarrafamento	25
3.5 ISÓTOPOS ESTÁVEIS	26
3.5.1 Fracionamento isotópico do oxigênio.....	27
3.5.2 Espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS).....	28
3.5.3 Espectrômetro de massas de razão isotópica	28
3.5.4 Notação delta (δ).....	30
3.5.5 Valores de referência isotópicos	31
3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	31
3.6.1 Seletividade.....	31
3.6.2 Linearidade	32
3.6.3 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	32
3.6.4 Tendência	33
3.6.5 Recuperação	33
3.6.6 Exatidão.....	34
3.6.7 Precisão.....	34
3.6.7.1 Repetibilidade	35
3.6.7.2 Reprodutibilidade	35

3.6.7.3 Precisão intermediária	36
3.6.8 Robustez	36
3.6.9 Incerteza de medição	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 REAGENTES E PADRÕES	37
4.2 AMOSTRAS	37
4.2.1 Amostras para sucos experimentais.....	37
4.2.2 Amostras para avaliar a influência do processo de elaboração de sucos industriais nos valores isotópicos.....	37
4.2.3 Amostras para elaboração de valores de referência isotópicos.....	37
4.2.4 Amostras de sucos reais	38
4.3 EXPERIMENTOS.....	38
4.3.1 Avaliação do efeito da temperatura e da evaporação no processo de elaboração de sucos	38
4.3.2 Avaliação da influência do processo de elaboração de sucos industriais nos valores isotópicos.....	38
4.3.3 Valores de referência isotópicos	39
4.3.4 Avaliação isotópica de sucos comerciais	39
4.3.5 Determinação da razão isotópica do oxigênio por IRMS	39
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	40
4.4.1 Seletividade.....	40
4.4.2 Linearidade	40
4.4.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	40
4.4.4 Tendência	41
4.4.5 Recuperação	41
4.4.6 Exatidão.....	41
4.4.7 Repetibilidade	41
4.4.8 Reprodutibilidade.....	41
4.4.9 Precisão intermediária	41
4.4.10 Robustez	42
4.4.11 Incerteza de medição	42
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES GERAIS	71
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1 - Limites analíticos estabelecidos para suco de uva	17
Tabela 2 - Abundância dos isótopos estáveis.....	26
Tabela 3 - Critérios de aceitação para recuperação do analito	33
Tabela 4 - Critérios de aceitação para precisão do analito.....	35

LISTA DE TABELAS DA PUBLICAÇÃO

Tabela 1 - Resultados da validação do método para determinação de água em suco de uva.....	53
Tabela 2 - Valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ das amostras submetidas a diferentes temperaturas durante o tempo de 15 e 30 min, expressos em ‰.....	57
Tabela 3 - Valores de $\delta^{18}\text{O}$ das amostras submetidas a aquecimento com as tampas fechadas (TF) e abertas (TA) em diferentes temperaturas durante 15 e 30 min, expressos em ‰.....	60
Tabela 4 - Valores de referência de $\delta^{18}\text{O}$ para mostos e sucos separados em uvas tintas e brancas.....	62
Tabela 5 - Valores de referência de $\delta^{18}\text{O}$ para mostos de uvas Bordô, Isabel, Concord e Niágara Branca	63
Tabela 6 - Valores de $\delta^{18}\text{O}$ de sucos reais comparados com valores da referência de mostos uvas <i>Vitis labrusca</i>	64

LISTA DE QUADRO DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1 - Classificações do suco de uva	16
--	----

LISTA DE FLUXOGRAMA DA DISSERTAÇÃO

Fluxograma 1 - Etapas de elaboração de suco de uva pelo sistema trocador de calor	23
--	----

LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Uva Isabel.	19
Figura 2 - Uva Bordô.	20
Figura 3 - Uva Niágara Branca.....	21
Figura 4 - Uva Concord.....	22
Figura 5 - Sistema tubular trocador de calor	24
Figura 6 - Esquema de um espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS).....	29
Figura 7 - Esquema de um cromatógrafo a gás (GasBench) acoplado a um IRMS..	30

LISTA DE FIGURAS DA PUBLICAÇÃO

Figura 1 - Amostras aquecidas em banho maria.....	48
Figura 2 - Representação da linearidade do método em suco de uva adicionado de água.....	54
Figura 3 - Representação gráfica dos resíduos relacionados com a concentração de água adicionada a um suco de uva tinto integral.....	55
Figura 4 - Resultados do teste de variação da temperatura do bloco do amostrador automático.....	56
Figura 5 - Regressão linear entre mostos e sucos de amostras industriais.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta^{18}\text{O}$	Razão isotópica do oxigênio
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
EA	Analizador elementar
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GC	Cromatógrafo gasoso
GISP	Greenland Ice Sheet Precipitation
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
IBRAVIN	Instituto Brasileiro do Vinho
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IRMS	Espectrometria de massa de razão isotópica
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
m/z	Razão massa/carga
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
PIQs	Padrões de Identidade e Qualidade
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho
SLAP	Standard Light Antarctic Precipitation
VSMOW	Vienna Standard Mean Ocean Water
z-score	Valores de avaliação de resultados interlaboratoriais

RESUMO

O consumo do suco de uva vem crescendo significativamente devido às suas características sensoriais e compostos bioativos. Cada vez mais, a qualidade do suco torna-se uma questão de grande importância, tanto para o consumidor como para a indústria. Então, prevenir a fraude em sucos de uva é um grande desafio e requer um processo analítico confiável. No Brasil, não existe metodologia para determinação de água exógena em suco de uva. Neste trabalho, foi validada e estabelecida uma metodologia para detecção de água exógena em suco de uva através da razão isotópica do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Para avaliar o efeito da temperatura e da evaporação nos valores de $\delta^{18}\text{O}$, foram preparados sucos experimentais a partir de uvas das variedades Bordô, Isabel, Concord e Niágara Branca, e aquecidos em banho maria nas temperaturas de 50°C, 80°C, 90°C e 95°C, durante 15 e 30 min. Os valores isotópicos encontrados apresentaram diferenças inferiores à incerteza do método, demonstrando que tanto a temperatura quanto a evaporação não influenciaram os resultados do $\delta^{18}\text{O}$ do suco. Para avaliar a influência do processo de elaboração do suco nos valores isotópicos, foram comparados cinco mostos e cinco sucos da variedade Isabel, processados em indústria pelo sistema trocador de calor. O mosto que entrou no trocador deu origem ao suco final. A correlação entre mosto inicial e suco final ($R^2=0,96$), mostrou que o processo do sistema trocador de calor não interferiu significativamente nos resultados. A equação de reta encontrada ($y= 0,90x + 0,13$), foi utilizada para construir os valores de referência dos sucos autênticos a partir dos mostos. Para compor os valores de referência isotópicos, foram coletadas 177 uvas *Vitis labrusca* (159 uvas tintas e 18 uvas brancas) de várias regiões do estado do Rio Grande do Sul. Utilizou-se a média ponderada para o cálculo. Foi possível concluir que os valores de referência para suco podem ser provenientes dos mostos, sem prejudicar a interpretação dos resultados finais. Finalmente, foram analisados sucos de uva reais, quanto à presença ou ausência de água. Dos trinta sucos reais analisados, oito apresentaram água exógena em sua composição, três demonstraram serem sucos reconstituídos e dezenove sucos foram considerados com ausência de água exógena, quando comparados aos valores de referência relacionados ao tipo de uva ou variedade específica. A metodologia proposta e validada neste estudo encontrou valores para o LOD de 0,24‰, LOQ de 0,97‰ e incerteza de medição de 0,71‰, mostrando-se eficaz para detecção de água exógena em suco de uva através da análise da razão isotópica do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$.

Palavras-chave: suco de uva, água exógena, isótopos, adulteração.

ABSTRACT

The consumption of grape juice has been growing significantly due to its sensory characteristics and bioactive compounds. The quality of the juice is becoming a major issue for both the consumer and the industry. So preventing fraud in grape juices is a big challenge and requires a reliable analytical process. There is no methodology for detecting exogenous water in grape juice in Brazil. A methodology for the detection of exogenous water in grape juice through the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotopic ratio was validated and established in this study. To evaluate the effect of temperature and evaporation on $\delta^{18}\text{O}$ values, experimental juices were prepared from Ives, Isabella, Concord and White Niagara grapes and heated in a water bath at 50°C, 80°C, 90°C and 95°C for 15 and 30 min. The isotopic values found showed differences below the method uncertainty, demonstrating that both temperature and evaporation did not influence the $\delta^{18}\text{O}$ results of the juice. To evaluate the influence of the juice elaboration process on the isotopic values, five musts and five Isabella juices were compared, processed in industry by the heat exchanger method. The must used in the heat exchanger was the same as the final juice. The correlation between initial must and final juice ($R^2 = 0.96$) showed that the heat exchanger process did not significantly affect the results. The equation found ($y = 0.90x + 0.13$) was used to construct the reference values of authentic juices from musts. To compose the isotopic reference values, 177 *Vitis labrusca* grapes (159 red grapes and 18 white grapes) were collected from many different regions of the state of Rio Grande do Sul. The weighted average was used for the calculation. It was concluded that the reference values for juice can be used from musts, without impairing the interpretation of the final results. Finally, real grape juices were analyzed to evaluate the presence or absence of water. From thirty real juices analyzed, eight presented exogenous water in their composition, three proved to be reconstituted juices and nineteen juices were considered to be without exogenous water, when compared to the reference values related to the type of grape or specific variety. The methodology proposed and validated in this study was found values for LD of 0.24‰, LQ of 0.97‰ and measurement uncertainty of 0.71‰, showing-be effective for detecting exogenous water in grape juice by analyzing the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotopic ratio.

Keywords: grape juice, exogenous water, isotopes, adulteration.

1. INTRODUÇÃO

O suco de uva é uma bebida não fermentada, elaborada principalmente a partir de uvas *Vitis labrusca* das variedades Isabel, Bordô, Concord e Niágara Branca no Rio Grande do Sul. O consumo do suco de uva vem crescendo significativamente, tanto por suas características sensoriais muito apreciadas como por suas propriedades funcionais. Outro aspecto importante do suco é permitir que pessoas que não ingerem álcool, mulheres grávidas, idosos e crianças consumam a bebida.

A região Sul do Brasil é responsável por 90% da elaboração de sucos de uva no país. Segundo dados da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR, 2019), a produção de sucos integrais, adoçados e reconstituídos cresceu 48% de 2018 para 2019. Além disso, entre 2008 e 2018, o volume de suco comercializado passou de 123 milhões para 282 milhões de litros anuais, o que representa crescimento de 128% no período. Nos supermercados, o suco de uva representa 30% de todo o faturamento de sucos líquidos, onde os mais vendidos são os naturais e integrais, com 100 milhões de litros comercializados anualmente (IBRAVIN, 2019).

O monitoramento da qualidade dos sucos de frutas é de crescente interesse tanto para a indústria de bebidas quanto para o consumidor. Nos últimos anos, a medição de isótopos estáveis tem sido utilizada como um instrumento para a determinação de fraudes em alimentos e bebidas, pois fornece informações sobre a origem botânica e geográfica dos mesmos. O controle da origem das matérias-primas utilizadas na produção de alimentos e bebidas é fundamental, a fim de garantir a qualidade e autenticidade desses produtos.

As análises isotópicas têm sido propostas pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho para detectar a adição de água (OIV, 1996) e açúcar (OIV, 2001) em vinhos e derivados. No Brasil, a análise isotópica em sucos de uva tem sido utilizada desde 2007 para determinar a porcentagem de açúcar natural da uva e açúcar da cana-de-açúcar possivelmente adicionado ao suco de uva (BRASIL, 2007). Porém, ainda não existe uma metodologia oficial para detecção de água exógena em suco de uva no Brasil, o que representa uma demanda do setor vitivinícola no intuito de melhorar a qualidade dos sucos e evitar possíveis adulterações. A presença de água no suco não acarreta problemas à saúde, no entanto, se não é declarada, constitui uma fraude ao consumidor, uma vez que o suco tem importante papel econômico e social.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia para detecção de água exógena em sucos de uva integrais através da análise da razão isotópica do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da temperatura na razão isotópica do oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) em sucos experimentais;
- Avaliar o efeito da evaporação no valor de $\delta^{18}\text{O}$ em sucos experimentais;
- Verificar a influência, nos valores de $\delta^{18}\text{O}$, do processo de elaboração de suco de uva em escala industrial;
- Encontrar os valores de referência para sucos de uva, baseado no $\delta^{18}\text{O}$ de mostos;
- Validar o método de determinação de adição de água exógena em suco de uva para uso na rotina de laboratório,
- Avaliar a aplicação da metodologia em amostras reais de sucos e compará-los aos valores de referência, para verificar a adição de água.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRIA DA VITICULTURA NO BRASIL

A uva é o fruto da videira ou vinha, pertencente à família *Vitaceae*, e as suas principais cultivares comerciais são do gênero *Vitis spp.* Estudos apontam que a videira já crescia de modo espontâneo há 13.000 anos, sendo originária da Ásia. Há registros de cultivo de vinhedos com 150 anos de idade devido ao abandono da vida nômade pelas comunidades das civilizações primitivas. A difusão da viticultura pelo mundo ocorreu em duas direções: uma américo-asiática e a outra euroasiática, dando origem as variedades de uvas chamadas americanas (*Vitis labrusca*) e europeias (*Vitis vinifera*) (EPAGRI, 2005).

No Brasil, a viticultura teve início no século XVI com a chegada de colonizadores portugueses à Capitania de São Vicente (atual Estado de São Paulo), e depois expandiu-se para outras regiões do país (Zapelini, 2010). No entanto, os vinhedos cultivados em São Paulo

foram deixados de lado com as descobertas de ouro em Minas Gerais, pois era mais fácil pagar pelo vinho importado do que produzi-lo (Cabral, 2004).

No século XVII, ainda no Brasil Colônia, a videira de origem espanhola foi introduzida no Rio Grande do Sul. Em 1626, o padre jesuíta espanhol Roque Gonzáles de Santa Cruz plantou as primeiras videiras na região dos Sete Povos das Missões. O cultivo de uva prosperou, mas não chegou a criar uma identidade local, pois as Missões foram dizimadas pela coroa portuguesa e os sobreviventes não deram continuidade à viticultura. Uma segunda tentativa ocorreu no século XVIII, com a imigração açoriana no litoral gaúcho. Entretanto, as vinhas não se desenvolveram devido às condições de baixa altitude e umidade excessiva da região (Dalcin, 2008; Valduga, 2007; Zapelini, 2010).

Nas primeiras décadas do século XIX, foram introduzidas no Brasil as uvas americanas (*V. labrusca*), especialmente a variedade Isabel, através do gaúcho Marques Lisboa (diplomata brasileiro em Washigton nos EUA), e do comerciante alemão Thomas Messiter (Aguiar, 2008). A partir da introdução e do plantio das variedades de uvas americanas ocorre definitivamente a difusão da vitivinicultura no Brasil, pois esta espécie era resistente às condições climáticas do país e adaptou-se facilmente em diferentes regiões (Losso, 2016).

A viticultura no Brasil ficaria restrita a pequenas áreas até 1875 (séculos XIX), quando ocorre a chegada de imigrantes italianos, provenientes do norte da Itália, na região da Serra Gaúcha. Os imigrantes tinham experiência e tradição no cultivo da vinha e na produção de vinho, tornando-se, desta forma, um elemento fundamental para o estabelecimento do comércio do vinho no país. Este é considerado o marco inicial da vitivinicultura brasileira (Facalde, 2011; Cordeiro, 2006; Losso, 2016).

Centrada no RS, a indústria do vinho nacional assumiu historicamente a liderança da produção e abastecimento da demanda do mercado interno brasileiro. A partir da década de 70, ocorreu investimentos e modernização das vinícolas, onde no mesmo período, a indústria de suco começou a se destacar pela qualidade e singularidade do produto. Atualmente, as empresas que elaboram suco de uva apresentam uma estrutura moderna e com alta tecnologia, evidenciando o potencial de expansão deste mercado e a tendência de diversificação dentro da cadeia vitivinícola (Protas *et al.*, 2014).

3.2 SUCO DE UVA

Os primeiros registros da produção de suco de uva no Brasil datam do início do século XX. No ano de 1911, o estabelecimento Oreste Franzoni & Cia, localizado no atual município de Monte Belo do Sul, foi premiado em Turim, na Itália com o “*Succo de Uvas Franzoni*” (Marzarotto, 2005). No entanto, a indústria brasileira de suco de uva cresceu consideravelmente a partir do final da década de 1970, com o início da produção de suco concentrado no RS (Cristofoli, 2007).

De acordo com a legislação brasileira, o suco de uva é uma bebida não fermentada e não diluída, obtida do mosto simples, sulfitado ou concentrado a partir da parte comestível da uva sã, fresca e madura, através de processo tecnológico adequado, sendo tolerada a graduação alcoólica de até 0,5% v/v (BRASIL, 2014; BRASIL, 2018).

As principais classificações do suco quanto ao processamento e constituição estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Classificações do suco de uva

Tipo de suco de uva	Definição
Suco integral³	Suco na concentração natural da uva, sendo proibida adição de açúcares, água, corantes ou aromas.
Suco desidratado³	Suco no estado sólido, obtido pela desidratação do suco integral, devendo ser denominado “suco de uva desidratado”, sendo proibida adição de açúcares.
Suco concentrado³	Suco submetido a processo físico para a retirada de água suficiente para elevar em, no mínimo, 50% o teor de sólidos solúveis presentes no suco integral, sendo proibida adição de açúcares.
Suco reconstituído³	Obtido pela diluição do suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao teor de sólidos solúveis mínimo do suco de uva integral (14 °Brix), sendo obrigatório constar no rótulo a origem do suco utilizado para sua elaboração e opcional o uso da expressão “reconstituído”.
Suco reconstituído adoçado³	Permitida adição de açúcar na quantidade máxima de um décimo em peso (10%) dos açúcares do mosto, tendo sua denominação acrescida pela designação “adoçado”.

Néctar ^{1,2}	Bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável, da parte comestível da uva ou de seu extrato, adicionado de açúcares, destinada ao consumo direto, sendo obrigatório conter no mínimo 50% de polpa ou suco de uva.
Bebida ou refresco ¹	Bebida não fermentada, obtida pela diluição, em água potável, do suco, polpa ou extrato de uva, com ou sem adição de açúcares. Quando adicionado de açúcares, deverá ter a designação “adoçado” acrescida à sua denominação.
Refrigerante ¹	Bebida gaseificada, obtida pela dissolução, em água potável, do suco ou extrato de uva, adicionada de açúcares e conservantes. É obrigatório ser saturado de dióxido de carbono industrialmente puro.

Fonte: ¹BRASIL, 2009; ²BRASIL, 2013; ³BRASIL, 2018.

A comercialização do suco de uva vem crescendo de forma constante desde 2004, sendo o ano de 2016 o único período de retração, onde a quebra na safra da uva reduziu a capacidade produtiva das vinícolas. Enquanto o suco concentrado é destinado principalmente para a indústria, a versão integral é a preferência do consumidor (IBRAVIN, 2018). Outro fator que vem se destacando são as versões do suco: tinto, branco e *rosé*, além da versatilidade das embalagens, como caixinhas prontas para o consumo, garrafas de vidro e *bag in box* (IBRAVIN, 2019).

3.2.1 Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs) para suco de uva

A composição do suco deverá atender aos limites indicados nos Padrões de Identidade e Qualidade de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Limites analíticos estabelecidos para suco de uva

Parâmetro	Limite	
	Mínimo	Máximo
Álcool etílico a 20°C (% v/v) ³	-	< 0,5
Anidrido sulfuroso total (g.L ⁻¹) ¹	-	0,05
Sólidos solúveis, °Brix a 20°C ³	14	-
Acidez total (mEq/L), (pH 8,2) ³	55	-
Acidez volátil (mEq/L) ³	-	10
Ácido sórbico (mg.L ⁻¹) ¹	-	1.000
Ácido benzóico (mg.L ⁻¹) ¹	-	1.000

Soma do ácido sórbico e benzoico (mg.L ⁻¹) ¹	-	1.000
Carbono (%C ₃) – Integral ou Simples ²	100	-
Carbono (%C ₃) – Adoçado ²	90	-

Fonte: ¹ANVISA, 2013; ²BRASIL, 2014; ³BRASIL, 2018.

Os limites analíticos, além de representarem uma exigência legal, são fundamentais para o controle de qualidade e para detecção de eventuais falhas que podem ocorrer em toda a cadeia produtiva do suco de uva (Rizzon & Salvador, 2010).

As uvas utilizadas para elaboração do suco devem alcançar um estágio ideal de maturação, por isso, a legislação estabelece um teor mínimo de sólidos solúveis para o suco de uva de 14 °Brix (BRASIL, 2018). O °Brix representa a porcentagem de sólidos solúveis totais no suco, incluindo açúcares, ácidos orgânicos, matéria corante, minerais e substâncias nitrogenadas (Rizzon & Salvador, 2010).

A qualidade das uvas e consequentemente dos sucos, dependerá de muitos fatores tais como: composição do solo, grau de maturação das bagas, estresse hídrico, exposição à luz solar, patogênese, sistema de produção, método de prensagem, variações climáticas, entre outros (Granato *et al.*, 2016).

3.3 VARIEDADES UTILIZADAS NA ELABORAÇÃO DE SUCO DE UVA

As cultivares tradicionalmente utilizadas para produção de sucos de uva, no RS, compreendem as uvas americanas *V. labrusca* das variedades Isabel, Bordô, Niágara Branca e Concord. Essas uvas são denominadas "uvas rústicas" ou "uvas de mesa" e apresentam elevada produtividade e resistência às doenças fúngicas. Além disso, cada variedade confere características próprias ao suco as quais complementam-se entre si, originando um produto final de reconhecida qualidade e tipicidade (Protas & Camargo, 2011).

As variedades destinadas à produção de uvas para suco devem apresentar algumas características principais, como adequado nível de maturação e sanidade, bom rendimento do mosto, relação açúcar e acidez equilibrada e aroma e sabor agradáveis (Marzarotto, 2005). Alguns países de tradição vitícola utilizam variedades *V. vinifera* para produção de suco, porém o mesmo apresenta um sabor não muito apreciado pelo consumidor após o processamento, enquanto que as variedades americanas mantêm no suco o aroma “foxado”, característico da uva *in natura*, mesmo após aquecimento e pasteurização (Rizzon & Meneguzzo, 2007).

No estudo de Bender *et al.* (2016), foi avaliado o perfil de aceitação sensorial de sucos tintos e brancos elaborados a partir das variedades de uvas Isabel, Bordô e Niágara Branca (*V. labrusca*), Chardonnay (*V. vinifera*) e Jacquez (*V. bourquina*). Os sucos das variedades *V. labrusca* obtiveram melhor aceitação sensorial que as variedades *V. vinifera* e *V. bourquina*, sendo que o suco de Isabel e Niágara Branca, seguido por Bordô, obtiveram as melhores notas em todos os atributos avaliados. O suco elaborado por Chardonnay foi rejeitado em todas as variáveis analisadas. O suco de Jacquez também foi rejeitado, exceto a sua aparência visual.

Nos últimos anos, foram desenvolvidas pela Embrapa Uva e Vinho, novas cultivares híbridas de uvas para elaboração de suco. Entre elas se destacam as variedades “BRS Cora”, “BRS Violeta”, “BRS Lorena” e “Isabel precoce”. A Isabel precoce é uma mutação da cultivar Isabel e apresenta as mesmas características desta uva, porém o período de maturação é bastante antecipado se comparado com o da uva Isabel (Camargo *et al.*, 2010). Essas novas variedades vêm contribuindo para o aprimoramento tecnológico, expansão da produção e competitividade do suco de uva brasileiro (Maia & Ritschel, 2015).

3.3.1 Isabel

A variedade Isabel (Figura 1), é originária dos Estados Unidos (EUA) e foi introduzida no Brasil na década de 1830, tornando-se a uva tinta mais cultivada no país. Representa 50% do total de uvas produzidas no RS, sendo muito bem adaptada as condições climáticas. Seus vinhedos atingem de 80 a 100 anos e fornecem produções abundantes necessitando de poucas intervenções (Camargo & Maia, 2005).



Figura 1 - Uva Isabel
Fonte: Embrapa (2016a).

A uva Isabel também é denominada “Americana”, “Uva Manga” e “Nacional”, além de “Frutilla” no Uruguai e “Isabela” ou “Fragola” na Itália (Rizzon *et al.*, 1998). Apresenta cachos pequenos a médios, baga preta média, polpa mucilaginosa que se desprende facilmente da película e sabor de framboesa (Camargo, 2008).

Entre as uvas americanas, essa variedade possui baixa acidez e elevado potencial de acúmulo de açúcar na baga, podendo variar em função das safras, entre 14 a 18 °Brix (Rizzon & Meneguzzo, 2007). No entanto, a uva Isabel produz sucos com menor intensidade aromática e de cor, sendo indicado corte com as variedades Bordô e Concord. O suco de Isabel é o principal suco de uva brasileiro para exportação (Camargo *et al.*, 2010).

3.3.2 Bordô

A variedade Bordô (Figura 2), é originária dos EUA e faz referência a Henry Yves, pesquisador que selecionou a variedade. É uma das principais uvas *V. labrusca* produzidas nacionalmente. Foi introduzida no RS em 1839 com o nome de “Ives” ou “Folha de Figo”, e expandiu-se rapidamente devido a fácil adaptação e alta produtividade (Rizzon *et al.*, 1998).

É uma cultivar muito rústica e resistente a doenças fúngicas. Seus cachos são pequenos ou médios, com bagas e sementes pequenas e polpa mucilaginosa (Camargo, 2008). O teor de açúcar do mosto varia de 13 a 16 °Brix e a acidez total é considerada baixa (Rizzon & Meneguzzo, 2007). Sucos de uva Bordô apresentam aroma frutado, sendo geralmente utilizadas em cortes com cultivares como Isabel e Concord, permitindo assim, aumentar a intensidade de cor destes sucos (Barnabé *et al.*, 2007; Rizzon & Meneguzzo, 2007).



Figura 2 - Uva Bordô
Fonte: Embrapa (2008).

3.3.3 Niágara Branca

A variedade Niágara (Figura 3), foi desenvolvida em 1868, no condado de Niágara (Nova Iorque - EUA), a partir do cruzamento de Concord (*V. labrusca*) com Cassady (*V. labrusca* x *V. vinifera*). Então, a Niágara, tem em sua genealogia, 75% de *V. labrusca* e 25% de *V. vinifera*, uma provável razão por não ser tão resistente às doenças fúngicas (Maia & Camargo, 2012).

Também denominada “Francesa Branca”, a uva Niágara Branca foi introduzida no Brasil em 1894. Apresenta polpa mucilaginosa, sabor de framboesa intenso, teor de sólidos solúveis entre 16 e 18 °Brix. Origina sucos com aroma e sabor intensos, sendo considerada a principal casta americana branca cultivada no Brasil (Camargo, 2008).



Figura 3 - Uva Niágara Branca
Fonte: Embrapa (2016b).

3.3.4 Concord

Desenvolvida nos EUA em 1849, a variedade Concord (Figura 4), foi introduzida no RS, em meados do século XIX. É também conhecida como “Bergerac”, “Francesa” e “Francesa Preta”, compreende uvas americanas rústicas, de alta produtividade e resistência a doenças fúngicas (Rizzon *et al.*, 1998; Pian *et al.*, 2009).



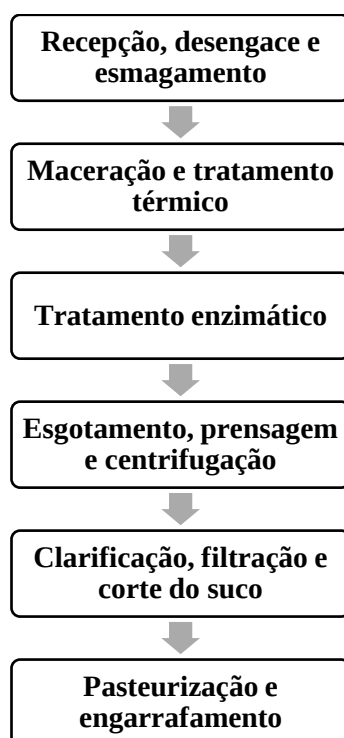
Figura 4 - Uva Concord
Fonte: Embrapa (2016c).

Apresenta maturação precoce e alta produtividade, com cachos médios e bagas médias e película fina bastante suscetível em condições chuvosas na fase de maturação. O teor de sólidos solúveis varia de 14 a 16 °Brix e a acidez é relativamente baixa. A cultivar Concord dá origem a sucos com características aromáticas muito bem aceitas, pois mantém as características da uva fresca ao longo das etapas de processamento (Camargo, 2008; Rizzon & Meneguzzo, 2007).

3.4 ELABORAÇÃO DE SUCO DE UVA

O processo de elaboração do suco de uva está diretamente ligado à qualidade final dos produtos, exercendo influência sobre as principais características, que são o sabor e o aroma. Neste contexto, o sistema trocador de calor é o método mais utilizado para a elaboração de suco de uva integral em escala industrial (Guerra *et al.*, 2016). Este sistema está detalhado no Fluxograma 1.

Fluxograma 1 - Etapas de elaboração de suco de uva pelo sistema trocador de calor



3.4.1 Recepção, desengace e esmagamento

As uvas normalmente são colhidas em fase de maturidade técnica (14 a 25 °Brix) e devem ser processadas dentro de 48 horas após a colheita, para evitar a deterioração por bactérias e fungos, ou ainda, produção de álcool etílico através de processo fermentativo (Silva *et al.*, 2016). Na etapa de recepção, são avaliados o estado sanitário e determinados o peso e o teor de açúcar na fruta com o auxílio de mostímetro de babo ou refratômetro (Marzarotto, 2005).

O desengace (separação da ráquis) é fundamental, uma vez que sua presença deixa gosto amargo no suco. O esmagamento mecânico da uva (rompimento das bagas, sem a trituração das sementes) contribui para extração da cor por meio do aumento da superfície de contato entre o mosto e a parte sólida, facilitando a dissolução, especialmente da matéria corante, importante para o aspecto do suco de uva (Rizzon & Meneguzzo, 2007).

3.4.2 Maceração e tratamento térmico

As uvas esmagadas são enviadas para um tanque de reação enzimática, conectado a termomaceradores tubulares formados por tubos concêntricos (Figura 5), onde ocorre a

maceração dos constituintes da uva e extração do suco, através de aquecimento indireto (Guerra *et al.*, 2016).

A uva e seus constituintes circulam em um tubo interno ao redor do qual circula vapor de água quente que aquece o mosto. A vaporização instantânea de uma parte de água contida nos tecidos vegetais e na casca das uvas, acompanhada de uma refrigeração imediata, produz uma desorganização de sua estrutura que facilita e aumenta os fenômenos de extração e difusão de compostos das películas durante a maceração (Valero, 2014).



Figura 5 - Sistema tubular trocador de calor
Foto: a Autora (2018).

3.4.3 Tratamento enzimático

Na elaboração do suco de uva, o tratamento enzimático é realizado logo após a etapa de maceração e tratamento térmico, utilizando preparações comerciais, geralmente constituídas por uma mistura de enzimas que atuam na degradação da pectina, celulase e hemicelulase (Parkin, 2010). Através desse processo, ocorre melhora na extração dos compostos fenólicos, aumento do rendimento do suco com consequente redução de resíduos, e diminuição da viscosidade, facilitando a filtração do produto final (Paiva *et al.*, 2009). Para o tratamento enzimático, ocorre a diminuição da temperatura no equipamento para 55°C a 60°C, permanecendo o mosto no tanque por uma a duas horas (Rizzon & Meneguzzo, 2007).

3.4.4 Esgotamento, prensagem e centrifugação

Posteriormente, o mosto é separado da parte sólida da uva por meio de um esgotador dinâmico e de prensa. Nestas etapas, deve-se evitar a excessiva dilaceração do bagaço, formado por cascas e sementes, evitando possível gosto herbáceo. A centrifugação do suco geralmente é realizada a vácuo, em centrífuga decanter (Rizzon & Meneguzzo, 2007).

3.4.5 Clarificação, filtração e corte do suco

O suco de uva pode ser submetido a alguns processos para remoção de pectinas, gomas e mucilagens e decantação de compostos insolúveis como bitartarato de potássio e tartarato de cálcio. A clarificação age produzindo floculações que promovem a decantação das substâncias que causam turbidez no suco, podendo ser realizada através de centrifugação, filtração ou estabilização tartárica. Esses processos têm por objetivo tornar o suco mais límpido (Rizzon *et al.*, 1998).

A estabilização tartárica é realizada resfriando o suco a uma temperatura de 0°C, permanecendo nessas condições por oito a dez dias. Após o esse período, o suco de uva é separado dos cristais precipitados no fundo do recipiente e filtrado para posterior pasteurização e engarrafamento (Rizzon & Meneguzzo, 2007).

Previamente à estabilização, é realizado o corte ou mistura dos sucos de variedades distintas, com o objetivo de atingir características de cor, aroma ou teor de sólidos solúveis desejados no suco de uva (Marzarotto, 2005).

3.4.6 Pasteurização e engarrafamento

A pasteurização é o tratamento térmico realizado com a finalidade de destruir tanto os microrganismos patogênicos, quanto os deteriorantes das uvas. Ela ainda tem a função de inativar enzimas, especialmente a lacase produzida por *Botrytis cinerea*, responsável pela podridão das uvas (Brice, 2014).

A pasteurização e o envase a quente caracterizam-se pelo aquecimento do suco a uma temperatura de 85°C a 90°C, e pelo resfriamento espontâneo no recipiente utilizado para engarrafamento. Valero (2014) cita que o tratamento realizado abaixo de 70° C não é capaz de destruir as enzimas oxidantes, processo que ocorre devido a desnaturação das proteínas pela ação de calor e choque térmico. De acordo com Rizzon & Meneguzzo (2007), o aquecimento do suco de uva deve alcançar no mínimo 65°C, não ultrapassando 90°C para proporcionar adequada extração da cor e não atribuir gosto de cozido ao suco. Da mesma forma, Martín-

Belloso & Marsellés-Fontanet (2006), afirmam que o excesso de aquecimento é prejudicial, pois aumenta os taninos e diminui o sabor característico dos sucos de uva.

3.5 ISÓTOPOS ESTÁVEIS

A palavra isótopo vem dos termos gregos *iso* (mesmo) e *topos* (lugar) e referem-se ao fato de os isótopos serem espécies de átomos de um elemento químico localizados na mesma posição da tabela periódica. Os isótopos de um elemento compartilham o mesmo número atômico, porque eles têm o mesmo número de prótons, mas sua massa atômica e propriedades físicas não são as mesmas, bem como o número de nêutrons em seu núcleo é diferente (Santesteban *et al.*, 2015).

Isótopos são geralmente classificados em duas categorias: estáveis e radioativos (instáveis). Isótopos estáveis mantêm uma constante concentração na Terra ao longo do tempo, à medida que isótopos radioativos são átomos que se desintegram em taxas previsíveis e mensuráveis para formar outros isótopos, como ^3H (trítio) e ^{14}C (Santesteban *et al.*, 2015).

Alguns isótopos estáveis como hidrogênio, carbono, nitrogênio e oxigênio (H, C, N, O) são de especial interesse para pesquisas em diversas áreas do conhecimento biológico, geológico, físico, químico, entre outros, pois apresentam importante fonte de informação sobre a história de cada espécie química (Marshall *et al.*, 2007). A variação da razão dos isótopos estáveis é muito pequena na natureza, no entanto, são muito importantes como rastreadores/marcadores (*tracers*), podendo proporcionar fonte de informação abundante sobre processos que acontecem atualmente ou que aconteceram no passado (Ferreira, 2008).

Os isótopos “leves”, que possuem massa atômica menor (^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O), são os mais abundantes, enquanto os isótopos “pesados”, que possuem massa atômica maior (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O), estão presentes no ambiente em uma quantidade muito pequena (Morasch *et al.*, 2001). As abundâncias isotópicas relativas encontradas na natureza para os elementos de maior interesse encontram-se referidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Abundância dos principais isótopos estáveis

Elemento	Isótopo	Abundância Relativa (%)
Hidrogênio	^1H	99,9855
	^2H	0,0145
Carbono	^{12}C	98,892
	^{13}C	1,108

Nitrogênio	¹⁴ N	99,6337
	¹⁵ N	0,3663
	¹⁶ O	99,7586
Oxigênio	¹⁷ O	0,0375
	¹⁸ O	0,2039

Fonte: adaptado de Calderone & Guillou (2008).

A análise isotópica pode fornecer informação sobre a origem de um composto químico. A abundância natural de isótopos estáveis para elementos como H, C e O mostram pequenas, mas mensuráveis variações, devido ao fracionamento que ocorre durante os processos químicos e físicos dos ciclos naturais, como a fotossíntese e a evaporação da água (Schmidt *et al.*, 2003; Morasch *et al.*, 2001).

3.5.1 Fracionamento isotópico do oxigênio

O fracionamento isotópico ocorre com os processos de evaporação e condensação do ciclo da água. A distribuição de isótopos na água da planta é diretamente influenciada pela fonte de água disponível para a planta, a qual geralmente é a água subterrânea resultante da precipitação, que sofre diferentes processos de evapotranspiração durante sua trajetória dos oceanos para os continentes (Calderone & Guillou, 2008).

As condições climáticas de uma região também podem influenciar na evapotranspiração de folhas e frutos, o que causa enriquecimento dos isótopos de oxigênio na água da planta (videira), em comparação com o das águas subterrâneas. A extensão desse enriquecimento depende de parâmetros fisiológicos como exposição solar da videira, irrigação, período de maturação e data da colheita (Christoph *et al.*, 2015). O enriquecimento isotópico também está relacionado ao clima, sendo que, as regiões mais quentes e secas são caracterizadas por valores mais positivos de $\delta^{18}\text{O}$ e as regiões mais frias por valores mais negativos (Rossmann *et al.*, 1999).

Da mesma forma que a composição isotópica das plantas depende das condições climáticas e geográficas, os alimentos e bebidas derivados são isotopicamente marcados e semelhantes ao das plantas de origem (Martin & Martin, 2003). Entre as técnicas disponíveis para auxiliar nos testes de autenticidade e rastreabilidade de alimentos e bebidas, a espectrometria de massa de razão isotópica tem sido amplamente utilizada devido à alta precisão do método (van Leeuwen *et al.*, 2014).

3.5.2 Espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS)

A espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) é uma técnica que separa átomos ou moléculas carregados com base em sua razão massa/carga (m/z). Esta técnica é reconhecida pela precisão, a qual é alcançada devido à permanente comparação entre a razão isotópica do composto a ser medido e a razão isotópica de um composto de referência (Santesteban *et al.*, 2015; Ferreira, 2008).

O padrão de calibração adotado para os isótopos de oxigênio é o VSMOW (*Vienna Standard Mean Ocean Water*), uma água obtida a partir da mistura de água do Oceano Pacífico com várias amostras de água do mar dessalinizada, cujo valor na escala delta é zero (Oliveira, 2014). Em 2006, devido à exaustão das amostras do padrão VSMOW, a International Atomic Energy Agency (IAEA) lançou o padrão VSMOW2, idêntico ao primeiro. Os resultados de $\delta^{18}\text{O}$ para amostras de água continuam sendo apresentados relativamente ao padrão VSMOW (IAEA, 2009).

O SLAP (*Standard Light Antarctic Precipitation*) é um segundo padrão de calibração de água, obtido a partir de uma amostra de neve do Polo Sul. Foi estabelecido pelo IAEA em 1966 a fim de facilitar as medições em amostras de água naturais, e possui uma composição isotópica muito empobrecida no isótopo mais pesado (relativo ao VSMOW) de $\delta^{18}\text{O} = -55,5\text{‰}$. Já o material de intercomparação mais utilizado é o GISP (*Greenland Ice Sheet Precipitation*), e corresponde a uma amostra de água com uma composição isotópica intermediária entre o VSMOW e o SLAP de $\delta^{18}\text{O} = -24,8\text{‰}$ (Ferreira, 2008).

3.5.3 Espectrômetro de massas de razão isotópica

O espectrômetro de massas é constituído basicamente por 3 partes: a fonte, o analisador e um detector múltiplo de Faraday ou *Faraday cups*. O primeiro passo na obtenção de medidas de espectrometria de massa é a preparação da amostra, a qual deve apresentar-se na forma de gases puros, tais como H_2 , CO_2 , N_2 e CO , dependendo da composição do material e do isótopo de interesse (Ferreira, 2008; Carter & Barwick, 2011).

Em seguida, conforme Figura 6, a amostra é introduzida na fonte de íons (1) para formação do feixe de íons. Os componentes gasosos (CO_2) da amostra são ionizados com a mesma quantidade de carga. Logo, os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico, defletidos por um campo magnético (2) em função da razão m/z , onde o feixe iônico principal é aberto em feixes de íons isotópicos característicos. Então, a quantidade relativa de íons que

atingem o detector é medida nos *Faraday cups* (3), posicionados de tal forma que três massas diferentes podem ser capturadas simultaneamente (as massas são 44, 45 e 46). O sinal elétrico gerado, proporcional à quantidade de íons formados, é amplificado (4), enviado ao computador (5) e processados pelo *software* que controla todas as partes do sistema (WUSTL, 2017; Ferreira, 2008; Sene & Silva, 2009; RUNL, 2017).

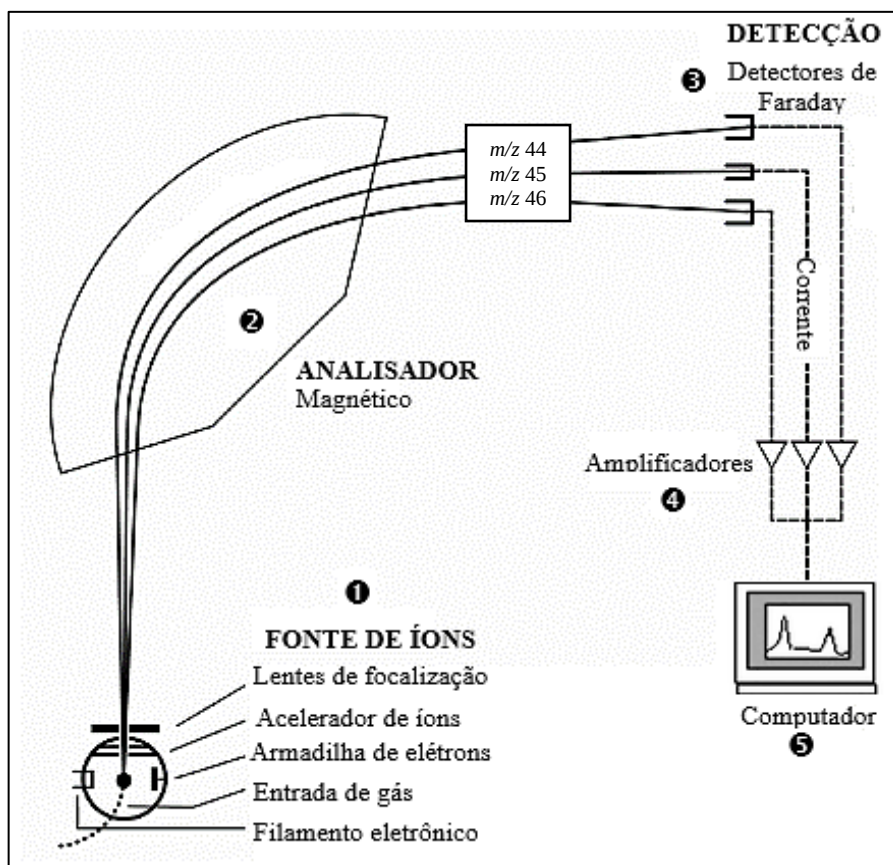


Figura 6 - Esquema de um espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS)
Fonte: adaptado de Clark & Fritz (1997).

Os principais sistemas de introdução de amostras que podem ser acoplados ao IRMS são os cromatógrafos a gás (GC-IRMS) e os analisadores elementares (EA-IRMS). O acoplamento do GC ao IRMS constitui uma das mais versáteis técnicas isotópicas, pois combina o poder de separação das técnicas cromatográficas com a elevada precisão e exatidão na determinação das razões de isótopos estáveis por IRMS (Sessions, 2006).

O GC (Figura 7) é acoplado a um amostrador automático (1), e possui uma agulha de dois orifícios (2) que adiciona um fluxo de hélio (He) no frasco de amostra, diluindo e deslocando o CO₂ da amostra para o topo (*headspace*). Esse gás é arrastado por fluxo contínuo de He e passa por uma membrana Nafion (3) - um copolímero de tetrafluoretileno sulfonado - para retirada da umidade. O volume é fixado em 100µL e o sistema de loop de injeção (4) permite maior precisão (1-2 min por repetição). Em seguida, a amostra segue para uma coluna cromatográfica gasosa (5) onde o CO₂ é separado de qualquer outra espécie de gás interferente. Então, passa novamente por uma membrana Nafion permeável à água (6) e é introduzida na fonte de íons por uma interface (7) de divisão aberta (*open Split*), seguindo para um sistema de aquisição de dados controlado por *software* (Thermo Fisher Scientific, 2013; Hilkert & Avak, 2016; UWI, 2013).

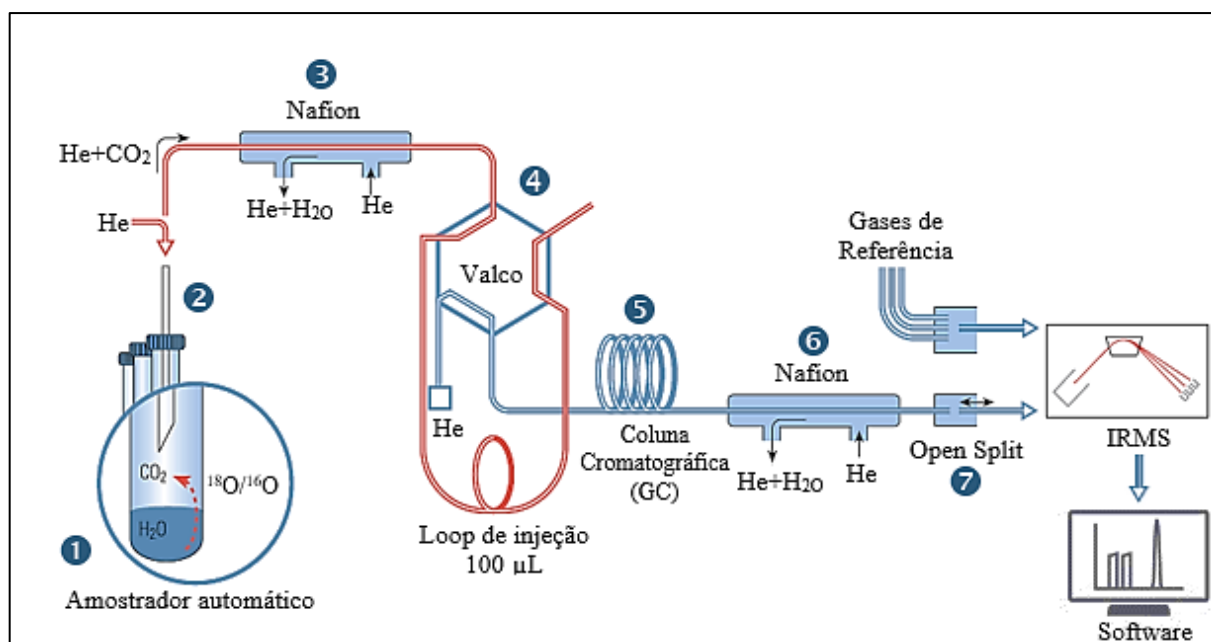


Figura 7- Esquema de um cromatógrafo a gás (GasBench) acoplado a um IRMS
Fonte: adaptado de Hilkert & Avak (2016).

3.5.4 Notação delta (δ)

A variação da abundância isotópica é muito pequena, sendo assim, a medida da razão do isótopo estável pesado em relação ao isótopo leve de um determinado elemento requer grande precisão, portanto, os resultados são indicados em notação delta (δ). Os valores de δ são multiplicados por 1000 e expressos em unidades "*per mil*" (‰) (Ferreira, 2008; Camin *et al.*, 2017).

Um δ com valor positivo significa que a razão da abundância do isótopo pesado em relação ao leve é maior na amostra do que no padrão. Um valor de δ negativo significa que

razão da abundância do isótopo pesado em relação ao leve é maior no padrão que na amostra (Sene & Silva, 2009).

3.5.5 Valores de referência isotópicos

Quando a análise da razão isotópica é utilizada para fins de autenticação, é necessária a comparação com um conjunto de dados de referência para interpretação dos dados. A representatividade das amostras de uvas é fundamental, e depende de fatores como origem geográfica, clima, período de colheita, cultivar e principalmente, ano da safra. Então, é de fundamental importância, incluir esses dados de referência atualizados a cada ano. Esses dados refinam e restringem o intervalo de autenticidade aceitável. A comparação de um valor de medição real com um limite de autenticidade é parte importante do processo de controle de fraudes (Camin *et al.* 2017; Dordevic *et al.* 2013).

3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação do método é o processo que demonstra que um método analítico é adequado para o fim proposto, garantindo desta forma, a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. A validação deve garantir que as características do método satisfaçam as especificações exigidas para os resultados analíticos, bem como estabelecer limites de controle a serem aplicados na rotina de trabalho (Silva, 2016).

3.6.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método distinguir e quantificar um ou mais analitos em uma matriz complexa sem interferência dos demais compostos, sejam eles, impurezas, produtos de degradação ou substâncias com propriedades idênticas as do analito (Costa, 2015). Pode ser avaliada pela comparação de uma matriz contendo o analito em questão com uma matriz isenta do mesmo (ICH, 2005).

A seletividade é calculada a partir do teste F para duas variâncias, através do qual obtêm-se o valor de $F_{calculado}$, conforme Equação 1. Após, o resultado de $F_{calculado}$ é comparado com o $F_{tabelado}$, determinado a partir da Tabela de distribuição F (ANEXO A). Os graus de liberdade são calculados mediante a fórmula $n-1$, onde n é o número de análises que foram realizadas pra calcular a variância. Se o $F_{calculado}$ for menor do que o $F_{tabelado}$, não há diferença significativa entre as duas matrizes (Albano & Raya-Rodriguez, 2015).

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

3.6.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de o método demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade é expressa na curva de calibração ($y = ax + b$) pela obtenção de resultados em proporção direta as concentrações da substância em estudo ($R^2 > 0,99$). Para verificar a eficiência da equação de regressão linear pode ser construído e analisado o gráfico de resíduos. Este gráfico ilustra uma distribuição dos resultados em torno da linha reta central. Se esta distribuição for aleatória, confirma a linearidade do método (Albano & Raia-Rodriguez, 2015).

3.6.3 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LD é calculado conforme Equação 2 (NATA, 2013).

$$LD = 0 + t(n-1, 1-\alpha) \cdot S \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

0: valores dos brancos da amostra;

t: distribuição de Student;

S: desvio padrão amostral dos brancos das amostras (INMETRO, 2018).

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis, dentro da sensibilidade normal do equipamento ou da técnica, calculado conforme Equação 3 (ICH, 2005).

$$LQ = 0 + 10 \cdot S \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

0: média dos valores dos brancos da amostra;

S: desvio padrão amostral dos brancos (INMETRO, 2018).

3.6.4 Tendência

A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica em uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. O uso de materiais de referência certificados (MRC) geralmente são utilizados para avaliar a tendência, e a mesma é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos (INMETRO, 2018). A tendência é calculada de acordo com a Equação 4.

$$Tendência = \frac{valor\ observado}{valor\ esperado} \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

3.6.5 Recuperação

A recuperação do analito pode ser avaliada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas desse mesmo analito (INMETRO, 2018). A recuperação é calculada em porcentagem, através da Equação 5.

$$Recuperação (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

C1: concentração da amostra adicionada;

C2: concentração da amostra não adicionada (0);

C3: concentração do analito adicionada.

Os critérios de aceitação para recuperação, segundo a AOAC (2016), encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Critérios de aceitação para recuperação do analito

Concentração	Recuperação média
100%	98 - 102
10%	98 - 102
1%	97 - 103
0,10%	95 - 105
100 ppm	90 - 107
10 ppm	80 - 110
1 ppm	80 - 110

100 ppb	80 - 100
10 ppb	60 - 115
1 ppb	40 - 120

Fonte: AOAC (2016).

3.6.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida como a aproximação entre o resultado da medição e o valor verdadeiro da amostra (Parreira, 2013). Para esta comparação podem ser utilizados diversos critérios de decisão, entre os quais o erro relativo (ER) e o índice Z (z-score). O índice Z pode ser determinado conforme a Equação 6.

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad \text{Equação 6}$$

Sendo:

X_{lab} : valor obtido pelo laboratório;

X_v : valor aceito como verdadeiro;

S: desvio padrão.

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 (INMETRO, 2018).

3.6.7 Precisão

A precisão reflete valores experimentais determinados por circunstâncias específicas sendo expressos por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade (Albano & Raia-Rodriguez, 2015).

3.6.7.1 Repetibilidade

A repetibilidade é uma medida de expressão da precisão de medições sucessivas sobre uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição, isto é, mesmo laboratório, analista, equipamento e tipo de reagentes, sendo estas medições realizadas, de preferência, no mesmo dia (Costa, 2015). É usualmente expressa pelo coeficiente de variação (desvio padrão relativo), conforme a Equação 7.

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada (INMETRO, 2018).

O critério de aceitação para precisão, que leva em consideração a concentração do analito na amostra, segundo a AOAC (2016), encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Critérios de aceitação para precisão do analito

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
100ppb	15
10ppb	21
1ppb	30

Fonte: AOAC (2016).

3.6.7.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é obtida quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (Albano & Raia-Rodriguez, 2015).

3.6.7.3 Precisão intermediária

Para determinar a precisão intermediária é efetuado um conjunto de medições da mesma amostra ou padrão, no mesmo laboratório, utilizando o mesmo método, variando as condições de análise, de forma a reproduzir as variações normalmente observadas no laboratório, tais como, diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos (Parreira, 2013). A precisão intermediária é calculada conforme Equação 8.

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

t : total de amostras ensaiadas;

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, 2018).

3.6.8 Robustez

A robustez é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do mesmo, as quais podem ser: condições de armazenamento, ambientais, diferentes preparações da amostra, septos novos e usados, entre outros. A robustez fornece uma indicação da confiança do método quando utilizado em rotina (Magnusson & Örnemark, 2014; Albano & Raia-Rodriguez, 2015).

3.6.9 Incerteza de medição

A incerteza de medição é definida como um parâmetro associado ao resultado de uma medida que caracteriza a dispersão dos valores que podem razoavelmente ser atribuídos ou mensurados (Dunn *et al.*, 2015). Os resultados de uma análise devem ser apresentados com a estimativa de sua incerteza de medição, principalmente quando essa incerteza afeta a conformidade com parâmetros de autenticidade (Fauhl, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E PADRÕES

Os padrões VSMOW (NIST, IAEA – 8535a) e GISP (NIST, IAEA – 8536) foram utilizados para a validação do método e o ácido sórbico (Merck®) foi utilizado como conservante. Os gases utilizados no IRMS foram uma mistura de 0,3% de CO₂ em Hélio 6.0 (Air Liquide), CO₂ 4.8 (Air Liquide) como gás de referência e Hélio 6.0 (Air Liquide) como gás de arraste.

4.2 AMOSTRAS

4.2.1 Amostras para sucos experimentais

Foram selecionadas para o experimento, uvas das variedades Bordô, Isabel, Concord e Niágara Branca, da safra de 2017, provenientes da Serra Gaúcha (RS). Cada variedade foi trabalhada em triplicata, totalizando doze amostras no experimento.

4.2.2 Amostras para avaliar a influência do processo de elaboração de sucos industriais nos valores isotópicos

Para avaliar influência do processo de elaboração do suco nos valores isotópicos, foram comparados cinco mostos e cinco sucos da variedade Isabel. Para tanto, foram processados 1.200 kg de uvas da variedade Isabel em uma indústria de sucos, em São Marcos-RS. O mosto que entrou no trocador de calor deu origem ao suco final.

4.2.3 Amostras para elaboração de valores de referência isotópicos

Para compor os valores de referência isotópico foram selecionadas as principais uvas utilizadas na elaboração de sucos de uva na indústria. Então, foram coletadas uvas de várias regiões do estado do Rio Grande do Sul, das variedades Bordô, Concord, Isabel, Isabel Precoce, BRS Cora e BRS Violeta, Niágara Rosada, Niágara Branca e BRS Lorena, da safra de 2017, totalizando 177 amostras de uvas, sendo 159 tintas e 18 brancas (como indicado no ANEXO B).

4.2.4 Amostras de sucos reais

Foram coletados 30 sucos de uva em supermercados de Caxias do Sul - RS, sendo 27 sucos de uva tinto integrais e três sucos de uva branco integrais.

4.3 EXPERIMENTOS

4.3.1 Avaliação do efeito da temperatura e da evaporação no processo de elaboração de sucos

Para avaliar a influência da evaporação, foram selecionadas cinco amostras de mostos de uvas, sendo elas tintas e brancas, das variedades Isabel e Niágara Branca. O critério de escolha utilizado foi baseado na seleção de uma variedade branca e uma tinta, de maior representatividade na elaboração de suco de uva. Estas uvas representam a maior produção do estado do RS dentro da sua categoria.

As uvas foram desengaçadas e amassadas manualmente e, em seguida, passaram por prensa pneumática para coleta de 3,2 L de mosto de cada amostra de uva, em erlenmeyer de 5 L. Foram adicionados 3,2 g de ácido sórbico ao mosto para evitar a fermentação e coletados em frascos de 12 mL, alíquotas em triplicata de cada amostra para análise do $\delta^{18}\text{O}$ sem aquecimento (“ponto zero”). Mediu-se 200 mL de mosto em proveta e transferiu-se para frascos âmbar de 1000 mL com tampa. Em outro frasco âmbar de 1000 mL, contendo 200 mL de mosto, foi acoplado um termômetro. Então, as amostras foram aquecidas em banho maria, às temperaturas de 50°C, 80°C, 90°C e 95°C, durante 15 e 30 min.

O efeito da evaporação no valor de $\delta^{18}\text{O}$ foi avaliado deixando a tampa de um dos frascos de teste aberta. Após esfriarem em temperatura ambiente, todas as amostras do experimento foram transferidas para frascos âmbar de 300 mL previamente identificadas e, posteriormente, realizada a análise da razão isotópica do oxigênio ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) em triplicata.

4.3.2 Avaliação da influência do processo de elaboração de sucos industriais nos valores isotópicos

Foram coletadas amostras de mostos iniciais e finais de sucos de uva Isabel elaborados em indústria. A variedade Isabel foi escolhida por ser a uva com maior produção no estado do Rio Grande do Sul e, conseqüentemente, com maior representatividade nos sucos comerciais.

Para tanto, foram coletados 12 mL de mosto e 12 mL de suco proveniente do mesmo mosto de uva Isabel. Foram realizadas coletas, em triplicata, no início (mosto) e no final (suco), em dias diferentes, durante a colheita desta variedade, e além disso, em dias em que a empresa estava processando somente uva Isabel.

A primeira coleta (mosto) foi realizada após a uva passar pela desengaçadeira. Seguindo o processo de elaboração, o mosto passou pelo trocador de calor, onde foi aquecido a uma temperatura de 85°C por 10 a 12 s e depois resfriado a 45°C. Logo, passou por prensa pneumática, onde foi centrifugado a 3000 rpm e, posteriormente, pasteurizado a 85°C, finalizando o processo de elaboração e coletada a segunda amostra (suco) para a comparação do $\delta^{18}\text{O}$.

4.3.3 Valores de referência isotópicos

As amostras de uvas foram desengaçadas e amassadas manualmente para formação do mosto. Em seguida, foi realizada coleta de cada amostra de mosto para posterior análise do $\delta^{18}\text{O}$. As amostras foram coletadas em frascos de 12 mL e adicionados 0,012 g de ácido sórbico para evitar a fermentação.

4.3.4 Avaliação isotópica de sucos comerciais

A análise do $\delta^{18}\text{O}$ das amostras de sucos comerciais foi realizada em triplicata.

4.3.5 Determinação da razão isotópica do oxigênio por IRMS

A razão isotópica do oxigênio dos sucos foi realizada através de um espectrômetro de massa de razão isotópica Delta V Advantage acoplado ao cromatógrafo gasoso GasBench II (ThermoFinnigan®, Bremen - Alemanha)

Foram pipetados 500 μL das amostras de mostos e sucos em frasco de 12 mL, fechados hermeticamente com tampa de plástico e septo novo de teflon-silicone. Os frascos foram acondicionados no amostrador automático do GasBench II. Então, uma mistura de 0,3% de CO_2 em He 6.0 foi inserida nos frascos automaticamente através de seringa no sistema de *flush and fill*. A amostra permaneceu em equilíbrio em temperatura controlada ($25^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$), durante um período de 24 h. Após a completa troca gasosa do CO_2 do gás com o CO_2 do suco, foi analisado o $\delta^{18}\text{O}$ do gás de topo do equilíbrio (*headspace*), o qual refletiu o $\delta^{18}\text{O}$ da

amostra. O resultado foi obtido comparativamente em relação ao padrão internacional VSMOW (OIV, 2009).

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método foi realizada conforme os requisitos estabelecidos pela ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (2018).

4.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da determinação de $\delta^{18}\text{O}$ em suco de uva tinto integral e na água (padrão VSMOW), realizando nove repetições para cada amostra. Aplicou-se o teste F para duas variâncias, o qual foi comparado ao valor de F tabelado (ANEXO A) a um nível de confiança de 95%.

4.4.2 Linearidade

A linearidade foi estabelecida adicionando-se água ao suco de uva tinto integral nas concentrações de 0; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30; 50; 75; 90; 99,5 e 100%. A triplicata de cada concentração foi analisada nove vezes, obtendo-se 27 resultados para cada ponto (9x3). Após, foi realizada a curva analítica e o critério de avaliação utilizado foi 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.

4.4.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram calculados através dos resultados da análise de $\delta^{18}\text{O}$ do suco referente a menor concentração de água adicionada (0,5%), em triplicata, no teste de linearidade. Para o cálculo do LD foram analisadas as 27 replicatas, considerando assim, 26 graus de liberdade e um t-student de 2,479 (conforme ANEXO C). O LQ foi calculado através do branco da amostra com a menor concentração do analito e analisadas 27 replicatas.

4.4.4 Tendência

A tendência foi avaliada através do cálculo de seis repetições do padrão GISP, pois este tem valor conhecido de -24,78‰, ao contrário do VSMOW, cujo valor é zero. Dividiu-se o valor observado pelo valor esperado e multiplicou-se por 100%. Avaliou-se a tendência pelos critérios da AOAC (2016).

4.4.5 Recuperação

A recuperação foi calculada através da análise do $\delta^{18}\text{O}$ de diferentes concentrações de água adicionada ao suco de uva. As concentrações analisadas foram de 20; 30; 50; 75; 90 e 99,5%, sendo analisadas em triplicatas, e utilizados os critérios de aceitação para recuperação da AOAC (2016).

4.4.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da determinação do $\delta^{18}\text{O}$ de 27 repetições do padrão GISP. Os valores médios e o desvio padrão dos ensaios foram comparados com o valor real do padrão (-24,78‰) e calculado o índice Z (z-score).

4.4.7 Repetibilidade

Para determinar a repetibilidade, foram realizadas 27 repetições de um mesmo suco, no mesmo dia, com o mesmo analista e equipamento e sob as mesmas condições. O resultado foi expresso pelo coeficiente de variação (desvio padrão relativo), e o critério de aceitação foi baseado na AOAC (2016).

4.4.8 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi realizada através de comparação interlaboratorial realizado pela Eurofins Scientific Brasil, no ano de 2018, considerando o z-score ($-2 < Z < 2$).

4.4.9 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi calculada através da variação da leitura do $\delta^{18}\text{O}$ de duas matrizes diferentes, sendo elas água (padrão VSMOW) e suco de uva. O resultado foi calculado conforme INMETRO (2018).

4.4.10 Robustez

Na avaliação da robustez do método, foi realizado um teste de variação da temperatura do bloco do amostrador automático do GasBench II nas temperaturas de 24°C, 25°C, 26°C e 27°C, para verificar se esse parâmetro interfere nos resultados das análises.

4.4.11 Incerteza de medição

A incerteza de medição do método foi calculada conforme o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2018), considerando a distribuição dos dados segundo o guia para incerteza de medição RM 68 da Rede Metrológica (2013) do Rio Grande do Sul.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram avaliados com o programa SPSS 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences for Windows*), através das médias e desvios padrão, análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Tukey ao nível de significância de 5%. Para os testes com as tampas abertas do item 4.3.1, foi realizado o Teste t para amostras pareadas.

Para o cálculo dos valores de referência isotópicos utilizou-se a média ponderada. Para se obter a média ponderada, o valor isotópico de cada amostra de uva é multiplicado pelo total da produção de uvas, em kg, declarados por cada produtor no Cadastro Vitícola, relativos à safra do ano anterior (ANEXO B). Então, divide-se o valor encontrado pela soma do total de kg e obtêm-se o valor ponderado. Assim, o efeito da ponderação é equilibrar o impacto do volume de produção em função das amostras de uvas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados na forma de artigo a ser submetido à revista *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.

Determinação de água exógena em suco de uva através da análise isotópica do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

M. M. Kercher^{1,2} | S. Leonardelli^{1,2} | G. J. Cargnel² | R. Vanderlinde^{1*}

¹Universidade de Caxias do Sul (UCS) - Instituto de Biotecnologia, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul-RS, Brasil.

²Laboratório de Referência Enológica Evanir da Silva (LAREN) - Avenida da Vindima, 1855, 95084-470, Caxias do Sul-RS, Brasil.

Justificativa: O suco de uva vem atraindo muita atenção dos consumidores devido às suas propriedades sensoriais e nutricionais. Para manter a qualidade dessas bebidas, o controle de adulterações assumiu um papel fundamental. A razão isotópica ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) é uma importante ferramenta para determinar a adição de água exógena, porém não existe uma metodologia oficial para suco no Brasil. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia para detecção de água exógena em suco de uva através do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$.

Métodos: A validação e o desenvolvimento do método analítico foram realizados através de espectrometria de massas de razão isotópica (IRMS). Foi avaliado o efeito da temperatura e da evaporação de $\delta^{18}\text{O}$ em sucos experimentais, encontrados valores de referência para sucos baseado no $\delta^{18}\text{O}$ de mostos, verificado a influência do processo industrial de elaboração de sucos nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e avaliados sucos reais em relação aos valores de referência quanto a adição de água.

Resultados: Os parâmetros de temperatura e evaporação não influenciaram os resultados do $\delta^{18}\text{O}$ do suco, pois apresentaram diferenças inferiores à incerteza do método. O sistema trocador de calor não exerceu influência sobre o método proposto. Os valores de referência para suco podem ser provenientes dos mostos, sem prejudicar a interpretação dos resultados finais. Dos trinta sucos reais analisados, oito apresentaram água exógena, três demonstraram ser sucos reconstituídos e dezenove foram considerados com ausência de água exógena.

Conclusões: A metodologia proposta e validada neste estudo mostrou-se eficaz para a detecção de água exógena em suco de uva integral, através da análise da razão isotópica do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ por espectrometria de massa de razão isotópica, a qual poderá ser aplicada na rotina de laboratório para a avaliação de sucos reais.

*Correspondência

R.Vanderlinde. Laboratório de Pesquisas Enológicas e Bebidas (LPEB) - Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul (UCS). Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul-RS, Brasil. E-mail: rvanderl@ucs.br.

1 | INTRODUÇÃO

O suco de fruta é uma bebida obtida a partir da parte comestível da fruta sã, fresca e madura e deve manter as características químicas, organolépticas e nutricionais essenciais da fruta de origem no produto final.¹ Por sua vez, o suco de uva é uma bebida não fermentada, obtida a partir do mosto de uvas submetidas a processos tecnológicos adequados.²

A crescente busca por hábitos saudáveis leva a um aumento na ingestão de alimentos e bebidas que contenham compostos benéficos à saúde. Em 2018, o consumo mundial de suco de frutas foi equivalente a 45,4 bilhões de litros, sendo que até 2024, espera-se chegar a um volume de 50,6 bilhões de litros.³ Os maiores consumidores de sucos de frutas são a Europa, seguida pela América do Norte, Ásia-Pacífico, América Latina, Oriente Médio e África⁴. O Brasil é o terceiro maior mercado de bebidas não alcoólicas do mundo e a região Sul do país é responsável por 90% da elaboração de sucos de uva no país⁵. Além disso, entre 2008 e 2018, o volume de suco de uva comercializado passou de 123 milhões para 282 milhões de litros anuais, o que representa uma expansão de 128%.⁶

A popularidade dos sucos de frutas vem crescendo na mesma proporção que as tentativas de adulteração, principalmente ao suco natural. Devido às suas características sensoriais muito apreciadas, os sucos integrais têm um alto valor agregado e são mais suscetíveis à fraude^{7,8}. Os métodos de adulteração mais comuns incluem adição de açúcares, ácidos, corantes, adição de sucos mais baratos provenientes de outras frutas e ainda, diluição com água. Em muitos casos, a adição de água tem o objetivo de aumentar o rendimento do suco, visando o lucro^{9,10,11}. Essas práticas, além de enganosas aos consumidores, refletem sobre a qualidade final dos sucos¹².

O controle da origem das matérias-primas utilizadas na produção de alimentos e bebidas é recomendado a fim de garantir a qualidade e autenticidade dos mesmos. Das muitas técnicas analíticas disponíveis para auxiliar nos testes de autenticidade, rastreabilidade e

origem, a espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) tem sido amplamente utilizada devido à robustez e alta precisão do método^{13,14}.

As análises isotópicas têm sido propostas pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) para detectar a adição de água¹⁵ e açúcar¹⁶ em vinhos e derivados. No Brasil, a análise isotópica em sucos de uva tem sido utilizada desde 2007 para determinar a porcentagem de açúcar natural da uva e açúcar da cana-de-açúcar possivelmente adicionado ao suco¹⁷. Porém, não existe uma metodologia oficial para detecção de água exógena em suco de uva no Brasil, o que representa uma demanda do setor vitivinícola no intuito de melhorar a qualidade dos sucos e evitar possíveis adulterações. A presença de água no suco não constitui problemas à saúde, no entanto, se não é declarada, se caracteriza como uma fraude ao consumidor.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia para detecção de água exógena em suco de uva integral, através da análise da razão isotópica do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Para isso, foi de fundamental importância validar o método analítico, avaliar o efeito da temperatura e da evaporação em sucos experimentais, verificar a influência do processo de mostos e sucos industriais nos valores de $\delta^{18}\text{O}$, encontrar valores de referência para sucos baseado no $\delta^{18}\text{O}$ de mostos e avaliar sucos reais em relação aos valores de referência, quanto à adição de água.

2 | EXPERIMENTAL

2.1 | Reagentes e Padrões

Os padrões VSMOW (NIST, IAEA – 8535a) e GISP (NIST, IAEA – 8536) foram utilizados para a validação do método e o ácido sórbico (Merck®) foi utilizado como conservante. Os gases utilizados no IRMS foram uma mistura de 0,3% de CO_2 em Hélio 6.0

(Air Liquide), CO₂ 4.8 (Air Liquide) como gás de referência e Hélio 6.0 (Air Liquide) como gás de arraste.

2.2 | Amostras

2.2.1 | Amostras para sucos experimentais

Foram selecionadas uvas das variedades Bordô, Isabel, Concord e Niágara Branca, provenientes da região Sul do Brasil, chamada Serra Gaúcha, da safra de 2017. Cada variedade foi trabalhada em triplicata, totalizando doze amostras no experimento.

2.2.2 | Amostras para avaliar a influência do processo de elaboração de sucos industriais nos valores isotópicos

Para avaliar influência do processo de elaboração do suco nos valores isotópicos, foram comparados cinco mostos e cinco sucos da variedade Isabel. Para tanto, foram processados 1.200 kg de uvas da variedade Isabel em uma indústria de sucos, em São Marcos – RS (Brasil). O mosto que entrou no trocador de calor deu origem ao suco final.

2.2.3 | Amostras para elaboração de valores de referência isotópicos

Para esta amostragem, foram selecionadas as principais uvas utilizadas na elaboração de sucos de uva na indústria. Foram coletadas uvas de várias regiões do estado do RS (Brasil), das variedades Bordô, Concord, Isabel, Isabel Precoce, BRS Cora e BRS Violeta, Niágara Rosada, Niágara Branca e BRS Lorena, da safra de 2017, totalizando 177 amostras de uvas, sendo 159 tintas e 18 brancas.

2.2.4 | Amostras de sucos reais

Foram coletados 30 sucos de uva em supermercados de Caxias do Sul – RS (Brasil), sendo 27 sucos de uva tinto integrais e três sucos de uva branco integrais.

2.3 | Experimento

2.3.1 | Avaliação do efeito da temperatura e da evaporação no processo de elaboração de sucos

Para avaliar a influência da evaporação, foram selecionadas cinco amostras de mostos de uvas, sendo elas tintas e brancas, das variedades Isabel e Niágara Branca. O critério de escolha foi baseado na seleção de uma variedade branca e uma tinta, de maior representatividade na elaboração de suco de uva. Estas uvas representam a maior produção do estado do RS dentro da sua categoria.

As uvas foram desengaçadas e amassadas manualmente e, em seguida, passaram por prensa pneumática para coleta de 3,2 L de mosto de cada amostra de uva, em erlenmeyer de 5 L. Foram adicionados 3,2 g de ácido sórbico ao mosto para evitar a fermentação e coletados em frascos de 12 mL, alíquotas em triplicata de cada amostra para análise do $\delta^{18}\text{O}$ sem aquecimento (“ponto zero”). Mediu-se 200 mL de mosto em proveta e transferiu-se para frascos âmbar de 1000 mL com tampa. Em outro frasco âmbar de 1000 mL, contendo 200 mL de mosto, foi acoplado um termômetro (Figura 1). Então, as amostras foram aquecidas em banho maria, às temperaturas de 50°C, 80°C, 90°C e 95°C, durante 15 e 30 min.

O efeito da evaporação no valor de $\delta^{18}\text{O}$ foi avaliado deixando a tampa de um dos frascos de teste aberta. Após esfriarem em temperatura ambiente, todas as amostras do experimento foram transferidas para frascos âmbar de 300 mL previamente identificadas e, posteriormente, realizada a análise da razão isotópica do oxigênio ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) em triplicata.



Figura 1 Amostras aquecidas em banho maria

2.3.2 | Avaliação da influência do processo de elaboração de sucos industriais nos valores isotópicos

Foram coletadas amostras de mostos iniciais e finais de sucos de uva Isabel elaborados em indústria. A variedade Isabel foi escolhida por ser a uva com maior produção no estado do RS e, conseqüentemente, com maior representatividade nos sucos comerciais. Para tanto, foram coletados 12 mL de mosto e 12 mL de suco proveniente do mesmo mosto de uva Isabel. Foram realizadas coletas, em triplicata, no início (mosto) e no final (suco) do processo, em dias diferentes, durante a colheita desta variedade, e além disso, em dias em que a empresa estava processando somente uva Isabel.

A primeira coleta (mosto) foi realizada após a uva passar pela desengaçadeira. Seguindo o processo de elaboração, o mosto passou pelo trocador de calor, onde foi aquecido a uma temperatura de 85°C por 10 a 12 s e depois resfriado a 45°C. Logo, passou por prensa pneumática, onde foi centrifugado a 3000 rpm e, posteriormente, pasteurizado a 85°C, finalizando o processo de elaboração e coletada a segunda amostra (suco) para a comparação do $\delta^{18}\text{O}$.

2.4 | Determinação da razão isotópica do oxigênio por IRMS

A razão isotópica do oxigênio dos sucos foi realizada através de um espectrômetro de massa de razão isotópica Delta V Advantage acoplado ao cromatógrafo gasoso GasBench II (ThermoFinnigan®, Bremen - Alemanha)

Foram pipetados 500 µl das amostras de mostos e sucos em frasco de 12 mL, fechados hermeticamente com tampa de plástico e septo novo de teflon-silicone. Os frascos foram acondicionados no amostrador automático do GasBench II. Uma mistura de 0,3% de CO₂ em He 6.0 foi inserida nos frascos automaticamente através de seringa no sistema de *flush and fill*. A amostra permaneceu em equilíbrio em temperatura controlada (25°C ± 0,5°C), durante um período de 24 h. Após a completa troca gasosa do CO₂ do gás com o CO₂ do suco, foi analisado o δ¹⁸O do gás de topo do equilíbrio (*headspace*), o qual refletiu o δ¹⁸O da amostra. O resultado foi obtido comparativamente em relação ao padrão internacional VSMOW¹⁸.

2.5 | Validação do método

A validação do método foi realizada conforme os requisitos estabelecidos pela ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (2018)¹⁹.

2.5.1 | Seletividade

A seletividade foi avaliada através da determinação de δ¹⁸O em suco de uva tinto integral e na água (padrão VSMOW), realizando nove repetições para cada amostra. Aplicou-se o teste F para duas variâncias (conforme Equação 1)¹⁹, o qual foi comparado ao valor de F tabelado (ANEXO A), a um nível de confiança de 95%.

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

2.5.2 | Linearidade

A linearidade foi estabelecida adicionando-se água ao suco de uva tinto integral nas concentrações crescentes de 0; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30; 50; 75; 90; 99,5 e 100%. A triplicata de cada concentração foi analisada nove vezes, obtendo-se 27 resultados para cada ponto (9x3). Após, foi realizada a curva analítica, e o critério de avaliação utilizado foi 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.

2.5.3 | Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram calculados através dos resultados da análise de $\delta^{18}\text{O}$ do suco referente a menor concentração de água adicionada (0,5%), no teste de linearidade. Para o cálculo do LD (Equação 2)¹⁹, foram analisadas as 27 replicatas, considerando assim, 26 graus de liberdade e um t-student de 2,479 (ANEXO C). O LQ foi calculado através do branco da amostra com a menor concentração do analito e analisadas 27 replicatas (conforme Equação 3)¹⁹.

$$\text{LD} = 0 + t(n-1, 1-\alpha) \cdot S \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{LQ} = 0 + 10 \cdot S \quad \text{Equação 3}$$

2.5.4 | Tendência

A tendência foi avaliada através do cálculo de seis repetições do padrão GISP, pois este tem valor conhecido de -24,78%, ao contrário do VSMOW, cujo valor é zero. Dividiu-se o valor observado pelo valor esperado e multiplicou-se por 100% (conforme Equação 4)¹⁹. Avaliou-se a tendência pelos critérios da AOAC (2016)²⁰.

$$Tendência = \frac{valor\ observado}{valor\ esperado} \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

2.5.5 | Recuperação

A recuperação foi calculada através da análise do $\delta^{18}\text{O}$ de diferentes concentrações de água adicionada ao suco de uva, conforme Equação 5¹⁹. As concentrações analisadas, em triplicata, foram de 20; 30; 50; 75; 90 e 99,5%, e utilizados os critérios de aceitação para recuperação da AOAC (2016)²⁰.

$$Recuperação (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

2.5.6 | Exatidão

A exatidão foi avaliada através da determinação do $\delta^{18}\text{O}$ de 27 repetições do padrão GISP. Os valores médios e o desvio padrão dos ensaios foram comparados com o valor real do padrão (-24,78‰) e calculado o índice Z (z-score), de acordo com a Equação 6¹⁹.

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad \text{Equação 6}$$

2.5.7 | Repetibilidade

Para determinar a repetibilidade, foram realizadas 27 repetições em um mesmo suco, no mesmo dia, com o mesmo analista e equipamento, e sob as mesmas condições. O resultado foi expresso pelo coeficiente de variação (desvio padrão relativo), conforme Equação 7¹⁹, e o critério de aceitação foi baseado na AOAC (2016)²⁰.

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \quad \text{Equação 7}$$

2.5.8 | Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi realizada através de comparação interlaboratorial internacional realizado pela Eurofins Scientific Brasil em 2018, considerando o z-score ($-2 < Z < 2$).

2.5.9 | Precisão intermediária

A precisão intermediária foi calculada através da variação da leitura do $\delta^{18}\text{O}$ de duas matrizes diferentes, sendo elas água (padrão VSMOW) e suco de uva, o resultado foi calculado conforme INMETRO (2018)¹⁹.

2.5.10 | Robustez

Na avaliação da robustez do método, foi realizado um teste de variação da temperatura do bloco do amostrador automático do Delta V, nas temperaturas de 24°C, 25°C, 26°C e 27°C, para verificar se esse parâmetro interfere nos resultados das análises.

2.5.11 | Incerteza de medição

A incerteza de medição do método foi calculada conforme o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2018)¹⁹, considerando a distribuição dos dados segundo o guia para incerteza de medição RM 68 da Rede Metrológica (2013)²¹ do Rio Grande do Sul.

2.6 | Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram avaliados com o programa SPSS 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences for Windows*), através das médias e desvios padrão, análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Tukey ao nível de significância de 5%. Para os testes com as tampas abertas do item 2.3, foi realizado o Teste t para amostras pareadas.

Para o cálculo dos valores de referência isotópicos utiliza-se a média ponderada. Para se obter a média ponderada, o valor isotópico de cada amostra de uva é multiplicado pelo total da produção de uvas, em kg, declarados por cada produtor, relativos à safra do ano anterior (ANEXO B). Então, divide-se o valor encontrado pela soma do total de kg e obtêm-se o valor ponderado. Assim, o efeito da ponderação é equilibrar o impacto do volume de produção em função das amostras de uvas.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 | Validação do método

Os resultados referentes à validação do método para determinação de água exógena em suco de uva são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Resultados da validação do método para determinação de água em suco de uva

Parâmetros	Resultados	Parâmetros ¹⁹
Seletividade	$1,2 < 3,44$	$F_c < F_t$. É seletivo.
Linearidade (R^2)	0,998	Satisfatório ²² .
LD (‰)	0,24	Menor concentração detectável do analito.
LQ (‰)	0,97	Menor concentração detectável com precisão.
Recuperação (%)	101	Satisfatório ²⁰ .
Tendência (%)	99,32	Satisfatório ²⁰ .
Exatidão (z-score) (%)	1,37	Satisfatório, pois $z \leq 2$ ¹⁹ .
Repetibilidade (CV) (‰)	0,48	Satisfatório ²⁰ .
Precisão Intermediária (‰)	0,24	Controle da dispersão do método.
Robustez (°C)	25	Temperatura ideal de análise.
Incerteza de Medição (‰)	0,71	Satisfatório ²³ .

LD (Limite de detecção); LQ (limite de quantificação) CV (coeficiente de variação ou desvio padrão relativo).

O método mostrou-se seletivo tanto para suco de uva tinto integral quanto para água (padrão VSMOW). A seletividade foi comprovada através do teste F, onde o $F_{\text{calculado}}$ foi de 1,2, sendo menor do que o F_{tabelado} de 3,44. Portanto, a matriz não interfere no método de determinação.

Considerando os resultados da seletividade, foi utilizada uma matriz de suco de uva tinto integral para compor a linearidade. Sendo assim, foram preparadas 11 concentrações de água adicionada ao suco. Os dados de linearidade encontram-se dispostos na Figura 2. Nela, observou-se que a curva analítica apresentou resultados lineares na faixa de trabalho das concentrações estudadas, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,998, evidenciando ajuste das correlações na regressão linear²².

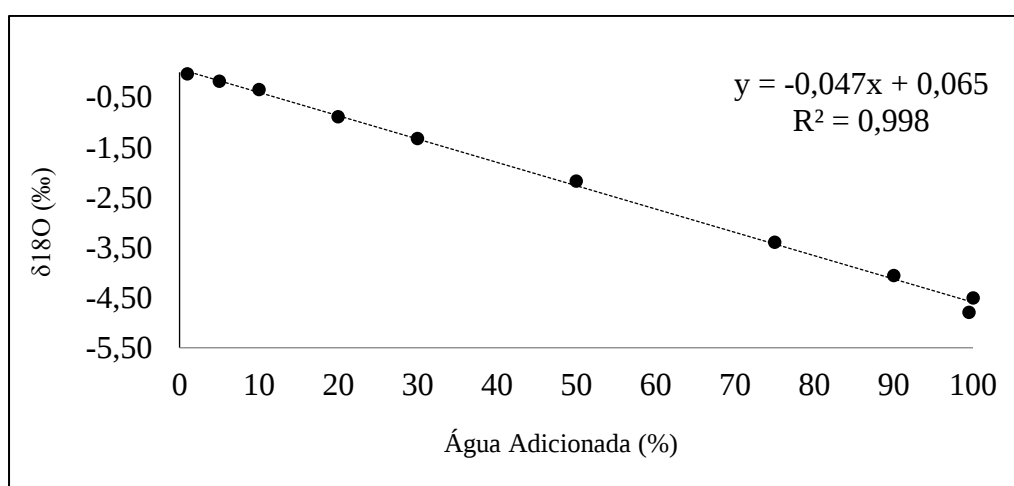


Figura 2 Representação da linearidade do método em suco de uva adicionado de água

O perfil dos resíduos, demonstraram-se aleatórios, o que significa a ausência de erros sistemáticos e tendências na sua variabilidade ao longo dos diferentes pontos (Figura 3).

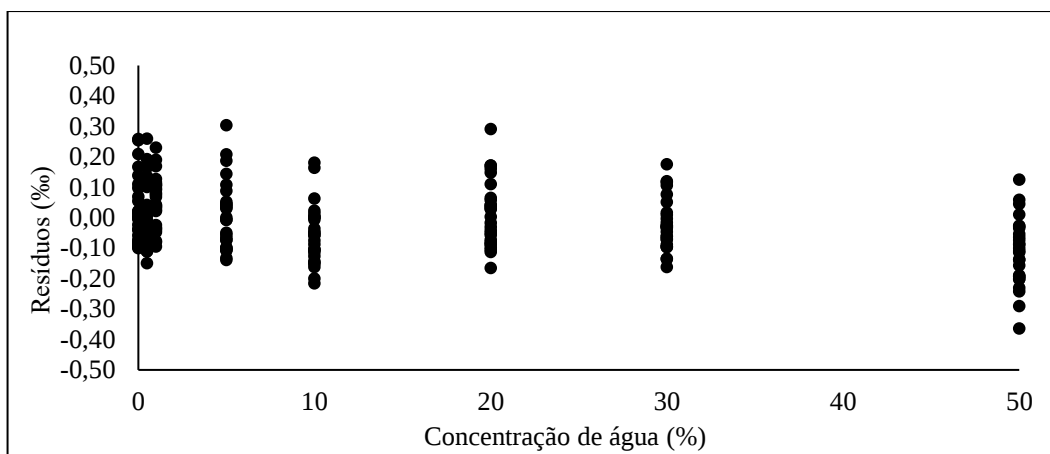


Figura 3 Representação gráfica dos resíduos relacionados com a concentração de água adicionada a um suco de uva tinto integral

Os resultados obtidos para os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,24‰ e 0,97‰, respectivamente. A recuperação do método demonstrou-se adequada, pois obteve-se uma recuperação média de 101%, assim como uma tendência de 99,32%, estando de acordo com os parâmetros propostos pela AOAC (2016)²⁰.

A precisão do método foi comprovada, com repetibilidade aceitável e coeficiente de variação de 0,48%, sendo inferior ao proposto pela AOAC (2016)²⁰ que, para a concentração de 100% do analito, é de 1,3%. Da mesma forma, a reprodutibilidade foi avaliada com o z-score, através de interlaboratorial internacional, onde o resultado obtido foi de 0,25, também considerado satisfatório ($-2 < Z < 2$).

Os resultados da exatidão são considerados satisfatórios¹⁹ por estarem dentro dos limites aceitos para a validação de métodos (Tabela 1). Os resultados obtidos para o teste de robustez mostraram que a temperatura utilizada no amostrador automático que menos variou foi a de 25°C (Figura 4), sendo esta a temperatura utilizada pelo método de determinação de $\delta^{18}\text{O}$ por IRMS, demonstrando ser a temperatura ideal de análise.

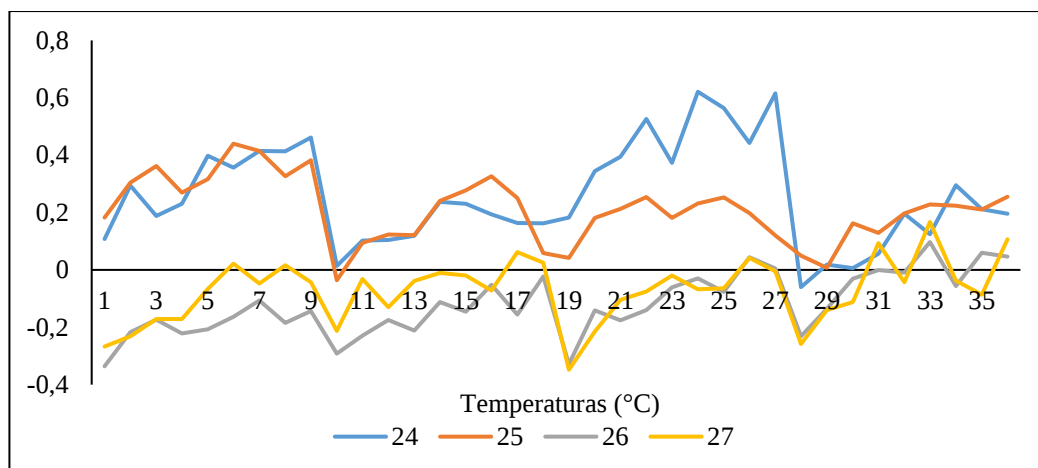


Figura 4 Resultados do teste de variação da temperatura do bloco do amostrador automático

Para finalizar a validação do método, foi calculada a incerteza de medição, considerando todas as possíveis interferências. O resultado encontrado foi de 0,71%, sendo caracterizado como adequado quando comparado a outros métodos, como por exemplo, o método oficial para determinação de água exógena em vinhos no Brasil que é de 0,55%²³.

3.2 | Efeito da temperatura no fracionamento isotópico em sucos experimentais

No processo de elaboração do suco de uva ocorre um aumento de temperatura, para tanto, neste teste foi avaliado se essa temperatura influencia nos valores isotópicos de $\delta^{18}\text{O}$. Este aspecto é importante, pois os valores isotópicos de referência foram construídos em mostos que não passaram pelo processo de aquecimento e para que estes dados sejam válidos, devemos certificar que os valores de $\delta^{18}\text{O}$ não são influenciados pelo processo de elaboração do suco.

Os valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ dos mostos das uvas *Vitis labruscas* brancas e tintas, aquecidos nos tempos de 15 e 30 min em diferentes temperaturas, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 Valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ das amostras submetidas a diferentes temperaturas durante o tempo de 15 e 30 min, expressos em ‰

Variedade	Amostras	Temperaturas (°C) para 15 min de exposição				
		0	50	80	90	95
Bordô	1	3,25 ^a ±0,10	3,04 ^b ±0,10	3,39 ^c ±0,10	3,21 ^a ±0,10	3,35 ^c ±0,16
	2	1,50 ^a ±0,11	1,57 ^b ±0,09	1,58 ^b ±0,06	1,57 ^b ±0,07	1,56 ^{ab} ±0,06
	3	0,19 ^a ±0,12	0,43 ^b ±0,10	0,32 ^c ±0,11	0,59 ^d ±0,09	0,43 ^b ±0,12
Concord	4	-0,08 ^a ±0,13	-0,03 ^a ±0,11	-0,54 ^c ±0,07	-0,19 ^{ab} ±0,06	0,05 ^d ±0,06
	5	-0,08 ^a ±0,13	-0,11 ^a ±0,09	0,10 ^b ±0,07	0,38 ^c ±0,08	0,62 ^d ±0,07
	6	1,32 ^{ac} ±0,09	0,88 ^b ±0,05	1,17 ^d ±0,07	1,26 ^c ±0,10	1,38 ^a ±0,09
Isabel	7	-1,13 ^a ±0,11	-0,93 ^b ±0,17	-1,16 ^a ±0,07	-1,15 ^a ±0,08	-1,01 ^b ±0,07
	8	-1,63 ^a ±0,08	-1,08 ^b ±0,07	-1,43 ^c ±0,15	-1,49 ^c ±0,08	-1,07 ^b ±0,10
	9	-1,62 ^a ±0,07	-1,14 ^b ±0,09	-1,10 ^b ±0,11	-1,38 ^c ±0,11	-1,13 ^b ±0,08
Niágara Branca	10	-0,39 ^a ±0,05	-0,41 ^a ±0,05	-0,10 ^b ±0,07	-0,15 ^{bc} ±0,07	-0,21 ^c ±0,07
	11	-0,45 ^a ±0,13	-0,49 ^{ac} ±0,06	-0,47 ^{ac} ±0,09	-0,65 ^b ±0,09	-0,56 ^{bc} ±0,09
	12	-1,22 ^a ±0,09	-1,20 ^a ±0,08	-0,97 ^b ±0,06	-0,95 ^b ±0,07	-1,17 ^a ±0,05
Temperaturas (°C) para 30 min de exposição						
Bordô	1	3,25 ^{ac} ±0,10	3,18 ^a ±0,07	3,07 ^b ±0,10	3,29 ^{ac} ±0,09	3,36 ^{ac} ±0,08
	2	1,50 ^{ac} ±0,11	1,68 ^b ±0,08	1,58 ^{ac} ±0,06	1,57 ^{ac} ±0,08	1,56 ^{ac} ±0,09
	3	0,19 ^a ±0,12	0,05 ^b ±0,14	0,12 ^{ac} ±0,12	0,12 ^{ac} ±0,08	0,08 ^{abc} ±0,09
Concord	4	-0,08 ^a ±0,13	-0,60 ^c ±0,09	-0,18 ^b ±0,05	-0,18 ^b ±0,09	0,05 ^d ±0,06
	5	-0,08 ^a ±0,13	-0,07 ^a ±0,08	0,00 ^a ±0,09	0,81 ^b ±0,07	0,75 ^b ±0,09
	6	1,32 ^a ±0,09	0,99 ^b ±0,05	1,33 ^a ±0,05	1,30 ^a ±0,07	1,06 ^b ±0,12
Isabel	7	-1,13 ^a ±0,11	-1,25 ^b ±0,13	-1,12 ^a ±0,10	-1,07 ^{ac} ±0,06	-1,02 ^{ac} ±0,06
	8	-1,63 ^a ±0,08	-1,29 ^b ±0,10	-1,30 ^b ±0,12	-1,89 ^d ±0,26	-0,99 ^c ±0,12
	9	-1,62 ^a ±0,07	-1,22 ^b ±0,10	-1,03 ^c ±0,10	-1,05 ^c ±0,11	-1,16 ^b ±0,10
Niágara Branca	10	-0,39 ^a ±0,05	-0,39 ^a ±0,06	-0,34 ^{ab} ±0,13	-0,30 ^b ±0,06	-0,09 ^c ±0,07
	11	-0,45 ^a ±0,13	-0,29 ^b ±0,10	-0,32 ^b ±0,08	-0,42 ^a ±0,09	-0,45 ^a ±0,09
	12	-1,22 ^a ±0,09	-1,23 ^a ±0,07	-1,32 ^b ±0,03	-1,00 ^c ±0,06	-0,97 ^c ±0,04

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Alguns resultados apresentam diferenças estatística significativas, entretanto, não se pode afirmar que houve um aumento ou decréscimo dos valores isotópicos em função da temperatura, independentemente do tempo de exposição, demonstrando que a variação nos resultados de $\delta^{18}\text{O}$ foi aleatória. Desta forma, pode-se dizer que as variações ocorridas podem ser consequência do próprio método de determinação, visto que as mesmas são inferiores à incerteza de medição calculada.

3.3 | Efeito da evaporação no valor de $\delta^{18}\text{O}$ em sucos experimentais

Este estudo foi necessário, pois diversos autores relatam que um fracionamento isotópico pode ocorrer devido ao aquecimento, sendo que a extensão desse fracionamento depende de fatores como umidade relativa e temperatura^{24,25}. Foi possível observar que os resultados isotópicos, após o aquecimento dos sucos tanto com tampa aberta (TA), quanto com tampa fechada (TF) (Tabela 3), não apresentaram diferenças estatísticas significativas, demonstrando que o aquecimento que ocorre durante o processo de elaboração dos sucos não interfere nos resultados isotópicos e, conseqüentemente, não influenciam o método de análise.

O enriquecimento isotópico ocorre naturalmente durante o desenvolvimento da videira, de forma que os níveis de ^{18}O na água da uva são significativamente maiores do que nas águas subterrâneas ou de irrigação, que são absorvidas pelo sistema radicular da planta. Este enriquecimento está geralmente ligado à perda dos isótopos ^{16}O (mais leves) durante a evapotranspiração foliar, com conseqüente enriquecimento da água da uva em isótopos ^{18}O (mais pesados)²⁶. Outros autores afirmam que a fruta cultivada em climas quentes e secos tem enriquecimento isotópico maior do que frutas cultivadas em áreas mais frias e úmidas²⁵.

Porém, nosso estudo demonstrou que o efeito da evaporação é insignificante nas temperaturas aplicadas no processo de elaboração dos sucos. Neste sentido, no método de elaboração do suco pelo trocador de calor não há contato com o ar atmosférico, os fluidos no

sistema estão em contato próximo um com o outro, mas são impedidos de serem misturados por uma barreira física, sendo o trocador de calor um sistema fechado²⁷.

Além disso, foi observado que tanto na avaliação da influência da temperatura (item 3.2) como a da evaporação, os valores isotópicos apresentaram diferenças inferiores à própria incerteza do método. Desta forma, podemos afirmar que os valores de referência para suco podem ser provenientes dos mostos, sem prejudicar a interpretação dos resultados no suco final. Diversos estudos^{28,29,30,31,32} demonstraram que a análise da razão isotópica do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ é uma boa ferramenta para caracterizar a origem e detectar adição ilegal de água em bebidas. Portanto, a metodologia posposta no presente estudo pode ser aplicada para a detecção de adição de água exógena em sucos de uva elaborados pelo sistema trocador de calor.

Tabela 3 Valores de $\delta^{18}\text{O}$ das amostras submetidas a aquecimento com as tampas fechadas (TF) e abertas (TA) em diferentes temperaturas durante 15 e 30 min, expressos em ‰

Variedades	Amostras	Temperatura (°C) para 15 min de exposição									
		0		50		80		90		95	
		TF		TA		TF		TA		TF	
Isabel	7	-1,13±0,11	-1,05±0,13	-0,93±0,17	-1,16±0,07	-1,07±0,05	-1,15±0,08	-0,76±0,07	-1,01±0,07	-0,76±0,09	
	8	-1,63±0,08	-1,45±0,12	-1,08±0,07	-1,43±0,15	-0,99±0,07	-1,49±0,08	-0,85±0,09	-1,07±0,10	-0,81±0,09	
	9	-1,62±0,07	-1,37±0,07	-1,14±0,09	-1,10±0,11	-0,13±0,12	-1,38±0,11	-1,04±0,06	-1,26±0,10	-1,13±0,08	
Niágara Branca	11	-0,45±0,13	-0,49±0,06	-0,38±0,08	-0,47±0,09	-0,20±0,09	-0,65±0,09	-0,17±0,06	-0,56±0,09	0,39±0,06	
	12	-1,22±0,09	-1,35±0,06	-1,20±0,08	-1,02±0,05	-0,97±0,06	-0,95±0,07	-0,89±0,04	-1,17±0,05	-0,62±0,08	
Temperaturas (°C) para 30 min de exposição											
Isabel	7	-1,13±0,11	-1,25±0,13	-1,16±0,08	-1,14±0,11	-1,12±0,10	-1,07±0,06	-0,70±0,05	-1,02±0,06	-0,57±0,11	
	8	-1,63±0,08	-1,66±0,09	-1,29±0,10	-1,30±0,12	-1,00±0,06	-1,89±0,26	-1,26±0,08	-0,99±0,12	-0,68±0,11	
	9	-1,62±0,07	-1,33±0,09	-1,22±0,10	-1,12±0,07	-1,03±0,10	-1,07±0,11	-1,05±0,11	-1,16±0,10	-0,84±0,10	
Niágara Branca	11	-0,45±0,13	-0,35±0,09	-0,29±0,10	-0,32±0,08	-0,30±0,13	-0,42±0,09	-0,19±0,08	-0,45±0,09	0,02±0,11	
	12	-1,22±0,09	-1,27±0,06	-1,23±0,07	-1,32±0,03	-0,84±0,05	-1,00±0,06	-0,67±0,07	-0,97±0,04	-0,14±0,05	

Não houve diferença estatística através do Teste t – Pareado

3.4 | $\delta^{18}\text{O}$ de mostos e sucos industriais

Outro fator importante a ser considerado é avaliar a influência, nos valores $\delta^{18}\text{O}$, do processo de elaboração do suco em escala industrial. Através da análise da razão isotópica das amostras coletadas na indústria, no início e no final do processo de elaboração do suco, encontraram-se valores que variaram de -2,92‰ a -1,60‰ para mostos iniciais e de -2,49‰ a -1,41‰ para sucos finais. A partir desses dados, calculou-se a regressão linear e encontrou-se a equação de reta ($y = ax + b$) e o coeficiente de determinação (R^2). A equação de reta estabeleceu a relação entre o mosto inicial e o suco final e foi $y = 0,90x + 0,13$, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,96 (Figura 5), demonstrando uma correlação forte entre os resultados²².

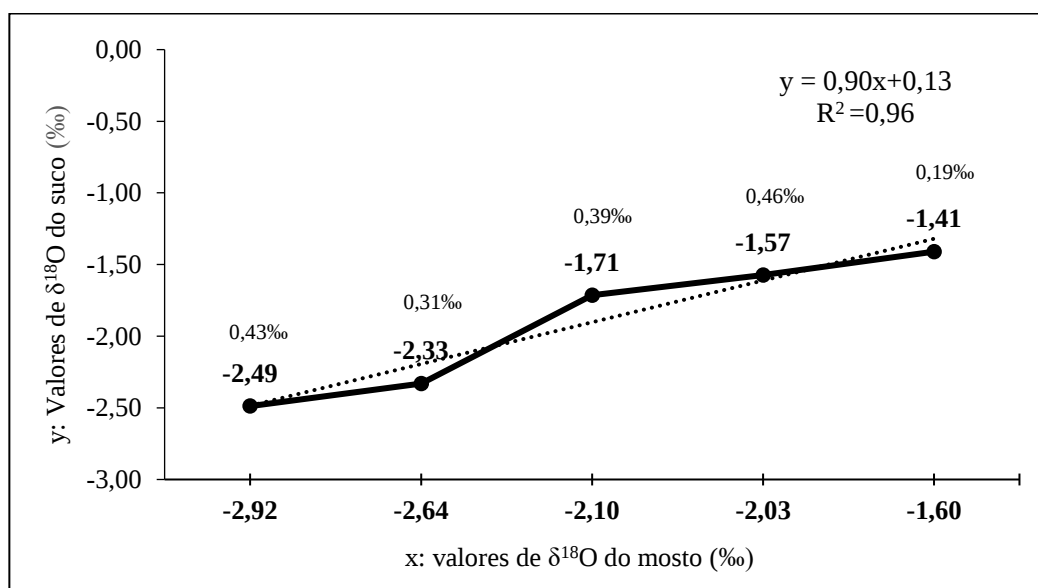


Figura 5 Regressão linear entre mostos e sucos de amostras industriais

As pequenas diferenças isotópicas encontradas entre os valores dos mostos e sucos correspondentes, foram inferiores ao valor de incerteza de medição do método que é de 0,71‰, mostrando que o processo do sistema trocador de calor não interfere significativamente nos resultados finais. Além disso, os valores mais positivos dos sucos em relação aos mostos evidenciaram que não houve incorporação de água exógena, uma vez que

a água apresenta valores de $\delta^{18}\text{O}$ inferiores. Em estudos de águas de precipitação foram encontrados valores de $\delta^{18}\text{O}$, variando de -28,10 a -3,23‰, com média de -6,54‰ em amostras de chuva coletadas em Indiana, nos Estados Unidos. Já águas da Suíça apresentaram valores de -9,05‰³³. Em águas de lagoas brasileiras, os valores encontrados variaram de -7,30 a -5,24‰, com valores mais altos em áreas de alta evaporação³⁴. Estes resultados comprovam que a adição de água exógena tornaria os resultados mais negativos, fato que não ocorreu neste estudo.

Considerando a forte correlação entre os resultados de $\delta^{18}\text{O}$ do mosto inicial e do suco final, foi utilizada a regressão linear encontrada para construir os valores de referência dos sucos autênticos. Desta forma, os valores de referência calculados para o suco a partir do mosto foram utilizados para verificar a autenticidade de sucos reais, ou seja, valores abaixo dos limites de referência são um indicativo de adição de água exógena.

3.5 | Valores isotópicos de referência para sucos

Na Tabela 4 são apresentados os valores de referência separados em tintos e brancos, permitindo a comparação com os sucos comerciais que, em sua maioria, não possuem informação de variedade no rótulo. Portanto, se o suco é branco confronta-se com os resultados das uvas brancas, se o suco é tinto relaciona-se aos resultados de referência das uvas tintas. Os dados detalhados estão apresentados no ANEXO B.

Tabela 4 Valores de referência de $\delta^{18}\text{O}$ para mostos e sucos separados em uvas tintas e brancas

Grupos	Razão isotópica (‰)		Mostos (‰)	Sucos (‰) $y = 0,90x + 0,13$
	Média ponderada	DP		
Uvas tintas comuns (n=159)	0,34	0,82	-1,01	-0,78
Uvas brancas comuns (n=18)	-0,28	0,86	-1,69	-1,39

Na Tabela 5 apresentam-se os valores de referência específicos para cada variedade. Quando há a informação da variedade da uva no rótulo do suco, a avaliação é muito mais precisa, pois se trabalha com um contingente mais específico, minimizando a influência da variedade no valor de referência, conferindo mais segurança ao resultado final ao afirmar se há ou não presença de água no suco.

Tabela 5 Valores de referência de $\delta^{18}\text{O}$ para mostos de uvas Bordô, Isabel, Concord e Niágara Branca

Variedades	Razão isotópica (‰)		Mostos (‰)	Sucos (‰) $y = 0,90x + 0,13$
	Média ponderada	DP		
Bordô (n=57)	0,65	1,00	-0,99	-0,76
Isabel (n=62)	0,11	0,61	-0,89	-0,67
Concord (n=22)	0,36	0,52	-0,49	-0,31
Niágara Branca (n=11)	0,49	0,63	-0,55	-0,36

Os valores de referência englobam diferentes tipos de uvas de regiões distintas, o que gera uma grande amplitude de variação nos resultados isotópicos, sendo estes tanto positivos quanto negativos. Este fato leva ao desvio padrão ser maior que a média ponderada nas Tabelas 4 e 5.

Os resultados deste trabalho estão muito próximos aos encontrados em estudo realizado com uvas e vinhos finos da mesma região (Serra Gaúcha), porém da safra 2007³⁵. Para a variedade Merlot, foram encontrados valores de 0,38‰ e para Cabernet Sauvignon, de 0,28‰. A diferença de valores encontrados pode ser atribuída ao fenótipo da variedade ou ainda, pelas condições climáticas diferentes da safra uma vez que valores negativos de $\delta^{18}\text{O}$ podem indicar condições climáticas particulares e chuvas durante a colheita da uva³⁶. Fatores que influenciam muito os valores de $\delta^{18}\text{O}$ são modificados durante o amadurecimento e o período da colheita³⁷. A influência do clima e da safra justificam a necessidade de encontrar

os valores de referência para cada safra, para considerar a variação isotópica na interpretação dos resultados³⁸.

3.5.1 | Interpretação dos valores isotópicos de referência para sucos

O resultado da análise isotópica de água exógena é normalmente expressa em presença ou ausência. Em todas as formas de interpretação deve-se levar em consideração a incerteza de medição do método (conforme ANEXO D). Para os sucos serem considerados com presença de água exógena, os valores da razão isotópica do suco devem ser inferiores aos valores de referência. Para serem considerados com ausência de água exógena, os valores da razão isotópica do suco devem ser superiores aos valores de referência. Para os sucos que, considerando a incerteza de medição, estiverem em uma faixa entre presença e ausência de água exógena, neste trabalho, considerou-se como ausência de água exógena.

3.6 | $\delta^{18}\text{O}$ de sucos reais

Na Tabela 6 são apresentados os valores de $\delta^{18}\text{O}$ de sucos reais. Os valores dos sucos foram comparados aos valores de referência encontrados nas Tabelas 4 e 5 e interpretados como presença ou ausência de água.

Tabela 6 Valores de $\delta^{18}\text{O}$ de sucos reais comparados com valores da referência de mostos uvas *Vitis labrusca*

Identificação	Sucos de uva tintos	$\delta^{18}\text{O}$ (‰)	Interpretação
1	Suco de uva tinto integral	$-3,64 \pm 0,11$	Presença
2	Suco de uva tinto integral	$-0,80 \pm 0,15$	Ausência
3	Suco de uva tinto integral	$-0,67 \pm 0,15$	Ausência
4	Suco de uva tinto integral	$-1,54 \pm 0,11$	Presença
5	Suco de uva tinto	$-4,44 \pm 0,07$	Presença
6	Suco de uva tinto integral	$-0,75 \pm 0,13$	Ausência
7	Suco de uva tinto integral	$-1,07 \pm 0,14$	Ausência
8	Suco de uva tinto integral	$-2,46 \pm 0,11$	Presença

9	Suco de uva tinto integral	-0,57 ± 0,13	Ausência
10	Suco de uva tinto integral	-0,42 ± 0,15	Ausência
11	Suco de uva tinto	-4,40 ± 0,16	Presença
12	Suco de uva tinto integral	-1,05 ± 0,15	Ausência
13	Suco de uva tinto	-4,90 ± 0,21	Presença
14	Suco de uva tinto integral	-0,79 ± 0,13	Ausência
15	Suco de uva tinto integral	-0,77 ± 0,08	Ausência
16	Suco de uva tinto integral	-1,02 ± 0,10	Ausência
17	Suco de uva tinto integral	-2,06 ± 0,12	Presença
18	Suco de uva tinto integral	-2,08 ± 0,07	Presença
19	Suco de uva tinto integral	-2,30 ± 0,09	Presença
20	Suco de uva tinto integral	0,19 ± 0,12	Ausência
21	Suco de uva tinto integral	-1,04 ± 0,15	Ausência
22	Suco de uva tinto integral	-4,69 ± 0,10	Presença
23	Suco de uva tinto integral	0,26 ± 0,14	Ausência
24	Suco de uva tinto integral	0,02 ± 0,12	Ausência
25	Suco de uva tinto integral	0,62 ± 0,13	Ausência
26	Suco de uva tinto integral	-0,95 ± 0,12	Ausência
27	Suco de uva tinto integral	0,13 ± 0,06	Ausência
Sucos de uva brancos “100% integrais”			
28	Suco de uva branco integral	-0,72 ± 0,06	Ausência
29	Suco de uva branco integral	-4,50 ± 0,06	Presença
30	Suco de uva branco integral	-7,15 ± 0,05	Presença

Os resultados dos sucos tintos declarados “100% integrais” variaram de -4,90‰ (amostra 22) a 0,62‰ (amostra 25), sendo -0,78‰ o valor de referência para uvas tintas. Esses números foram inferiores a um estudo que investigou a caracterização isotópica em sucos de frutas, cujos valores para sucos de uva variaram de -2,7‰ a 6,7‰³⁹.

Os sucos de números 1, 4, 8, 17, 18, 19 e 22 obtiveram valores mais negativos em relação ao valor de referência para uvas tintas, resultando em presença de água exógena, mesmo declarados no rótulo como sendo sucos “100% integral”. Neste sentido, um estudo avaliou a variação isotópica do oxigênio de sucos de frutas em função do conteúdo de água

adicionado. A adição de 41% de água modificou o valor isotópico do oxigênio em torno de 2‰, de -5,5‰, para -7,5‰, sendo -10,5‰ o valor isotópico da água utilizada neste estudo³². Então, quando a água exógena é adicionada, o valor de $\delta^{18}\text{O}$ do suco diminui linearmente⁴⁰. Portanto, valores mais negativos da razão isotópica do oxigênio da água no suco podem indicar a adição de água, caracterizando potenciais adulterações.

Os sucos de números 5, 11 e 13 se denominam “100% suco de uva”, porém, o primeiro ingrediente que consta no rótulo é água. Esse fato foi confirmado pelos valores de $\delta^{18}\text{O}$ mais negativos dos sucos (-4,44‰, -4,40‰, e -4,90‰) quando comparados com o valor de referência para uvas tintas (-0,78‰). No entanto, nenhum destes sucos apresentam no rótulo a palavra “integral”, podendo os mesmos serem caracterizados como “suco de uva reconstituído”, estando de acordo com a legislação. A designação “integral” é exclusiva do suco na sua concentração natural e sem adição de açúcares, água, corantes ou aromas, sendo proibido o uso desta denominação para “suco reconstituído”⁴¹.

Os sucos de números 20, 23, 24 e 25 não apresentaram água em sua composição, pois são mais positivos que o valor de referência para uvas tintas. Por sua vez, os sucos de números 2, 3, 6, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 21, 26 e 27 quando comparados ao valor de referência de -0,78‰ e, levando em conta, a incerteza de medição de 0,71‰, podem ser considerados tanto com presença como com ausência de água exógena. Neste estudo, estes sucos serão interpretados com ausência de água. O mesmo ocorreu para o suco de número 7, o qual declara no rótulo ser “100% de uvas Isabel”, onde o valor de referência para esta variedade de uva foi de -0,67‰ (Tabela 6) e o valor isotópico encontrado foi -1,07‰, considerado com ausência de água exógena.

Os sucos apresentados como sendo “suco de uva branco integral” (amostras 29 e 30), obtiveram valores bem mais negativos quando comparados ao valor de referência de -1,39‰ para uvas brancas, caracterizando presença de água. O suco de número 28 não apresentou

água em sua composição, visto que o resultado encontrado é mais positivo que o valor de referência.

5 | CONCLUSÃO

Os valores isotópicos encontrados apresentaram diferenças inferiores à incerteza do método, demonstrando que tanto a temperatura quanto a evaporação não influenciaram os resultados do $\delta^{18}\text{O}$ do suco. A forte correlação encontrada nos valores entre mostos e sucos em escala industrial mostraram que o trocador de calor não exerce influência sobre o método. Foi possível concluir também que os valores de referência para suco podem ser provenientes dos mostos, sem prejudicar a interpretação dos resultados finais. Dos trinta sucos reais analisados, oito apresentaram água exógena em sua composição, três demonstraram ser sucos reconstituídos e dezenove sucos foram considerados com ausência de água exógena, quando comparados aos valores de referência relacionados ao tipo de uva ou variedade específica. A metodologia proposta e validada neste estudo encontrou valores para o LD de 0,24‰, LQ de 0,97‰ e incerteza de medição de 0,71‰, mostrando-se eficaz para a detecção de água exógena em suco de uva, através da análise da razão isotópica do $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ por IRMS, a qual poderá ser aplicada na rotina de laboratório para avaliação de sucos reais.

REFERÊNCIAS

1. Codex Alimentarius Commition. Codex General Standard for Fruit Juices and Nectars (Codex Stan 247-2005), 2005 www.fao.org/input/download/standards/10154/CXS_247e.pdf. Accessed June 15, 2019.
2. OIV. International Organisation of Vine and Wine. International Code of Oenological Practices. OIV Code Sheet (Issue 2017/01), 2017. <http://www.oiv.int/public/medias/5119/code-2017-en.pdf>. Accessed August 30, 2019.
3. Research and Markets. Fruit Juice Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2019-2024, 2019. https://www.researchandmarkets.com/research/vg6wjl/global_fruit?w=5. Accessed August 25, 2019.
4. AIJN. European Fruit Juice Association. Liquid fruit: market report, 2018.

- <https://aijn.eu/en/publications/market-reports-1/publication-2>. Accessed August 30, 2019.
5. ABIR. Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas. Revista ABIR, 2018/2019. <https://abir.org.br/abir/wp-content/uploads/2019/01/REVISTA-ABIR-2019.pdf>. Accessed August 31, 2019.
 6. IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. Do biodinâmico ao kosher, as apostas das vinícolas em nichos sucos de uva, 2019. <https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2019/07/do-biodinamico-ao-kosher-as-apostas-das-vinicolas-em-nichos-sucos-de-uva-cjyj34w7702fm01pbetg1ygqx.html>. Accessed August 03, 2019.
 7. Palade LM, Popa MW. Polyphenol Fingerprinting approaches in wine traceability and authenticity: assessment and implications of red wines. *Beverages*. 2018;4(75):1-18. DOI: 10.3390/beverages4040075.
 8. Włodarska K, Khmelinskii I, Sikorska E. Authentication of apple juice categories based on multivariate analysis of the synchronous fluorescence spectra. *Food Control*. 2018;86:42-49. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.11.004.
 9. Ammari F, Redjda L, Rutledge DN. (2015). Detection of orange juice frauds using front-face fluorescence spectroscopy and independent components analysis. *Food Chem*. 2015;168:211-217. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.110.
 10. Jandrić Z, Roberts D, Rathor M, Abraham A, Islam M, Cannavan A. Assessment of fruit juice authenticity using UPLC–QToF MS: A metabolomics approach. *Food Chem*. 2014;148:7-17. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.10.014.
 11. Navarro-Pascual-Ahuir M, Lerma-García MAJ, Simó-Alfonso EF, Herrero-Martínez JM. Rapid differentiation of commercial juices and blends by using sugar profiles obtained by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. *J Agric Food Chem*. 2015;63(10):2639-2646. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00122.
 12. Ogrinc N, Bat K, Košir IJ, Golob T, Kokkinofa R. Characterization of commercial Slovenian and Cypriot fruit juices using stable isotopes. *J Agric Food Chem*. 2009;57(15):6764-6769. DOI: 10.1021/jf9009944.
 13. Rossmann A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Rev. Int*. 2001;17(3):347-381. DOI: 10.1081/FRI-100104704.
 14. van Leeuwen KA, Prenzler PD, Ryan D, Camin F. Gas Chromatography - Combustion - Isotope Ratio Mass Spectrometry for Traceability and Authenticity in Foods and Beverages. *Compr Rev Food Sci F*. 2014;13(5):814-837. DOI: 10.1111/1541-4337.12096.
 15. OIV. International Organisation of Vine and Wine. Mouillage - Détermination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau des vins. Resolution OENO 2/96, 1996. <http://www.oiv.int/public/medias/5533/recueil-2017-volume2-fr.pdf>. Accessed March 14, 2019.
 16. OIV. International Organisation of Vine and Wine. 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. Resolution OENO 17/2001, 2001. <http://www.oiv.int/public/medias/2496/oiv-ma-as312-06.pdf>. Accessed March 14, 2019.
 17. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 39, de 08 de agosto de 2007. Oficializa o método analítico para determinação da razão isotópica do carbono em suco, refresco, néctar e bebida de uva, 2007. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Accessed April 10, 2019.
 18. OIV. International Organisation of Vine and Wine. Method for $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope ratio determination of water in wines and must. Resolution OENO 353/2009. Method OIV-MA-AS2-12, 2009. <http://www.oiv.int/public/medias/2479/oiv-ma-as2-12.pdf>.

- Accessed March 14, 2019.
19. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, 2018. http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Accessed June 24, 2019.
 20. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Official Methods of Analysis. Gaithersburg: AOAC International, 2016. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf. Accessed June 26, 2019.
 21. Rede Metrológica do Rio Grande Do Sul. RM 68 - Incerteza de medição: guia prático do avaliador de laboratórios, 2013. http://www.redemetrologica.com.br/uploads/pages/15/1405816078_DOC_128. Accessed May 25, 2019.
 22. Samohyl RW. *Controle Estatístico de Qualidade*. 1st ed. São Paulo, SP: Elsevier; 2009.
 23. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 10, de 10 de abril de 2009. *Oficializa a metodologia analítica para determinação da razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água dos vinhos*, 2009. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/ivegetal/bebidas-arquivos/in-no-10-de-14-de-abril-de-2009.doc>. Accessed October 30, 2019.
 24. Holbach B, Förstel H, Otteneder H, Hützen H. The stable isotope ratio of ^{18}O and ^{16}O as a mean to evaluate foreign wine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1994;198(3):223-229.
 25. Simpkins, WA, Patel G, Collins P, Harrison M, Goldberg D. Oxygen Isotope Ratios of Juice Water in Australian Oranges and Concentrates. *J Agric Food Chem.* 1999;47(7):2606-2612. DOI: 10.1021/jf981045a.
 26. Kim K, Lee X. Isotopic enrichment of liquid water during evaporation from water surfaces. *J Hydrol.* 2011;399(3):364-375. DOI: 10.1016/j.jhydrol.2011.01.008.
 27. Rašković P, Anastasovski A, Markosvska L, Meško V. Process integration in bioprocess industry waste heat recovery in yeast and ethyl alcohol plant. *J. Energy.* 2010;35(2):704-717. DOI:10.1016/j.energy.2009.11.020.
 28. Dordevic N, Camin F, Marianella RM, Postma GJ, Buydens LMC, Wehrens R. Detecting the addition of sugar and water to wine. *Aust J Grape Wine R.* 2013;19:324-330. DOI: 10.1111/ajgw.12043.
 29. Perini M, Rolle L, Franceschi P, et al. H, C, and O Stable Isotope Ratios of Passito Wine. *J Agric Food Chem.* 2015;63(25):5851-5857. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02127.
 30. Thomas F, Jamin E, Hammond D. ^{18}O Internal Referencing Method to Detect Water Addition in Wines and Fruit Juices: Interlaboratory Study. *J. AOAC Int.* 2013;96(3):615-624. DOI: 10.5740/jaoacint.12-339.
 31. Yunianta, Zhang, BL, Lees M, Martin GJ. Stable Isotope Fractionation in Fruit Juice Concentrates: Application to the Authentication of Grape and Orange Products. *J Agric Food Chem.* 1995;43(9):2411-2417. DOI: 10.1021/jf00057a018.
 32. Magdas DA, Cuna S, Cristea G, Ionete RE, Continel D. Stable isotopes determination in some Romanian wines. *Isot Environ Healt S.* 2012;48(2): 345-353. DOI: 10.1080/10256016.2012.661731.
 33. Tian C, Wang L, Farai K, Broxton WB. Stable isotope compositions ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{17}\text{O}$) of rainfall and snowfall in the central United States. *Sci. Rep.* 2018;8:6712. DOI: 10.1038/s41598-018-25102-7.
 34. Linhares GMG, Rubens MM, Pimenta RC, Scarpelli RP, dos Santos, EA. Stable isotope oxygen-18 and deuterium analysis in surface and groundwater of the Jequitibá Creek Basin, Sete Lagoas, Mg. International Nuclear Atlantic Conference (INAC). 2017; 22-27.
 35. Dutra SV, Adami L, Marcon AR, Carnieli GJ, Roani CA, Spinelli FR, Leonardelli S, Vanderlinde R. Characterization of wines according the geographical origin by

- analysis of isotopes and minerals and the influence of harvest on the isotope values. *Food Chem.* 2013;141(3):2148-2153. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.04.106.
36. Rossmann A, Reniero F, Moussa I, Schmidt HL, Versini G, Merle MH. Stable oxygen isotope content of water of EU data-bank wines from Italy, France and Germany. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1999;208(5):400-407. DOI: 10.1007/s002170050437.
 37. Ogrinc N, Kosir IJ, Kocjancic M, Kidric J. Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses. *J Agric Food Chem.* 2001;49:1432-1440. DOI: 10.1021/jf000911s.
 38. Camin F, Boner M, Bontempo L, et al. Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. *Trends Food Sci Tech.* 2017;61:176-187.
 39. Magdas DA, Vedeanu NS, Puscas R. The use of stable isotopes ratios for authentication of fruit juices. *Chem Pap.* 2012;66(2):152-155. DOI: 10.2478/s11696-011-0105-3.
 40. Bontempo L, Caruso R, Fiorillo M, et al. Stable isotope ratios of H, C, N and O in Italian citrus juices. *J Mass Spectrom.* 2014;49(9):785-791. DOI: 10.1002/jms.3420.
 41. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14 de 8 de fevereiro de 2018. *Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho e Derivados da Uva e do Vinho*. 47 ed. Brasil: Diário Oficial da União. 2018;(1):4-6.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- A metodologia proposta neste estudo apresentou-se linear na faixa de concentração de trabalho, precisa, exata, específica e seletiva, o que garantiu resultados analíticos confiáveis que, posteriormente, poderão ser aplicados na rotina de laboratório para avaliação de sucos comerciais.
- A variação nos resultados de $\delta^{18}\text{O}$, independente da temperatura utilizada, mostrou-se aleatória. Os testes de evaporação não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Os valores isotópicos encontrados nestes testes apresentaram diferenças inferiores à incerteza do método, demonstrando que tanto a temperatura quanto a evaporação não influenciaram os resultados do $\delta^{18}\text{O}$ dos sucos.
- A forte correlação encontrada entre mosto inicial e suco final ($R^2 = 0,96$) dos sucos em escala industrial, mostrou que o processo do sistema trocador de calor não influencia significativamente nos resultados. A equação da reta encontrada pôde ser utilizada para construir os valores de referência dos sucos autênticos a partir dos mostos.
- Os valores de referência isotópicos para suco podem ser provenientes dos mostos, sem prejudicar a interpretação dos resultados no suco final.
- Dos trinta sucos reais analisados, oito apresentaram água exógena em sua composição, três demonstraram ser sucos reconstituídos e dezenove sucos foram considerados com ausência de água exógena, quando comparados aos valores de referência relacionados ao tipo de uva ou variedade específica.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- A metodologia desenvolvida e validada neste estudo será proposta ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), para ser um método oficial de detecção de água exógena em suco de uva no Brasil, se tornando uma futura Instrução Normativa, para completar os Padrões de Identidade e Qualidade dos sucos de uva.
- Este estudo poderá ser complementado para sucos de uva obtidos por outros processos de elaboração: sistema *flash détente*, suquificador integral (utilizado para pequenos volumes de suco) e panela extratora (analisar o percentual de água que agrega neste sistema).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, M. (2008). **O vinho na era da técnica e da informação: um estudo sobre Brasil e Argentina**. 1 ed. Belo Horizonte: Autêntica, 288p.
- Albano, F. M.; Raya-Rodriguez, M. T. (2015). **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaaios Laboratoriais. Guia Prático**. 2 ed. Porto Alegre: Rede Metrológica – RS, 129p.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2013). Resolução RDC nº 08, de 06 de março de 2013. Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó. **Disponível (on line)** http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3352026/RDC_08_2013_COMP.pdf/ea34430b-4774-450c-bcc8-73919315b132 (23 de abril).
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (2016). **Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)**. Official Methods of Analysis. Gaithersburg: AOAC International, 18p.
- Barnabé, D.; Venturini Filho, W. G.; Bolini, H. M. A. (2007). Análise descritiva quantitativa de vinhos produzidos com uvas Niágara Rosada e Bordô. **Brazilian Journal of Food Technology**. 10(2): 122-129.
- Bender, A.; Costa, V. B.; Rodrigues, C. M.; Malgarim, M. B. (2016). Características sensoriais de sucos de uva elaborados com diferentes variedades e espécies. In: XIII Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa - Congrega Urcamp. Revista da Jornada de Pós-Graduação e pesquisa. ISSN: 1982-2960. São Gabriel, p. 1035. **Disponível (on line)** <http://revista.urcamp.tche.br/index.php/rcjpgp/article/view/1872/1235> (21 de março).
- BRASIL - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2007). Instrução Normativa nº 39, de 08 de agosto de 2007. Oficializa o método analítico para determinação da razão isotópica do carbono em suco, refresco, néctar e bebida de uva. **Disponível (on line)** <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal> (10 de abril).
- BRASIL - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2009). Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994 que dispõe sobre

a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Disponível (on line)**

<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal> (07 de setembro).

BRASIL - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2013). Instrução Normativa nº 42, de 11 de setembro de 2013. Altera a quantidade mínima de suco de fruta nos néctares de laranja e uva. **Disponível (on line)**
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal> (07 de setembro).

BRASIL - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2014). Decreto nº 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. **Disponível (on line)**
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal> (05 de novembro).

BRASIL - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2018). **Instrução Normativa nº 14 de 8 de fevereiro de 2018**. Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho e Derivados da Uva e do Vinho. 47 ed. Brasil: Diário Oficial da União, Seção 1, 4-6p.

Brice, J. (2014). Killing in More-than-human Spaces: Pasteurisation, Fungi, and the Metabolic Lives of Wine. **Environmental Humanities**. 4(1): 171-194. DOI: 10.1215/22011919-3614980.

Cabral, C. (2004). **A presença do vinho no Brasil: um pouco de história**. 1 ed. São Paulo: Editora De Cultura, 256p.

Calderone, G.; Guillou, C. (2008). Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages. **Food Chemistry**. 106(4): 1399-1405. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.01.080.

Camargo, U. A. (2008). **Porta-enxertos e cultivares de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho.

- Camargo, U. A.; Maia, J. D. G. (2005). Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil. *Sistemas de Produção*, nº 9. ISSN 1678-8761. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. **Disponível (on line)** <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/cultivares.htm> (13 de março).
- Camargo, U. A.; Maia, J. D. G.; Ritschel, P. S. (2010). Novas cultivares brasileiras de uva. 1ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 64p. **Disponível (on line)** <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/872373/1/LivroPatriciaFinal1.pdf> (13 de março).
- Camin, F.; Boner, M.; Bontempo, L.; Fauhl-Hassek, C.; Kelly, S. D.; Riedl, J. D; Rossmann, A. (2017). Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. **Trends in Food Science & Technology**. 61: 176-187. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.12.007.
- Carter, J. F.; Barwick, V. J. (Eds). (2011). **Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry**, FIRMS. 1 ed. ISBN 978-0-948926-31-0.
- Christoph, N.; Hermann, A.; Wachter, H. (2015). 25 Years authentication of wine with stable isotope analysis in the European Union – Review and outlook. **BIO Web of Conferences**. 5(02020): 1-8. DOI: 10.1051/bioconf/20150502020.
- Clark, I. D.; Fritz, P. (1997). **Environmental isotopes in hydrogeology**. Boca Raton: CRC Press/Lewis Publishers. 328p.
- Cordeiro, W. (2006). A viticultura em São Joaquim – SC: uma nova atividade no município. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil.
- Costa, J. C. D. (2015). Validação de um Método de Cromatografia de Alta Eficiência para Determinação de Conservantes em Géneros Alimentícios. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Engenharia Química. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa – PT, Portugal.
- Cristofoli, B. (2007). Influência do tempo de extração na composição e na razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água do suco de uva elaborado pelo método de arraste de vapor. **Monografia**.

Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia, Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves – RS, Brasil.

- Dalcin, M. S. (2008). **Vale dos Vinhedos: história, vinho e vida**. Bento Gonçalves: MSD Empreendimentos Culturais. Gráfica Pallotti, 240p.
- Dordevic, N.; Camin, F.; Marianella, R. M.; Postma, G. J.; Buydens, L. M. C., Wehrens, R. (2013). Detecting the addition of sugar and water to wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. 19: 324-330. DOI: 10.1111/ajgw.12043.
- Dunn, P. J. H.; Hai, L.; Malinovsky, D.; Goenaga-Infante, H. (2015). Simple spreadsheet templates for the determination of the measurement uncertainty of stable isotope ratio delta values. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**. 29(22): 2184-2186. DOI: 10.1002/rcm.7376.
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2008). Cadastro vitícola. Cultivares: Bordô. **Disponível (on line)** http://www.cnpuv.embrapa.br/cadastro-viticola/rs-2005-2007/html/cult_bordo.html (13 de março).
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2016a). Ampelografia da cultivar copa de videira Isabel. Embrapa Uva e Vinho. **Disponível (on line)** <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-imagens/-/midia/3136001/uva-isabel> (13 de março).
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2016b). Ampelografia da cultivar copa de videira Niágara Branca. Embrapa Uva e Vinho. **Disponível (on line)** <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-imagens/-/midia/3158001/uva-niagara-branca> (13 de março).
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2016c). Ampelografia da cultivar copa de videira Concord. Embrapa Uva e Vinho. **Disponível (on line)** <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-imagens/-/midia/3134002/uva-concord> (13 de março).
- EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural. (2005). **Normas técnicas para o cultivo da videira em Santa Catarina**. 2 ed. Florianópolis: Epagri. 67p.

- Facalde, I. (2011). A paisagem como representação espacial: a paisagem como símbolo das indicações geográficas de procedência de vinhos das regiões Vale dos Vinhedos, Pinto Bandeira e Monte Belo (Brasil). **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-graduação em Geografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brasil.
- Fauhl, C. (2006). Measurement uncertainty in wine appreciation. **Mitteilungen Klosterneuburg**. 56: 3-13.
- 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 – PT, Portugal.
- Granato, D.; Carrapeiro, M. M.; Fogliano, V.; Ruth, S. M. van. (2016). Effects of geographical origin, varietal and farming system on the chemical composition and functional properties of purple grape juices: A review. **Trends in Food Science & Technology**. 52: 31-48. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.03.013.
- Guerra, C. C.; Bitarelo, H.; Ben, R. L.; Marin, A. (2016). Sistema para elaboração de suco de uva integral em pequenos volumes: Suquificador Integral. Documentos nº 96. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 33p. **Disponível (on line)** <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1041084/sistema-para-elaboracao-de-suco-de-uva-integral-em-pequenos-volumes-suquificador-integral> (12 de julho).
- Hilkert, A. W.; Avak, H. (2016). Isotope Analysis of Water, Fruit Juice and Wine Using the Thermo Scientific GasBench II IRMS. Application Note 30048. **Disponível (on line)** <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-30048-IRMS-Water-Fruit-Juice-Wine-AN30048-EN.pdf> (15 de julho).
- IAEA - International Atomic Energy Agency. (2009). Reference Sheet for VSMOW2 and SLAP2 international measurement standards. Department of Nuclear Sciences and Applications. Vienna: IAEA, pp. 1-8. **Disponível (on line)** https://nucleus.iaea.org/rpst/Documents/VSMOW2_SLAP2.pdf (10 de julho).
- IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho. (2018). Vendas de suco de uva atingem o maior volume da história. **Disponível (online)** <http://pioneiro.clicrbs.com.br/rs/economia/noticia/2019/07/vendas-de-suco-de-uva-atingem-o-maior-volume-da-historia-10958983.html> (28 de julho).

- IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho. (2019). Refrigerantes perdem espaço para sucos de uva no RS. **Disponível (online)** <https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2019/01/refrigerantes-perdem-espaco-para-sucos-de-uva-no-rs-cjr2dwt5e029201uk2p4aagqz.html> (03 de agosto).
- ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2005). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 13p.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. (2018). Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008.
- Losso, F. B. (2016). A vitivinicultura de altitude em Santa Catarina: desafios para o desenvolvimento do enoturismo. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Geografia, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil.
- Magnusson, B.; U. Örnemark (Eds). (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2 ed. ISBN 978-91-87461-59-0. **Disponível (online)** https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf.
- Maia, J. D. G.; Camargo, U. A. (2012). **O cultivo da videira Niágara no Brasil**. 1 ed. Brasília: Embrapa, 301p.
- Maia, J. D. G.; Ritschel, P. S. (2015). Novas cultivares de videira para elaboração de suco e para mesa. In: XIV Encontro Nacional Sobre Fruticultura de Clima Temperado. Anais. pp. 81-90. **Disponível (online)** <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130383/1/maia-xivenfrute-palestras-p81-90-jul20150001.pdf> (13 de março).
- Marshall, J. D.; Brooks, J. R.; Lajtha, K. (2007). **Sources of variation in the stable isotopic composition of plants**. In: Michener, R. H.; Lajtha, K (Eds). **Stable isotopes in ecology and environmental Science**. Blackwell Publishing: Austrália, cap. 2, pp. 22-60.
- Martín-Belloso, O.; Marsellés-Fontanet., A. R. (2006). **Grape juice**. Hui, Y. H. (Ed). **Handbook of Fruits and Fruit Processing**. 1 ed. Iowa: Blackwell Publishing. cap 23. pp 421-437.

- Martin, G. J.; Martin, M. L. (2003). Climatic significance of isotope ratios. **Phytochemistry Reviews**. 2(3): 179-190.
- Marzarotto, V. **Suco de Uva**. (2005). In: Venturini Filho, W. G (Ed). **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, cap. 14, pp. 311-345.
- Marzarotto, V. (2010). **Suco de Uva**. In: Venturini Filho, W. G (Ed). **Bebidas Não Alcoólicas**. São Paulo: Edgard Blücher, vol. 2, cap. 19, pp. 359-385.
- Morasch, B.; Richnow, H. H.; Schink, B.; Meckenstock, R. U. (2001). Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(10): 4842-4849. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4842-4849.2001.
- NATA - National Association of Testing Authorities. (2013). **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. Technical Note 17.
- OIV - International Organisation of Vine and Wine. (1996). Mouillage - Determination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau des vins. Resolution OENO 2/96. **Disponível (on line)** <http://www.oiv.int/public/medias/5533/recueil-2017-volume2-fr.pdf> (14 de março).
- OIV - International Organisation of Vine and Wine. (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. Resolution OENO 17/2001. **Disponível (on line)** <http://www.oiv.int/public/medias/2496/oiv-ma-as312-06.pdf> (14 de março).
- OIV. International Organisation of Vine and Wine. (2009). Method for $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope ratio determination of water in wines and must. Method OIV-MA-AS2-12. Resolution OENO 353/2009. **Disponível (on line)** <http://www.oiv.int/public/medias/2479/oiv-ma-as2-12.pdf>. (14 de março).
- Oliveira, I. (2014). Dinâmica das massas d'água no sistema de ressurgência de cabo frio e os principais processos que modulam suas assinaturas isotópicas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ, Brasil.

- Paiva, E.; Lima, M. S.; Paixão, J. A. (2009). Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. 10(4): 196-211.
- Parkin, K. L. (2010). **Enzimas**. In: Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. (Eds). **Química de Alimentos**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed S.A., pp. 264-316.
- Parreira, D. I. S (2013). Validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para doseamento da vitamina D em géneros alimentícios. Aplicação do método em diferentes matrizes alimentares. **Dissertação de Mestrado**. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa – PT, Portugal.
- Pian, L. B.; Almagro, A. C.; Neto, F. R.; Gasparotto, A. C.; Messias, S. S.; Caldas, R. G.; Neto, J. S.; Hata, F. T.; Sena, J. O. A. (2009). Produtividade da uva rústica Concord sobre três diferentes porta-enxertos, cultivada em sistema de produção orgânico. **Revista Brasileira de Agroecologia**. 4(2): 3897-3900.
- Protas, J. F. S.; Camargo, U. A. (2011). Vitivinicultura Brasileira: Panorama Setorial de 2010. Brasília: SEBRAE; Bento Gonçalves: IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho, 110p. **Disponível (on line)** <http://www.ibraevin.org.br/admin/arquivos/downloads/1455901895.pdf> (17 de fevereiro).
- Protas, J. F. S.; Camargo, U. A.; Mello, L. M. R. (2014). A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. Embrapa Uva e Vinho. **Disponível (online)** <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1052798/a-vitivinicultura-brasileira-realidade-e-perspectivas> (16 de fevereiro).
- 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 (25 de maio).
- Rizzon, L. A.; Meneguzzo, J. (2007). **Suco de uva**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 45p.
- Rizzon, L. A.; Meneguzzo, J.; Manfro, V. (1998). Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 24p. **Disponível (on line)**

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/538470/1/Doc21.pdf> (22 de abril).

- Rizzon, L. A.; Salvador, M. B. G. (2010). **Determinações analíticas por métodos físico-químicos**. In: Rizzon, L. A. (Ed). **Metodologia para análise de mosto e suco de uva**. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, cap.1, pp. 9-25.
- Rossmann, A.; Reniero, F.; Moussa, I.; Schmidt, H. L.; Versini, G.; Merle, M. H. (1999). Stable oxygen isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**. 208: 400-407. DOI: 10.1007/s002170050437.
- RUNL - Radboud University Netherlands. (2017). Isotopes Ratio Mass Spectrometry (IRMS). General Instrumentation. Faculty of Science. **Disponível (online)** <https://www.ru.nl/science/gi/facilities-activities/elemental-analysis/irms/> (10 de julho).
- Santesteban, L. G.; Miranda, C.; Barbarin, I.; Royo, J. B. (2015). Application of the measurement of the natural abundance of stable isotopes in viticulture: a review. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. 21: 157-167. DOI: 10.1111/ajgw.12124.
- Schmidt, H. L.; Werner, R. A.; Eisenreich, W. (2003). Systematics of ^2H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways. **Phytochemistry Reviews**. 2: 61-85.
- SEAPDR - Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural. (2019). Novo Sistema de Cadastro Vinícola apresenta dados de colheita e produção da safra 2019. **Disponível (online)** <https://www.estado.rs.gov.br/novo-sistema-de-cadastro-vinicola-apresenta-dados-de-colheita-e-producao-da-safra-2019> (08 de agosto).
- Sene & Silva, N. M. C. (2009). Espectrometria de Massa para análise isotópica dos bio-elementos. **Monografia**. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu – SP, Brasil.
- Sessions, A. L. (2006). Isotope-ratio detection for gas chromatography. **Journal of Separation Science**. 29: 1946-1961. DOI: 10.1002/jssc.200600002.

- Silva, A. F. A. Validação de Métodos Analíticos para controle de Qualidade de um Medicamento, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). (2016). **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Lisboa, Lisboa – PT, Portugal.
- Silva, J. K.; Cazarin, C. B. B.; Correa, L. C.; Batista, A. G.; Furlan, C. P. B.; Biasoto, A. C. T.; Pereira, G. E.; Camargo, A. C.; Maróstica Junior, M. R. (2016). Bioactive compounds of juices from two Brazilian grape cultivars. **Journal of the Science and Food Agriculture**. 96(6): 1990-1996. DOI: 10.1002/jsfa.7309.
- Thermo Fisher Scientific. (2013). Thermo Scientific GasBench II. Universal On-Line Gas Preparation and Introduction System for Isotope Ratio MS. Product Specifications. **Disponível (on line)** <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Specification-Sheets/PS-30259-GasBench-PS30259-EN.pdf> (15 de julho).
- UWI - University of the West Indies. (2013). Chemistry and crime. The Oxygen isotope signature - GC/C/IRMS. Department of Chemistry. **Disponível (on line)** http://wwwchem.uwimona.edu.jm/courses/CHEM2402/Crime/GC_IRMS.html (16 de julho).
- Valduga, V. (2007). O processo de desenvolvimento do enoturismo no Vale dos Vinhedos. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Turismo, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, Brasil.
- Valero, J. M. O. (2014). Nuevas tecnologías para la elaboración de vinos tintos: Flash Detente. **Monografia**. Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática, Universidad de la Rioja – Rioja, Espanha.
- van Leeuwen, K. A.; Prenzler, P. D.; Ryan, D.; Camin, F. (2014). Gas Chromatography - Combustion - Isotope Ratio Mass Spectrometry for Traceability and Authenticity in Foods and Beverages. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 13(5): 814-837. DOI: 10.1111/1541-4337.12096.
- WUSTL - Washington University in St. Louis. (2017). Mass Analyzers. Division of Endocrinology, Metabolism and Lipid Research. **Disponível (on line)** <http://msr.dom.wustl.edu/mass-analyzers/> (16 de julho).

Zapelini, G. C. (2010). Análise do sistema produtivo de vinhos finos de altitude em São Joaquim, Santa Catarina. **Monografia**. Departamento de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil.

ANEXOS

ANEXO A – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO F

v1 →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	25	30
v2 ↓																	
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	242.98	243.90	245.95	248.02	249.05	249.26	250.10
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.46
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.70	8.66	8.64	8.63	8.62
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.86	5.80	5.77	5.77	5.75
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.62	4.56	4.53	4.52	4.50
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.94	3.87	3.84	3.83	3.81
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.51	3.44	3.41	3.40	3.38
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.22	3.15	3.12	3.11	3.08
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.01	2.94	2.90	2.89	2.86
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.85	2.77	2.74	2.73	2.70
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.72	2.65	2.61	2.60	2.57
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.62	2.54	2.51	2.50	2.47
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.53	2.46	2.42	2.41	2.38
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.46	2.39	2.35	2.34	2.31
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.40	2.33	2.29	2.28	2.25
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.35	2.28	2.24	2.23	2.19
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.31	2.23	2.19	2.18	2.15
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.27	2.19	2.15	2.14	2.11
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.23	2.16	2.11	2.11	2.07
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.20	2.12	2.08	2.07	2.04
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.18	2.10	2.05	2.05	2.01
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.15	2.07	2.03	2.02	1.98
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.13	2.05	2.01	2.00	1.96
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.11	2.03	1.98	1.97	1.94
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.09	2.01	1.96	1.96	1.92
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.07	1.99	1.95	1.94	1.90
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.06	1.97	1.93	1.92	1.88
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.04	1.96	1.91	1.91	1.87
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.03	1.94	1.90	1.89	1.85
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.01	1.93	1.89	1.88	1.84
35	4.12	3.27	2.87	2.64	2.49	2.37	2.29	2.22	2.16	2.11	2.07	2.04	1.96	1.88	1.83	1.82	1.79
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.92	1.84	1.79	1.78	1.74

ANEXO B – DADOS QUE COMPÕE OS VALORES DE REFERÊNCIA ISOTÓPICOS

Nº RS	Variedade	Município	Produção	$\delta^{18}\text{O}$
RS003/17	Bordô	Bento Gonçalves	NC	0,29±0,07
RS006/17	Bordô	Bento Gonçalves	8.000	-0,55±0,08
RS010/17	Bordô	Coronel Pilar	3.000	0,05±0,05
RS012/17	Bordô	Farroupilha	60.000	0,24±0,11
RS015/17	Bordô	Santa Tereza	200	0,11±0,06
RS026/17	Bordô	Garibaldi	8.530	-0,10±0,07
RS030/17	Bordô	Farroupilha	21.190	-1,06±0,10
RS037/17	Bordô	Cotiporã	16.360	-0,09±0,07
RS040/17	Bordô	Vale Real	2.240	2,27±0,07
RS041/17	Bordô	Planalto	22.000	3,72±0,08
RS042/17	Bordô	Alpestre	7.380	2,61±0,09
RS049/17	Bordô	Fagundes Varela	950	1,50±0,05
RS056/17	Bordô	Roca Sales	26.500	2,19±0,08
RS057/17	Bordô	Dois Lajeados	12.000	2,41±0,06
RS059/17	Bordô	Nova Roma do Sul	300	2,44±0,07
RS061/17	Bordô	Flores da Cunha	34.550	2,60±0,06
RS062/17	Bordô	Nova Pádua	17.700	1,99±0,07
RS063/17	Bordô	Caxias do Sul	20.150	1,48±0,10
RS071/17	Bordô	Garibaldi	10.903	1,48±0,09
RS073/17	Bordô	Caxias do Sul	8.620	2,12±0,09
RS074/17	Bordô	Nova Pádua	26.820	2,78±0,13
RS076/17	Bordô	Farroupilha	8.630	0,81±0,13
RS080/17	Bordô	Bento Gonçalves	560	1,26±0,09
RS093/17	Bordô	Nova Pádua	29.640	1,61±0,08
RS095/17	Bordô	Flores da Cunha	NC	1,59±0,09
RS098/17	Bordô	Caxias do Sul	3.780	0,71±0,10
RS099/17	Bordô	Nova Pádua	2.200	1,52±0,08
RS101/17	Bordô	Antônio Prado	6.080	1,60±0,09
RS102/17	Bordô	Antônio Prado	22.000	1,50±0,12
RS103/17	Bordô	Flores da Cunha	18.843	1,24±0,11
RS111/17	Bordô	Carlos Barbosa	24.200	-0,15±0,13
RS112/17	Bordô	Flores da Cunha	33.180	1,14±0,16
RS115/17	Bordô	Veranópolis	2.060	2,02±0,12
RS116/17	Bordô	Veranópolis	9.480	0,31±0,13
RS117/17	Bordô	Flores da Cunha	46.040	0,29±0,10
RS126/17	Bordô	Flores da Cunha	1.200	0,90±0,09
RS127/17	Bordô	Flores da Cunha	30.590	0,91±0,08
RS134/17	Bordô	São Marcos	9.820	0,66±0,12
RS135/17	Bordô	São Marcos	3.940	1,05±0,14
RS136/17	Bordô	Caxias do Sul	6.770	1,66±0,06
RS138/17	Bordô	Farroupilha	NC	2,35±0,07
RS141/17	Bordô	Campestre da Serra	21.590	0,19±0,10
RS142/17	Bordô	Campestre da Serra	4.700	0,68±0,20

RS143/17	Bordô	Ipê	986	-0,24±0,14
RS144/17	Bordô	Campestre da Serra	5.860	0,30±0,09
RS151/17	Bordô	Caxias do Sul	10.300	-0,18±0,11
RS152/17	Bordô	Flores da Cunha	43.960	0,06±0,09
RS154/17	Bordô	Flores da Cunha	42.080	0,15±0,12
RS156/17	Bordô	Flores da Cunha	41.590	-0,15±0,09
RS157/17	Bordô	Flores da Cunha	22.120	0,16±0,08
RS160/17	Bordô	Monte Alegre dos Campos	3.900	1,04±0,10
RS161/17	Bordô	Monte Alegre dos Campos	NC	0,77±0,08
RS163/17	Bordô	Flores da Cunha	NC	-0,32±0,09
RS181/17	Bordô	Flores da Cunha	46.940	-0,12±0,06
RS198/17	Bordô	Monte Alegre dos Campos	17.786	1,28±0,10
RS207/17	Bordô	Vacaria	10.830	0,40±0,09
RS281/17	Bordô	Caseiros	275.945	-0,06±0,10
RS007/17	Concord	Pinto Bandeira	13.480	0,70±0,08
RS011/17	Concord	Coronel Pilar	2.629	-0,66±0,08
RS013/17	Concord	Garibaldi	1.601	-0,13±0,07
RS014/17	Concord	Santa Tereza	34.389	0,42±0,08
RS016/17	Concord	Nova Roma do Sul	1.980	-1,46±0,08
RS023/17	Concord	Bento Gonçalves	15.580	-0,59±0,10
RS028/17	Concord	Garibaldi	12.800	0,07±0,06
RS029/17	Concord	Coronel Pilar	11.880	0,33±0,07
RS033/17	Concord	Bento Gonçalves	1.500	0,23±0,11
RS036/17	Concord	Cotiporã	11.420	-0,17±0,10
RS050/17	Concord	Fagundes Varela	3.000	1,70±0,06
RS051/17	Concord	Veranópolis	3.000	1,17±0,07
RS052/17	Concord	São Valentin do Sul	8.000	0,82±0,06
RS053/17	Concord	Roca Sales	12.750	0,76±0,06
RS054/17	Concord	Dois Lajeados	21.090	0,45±0,07
RS058/17	Concord	Guaporé	20.000	0,82±0,15
RS075/17	Concord	Pinto Bandeira	8.000	1,22±0,16
RS091/17	Concord	Cotiporã	5.370	0,17±0,11
RS105/17	Concord	Bento Gonçalves	8.690	0,55±0,10
RS109/17	Concord	Dois Lajeados	8.597	0,72±0,07
RS118/17	Concord	Cotiporã	2.690	0,87±0,12
RS171/17	Concord	Guaporé	20.000	-0,25±0,10
RS100/17	Isabel	Bento Gonçalves	121.000	0,93±0,08
RS123/17	Isabel	Pinto Bandeira	47.120	1,48±0,09
RS132/17	Isabel	Bento Gonçalves	61.580	0,92±0,09
RS148/17	Isabel	Bento Gonçalves	61.580	0,19±0,11
RS170/17	Isabel	Bento Gonçalves	134.050	-0,17±0,13
RS175/17	Isabel	Bento Gonçalves	57.360	-0,18±0,09
RS182/17	Isabel	Coronel Pilar	14.450	-0,73±0,15
RS183/17	Isabel	Garibaldi	8.360	0,21±0,09
RS184/17	Isabel	Garibaldi	22.004	0,08±0,11
RS185/17	Isabel	Sta. Tereza	39.376	-0,21±0,10
RS186/17	Isabel	Monte Belo do Sul	20.000	-1,29±0,14
RS194/17	Isabel	Bento Gonçalves	59.940	0,18±0,11
RS195/17	Isabel	Cotiporã	3.010	-0,15±0,13
RS202/17	Isabel	Bento Gonçalves	1.910	-0,27±0,08

RS212/17	Isabel	Nova Pádua	26.590	0,60±0,11
RS213/17	Isabel	Farroupilha	NC	0,18±0,12
RS214/17	Isabel	Farroupilha	5.010	0,14±0,09
RS216/17	Isabel	Farroupilha	16.535	0,23±0,09
RS217/17	Isabel	Flores da Cunha	60.754	1,17±0,14
RS218/17	Isabel	Caxias do Sul	8.540	0,77±0,09
RS219/17	Isabel	Flores da Cunha	12.100	-0,56±0,32
RS220/17	Isabel	Nova Pádua	87.160	0,03±0,10
RS221/17	Isabel	Pinto Bandeira	12.000	-0,01±0,06
RS223/17	Isabel	Bento Gonçalves	29.770	0,12±0,08
RS224/17	Isabel	Pinto Bandeira	3.000	0,36±0,05
RS226/17	Isabel	Monte Belo do Sul	9.590	-0,21±0,08
RS227/17	Isabel	Bento Gonçalves	53.590	-0,27±0,09
RS230/17	Isabel	Garibaldi	21.662	0,39±0,10
RS233/17	Isabel	Boa Vista do Sul	14.129	-0,30±0,13
RS234/17	Isabel	Garibaldi	40.860	0,10±0,08
RS237/17	Isabel	Santa Tereza	37.695	-0,77±0,11
RS241/17	Isabel	Veranópolis	44.320	-0,06±0,07
RS242/17	Isabel	Vila Flores	5.960	1,05±0,10
RS243/17	Isabel	Veranópolis	10.000	-0,09±0,12
RS244/17	Isabel	Cotiporã	12.030	-0,11±0,10
RS245/17	Isabel	Garibaldi	40.000	0,05±0,11
RS246/17	Isabel	Flores da Cunha	26.990	0,45±0,13
RS248/17	Isabel	Farroupilha	1.191	0,63±0,15
RS252/17	Isabel	Caxias do Sul	19.630	-0,25±0,17
RS253/17	Isabel	Flores da Cunha	11.080	0,70±0,11
RS254/17	Isabel	Nova Pádua	36.560	0,81±0,16
RS255/17	Isabel	Nova Pádua	8.970	0,12±0,15
RS256/17	Isabel	Nova Pádua	4.500	0,45±0,09
RS257/17	Isabel	Flores da Cunha	13.750	0,08±0,10
RS258/17	Isabel	Antônio Prado	37.470	-0,21±0,11
RS259/17	Isabel	Antônio Prado	32.660	0,32±0,17
RS262/17	Isabel	Nova Roma do Sul	42.000	-0,25±0,13
RS264/17	Isabel	Coronel Pilar	NC	0,27±0,09
RS266/17	Isabel	São Marcos	NC	0,11±0,09
RS268/17	Isabel	Nova Pádua	4.500	-0,63±0,09
RS269/17	Isabel	São Marcos	15.730	0,01±0,10
RS270/17	Isabel	Pinto Bandeira	37.740	0,08±0,11
RS271/17	Isabel	Nova Roma do Sul	11.340	-0,23±0,10
RS275/17	Isabel	Caxias do Sul	9.130	0,84±0,09
RS279/17	Isabel	Caxias do Sul	4.660	-1,84±0,10
RS280/17	Isabel	Flores da Cunha	4.700	-0,96±0,13
RS282/17	Isabel	Nova Pádua	34.420	-0,91±0,13
RS287/17	Isabel	Campestre da Serra	11.080	-1,41±0,10
RS288/17	Isabel	São Marcos	3.061	-1,04±0,16
RS289/17	Isabel	Ipê	5.770	-1,62±0,10
RS290/17	Isabel	Antônio Prado	5.850	-0,92±0,11
RS291/17	Isabel	Antônio Prado	38.350	-1,14±0,12
RS021/17	Isabel Precoce	Bento Gonçalves	38.720	-0,29±0,07
RS024/17	Isabel Precoce	Bento Gonçalves	91.860	0,00±0,05

RS048/17	Isabel Precoce	Cotiporã	24.290	0,47±0,07
RS147/17	Isabel Precoce	Cotiporã	3.860	-0,09±0,06
RS188/17	Isabel Precoce	Flores da Cunha	81.850	-1,66±0,12
RS034/17	BRS Cora	Bento Gonçalves	17.370	-0,51±0,06
RS092/17	BRS Cora	Farroupilha	2.600	0,78±0,13
RS131/17	BRS Cora	Pinto Bandeira	5.000	1,18±0,13
RS189/17	BRS Cora	Pinto Bandeira	44.760	-0,79±0,10
RS005/17	BRS Violeta	Bento Gonçalves	3.490	-0,13±0,06
RS027/17	BRS Violeta	Garibaldi	13.880	-1,21±0,05
RS038/17	BRS Violeta	Cotiporã	9.400	-0,12±0,08
RS081/17	BRS Violeta	Santa Tereza	3.639	1,83±0,08
RS082/17	BRS Violeta	Santa Tereza	1.905	1,77±0,09
RS004/17	Niágara Rosada	Bento Gonçalves	11.270	0,47±0,08
RS017/17	Niágara Rosada	Farroupilha	1.500	0,15±0,05
RS106/17	Niágara Rosada	Caxias do Sul	10.810	-0,18±0,10
RS113/17	Niágara Rosada	Flores da Cunha	1.460	0,76±0,10
RS025/17	Niágara Branca	Bento Gonçalves	13.030	1,29±0,12
RS039/17	Niágara Branca	Caxias do Sul	8.870	0,26±0,08
RS060/17	Niágara Branca	Nova Roma do Sul	827	0,82±0,09
RS069/17	Niágara Branca	Garibaldi	NC	-0,17±0,09
RS070/17	Niágara Branca	Garibaldi	2.410	0,31±0,10
RS072/17	Niágara Branca	Caxias do Sul	500	-0,59±0,08
RS088/17	Niágara Branca	Antônio Prado	14.800	1,04±0,09
RS089/17	Niágara Branca	Farroupilha	3.510	1,04±0,15
RS097/17	Niágara Branca	Nova Pádua	2.000	-1,53±0,10
RS107/17	Niágara Branca	Flores da Cunha	9.380	1,29±0,12
RS120/17	Niágara Branca	Flores da Cunha	28.980	0,26±0,08
RS122/17	Niágara Branca	Nova Pádua	4.400	0,82±0,09
RS129/17	Niágara Branca	Farroupilha	2.350	-0,17±0,09
RS153/17	Niágara Branca	Flores da Cunha	950	0,31±0,10
RS191/17	Niágara Branca	Flores da Cunha	100	-0,59±0,08
RS124/17	BRS Lorena	Bento Gonçalves	650	0,63±0,11
RS165/17	BRS Lorena	Monte Belo do Sul	NC	-0,23±0,12
RS197/17	BRS Lorena	Farroupilha	2.780	-1,25±0,12

NC: não consta

ANEXO C – TABELA DE DISTRIBUIÇÃO DE T (T STUDENT)

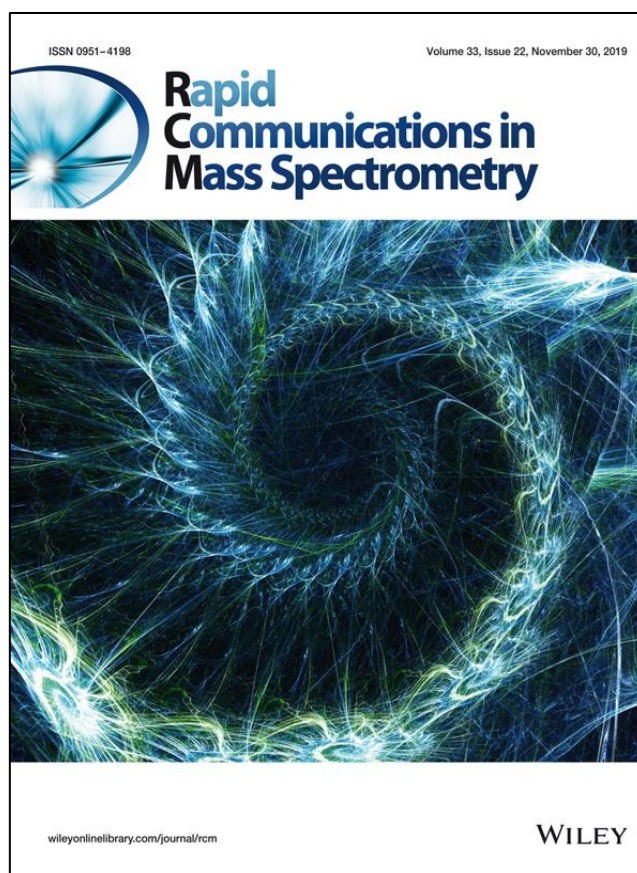
Tabela de distribuição de t

Unilateral	40%	25%	10%	5%	2,5%	1%	0,5%	0,05%
Bilateral	80%	50%	20%	10%	5%	2%	1%	0,1%
1	0.324920	1.000000	3.077684	6.313752	12.70620	31.82052	63.65674	636.6192
2	0.288675	0.816497	1.885618	2.919986	4.30265	6.96456	9.92484	31.5991
3	0.276671	0.764892	1.637744	2.353363	3.18245	4.54070	5.84091	12.9240
4	0.270722	0.740697	1.533206	2.131847	2.77645	3.74695	4.60409	8.6103
5	0.267181	0.726687	1.475884	2.015048	2.57058	3.36493	4.03214	6.8688
6	0.264835	0.717558	1.439756	1.943180	2.44691	3.14267	3.70743	5.9588
7	0.263167	0.711142	1.414924	1.894579	2.36462	2.99795	3.49948	5.4079
8	0.261921	0.706387	1.396815	1.859548	2.30600	2.89646	3.35539	5.0413
9	0.260955	0.702722	1.383029	1.833113	2.26216	2.82144	3.24984	4.7809
10	0.260185	0.699812	1.372184	1.812461	2.22814	2.76377	3.16927	4.5869
11	0.259556	0.697445	1.363430	1.795885	2.20099	2.71808	3.10581	4.4370
12	0.259033	0.695483	1.356217	1.782288	2.17881	2.68100	3.05454	4.3178
13	0.258591	0.693829	1.350171	1.770933	2.16037	2.65031	3.01228	4.2208
14	0.258213	0.692417	1.345030	1.761310	2.14479	2.62449	2.97684	4.1405
15	0.257885	0.691197	1.340606	1.753050	2.13145	2.60248	2.94671	4.0728
16	0.257599	0.690132	1.336757	1.745884	2.11991	2.58349	2.92078	4.0150
17	0.257347	0.689195	1.333379	1.739607	2.10982	2.56693	2.89823	3.9651
18	0.257123	0.688364	1.330391	1.734064	2.10092	2.55238	2.87844	3.9216
19	0.256923	0.687621	1.327728	1.729133	2.09302	2.53948	2.86093	3.8834
20	0.256743	0.686954	1.325341	1.724718	2.08596	2.52798	2.84534	3.8495
21	0.256580	0.686352	1.323188	1.720743	2.07961	2.51765	2.83136	3.8193
22	0.256432	0.685805	1.321237	1.717144	2.07387	2.50832	2.81876	3.7921
23	0.256297	0.685306	1.319460	1.713872	2.06866	2.49987	2.80734	3.7676
24	0.256173	0.684850	1.317836	1.710882	2.06390	2.49216	2.79694	3.7454
25	0.256060	0.684430	1.316345	1.708141	2.05954	2.48511	2.78744	3.7251
26	0.255955	0.684043	1.314972	1.705618	2.05553	2.47863	2.77871	3.7066
27	0.255858	0.683685	1.313703	1.703288	2.05183	2.47266	2.77068	3.6896
28	0.255768	0.683353	1.312527	1.701131	2.04841	2.46714	2.76326	3.6739
29	0.255684	0.683044	1.311434	1.699127	2.04523	2.46202	2.75639	3.6594
30	0.255605	0.682756	1.310415	1.697261	2.04227	2.45726	2.75000	3.6460
∞	0.253347	0.674490	1.281552	1.644854	1.95996	2.32635	2.57583	3.2905

ANEXO D – VALORES DE REFERÊNCIA ISOTÓPICOS CONSIDERANDO A INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Amostras	$\delta^{18}\text{O}$ (‰)	$\pm 0,71\text{‰}$	Amostras	$\delta^{18}\text{O}$ (‰)	$\pm 0,71\text{‰}$
1	-3,64	-2,93 -4,35	16	-1,02	-0,31 -1,73
2	-0,80	-0,09 -1,51	17	-2,06	-1,35 -2,77
3	-0,67	0,04 -1,38	18	-2,08	-1,37 -2,79
4	-1,54	-0,83 -2,25	19	-2,30	-1,59 -3,01
5	-4,44	-3,73 -5,15	20	0,19	0,90 -0,52
6	-0,75	-0,04 -1,46	21	-1,04	-0,33 -1,75
7	-1,07	-0,36 -1,78	22	-4,69	-3,98 -5,40
8	-2,46	-1,75 -3,17	23	0,26	0,97 -0,45
9	-0,57	0,14 -1,28	24	0,02	0,73 -0,69
10	-0,42	0,29 -1,13	25	0,62	1,33 -0,09
11	-4,40	-3,69 -5,11	26	-0,95	-0,24 -1,66
12	-1,05	-0,34 -1,76	27	-0,13	0,58 -0,84
13	-4,90	-4,19 -5,61	28	-0,72	-0,01 -1,43
14	-0,79	-0,08 -1,5	29	-4,50	-3,79 -5,21
15	-0,77	-0,06 -1,48	30	-7,15	-6,44 -7,86

ANEXO E - NORMAS “*Rapid Communications in Mass Spectrometry*”



Author Guidelines:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10970231/homepage/forauthors.html>