UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

ESTHER MACHADO SCHERRER

Estudo não-invasivo de vinhos tintos em garrafas
lacradas através de RMN ^1H no domínio do tempo e
análise multivariada

São Carlos

2016

ESTHER MACHADO SCHERRER

Estudo não-invasivo de vinhos tintos em garrafas
lacradas através de RMN ^1H no domínio do tempo e
análise multivariada

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Química

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

São Carlos

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Criador, sempre comigo nos bons e maus momentos, cuidando de mim e direcionando todas as minhas decisões.

Ao Dr. Luiz Alberto Colnago, pela orientação, atenção e pelo cuidado constantes.

À minha família e aos meus amigos, pelo carinho e suporte sem os quais eu não teria conseguido.

Aos queridos do grupo de pesquisa, sempre dispostos a ajudar e contribuir neste trabalho. Em especial à Gabi e à Tati, que tanto fizeram por mim e pelas minhas medidas em baixo campo.

À Embrapa Instrumentação, pela infraestrutura para a realização de toda essa pesquisa e por disponibilizar seus funcionários, alguns dos quais eu agora chamo de amigos. Cito especialmente a Sil, a Vivi, a Alice, a Joana, a Dr. Ana Rita e a sua aluna Raquel.

Ao Instituto de Química de São Carlos, que forneceu conhecimento acadêmico, atendimento eficiente sempre que precisei e realização de algumas das medidas aqui apresentadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que concedeu minha bolsa de estudos nesses dois anos de mestrado.

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isso fica sendo a minha última e mais elevada descoberta.”

Isaac Newton

RESUMO

A análise de qualidade de vinhos é altamente requisitada no setor da enologia. No entanto, o simples ato de abrir a garrafa desvaloriza o produto, sendo necessário o desenvolvimento de métodos alternativos não-invasivos. Atualmente, dois métodos não-invasivos têm sido propostos para análise da qualidade de vinhos em garrafas lacradas: análise do perfil diamagnético e espectroscopia de ressonância magnética (RMN) em alta resolução, usando um ímã de tomógrafo de RMN. No entanto, esses métodos têm baixa seletividade e/ou usam aparelhos que custam milhares de dólares, o que limita seu uso rotineiro.

Neste trabalho de mestrado avaliou-se o uso de métodos rápidos de medidas relaxométricas (T_1 e T_2) para estudar vinhos diretamente nas embalagens lacradas. Neste tipo de medida utilizou-se um equipamento de RMN ^1H no domínio do tempo, de baixo custo, baseado em um ímã permanente tipo Halbach de 0,23 T e 10 cm de bore livre utilizando as sequências de pulso CPMG e CP-CWFPx-x. Os dados obtidos foram comparados com medidas realizadas em um equipamento de RMN-DT padrão, mais homogêneo, porém que requer a abertura da garrafa. Todos os decaimentos obtidos foram tratados com ferramentas quimiométricas, correlacionando os dados multivariados com medidas dos metais paramagnéticos ferro, manganês e cobre de cada vinho. Os resultados mostraram que a variação de relaxação dos vinhos ocorreu devido à concentração de Mn^{2+} , que tem uma relaxatividade maior do que o Fe^{3+} e o Cu^{2+} . Portanto, os resultados mostram que os vinhos de diferentes origens geográficas têm diferentes perfis de relaxação conforme a concentração de metais absorvidos durante o crescimento das uvas, inerente às propriedades edafambientais de seu local de origem (terroir).

Palavras-chave: ressonância magnética nuclear, vinhos, análise em embalagem lacrada, quimiometria, análise multivariada, concentração de metais.

ABSTRACT

The quality control of wines is highly requested in the enology sector. However, opening the bottle devalues the product, therefore it's necessary to develop alternative and non-invasive ways of analysis. Nowadays two non-invasive methods have been proposed to analyze wine in sealed bottles: diamagnetic profile of the bottle and high resolution nuclear magnetic spectroscopy (NMR) using an NMR imaging magnet (MRI). These methods, though, have low selectivity and/or use expensive hardware, making it's usage limited.

In this study, rapid methods to measure the relaxometric constants (T_1 and T_2) were evaluated to study wines directly in sealed bottles. To do that it was used a ^1H TD-NMR equipment of low cost, based on a permanent Halbach magnet with 0,23T and a 10cm bore. CPMG and CP-CWFPx-x pulse sequences were used and the results were compared to the ones obtained by standard TD-NMR equipment, which is more homogeneous but requires the bottle to be opened. The NMR decays obtained with these two sequences were treated using chemometric tools and correlated to paramagnetic ions content in the samples (Fe^{3+} , Mn^{2+} and Cu^{2+}). The results show that variation of wine relaxation time is related to the the Mn^{2+} content, that has higher relaxivity than Fe^{3+} and Cu^{2+} . As consequence, wine from different geographic origins have different relaxation profiles due to the presence of metals absorbed by the grapes whilst their growth. The metal concentrations in grapes are inherent to soil and environmental properties of the wines origin site (terroir).

Key words: nuclear magnetic resonance, wines, sealed bottle analysis, chemometrics, multivariate analysis, metal concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do Efeito Zeeman para núcleos com $I = \frac{1}{2}$	19
Figura 2 - Representação do movimento de precessão	20
Figura 3 - Representação vetorial da magnetização de um sistema de spins no modelo de coordenadas girantes antes (A) e depois (B) do pulso de radiofrequência	21
Figura 4 - Sequência de pulso para a CPMG	24
Figura 5 - Exemplo de sinal obtido pela CPMG	24
Figura 6 - Sinal CWFP resultante da combinação entre as componentes FID e eco com dependência do ângulo de offset para as condições: (A) $\psi=2n\pi$ e (B) $\psi=(2n+1)\pi$	25
Figura 7 - Sequência de pulso para a CP-CWFPx-x.....	26
Figura 8 - Exemplo de sinal obtido pela CP-CWFPx-x	27
Figura 9 - Esquema para obtenção do espectro de RMN de alto campo de garrafas lacradas em ímã com bore horizontal. As figuras (a) e (b) da garrafa mostram a posição da garrafa para obtenção dos espectros de ^1H e ^{13}C , respectivamente.	32
Figura 10 - Espectro de ^1H obtido de garrafa lacrada. Em (a) a garrafa continha vinho Cabernet Sauvignon e em (b) a garrafa continha uma mistura de ácido acético, água e etanol em proporções similares à do vinho.	33
Figura 11 - Diagrama esquemático do dispositivo usado para monitorar a magnetização induzida de garrafas de vinho lacradas.	34
Figura 12 - Escores de PC1 e PC2 de 12 garrafas. Três vinícolas diferentes estão representadas como quadrados, círculos e losangos; safras diferentes de uma mesma vinícola estão diferenciadas como símbolos fechados e abertos.	35
Figura 13 - Representação da matriz de dados para PCA.....	36
Figura 14 - Representação da matriz de dados multivariados (X_{nm}) e de dados univariados (Y_{nm}) para PLS	36
Figura 15 – Amostras de vinho utilizadas	39
Figura 16 – Equipamento SpinLock, de ressonância magnética de baixo campo	41
Figura 17 - Equipamento Minispec, de ressonância magnética de baixo campo.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de amostras de vinho segundo país, região de plantio e casta	38
Tabela 2 - Valores das constantes relaxométricas T_1 e T_2 dos vinhos	54
Tabela 3- Média e desvio padrão das concentrações de metais nos vinhos segundo o método de obtenção utilizado.	54
Tabela 4 - Valores de R de correlação entre as constantes T_1 e T_2 e as concentrações de metais presentes nos vinhos	56
Tabela 5 – Dados da regressão PLS obtidos com os dados de RMN-DT gerados pelo Minispec e as concentrações de metais determinadas por AA e MIP.	66
Tabela 6 – Dados de regressão PLS obtidos com os dados de RMN-DT gerados no SpinLock e as concentrações de metais determinadas por AA e MIP.	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Decaimentos de CPMG dos vinhos argentinos (azul) e brasileiros (preto) obtidos pelo Minispec.	46
Gráfico 2 - Decaimentos de CPMG dos vinhos da África do Sul obtidos pelo Minispec.	47
Gráfico 3 - Decaimentos de CPMG dos vinhos dos Estados Unidos obtidos pelo Minispec.	47
Gráfico 4 - Decaimentos dos vinhos da África do Sul obtidos com a sequência CP-CWFPx-x, no Minispec.	48
Gráfico 5 - Decaimentos de CP-CWFPx-x dos vinhos dos Estados Unidos obtidos pelo Minispec.	49
Gráfico 6 - Variação do perfil de decaimento de CPMG obtida pelo SpinLock para uma amostra de vinho aquecido a 50°C e colocado no espectrômetro com temperatura interna de 23°C, em função do tempo de resfriamento.	50
Gráfico 7 - Decaimentos de CPMG de vinhos argentinos (azul) e brasileiros (preto) obtidos pelos SpinLock.	51
Gráfico 8 - Decaimentos de CPMG de vinhos dos Estados Unidos obtidos pelos SpinLock.	51
Gráfico 9 - Decaimentos de CPMG de vinhos da África do Sul obtidos pelos SpinLock.	52
Gráfico 10 - Decaimentos de CP-CWFPx-x de vinhos dos Estados Unidos obtidos pelos SpinLock.	53
Gráfico 11 - Decaimentos de CP-CWFPx-x de vinhos da África do Sul obtidos pelos SpinLock.	53
Gráfico 12 - Correlação entre as concentrações de ferro obtidas pela absorção atômica com ionização por chama e a absorção atômica de plasma com microondas.	55
Gráfico 13 - Correlação entre as concentrações de manganês obtidas pela absorção atômica com ionização em forno de grafite e a absorção atômica de plasma com microondas.	56
Gráfico 14 - Correlação entre a concentração de manganês obtida pelo MIP-AES e os valores de T_2 obtidos por RMN-DT.	57

Gráfico 15 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do Minispec com prévia normalização.	58
Gráfico 16 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do Minispec sem prévia normalização.	59
Gráfico 17 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do Minispec sem prévia normalização dos vinhos (a) dos Estados Unidos, (b) da França, (c) da Itália, (d) de Portugal e (e) da Espanha.	59
Gráfico 18 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do Minispec sem prévia normalização dos vinhos (a) da África do Sul, (b) da Argentina, (c) do Brasil, (d) do Chile e (e) do Uruguai.	60
Gráfico 19 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do Minispec.	61
Gráfico 20 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do Minispec dos vinhos (a) dos Estados Unidos, (b) da França, (c) da Itália, (d) de Portugal e (e) da Espanha.	61
Gráfico 21 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do Minispec dos vinhos (a) da África do Sul, (b) da Argentina, (c) do Brasil, (d) do Chile e (e) do Uruguai.	62
Gráfico 22 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do SpiLock.	63
Gráfico 23 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do SpinLock dos vinhos (a) dos Estados Unidos, (b) da França, (c) da Itália, (d) de Portugal e (e) da Espanha.	63
Gráfico 24 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do SpinLock dos vinhos (a) da África do Sul, (b) da Argentina, (c) do Brasil, (d) do Chile e (e) do Uruguai.	64
Gráfico 25 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do SpinLock.	64
Gráfico 26 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do SpinLock dos vinhos (a) dos Estados Unidos, (b) da França, (c) da Itália, (d) de Portugal e (e) da Espanha.	65
Gráfico 27 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do SpinLock dos vinhos (a) da África do Sul, (b) da Argentina, (c) do Brasil, (d) do Chile e (e) do Uruguai.	65
Gráfico 28 - Regressão de PLS para CP-CWFPx-x medida no Minispec e a concentração de manganês obtida pelo MIP-AES.	67
Gráfico 29 - Regressão PLS para CP-CWFPx-x medida no SpinLock e a concentração de manganês obtida pelo MIP-AES.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Absorção Atômica

CG – Cromatografia Gasosa

CP-CWFP – Carr-Purcell *Continuous Wave Free Precession*

CP-CWFPx-x – Carr-Purcell *Continuous Wave Free Precession* com alternância de fase

CPMG – Carr-Purcell-Maiboom-Gill

CWFP – *Continuous Wave Free Precession*

DOC – Denominação de Origem Controlada

FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica por chama

FID – *Free Induction Decay*

FT-NIR – Infravermelho próximo com transformada de Fourier

GFAAS – Espectrometria de Absorção Atômica por forno de grafite

IR – Inversão-Recuperação

MIP-OES – espectrômetro de emissão óptica de plasma induzido por micro-ondas

MIR – Infravermelho médio

MRI – *Magnetic Resonance Imaging*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN-DT – Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo

NIR – Infravermelho próximo

OPLS-DA – Análise Discriminante de Projeção Ortogonal de Estrutura Latente

PC – Componente Principal

PCA – Análise de Componente Principal

PLS – Quadrados Mínimos Parciais

qRMN – Ressonância Magnética Nuclear quantitativa

rf - Radiofrequência

RMN-FT – Ressonância Magnética Nuclear com transformada de Fourier

SSFP – *Steady State Free Precession*

UV-Vis – Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	Revisão bibliográfica	18
2.1	Bases da Ressonância Magnética Nuclear	18
2.2	RMN de Baixo Campo	22
2.3	RMN no domínio do tempo (RMN-DT)	22
2.4	As sequências de pulso utilizadas em RMN-DT	23
2.4.1	Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).....	23
2.4.2	Sequência CP-CWFPx-x.....	25
2.5	Certificação de Origem	27
2.6	Análise de Vinhos.....	29
2.6.1	Análises invasivas	29
2.6.2	Análises não-invasivas.....	31
2.7	Análises Quimiométricas	35
3	OBJETIVOS	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Amostragem.....	38
4.2	Equipamentos utilizados e análises realizadas.....	40
4.2.1	Análises de RMN-DT ¹ H de baixo campo	40
4.2.2	Análises de teor de metais	42
4.3	Processamento dos dados	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Medidas invasivas de vinho por RMN-DT (Minispec)	45
5.1.1	Análise com a sequência CPMG	45

5.1.2	Análise com a sequência CP-CWFPx-x	47
5.2	Medidas não invasivas de vinho por RMN-DT (SpinLock)	49
5.2.1	Influência da temperatura nas medidas de RMN em garrafas de vinho lacradas	49
5.2.2	Análise com a sequência CPMG	50
5.2.3	Análise com a sequência CP-CWFPx-x	52
5.3	Análise do teor de Mn, Fe e Cu nos vinhos.....	53
5.3.1	Correlação univariada entre as concentrações de metais paramagnéticos e os valores de T_1 e T_2 extraídos dos decaimentos	56
5.4	Análise quimiométrica	57
5.4.1	Análise de Componente Principal – PCA.....	57
5.4.2	Análise dos dados de RMN-DT pelo método de Mínimos Quadrados Parciais - PLS	66
6	Conclusões.....	70
7	REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE A – DECAIMENTOS DE CPMG DOS VINHOS CHILENOS, URUGUAIOS, PORTUGUESES, ESPANHÓIS, FRANCESES E ITALIANOS OBTIDOS PELO MINISPEC.....		76
APÊNDICE B – DECAIMENTOS DE CP-CWFPX-X DOS VINHOS ARGENTINOS, BRASILEIROS, CHILENOS, URUGUAIOS, PORTUGUESES, ESPANHÓIS, FRANCESES E ITALIANOS OBTIDOS PELO MINISPEC.		78
APÊNDICE C – DECAIMENTOS DE CPMG DOS VINHOS CHILENOS, URUGUAIOS, PORTUGUESES, ESPANHÓIS, FRANCESES E ITALIANOS OBTIDOS PELO SPINLOCK.....		80
APÊNDICE D – DECAIMENTOS DE CP-CWFPX-X DOS VINHOS ARGENTINOS, BRASILEIROS, CHILENOS, URUGUAIOS, PORTUGUESES, ESPANHÓIS, FRANCESES E ITALIANOS OBTIDOS PELO SPINLOCK.		82
APÊNDICE E – CONCENTRAÇÕES DE METAIS DAS AMOSTRAS DE VINHO DETERMINADAS POR AA E MIP.		84

1 INTRODUÇÃO

A análise da qualidade de vinhos é altamente requisitada no setor vitivinícola. Os métodos utilizados atualmente necessitam da retirada de uma amostra de vinho de dentro da garrafa, para a análise, que em geral é destruída. No caso do vinho tinto e outras bebidas nobres, onde uma única garrafa pode facilmente valer alguns milhares de dólares, o simples ato de abri-la para análise desvaloriza o produto (1-3). Portanto, a análise de vinho dentro de garrafas lacradas (método não-invasivo) é uma importante demanda para o setor vinícola, principalmente para vinhos colecionáveis que só devem ser abertos na hora do consumo. Por esse motivo o mercado de vinhos se interessa pelo desenvolvimento de técnicas não-invasivas, que possam analisar o produto diretamente nas garrafas.

Atualmente, dois métodos não-invasivos têm sido propostos para análise da qualidade de vinhos em garrafas lacradas. Esses métodos envolvem a análise do perfil diamagnético que depende da concentração de solutos como íons e outras moléculas (4) e a espectroscopia de ressonância magnética (RMN) em alta resolução, usando um ímã de tomógrafo de RMN, que permite quantificar o teor de etanol e ácido acético (3). No entanto, esses métodos têm baixa seletividade e/ou usam aparelhos que custam milhares de dólares, o que limita seu uso rotineiro.

Assim, nesta dissertação estudou-se o uso da RMN no domínio do tempo (RMN-DT), que é baseada em um ímã permanente, de baixo campo, baixa homogeneidade e consequentemente baixo custo, como um método rápido e não-invasivo analisar os vinhos diretamente nas embalagens lacradas. Na RMN-DT os sinais são analisados no domínio do tempo, sem necessidade de se fazer a transformada de Fourier.

A RMN-DT é menos difundida do que a RMN em alta resolução pois o baixo campo e a baixa homogeneidade dos ímãs usados impossibilita a observação deslocamentos químicos. No entanto, o equipamento tem baixo custo de compra e de manutenção, não necessita de refrigeração com líquidos criogênicos, as análises são rápidas e simples, entre outras vantagens. Sem a presença do deslocamento químico e outros parâmetros da RMN em alta resolução, as análises por RMN-DT se baseiam na intensidade do sinal, nas diferenças dos

tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2), e da diferença no coeficiente de autodifusão da amostra. Diversas sequências de pulso foram desenvolvidas para medir esses parâmetros. Entre elas destacam-se a sequência desenvolvida por Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), usada para medida do valor de T_2 , e as sequências tipo *Continuous Wave Free Precession* (CWFP), que analisam simultaneamente os valores de T_1 e T_2 . (5)

Os dados de RMN-DT podem ser analisados por métodos univariados, onde se pode fazer a correlação entre os valores de amplitude, tempo de relaxação e autodifusão com alguma propriedade físico-química que se deseje medir. No entanto, os melhores resultados têm sido obtidos quando os dados de RMN-DT são analisados com métodos de análise multivariada, também conhecido como métodos quimiométricos.

A quimiometria é uma ferramenta baseada em métodos estatísticos, matemáticos, computacionais e de lógica formal para se analisar dados multivariados, como é o caso do sinal de RMN-DT. Em química, ela é utilizada tanto para otimizar procedimentos experimentais, quanto para extrair o máximo possível de informações de um conjunto de dados. As análises mais comuns são a Análise de Componentes Principais (PCA) e o método dos Quadrados Mínimos Parciais (PLS).

A PCA é uma análise exploratória de dados. Ela trata os dados como uma matriz onde cada linha é uma amostra e as colunas são os pontos do sinal a ser analisado. A função da PCA é condensar as informações da matriz, gerando um novo conjunto de dados que seja o mais próximo possível do original, mas com reduzido número de fatores (componentes). O primeiro fator é mais significativo que o segundo e assim por diante. Uma análise de PCA bem sucedida é aquela onde existe uma explicação confiável dos dados usando o menor número possível de componentes.

Por sua vez, o PLS faz um modelo de regressão multivariada. Sua proposta é gerar um conjunto de dados semelhante ao da PCA e correlacioná-lo com propriedades químicas, físico-químicas ou até sensoriais que foram medidas de forma convencional. Com esses dados, o PLS constrói um modelo de regressão. Caso o modelo seja confiável, compara-se a ele os dados multivariados de amostras desconhecidas de maneira a obter indiretamente a propriedade de interesse.

Portanto, nessa dissertação os dados de RMN-DT de vinhos dentro de garrafas lacradas, ou seja, coletados de forma não-invasiva, foram analisados por métodos quimiométricos para diferenciar vinhos de acordo com a origem e o teor de íons paramagnéticos de Mn, Fe e Cu. O teor desses íons nos vinhos depende de fatores edafambientais, como tipo de solo, adubação, quantidade e frequência de chuvas, ou o chamado “terroir”. Como esses íons também interferem fortemente nos tempos de relaxação, a hipótese desse trabalho foi que a análise relaxométrica por RMN-DT pudesse ser usada para análise e classificação de acordo com o teor desses íons e conseqüentemente com sua origem.

Assim, na Revisão Bibliográfica será apresentada uma breve teoria de RMN, dos métodos de certificado de origem, dos métodos de análise de vinho e dos métodos de análise quimiométrica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bases da Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica com aplicações em diversas áreas da ciência (1, 2, 6). Seu histórico começa quando o magnetismo nuclear foi percebido pela primeira vez em 1924, quando Wolfgang Pauli constatou que alguns núcleos atômicos apresentavam propriedades magnéticas e desdobravam seus níveis de energia quando expostos a campos magnéticos (7, 8). Quinze anos mais tarde, Isidor Rabi submeteu um feixe de hidrogênio gasoso a um campo magnético e a uma onda eletromagnética na região de radiofrequência (rf), observando que em determinada frequência de onda o feixe absorvia energia; essa foi a primeira observação de ressonância magnética nuclear (9). Em meados da década de 40 dois grupos de físicos, liderados por Edward Purcell (10) e Felix Bloch (11), ambos norte-americanos, desenvolveram separadamente a RMN para análise de matéria condensada com parafina e água respectivamente. Por esse feito eles foram contemplados com o prêmio Nobel de Física em 1952.

A RMN se baseia nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos decorrentes do spin nuclear. O momento angular de spin (α) pode ser expresso em termos do número quântico nuclear spin (I). O valor de I pode ser nulo, inteiro ou fracionado, dependendo do número de prótons e de nêutrons presentes no núcleo em questão. Quando um núcleo possui $I = 0$ ele é inativo na técnica de RMN.

O momento angular de spin gera o momento magnético nuclear μ , sendo essas duas grandezas diretamente proporcionais e relacionadas pela constante magnetogírica (γ). A constante magnetogírica é uma característica intrínseca a cada núcleo, podendo ser usada como parâmetro para definir a frequência de ressonância e a sensibilidade do núcleo para RMN. Quanto maior o valor de γ , maior será μ e sua interação com o campo magnético aplicado, aumentando a sensibilidade da técnica.

Ao se submeter uma amostra com $I \neq 0$ a um campo magnético (B_0), a interação do campo com μ separa os spins em $2I + 1$ níveis de energia – a isto dá-se o nome Efeito

Zeeman –, fazendo com que os núcleos atômicos se posicionem contra ou a favor do campo. Um esquema do Efeito Zeeman com $I = \frac{1}{2}$ pode ser observado na Figura 1. Após a aplicação do campo magnético os spins se orientam em estados de maior (β) e menor (α) energia, respectivamente contra e a favor do campo.

Figura 1 - Representação do Efeito Zeeman para núcleos com $I = \frac{1}{2}$

Fonte: Autoria própria.

O valor de energia associado aos diferentes níveis é dado pela expressão

$$E = -\mu \cdot B_0 = \gamma \cdot m_I \cdot \hbar \cdot B_0$$

em que m_I é chamado de número quântico direcional e pode assumir os valores $\{-I, -I + 1, \dots, I - 1, +I\}$, levando aos diversos estados magnéticos observados. Portanto, para $I = \frac{1}{2}$ as energias para os dois níveis são:

$$E_\alpha = -\frac{1}{2} \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$

$$E_\beta = +\frac{1}{2} \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$

Onde $\hbar$ é a constante de Planck dividida por 2π .

A diferença de energia entre os dois níveis é dada por:

$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$

A população dos níveis de energia segue a distribuição de Boltzmann, e o nível de menor energia terá um ligeiro excesso de magnetização seguindo a equação:

$$N_{\alpha}/N_{\beta} = \exp(-E/kT)$$

Onde N_{α} é o número de núcleos no nível menos energético, N_{β} é o número de núcleos no nível mais energético, k é a constante de Boltzmann ($1,3805 \times 10^{-23}$ J/K) e T é a temperatura em Kelvin.

Por ter menor energia, o nível α terá um ligeiro excesso de população com relação ao nível β . Para um campo de 1 Tesla, a razão do excesso magnético está em torno de 10^{-3} . A diferença de população entre os níveis origina a magnetização resultante (M_0), que é definida como o somatório do excesso dos momentos magnéticos e é um vetor posicionado a favor do campo B_0 .

Classicamente a RMN pode ser tratada pela interação entre μ e B_0 . Na presença de B_0 , μ sofre um torque que resulta num movimento de precessão em torno do eixo do campo B_0 , semelhante ao comportamento de um pião no campo gravitacional (Figura 2).

Figura 2 - Representação do movimento de precessão

Fonte: Autoria própria.

A frequência de precessão de um núcleo também é chamada de frequência de Larmor ou de frequência de ressonância (ν) e sua expressão (mostrada abaixo) é considerada a equação fundamental da ressonância magnética, pois define a frequência de ressonância do núcleo estudado em relação ao campo B_0 e γ

$$\nu_0 = \gamma \cdot B_0 / 2\pi$$

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0$$

(ω_0 = velocidade angular de precessão em rad.s^{-1})

A condição de ressonância é atingida ao se aplicar um campo magnético oscilante e linearmente polarizado B_1 , perpendicular a B_0 e com frequência igual a ν_0 . Atualmente o campo B_1 é aplicado na forma de um pulso de rf. Para facilitar a visualização do efeito do pulso B_1 é utilizado um sistema de coordenadas girantes (z, x', y') com o plano x', y' girando em torno do eixo z com velocidade idêntica à radiofrequência do pulso. A Figura 3 mostra como B_1 exerce torque sobre o vetor da magnetização resultante, deslocando-o num ângulo θ em relação ao eixo z .

Figura 3 - Representação vetorial da magnetização de um sistema de spins no modelo de coordenadas girantes antes (A) e depois (B) do pulso de radiofrequência

Fonte: CORRÊA, C. C., 2007, p. 11. (12)

O ângulo θ pode ser calculado como o produto entre a duração τ do pulso, a intensidade do campo e a constante magnetogírica:

$$\theta = \gamma \cdot B_1 \tau$$

Após o pulso, a magnetização volta a precessionar na direção de B_0 e induz uma corrente elétrica em uma bobina receptora, gerando o sinal de RMN. Esse sinal (*Free Induction Decay* – FID) está no domínio do tempo e é comumente passado para o domínio da frequência, que é analisado na RMN em alta resolução. Essa transformação é feita utilizando a Transformada de Fourier e gera um espectro de RMN com os deslocamentos químicos e outros parâmetros espectrais próprios de cada núcleo atômico.

2.2 RMN de Baixo Campo

Após o pulso, a magnetização retorna a seu estado inicial por dois processos de relaxação independentes que ocorrem simultaneamente: o desaparecimento da magnetização do plano x', y' (relaxação transversal) e o aparecimento da magnetização no eixo z (relaxação longitudinal). O primeiro é caracterizado pela perda da coerência de fase dos vetores de momento magnético durante a precessão (relaxação spin-spin) e é caracterizado pela constante de tempo T_2 . O segundo ocorre quando o vetor magnetização volta ao eixo z . Esse processo de volta ao estado fundamental ocorre pela transferência de energia magnética do estado excitado para a vizinhança ou para a rede (relaxação spin-rede) e é caracterizado pela constante de tempo T_1 . Os tempos de relaxação dependem da viscosidade da amostra, da dinâmica molecular, da presença de substâncias paramagnéticas e de outros fatores físico-químicos.

Como a técnica de RMN possui baixa receptividade, normalmente é necessário fazer a promediação de vários espectros para que haja uma boa relação sinal/ruído. No entanto, para medidas quantitativas é necessário um tempo de intervalo (T_p) de aproximadamente $5 T_1$ para a repetição da medida. Com $5 T_1$ tem-se 99,93% de M_0 retornado à condição de equilíbrio térmico. Por isso, caso o valor de T_1 seja muito grande, uma análise pode levar muito tempo para ser concluída. O valor de T_1 varia de acordo com B_0 , mas está em até 3s para ^1H para amostras aquosas em campos baixos.

2.3 RMN no domínio do tempo (RMN-DT)

A espectroscopia de RMN é dividida entre a espectroscopia de alta resolução (comumente resolvida no domínio da frequência) e de baixa resolução (comumente resolvida no domínio do tempo, RMN-DT). A RMN-DT é menos difundida do que a RMN de alta resolução, uma vez que a largura de linha e dispersão dos sinais impossibilita a observação de deslocamento químico. Isso se deve à baixa homogeneidade e o baixo campo magnético utilizado nos espectrômetros de RMN-DT. Nesses espectrômetros os ímãs têm campos magnéticos inferiores a 2T, o que equivale a uma frequência de ressonância de 85MHz para o ^1H . No entanto, a RMN-DT tem como vantagens o baixo custo do

equipamento e sua manutenção, as análises são rápidas e simples e não precisam de operador altamente especializado.

Existem muitas maneiras para se realizar análises em RMN-DT. As primeiras análises eram baseadas na intensidade do sinal de RMN (FID), que são usadas na determinação do teor de hidrogênio em combustíveis, teor de flúor em dentífricos, teor de óleo em sementes entre outras aplicações. Nas últimas décadas houve uma diversificação das análise por RMN-DT com os métodos de medida dos tempo de relaxação T_1 e T_2 e medidas do coeficiente de auto difusão. As principais aplicações têm sido em produtos alimentícios, petróleo e derivados e polímeros. (13)

Diversas sequências de pulso têm sido usadas para as medidas de T_1 e T_2 em aparelhos de RMN-DT. As duas mais comuns são a Inversão Recuperação (IR), usada para determinação de T_1 , e a sequência proposta por Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), para obtenção de T_2 . Contudo, a IR demanda muito tempo de análise e novas sequências rápidas para o estudo de T_1 têm sido propostas. Dentre essas novas sequências, as baseadas no regime de estado estacionário de precessão livre (SSFP, do inglês Steady State Free Precession) têm sido as mais usadas. Essas sequências são denominadas de sequências de precessão livre em onda contínua (CWFP, do inglês Continuous Wave Free Precession). A mais eficiente é a CP-CWFPx-x, uma sequência que é usada para determinar T_1 e T_2 em um único experimento, em alguns segundos, similar ao tempo de medida com CPMG.

2.4 As sequências de pulso utilizadas em RMN-DT

2.4.1 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)

A sequência CPMG, já amplamente difundida em RMN-DT, foi inicialmente proposta por Carr-Purcell e aperfeiçoada por Meiboom-Gill e se tornou a principal análise para obtenção de T_2 (8). É uma técnica rápida e precisa, mesmo em ímãs de baixa homogeneidade. A sequência CPMG, representada na Figura 4, é composta por um pulso inicial de 90° (ou $\pi/2$) em x, seguida de um tempo T_p e um trem de pulsos de 180° (ou π) em y, espaçados entre si por um tempo $2T_p$. Nesse intervalo entre os pulsos a magnetização se

focaliza, chega à sua intensidade máxima entre os dois pulsos de 180° , formando o chamado eco e em seguida volta a se desfocalizar. A cada novo pulso de 180° em y esse processo se repete, formando um eco por vez. Na Figura 5 está um gráfico entre a intensidade máxima de cada eco em função do tempo. O T_2 é obtido pelo ajuste exponencial desse decaimento.

Figura 4 - Sequência de pulso para a CPMG

Fonte: Autoria própria.

Figura 5 - Exemplo de sinal obtido pela CPMG

Fonte: Autoria própria.

A CPMG é usada para análise de propriedades físicas e químicas de amostras homogêneas ou heterogêneas, portanto suas medidas têm grandes aplicações na agropecuária, meio ambiente, indústrias químicas, farmacêuticas, de alimentos, polímeros, petróleo, entre outras (13, 14). Na agricultura, por exemplo, ela vem sendo usada para medir a qualidade de óleos vegetais em sementes (5).

2.4.2 Sequência CP-CWFP_{x-x}

Em 2005, Venâncio et al. (15) propuseram um método rápido para medidas simultâneas de T_1 e T_2 para RMN-DT. A técnica deriva da sequência SSFP e foi denominada CWFP (Continuous Wave Free Precession). Na condição CWFP o sinal do FID e do eco de spin gerados pela sequência de pulso e separados por um tempo T_p menor que T_2 efetivo (T_2^*) é mínimo quando a análise ocorre em ressonância ou com ângulos de precessão (ψ) com número par de π ($\psi=2n\pi$), como mostra a Figura 6. Para contornar esse problema é necessário deslocar a frequência de ressonância (offset) em alguns kHz e ajuste do valor do tempo entre os pulsos (T_p).

O sinal gerado pela CWFP não apresenta bons resultados quando os valores de T_1 e T_2 da amostra são muito próximos. Por isso, foi proposta uma nova sequência por Andrade et al. em 2011, denominada CP-CWFP (Carr-Purcell-Continuous Wave Free Precession). Essa sequência é mais vantajosa para amostras onde os valores de T_1 e T_2 são próximos.

Figura 6 - Sinal CWFP resultante da combinação entre as componentes FID e eco com dependência do ângulo de offset para as condições: (A) $\psi=2n\pi$ e (B) $\psi=(2n+1)\pi$.

Fonte: MONARETTO, T., 2015, p.26 (16)

Para otimizar a medida T_1 e T_2 com as sequências tipo CWFp, Monaretto (16) propôs em 2015 várias novas sequências, onde a fase dos pulsos alternam em 180° . Essas sequências permitem que a análise seja realizada em ressonância, sem necessidade de acertar o offset de frequência para cada valor de T_p . A melhor sequência desenvolvida foi a sequência CP-CWFp $\times$ - $\times$, onde os pulsos alternam entre $\times$ e em $-\times$. Sua maior vantagem é que pode ser usada para medidas de relaxação independente da razão T_1/T_2 .

A Figura 7 mostra um esquema da sequência a CP-CWFp $\times$ - $\times$. A CP-CWFp $\times$ - $\times$ começa com um pulso inicial de 90° em $\times$, seguido por um tempo $T_p/2$ e um trem de pulsos de 90° aplicados em $\times$ e $-\times$ alternadamente e separados por um tempo T_p . Como o tempo T_p é curto, da ordem de centenas de microssegundos, o sinal de RMN atinge um estado estacionário de precessão livre. Nesta condição a magnitude do sinal tem amplitude constante $|M_{ss}|$.

Figura 7 - Sequência de pulso para a CP-CWFp $\times$ - $\times$

Fonte: Autoria própria.

A Figura 8 mostra um sinal típico da sequência CP-CWFp $\times$ - $\times$. Esse sinal é bem diferente do obtido com a sequência CPMG. Ele começa com um sinal de alta intensidade, proporcional a M_0 , após o pulso de $90^\circ \times$. Em seguida os outros pulsos fazem com que o sinal atinja um mínimo negativo. A partir desse mínimo, o sinal aumenta com uma constante T^* , que depende tanto de T_1 quanto de T_2 , onde

$$T^* = 2T_1T_2 / (T_1 + T_2)$$

A intensidade entre o sinal no estado estacionário $|M_{ss}|$ também depende da razão T_1 e T_2 , onde

$$|M_{ss}| = M_0 T_2 / (T_1 + T_2)$$

Essas duas equações podem ser rearranjadas para as medidas de T_1 e T_2 onde:

Equação 1 $T_1 = \frac{T^*/2}{|M_{ss}| / M_0}$

Equação 2 $T_2 = \frac{T^*/2}{1 - |M_{ss}| / M_0}$

Figura 8 - Exemplo de sinal obtido pela CP-CWFPx-x

Fonte: Autoria própria.

Embora tenham sido desenvolvidas há pouco tempo, as sequências CWFP já mostraram bons resultados em diversos tipos de amostra, como análise de óleo em sementes intactas, teor de açúcar em geleias comerciais e em bananas verdes e maduras, teor de gordura intramuscular em carne bovina, entre outras aplicações. (17, 18)

2.5 Certificação de Origem

No século XVIII o vinho do porto era um dos principais produtos de exportação de Portugal. O surgimento de falsificações foi crescente e causou diminuição na venda do

produto real, pois os consumidores (sem saberem da existência do vinho falso, ou sem saber distinguir falso de original) passaram a pensar que a qualidade do produto havia caído.

Para resolver esse problema, em 1757 o Ministro do Estado de Portugal criou um sistema de controle de vinho com respeito à localidade de produção e diversos outros parâmetros. A primeira região demarcada foi a de Douro, onde era produzido o vinho do porto. Posteriormente, esse sistema deu origem à classificação D.O.C. (Denominação de Origem Controlada) e nos dias atuais é usada para atribuir normas de produção em regiões geograficamente delimitadas por cada país. As análises feitas para conferir o selo DOC incluem desde as práticas de cultura, castas de uva utilizadas e tipo de solo, até o teor alcoólico natural e as características físico-químicas e organolépticas. (19)

A concentração de metais, em especial, pode dizer muito sobre um determinado vinho. Por não se tratar de uma bebida destilada, todo o metal que a uva agrega em si durante seu crescimento pode ser levado até o produto final. As concentrações de metais são influenciadas principalmente pelo solo onde as videiras foram plantadas e pelo clima ao qual a safra foi submetida. Na Eslovênia, já foi realizada a separação de vinhos brancos e tintos por região de plantio utilizando a quantificação de elementos com ICP e o auxílio de Análise dos Componentes Principais (PCA) e redes neurais artificiais (CPANN), e apresentou bons resultados (20). Na Itália, foram feitas análises da variação das concentrações de íons metálicos em vinhos de diferentes safras, correlacionando-as com as mudanças climáticas ocorridas em uma região e a maneira como isso afeta as características das uvas. (21)

No Brasil, Bentlin e colaboradores fizeram um estudo com 53 vinhos provenientes de Argentina, Brasil, Chile e Uruguai analisando as concentrações de 45 elementos diferentes presentes no vinho. Os dados foram tratados com PCA e mostraram que os vinhos se agrupavam de acordo com seu país de origem, independentemente da casta de uva usada para sua fabricação. Os elementos Tl, U, Li, Rb e Mg foram os maiores responsáveis por essa separação. (22)

2.6 Análise de Vinhos

2.6.1 Análises invasivas

O uso de técnicas espectroscópicas para análise de qualidade de vinho não é algo incomum. A espectrometria de infravermelho próximo (NIR) é amplamente utilizada nessa área na análise da qualidade de amostras de vinho. Em 2005, com Gishen e Dambergers fizeram um artigo de revisão sobre o uso de variadas técnicas espectroscópicas na indústria vinícola australiana, desde estudos de qualidade de uvas e de vinhos com espectrometria de ultravioleta-visível (UV-vis), NIR e MIR (infra vermelho médio), também com combinação de quimiometria para analisar a composição química das amostras. (23) Em 2008, Cozzolino e colaboradores utilizaram a NIR acoplada com cromatografia gasosa (CG), espectrometria de massas e análise quimiométrica (Parcial Least-Squares – PLS) como técnica rápida e de baixo custo para medir compostos voláteis em vinhos Riesling. Os resultados obtidos para coeficiente de determinação na validação cruzada (R_{val}) foram todos superiores a 0,70, o que indica que a técnica pode ser usada para determinação de compostos voláteis no vinho. (24) Em 2011 os mesmos autores publicaram outro artigo de revisão, com Cynkar, Shah e Smith, sobre análise de vinho, suco de uva e mosto com sensores de NIR, MIR, UV-Vis e quimiometria. (25)

A técnica de RMN em alta resolução também é uma ferramenta bastante usada na análise de vinhos. Du, Bai, Zhang e Liu utilizaram a técnica junto com análise de componentes principais (PCA) para classificar e separar vinhos de acordo com a localização geográfica em que foram produzidos e os tipos de mistura (seco, médio seco, branco ou tinto). A distinção entre os vinhos ocorreu principalmente devido à variação na fermentação, nas diferentes condições edafambientais do cultivo das uvas. Eles também identificaram quais eram os principais componentes do vinho associados à separação. (26)

Hong-Seok Son e colaboradores também analisaram e classificaram vinhos de variados tipos de uva com RMN ^1H e análise estatística multivariada, incluindo o PCA e a análise discriminante de projeção ortogonal de estrutura latente (OPLS-DA). Os metabólitos responsáveis pela diferenciação foram identificados e o novo PCA feito com dados

quantitativos também mostrou clara separação, indicando confiabilidade de dados de RMN ^1H para diferenciação de vinhos. (27)

Ferrari e colaboradores fizeram um estudo de adulteração de vinho com antocianinas (para correção da cor) utilizando a espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) e RMN ^1H , tratando os dados com análise multivariada. A eficiência do método para verificação de adulteração foi de 70% para o espectro de NIR e 95% para o de RMN. (28)

López-Rituerto fez uso de RMN ^1H quantitativa (qRMN) e RMN ^1H para monitorar os teores de metabólitos no vinho durante o processo de fermentação. O método permitiu a quantificação simultânea de diversos metabólitos presentes no mosto de uvas tempranillo durante o processo de fermentação, comparando com resultados obtidos por infravermelho e tratando os dados quantitativos com auxílio de quimiometria. (29)

Fabre e colaboradores, em 2014, isolaram e caracterizaram o ácido 3-indolil-(2R)-O- β -D-glicosil-lático em vinhos bordeaux tintos, cuja estrutura foi desvendada com espectrometria de massas e RMN. (30)

Além das pesquisas de Du e colaboradores e Son e colaboradores (26, 27) citadas anteriormente, foram feitos outros estudos semelhantes por RMN ^1H com auxílio de análise multivariada na República da Coreia (Coreia do Sul) (31), fazendo estudos para separação de vinhos por região de plantio das uvas, e na Grécia (32), para autentificação de vinhos.

Pereira e colaboradores utilizaram PCA para investigar a variabilidade da composição de uvas de diferentes locais da França, usando perfis metabólicos de RMN e caracterizando 5 grupos entre as 134 amostras. PC1 e PC2 juntas comportavam 70,1% dos dados. (33) Brescia e colaboradores fizeram caracterização de vinhos tintos italianos também por RMN de ^1H e PCA. Suas 41 amostras se separaram em 3 grupos, as duas primeiras PC's explicando 40% da variância dos dados. Os autores perceberam a influência da concentração de metais na separação dos grupos. (34) Arvanitoyannis e colaboradores fizeram autentificação de vinhos usando diversas técnicas, como cromatografia líquida de alta eficiência, absorção atômica, espectrometria de massas e RMN. Suas duas primeiras componentes principais explicaram 85% da variância do conjunto amostral. (32)

2.6.2 Análises não-invasivas

Nas análises não-invasivas de vinho destaca-se o grupo do Prof. M. P. Augustine, da Universidade da Califórnia. Em 2002, eles utilizaram um tomógrafo de RMN com ímã supercondutor de 2,01T (85MHz) e 31cm de bore para medir com RMN de ^1H e ^{13}C o teor de ácido acético em garrafas fechadas de vinhos Cabernet Sauvignon (35). Para esses estudos foi necessário ajustar a homogeneidade do campo magnético (shimming) para que a largura do sinal da garrafa fosse de 4Hz.

O esquema com a montagem da sonda para análise das garrafas de vinho está na Figura 9. Nesta Figura (b) pode-se ver que a bobina da sonda foi montada em volta da garrafa com os capacitores de sintonia e de casamento de impedância ao lado. A Figura (a) mostra a sonda que usaram para fazer imagens das rolhas nas garrafas.

Na Figura 10 estão os espectro de RMN de ^1H de uma garrafa lacrada de vinho Cabernet Sauvignon (a) e de uma garrafa com uma mistura de ácido acético, água e etanol em proporções similares à do vinho. Como pode se ver nesta figura, o sinal do grupo metila do ácido acético pode ser encontrado em 2 ppm. Esse método foi patenteado nos Estados Unidos (36).

Figura 9 - Esquema para obtenção do espectro de RMN de alto campo de garrafas lacradas em ímã com bore horizontal. As figuras (a) e (b) da garrafa mostram a posição da garrafa para obtenção dos espectros de ^1H e ^{13}C , respectivamente.

Fonte: AUGUSTINE, M. P., 2002, p. 93.(35)

Em 2005 esse trabalho foi ampliado, visando sua utilização para análise de garrafas com mais de um século de maturação (37). A vantagem desse novo método é a supressão do sinal da água, que facilita a quantificação de ácido acético.

Figura 10 - Espectro de ^1H obtido de garrafa lacrada. Em (a) a garrafa continha vinho Cabernet Sauvignon e em (b) a garrafa continha uma mistura de ácido acético, água e etanol em proporções similares à do vinho.

Fonte: AUGUSTINE, M. P., 2006, p. 95. (37)

Mais recentemente, outra pesquisa do mesmo grupo analisou garrafas inteiras de vinho com medidas de susceptibilidade magnética, que depende principalmente da sua composição iônica.

Na figura 11 está um diagrama em blocos do espectrômetro usado para fazer as medidas de qualidade de vinhos em garrafas lacradas. Esse aparelho é baseado em um gerador de funções comercial que gera um campo magnético oscilante na bobina primária que é induzido na bobina secundária onde se coloca a garrafa de vinho e na outra bobina secundária que serve de referência (sem a garrafa de vinho). A susceptibilidade magnética do vinho atenua a amplitude e retarda a fase do campo magnético aplicado na bobina na qual está inserido. Esse efeito é monitorado pela bobina secundária de referência através de um amplificador tipo “*lock in*”. Esse equipamento para a análise também foi patenteado nos Estados Unidos. (38)

Figura 11 - Diagrama esquemático do dispositivo usado para monitorar a magnetização induzida de garrafas de vinho lacradas.

Fonte: AUGUSTINE, M. P., 2012, p. 2439. (39)

Os autores usaram esse aparelho inicialmente comparando 12 vinhos de diferentes anos e vinícolas. Além de comparar as amostras entre si, elas também foram comparadas com relação a soluções dos principais solutos contidos em vinho em água deionizada (etanol, ácido acético, glicerol e sulfato de potássio). Os dados foram tratados por PCA (Figura 12) e o trabalho sugere a construção de uma biblioteca de vinhos de origem confirmada, de forma a se poder comparar amostras suspeitas de falsificação. (35)

Alguns meses depois, o foi estendido para um conjunto de 60 garrafas de vinho, sendo 36 delas igualmente rotuladas e compradas de quatro fornecedores diferentes. Os dados de susceptibilidade magnética foram tratados com estatística bivariada (os dois primeiros fatores de um PCA) e foram analisados os efeitos do transporte e estocagem nos vinhos estudados. (39)

A quimiometria é uma ferramenta de análise estatística de dados multivariados como, os sinal de RMN obtidos com as sequências de pulsos CPMG e CP-CWFPx-x. As análises quimiométricas mais comuns são a Análise de Componentes Principais (PCA) e o método dos Quadrados Mínimos Parciais (PLS).

A PCA é um método não supervisionado para redução da dimensionalidade dos dados. É usado para classificar amostras e consiste na construção de um modelo bi ou tridimensional, onde as duas ou três componentes do modelo (PC's) explicam a maior parte da variação dos dados, fornecendo grande quantidade de informações para facilitar sua interpretação. (40)

Na análise quimiométrica todos os dados coletados (espectros) são colocados em um único arquivo: uma matriz original X de dimensões $(n \times m)$, onde n é o número de amostras e m é o número de variáveis. Uma matriz de resultados é representada na Figura 13, onde são mostrados os valores $a_1, a_2, \dots, a_n$ (número de amostras) e os valores $d_1, d_2, \dots, d_n$ (pontos do espectro).

Figura 13 - Representação da matriz de dados para PCA

Fonte: CORRÊA, C. C., 2007, p. 48. (12)

Assim como na PCA, há várias aplicações possíveis para o PLS. Por ser um modelo de regressão, sua capacidade de correlacionar medidas não invasivas com outras informações normalmente obtidas comprometendo a integridade de amostras abre um novo horizonte para as análises químicas. No PLS são geradas duas matrizes: a primeira delas é a matriz X como descrita acima, a segunda matriz comporta dados dependentes tais como propriedades físico-químicas ou concentrações de determinado analito. As matrizes X e Y estão mostradas na Figura 14.

Figura 14 - Representação da matriz de dados multivariados (X_{nm}) e de dados univariados (Y_{nm}) para PLS

Fonte: CORRÊA, C. C., 2007, p. 49. (12)

3 OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho de mestrado foi avaliar o uso da relaxometria por RMN-DT e análise quimiométrica para classificação de vinhos tintos diretamente nas embalagens lacradas. Para isso foi utilizado um espectrômetro de RMN-DT de baixo campo (0,23T, 9MHz para o ^1H) baseado em um ímã Halbach de 10cm de bore. As medidas relaxométricas foram realizadas com as sequências de pulsos CPMG e CP-CWFPx-x e os dados foram analisados pelos métodos quimiométricos PCA e PLS.

Objetivos secundários:

- 1) Analisar as amostras dos vinhos em garrafas lacradas e também em um espectrômetro de referência, usando as mesmas sequências de pulsos em ambos para fins de comparação.
- 2) Analisar o teor dos íons paramagnéticos de Mn, Fe e Cu das amostras de vinhos.
- 3) Avaliar com PCA se os dados de CPMG e CP-CWFPx-x têm discriminação de acordo com a origem do vinho.
- 4) Avaliar com PLS, se os dados de CPMG e CP-CWFPx-x têm correlação com os teores dos íons paramagnéticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram adquiridas 53 garrafas de vinho tinto no comércio local de São Carlos, SP. Os vinhos foram escolhidos de acordo com o país, regiões produtoras e casta de uva (Tabela 1). Nesta tabela pode-se ver que os vinhos foram de 10 países, 16 regiões de plantio e 11 castas de uva. Na Figura 15 está uma foto com algumas das garrafas de vinhos que foram analisadas nesse trabalho.

Tabela 1 - Lista de amostras de vinho segundo país, região de plantio e casta (continua)

	Amostra	Região	Uva
Argentina	AR1	Mendoza	Cabernet Sauvignon
	AR2	Mendoza	Shiraz
	AR3	Mendoza	Cabernet Sauvignon
	AR4	Mendoza	Malbec
	AR5	Mendoza	Shiraz
	AR6	Mendoza	Malbec
Espanha	ES1	Bierzo y Rioja	Indefinido
	ES2	Bierzo y Rioja	Tempranillo
	ES3	Catalunia	Tempranillo
Brasil	BR1	Sul do Brasil	Cabernet Sauvignon
	BR2	Sul do Brasil	Tannat
	BR3	Sul do Brasil	Merlot
	BR4	Sudoeste do Brasil	Indefinido
	BR5	Sul do Brasil	Merlot
	BR6	Sudoeste do Brasil	Indefinido
	BR7	Sul do Brasil	Cabernet Sauvignon
	BR8	Sul do Brasil	Cabernet Sauvignon
	BR9	Sudoeste do Brasil	Shiraz
Itália	IT1	Sul da Itália	Nero D'avola
	IT2	Sul da Itália	Nero D'avola
	IT3	Sul da Itália	Pinot Noir
	IT4	Norte da Itália	Indefinido
	IT5	Centro da Itália	Indefinido
Portugal	PT1	Norte de Portugal	Indefinido
	PT2	Norte de Portugal	Indefinido
	PT3	Norte de Portugal	Indefinido
	PT4	Norte de Portugal	Indefinido

Tabela 1 - Lista de amostras de vinho segundo país, região de plantio e casta (conclusão)

	Amostra	Região	Uva
Chile	CH1	Valle Central	Cabernet Sauvignon
	CH2	Valle Central	Malbec
	CH3	Valle Central	Cabernet Sauvignon
	CH4	Valle Central	Cabernet Sauvignon
	CH5	Valle Central	Carmenere
	CH6	Valle Central	Merlot
Uruguai	URU1	Sul do Uruguai	Cabernet Sauvignon
	URU2	Sul do Uruguai	Merlot
	URU3	Sul do Uruguai	Tannat
Estados Unidos	EUA1	California	indefinido
	EUA2	Washington	Cabernet Sauvignon
	EUA3	Washington	Merlot
	EUA4	Washington	Shiraz
	EUA5	California	Cabernet Sauvignon
	EUA6	California	Cabernet Sauvignon
	EUA7	California	Pinot Noir
África do Sul	AF1	Western Cape	Pinotage
	AF2	Western Cape	pinotage
	AF3	Western Cape	indefinido
	AF4	Western Cape	Cabernet Sauvignon
	AF5	Western Cape	Pinotage
França	FR1	Oeste da França	indefinido
	FR2	Oeste da França	indefinido
	FR3	Leste da França	Shiraz
	FR4	Leste da França	Grenache
	FR5	Leste da França	Shiraz

Figura 15 – Amostras de vinho utilizadas

Fonte: Autoria própria.

4.2 Equipamentos utilizados e análises realizadas

4.2.1 Análises de RMN-DT ^1H de baixo campo

❖ *Medidas não-invasivas de vinho (em garrafas inteiras e lacradas)*

Na Figura 16 está uma foto do equipamento usado nas análises dos vinhos diretamente nas garrafas. Trata-se de um espectrômetro de RMN-DT, baseado em um ímã permanente na configuração Halbach, com 10cm de bore e campo de 0,23 T (9 MHz para o ^1H) e uma sonda com bobina solenoidal de 1L de volume útil (SpinLock, Córdoba, Argentina). Esse sistema foi acoplado a um console transmissor receptor de RMN, Apollo (Tecmag, Houston, EUA). Utilizou ainda um amplificador de potência AMT 3025 e um pré-amplificador de baixo ruído Miteg 1041. Foi utilizado para tratamento dos dados adquiridos o software *NTNMR versão 2.3.8* (Tecmag, Houston, EUA).

Na sequência CPMG foi utilizado um pulso de 90° igual a $30\mu\text{s}$ e tau igual a $778\mu\text{s}$. Foram adquiridos 6000 ecos, com 8 scans e last delay de 5s, o tempo total de medida foi igual a 130s. As medidas foram feitas em triplicata. Os dados obtidos com essa sequência foram tratados usando a magnitude do sinal.

Para a sequência CP-CWFPx-x foi utilizado 90° igual a $30\mu\text{s}$ e tau igual a $90\mu\text{s}$. Foram adquiridos 16383 sinais, com 4 scans e last delay de 20s, o tempo total da medida foi igual a 120s. As medidas foram feitas em triplicata. Os dados obtidos com essa sequência foram tratados usando a componente real do sinal.

As amostras foram armazenadas no mesmo laboratório onde se encontra o equipamento, onde a temperatura foi mantida em 23°C . As garrafas foram completamente inseridas no magneto/sonda para a realização das medidas.

❖ *Análise da influência da temperatura na medida de RMN-DT*

O SpinLock é um equipamento aberto, sem controle de temperatura e as garrafas inteiras e lacradas são amostras grandes. Devido a todos esses fatores torna-se difícil haver rigor na temperatura em que a medida é realizada, portanto a influência da temperatura precisa ser avaliada. Para fazer essa avaliação uma das amostras foi aquecida até 50°C em

banho termostático e colocada dentro do equipamento, onde foram realizadas análises de CPMG do vinho dentro da garrafa durante seu resfriamento nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 minutos, até atingir a temperatura ambiente.

Figura 16 – Equipamento SpinLock, de ressonância magnética de baixo campo

Fonte: Autoria própria.

❖ *Medidas invasivas de vinho*

Foi utilizado o espectrômetro Minispec mq-20, Bruker (mostrado na Figura 17), com um magneto de 0,47 T operando na frequência de 19,9 MHz para o ^1H , com probe de 10 mm e largura do pulso de 90° de $3,22\mu\text{s}$. A operação do equipamento foi feita usando software *The Minispec v. 2.59* (Bruker BioSpin, Alemanha). Após a abertura das garrafas, as amostras foram transferidas para frascos estéreis de vidro e guardadas a -35°C para evitar a sua decomposição. No dia em que as medidas do Minispec foram realizadas, essas amostras foram retiradas do congelador até retornarem à temperatura ambiente. As alíquotas medidas nesse equipamento foram de $500\mu\text{L}$ e a temperatura de medida do equipamento foi igual a 23°C .

Na sequência CPMG foi utilizado um pulso de 90° igual a $2,26\mu\text{s}$ e tau igual a $1000\mu\text{s}$. Foram adquiridos 4000 ecos, com 8 scans e d1 de 3s. O tempo total da medida foi igual a

88s. As medidas foram feitas em triplicata. Os dados obtidos com essa sequência foram tratados usando a magnitude do sinal.

Semelhantemente, para a sequência CP-CWFPx-x foi utilizado 90° 2,26 μ s e tau igual a 300 μ s. Foram adquiridos 14000 ecos, com 8 scans e d1 de 3s, o tempo total de medida foi igual a 92s. As medidas foram feitas em triplicata. Os dados obtidos com essa sequência foram tratados usando a componente real do sinal.

Figura 17 - Equipamento Minispec, de ressonância magnética de baixo campo

Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Determinação de teor de metais

Todas as amostras foram digeridas segundo o método de Bentlin et al (22). Em tubos de digestão, foram colocados 1mL de amostra e 3mL de ácido nítrico concentrado da marca Synth. Os tubos foram cobertos com um funil de vidro para evitar contaminação ambiente, e a solução foi deixada em pré-digestão por no mínimo 15h (overnight). Em seguida as soluções foram aquecidas em bloco digestor a 50°C por uma hora, 100°C por uma hora e 150°C por três horas. Após resfriamento até temperatura ambiente, as soluções foram filtradas com papel de filtro analítico e seu volume foi completado com água MilliQ até atingir 25mL.

Os teores de manganês e de cobre foram determinados por um espectrômetro de absorção atômica (AA) PinnAAcle 900T, da PerkinElmer, com atomização em forno de

grafite. A curva de calibração para o cobre foi feita usando as concentrações 0, 5, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/L}$ usando como partida o padrão analítico da PerkinElmer em solução aquosa de 1% de ácido nítrico e concentração de analito igual a 1,0g/L. A curva de calibração para o manganês foi feita usando as concentrações 0, 5, 10, 20, 30 e 50 $\mu\text{g/L}$ usando como partida o padrão analítico da PerkinElmer em solução aquosa de 1% de ácido nítrico e concentração de manganês igual a 1,0g/L, as amostras que passaram a concentração de 50 $\mu\text{g/L}$ foram diluídas num fator 1:10 e medidas novamente.

Os teores de ferro e manganês também foram determinados por um espectrômetro de emissão ótica de plasma induzido com micro-ondas (MIP-OES), modelo 4200 da Agilent Technologies (Melbourne, Austrália). A curva de calibração para do manganês foi feita usando as concentrações 0, 5, 1, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu\text{g/L}$ a partir de padrão analítico PerkinElmer em solução aquosa de 1% de ácido nítrico e concentração de manganês igual a 1,0g/L. A curva de calibração para do ferro foi feita usando as concentrações 0, 10, 30, 50, 80, 100, 200, 400, 500 $\mu\text{g/L}$ usando o padrão analítico da PerkinElmer em solução aquosa de 1% de ácido nítrico e concentração de ferro igual a 1,0g/L.

Os teores de ferro também foram determinados por um espectrômetro de absorção atômica (AA) PinAAcle 900T, da PerkinElmer, acoplado a um atomizador por chama. A curva de calibração para o ferro foi feita usando as concentrações 0, 10, 20, 40, 60 e 100 $\mu\text{g/L}$ usando como partida o padrão analítico da PerkinElmer em solução aquosa de 1% de ácido nítrico e concentração de ferro igual a 1,0g/L.

4.3 Processamento dos dados

A organização dos dados, cálculo da média das medidas, extração dos valores de T_1 e T_2 e gráficos de correlação univariada foram feitos com o *software Origin 8.1* (OriginLab, MA, EUA). O valor de T_2 obtido com a sequência CPMG foi calculado automaticamente pelo software do equipamento. Os valores de T_1 e T_2 foram calculados com os dados dos sinais obtidos com a sequência CP-CWFPx-x e as Equações 1 e 2 (introdução). Para isso, usou-se a intensidade do sinal após primeiro pulso (M_0), a constante de tempo T^* e a intensidade do sinal no estado estacionário M_z . Devido a grande redundância de informações dos sinais

CPMG e de CP-CWFPx-x, os dados dos decaimentos originais foram reduzidos para 2000 variáveis.

As análises multivariadas e todos os pré-processamentos, transformações e gráficos a elas associados foram realizados no *software Pirouette v. 4.0 (Infometrix Inc. Bothel, WA, EUA)*. Os pré-processamentos testados foram o uso de valores auto-escalados ou centrados na média. As transformações testadas foram a normalização pela variância, a normalização pelo valor máximo e a suavização. Todas as análises de PLS foram feitas utilizando validação cruzada.

Foram calculados modelos de PCA e PLS separadamente com os dados de RMN-DT obtidos no SpinLock e no Minispec, a fim de comparar a qualidade de medida e de resultados obtidos por eles.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Medidas invasivas de vinho por RMN-DT (Minispec)

Todas as análises foram inicialmente feitas no espectrômetro de RMN-DT Spinlock, com as garrafas lacradas. Só depois disso foram feitas as análises invasivas, que usam apenas uma pequena quantidade de amostra. No entanto, para facilitar a apresentação dos resultados, optou-se por apresentar primeiramente as medidas realizadas no Minispec, um espectrômetro padrão de RMN-DT ^1H . As amostras analisadas foram de 500 μL , sendo necessária a violação do lacre da garrafa de vinho.

5.1.1 Análise com a sequência CPMG

As análises com a sequência CPMG, como apresentado na introdução, têm um decaimento governado pelo tempo de relaxação transversal (T_2). Devido ao número grande de amostras, os decaimentos foram agrupados por país e os grupos foram comparados entre si. Pode-se ver no Gráfico 1 que os vinhos brasileiros (em azul) decaem bem mais rapidamente que os vinhos argentinos (em preto), mas que a dispersão dos dados dentro de cada grupo é pequena. Se os decaimentos forem comparados aos dados contidos na Tabela 1, percebe-se que existem castas de uva presentes tanto no grupo de amostras brasileiras quanto no grupo argentino, mas que cada país parece ter um perfil próprio de decaimento. O mesmo comportamento pode ser visto nos vinhos chilenos, uruguaio e nas amostras europeias (Apêndice A). Embora nos demais países a diferença não seja tão nítida quanto a observada no Gráfico 1, nota-se de maneira semelhante que vinhos de um mesmo país ou região tendem a ter comportamentos mais parecido entre si. Isso indica que o país de origem da uva tem mais influência no decaimento de um vinho do que a casta usada em sua produção.

Gráfico 1 - Decaimentos de CPMG dos vinhos argentinos (preto) e brasileiros (vermelho) obtidos pelo Minispec.

Fonte: Autoria própria.

Nas amostras de origem europeia o mesmo padrão de agrupamento por país, no entanto os decaimentos parecem estar bem mais próximos e se misturam entre si. Isso provavelmente se deve à proximidade geográfica entre Portugal, Espanha, França e Itália e similaridade entre seus solos (Apêndice A).

As amostras sul-africanas e norte-americanas (mostradas, respectivamente, nos Gráficos 2 e 3) merecem um destaque especial. Além de serem as únicas representantes de seus continentes no espaço amostral do presente estudo, elas mostram perfis bastante distintos. Enquanto os vinhos da África do Sul são muito semelhantes entre si e reafirmam a observação de que o agrupamento ocorre por país e não por uva, os vinhos dos Estados Unidos se dividem em um leque maior e parecem contradizer essa observação. Mas comparando os decaimentos de vinhos norte-americanos com os dados da Tabela 1 percebe-se que na realidade essa distinção entre as amostras segue a região de cultivo, onde as amostras EUA2, EUA3 e EUA4 são originárias da Califórnia e as demais do estado de Washington.

Gráfico 2 - Decaimentos de CPMG dos vinhos da África do Sul obtidos pelo Minispec.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 3 - Decaimentos de CPMG dos vinhos dos Estados Unidos obtidos pelo Minispec.

Fonte: Autoria própria.

5.1.2 Análise com a sequência CP-CWFPx-x

Os sinais obtidos com a sequência Cp-CWFPx-x têm dependência tanto do tempo de relaxação longitudinal (T_1) quanto do transversal (T_2). Os resultados obtidos com a sequência CP-CWFPx-x foram bastante semelhantes àqueles obtidos pela CPMG. Amostras de um

mesmo país apresentaram perfis semelhantes entre si e se diferenciaram segundo o local de plantio das uvas. Os gráficos das demais medidas estão contidos nos ApêndiceB. Para fins didáticos, abaixo estão mostrados apenas os gráficos para os vinhos sul-africanos (Gráfico 4) e norte-americanos (Gráfico 5). Percebe-se bastante claramente o perfil diferenciado dos vinhos de acordo com sua região de origem ao se observar a amplitude da magnetização do estado estacionário (M_E). Os vinhos da África do Sul novamente estão todos bastante coerentes entre si, porém as amostras EUA2, EUA3 e EUA4 apresentam valores de estado estacionário (M_E) ligeiramente maiores que as demais amostras dos Estados Unidos.

Gráfico 4 - Decaimentos dos vinhos da África do Sul obtidos com a sequência CP-CWFPx-x, no Minispec.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 5 - Decaimentos de CP-CWFPx-x dos vinhos dos Estados Unidos obtidos pelo Minispec.

Fonte: Autoria própria.

5.2 Medidas não invasivas de vinho por RMN-DT (SpinLock)

5.2.1 Influência da temperatura nas medidas de RMN em garrafas de vinho lacradas

Os tempos de relaxação são dependentes da temperatura da amostra. Para o caso de óleos vegetais e outros líquidos viscosos, a variação altera o valor da relaxação exponencialmente (5). Assim, uma variação de 1°C na temperatura da amostra pode ser facilmente observada. Como a sonda desse espectrômetro não tem temperatura controlada, os experimentos iniciais foram realizados com as amostras sendo estocada, a 23°C , em um sistema com temperatura controlada. Em seguida as amostras eram analisadas na mesma temperatura (controlada por ar condicionado). No entanto, observou-se que temperatura não tinha muita interferência nos tempos de relaxação das amostras de vinho.

Para comprovar essa hipótese fez-se um experimento, medindo-se os decaimentos do sinal CPMG de uma amostra de vinho pré-aquecida a 50°C e colocada no espectrômetro. A amostra foi resfriada até 23°C , em função do tempo. Os decaimentos obtidos em função do tempo de resfriamento da amostra (até 2 horas) encontram-se no Gráfico 6. Esses resultados demonstram que praticamente não houve variação do decaimento em função da temperatura.

Gráfico 6 - Variação do perfil de decaimento de CPMG obtida pelo SpinLock para uma amostra de vinho aquecido a 50°C e colocado no espectrômetro com temperatura interna de 23°C, em função do tempo de resfriamento.

Fonte: Autoria própria.

Os valores de T_2 obtidos por ajuste mono exponencial tiveram uma média de 0,453s e desvio padrão 0,008s. Portanto, se uma diferença de mais de 20°C não interferiu significativamente na medida de T_2 , conclui-se que a variação de temperatura em cerca de 3°C, dentro do laboratório não foi causa de erro significativo nas análises realizadas no espectrômetro SpinLock.

5.2.2 Análise com a sequência CPMG

Da mesma maneira que nos dados do Minispec, nota-se que os decaimentos obtidos com o SpinLock se agrupam por país, de maneira independente às castas de uva utilizadas na fabricação do vinho. O Gráfico 7 mostra os decaimentos sobrepostos de vinhos argentinos e brasileiros, ilustrando essa discriminação.

Gráfico 7 - Decaimentos de CPMG de vinhos argentinos (preto) e brasileiros (vermelho) obtidos pelos SpinLock.

Fonte: Autoria própria.

Também os vinhos norte-americanos e sul-africanos mostram o mesmo comportamento observado no Minispec, conforme mostram os Gráficos 8 e 9 (respectivamente). Os vinhos dos Estados Unidos se separaram em dois grupos distintos, obedecendo à origem geográfica de plantio, e os vinhos da África do Sul tiveram decaimentos praticamente sobrepostos. Os decaimentos dos demais vinhos estão mostrados no Apêndice C deste trabalho.

Gráfico 8 - Decaimentos de CPMG de vinhos dos Estados Unidos obtidos pelos SpinLock.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 9 - Decaimentos de CPMG de vinhos da África do Sul obtidos pelos SpinLock.

Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Análise com a sequência CP-CWFPx-x

Também os resultados obtidos pela CP-CWFPx-x seguiram a tendência de separação por nacionalidade. Para fins de comparação, novamente mostramos os vinhos norte-americanos e sul-africanos, os decaimentos dos demais vinhos estão mostrados no Apêndice D. Embora um pouco menos evidente do que os decaimentos da CPMG, também é possível notar que existe uma diferenciação entre eles, havendo dois grupos nas curvas de CP-CWFPx-x dos vinhos americanos, enquanto os vinhos sul-africanos evoluem magneticamente de maneira bastante parecida até atingirem o estado estacionário.

Gráfico 10 - Decaimentos de CP-CWFPx-x de vinhos dos Estados Unidos obtidos pelos SpinLock.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 11 - Decaimentos de CP-CWFPx-x de vinhos da África do Sul obtidos pelos SpinLock.

Fonte: Autoria própria.

5.3 Análise do teor de Mn, Fe e Cu nos vinhos

Como os valores de T_1 e T_2 dos vinhos analisados ficaram sempre abaixo de 0,6 s (Tabela 2), muito abaixo dos T_2 de 2 s observados para água e etanol puros ou misturados na proporção 9:1, levantou-se a hipótese de que íons paramagnéticos fossem os responsáveis por essa redução de T_2 . Os elementos que tem íons paramagnéticos que estão presentes nos vinhos são o Fe, Mn e Cu. Os dois primeiros estão na faixa de 1mg/L e o Cu abaixo desse valor (22).

Tabela 2 - Valores das constantes relaxométricas T_1 e T_2 dos vinhos

Amostra	T_1 (s)	T_2 (s)	Amostra	T_1 (s)	T_2 (s)
AR1	0,550	0,032	EUA4	0,507	0,031
AR2	0,518	0,033	EUA5	0,378	0,028
AR3	0,416	0,028	EUA6	0,359	0,027
AR4	0,477	0,030	EUA7	0,375	0,028
AR5	0,420	0,028	FR1	0,402	0,025
AR6	0,451	0,028	FR2	0,443	0,028
BR1	0,479	0,032	FR3	0,507	0,032
BR2	0,370	0,025	FR4	0,563	0,036
BR3	0,302	0,022	FR5	0,500	0,031
BR4	0,395	0,028	IT1	0,396	0,028
BR5	0,402	0,027	IT2	0,360	0,026
BR6	0,397	0,026	IT3	0,468	0,031
BR7	0,336	0,024	IT4	0,427	0,032
BR8	0,337	0,024	IT5	0,494	0,033
BR9	0,301	0,021	PT1	0,325	0,026
CH1	0,460	0,026	PT2	0,398	0,029
CH2	0,400	0,029	PT3	0,315	0,026
CH3	0,388	0,030	PT4	0,371	0,027
CH4	0,440	0,025	UR1	0,475	0,029
CH5	0,489	0,034	UR2	0,538	0,034
CH6	0,453	0,032	UR3	0,435	0,026
ES1	0,367	0,027	AF1	0,448	0,032
ES2	0,554	0,046	AF2	0,448	0,030
ES3	0,448	0,029	AF3	0,434	0,031
EUA1	0,211	0,022	AF4	0,414	0,030
EUA2	0,604	0,034	AF5	0,454	0,032
EUA3	0,532	0,031			

As análises desses metais foram realizadas em dois equipamentos diferentes, um de Absorção Atômica com ionização por chama (FAAS) ou forno de grafite (GFAAS) e outro de Emissão Ótica por plasma induzido por microondas (MIP-OES). Essas duas determinações foram necessárias pois as análises iniciais de Fe, realizadas por FAAS, se mostraram muito superiores que o previsto por Bentlin et al (22). Na Tabela 3 estão as médias e os desvios-padrão dos teores dos metais segundo os métodos usados para obtenção dos dados. Os dados completos das determinações de metais estão no Apêndice E.

Tabela 3- Média e desvio padrão dos teores de metais nos vinhos segundo o método de obtenção utilizado.

	Fe MIP ($\mu\text{g/L}$)	Fe FAAS ($\mu\text{g/L}$)	Mn MIP ($\mu\text{g/L}$)	Mn GFAAS ($\mu\text{g/L}$)	Cu GFAAS ($\mu\text{g/L}$)
MÉDIA	7,481	3,056	1,778	1,018	0,232
DESVIO	6,031	2,703	0,717	0,445	0,052

A determinação por MIP-OES indicou valores superiores. Acredita-se que as análises em GFAAS e FAAS tenham eliminado parte dos analitos durante a etapa de pirólise, que não ocorre no MIP-OES. (41)

Embora os valores sejam diferentes, nota-se que há uma boa correlação entre eles, em especial nas concentrações de ferro (Gráfico 12). O ajuste linear foi feito para ambos os gráficos, dando $R^2=0,953$ para o ferro e $R^2=0,680$ para o manganês. O maior erro nas medidas de Mn realizadas com os dois métodos foi para as amostras com alta concentração do metal. Se a amostra de manganês com os maiores teores de determinação por GFAAS for eliminada (cerca de $3,25\mu\text{g/L}$), a correlação entre os dois métodos sobe para 0,796.

Gráfico 12 - Correlação entre as concentrações de ferro obtidas pelo absorção atômica com ionização por chama e o absorção atômica de plasma com microondas.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 13 - Correlação entre as concentrações de manganês obtidas por espectrometria com absorção atômica com ionização em forno de grafite e com emissão atômica de plasma induzido por microondas.

Fonte: Autoria própria.

5.3.1 Correlação univariada entre as concentrações de metais paramagnéticos e os valores de T_1 e T_2 extraídos dos decaimentos

Os valores obtidos para os teores de metais foram plotados versus as constantes T_1 e T_2 . Como esperado, os valores de T_1 e T_2 tendem a cair à medida que a concentração de metais aumenta. Os coeficientes de correlação (R) foram satisfatórios para o manganês (Tabela 4). O melhor resultado foi obtido com os valores de T_2 do SpinLock versus a concentração de manganês obtida pelo MIP-AES, como mostra o Gráfico 14.

Tabela 4 - Valores de R de correlação entre as constantes T_1 e T_2 e o teor de metais presentes nos vinhos

		Mn		Fe		Cu
		MIP	GFAAS	MIP	FAAS	GFAAS
Minispec	T_1	0,707	0,479	0,037	0,010	0,026
	T_2	0,806	0,588	0,026	0,010	0,053
SpinLock	T_1	0,640	0,482	0,052	0,014	0,017
	T_2	0,820	0,598	0,014	0,024	0,046

Gráfico 14 - Correlação entre a concentração de manganês obtida pelo MIP-AES e os valores de T_2 obtidos por RMN-DT

Fonte: Autoria própria.

Essa correlação se encontra dentro do esperado segundo o trabalho realizado por Cobra e Colnago (4), no qual o Mn^{2+} é o íon com maior relaxatividade. A baixa correlação para o Fe (Tabela 4) provavelmente se deve à presença de substâncias complexantes no vinho, que diminuem seu efeito relaxante (42). Já para o cobre a baixa correlação (Tabela 4) pode ser explicada pela baixa concentração e baixa relaxividade desse metal.

5.4 Análise quimiométrica

5.4.1 Análise de Componente Principal – PCA

Inicialmente fez-se a análise exploratória dos dados com a análise dos componentes principais (PCA). Novamente foram analisados primeiro os dados coletados no aparelho padrão (Minispec) e depois no SpinLock.

❖ Análise dos dados coletados no Minispec

Inicialmente os dados coletados no Minispec foram analisados centrados na média e com prévia normalização. O resultado para CPMG (Gráfico 15) foi bem diferente do esperado. A primeira componente explicava mais de 96% dos dados, sendo muito difícil

observar qualquer tipo de separação entre os grupos de vinho. Por ser um equipamento bastante controlado desde a temperatura da amostra até o volume analisado, acredita-se que a normalização dos dados excluiu alguma informação importante obtida por ele.

Gráfico 15 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do Minispec com prévia normalização.

Fonte: Autoria própria.

Se o volume analisado era sempre o mesmo (500 μ L), então a amplitude do primeiro ponto do decaimento fornece informações sobre a quantidade de núcleos por volume, ou a densidade do vinho em questão. Para o CPMG o melhor resultado foi obtido com os dados centrados na média, sem qualquer tipo de normalização. Ao se recalcularem as componentes principais dos dados do sinal CPMG sem realizar sua normalização, o resultado obtido mostra uma separação mais clara dos vinhos por país de origem. No Gráfico 16 são mostrados os escores de PCA, onde cada nacionalidade é representada por uma cor. É possível perceber que existe algum agrupamento de acordo com o país de origem. Para melhor visualizar essas informações, o gráfico de escores foi separado por países de origem. No Gráfico 17 estão os dados dos vinhos dos países do hemisfério norte, no Gráfico 18 estão os vinhos do hemisfério sul.

Como esperado, os vinhos norte-americanos se dividiram em dois grupos distintos, segundo as localidades de plantio (Gráfico 17a). Também pode-se observar nesses gráficos

que os vinhos brasileiros tiveram valores de PC2 bem negativos, enquanto que os demais países permaneceram próximos ou acima de zero.

Gráfico 16 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do Minispec sem prévia normalização.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 17 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do Minispec sem prévia normalização dos vinhos (a) dos Estados Unidos, (b) da França, (c) da Itália, (d) de Portugal e (e) da Espanha.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 18 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do Minispec sem prévia normalização dos vinhos (a) da África do Sul, (b) da Argentina, (c) do Brasil, (d) do Chile e (e) do Uruguai.

Fonte: Autoria própria.

Os dados obtidos com a sequência CP-CWFPx-x tiveram uma melhor separação, em relação ao CPMG, ao serem centradas na média e normalizadas pela variância (Gráfico 19). O resultado obtido foi semelhante àquele visto para a CPMG. Contudo, os grupos formados de acordo com a nacionalidade parecem estar menos dispersos que aqueles formados nos com os dados de CPMG, em especial para as amostras do hemisfério sul (Gráfico 21). Tal resultado pode significar uma melhor caracterização das amostras ao se construir um modelo de regressão.

Gráfico 19 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do Minispec.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 20 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do Minispec dos vinhos (a) dos Estados Unidos, (b) da França, (c) da Itália, (d) de Portugal e (e) da Espanha.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 21 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do Minispec dos vinhos (a) da África do Sul, (b) da Argentina, (c) do Brasil, (d) do Chile e (e) do Uruguai.

Fonte: Autoria própria.

❖ *Análise dos dados coletados no SpinLock*

Os resultados obtidos pelo SpinLock foram bastante similares àqueles obtidos no Minispec, sobretudo os dados de CPMG. Pode-se inferir, portanto, que os dados obtidos pelo Spinlock, apesar de um pouco mais dispersos, são confiáveis quando comparados aos dados do equipamento padrão. Como visto no Minispec, os vinhos se agrupam por país, de acordo com a região de plantio das uvas. Os cálculos de PCA foram feitos sem normalização e com os dados centrados na média.

Gráfico 22 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do SpiLock.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 23 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do SpinLock dos vinhos (a) dos Estados Unidos, (b) da França, (c) da Itália, (d) de Portugal e (e) da Espanha.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 24 - Resultado da PCA dos dados de CPMG do SpinLock dos vinhos (a) da África do Sul, (b) da Argentina, (c) do Brasil, (d) do Chile e (e) do Uruguai.

Fonte: Autoria própria.

Os dados de CP-CWFPx-x não renderam resultados de PCA tão satisfatórios. Os grupos formados são menos nítidos que a CPMG ou que a CP-CWFPx-x feita no Minispec. Apesar disso, tendência geral de agrupamento por país ainda é observada.

Gráfico 25 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do SpinLock.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 26 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do SpinLock dos vinhos (a) dos Estados Unidos, (b) da França, (c) da Itália, (d) de Portugal e (e) da Espanha.

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 27 - Resultado da PCA dos dados de CP-CWFPx-x do SpinLock dos vinhos (a) da África do Sul, (b) da Argentina, (c) do Brasil, (d) do Chile e (e) do Uruguai.

Fonte: Autoria própria.

5.4.2 Análise dos dados de RMN-DT pelo método de Mínimos Quadrados Parciais - PLS

❖ Análise dos dados coletados no Minispec

Na tabela 5 estão os resultados da regressão PLS obtidos com os dados coletados no Minispec para as sequências CPMG e CP-CWFPx-x e as concentrações de Mn, Fe e Cu, obtidos com AA e MIP-OES. Em ambas as regressões foram usados 2 fatores.

Tabela 5 – Dados da regressão PLS obtidos com os dados de RMN-DT gerados pelo Minispec e as concentrações de metais determinadas por AA e MIP.

Análise	Pré-Tratamento	Erros	Mn		Fe		Cu
			MIP	GFAAS	MIP	FAAS	GFAAS
CPMG	Centrado na média	RMsec	0,416	0,394	6,218	2,782	0,054
		RMsev	0,433	0,393	6,107	2,730	0,056
		R cal	0,832	0,541	0,193	0,200	0,166
		Rval	0,797	0,477	0,038	0,056	-0,278
CP-CWFPx-x	Centrado na média e Normalizado pelo máximo	RMsec	0,369	0,343	6,314	2,834	0,055
		RMsev	0,367	0,353	6,369	2,824	0,055
		R cal	0,871	0,681	0,085	0,063	0,130
		Rval	0,858	0,614	0,309	0,231	0,242

Os erros RMsec e RMsev representam os erros médios das medidas (calculadas e validadas, respectivamente), ou seja, ele mostra o quão dispersos os dados estão em relação à reta de correlação traçada. Quanto menores os valores de erros médios, mais próximos os pontos estarão da reta. Os valores Rcal e Rval são as medidas de correlação (calculadas e validadas, respectivamente) dos pontos com a reta. Quanto maiores os valores de R, melhor é o ajuste da reta ao conjunto de dados.

Em outras palavras, a correlação do modelo será melhor quanto maiores forem os valores de R e quanto menores forem os valores de RM. Seguindo essa lógica, os valores mais confiáveis de correlação foram obtidos para a medida de CP-CWFPx-x e as concentrações de manganês medidas pelo MIP. A boa correlação dos decaimentos com a concentração de manganês obtida pelo MIP era esperada, segundo visto e abordado na

Secção 5.4 deste trabalho. Comparando as Tabelas 3 e 4 percebe-se porém que os valores de R são bem maiores quando se considera todo o decaimento do que quando leva-se em conta apenas os valores de T_1 e T_2 , comprovando a grande utilidade da análise multivariada.

Os resultados obtidos com a sequência CP-CWFPx-x foram melhores que os obtidos com a CPMG. Isso mostra que uma correlação multivariada que leva em conta ambas as constantes de relaxação T_1 e T_2 dá resultados mais confiáveis que aqueles obtidos pela CPMG, técnica mais antiga e já consolidada, mas que é influenciada unicamente por T_2 . O Gráfico 28 mostra o resultado de correlação gerado pelo PLS com respeito às concentrações de manganês medidas pelo MIP, com $R=0,858$.

Gráfico 28 - Regressão de PLS para CP-CWFPx-x medida no Minispec e a concentração de manganês obtida pelo MIP-AES.

Fonte: Autoria própria.

❖ *Análise dos dados coletados no SpinLock*

Semelhantemente aos dados do Minispec, os dados da regressão PLS do SpinLock foram organizados com seus respectivos erros calculados e validados e estão mostrados na Tabela 6. Em ambas as regressões foram usados 3 fatores.

Tabela 6 – Dados de regressão PLS obtidos com os dados de RMN-DT gerados no SpinLock e as concentrações de metais determinadas por AA e MIP.

Análise	Pré-Tratamento	Erros	Mn		Fe		Cu
			MIP	forno	MIP	chama	forno
CPMG	Centrado na média	RMsec	0,351	0,357	6,304	2,825	0,054
		RMsev	0,372	0,357	6,229	2,793	0,054
		R cal	0,885	0,647	0,102	0,103	0,149
		Rval	0,856	0,599	-0,217	-0,217	-0,116
CP-CWFPx-x	Centrado na média	RMsec	0,350	0,338	6,264	2,798	0,054
		RMsev	0,367	0,345	6,376	2,837	0,054
		R cal	0,884	0,691	0,151	0,171	0,162
		Rval	0,858	0,635	-0,265	-0,185	-0,102

Analizando os dados da mesma maneira como foi feito para o Minispec, nota-se que novamente o melhor resultado foi obtido pela correlação entre CP-CWFPx-x e as concentrações de manganês obtidas pelo MIP. A mesma análise feita no sub-item anterior é válida, mas é importante ressaltar a magnitude dos valores de ambas as tabelas (4 e 5). Os valores recuperados para as análises feitas no SpinLock não apenas são equiparáveis com os obtidos pelo Minispec como são ligeiramente melhores. Esses resultados demonstram que é possível estimar a concentração de Mn em garradas lacradas usando a RMN-DT (em especial a sequência de pulso CP-CWFPx-x) e com base nela fazer uma estimativa da região de origem do vinho em questão. O Gráfico 29 mostra o resultado da correlação gerado pelo PLS com respeito às concentrações de manganês medidas pelo MIP, com $R=0,858$.

Gráfico 29 - Regressão PLS para CP-CWFPx-x medida no SpinLock e a concentração de manganês obtida pelo MIP-AES.

Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que o SpinLock, um equipamento com ímã de imagem que possui 10cm de bore e campo magnético de 0,23T, é útil para análises de vinhos tintos em garrafas lacradas. Seus resultados foram equiparáveis àqueles obtidos com o Minispec, equipamento mais preciso e controlado, mas que necessita da abertura da garrafa.

As análises multivariadas (quimiométricas) dos decaimentos de CPMG e CP-CWFPx-x foram mais eficazes para a diferenciação de amostras e para modelos de regressão do que os métodos univariados.

Também com a análise multivariada dos dados de RMN-DT foi possível observar que os vinhos se diferenciam pela região de plantio da uva, segundo a concentração de Mn. A concentração de metais em um vinho depende diretamente das características de seu local de origem, tanto solo em que a uva foi plantada quanto clima a que foi submetida (terroir).

A sequência de pulso CP-CWFPx-x mostrou resultados superiores nas análises quimiométricas de regressão (PLS) que a sequência CPMG. A nova sequência de pulso superou as expectativas, mostrando-se não apenas eficiente, mas também mais eficaz que a técnica mais utilizada atualmente para medidas de RMN-DT. Por ser uma medida rápida e que leva em conta tanto a relaxação longitudinal quanto a transversal, a CP-CWFPx-x tem potencial para ser utilizada em diversos campos de pesquisa e, aliada com a análise multivariada, pode extrair de uma determinada amostra mais informações do que se pode observar apenas com a CPMG.

Os metais paramagnéticos exercem grande influência no perfil de decaimento magnético de amostras de vinho. O manganês em especial, que possui efeito paramagnético aproximadamente três vezes maior que o ferro e trinta vezes maior que o cobre, mostrou uma correlação bastante alta com os dados obtidos por RMN-DT. Os outros dois metais estudados, no entanto, não tiveram correlação. Isso provavelmente ocorreu devido à forte influência do manganês, que mascarou o efeito dos outros íons. Para o ferro, outro fator relevante é seu o fato de ele estar majoritariamente precipitado no pH das amostras de vinho ($\text{pH} \approx 6,0$). No caso do cobre, a baixa concentração presente na amostra talvez tenha ficado até mesmo fora do limite de detecção do equipamento.

Outro fator que influencia o comportamento magnético dos vinhos é a presença de agentes complexantes que estão naturalmente na solução. Ao se complexarem com íons como os de manganês e ferro, essas moléculas reduzem seu efeito paramagnético e geram mudança no sinal de RMN obtido. Futuramente, a influência de complexantes também pode ser estudada de maneira semelhante ao estudo com metais apresentado nesse trabalho a fim de melhor compreender o comportamento desse tipo de amostra em um campo magnético.

É importante ressaltar que os dados aqui expressos dizem respeito ao conjunto amostral estudado no presente trabalho. A intenção desse estudo é mostrar que a RMN-DT tem potencial para estimar, com alguma confiabilidade, alguns países ou regiões produtoras de vinho e mais diretamente a concentração de Mn de garrafas de vinho lacradas. No entanto, para construir modelos de regressão mais precisos, robustos e estatisticamente mais confiáveis se faz necessária uma quantidade maior de amostras, com representatividade mais ampla do que aquela aqui foi apresentada.

7 REFERÊNCIAS

- 1 SCHMIDT-ROHR, K.; SPIESS, H. W. **Multidimensional solid-state NMR and polymers**. London: Academic Press, 1994. 478p.
- 2 DICKINSON, E. M. Structural comparison of petroleum fractions using proton and ¹³C NMR Spectroscopy. **FUEL**, v. 59, n. 5, p. 290-294, 1980.
- 3 HARLEY, S. J.; LIM, V.; STUCKY, P. A.; AUGUSTINE, M. P. Using low frequency full bottle diamagnetic screening to study collectible wine. **Talanta**, v. 85, p. 2437-2444, 2011.
- 4 COBRA, Paulo Falco. **Uso da relaxometria de RMN no domínio do tempo para estudo de íons paramagnéticos em solução**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 5 PRESTES, R. A.; COLNAGO, L. A.; FORATO, L. A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E. H.; CARRILHO, E. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, n. 2, p. 325–329, 2007.
- 6 TALEBPOUR, Z.; HAGHGOO, S.; SHAMSIPUR, M. ¹H Nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa, carbidopa and methylodopa in human serum and pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta**, v. 506, n. 1, p. 97-104, 2004.
- 7 Tipler P. A. **Física moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981. 422p.
- 8 GIL, V. M. S.; GERALDES, F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1987. 1012 p.
- 9 RABI, I. I. On the process of space quantization. **Physical Review**, v. 49, p. 324-328, 1936.
- 10 BLOEMBERGEN, N.; PURCELL, E. M.; POUND, R. V. Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. **Physical Review**, v. 73, n. 7, p. 679-712, 1948.
- 11 BLOCH, F. AND HANSEN, W. W. AND PACKARD, M. Nuclear induction. **Physical Review**, v. 69, n. 3-4, p. 127, 1946.
- 12 CORRÊA, Cátia Crispilho. **Análise da qualidade decarne bovina por ressonância magnética nuclear em baixa resolução**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- 13 DUARTE, C. J.; COLNAGO, L. A.; AZEREDO, R. B. V.; VENÂNCIO, T.. Solvent suppression in high-resolution ¹H NMR spectroscopy using conventional and phase alternated continuous wave free precession. **Applied Magnetic Resonance**, v. 44, p. 1265-1280, 2013.

- 14 ANDRADE, Fabiana Diuk. **Desenvolvimento de sequências de pulso de eco de spin de baixa potência para RMN online**. 2011. 80f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 15 VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R. B. V.; ALEM, N. E. R.; COLNAGO, L.A. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, p. 34-39, 2005.
- 16 MONARETTO, Tatiana. **Desenvolvimento e aplicação de sequências de pulsos CWFP com alternância de fase em RMN no domínio do tempo**. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- 17 FLORES, Douglas William Menezes. **Sistemas não-invasivos para classificação de laranjas por meio de parâmetros físico-químicos**. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- 18 SANTOS, P. M.; CORRÊA, C. C.; FORATO, L. A.; TULLIO, R. R.; CRUZ, G. M.; COLNAGO, L. A. A fast and non-destructive method to discriminate beef samples using TD-NMR. **Food Control**, v. 38, p. 204-208, 2014.
- 19 SOBRE VINHO. Curiosidades dos vinhos. **Denominação de origem controlada: DOC**. Porto Alegre, 2015. Disponível em: < <http://www.sobrevinho.net/curiosidades/denominacao-origem-controlada-doc>>. Acesso em: 07 jan. 2016.
- 20 SELIH, V. S.; SALA, M.; DRGAN, V. Multi-element analysis of wines by ICP-MS and ICP-OES and their classification according to geographical origin in Slovenia. **Food Chemistry**, v. 153, p. 414-423, 2014.
- 21 ILLUMINATI, S.; ANNIBALDI, A.; TRUZZI, C.; SCARPONI, G. Recent temporal variations of trace metal content in an Italian white wine. **Food Chemistry**, v. 159, p. 493-497, 2014.
- 22 BENTLIN, F. R. S.; PULGATI, F. H.; DRESSLER, V. L.; POZEBON, D. Elemental analysis of wines from south America and their classification according to country. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 22, n. 2, p. 327-336, 2011.
- 23 GISHEN, M.; DAMBERGS, R. G.; COZZOLINO, D. Grape and wine analysis - enhancing the power of spectroscopy with chemometrics: a review of some applications in the Australian wine industry. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 3, p. 296-305, 2005.
- 24 SMYTH, H. E.; COZZOLINO, D.; CYNKAR, W. U.; DAMBERGS, R. G.; SEFTON, M.; GISHEN, M. Near infrared spectroscopy as a rapid tool to measure volatile aroma compounds in Riesling wine: possibilities and limits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 7, p. 1911-1916, 2008.

- 25 COZZOLINO, D.; CYNKAR, W.; SHAH, N.; SMITH, P. Technical solutions for analysis of grape juice, must, and wine: the role of infrared spectroscopy and chemometrics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 5, p. 1475-1784, 2011.
- 26 DU, Y.; BAI, G.; ZHANG, X.; LIU, M. Classification of wines based on combination of H-1 NMR Spectroscopy and principal component analysis. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 930-936, 2007.
- 27 SON, H.; HWANG, G.; AHN, H.; PARK, W.; LEE, C.; HONG, Y. Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of H-1 NMR spectroscopic data. **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1483-1491, 2009.
- 28 FERRARI, E.; FOCA, G.; VIGNALI, M.; TASSI, L.; ULRICI, A. Adulteration of the anthocyanin content of red wines: Perspectives for authentication by Fourier Transform-Near InfraRed and H-1 NMR spectroscopies. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 139-151, 2011.
- 29 LOPEZ-RITUERTO, E.; CABREDO, S.; LOPEZ, M.; AVENOZA, A.; BUSTO, J. H.; PEREGRINA, J. M. A thorough study on the use of quantitative H-1 NMR in Rioja red wine fermentation processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2112-2118, 2009.
- 30 FABRE, S.; ABSALON, C.; PINAUD, N.; VENENCIE, C.; TEISSEDRE, P.; FOUQUET, E.; PIANET, I. Isolation, characterization, and determination of a new compound in red wine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 4, p. 1201-1208, 2014.
- 31 SON, H.; HWANG, G.; KIM, K.; AHN, H.; PARK, W.; VAN DEN BERG, F.; HONG, Y.; LEE, C. Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using H-1 NMR analysis coupled with multivariate statistics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1481-1490, 2009.
- 32 ARVANITOYANNIS, I. S.; KATSOTA, M. N.; PSARRA, E. P.; SOUFLEROS, E. H.; KALLITHRAKA, S. Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics). **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 10, p. 321-336, 1999.
- 33 PEREIRA, G. E.; GAUDILLERE, J.; LEEUWEN, C.; HILBERT, G.; LAVIALLE, O.; MAUCOURT, M.; DEBORDE, C.; MOING, A.; ROLIN, D. 1H NMR and chemometrics to characterize mature grape berries in four wine-growing areas in Bordeaux, France. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 6382-6389, 2005.
- 34 BRESCIA, M. A.; CALDAROLA, V.; DE GIGLIO, A.; BENEDETTI, D.; FANIZZI, F. P.; SACCO, A. Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear resonance spectrometric determinations. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 177-186, 2002.
- 35 WEEKLY, A. J.; BRUINS, P.; SISTO, M.; AUGUSTINE, M. P. Using NMR to study full intact wine bottles. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 161, p. 91-98, 2002.

- 36 AUGUSTINE, M. P.; WEEKLY, A. J.; BRUINS, P. **Methods and devices for analysis of sealed containers**. US n. US7339377 B2, 04 mar. 2008.
- 37 SOBIESKI, D. N.; MULVIHILL, G.; BROZ, J. S.; AUGUSTINE, M. P. Towards rapid throughput NMR studies of full wine bottles. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 29, p. 191-198, 2006.
- 38 AUGUSTINE, M. P.; HARLEY, S. J.; LIM, P. A.; STUCKY, P. **Authentication device for full intact wine bottles**. US n. US20110184681 A1, 28 jul. 2011.
- 39 HARLEY, S. J.; LIM, P. A.; AUGUSTINE, M. P. Application of bivariate statistics to full wine bottle diamagnetic sceening data. **Talanta**, v. 89, p. 484-489, 2012.
- 40 IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P.; MALGORZATA, D.; PROTASIEWICZ, M.; MOGUT, D. Chemometrics and cheminformatics in the analysis of biologically active peptides from food sources. **Journal of Functional Food**, v. 16, p. 334-351, 2015.
- 41 KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras**: fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008. 340 p.
- 42 KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A. Rapid and simultaneous relaxometris methods to study paramagnetic ion complexes in solution: an alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 122, p. 144-148, 2015.

APÊNDICE A – DECAIMENTOS DE CPMG DOS VINHOS CHILENOS, URUGUAIOS, PORTUGUESES, ESPANHÓIS, FRANCESES E ITALIANOS OBTIDOS PELO MINISPEC.

APÊNDICE B – DECAIMENTOS DE CP-CWFP_{x-x} DOS VINHOS ARGENTINOS, BRASILEIROS, CHILENOS, URUGUAIOS, PORTUGUESES, ESPANHÓIS, FRANCESES E ITALIANOS OBTIDOS PELO MINISPEC.

APÊNDICE C – DECAIMENTOS DE CPMG DOS VINHOS CHILENOS, URUGUAIOS, PORTUGUESES, ESPANHÓIS, FRANCESES E ITALIANOS OBTIDOS PELO SPINLOCK.

APÊNDICE D – DECAIMENTOS DE CP-CWFPx-x DOS VINHOS ARGENTINOS, BRASILEIROS, CHILENOS, URUGUAIOS, PORTUGUESES, ESPANHÓIS, FRANCESES E ITALIANOS OBTIDOS PELO SPINLOCK.

**APÊNDICE E – CONCENTRAÇÕES DE METAIS DAS AMOSTRAS DE VINHO
DETERMINADAS POR GFAAS E MIP.**

Amostra	Fe MIP (µg/L)	Fe chama (µg/L)	Mn MIP (µg/L)	Mn forno (µg/L)	Cu forno (µg/L)
AR1	5,000	1,784	1,120	0,800	0,389
AR2	4,000	1,460	1,770	0,930	0,155
AR3	4,500	1,896	1,460	0,830	0,312
AR4	5,500	2,020	1,050	0,590	0,230
AR5	5,500	1,905	1,430	0,720	0,255
AR6	4,000	1,260	1,360	0,710	0,143
BR1	6,000	2,538	1,420	0,800	0,171
BR2	4,000	1,600	2,680	1,380	0,276
BR3	9,000	1,870	3,790	2,370	0,223
BR4	5,500	1,804	2,160	1,140	0,260
BR5	2,500	1,418	1,990	1,120	0,228
BR6	4,000	1,847	3,550	3,330	0,296
BR7	3,500	1,493	2,800	1,130	0,287
BR8	2,000	0,992	2,990	1,230	0,284
BR9	10,000	2,940	3,870	1,360	0,248
CH1	10,000	6,272	1,410	0,930	0,232
CH2	30,000	12,842	1,980	1,220	0,338
CH3	6,000	2,846	1,850	1,260	0,268
CH4	7,000	2,658	1,550	0,940	0,220
CH5	9,500	4,050	1,380	0,860	0,247
CH6	34,000	15,346	1,740	1,120	0,264
ES1	6,000	2,532	1,830	1,030	0,198
ES2	7,500	3,352	0,950	0,600	0,220
ES3	8,500	3,814	1,370	0,800	0,250
EUA1	3,500	1,407	2,570	1,260	0,176
EUA2	3,000	1,365	0,950	0,630	0,197
EUA3	4,000	1,556	1,140	0,690	0,181
EUA4	3,000	1,483	1,070	0,710	0,287
EUA5	5,000	2,320	2,050	1,170	0,185
EUA6	9,000	4,300	2,320	1,360	0,181
EUA7	16,500	6,694	1,980	1,120	0,181
FR1	6,500	2,572	1,370	0,800	0,214
FR2	22,000	9,460	1,220	0,710	0,222
FR3	4,500	1,803	1,110	0,650	0,232
FR4	5,500	1,813	1,170	0,630	0,224
FR5	4,500	1,836	1,020	0,650	0,134
IT1	3,500	1,326	1,950	1,080	0,266
IT2	4,500	1,889	1,970	1,220	0,183

IT3	15,500	6,482	1,530	0,950	0,255
IT4	4,500	1,935	1,290	0,730	0,290
IT5	4,500	1,975	1,090	0,650	0,172
PT1	8,500	1,713	3,150	1,360	0,351
PT2	4,500	1,529	1,750	1,050	0,220
PT3	8,000	3,298	2,700	1,480	0,221
PT4	4,500	3,038	2,000	1,220	0,214
UR1	7,000	2,584	1,740	0,980	0,283
UR2	5,000	1,924	1,120	0,680	0,272
UR3	10,000	3,820	1,560	0,840	0,211
AF1	4,000	1,137	1,340	0,760	0,216
AF2	7,500	2,522	1,310	0,780	0,178
AF3	8,500	3,114	1,530	0,860	0,210
AF4	8,500	3,520	1,480	0,930	0,169
AF5	7,500	3,022	1,260	0,780	0,186