

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

ANÁLISES ISOTÓPICAS E ELEMENTOS MINERAIS NA
DETERMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DE VINHOS
BRASILEIROS

SANDRA VALDUGA DUTRA

Caxias do Sul, 2011

SANDRA VALDUGA DUTRA

**ANÁLISES ISOTÓPICAS E ELEMENTOS MINERAIS NA
DETERMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DE VINHOS
BRASILEIROS**

“Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de
Doutor em Biotecnologia”

Orientador: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

Caxias do Sul, 2011

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

D978a Dutra, Sandra Valduga
Análises isotópicas e elementos minerais na determinação da
origem geográfica de vinhos brasileiros / Sandra Valduga Dutra.
2011.
72 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.
“Orientação: Profª. Drª. Regina Vanderlinde”

1. Vinho e vinificação - Microbiologia. 2. Microbiologia
aplicada. 3. Microbiologia dos alimentos. 4. Produção de uva e
vinho por região. I. Título.

CDU : 2.ed. 663.25

Índice para catálogo sistemático:

1. Vinho e vinificação – Microbiologia	663.25
2. Microbiologia aplicada	663.1
3. Microbiologia dos alimentos	579.67
4. Produção de uva e vinho por região	634.88

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Kátia Stefani – CRB 10/1683

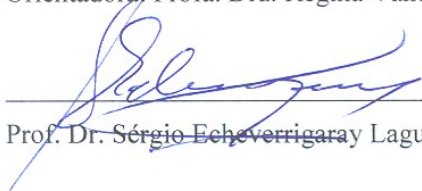
SANDRA VALDUGA DUTRA

**ANÁLISES ISOTÓPICAS E ELEMENTOS MINERAIS NA
DETERMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DE VINHOS
BRASILEIROS**

TESE APROVADA EM 30 DE SETEMBRO DE 2011.



Orientadora; Profa. Dra. Regina Vanderlinde



Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna



Prof. Dr. Carlos Eugênio Daudt



Prof. Dr. Marcelo Zacharias Moreira

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
Biblioteca Central

Dedico esta tese aos meus grandes amores Clandio, Bruna e Luana
que sempre estiveram ao meu lado e
nunca mediram esforços para me ajudar.
Obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

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

A Deus pelas oportunidades que tive na vida.

Ao meu esposo Clandio e minhas filhas Bruna e Luana, que auxiliaram na coleta das amostras, pelo amor incondicional e carinho.

A minha família, especialmente a minha mãe, pelo apoio.

A Profa. Dra. Regina Vanderlinde pela oportunidade de participar deste grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, orientação e obrigada pela confiança depositada em mim.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em especial aos professores Dr. Sergio Echeverrigaray e Dr. Aldo J. P. Dillon pelo acompanhamento e sugestões que deixaram este trabalho melhor e a secretária Lucimara Serafini Rech pelo apoio constante.

Aos meus colegas e amigos Ângela Rossi Marcon, Carlos Roani, Fernanda Spinelli, Gilberto João Carnieli, Júlio Meneguzzo, Laurien Adami, Paula Balardin, Plínio Manosso, Susiane Leonardelli, Vanessa Webber, pelo auxílio, incentivo e amizade, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eugênio Daudt, meus sinceros agradecimentos pelos primeiros ensinamentos em enologia, incentivo de realizar pesquisas na área de vinhos e por participar da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Marcelo Moreira pela importante colaboração em nossas pesquisas na área de isótopos e disponibilidade de participar da banca examinadora.

Ao estatístico Prof. Sérgio Kato pelo auxílio nas análises estatísticas dos resultados.

A Universidade de Caxias do Sul (UCS), ao Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN) e Laboratório de Referência Enológica (LAREN) pela oportunidade da realização desta pesquisa.

A todos os funcionários da Secretaria da Agricultura e Agronegócio (SEAPA) que auxiliaram na coleta das amostras.

Aos estagiários e bolsistas do LAREN pela amizade, auxílio e agradável convivência.

Aos enólogos e produtores de uva que forneceram as amostras de uvas utilizadas neste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS DA TESE	i
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 01	i
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 02	ii
LISTA DE FIGURAS DA TESE	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Regiões produtoras do Rio Grande do Sul	3
2.1.1 Serra Gaúcha	4
2.1.2 Campanha	4
2.1.3 Serra do Sudeste	5
2.2 Indicação de Procedência e Denominação de Origem	5
2.3 Variedades Merlot e Cabernet Sauvignon	7
2.4 – Análises isotópicas em vinhos	8
2.5 – Elementos minerais nos vinhos	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1 CAPÍTULO 1 – Determination of the geographical origin of Brazilian wines by isotope and mineral analysis	20
3.2 CAPÍTULO 2 – Determinação de regiões produtoras de vinhos no Brasil através de análise isotópica e elementos minerais e influência da safra nos valores isotópicos	28
4. CONCLUSÕES	52
5. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	54

LISTA DE TABELAS DA TESE

Tabela 01: Abundâncias médias naturais de isótopos estáveis leves usados na autenticação de produtos alimentares.	09
---	----

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 01

Table 01 – Isotope ratios $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (per mille) of water and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (per mille) of ethanol of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied	23
Table 02 – Mg and Rb (milligrams per liter) of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied	24
Table 03 – Values of Mn and Ca (milligrams per liter) of wines Cabernet Sauvignon and Merlot of the different studied regions	24
Table 04 – Li (micrograms per liter) of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied	25
Table 05 – Classification (percent) of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied	25
Erratum - Table 01 – Isotope ratios $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (per mille) of water and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (per mille) of ethanol of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied	27

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 02

Tabela 01 – Valores de razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰) da água e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰) do etanol dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot, safra 2008, das diferentes regiões estudadas.	38
Tabela 02 – Valores de Rb e Li (mg.L ⁻¹) de vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot de diferentes regiões estudadas, safra 2008.	40
Tabela 03 – Valores de Mn e Ca (mg.L ⁻¹) dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot das diferentes regiões estudadas, safra 2008.	41
Tabela 04 – Valores de Mg (mg.L ⁻¹) dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot, das diferentes regiões estudadas, safra 2008.	41
Tabela 05 – Classificação (percentagem) dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot das diferentes regiões estudadas.	43
Tabela 06 – Valores de razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰) da água e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰) do etanol dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot, da Serra Gaúcha, safras 2007 e 2008.	44

LISTA DE FIGURAS DA TESE

Figura 01 – Principais regiões produtoras de vinhos do RS	3
Figura 02 - Efeitos climáticos e geográficos no fracionamento isotópico de oxigênio na água	13

RESUMO

Foram estudados vinhos brasileiros, elaborados por microvinificação, das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot, safras 2007 e 2008, provenientes da Serra Gaúcha, Campanha e Serra do Sudeste, com o objetivo de diferenciá-los em função da origem geográfica, utilizando análises isotópicas e elementos minerais. Além disso, verificou-se a influência da safra de produção nos valores isotópicos. As análises isotópicas foram realizadas por espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) e a determinação dos minerais por absorção atômica de chama (FAA). Os melhores parâmetros para classificar os vinhos na safra de 2007 foram o $\delta^{18}\text{O}$ da água do vinho, o Mg e o Rb, enquanto que na safra de 2008 o Rb e o Li mostraram-se mais eficientes. Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol do vinho, Rb e Li mostraram uma diferença significativa entre variedades, independente da região estudada, em ambas as safras, com valores mais negativos de $\delta^{13}\text{C}$ e médias superiores de Rb e Li para os vinhos da variedade Cabernet Sauvignon. Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água e $\delta^{13}\text{C}$ do etanol, apresentaram diferenças significativas entre safras, independente da variedade, sendo os resultados de $\delta^{18}\text{O}$ mais negativos na safra de 2007 e os de $\delta^{13}\text{C}$ mais negativos na safra de 2008. A precipitação média quinzenal antes da coleta, apresentou uma forte correlação com os valores de $\delta^{18}\text{O}$. A análise discriminante dos valores isotópicos e minerais permitiu uma classificação de aproximadamente 80 % dos vinhos das três regiões estudadas.

Palavras-chave: composição isotópica, vinhos, carbono, oxigênio, minerais.

ABSTRACT

Were studied Brazilian wines microvinificated from Cabernet Sauvignon and Merlot varieties, vintages 2007 and 2008, from Serra Gaúcha, Campanha and Serra do Sudeste, in order to to differentiate them according to geographical origin, using isotopic and mineral elements analyses. In addition, the influence of vintage production in isotope values was verified. The isotopic analysis were performed by isotope ratio mass spectrometry (IRMS) and the determination of the minerals by flame atomic absorption (FAA). The best parameters to classify the wines in the 2007 vintage were $\delta^{18}\text{O}$ of wine water, Mg and Rb, while in the 2008 vintage Rb and Li were more efficient. The results of the $\delta^{13}\text{C}$ of winw ethanol, Rb and Li showed a significative difference between the varieties independent of the region studied, in both vintages, with more negative values of $\delta^{13}\text{C}$ and higher averages of Rb and Li for the wines from the Cabernet Sauvignon variety. The $\delta^{18}\text{O}$ values of the water and $\delta^{13}\text{C}$ of ethanol showed significant differences, regardless of the variety, with more negative values of $\delta^{18}\text{O}$ for the 2007 vintage and values of $\delta^{13}\text{C}$ of ethanol more negatives in the 2008 vintage. The fortnightly average rainfall before the collection showed a strong direct correlation with the $\delta^{18}\text{O}$ values. Discriminant analysis of of isotopic and mineral elements values allowed to classify approximately 80% of the wines from the three regions studied.

Keywords: isotopic composition, wines, carbon, oxygen, minerals.

1. INTRODUÇÃO

O vinho é uma bebida alcoólica cujo valor comercial pode variar em função da localização geográfica, variedade de uva e da safra de produção. A grande extensão de terras e a diversidade de climas do Brasil permitem a produção de uvas e vinhos em distintas regiões as quais apresentam características próprias. Nos últimos anos, com o emprego de alta tecnologia e o cultivo de variedades *Vitis vinifera*, os vinhos brasileiros desenvolveram um novo referencial de qualidade.

A região da Serra Gaúcha é a região de maior produção de vinhos do Brasil, porém novas regiões de produção estão em expansão. Vinhos de diferentes regiões, elaborados com a mesma tecnologia, apresentam características organolépticas e químicas distintas, que variam em função do tipo de solo e das condições meteorológicas.

Nos países mais tradicionais, principalmente nos europeus, as denominações de origem são bem desenvolvidas e os consumidores guiam-se pelas mesmas para adquirirem seus vinhos, em função da genuinidade e tipicidade de cada região. Para o vinho brasileiro, as indicações geográficas consolidariam e fortaleceriam uma identidade nacional e regional com aumento de competitividade no mercado interno e externo.

As determinações da razão isotópica do carbono do etanol, oxigênio da água e concentração de minerais, podem ser utilizadas para a caracterização de vinhos de diferentes regiões. Portanto, para caracterizar vinhos é necessário conhecer seu perfil analítico e utilizar um tratamento estatístico adequado, que permita a determinação de compostos que apresentam um comportamento similar para os vinhos de uma determinada região. Um estudo utilizando a combinação de isótopos e elementos minerais, combinados

com análise discriminante, com o objetivo de diferenciar regiões produtoras de uva, é inédito para vinhos brasileiros.

O objetivo deste trabalho foi determinar o potencial da análise da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do etanol, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água e a concentração de elementos minerais, na determinação da origem geográfica de vinhos provenientes de uvas da Serra Gaúcha, Serra do Sudeste e Campanha do RS, bem como verificar a influência da safra nos valores isotópicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A viticultura, no Brasil, ocupa uma área de aproximadamente 77 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do país, em latitude de 30° 56' 15''S, até regiões situadas muito próximas ao equador, em latitude de 5° 11' 15''S. A produção de uvas é em torno de 1,2 milhões de toneladas/ano. Deste volume, cerca de 45% é destinado ao processamento para a elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, e 55% comercializado como uvas de mesa (Ibravin, 2011).

2.1 Regiões Produtoras do Rio Grande do Sul

A cultura da videira destinada à elaboração de vinho historicamente concentra-se no Rio Grande do Sul, especialmente na Serra Gaúcha, responsável por 90% do vinho produzido no país (Ibravin, 2011). Nas últimas décadas surgiram dois novos pólos, um na Campanha e outro na Serra do Sudeste (Figura 01).



Figura 01 – Principais regiões produtoras de vinhos do RS
Fonte: <http://www.sitedovinhobrasileiro.com.br/>

2.1.1 Serra Gaúcha

A Serra Gaúcha é a região vitivinícola mais importante do Brasil, com cerca de 40 mil hectares de vinhedos. A região apresenta topografia acidentada, onde os vinhedos se situam em altitudes variáveis de 200 a 800 m. Os solos são de origem vulcânica com predominância da rocha basáltica, de pH baixo e de estrutura argilo arenosa. Em relação à fertilidade, a maior parte deles possui de 2 a 4% de matéria orgânica, concentração baixa de P e elevada de K, Fe, Mg e Ca (Rizzon *et al.*, 2008; Streck *et al.*, 2008). A Serra Gaúcha com latitude de 29° S apresenta clima temperado do tipo sub-tropical, mesotérmico úmido, com verões amenos e úmidos. Os principais municípios produtores são Bento Gonçalves, Caxias do Sul, Flores da Cunha, Farroupilha, Garibaldi, Monte Belo do Sul, Nova Pádua, São Marcos e Antônio Prado (Miele & Miolo, 2003).

2.1.2 Campanha

A Campanha é uma região relativamente extensa, situada a uma latitude média de 31° S na fronteira com o Uruguai. É parte de duas províncias geomorfológicas o Planalto Meridional, a oeste, e a Depressão central, a leste. Caracteriza-se por campos limpos, formados por tapetes herbáceos baixos e densos com a presença de matas-galerias remanescentes e, em parte, por zona agrícola de uso intensivo de verão. A paisagem predominante é o pampa, com altitudes que geralmente variam entre 100 e 200 metros. Localizada sob a borda do derrame basáltico A rocha-mãe é arenito, e os solos são de média e alta profundidade são medianamente férteis. O clima da região é temperado do tipo subtropical, com verões relativamente quentes e secos. Os principais municípios produtores

são Santana do Livramento, Bagé, Dom Pedrito e Candiota (Streck *et al.*, 2008; Miele & Miolo, 2003).

2.1.3 Serra do Sudeste

A Serra do Sudeste está localizada na província geomorfológica Escudo Sul – Rio-Grandense, caracterizada por rochas ígneas muito desgastadas pela erosão. A topografia da Serra do Sudeste é ondulada ou fortemente ondulada. Algumas áreas apresentam solos rasos, com rochas aflorando a superfície do solo. A rocha mãe é o granito. A altitude em geral varia de 200 a 400 metros, não ultrapassando 600 metros. Em geral, são solos ácidos, com teores baixos ou médios de matéria orgânica, médios a altos de K, baixos de P e traços de Li, Na e Al. O clima da região é temperado do tipo subtropical, mesotérmico úmido. Os verões são relativamente quentes e secos. Os principais municípios produtores: são: Encruzilhada do Sul e Pinheiro Machado (Streck *et al.*, 2008; Miele & Miolo, 2003).

2.2 Indicação de Procedência e Denominação de Origem

A globalização do comércio de alimentos e a facilidade com que os produtos alimentares são transportados entre países e continentes fazem com que os consumidores estejam cada vez mais preocupados com a origem dos alimentos consumidos (Kelly *et al.*, 2005).

Desde a Antigüidade a produção de vinhos utiliza o nome geográfico das zonas de produção como sinal de qualidade para vinhos de maior reputação. No século IV a.C. a história registra a prática da impressão de selos na argila das ânforas destinadas a

comercialização de vinhos gregos, buscando garantir a origem e autenticidade dos produtos vînicos de determinadas procedências (Kourakou-Dragonas, 1987).

As autoridades fiscalizadoras são freqüentemente confrontadas com produtos vitivinícolas que não são corretamente identificados no que diz respeito à sua origem, safra e parâmetros de qualidade. A determinação da autenticidade do vinho, através de métodos analíticos, destina-se a confirmar as declarações descritas nos rótulos, sendo de grande interesse para a indústria e consumidores (Christoph *et al.*, 2007; Schlesier *et al.*, 2009; Smeyers-Verbeke *et al.*, 2009). Este conhecimento é considerado como uma garantia adicional da qualidade, autenticidade e tipicidade destes produtos (Angerosa *et al.*, 1999).

Em mercados mais exigentes, a ausência desta indicação implica em menor competitividade dos produtos, algumas vezes dificultando ou inviabilizando seu acesso aos mercados (Falcade & Tonietto, 1995).

A Denominação de Origem (DO) é caracterizada por uma área geográfica, precisamente demarcada, produtora de determinado produto, influenciado por suas características geográficas (solo, subsolo, vegetação), meteorológicas (mesoclima) e humanas (cultivo, tratamento, elaboração, processamento), como por exemplo, Champagne, Bourgogne, Alsace, Bordeaux, Parma e Cognac. A Indicação de Procedência, por outro lado, refere-se à determinada área geográfica conhecida por produzir certo produto, ou seja, não há características naturais (clima, solo) ou humanas, envolvidas na produção do mesmo (Machado, 2004).

Vários estudos foram realizados para determinar a origem geográfica de diferentes produtos alimentícios, como vinho (Day *et al.*, 1994; Ogrinc *et al.*, 2001; Frias *et al.*, 2001; Gremaud *et al.*, 2004; Capron *et al.*, 2007), chá (Fernández-Cáceres *et al.*, 2001), azeite de oliva (Angerosa *et al.*, 1999) e arroz (Kelly *et al.*, 2002).

No Brasil existem atualmente nove certificações de Indicação de Procedência (IP), que são: Região do Cerrado Mineiro (MG), para o café; Vale dos Vinhedos (RS) e Pinto Bandeira, para vinho tinto, branco e espumante; Pampa Gaúcho da Campanha Meridional (RS), para carne bovina e derivados; Paraty (RJ), para cachaça e aguardente composta azulada; Vale do Submédio São Francisco (BA/PE), para manga e uvas de mesa; Vale do Sinos (RS), para couro acabado, Região do Jalapão (TO), para artesanato em capim dourado e Pelotas (RS) para doces tradicionais de confeitaria e de frutas. Para as Denominações de Origem (DO) temos registrado o Litoral Norte Gaúcho (RS) para a produção de arroz e Costa Negra (CE) para o camarão. (INPI, 2011).

2.3 – Variedades Merlot e Cabernet Sauvignon

Entre as uvas tintas viníferas produzidas no RS na safra de 2007 (43 milhões de Kg), as variedades Cabernet Sauvignon (14 milhões de Kg) e Merlot (11 milhões de Kg) representaram aproximadamente 58% (Embrapa, 2008).

A variedade Cabernet Sauvignon é uma das viníferas mais disseminadas no mundo, originando vinhos de qualidade em vários países. Originária de Bordeaux (França) possui película tinta e sabor herbáceo, resultando em um vinho tinto varietal fino de longo envelhecimento (Giovannini, 2008). É uma variedade de brotação e de maturação tardia, relativamente vigorosa, com ramos novos de porte ereto, de média produção e elevada qualidade de vinificação. Embora a uva Cabernet Sauvignon tenha sido introduzida no Brasil em 1921, foi depois de 1980 que houve o incremento do seu plantio na Serra Gaúcha e na fronteira oeste do Rio Grande do Sul. A partir de 1984, observou-se um aumento da produção dessa variedade na Serra Gaúcha (Rizzon & Miele, 2002).

A variedade Merlot possui excelente adaptação às condições de solo e clima do sul do Brasil. Originária de Bordeaux (França), possui película tinta e sabor herbáceo, resultando em um vinho tinto fino, de grande qualidade e que melhora com o envelhecimento não muito prolongado (Giovannini, 2008). No Rio Grande do Sul, ela foi introduzida através da Estação Agronômica de Porto Alegre, de onde foi difundida para a Serra Gaúcha. A uva Merlot, juntamente com outras do grupo de européias, marcou o início da produção de vinhos finos varietais brasileiros. Atualmente, ocupa o segundo lugar em volume de produção entre as variedades de *Vitis vinífera* tintas (Rizzon & Miele, 2009).

A análise sensorial é útil para diferenciação de vinhos, mas um dos seus maiores problemas dizem respeito ao caráter qualitativo, portanto é necessário utilizar outros métodos com base em parâmetros analíticos para uma melhor classificação dos vinhos. O tratamento estatístico adequado para os resultados analíticos obtidos permite a determinação de compostos que apresentam um comportamento similar em um determinado tipo de vinho (Pérez-Magarino *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2003).

2.4 – Análises isotópicas em vinhos

Nos últimos anos, a análise de isótopos estáveis tem apresentado crescente importância no controle de autenticidade e determinação da origem geográfica de alimentos como suco, vinho, aguardente e cerveja (Rossmann, 2001).

Isótopos são átomos com o mesmo número de prótons (número atômico), porém com diferente número de massa. A diferença no número de massa é proporcionada pela variação da quantidade de nêutrons existentes em cada isótopo (Russel, 1982). Os isótopos que não emitem nenhuma forma de radiação são denominados isótopos estáveis. Alguns

isótopos estáveis são de especial interesse para a pesquisa em diversas áreas do conhecimento biológico, geológico, físico e químico, tais como o do hidrogênio, oxigênio, carbono, nitrogênio e enxofre, os quais são encontrados naturalmente na litosfera, hidrosfera, atmosfera e biosfera e representam importante fonte de informações a respeito do histórico de cada espécie química (Martin & Martin, 1991).

Os isótopos “leves”, que possuem massa atômica menor (^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S), são os mais abundantes, enquanto que os isótopos “pesados”, que possuem massa atômica maior (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{34}S), estão presentes no ambiente em quantidades ínfimas (Tabela 01). Na maioria dos casos, os isótopos mais leves são preferencialmente utilizados e os mais pesados são enriquecidos na fração do substrato (Morasch *et al.*, 2001).

Tabela 01: Abundâncias médias naturais de isótopos estáveis leves usados na autenticação de produtos alimentares

Elemento	Isótopo	% Abundância Média (Rossman, 2001)
Hidrogênio	^1H	99,9855
	^2H (D)	0,0145
Carbono	^{12}C	98,892
	^{13}C	1,108
Nitrogênio	^{14}N	99,6337
	^{15}N	0,3663
Oxigênio	^{16}O	99,7587
	^{17}O	0,0375
	^{18}O	0,2039

Fonte: Calderone &Guillou, 2008

Nos últimos anos, as análises isotópicas tem sido recomendadas pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) para detectar a adição de água OIV (1996) e açúcar OIV (2001) em vinhos e derivados, bem como tem sido aplicadas por diversos

pesquisadores para determinar a origem geográfica dos vinhos (Breás *et al.*, 1994; Rossmann *et al.*, 1996).

Os métodos de análises isotópicas são baseados nas medidas das razões dos isótopos estáveis ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) de um produto. As determinações podem ser realizadas usando técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e ou espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) (Calderone *et al.*, 2007).

Em espectrometria de massas, os compostos são analisados como gases produzidos por reações de combustão, pirólise ou equilíbrio, os quais são introduzidos dentro de um espectrômetro de massas para separar as formas isotópicas de um dado elemento (Jamin, 2002).

O valor da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ expresso em delta (δ) por mil (‰) é determinado por espectrometria de massas, comparativamente ao padrão internacional PDB, fóssil carbonatado da Era Cretacea (*Bellemnitella americana*) da formação Pee Dee da Carolina do Sul (EUA). Da mesma forma, a razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ é determinada a partir do padrão internacional V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water), também expressa em partes por mil (‰) (Bréas *et al.*, 1994).

A análise de razão isotópica pode fornecer informação sobre a origem de um composto químico, pois a abundância natural dos isótopos estáveis de elementos como H, C e O demonstra pequenas, mas mensuráveis variações devido ao fracionamento que ocorre durante os processos químicos e físicos dos ciclos naturais, influenciáveis por fatores como umidade, temperatura, ventos e condições meteorológicas (Breás *et al.*, 1994). Da mesma forma que a composição isotópica das plantas depende do ciclo fotossintético e do meio ambiente, os produtos alimentícios derivados são isotopicamente marcados e semelhantes aos das plantas geradoras (Licatti, 1997).

Na fotossíntese o CO_2 penetra nas plantas por difusão através dos estômatos passando por rotas bioquímicas no interior das células a fim de produzir carboidratos. Nas referidas rotas bioquímicas, o primeiro composto orgânico sintetizado, pode conter três ou quatro átomos de carbono. As plantas que possuem ciclo fotossintético cujo primeiro composto orgânico sintetizado é um açúcar com três carbonos são denominados C_3 , enquanto que nas plantas C_4 , os primeiros açúcares formados possuem quatro carbonos (Licatti, 1997). As C_3 são a maioria das plantas superiores de florestas ou cultivadas de folhas largas (dicotiledôneas), incluindo a videira, adaptadas às condições de disponibilidade hídrica e temperaturas amenas. As plantas de ciclo C_4 são mais comuns em regiões que apresentam clima quente e em baixas latitudes (nos trópicos), sob forte estresse hídrico, como nas savanas (Kelly *et al.*, 2005).

Os vegetais de ciclo fotossintético C_3 apresentam valores de enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) entre -22,00 a -34,00‰ e nos vegetais de ciclo fotossintético C_4 , o enriquecimento isotópico relativo varia de -9,00 a -16,00‰ (Koziet *et al.*, 1993, Rossmann, 2001). A uva é uma espécie vegetal de ciclo fotossintético C_3 , que apresenta uma razão isotópica em torno de -28 ‰. Os subprodutos da uva tendem a apresentar este mesmo valor. A cana-de-açúcar e o milho são espécies vegetais de ciclo fotossintético C_4 , com valor isotópico médio de -14 ‰. Através da técnica da diluição dos isótopos estáveis do carbono pode-se medir quantitativamente a proporção do álcool de cana adicionado ao vinho. Entretanto, a adição de outras substâncias exógenas provenientes de plantas pertencentes ao mesmo ciclo fotossintético da uva, como o álcool de arroz ou laranja e açúcar de beterraba, não são detectados por este método (Ducatti, 2000). Além disso os valores de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ diminuem em plantas cultivadas na região do equador em direção aos

pólos e esta informação pode ser utilizada para a determinação da origem geográfica (Kelly *et al.*, 2005).

Variedades de uvas podem apresentar diferentes valores isotópicos de carbono, devido a variabilidade genética das plantas, resultando em diferentes fracionamentos dos isótopos de carbono durante a fixação do CO₂ (Rossmann *et al.*, 1996).

Martin *et al.* (1999), num estudo com vinhos genuínos de diferentes regiões de Bordeaux (França), durante as safras de 1990 a 1993, obtiveram valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ que variaram de $-25,8 \pm 1,3 \text{ ‰}$ a $-27,1 \pm 1,2 \text{ ‰}$. Esses autores observaram que os baixos níveis de precipitação resultaram em altos conteúdos de ^{13}C nos vinhos (aproximadamente $-25,2 \text{ ‰}$). Porém, em vinhos de diferentes regiões da Eslovênia, Kosir *et al.* (2001) encontraram valores de carbono que variaram de $-26,4 \text{ ‰}$ a $-28,6 \text{ ‰}$ em regiões com clima frio e seco e valores de $-24,7 \text{ ‰}$ a $-26,9 \text{ ‰}$ em regiões de clima quente e úmido.

Os efeitos significativos do clima nos valores isotópicos do carbono foram avaliados por Christoph *et al.* (2007) em vinhos alemães, das safras de 1995 a 2003. Os valores mais negativos de $\delta^{13}\text{C}$ (média de $-28,1 \text{ ‰}$) foram encontrados para a safra 1998, na qual ocorreu maior precipitação e os valores menos negativos de $\delta^{13}\text{C}$ (média de $-25,7 \text{ ‰}$) ocorreram em 2003, safra de menor precipitação.

Para o oxigênio, o fracionamento de isótopos ocorre com os processos de evaporação e condensação do ciclo da água: a água do oceano passa do estado líquido para o estado de vapor na atmosfera e sofre um forte fracionamento isotópico, resultando na diminuição dos isótopos mais pesados (deutério ou ^2H , oxigênio 18 ou ^{18}O) no vapor e nas nuvens (Figura 02). A extensão do fracionamento depende da temperatura. A massa de ar também segue a trajetória dos oceanos para os continentes, esfriando e perdendo o vapor de água durante o caminho, em forma de precipitação. Durante este processo, a chuva

enriquecida de isótopos cai e o vapor começa a ser progressivamente empobrecido no conteúdo de ^{18}O e ^2H (Calderone & Guillou, 2008).

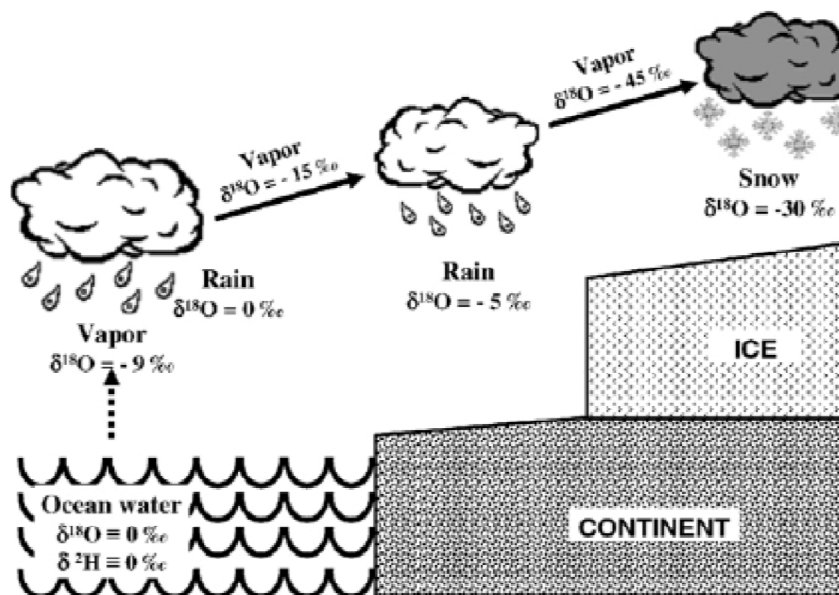


Figura 02 – Efeitos climáticos e geográficos no fracionamento isotópico de oxigênio na água (Calderone & Guillou, 2008)

No processo de absorção de água do solo pelas plantas, inicialmente não ocorre fracionamento significativo nos isótopos de hidrogênio e de oxigênio da água. Porém, ao atingir o nível das folhas e outras partes expostas como os frutos, o intenso processo de evaporação causa um enriquecimento no conteúdo de ^2H e ^{18}O da água residual das células, onde vai ocorrer a formação dos compostos orgânicos da planta. Como na razão isotópica do carbono na uva, onde a glicose e frutose são precursoras do etanol do vinho, também a água do processo de fermentação preservará o enriquecimento isotópico do oxigênio da água da folha/fruto. Desta forma, a água do vinho refletirá o conteúdo isotópico da água das plantas que o originou, que por sua vez será distinta da água do ambiente. Assim, a análise

de oxigênio pode ser utilizada para identificação da adição de água exógena em vinhos (Breás *et al.*, 1994).

As diferenças no conteúdo isotópico da água presente nas videiras ocorrem principalmente em função da alta evaporação da água em ambientes quentes e secos, em comparação com locais frios e úmidos. Portanto, as diferenças entre o conteúdo de ^{18}O das videiras, e conseqüentemente da água do mosto e do vinho de diferentes regiões são normalmente superiores aos da água do solo fornecida para a planta (Rossmann *et al.*, 1999, Jamin, 2002).

Valores “negativos” de $\delta^{18}\text{O}$ da água em vinhos podem indicar a adição de água exógena, ou serem resultantes das condições climáticas, principalmente da alta precipitação pluviométrica durante o período de colheita das uvas (Rossmann *et al.*, 1999).

A análise de vinhos europeus de diferentes países mostrou uma distinção para o $\delta^{18}\text{O}$, entre os grupos de vinhos, que variaram conforme a origem climática. O primeiro grupo, representado por vinhos de países europeus de clima quente (Espanha, Grécia e Portugal), apresentou alto enriquecimento, com valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ em torno de 5,2 ‰. O segundo grupo, representando países de clima temperado, obteve um valor médio de 2,3 ‰ e o último grupo (países europeus frios), mostrou um significativo decréscimo de $\delta^{18}\text{O}$ com um valor médio de -0,7 ‰ (Breás *et al.*, 1994). Em outro estudo, Day *et al.* (1994), encontraram em mostos de uva de cinco diferentes regiões da França, da safra de 1989, um valor médio de $\delta^{18}\text{O}$ de $3,8 \pm 1,4$ ‰.

A influência do clima na razão isotópica de oxigênio de vinte e sete vinhos da região do Napa Valley e quatro vinhos do Vale de Livermore (USA) foi analisada por Ingraham & Caldwell (1999). Nestes vinhos, a composição isotópica de oxigênio variou de 4,6 ‰ a 10,2 ‰, sendo que, os vinhos tintos ficaram 4 a 5 ‰ mais enriquecidos em $\delta^{18}\text{O}$

que os vinhos brancos. Estes autores, também estudaram a resistência à perda de água pela transpiração e a troca isotópica nas folhas e bagas de uva durante o período que antecede a colheita. Uma chuva de verão, três dias antes da colheita, ocasionou uma diminuição nos valores isotópicos de $\delta^{18}\text{O}$. As folhas foram mais sensíveis, apresentando uma diminuição de 8‰ nos valores isotópicos, enquanto que nas bagas a diminuição foi 3 a 4‰. Uma correlação negativa de - 0,93 foi observada entre o valor do $\delta^{18}\text{O}$ e a umidade relativa, isto ocorreu em função da alta umidade, que ao diminuir a transpiração resultou em valores mais baixos de $\delta^{18}\text{O}$ na água da uva.

Ogrinc *et al.* (2001), num estudo com vinhos de diferentes variedades de uvas, das safras de 1997 e 1998, provenientes de três regiões da Eslovênia (Sava, Drava e Coastal) encontraram valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ que variaram de $-6,05 \pm 1,26$ ‰ a $1,35 \pm 1,51$ ‰. Valores mais elevados de $\delta^{18}\text{O}$ da água foram observados em 1997 (-3,91 a 0,84 ‰) em relação a 1998 (-8,24 a -4,33 ‰).

Procurando identificar a origem geográfica, Capron *et al.* (2007), analisaram 63 parâmetros químicos em vinhos de quatro países (Hungria, Romênia, República Tcheca e África do Sul). Os resultados mostraram que foi possível classificar corretamente os vinhos utilizando parâmetros como valores isotópicos e concentração de elementos minerais.

Os valores isotópicos de oxigênio e carbono em vinhos alemães das safras de 1995 a 2003 foram avaliados por Christoph *et al.* (2007). O resultado mais negativo de $\delta^{18}\text{O}$ (valor médio -3,82‰) foi obtido em 1998, ano que apresentou a maior precipitação (290 mm) durante o período de maturação das uvas. Ao contrário, nos vinhos da safra de 2003, onde ocorreu a menor precipitação (33 mm), os valores de $\delta^{18}\text{O}$ foram os mais positivos (4‰). Devido as variações isotópicas que ocorrem em função das condições meteorológicas durante a maturação, as análises isotópicas devem ser realizadas para cada safra.

2.5 – Elementos minerais em vinhos

O conteúdo de elementos minerais nos vinhos pode resultar de duas origens: (1) natural ou primária, quando os minerais provêm do solo (erupções vulcânicas, uvas que crescem próximas ao mar, etc); (2) secundárias, podem ser devido a práticas de cultivo (fertilização, tratamentos fitossanitários, etc.), práticas enológicas (contato com máquinas, canos, utilização de agentes filtrantes, aditivos para diferentes finalidades) contaminações externas (carros, fábricas, etc.) e práticas fraudulentas (adição de produtos proibidos) (Eschnauer, 1982).

Devido à relação direta com a composição do solo, os minerais permitem uma diferenciação das uvas de acordo com a origem geográfica (Frias *et al.*, 2003). Portanto, a determinação dos teores de minerais em vinhos é uma técnica usualmente utilizada para diferenciar a origem geográfica dos vinhos, bem como para detectar adulterações e falsificações (Nuñez, 2000, Iglesias, 2007).

O teor de alguns minerais e elementos traços como o Li e o Rb foram utilizados para diferenciar vinhos espanhóis (Galícia) da Denominação de Origem Rías Baixas de vinhos das denominações Ribeiro e Valdeorras (Latorre *et al.*, 1994). Um estudo posterior também permitiu a classificação de vinhos espanhóis (Ilhas Canárias), porém utilizando somente o Rb, cujas concentrações foram de 0,33 mg.L⁻¹ para vinhos de Lanzarote, 2,68 mg.L⁻¹ para vinhos de El Hierro e 2,88 mg.L⁻¹ para La Palma (Frias *et al.* 2003). Da mesma forma Gremaud *et al.* (2004) determinaram a origem geográfica de vinhos suíços utilizando isótopos estáveis e elementos traços.

Em vinhos franceses a combinação da análise de isótopos e minerais também permitiu a classificação dos vinhos. Em 165 amostras, somente duas foram incorretamente classificadas, o restante atingiu uma classificação de 98,8% (Day *et al.* 1994). Em trabalho posterior, Day *et al.* (1995) diferenciaram regiões produtoras da França utilizando isótopos estáveis e os minerais Ba, Sr, Mg, Fe, Al e Rb.

A composição mineral diferenciou vinhos brasileiros, argentinos e uruguaios, sendo que os elementos que permitiram a melhor caracterização foram o Li, Mg, P, K, Rb, Na e Fe (Rizzon, *et al.*, 1997). Simpkins *et al.* (2000), utilizaram os elementos minerais Rb, Ba e B para diferenciar sucos australianos de brasileiros.

O conteúdo de minerais foi igualmente utilizado para diferenciar vinhos de diversas regiões da Bohemia (República Tcheca). Os elementos mais importantes foram Al, Ba, Ca, K, Li, Mg, Mn, Mo, Rb, Sr e V, que permitiram uma classificação de 97,4% dos vinhos brancos e 100% dos vinhos tintos (Sperková & Suchánek, 2005).

Minerais alcalinos especialmente Rb são facilmente mobilizados no solo e transportados pelas plantas, sendo bons indicadores da identidade geográfica. Este elemento depende de vários fatores como o solo, pH, umidade e porosidade (Kim & Thornton, 1993 in Kelly *et al.*, 2005). O Rb é pouco difundido na natureza e encontrado naturalmente em todos os vinhos em pequenas quantidades que variam de 1,0 a 10,0 mg.L⁻¹ (Rizzon *et al.*, 2008).

O teor de Mn pode ser uma característica específica de uma determinada região de produção (Daudt *et al.*, 1987). Solos oriundos de rochas ígneas básicas contêm maior quantidade de Mn total que os derivados de sedimentação arenosa. As sementes são ricas em Mn e conferem maior quantidade desse elemento nos vinhos tintos (Daudt *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1999).

Os teores médios de Mn encontrados em vinhos brasileiros comerciais por Daudt *et al.*, (1987) variaram de 2,1 a 2,8 mg.L⁻¹, porém Silva *et al.* (1999) encontraram concentrações entre 0,70 a 4,10 mg.L⁻¹ e Rizzon & Miele (2002) de 1,90 a 3,30 mg.L⁻¹.

O Ca nos vinhos pode originar-se de várias fontes além do solo, como o tratamento do mosto para diminuir a acidez, tipos de filtros, bentonite com predominância de Ca e resinas trocadoras de íons (Daudt *et al.*, 1987).

Os teores elevados de Ca e Mg podem provocar problemas de estabilidade nos vinhos, por esta razão suas determinações são importantes tanto em mostos quanto em vinhos (Silva *et al.*, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados em forma de capítulos.

CAPÍTULO 1 – Determination of the geographical origin of Brazilian wines by isotope and mineral analysis

Aceito para publicação na *Analytical and Bioanalytical Chemistry* numa edição especial sobre vinhos.

CAPÍTULO 2 – – Determinação de regiões produtoras de vinhos no Brasil através de análise isotópica e elementos minerais e influência da safra nos valores isotópicos

Trabalho nas normas para publicação na *Food Chemistry*.

CAPÍTULO 1 – Determination of the geographical origin of Brazilian wines by isotope and mineral analysis

Aceito para publicação na *Anlytical and Bioanalytical Chemistry* numa edição especial sobre vinhos.

Determination of the geographical origin of Brazilian wines by isotope and mineral analysis

S. V. Dutra · L. Adami · A. R. Marcon · G. J. Carnieli ·
 C. A. Roani · F. R. Spinelli · S. Leonardelli · C. Ducatti ·
 M. Z. Moreira · R. Vanderlinde

Received: 5 April 2011 / Revised: 7 June 2011 / Accepted: 13 June 2011 / Published online: 1 July 2011
 © Springer-Verlag 2011

Abstract In the present research, we studied wines from three different south Brazilian winemaking regions with the purpose of differentiating them by geographical origin of the grapes. Brazil's wide territory and climate diversity allow grape cultivation and winemaking in many regions of different and unique characteristics. The wine grape cultivation for winemaking concentrates in the South Region, mainly in the Serra Gaúcha, the mountain area of the state of Rio Grande do Sul, which is responsible for 90% of the domestic wine production. However, in recent years, two new production regions have developed: the

Campanha, the plains to the south and the Serra do Sudeste, the hills to the southeast of the state. Analysis of isotopic ratios of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ of wine water, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of ethanol, and of minerals were used to characterize wines from different regions. The isotope analysis of $\delta^{18}\text{O}$ of wine water and minerals Mg and Rb were the most efficient to differentiate the regions. By using isotope and mineral analysis, and discrimination analysis, it was possible to classify the wines from south Brazil.

Keywords Wine · Stable isotopes · Minerals · Geographical origin

Published in the special issue *Wine Analysis* with guest editor Isabelle Pianet.

S. V. Dutra · R. Vanderlinde
 Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul (UCS),
 Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130,
 Caxias do Sul, Rio Grande do Sul 95070-560, Brazil

S. V. Dutra (✉) · L. Adami · A. R. Marcon · G. J. Carnieli ·
 C. A. Roani · F. R. Spinelli · S. Leonardelli · R. Vanderlinde
 IBRAVIN/LAREN - Reference Laboratory Enologic,
 Avenida da Vindima, 1855,
 Caxias do Sul, Rio Grande do Sul 95084-470, Brazil
 e-mail: scdutra@terra.com.br

C. Ducatti
 Institute of Biosciences, Department of Physics and Biophysics,
 Centre for Stable Isotopes in Life Environmental Sciences,
 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
 Rubião Júnior,
 18608-000 Botucatu, São Paulo, Brazil

M. Z. Moreira
 Center for Nuclear Energy in Agriculture,
 Laboratory of Isotope Ecology, University of São Paulo,
 Avenida Centenário, 303 São Dimas,
 13400-970 Piracicaba, São Paulo, Brazil

Introduction

In Brazil, wine grape cultivation for winemaking concentrates in the South Region, mainly in the Serra Gaúcha, the mountain area of the state of Rio Grande do Sul, which is responsible for 90% of the domestic wine production. However, in recent years, two new production regions have developed: the Campanha, the plains to the south and the Serra do Sudeste, the hills to the southeast of the state. The Serra Gaúcha is located over basalt rocks, which give rise to the formation of clay loam soils. The Campanha is formed from sandy soils, as they are located over limestone, while the Serra do Sudeste is located mostly over granite rocks, in loam soils with traces of lithium, sodium, and aluminum [1].

Knowing the geographical origin of foods provides additional assurance of their quality, authenticity, and tipicity [2]. Several studies have been conducted to establish the geographical origin of different foods, for example, tea, olive oil, and rice [2–4]. Wine classification according to their geographical origin by assessment of

various chemical parameters was used by several researchers [5–9].

Determination of isotopes can provide information on the botanical and geographical origin [10]. Biological isotope fractionation provides an uneven distribution of lighter and heavier isotopes among the reagents and the reaction products. In general, the lighter isotopes are preferentially used, while the heavier isotopes are enriched in the uneven fraction of the substrate [11]. The magnitude of isotope fractionation is influenced by regional differences, which involves parameter variation such as humidity, temperature, winds, and meteorological conditions, amongst [12].

Minerals allow differentiation according to geographical origin because of a direct relationship with soil composition. They may also be used to detect adulterations and avoid fraud. Mineral contents of wines depend on several factors including type of grapes, area of production, soil characteristics, fertilization practices, processing conditions, and location of the vineyard [13, 14].

The purpose of the present study was to verify the differentiation of Merlot and Cabernet Sauvignon wines from the regions of Serra Gaúcha, Serra do Sudeste, and Campanha, localized at South Brazil, according to their origin on the basis of isotopic and minerals analyses.

Materials and methods

Samples

Fifty samples of each the Cabernet Sauvignon and Merlot grapes were collected in south Brazil during the 2007 harvest. For Cabernet Sauvignon, 34 samples from the Serra Gaúcha region, 4 from the Serra do Sudeste region, and 12 from the Campanha region were collected. For Merlot, 34 from the Serra Gaúcha region, 3 from the Serra do Sudeste region, and 13 from the Campanha region were collected. More samples were collected from the Serra Gaúcha region because of the major area of production in relation to the other regions. Sampling occurred during the physiological maturation of the grapes.

Microvinifications

Grape samples (5 kg) were destemmed from and crushed manually; microvinifications were conducted in stainless steel tanks (10 L). After destemming, the *Saccharomyces cerevisiae* yeast (0.3 g L⁻¹) pre-activated in ultra-pure water (28 °C) was added. After the malolactic fermentation, wines were decanted, and 40.0 mg L⁻¹ of sulfur dioxide was added as a preservative. They were kept for 10 days at -1 °C and were then transferred to 750-mL glass bottles.

For the mass spectrometric analysis, a Delta^{plus} XL isotope ratio mass spectrometer (ThermoFinnigan, Bremen, Germany), connected “on line” to a Flash EA 1112 elemental analyzer (ThermoQuest, Milan, Italy), was used to measure the ¹³C/¹²C ratios from the ethanol and the ¹⁸O/¹⁶O ratios from the wine water.

Isotopic ratio analysis of ¹⁸O/¹⁶O of water and of ¹³C/¹²C of ethanol

The ¹⁸O/¹⁶O isotopic ratios from the wine samples were related to the international standard Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) (δ¹⁸O) following the Agriculture Ministry methodology through the Instruction Normative No. 2 from February 2, 2006 [15]. In 10-mL flasks, CO_{2(g)} was added directly from the cylinder and sealed with a rubber stopper and aluminum seal. A syringe was inserted into the wine sample (3 mL) vials, and these were kept vertically with the lid down. The sample preparation was based on the CO₂ equilibrium obtained through the isotope change reaction between CO_{2(g)} and the wine water_(l), at controlled temperature (25 °C), over a 24-h period, according to Eq. 1:



After isotopic equilibrium has been achieved, the δ¹⁸O value of the CO_{2(g)} reflects the δ¹⁸O_(l) value from the wine water. For this analysis, the same instrumental configuration was used as for measuring the ¹³C/¹²C values for the wine samples, with a helium flow rate of 90 mL min⁻¹, while 70 μL of the equilibrated CO₂ was injected into the elemental analyzer. After removal of the water in the reduction column, the signal intensities at *m/z* 44, 45, and 46 were measured on the mass spectrometer. The δ¹⁸O value, calculated by Eq. 2, is normalized with that of the international standard V-SMOW [16, 17]. A working standard (ultra-pure water) was calibrated against the V-SMOW and SLAP standards. The analytical instrumental error was lower than 0.05‰, and the analysis precision was equal to or less than 0.2‰ [16, 18, 19]. The samples were analyzed in triplicate.

$$\delta \text{ (‰)} = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{ref}}) - 1] \times 10^3 \quad (2)$$

The ¹³C/¹²C isotopic ratios of the wine samples were obtained according to the Agriculture Ministry methodology through the Instruction Normative No. 4 from May 2, 2001 [20]. After the distillation of 1.5 mL of the sample, at -196 °C and under vacuum (10⁻² mbar), for approximately 25 min, 1 μL of the distillate was packed into a tin capsule, with an absorbent substance, Chromosorb W, to avoid volatilization of the sample. The sample was then combusted inside the elemental analyzer in a vertical

quartz tube, containing copper oxide and silvered cobaltous-cobaltic oxide at 900 °C, under a continuous flow of ultra-pure helium (flow rate of 90 mL min⁻¹) and O₂ pulse of 175 mL min⁻¹. The produced gases were passed through a reduction column containing reduced copper at 680 °C, and after this, the water was removed, and the gases were separated on a Porapak Q chromatographic column at a temperature of 43 °C before entering the ion source of the mass spectrometer. The Delta^{plus} XL mass spectrometer has a triple ion collector measuring simultaneously the signals at *m/z* 44, 45, and 46 of the molecular ions of the CO₂ formed by the sample combustion. The isotopic value of the carbon-containing sample ($\delta^{13}\text{C}$) is compared with that of the international standard Pee Dee Belemnite (PDB), through Eq. 2, where R_{sample} is the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio of the sample and R_{ref} is that of the international standard PDB [16, 17]. A working standard solution of ethanol (Merck) was calibrated against NBS22 (oil) NIST. The samples were analyzed in triplicate. The standard deviation of the measurements was equal to or less than 0.2‰.

Determination of minerals

Some minerals were determined in the atomic absorption spectrometer (PerkinElmer model AAnalyst 800), according to specific methodology for each mineral. Analyses were performed in triplicate. For all minerals analyses, acetylene was used as air flame. A hollow cathode lamp with flame was used for determining Mg, Mn, and Ca. Emission method was used for Rb and Li analyses. For determining Mg, the sample was read directly at 279 nm wavelength and 0.2 nm slit. For determining Mg, wine was diluted at 1% with ultra-pure water and read at 285.2 nm wavelength and 0.7 nm slit. For Ca analysis, wine was diluted at 4% with a solution containing 20% of lanthanum chloride solution at 2.5% and read at 433.8 nm wavelength and 0.7 nm slit. For determining Rb, sample was diluted at 50% with ultra-pure water and, using an EDL lamp, was read at 780 nm wavelength and 0.2 nm slit. For

determining Li, the sample was read directly at 670.8 nm wavelength and 0.2 nm slit.

Climatological data

The climatological data on average air temperature, total rainfall, and total sunshine hours were supplied by the 8° District of the Brazilian National Institute of Meteorology (INMET) [21].

Statistical analysis

The results were evaluated with SPSS 12.0 program for Windows, through variance analysis by average comparative (ANOVA). Discrimination analysis was used to differentiate regions by the multivariate model.

Results and discussion

Values of $\delta^{18}\text{O}$ of wine water and $\delta^{13}\text{C}$ of ethanol

Regardless of the studied variety, analysis of $\delta^{18}\text{O}$ of wine water was efficient in differentiating the three studied regions; however, no statistical difference was observed between the varieties (Table 1). Samples from the Serra Gaúcha showed an average value of $\delta^{18}\text{O}$ higher than the other two regions, followed by the samples of the Campanha and Serra do Sudeste regions. This variation among regions might be explained due to differences in meteorological conditions as humidity and temperature [12].

With regard to climate, average values of $\delta^{18}\text{O}$ of wines water (Table 1) of the south region of Brazil were lower than wines of warm countries (5.2‰) and also lower than countries of temperate climate (2.3‰) [16]. However, average values of the present study are similar to those found for cold countries (−0.7‰) and lower than those described for Bordeaux regions, whose values vary between 1.7‰ and 4.5‰ [8].

Table 1 Isotope ratios $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (per mille) of water and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (per mille) of ethanol of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied

Region	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰; mean±standard error)			$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰; mean±standard error)		
	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total
Serra Gaúcha	0.38Aa±0.15	0.28 Aa±0.18	0.05A±0.12	27.73 Aa±0.06	28.52Ab±0.08	28.12A±0.06
Serra do Sudeste	−2.34Ca±0.21	2.17Ca±0.25	2.28C±0.16	28.75Ba±0.15	29.82Bb±0.3	29.11B±0.18
Campanha	−1.35Ba±0.39	1.24Ba±0.3	1.29B±0.24	28.90Ba±0.13	29.37Bb±0.11	29.17B±0.09
Total	−0.23±0.16	0.64±0.15	0.44±0.11	28.08a±0.07	28.82b±0.07	28.45±0.05

Means followed by different capital letters in the column and means followed by different lowercase letters in the line differ significantly by ANOVA complemented by Tukey's test of multiple comparisons; significance level of 5%

Table 2 Mg and Rb (milligrams per liter) of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied

Region	Mg (mean±standard error)			Rb (mean±standard error)		
	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total
Serra Gaúcha	79.68Cb±0.87	80.30Ca±1.02	79.99C±0.67	6.95Bb±0.25	7.99Ba±0.23	7.47B±0.18
Serra do Sudeste	90.94Ab±3.03	98.52Aa±4.70	93.47A±2.62	8.47Ab±0.29	9.72Aa±0.20	8.88A±0.25
Campanha	86.52Bb±1.40	89.22Ba±1.38	88.08B±1.00	4.45Cb±0.22	5.50Ca±0.27	5.06C±0.19
Total	82.19b±0.79	83.70a±0.91	82.96±0.60	6.50b±0.21	7.31a±0.20	6.92±0.15

Means followed by different capital letters in the column and means followed by different lowercase letters in the line differ significantly by ANOVA complemented by Tukey's test of multiple comparisons; significance level of 5%

The climate of the three regions studied is classified as temperate; however, during the 2007 harvest, average rainfall was higher than the median of the last 10 years. Isotopic discrimination of the various chemical elements present in nature occurs in function of natural phenomena that fractionate isotopes, such as photosynthesis and water evaporation, and it is subject to climatic influences of latitude and agricultural techniques [8, 11, 12]. Negative values of $\delta^{18}\text{O}$ of water are typical of groundwater. In wines, they might indicate the addition of exogenous water or particular climatic conditions and rainfall during grape harvest [22]. Moreover, $\delta^{18}\text{O}$ values are modified by climatic conditions during the ripening and harvesting periods [23].

Regardless of the variety studied, results of $\delta^{13}\text{C}$ of ethanol were efficient in differentiating the samples of the Serra Gaúcha in relation to the remaining regions. Regardless of region, the Merlot variety showed a significantly higher total average than the Cabernet Sauvignon variety (Table 1). These findings corroborate results obtained by Rossmann et al. [24], who also found higher average values of $\delta^{13}\text{C}$ for the Merlot variety compared to other varieties and reached the conclusion that this difference might be due to the influence of genetic variability in some biochemical reactions that occur in plants and cause different carbon isotope fractionations during CO_2 fixation.

According to Table 1, average values of $\delta^{13}\text{C}$ found in the present study were lower than those obtained by Martin

et al. [8] (−25.8‰ to −27.1‰) in a study with wines from different European regions, but stayed within value ranges obtained by Rossmann et al. [24], who found values of $\delta^{13}\text{C}$ between −23‰ and −29‰ in Italy, −24‰ and −29‰ in France, and −23‰ and −30‰ in Germany.

In the three areas of study, rainfall between January and mid-February was lower compared to that between February and end of March. In the Serra Gaúcha, sampling began earlier than in other regions; therefore, a higher number of samples were collected before the rainy season (mid-February). In the Serra do Sudeste and Campanha, samples were collected after this period, and only negative values were observed, which might explain the higher average value of $\delta^{18}\text{O}$ of wine water and $\delta^{13}\text{C}$ of ethanol in the Serra Gaúcha in relation to the other two regions. The isotopic ratio of water in the grapes is influenced by evapotranspiration in the weeks preceding harvest, regardless of other factors [25].

Mineral content

Mg and Rb (Table 2) showed to be efficient in differentiating the three regions of study, regardless of wine variety. Wines from the Serra do Sudeste showed a higher Mg and Rb average, differing from those from the Serra Gaúcha and Campanha. Regardless of region, the Cabernet Sauvignon variety showed significantly higher Mg and Rb total averages than the Merlot variety.

Table 3 Values of Mn and Ca (milligrams per liter) of wines Cabernet Sauvignon and Merlot of the different studied regions

Regions	Mn (mean±standard error)			Ca (mean±standard error)		
	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total
Serra Gaúcha	2.21Ba±0.13	1.84Aa±0.08	2.03±0.08	55.14Ab±1.29	68.97Aa±1.5	62.06±1.10
Serra do Sudeste	1.96Ba±0.1	1.27Aa±0.12	1.73±0.11	48.61Aa±2.49	51.13Ba±8.89	49.45±3.24
Campanha	3.62Aa±0.33	2.44Ab±0.15	2.94±0.18	59.12Aa±1.44	60.72Ba±1.75	60.04±1.17
Total	2.51±0.13	2.00±0.07	2.25±0.08	55.51±0.99	65.78±1.23	60.75±0.85

Means followed by different capital letters in the column and means followed by different lowercase letters in the line differ significantly by ANOVA complemented by Tukey's test of multiple comparisons; significance level of 5%

Table 4 Li (micrograms per liter) of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied

Regions	Merlot (mean±standard error)	Cabernet Sauvignon (mean±standard error)	Total (mean±standard error)
Serra Gaúcha	4.11Bb±0.13	4.43Ba±0.15	4.27B±0.10
Serra do Sudeste	5.36Ab±0.4	6.24Aa±0.29	5.65A±0.30
Campanha	5.05Ab±0.17	5.96Aa±0.25	5.59A±0.17
Total	4.42b±0.11	4.96a±0.14	4.70±0.09

Means followed by different capital letters in the column and means followed by different lowercase letters in the line differ significantly by ANOVA complemented by the Tukey's test of multiple comparisons; significance level of 5%

These values agree with other studies on Brazilian wines, which found Mg levels between 44.30 and 124.10 mg L⁻¹ [26]. Frias et al. [13] were also able to geographically differentiate sweet wines bottled in the Canary Islands (Spain) just by measuring Mg and Na. The average values found for Rb in the present study are higher than those found by Frias et al. [27], who obtained 0.33 mg L⁻¹ in wines from Lanzarote, 2.68 mg L⁻¹ in wines from El Hierro, and 2.88 mg L⁻¹ in wines from La Palma (Canary Islands), differentiating Spanish wines. Latorre et al. [28] also obtained a good classification of Spanish wines from Galizia by measuring Rb and Li levels.

Mn results proved efficient in differentiating Campanha wines from the wines of the two other regions only with regard to the Merlot variety. Although Merlot wines showed higher average values than those of Cabernet Sauvignon wines, only Campanha wines showed significant differences in both varieties (Table 3). These values agree with those found in Brazilian commercial wines, whose levels vary between 1.90 and 3.30 mg L⁻¹. The content of Mn in wines is derived from the soil or phytosanitary treatments [26, 29].

In contrast to Mn, Ca results allowed differentiating Serra Gaúcha wines in relation to wines from the other two regions only with regard to the Cabernet Sauvignon variety. In this region, the average for the Cabernet Sauvignon wines was significantly higher than in the Merlot wines (Table 3). Average Ca values found in this study varied between 48.61 and 68.97 mg L⁻¹, and were lower than the average value (74.0 mg L⁻¹) described for Brazilian commercial wines by Rizzon and Miele [29]. According to Daudt et al. [26], factors such as grape variety, soil, climatic conditions, technological treatment of must and wine, filtration process, bottling, storing temperature during conservation, and aging influence Ca content of wines.

Regardless of variety, Serra do Sudeste and Campanha wines showed higher Li averages than Campanha wines (Table 4). Regardless of region, the Cabernet Sauvignon wines showed a significantly higher average compared to the Merlot wines. Li results found in the present study are in agreement with results obtained by Rizzon et al. [7], who used minerals to characterize wines from different countries

of the Mercosul area and found Li levels of 5.0 µg L⁻¹ in Brazilian wines; however, these levels were much lower than those found for wines from Argentina and Uruguay (193.6 and 23.0 µg L⁻¹, respectively).

Statistical design for classification of the regions

By discrimination analysis of the experimental wines, a statistical model was prepared for differentiating the geographical regions, using the region as a dependent variable and the isotopic values of δ¹⁸O, δ¹³C, and the minerals Mg, Rb, Mn, Ca, and Li as independent variables. From this analysis, three equations of classification were achieved:

$$C_{\text{Serra}} = -712.129 + 8.769Y_{\text{Oxygen}} - 48.70Y_{\text{Carbon}} + 4.059Y_{\text{Mn}} + 0.164Y_{\text{Ca}} + 0.504Y_{\text{Mg}} + 0.353Y_{\text{Rb}} - 2.176Y_{\text{Li}} \quad (3)$$

$$C_{\text{Serra do Sudeste}} = -743.299 + 8.113Y_{\text{Oxygen}} - 49.592Y_{\text{Carbon}} + 3.511Y_{\text{Mn}} + 0.084Y_{\text{Ca}} + 0.579Y_{\text{Mg}} + 0.540Y_{\text{Rb}} - 2.176Y_{\text{Li}} \quad (4)$$

$$C_{\text{Campanha}} = -757.025 + 8.735Y_{\text{Oxygen}} - 50.130Y_{\text{Carbon}} + 4.618Y_{\text{Mn}} + 0.155Y_{\text{Ca}} + 0.542Y_{\text{Mg}} - 0.311Y_{\text{Rb}} - 1.348Y_{\text{Li}} \quad (5)$$

Table 5 Classification (percent) of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied

Region	Serra	Serra do Sudeste	Campanha	Total
Serra	77.3	10.1	12.6	100
Serra do Sudeste	0	100	0	100
Campanha	9.2	11.8	78.9	100

To establish the origin of the wine, isotopic and mineral values of the wine are replace in the three equations above. The equation with the highest value indicates the region to which the wine belongs. Table 5 shows the wine classification of the different regions of study, obtained by isotopic and mineral analysis.

Wines from the Serra do Sudeste had the best classification, with all wines being correctly classified. The total classification of the wines using this statistical model was of 80% (Table 5).

Isotopic analyses of $\delta^{18}\text{O}$ of wine water and Mg and Rb were the most efficient in differentiating the three regions of study. Values of $\delta^{13}\text{C}$ of ethanol, Mg, Rb, and Li showed a significant difference between the wine varieties, regardless of regions. A good classification of wines from different winemaking regions of south Brazil was obtained from the results of isotopic and mineral analyses.

Acknowledgements The authors thank all enologists and wineries that have kindly supplied the grape samples and thus have made this work possible.

References

1. Streck EV, Kämpf N, Dalmolin RS, Klamt E, Nascimento PC, Schneider P, Giasson E, Pinto LFS (2008) Solos do Rio Grande do Sul, 2nd edn. EMATER/RS-ASCAR, Porto Alegre
2. Angerosa F, Brás O, Contento S, Guillou FC, Reniero F, Sada E (1999) Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *J Agric Food Chem* 47:1013–1017
3. Fernández-Cáceres PL, Martín MJ, Pablos F, González G (2001) Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. *J Agric Food Chem* 49:4775–4779
4. Kelly S, Baxter M, Chapman S (2002) The application of isotopic and elemental analysis to determine the geographical origin of premium long grain rice. *Eur Food Res Technol* 214:72–78
5. Baxter MJ, Crews HM, Dennis MJ, Goodall I, Anderson D (1997) The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. *Food Chem* 60:443–450
6. Šperková J, Suchánek M (2005) Multivariate classification of wines from different Bohemian regions (Czech Republic). *Food Chem* 93:659–663
7. Rizzon LA, Miele A, Rosier JP (1997) Discrimination of wines from the Mercosul countries according to their mineral composition. *J Int Des Sci De La Vigne Et Du Vin* 31:43–47
8. Martin ML, Mazure M, Jouiteau C, Martin YL, Aguile L, Allain P (1999) Characterization of the geographic origin of Bordeaux wines by a combined use of isotopic and trace element measurements. *Am J Enol Viticult* 50:409–417
9. Capron X, Smeyers-Verbeke J, Massart DL (2007) Multivariate determination of the geographical origin of wines from four different countries. *Food Chem* 101:1585–1597
10. Calderone G, Guillou C, Reniero F, Naulet N (2007) Helping to authenticate sparkling drinks $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of CO_2 by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Food Res Int* 40:324–331
11. Morasch B, Richnow HH, Schink B, Meckenstock RU (2001) Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects. *Appl Environ Microbiol* 67:4842–4849
12. Brause AR, Raterman JM, Petrus D, Doner LW (1984) Verification of authenticity of orange juice. *Anal Chem* 6:535–539
13. Frias S, Pérez-Trujillo JP, Pena EM, Conde JE (2001) Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content. *Eur Food Res and Technol* 213:145–149
14. Iglesias M, Besalú E, Anticó E (2007) Internal standardization-atomic spectrometry and geographical pattern recognition techniques for the multielement analysis and classification of Catalanian red wines. *J Agric Food Chem* 55:219–225
15. Brazil (2006) Instrução Normativa No. 2 de 02 de fevereiro de 2006. Metodologia de análise da razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da Água dos Vinhos e Derivados. Available at <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>
16. Brás O, Reniero F, Serrini G (1994) Isotope ratio mass spectrometry: analysis of wines from different European countries. *Rapid Commun Mass Spectrom* 8:967–970
17. Cisneros BOA, López MG, Richling E, Heckel F, Scherier P (2002) Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of ethanol. *J Agric Food Chem* 50:7520–7523
18. Remaud G, Guillou C, Villet C, Martin GJ (1992) A coupled NMR and MS isotopic method for the authentication of natural vinegars. *Fresenius J Anal Chem* 342:457–461
19. Pupin AM, Dennis IE, Kelly S, Bigwood T, Toledo MCF (1998) Use of isotopic analysis to determine the authenticity of Brazilian orange juice (*Citrus sinensis*). *J Agric Food Chem* 46:1369–1373
20. Brazil (2001) Instrução Normativa No. 04 de 05 de fevereiro de 2001. Dispõe sobre a metodologia de análise da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em produtos e sub-produtos das plantas do ciclo fotossintético C_3 e C_4 . Available at <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>
21. National Institute of Meteorology—INMET, Brazil. Available at <http://www.inmet.gov.br/>
22. Rossmann A, Reniero F, Moussa I, Schmidt HL, Versini G, Merle MH (1999) Stable oxygen isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. *Z Lebensm Unters Forsch* 208:400–407
23. Ogrinc N, Kosir IJ, Kocjancic M, Kidric J (2001) Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses. *J Agric Food Chem* 49:1432–1440
24. Rossmann A, Schmidt HL, Reniero F, Versini G, Moussa I, Merle MH (1996) Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. *Z Lebensm Unters Forsch* 203:293–301
25. Ingraham NL, Caldwell EA (1999) Influence of weather on the stable isotopic ratios of wines: tools for weather/climate reconstruction? *J Geophys Res* 27:2185–2194
26. Daudt CE, Dal Piva GC, Garcia N, Rizzon LA (1987) Minerais em Videiras, Mosto e Vinhos II—Minerais em mosto, sua utilização durante a fermentação alcoólica e presença em vinhos. *Cienc Tecnol Aliment* 7:189–204
27. Frias S, Conde JE, Rodríguez-Bencomo JJ, García-Montelongo F, Pérez-Trujillo JP (2003) Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *Talanta* 53:335–344
28. Latorre MJ, Jares CG, Medina B, Herrero C (1994) Pattern recognition analysis applied to classification of wines from Galicia (Northwestern Spain) with certified brand of origin. *J Agric Food Chem* 42:1451–1455
29. Rizzon LA, Miele A (2002) Avaliação da Cv. Cabernet Sauvignon para Elaboração de Vinho Tinto. *Cienc Tecnol Aliment* 2:192–198

ERRATUM

Erratum to: Determination of the geographical origin of Brazilian wines by isotope and mineral analysis

S. V. Dutra · L. Adami · A. R. Marcon · G. J. Carnieli ·
C. A. Roani · F. R. Spinelli · S. Leonardelli · C. Ducatti ·
M. Z. Moreira · R. Vanderlinde

© Springer-Verlag 2011

Erratum to: Anal Bioanal Chem
DOI 10.1007/s00216-011-5181-2

Unfortunately, there was a mistake in Table 1 of this contribution. Please find the correct Table 1 below.

Table 1 Isotope ratios $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (per mille) of water and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (per mille) of ethanol of Cabernet Sauvignon and Merlot wines of the different regions studied

Regions	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰; mean $\pm$ standard error)						$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰; mean $\pm$ standard error)					
	Merlot		Cabernet Sauvignon		Total		Merlot		Cabernet Sauvignon		Total	
Serra Gaúcha	0.38Aa	± 0.15	-0.28Aa	± 0.18	0.05A	± 0.12	-27.73Aa	± 0.06	-28.52Ab	± 0.08	-28.12 A	± 0.06
Serra do Sudeste	-2.34Ca	± 0.21	-2.17Ca	± 0.25	-2.28 C	± 0.16	-28.75Ba	± 0.15	-29.82Bb	± 0.3	-29.11 B	± 0.18
Campanha	-1.35Ba	± 0.39	-1.24Ba	± 0.3	-1.29 B	± 0.24	-28.90Ba	± 0.13	-29.37Bb	± 0.11	-29.17 B	± 0.09
Total	-0.23	± 0.16	-0.64	± 0.15	-0.44	± 0.11	-28.08 a	± 0.07	-28.82b	± 0.07	-28.45	± 0.05

Means followed by different capital letters in the column and means followed by different lowercase letters in the line differ significantly by ANOVA complemented by Tukey's test of multiple comparisons; significance level of 5%

The online version of the original article can be found at <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5181-2>.

S. V. Dutra · R. Vanderlinde
Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul (UCS),
Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130,
Caxias do Sul, Rio Grande do Sul 95070-560, Brazil

S. V. Dutra (✉) · L. Adami · A. R. Marcon · G. J. Carnieli ·
C. A. Roani · F. R. Spinelli · S. Leonardelli · R. Vanderlinde
IBRAVIN/LAREN - Reference Laboratory Enologic,
Avenida da Vindima, 1855,
Caxias do Sul, Rio Grande do Sul 95084-470, Brazil
e-mail: scdutra@terra.com.br

C. Ducatti
Institute of Biosciences, Department of Physics and Biophysics,
Centre for Stable Isotopes in Life Environmental Sciences,
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Rubião Júnior,
18608-000 Botucatu, São Paulo, Brazil

M. Z. Moreira
Center for Nuclear Energy in Agriculture,
Laboratory of Isotope Ecology, University of São Paulo,
Avenida Centenário, 303 São Dimas,
13400-970 Piracicaba, São Paulo, Brazil

Published online: 30 July 2011

 Springer

CAPÍTULO 2 – Determinação de regiões produtoras de vinhos no Brasil através de análise isotópica e elementos minerais e influência da safra nos valores isotópicos

Trabalho nas normas para publicação na *Food Chemistry*.

Determinação de regiões produtoras de vinhos no Brasil através de análise isotópica e elementos minerais e influência da safra nos valores isotópicos

S.V. Dutra*, L. Adami, A. R. Marcon, G. J. Carnieli, C. A. Roani, F. Spinelli, S.

Leonardelli, R.Vanderlinde

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

*Correspondência para autor: S.V. Dutra, IBRAVIN/LAREN – Laboratório de Referência Enológica; Avenida da Vindima, 1855; CEP 95084-470, Caxias do Sul, RS, Brasil.
e-mail: scdutra@terra.com.br.

Resumo

Foram estudados vinhos brasileiros, elaborados por microvinificação, de uvas das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot, provenientes da Serra Gaúcha, Campanha e Serra do Sudeste, com o objetivo de diferenciá-los em função da origem geográfica, utilizando análises isotópicas e elementos minerais. Além disso, verificou-se a influência da safra de produção nos valores isotópicos. As análises isotópicas foram realizadas por espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) e a determinação dos minerais por absorção atômica de chama (FAA). Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água do vinho na variedade Merlot, foram eficientes para diferenciar os vinhos da Região da Campanha em relação às demais regiões, porém na variedade Cabernet Sauvignon somente diferenciaram os vinhos da Campanha dos vinhos da Serra do Sudeste. Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol do vinho separaram os vinhos da Serra

Gaúcha em relação a Campanha, para a variedade Cabernet Sauvignon. Os parâmetros mais eficientes para classificar os vinhos das diferentes regiões, foram o Rb e o Li. Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol, Rb e Li mostraram uma diferença significativa entre variedades, independente da região estudada. Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$, apresentaram diferenças significativas entre safras, independente da variedade, sendo os resultados de $\delta^{18}\text{O}$ mais negativos na safra de 2007 e os de $\delta^{13}\text{C}$ mais negativos na safra de 2008. A precipitação média quinzenal antes da data de coleta, apresentou uma forte correlação com os valores de $\delta^{18}\text{O}$. A análise discriminante dos resultados isotópicos e minerais permitiu uma classificação de aproximadamente 80 % dos vinhos das diferentes regiões vitivinícolas do sul do Brasil,

Palavras chave: vinho, isótopos, minerais, origem geográfica.

1. Introdução

Conhecer a origem geográfica dos alimentos fornece uma garantia adicional da qualidade, autenticidade e tipicidade destes produtos (Angerosa, Breás, Contento, Guillou, reniero & Sada, 1999). A determinação da autenticidade em vinho, através de métodos analíticos, destina-se a confirmar as declarações descritas nos rótulos, sendo de grande interesse para a indústria e consumidores (Christoph, Rossmann, Schlicht & Voerkelius, 2007, Schlesier et al., 2009, Smeyers-Verbeke et al., 2009).

Nos últimos anos, as análises isotópicas tem sido utilizadas por diversos pesquisadores para determinar a origem geográfica do vinho (Bréas, Reniero & Serrini, 1994; Rossmann, Schmidt, Reniero, Versini, Moussa & Merle, 1996).

A discriminação isotópica dos diferentes elementos químicos presentes na natureza ocorre em função dos processos naturais que fracionam os isótopos, como a fotossíntese e a evaporação da água (Brause, Raterman, Petrus & Doner, 1984; Martin, Mazure, Jouitteau, Martin, Aguilé & Allain, 1999; Morasch, Richnow, Schink & Meckenstock, 2001). O fracionamento isotópico é afetado pelas diferenças regionais, que é influenciado por parâmetros como a umidade, temperatura, ventos, altitude entre outros (Breas et al., 1994). Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água da uva são influenciados pelas condições climáticas durante o amadurecimento e colheita (Ogrinc, Kosir, Kocjancic & Kidric, 2001).

Para o oxigênio, o fracionamento de isótopos ocorre com os processos de evaporação e condensação do ciclo da água: a água do oceano passa do estado líquido para o estado de vapor na atmosfera e sofre um forte fracionamento isotópico, resultando na diminuição dos isótopos mais pesados (deutério ou ^2H , oxigênio 18 ou ^{18}O) no vapor e nas nuvens. A extensão do fracionamento depende da temperatura. A massa de ar também segue a trajetória dos oceanos para os continentes, esfriando e perdendo o vapor de água durante o caminho, em forma de precipitação. Durante este processo, a chuva enriquecida de isótopos pesados cai e o vapor começa a ser progressivamente empobrecido no conteúdo de ^{18}O e ^2H (Calderone & Guillou, 2008).

As diferenças no conteúdo isotópico da água presente nas videiras ocorrem principalmente em função da alta evaporação da água em ambientes quentes e secos, em comparação com locais frios e úmidos. Portanto, as diferenças entre o conteúdo de ^{18}O das videiras, e conseqüentemente da água do mosto e do vinho de diferentes regiões são normalmente superiores aos da água do solo fornecida para a planta (Rossmann, Reniero, Moussa, Schmidt, Versini & Merle, 1999, Jamin, 2002).

Valores “negativos” de $\delta^{18}\text{O}$ da água em vinhos podem indicar a adição de água exógena, ou serem resultantes das condições climáticas, principalmente da alta precipitação pluviométrica durante o período de colheita das uvas (Rossmann *et al.*, 1999).

A determinação de minerais em vinhos é usada para distinguir a origem geográfica, bem como para detectar adulterações. A quantidade destes minerais depende da disponibilidade dos elementos no solo, práticas de fertilização condições de processamento e localização do vinhedo (Nuñez, Peña, Herreo & Garcia-Martin, 2000; Frias, Conde, Rodriguez-Bencomo, Garcia-Montelongo & Pérez-Trujillo, 2003).

O principal local de cultivo da videira no Brasil é a Serra Gaúcha que está localizada na região sul, onde se destacam também dois novos locais de produção, a Serra do Sudeste e a Campanha. Estas regiões apresentam características diferentes, sendo a Serra Gaúcha situada a uma altitude de 400 a 600 m, com precipitação anual de 1736 mm e solo argiloso (basalto), a Serra do Sudeste localizada a uma altitude de 200 a 400 m, precipitação anual de 1505 mm, solos arenosos (granito) e a Campanha está localizada uma altitude de 100 to 200 m, precipitação anual de 1388 mm e solo arenoso (arenito) (Miele & Miolo, 2003).

Ingrahan & Caldwell (1999) avaliaram a resistência à perda de água pela transpiração e a troca isotópica nas folhas e bagas de uva durante o período que antecede a colheita. Uma chuva de verão, três dias antes da colheita, ocasionou uma diminuição nos valores isotópicos de $\delta^{18}\text{O}$ nas folhas e bagas. As folhas foram mais sensíveis, apresentando uma diminuição de 8 ‰ nos valores isotópicos, enquanto que nas bagas a diminuição foi 3 a 4‰. Uma correlação negativa de - 0,93 foi observada entre o valor do $\delta^{18}\text{O}$ e a umidade relativa, isto ocorreu em função da alta umidade, que ao diminuir a transpiração resultou em valores mais baixos de $\delta^{18}\text{O}$ na água da uva.

O objetivo deste trabalho foi determinar o potencial da análise da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do etanol, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água e a concentração de elementos minerais, na determinação da origem geográfica de vinhos provenientes de uvas da Serra Gaúcha, Serra do Sudeste e Campanha do RS, bem como verificar a influência da safra nos valores isotópicos.

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras

Foram coletadas 58 amostras de uvas Cabernet Sauvignon e 54 de Merlot para determinar a origem geográfica dos vinhos brasileiros provenientes da Serra Gaúcha, Serra do Sudeste e Campanha, na safra de 2008.

Para avaliar influência da safra nos valores isotópicos foram utilizadas 39 amostras de vinhos Merlot e 34 de Cabernet Sauvignon, da safra de 2008, com 34 amostras de vinhos Merlot e 34 de Cabernet Sauvignon, da safra 2007, somente da região Serra Gaúcha.

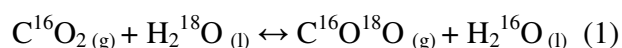
2.2 Microvinificações

As amostras de uva (5 kg) foram desengaçadas e esmagadas manualmente. As microvinificações foram realizadas em tanques de aço inox (10 L). Após desengace, foi adicionado levedura *Saccharomyces cerevisiae* (0,3 g. L⁻¹). Após a fermentação malolactica espontânea, os vinhos foram decantados, e 40,0 mg. L⁻¹ de dióxido sulfuroso foi adicionado como conservante. Após foram mantidos por 10 dias a -1 °C e transferidos para garrafas de 750 mL.

Para medir as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do etanol e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água do vinho, foi utilizado um espectrômetro de massa de razão isotópica Delta_{plus} XL (ThermoFinnigan, Bremen, Germany), conectado “in line” com um analisador elementar Flash EA 1112 (ThermoQuest, Milan, Italy).

2.3 Análise das razões isotópicas $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do etanol.

A razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água dos vinhos foi realizada em relação ao padrão internacional Vienna Standard Mean Ocean Water (V-SMOW) ($\delta^{18}\text{O}$) conforme a metodologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, segundo a Organização Internacional do Vinho e da Vinha - OIV (1996). A determinação da razão isotópica do oxigênio da água foi realizada indiretamente através do uso de gás carbônico, pois o espectrômetro de massas não admite água líquida diretamente. Em frascos de 10 mL, foi adicionado CO_2 (gás) diretamente do cilindro e fechado com tampa de borracha e selo de alumínio. O preparo da amostra foi baseado no equilíbrio do CO_2 obtido através da reação de troca isotópica entre o $\text{CO}_2(\text{g})$ e a água do vinho(l), em temperatura controlada (25 °C), durante um período de 24 horas, (Epstein & Mayeda, 1953) de acordo com a Equação 1:



Após o equilíbrio isotópico o $\delta^{18}\text{O}$ do $\text{CO}_2(\text{g})$ reflete o $\delta^{18}\text{O}(\text{l})$ da água contida no vinho.

Para esta análise utilizou-se hélio com fluxo de 90 mL min^{-1} e um volume de $70 \mu\text{L}$ do CO_2 equilibrado foi injetado no analisador elementar. Após a retenção da água, as espécies isotópicas de massa 44, 45 e 46 foram medidas no espectrômetro. O valor de

$\delta^{18}\text{O}$, calculado pela Equação 2, foi tomado comparativamente com o padrão internacional V-SMOW (Breás et al., 1994; Cisnerous, López, Richling, Heckel & Schereier, 2002). O padrão de trabalho (água ultra-pura) foi calibrado através dos padrões V- SMOW e SLAP. O erro analítico instrumental foi menor que 0,05‰, e a precisão da análise foi inferior ou igual a 0,2‰ (Bréas et al, 1994; Remaud, Guillou, Vallet & Martin, 1992). As amostras foram analisadas em triplicata.

$$\delta (\text{‰}) = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{ref}}) - 1] \times 10^3 \quad (2)$$

O valor isotópico do carbono da amostra ($\delta^{13}\text{C}$) é comparado com o padrão internacional Pee Dee Belemnite (PDB), através da Eq. 2, onde R_{amostra} é a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e R_{ref} é o padrão internacional PDB (Breás et al., 1994; Cisnerous et al., 2002). Uma solução padrão de etanol (Merck) foi calibrada através do NBS22 (oil) NIST. em relação ao padrão de acordo com a metodologia da OIV (1996). Após a destilação de 1,5 mL da amostra, sob ação criogênica $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ e sob vácuo (10^{-2} mbar), por aproximadamente 25 min, 1 μL do destilado foi empacotado em cápsula de estanho puro, juntamente com substância absorvente “Cromosorb W”, para evitar a volatilização da amostra. O carbono da amostra sofreu combustão no interior do analisador elementar em um tubo de quartzo vertical, contendo óxido de cobre e óxido de cobalto e prata a 900°C , sob fluxo contínuo de hélio ultra puro (90 mL min^{-1}) e pulso de O_2 de 175 mL min^{-1} . Os gases gerados passaram por uma coluna de redução, contendo cobre reduzido a $680\text{ }^{\circ}\text{C}$, e após retenção de água, foram separados por uma coluna cromatográfica Porapak Q a temperatura de $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de chegar na fonte de íon do espectrômetro de massas. O espectrômetro de massas Delta^{plus} XL contém um coletor triplo de íons com o objetivo de medir simultaneamente as relações massa/carga (m/z) correspondentes às massas 44, 45 e

46 do CO₂ formado pela combustão das amostras. As amostras foram analisadas em triplicata. O desvio padrão das medições foi igual ou menor que 0,2%.

2.4 Determinação de minerais

Os minerais foram determinados em espectrômetro de absorção atômica (PerkinElmer modelo AAnalyst 800), de acordo com a metodologia específica para cada mineral. As análises foram realizadas em triplicata. Para a determinação de Mg, Mn e Ca, foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco para cada elemento. Para as análises de Rb e Li foi utilizado o método de emissão de chama. Para a determinação do Mn, as amostras foram lidas diretamente a 279 nm de comprimento de onda e 0,2 nm de fenda. Para a determinação do Mg, as amostras foram diluídas a 1% com água ultra-pura e lidas a 285,2 nm de comprimento de onda e 0,7 nm de fenda. Para as análises de Ca, as amostras foram diluídas a 4% com solução contendo 20% cloreto de lantânio a 2,5% e lida a 433,8 nm e 0,7 nm de fenda. Para a determinação de Rb, as amostras foram diluídas a 50% com água ultra-pura e através de uma lâmpada de EDL deste elemento, foram lidas a 780 nm de comprimento de onda e 0,2 nm de fenda. Para a determinação de Li, as amostras foram lidas diretamente a 670,8 nm de comprimento de onda e 0,2 nm de fenda.

2.5 Dados climatológicos

Os dados climatológicos foram fornecidos pelo 8º Distrito Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados com o programa SPSS 12.0 for Windows, através da análise de variância (ANOVA). A análise discriminante foi utilizada para diferenciar os vinhos das diferentes regiões.

3. Resultados e Discussão

3.1 Origem geográfica dos vinhos

3.1.1 Valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água do vinho e $\delta^{13}\text{C}$ do etanol

Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água, da safra de 2008, para os vinhos da variedade Merlot, foram eficientes para diferenciar os vinhos da Região da Campanha em relação às demais regiões (Tabela 01). Na variedade Cabernet Sauvignon os valores de $\delta^{18}\text{O}$ somente distinguiram os vinhos da Campanha dos vinhos provenientes da Serra do Sudeste. Os vinhos da Serra Gaúcha apresentaram valores intermediários não se diferenciando das demais regiões. A região da Campanha apresentou uma precipitação menor em relação às demais, o que pode ter influenciado na obtenção do maior valor de $\delta^{18}\text{O}$ dos vinhos em relação aos valores da Serra Gaúcha e da Serra do Sudeste. Em estudos anteriores também encontramos diferenças significativas nos valores isotópicos de oxigênio, nas variedades Merlot e Cabernet Sauvignon da região sul do Brasil, safra 2005, com valores maiores em regiões de menor altitude (Adami, Dutra, Marcon, Carnieli, Roani & Vanderlinde, 2010).

Os níveis de $\delta^{18}\text{O}$ encontrados neste trabalho, quando comparados em um estudo realizado em vinhos europeus, classificados segundo o clima, apresentaram-se inferiores

aos países de clima quente, cujo valor médio foi de 5,2‰, e semelhante aos valores isotópicos de países com clima temperados (valor médio 2,3‰) e superiores aos encontrados para os países de clima frio (-0,7 ‰) (Breás et al., 1994). O clima nas três regiões avaliadas neste trabalho é classificado como temperado.

Conforme observa-se na Tabela 01, o valor médio de $\delta^{13}\text{C}$, independente da variedade estudada, diferenciou os vinhos da Serra Gaúcha em relação a Campanha. Porém, os vinhos da Serra do Sudeste não se diferenciaram das demais regiões estudadas. Os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados neste trabalho foram inferiores aos obtidos em vinhos de diferentes regiões da Europa, os quais apresentaram valores médios entre -25,8 a -27,1 ‰, (Martin et al., 1999), porém permaneceram dentro dos intervalos de valores obtidos na Itália (-23 ‰ a -29 ‰), na França (-24 a -29 ‰) e na Alemanha (-23 a -30 ‰) (Rossmann et al., 1996).

Tabela 01 – Valores de razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰) da água e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰) do etanol dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot, safra 2008, das diferentes regiões estudadas.

Regiões	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰) (média $\pm$ erro padrão)			$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰) (média $\pm$ erro padrão)		
	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total
Serra Gaúcha	1,21 ^{Ba} $\pm$ 0,11	1,30 ^{ABa} $\pm$ 0,12	1,25 $\pm$ 0,08	-28,04 ^{Aa} $\pm$ 0,05	-29,03 ^{Ab} $\pm$ 0,09	-28,50 ^A $\pm$ 0,06
Serra do Sudeste	1,32 ^{Ba} $\pm$ 0,38	0,89 ^{Ba} $\pm$ 0,52	1,16 $\pm$ 0,30	-28,31 ^{ABa} $\pm$ 0,07	-29,64 ^{ABb} $\pm$ 0,04	-28,81 ^{AB} $\pm$ 0,14
Campanha	2,93 ^{Aa} $\pm$ 0,38	2,08 ^{Aa} $\pm$ 0,23	2,35 $\pm$ 0,20	-28,36 ^{Ba} $\pm$ 0,15	-29,40 ^{Bb} $\pm$ 0,09	-29,07 ^B $\pm$ 0,09
Total	1,54 ^a $\pm$ 0,12	1,56 ^a $\pm$ 0,12	1,55 $\pm$ 0,09	-28,13 ^a $\pm$ 0,05	-29,20 ^b $\pm$ 0,06	-28,68 $\pm$ 0,05

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e médias seguidas de letras minúsculas distintas na linha diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Entre as variedades estudadas não foram observadas diferenças significativas nos resultados de $\delta^{18}\text{O}$ da água; entretanto os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol, na variedade Merlot apresentaram médias significativamente superiores as obtidas para a variedade Cabernet Sauvignon independente da região estudada (Tabela 01).

Isto pode ser explicado pela influencia da variabilidade genética que ocorre em algumas reações bioquímicas das plantas, causando diferente fracionamento do isótopo de carbono durante fixação do CO₂ (Rossmann et al., 1996). Em trabalhos anteriores também encontramos diferenças significativas nos valores isotópicos de carbono, para as variedades Merlot e Cabernet Sauvignon da região sul do Brasil, com valores superiores para a variedade Merlot (Adami et al., 2010).

3.1.2 Teores de Minerais dos Vinhos

Os resultados de Rb e Li, independente da variedade, permitiram a diferenciação dos vinhos das três regiões estudadas (Tabela 02). Os valores médios de Rb foram superiores na região da Serra do Sudeste, diferindo da Serra Gaúcha e da Campanha. O Rb é encontrado naturalmente em todos os vinhos em quantidades reduzidas variáveis de 1,0 a 10,0 mg.L⁻¹. Este elemento pertencente, ao grupo dos metais alcalinos é pouco difundido na natureza. A concentração de Rb dos vinhos está relacionada com a do solo, por isso a determinação desse elemento apresenta interesse na caracterização de vinhos de regiões vitícolas. (Rizzon, Salvador & Miele, 2008). Rizzon, Miele & Rosier, (1997) encontraram concentração mais elevada desse mineral nos vinhos da Serra Gaúcha, em relação aos vinhos argentinos e uruguaios.

A variedade Cabernet Sauvignon, independente da região, apresentou média total, significativamente superior de Rb e Li do que a variedade Merlot. Os vinhos da região da Campanha apresentaram resultados de Li superiores as demais regiões (valor médio total de 7,08 µg.L⁻¹), que os diferenciaram dos vinhos da Serra do Sudeste (valor médio total de

5,09 $\mu\text{g.L}^{-1}$), com valores intermediários, seguidos da Serra Gaúcha (valor médio total de 3,40 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (Tabela 02).

Vinhos espanhóis foram classificados, através dos teores de Li e Rb (Frias et al., 2003). Simpkins *et al.* (2000), também utilizaram os elementos minerais Rb, Ba e B para diferenciar sucos australianos de brasileiros.

Tabela 02 – Valores de Rb e Li (mg.L^{-1}) de vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot de diferentes regiões estudadas, safra 2008.

Region	Rb (média $\pm$ erro padrão)			Li (média $\pm$ erro padrão)		
	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total
Serra Gaúcha	5,95 ^{Bb} $\pm$ 0,2	7,78 ^{Ba} $\pm$ 0,26	6,79 ^B $\pm$ 0,17	3,39 ^{Cb} $\pm$ 0,10	3,42 ^{Ca} $\pm$ 0,10	3,40 ^C $\pm$ 0,07
Serra do Sudeste	7,48 ^{Ab} $\pm$ 0,49	9,17 ^{Aa} $\pm$ 0,54	8,12 ^A $\pm$ 0,4	4,57 ^{Bb} $\pm$ 0,30	5,95 ^{Ba} $\pm$ 0,97	5,09 ^B $\pm$ 0,42
Campanha	4,10 ^{Cb} $\pm$ 0,22	5,53 ^{Ca} $\pm$ 0,20	5,05 ^C $\pm$ 0,17	6,81 ^{Ab} $\pm$ 0,59	7,20 ^{Aa} $\pm$ 0,36	7,08 ^A $\pm$ 0,31
Total	5,75 ^b $\pm$ 0,17	7,05 ^a $\pm$ 0,19	6,41 $\pm$ 0,13	4,13 ^b $\pm$ 0,17	4,92 ^a $\pm$ 0,20	4,54 $\pm$ 0,13

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e médias seguidas de letras minúsculas distintas na linha diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Os resultados de Mn (Tabela 03) permitiram a diferenciação dos vinhos da região da Serra do Sudeste (valor médio total de 2,90 mg.L^{-1}), em relação às demais regiões, independente da variedade estudada. Os valores médios dos vinhos da variedade Merlot foram superiores em relação a variedade Cabernet Sauvignon. O teor de Mn pode ser específico de uma determinada região de produção, bem como ser influenciado pelo processo de fermentação (Daudt, Dal Piva, Garcia & Rizzon, 1987). Em função das microvinificações serem realizadas seguindo o mesmo procedimento, esta diferença foi provavelmente devido à região de cultivo.

Tabela 03 – Valores de Mn e Ca (mg.L^{-1}) dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot das diferentes regiões estudadas, safra 2008

Regiões	Manganês (média $\pm$ erro padrão)			Cálcio (média $\pm$ erro padrão)		
	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total
Serra Gaúcha	2,22 ^{Ba} $\pm$ 0,09	1,94 ^{Bb} $\pm$ 0,10	2,09 ^B $\pm$ 0,07	57,74 ^{Aa} $\pm$ 0,78	59,77 ^{Aa} $\pm$ 0,85	58,68 ^A $\pm$ 0,58
Serra do Sudeste	3,21 ^{Aa} $\pm$ 0,51	2,39 ^{Ab} $\pm$ 0,60	2,90 ^A $\pm$ 0,39	55,85 ^{Aa} $\pm$ 1,92	49,66 ^{Ba} $\pm$ 1,35	53,53 ^A $\pm$ 1,42
Campanha	2,38 ^{Ba} $\pm$ 0,12	2,33 ^{Bb} $\pm$ 0,15	2,35 ^B $\pm$ 0,11	61,43 ^{Aa} $\pm$ 2,41	58,06 ^{ABa} $\pm$ 1,25	59,07 ^A $\pm$ 1,14
Total	2,34 ^a $\pm$ 0,09	2,11 ^b $\pm$ 0,08	2,22 $\pm$ 0,06	58,18 ^a $\pm$ 0,74	58,63 ^a $\pm$ 0,70	58,42 $\pm$ 0,50

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e médias seguidas de letras minúsculas distintas na linha diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Conforme tabela 03, os resultados de Ca somente diferenciaram os vinhos da região da Serra Gaúcha em relação às demais regiões para a variedade Cabernet Sauvignon. Os teores médios de Ca, encontrados neste trabalho foram inferiores aos encontrados para vinhos comerciais brasileiros, cujo teor médio foi de $74,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Rizzon & Miele, 2002).

Tabela 04 – Valores de Mg (mg.L^{-1}) dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot, das diferentes regiões estudadas, safra 2008

Regiões	Magnésio (média $\pm$ erro padrão)		
	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total
Serra Gaúcha	72,67 ^{Bb} $\pm$ 0,85	84,72 ^{Aa} $\pm$ 2,08	78,28 ^A $\pm$ 1,14
Serra do Sudeste	84,65 ^{Aa} $\pm$ 2,77	88,83 ^{Aa} $\pm$ 4,71	86,22 ^A $\pm$ 2,45
Campanha	83,07 ^{Aa} $\pm$ 2,14	83,50 ^{Aa} $\pm$ 1,55	83,36 ^A $\pm$ 1,25
Total	75,71 ^b $\pm$ 0,86	84,49 ^a $\pm$ 1,36	80,25 $\pm$ 0,85

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e médias seguidas de letras minúsculas distintas na linha diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Os resultados de Mg somente diferenciaram os vinhos Merlot da Serra Gaúcha, em relação às demais regiões (Tabela 04). Alguns pesquisadores diferenciaram geograficamente vinhos espanhóis das Ilhas Canárias utilizando somente Mg e Na (Frías, Pérez-Trujillo, Peña & Conde, 2001). Rizzon, et al. (1997), também utilizaram minerais para diferenciar vinhos brasileiros, argentinos e uruguaios. Os elementos que mostraram a melhor caracterização foram o Li, Mg, P, K, Rb, Na e Fe.

3.1.3 Modelo estatístico para classificação das regiões

Foi elaborado um modelo estatístico com base na análise discriminante dos vinhos experimentais para diferenciar as regiões geográficas, utilizando-se como variável dependente a região e variáveis independentes os valores de $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ e dos minerais Mg, Rb, Mn e Ca e Li. Através dessa análise foram determinadas três equações discriminantes de classificação:

$$C_{\text{Serra Gaúcha}} = -604,885 + 2,403Y_{\text{Oxigenio}} - 40,862Y_{\text{Carbono}} - 1,410 Y_{\text{Mn}} + 0,695Y_{\text{Ca}} + 0,72Y_{\text{Mg}} - 1,665Y_{\text{Rb}} + 2,356 Y_{\text{Li}}$$

$$C_{\text{Serra do Sudeste}} = -616,032 + 2,204Y_{\text{Oxigenio}} - 41,188Y_{\text{Carbono}} - 0,894Y_{\text{Mn}} + 0,632Y_{\text{Ca}} + 0,99Y_{\text{Mg}} - 1,646 Y_{\text{Rb}} + 2,820 Y_{\text{Li}}$$

$$C_{\text{Campanha}} = -647,555 + 2,691Y_{\text{Oxigenio}} - 42,305Y_{\text{Carbono}} - 1,512Y_{\text{Mn}} + 0,653Y_{\text{Ca}} + 0,082Y_{\text{Mg}} - 2,501Y_{\text{Rb}} + 3,787Y_{\text{Li}}$$

Para determinar a origem de um vinho substitui-se os valores de $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$, Mg, Rb, Mn, Ca e Li deste vinho nas três equações acima. O vinho pertence à região cuja equação resultar em maior valor. Utilizando estas equações foi obtido uma classificação de 88,5% para os vinhos da Campanha, 78,2% para os vinhos da Serra Gaúcha e 62,5% para

os vinhos da Serra do Sudeste (Tabela 05). Para o total dos vinhos, este modelo permitiu uma classificação de 76,4%. A combinação da análise de isótopos e minerais, também permitiu classificar vinhos franceses (Day, Zhang & Martin, 1995).

Tabela 05 – Classificação (percentagem) dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot das diferentes regiões estudadas.

Regiões	Serra	Serra do Sudeste	Campanha	Total
Serra Gaúcha	78,2	20,4	1,4	100
Serra do Sudeste	37,5	62,5	0	100
Campanha	0	11,5	88,5	100

3.2 Influência da safra nos valores isotópicos

A influência da safra nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água e $\delta^{13}\text{C}$ do etanol dos vinhos foi estudada na região da Serra Gaúcha. Independente da variedade analisada observou-se diferenças significativas entre as safras (Tabela 06). Na safra de 2007, os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água foram mais negativos em relação à safra de 2008, para ambas variedades. Isto pode ser justificado devido ao maior volume de precipitação pluviométrica que ocorreu de janeiro a março, na safra de 2007 (média de 160 mm) em relação à safra de 2008 (média de 85 mm) (Mandelli, 2007; Mandelli, 2008).

Os valores isotópicos de oxigênio em vinhos da região da Franconia (Alemanha), também variaram em função da safra. Na safra de maior precipitação, os resultados de $\delta^{18}\text{O}$

foram mais negativos (-3,82‰), em relação a safra de menor precipitação (4‰) (Christophe et al., 2007).

Observam-se também valores mais negativos de $\delta^{18}\text{O}$ da água para a variedade Cabernet Sauvignon (-0,28‰) em relação a variedade Merlot (0,38‰), somente para a safra de 2007, provavelmente devido ao maior volume de precipitação pluviométrica (média de 210 mm) que ocorreu na época de maturação da variedade Cabernet Sauvignon (março), quando comparada com a precipitação (média de 155mm) da época de maturação da variedade Merlot (fevereiro). Valores negativos de $\delta^{18}\text{O}$ da água em vinhos genuínos são resultantes de condições climáticas de regiões frias e úmidas durante o período de colheita das uvas (Rossmann et al., 1999).

A alta precipitação média quinzenal antes da data de coleta (INMET, 2007), apresentou uma correlação direta forte ($r = -0,800$; $p < 0,001$) com os valores de $\delta^{18}\text{O}$, na safra de 2007.

Tabela 06 – Valores de razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰) da água e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰) do etanol dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot, da Serra Gaúcha, safras 2007 e 2008.

Safra	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (‰) (média $\pm$ erro padrão)			$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰) (média $\pm$ erro padrão)		
	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total	Merlot	Cabernet Sauvignon	Total
2007	0,38 ^{Ba} $\pm$ 0,15	-0,28 ^{Bb} $\pm$ 0,18	1,16 ^B $\pm$ 0,30	-27,73 ^{Aa} $\pm$ 0,06	-28,52 ^{Ab} $\pm$ 0,08	-28,12 ^A $\pm$ 0,06
2008	1,21 ^{Aa} $\pm$ 0,11	1,30 ^{Aa} $\pm$ 0,12	2,35 ^A $\pm$ 0,20	-28,04 ^{Ba} $\pm$ 0,05	-29,03 ^{Bb} $\pm$ 0,09	-28,50 ^B $\pm$ 0,06
Total	0,82 $\pm$ 0,10	0,51 $\pm$ 0,12	1,55 $\pm$ 0,09	-27,90 ^a $\pm$ 0,04	-28,77 ^b $\pm$ 0,06	-28,32 $\pm$ 0,04

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e médias seguidas de letras minúsculas distintas na linha diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol foram mais negativos para a safra de 2008, bem como para a variedade Cabernet Sauvignon independente da safra de produção. A safra de 2007 caracterizou-se por ser uma safra mais quente e úmida do que a safra de 2008. Segundo Mandelli (2008), as temperaturas (dezembro a março) da Serra Gaúcha na safra de

2007, foram mais elevadas que na safra de 2008. Kosir *et al.* (2001), também encontraram maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$ em regiões de clima quente e úmido.

As análises isotópicas, devem ser realizadas para cada safra de produção, pois as variações dos isótopos ocorrem em função das condições meteorológicas que antecedem a maturação das uvas (Martin *et al.*, 1999).

4. Conclusões

Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ na safra 2008 para a variedade Merlot, foram eficientes para classificar os vinhos da Região da Campanha em relação às demais regiões, porém na variedade Cabernet Sauvignon somente diferenciaram os vinhos da Campanha dos vinhos da Serra do Sudeste. Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ distinguiram os vinhos da Serra Gaúcha em relação a Campanha, para a variedade Cabernet Sauvignon.

Os parâmetros mais eficientes para classificar os vinhos foram o Rb e o Li. O Mg somente diferenciou os vinhos da Serra Gaúcha em relação às demais regiões e o Mn separou os vinhos da Serra do Sudeste em relação aos vinhos da Campanha e Serra Gaúcha.

Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol, Rb e Li mostraram uma diferença significativa entre variedades, independente da região estudada, com valores mais negativos de $\delta^{13}\text{C}$ e médias superiores de Rb e Li para os vinhos da variedade Cabernet Sauvignon.

Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água e $\delta^{13}\text{C}$ do etanol, apresentaram diferenças significativas entre safras. A precipitação média quinzenal antes da data de coleta, apresentou uma forte correlação com os valores de $\delta^{18}\text{O}$.

A análise discriminante dos resultados isotópicos e minerais permitiu uma classificação de aproximadamente 80 % dos vinhos das diferentes regiões vitivinícolas do sul do Brasil.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade de Caxias do Sul (UCS), ao Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro a este estudo.

Os autores agradecem também aos enólogos e produtores que forneceram as uvas que tornaram possível a realização deste trabalho.

6. References

- Adami, L., Dutra, S. V., Rossi, A. R., Carnieli, G. J., Roani, C. A & Vanderlinde, R. (2010). Geographic origin of southern Brazilian wines by carbon and oxygen isotope analyses *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 2943–2948.
- Angerosa F., Bréas O., Contento S., Guillou F.C., Reniero F. & Sada E. (1999). Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1013–1017.
- Brause, A.R., Ratterman, J.M., Petrus, D. & Doner, L.W, (1984). Verification of authenticity of orange juice. *Analytical Chemistry*, 6, 535–539.
- Brasil (2001) Instrução Normativa No. 04 de 05 de fevereiro de 2001. Dispõe sobre a metodologia de análise da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em produtos e sub-produtos das plantas do ciclo fotossintético C_3 e C_4 . Available at <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>

- Brasil (2006) Instrução Normativa No. 2 de 02 de fevereiro de 2006. Metodologia de análise da razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da Água dos Vinhos e Derivados. Available at <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>
- Bréas, O., Reniero, F. & Serrini, G. (1994). Isotope ratio mass spectrometry: analysis of wines from different European countries. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 8, 967–970.
- Calderone, G. & Guillou C. (2008). Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages. *Food Chemistry*, 106, 1399–1405.
- Christoph, N., Rossmann A., Schlicht, C. & Voerkelius, S. (2007). Wine Authentication using Stable Isotope Ratio Analysis: Significance of Geographic Origin, Climate, and Viticultural Parameters *ACS Symposium Series*, 952, 166–179.
- Cisnerous, B.O.A., López, M.G., Richling, E., Heckel, F. & Schereier P (2002). Tequila authenticity assessment by headspace SPME- HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7520–7523.
- Daudt, C.E., Dal Piva, G.C., Garcia, N. & Rizzon, L.A. (1987). Minerais em Videiras, Mosto e Vinhos II—Minerais em mosto, sua utilização durante a fermentação alcoólica e presença em vinhos. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 7, 189–204.
- Day, M.P., Zhang, B., Martin, G.J. (1995). Determination of geographical origin of wine using joint analysis of elemental and isotopic composition. II—Differentiation of the principal production zones in France for the 1990 vintage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 113–123.
- Epstein S., Mayeda T. (1953). Variation of O^{18} content of waters from natural sources *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 4: 213–224.

- Frías, S., Conde, J.E., Rodríguez-Bencomo, J.J., García-Montelongo, F. & Pérez-Trujillo, J.P. (2003). Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *Talanta*, 5, 335–344.
- Frias, S., Pérez-Trujillo, J.P., Pena, E.M. & Conde, J. E. (2001). Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content. *European Food Research and Technology*, 213, 145–149.
- Ingrahan, N.L. & Caldwell, E.A. (1999) Influence of weather on the stable isotopic ratios of wines: tools for weather/climate reconstruction? *Journal of Geophysical Research*, 27, 2185–2194.
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia (2007). **Disponível (on line)**
<http://www.inmet.gov.br/>
- Jamin, E. (2002). Isotopic analysis of wine and wine vinegar: new state of the Art. XXVII World Congress of Vine and Wine, Bratislava, Eslováquia. **Disponível (on line)**
<http://www.eurofins.com>
- Mandelli, F. (2007). Comportamento meteorológico e sua influência na vindima de 2007 na Serra Gaúcha. Comunicado Técnico. Bento Gonçalves, RS. (76)
- Mandelli, F. (2008). Comportamento meteorológico e sua influência na vindima de 2008 na Serra Gaúcha. Comunicado Técnico. Bento Gonçalves, RS. (85)
- Martin, G.J., Mazure, M., Jouitteau, C., Martin, Y.L., Aguilé, L. & Allain, P. (1999). Characterization of the geographic origin of Bordeaux wines by a combined use of isotopic and trace element measurements. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 409–417
- Miele A & Miolo A. (2003) O Sabor do Vinho. Caxias do Sul, RS; 133p.

- 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*, 6, 4842–4849.
- Núñez M, Peña R M, Herreo C, Garcia-Martin S, (2000). Analysis of some metals in wine by means of capillary electrophoresis. Application to the differentiation of *Ribeira Sacra* Spanish red wines *Analysis*, 28, 432-437.
- Ogrinc, N., Kosir, I.J., Kocjancic, M. & Kidric, J. (2001). Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1432–1440.
- OIV (1996). Mouillage - Determination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau des vins . **Resolution OENO 2/96**. Recueil des methodes internationales d'analyse des vins et des spiritueux. Paris, p.383-386
- OIV (2001). Determination of isotopic ratio of ethanol. **Resolution OENO 17/2001**
Disponível (on line) <http://www.oiv.int>
- Remaud, G., Guillou, C., Vallet, C. & Martin, G. J, (1992). A coupled NMR and MS isotopic method for the authentication of natural vinegars. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 342, 457–461.
- Rizzon, L.A. & Miele A (2002). Avaliação da Cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 2, 192–198.
- Rizzon, L.A., Miele, A. & Rosier, J. P. (1997). Discrimination of wines from the Mercosul countries according to their mineral composition. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31, 43–47.

- Rizzon, L.A., Salvador, M. B.G. & Miele, A. (2008). Teores de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 3, 635-641.
- 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.
- Rossmann, A., Schmidt, H. L., Reniero, F., Versini G., Moussa, I. & Merle M. H. (1996). Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203, 293–301.
- Schlesier, K., Fauhl-Hassek, C., Forina, M., Cotea, V., Kocsi, E., Schoula, R., Jaarsveld, F. van & Wittkowski, R. (2009). Characterisation and determination of the geographical origin of wines. *Journal European Food Research and Technology*, 230, 1-13.
- Simpkins, Louie, Wu, Harrison, & Goldberg, (2000) Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices, *Food Chemistry*, 70, 385–390.
- Smeyers-Verbeke, J., Jager, H., Lanteri, S., Brereton, P., Jamin, E., Fauhl-Hassek, C., Forina, M. & Romisch, U. (2009). Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part II: descriptive and inductive univariate statistics. *European Food Research and Technology*, 230, 15-29.

4. CONCLUSÕES

Os resultados de $\delta^{18}\text{O}$ da água, na safra de 2007 diferenciaram os vinhos das diferentes regiões de cultivo do Rio Grande do Sul (Serra Gaúcha, Campanha e Serra do Sudeste) entretanto, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ diferenciaram somente os vinhos da Serra Gaúcha em relação as demais regiões. Os teores de Mg também mostraram-se eficientes para diferenciar os vinhos das diferentes regiões, e os de Li permitiram a diferenciação dos vinhos provenientes das regiões da Campanha e Serra do Sudeste em relação a Serra Gaúcha. O Mn somente diferenciou os vinhos Merlot da Campanha em relação aos vinhos das demais regiões.

Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ na safra 2008 para a variedade Merlot, foram eficientes para diferenciar os vinhos da Região da Campanha em relação às demais regiões, porém na variedade Cabernet Sauvignon somente diferenciaram os vinhos da Campanha dos vinhos da Serra do Sudeste. Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ diferenciaram somente os vinhos da Serra Gaúcha em relação a Campanha, para a variedade Cabernet Sauvignon. O Li apresentou diferença significativa entre os vinhos das três regiões, com valores superiores na região da Campanha. O Mg, somente diferenciou os vinhos da Serra Gaúcha em relação às demais e o Mn permitiu a diferenciação dos vinhos da Serra do Sudeste em relação aos vinhos da Campanha e Serra Gaúcha.

Os resultados de Rb diferenciaram os vinhos provenientes das diferentes regiões de cultivo nas duas safras estudadas, com valores superiores para a região da Serra do Sudeste.

Os melhores parâmetros para classificar os vinhos na safra de 2007 foram o $\delta^{18}\text{O}$, o Mg e o Rb, enquanto que na safra de 2008 o Rb e o Li mostraram-se mais eficientes.

Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ do etanol, Rb e Li mostraram uma diferença significativa entre variedades, independente da região estudada, em ambas as safras, com valores mais negativos de $\delta^{13}\text{C}$ e médias superiores de Rb e Li para os vinhos da variedade Cabernet Sauvignon.

Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água e $\delta^{13}\text{C}$ do etanol, apresentaram diferenças significativas entre safras, independente da variedade, sendo os resultados de $\delta^{18}\text{O}$ mais negativos na safra de 2007 e os de $\delta^{13}\text{C}$ mais negativos na safra de 2008. A precipitação média quinzenal antes da data de coleta, apresentou uma forte correlação com os valores de $\delta^{18}\text{O}$.

A análise discriminante dos valores isotópicos e minerais permitiu uma classificação de aproximadamente 80 % dos vinhos das diferentes regiões estudadas.

5. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

Adami, L.; Dutra, S.V.; Rossi, A.R.; Carnieli, G.J.; Roani, C.A.; Vanderlinde, R. (2010).

Geographic origin of southern Brazilian wines by carbon and oxygen isotope analyses.

Rapid Communications in Mass Spectrometry. 24: 2943–2948.

Alvarez, I.; Aleixandre, J.L.; Garcia, M.J.; Casp, A.; Zúnica, L. (2003). Geographical

differentiation of White wines from three subzones of the designation of origin

Valencia. **European Food Research Technology**. 217: 173-179.

Angerosa, F.; Bréas, O.; Contento, S.; Guillou, F.C.; Reniero, F.; Sada, E. (1999).

Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 47: 1013-1017.

Baxter, M.J.; Crews, H.M.; Dennis, M.J.; Goodall, I.; Anderson, D. (1997). The

determination of the authenticity of wine from its trace element composition. **Food Chemistry**. 60: 443-450.

Brasil (2001). Instrução Normativa N° 04 de 05 de fevereiro de 2001. Dispõe sobre a

metodologia de análise da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em produtos e sub-produtos das plantas do ciclo fotossintético C_3 e C_4 . **Disponível (on line)**

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>

Brasil (2006). Instrução Normativa N° 2 de 02 de fevereiro de 2006. Metodologia de

análise da razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da Água dos Vinhos e Derivados. **Disponível (on**

line) <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>

- Brause, A.R.; Raterman, J.M.; Petrus, D.; Doner, L.W. (1984). Fruits and Fruits Products. Verification of Authenticity of Orange Juice. **Analytical Chemistry**. 67: 535-539.
- Bréas, O.; Reniero, F.; Serrini, G. (1994). Isotope ratio mass spectrometry: analysis of wines from different european countries. **Rapid Communication Mass Spectrometry**. 8: 967-970.
- Calderone, G.; Guillou C. (2008). Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages. **Food Chemistry**. 106: 1399–1405.
- Calderone, G.; Guillou, C.; Reniero, F.; Naulet, N. (2007). Helping to authenticate sparkling drinks $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of CO_2 by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. **Food Research International**. 40: 324-331.
- Capron, X.; Smeyers-Verbeke, J.; Massart, D.L. (2007). Multivariate determination of the geographical origin of wines from four different countries. **Food Chemistry**. 101: 1585-1597.
- Christoph, N.; Rossmann A.; Schlicht, C.; Voerkelius, S. (2007). Wine Authentication using Stable Isotope Ratio Analysis: Significance of Geographic Origin, Climate, and Viticultural Parameters. **ACS Symposium Series**. pp.166–179.
- Cisneros, B.O.A.; López, M.G.; Richling, E.; Heckel, F.; Schereier, P. (2002). Tequila authenticity assesment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of ethanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 7520-7523.
- Day, M.P.; Zhang, B.; Martin, G.J. (1994). The use of trace element data to complement stable isotope methods in the characterization of grape musts. **American Journal Enology and Viticulture**. 45: 79-85.

- Day, M.P.; Zhang, B.; Martin, G.J. (1995). Determination of geographical origin of wine using joint analysis of elemental and isotopic composition. II—Differentiation of the principal production zones in France for the 1990 vintage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 67: 113-123.
- Daudt, C.E.; Dal Piva, G.C.; Garcia, N.; Rizzon, L.A. (1987). Minerais em Videiras, Mosto e Vinhos II – Minerais em mosto, sua utilização durante a fermentação alcoólica e presença em vinhos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 7: 189-204.
- Daudt, C.E., Dal Piva, G.G., Rizzon, L.A. (1992). Minerais em mostos e vinhos oriundos de uvas tratadas com fungicida Dithane M-45. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 26: 81-88
- Ducatti, C. (2000). **Isótopos Estáveis de Carbono. Detecção da adulteração do álcool de cana de açúcar e do milho em vinho, vinagres e outros fermentados**. Instituto de Biociências. Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo, 28p.
- Epstein S.; Mayeda T. (1953). Variation of ^{18}O content of waters from natural sources **Geochimica et Cosmochimica Acta**. 4: 213-224.
- Embrapa (2008). **Disponível (on line)** <http://www.cnpuv.embrapa.br/> (26 de jun).
- Eschnauer, H. (1982). Trace elements in must and wine: primary and secondary contents **American Journal Enology and Viticulture**. 33: 226-230.
- Falcade, I.; Tonietto, J. (1995). **A viticultura para vinhos finos e espumantes na Região da Serra Gaúcha, Brasil: topônimos e distribuição geográfica**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 28p.

- Fernández-Cáceres, P.L.; Martín, M.J.; Pablos, F.; Gonzáles, G. (2001). Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 49: 4775-4779.
- Frias, S.; Pérez-Trujillo, J.P.; Pena, E.M.; Conde, J.E. (2001). Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content. **European Food Research and Tehnology**. 213: 145-149.
- Frías, S.; Conde, J.E.; Rodríguez-Bencomo, J.J.; García-Montelongo, F.; Pérez-Trujillo, J.P. (2003). Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemo metric techniques using metallic contents. **Talanta**. 59: 335-344.
- Giovannini, E. (2008). **Produção de Uvas para Vinho, Suco e Mesa**. Renascença, Porto Alegre, RS. 368p.
- Gremaud, G.; Quaile, S.; Piantini, U.; Pfammatter, E.; Corvi, C. (2004). Characterization of Swiss vineyards using isotopic data in combination with trace elements and classical parameters. **European Food Research Technology**. 219: 97-104.
- Ibravin. (2011). A vitivinicultura Brasileira - Panorama Geral, **Disponível (on line)** <http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras>
- Iglesias, M.; Besaluã, E.; Anticoã, E. (2007). Internal standardization-atomic spectrometry and geographical pattern recognition techniques for the multielement analysis and classification of Catalanian red wines. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 55: 219-225.
- Ingrahan, N.L.; Caldwell, E.A. (1999). Influence of weather on the stable isotopic ratios of wines: Tools for weather/climate reconstruction? **Journal Geophysical Research**. 27: 2185-2194.

- INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial (2011). **Disponível (on line)**
<http://www.inpi.gov.br>
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia (2007). **Disponível (on line)**
<http://www.inmet.gov.br/>
- Jamin, E. (2002). Isotopic analysis of wine and wine vinegar: new state of the Art. XXVII
World Congress of Vine and Wine, Bratislava, Eslováquia. **Disponível (on line)**
<http://www.eurofins.com>
- Kelly, S.; Baxter, M.; Chapman, S. (2002). The application of isotopic and elemental
analysis to determine the geographical origin of premium long grain rice. **European
Food Research and Technology**. 214: 72-78.
- Kelly, S.; Heaton, K.; Hoogewerff, J. (2005). Tracing the geographical origin of food: The
application of multi-element and multi-isotope analysis. **Trends in Food Science &
Technology**. 16: 555-567.
- Kosir, I.J.; Kocjancic; Ogrinc, N.; Kidric, J. (2001). Use of SNIF-NMR and IRMS IN
Combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and
geographical origin of wines (the example of Slovenian wines). **Analytica Chimica
Acta**. 429: 195-206.
- Kourakou-Dragonas, S. (1987) La Grèce vinicole. Athenes: Organisme Hellénique pour la
promotion des exportations, 60p.
- Koziet, J.; Rossmann, A.; Martin, G.J. (1993). Determination of the ^{13}C contents of sugars
of fruit and vegetables juices: inter-comparison study. **Analytica Chimica Acta**. 271:
31-38.

- Latorre, M.J.; Jares, C.G.; Medina, B.; Herrero, C. (1994). Pattern Recognition Analysis Applied to Classification of Wines from Galicia (Northwestern Spain) with Certified Brand of Origin. **J. Agric. Food Chem.** 7: 1451–1455.
- Licatti, F. (1997). Isótopos estáveis do carbono (^{12}C , ^{13}C) em plantas dos ciclos bioquímicos C_3 e C_4 . **Monografia**. Instituto de Biociência, Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo, SP.
- Machado, A.F. (2004). As indicações geográficas. **Disponível (on line)** http://www.swisscam.com.br/files_legais/
- Mandelli, F. (2007). Comportamento meteorológico e sua influência na vindima de 2007 na Serra Gaúcha. Comunicado Técnico. Bento Gonçalves, RS. (76)
- Mandelli, F. (2008). Comportamento meteorológico e sua influência na vindima de 2008 na Serra Gaúcha. **Comunicado Técnico**. Bento Gonçalves, RS. (85)
- Martin, M.L.; Martin, G.J. (1991). Deuterium NMR In: study of site-specific natural isotope fraction (SNIF-NMR). **Université de Nantes**. França.
- Martin, M.L.; Mazure, M.; Jouitteau, C.; Martin, Y.L.; Aguilé, L.; Allain, P. (1999). Characterization of the Geographic origin of Bordeaux wines by a combined use of isotopic and trace element measurements. **American Journal Enology and Viticulture**. 50: 409-417.
- Miele, A.; Miolo, A. (2003). **O Sabor do Vinho**. Editora São Miguel. Caxias do Sul, RS. 133p.
- 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: 4842-4849.

National Institute of Meteorology – INMET, Brazil: **Disponível (on line)**

<http://www.inmet.gov.br/>

Nuñez, M.; Peña, R.M; Herreo, C.; Garcia-Martin, S. (2000). Analysis of some metals in wine by means of capillary electrophoresis. Application to the differentiation of Ribeira Sacra Spanish red wines. **Analusis**. 28: 432-437.

Ogrinc, N.; Kosir, I. J.; Kocjancic, M.; Kidric, J. (2001). Determination of authentic, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 49: 1432-1440.

OIV (1996). Mouillage - Determination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau des vins . **Resolution OENO 2/96**. Recueil des methodes internationales d'analyse des vins et des mours. Paris, p.383-386

OIV (2001). Determination of isotopic ratio of ethanol. Resolution OENO 17/2001
Disponível (on line) <http://www.oiv.int>

Perez-Magariño, S.; Ortega-Heras, M.; Gonzáles-San José, M.L. (2002). Multivariate classification of rosé wines from different Spanish protected designations of origin. **Analytica Chimica Acta**. 458: 187-190.

Pupin, A.M.; Dennis, I.P.; Kelly, S.; Bigwood, T.; Toledo, M.C.F. (1998). Use of isotopic analysis to determine the authenticity of Brazilian orange juice (*Citrus sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46: 1369-1373.

Remaud, G.; Guillou, C.; Vallet, C.; Martin, G.J. (1992). A coupled NMR and MS isotopic method for the authentication of natural vinegars. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**. 342: 457–461.

- Rizzon, L.A.; Miele, A.; Rosier, J.P. (1997). Discrimination of wines from the Mercosul countries according to their mineral composition. **Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin**. 31: 43-47.
- Rizzon, L.A.; Miele, A. (2002). Avaliação da Cv. Cabernet Sauvignon para Elaboração de Vinho Tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 22: 192-198.
- Rizzon, L.A.; Miele, A. (2009). Características analíticas de vinhos Merlot da Serra Gaúcha. **Ciência Rural**. 6: 1913-1916.
- Rizzon, L.A.; Salvador, M.B.G.; Miele, A. (2008). Teores de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 28: 635-641.
- Rossmann, A (2001). Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**. 17: 347-381.
- Rossmann, A.; Schmidt, H.L.; Reniero, F.; Versini, G.; Moussa, I.; Merle, M.H. (1996). Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**203: 293-301.
- 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.
- Russel, J.B. (1982). **Química Geral**. McGraw-Hill, São Paulo, SP. 879p.
- Schlesier, K.; Fauhl-Hassek, C.; Forina, M.; Cotea, V.; Kocsi, E.; Schoula, R.; Jaarsveld, F. van; Wittkowski, R. (2009). Characterisation and determination of the geographical origin of wines. **Journal European Food Research and Technology**. 230: 1-13.

- Silva, T.G.; Regina, M.A.; Rosier, J.P.; Rizzon, L.A.; Chalfun, N.N.J. (1999) Diagnóstico vinícola do sul de Minas Gerais – I.Caracterização físico-química dos vinhos. **Ciência Agrotécnica**. 23: 632-637.
- Simpkins, W.A.; Louie, H.; Wu, M.; Harrison, M.; Goldberg, D. (2000). Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. **Food Chemistry**. 3: 385–390.
- Smeyers-Verbeke, J.; Jager, H.; Lanteri, S.; Brereton, P.; Jamin, E.; Fauhl-Hassek, C.; Forina, M.; Romisch, U. (2009). Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part II: descriptive and inductive univariate statistics. **European Food Research and Technology**. 230: 15-29.
- Sperková, J.; Suchánek M. (2005). Multivariate classification of wines from different Bohemian regions (Czech Republic). **Food Chemistry**. 93: 659-663.
- Streck, E.V.; Kämpf, N.; Dalmolin, R.S.; Klamt, E.; Nascimento, P.C.; Schneider, P.; Giasson, E.; Pinto, L.F.S. (2008). **Solos do Rio Grande do Sul**. Emater/RS-Ascar, 2.ed. Porto Alegre. 222p.