

Universidade Federal de Pelotas
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação

Determinação da concentração total e da fração bioacessível de metais
em amostras de casca de uva das cultivares Tannat e Cabernet
Sauvignon por MIP OES

Bruno Jacobs

Pelotas, fevereiro de 2019.

Bruno Jacobs

Determinação da concentração total e da fração bioacessível de metais em amostras de casca de uva das cultivares Tannat e Cabernet Sauvignon por MIP OES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química (Área de concentração: em Química Analítica).

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Bruno Jacobs

"Determinação da concentração total e da fração bioacessível de metais em amostras de casca de uva das cultivares Tannat e Cabernet Sauvignon por MIP OES"

Dissertação *aprovada*, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 27 de fevereiro de 2019

Banca Examinadora:

ADRIANE M. NUNES
Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes (Orientadora-UFPel)

Márcia Arocha
Profa. Dra. Márcia Arocha Gularte

Eliézer
Dr. Eliézer Quadro Oreste

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

J17d Jacobs, Bruno

Determinação da concentração total e da fração bioacessível de metais em amostras de casca de uva das cultivares Tannat e Cabernet Sauvignon por MIP OES / Bruno Jacobs ; Adriane Medeiros Nunes, orientadora ; Anderson Schwingel Ribeiro, coorientador. — Pelotas, 2019.

91 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Sistema de refluxo. 2. Casca de uva. 3. Decomposição ácida. 4. Bioacessibilidade. 5. MIP OES. I. Nunes, Adriane Medeiros, orient. II. Ribeiro, Anderson Schwingel, coorient. III. Título.

CDD : 634.8

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me concedido saúde e proteção durante essa caminhada e nas inúmeras viagens entre Dom Pedrito e Pelotas.

A minha esposa, Suziane, pela ajuda e paciência que teve comigo nos períodos difíceis e esteve sempre comigo. Sem você esse trabalho não seria possível, pois você me ampara, me dá suporte, me guia e me inspira no crescimento profissional, pessoal e acadêmico. Te amo muito.

Ao meu filho, Mathias, meu anjo azul, que é a luz da minha vida e minha bússola que me faz sempre tomar o rumo certo. Que me faz levantar todos os dias para poder te dar um bom futuro, onde você possa ser independente, bem sucedido e principalmente feliz. É principalmente para você que dedico este trabalho. Amo você mais que tudo.

A minha mãe Nair, por todo apoio prestado, essa mulher guerreira e de bom coração que sempre me ajudou em diversos sentidos e que sempre acreditou no meu potencial. Meu muito obrigado por tudo, te amo.

Ao meu pai, pela ajuda financeira ao longo da minha trajetória da graduação em Química Ambiental, o que proporcionou a realização do mestrado.

A Universidade Federal do Pampa, pelo apoio à qualificação.

A Universidade Federal de Pelotas, que proveu meus estudos.

A Profa. Adriane, orientadora, que me aceitou como aluno especial abrindo as portas para o meu crescimento profissional e pessoal. Você sempre foi muita solícita, de bom caráter, de sorriso aberto e verdadeiro. Obrigado pelos ensinamentos e por acreditar que era possível.

Ao co-orientador, Anderson, pela ajuda, pelas ideias e ensinamentos.

Aos demais professores, os quais tive aula, que de uma forma ou outra passaram seus conhecimentos científicos e humano.

Aos colegas do LabMequi, que me ajudaram muito na realização deste trabalho, nos ensinamentos teóricos e práticos. Obrigado pela convivência, sempre boa, pelos momentos de descontração e risadas. Com certeza não me esquecerei de nenhum de vocês.

Aos amigos Cícero e Renan que me acolheram em suas casas ao longo desses dois anos. Vocês ajudaram a tornar esse mestrado possível e 'mais leve', pois ao final do dia eu tinha amigos e um lar para dormir.

A Gabriela Potter, diretora da Guatambu, que forneceu gratuitamente as uvas para este trabalho e que sempre esteve a disposição para tirar quaisquer dúvidas.

Aos amigos, em geral, que de alguma forma contribuíram com essa etapa da minha vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

JACOBS, Bruno. **Determinação da concentração total e da fração bioacessível de metais em amostras de casca de uva das cultivares Tannat e Cabernet Sauvignon por MIP OES**. 2019. 91f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós- Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Anualmente no mundo são gerados milhões de toneladas de resíduos provenientes das mais diversas culturas do agronegócio, sendo que muitas vezes estes não são aproveitados e acabam sendo descartados de forma incorreta, o que gera danos ambientais. O aproveitamento destes resíduos, como os provenientes de vinícolas, que tem como seu principal resíduo o bagaço de uva, vem aumentando o interesse por parte das indústrias de alimentos e de cosméticos na extração de compostos que apresentam importantes propriedades biológicas. Estes resíduos apresentam em sua composição água, proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas, compostos fenólicos e minerais, os quais são dependentes do tipo de resíduo gerado, da cultivar, bem como das condições climáticas e de cultivo. Assim, a caracterização elementar destas amostras se faz necessário, o que vem a auxiliar a melhor forma de destino destes. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia simples e segura de preparo de amostra com o uso do sistema de refluxo para posterior determinação da concentração total e da fração bioacessível de metais (essenciais e potencialmente tóxicos, tais como Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb e Zn) em amostras de casca de uva das cultivares Cabernet Sauvignon e Tannat através da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) com sistema multimode para introdução das amostras. Para determinação da concentração total dos elementos de interesse, as amostras foram preparadas em um bloco digestor através de uma decomposição ácida em sistema de refluxo com dedo frio, utilizando HNO_3 e H_2O_2 como meio oxidante. A exatidão do método foi realizada através de testes de adição e recuperação de analito, obtendo-se recuperações adequadas, que ficaram na faixa de 82 a 118 %, bem como através de um método comparativo de preparo de amostra em sistema fechado. De acordo com os resultados obtidos da concentração total, os elementos Cd e Bi ficaram abaixo do limite de detecção do

método (LOD_m) em ambas as amostras e o Cr para a cultivar Tannat. Para a determinação da fração bioacessível, foi simulado o sistema gastrointestinal *in vitro*. A exatidão do método foi avaliada somando-se a fração bioacessível (sobrenadante) com a não bioacessível, a qual deve ser próxima da concentração total, os resultados ficaram entre 81 e 120 %. A fração bioacessível dos elementos Zn, Cu, Ba, Pb, Mn ficaram na faixa de 13,5 a 52,8 %. Já o Fe que apesar de estar presente nas amostras em concentrações consideráveis, teve sua fração bioacessível abaixo do LOD_m . É importante salientar que o Pb, que é considerado um elemento não essencial e potencialmente tóxico apresentou alta bioacessibilidade, o que ressalta a necessidade do monitoramento de elementos essenciais e potencialmente tóxicos nestas amostras, o que vem auxiliar no destino desses resíduos.

Palavras-chave: sistema de refluxo, casca de uva; decomposição ácida; bioacessibilidade; MIP OES.

Abstract

JACOBS, Bruno. **Determination of the total concentration and the bioaccessible fraction of metals in samples of grape skin of the cultivars Tannat and Cabernet Sauvignon by MIP OES.** 2019. 91f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós- Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Every year in the world millions of tons of waste are generated from the most diverse agribusiness crops, many of which are not used and are eventually disposed of incorrectly, which causes environmental damages. The use of these residues, such as those from wineries, whose main residue is grape skin, has increased the interest of the food and cosmetic industries in the extraction of compounds that have important biological properties. These residues contain water, proteins, lipids, carbohydrates, vitamins, phenolic compounds and minerals, which are dependent on the type of residue generated, the cultivar, as well as the climatic and cultivation conditions. Thus, the elementary characterization of these samples becomes necessary, which helps to the best form of destination of these. The objective of the present work was the development of a simple and safe sample preparation methodology with the use of the reflux system for subsequent determination of the total concentration and the bioaccessible fraction of metals (essential and potentially toxic metals such as Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb and Zn) in grape-peel samples of cultivars Cabernet Sauvignon and Tannat by means of the microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES) with multimode system for introduction of samples. To determine the total concentration of the elements of interest, the samples were prepared in a digester block by acid decomposition in cold reflux with HNO_3 and H_2O_2 as the oxidizing medium. The accuracy of the method was performed by analytical addition and recovery tests, obtaining adequate recoveries, which were in the range of 82 to 118%, as well as through a comparative method of sample preparation in a closed system. According to the results of the total concentration, the elements Cd and Bi were below the limit of detection of the method (LOD_m) in both samples and Cr for the cultivar Tannat. In order to determine the bioaccessible fraction, the gastrointestinal system was simulated in vitro. The accuracy of the method was evaluated by adding the

bioaccessible (supernatant) fraction to the non-bioaccessible fraction, which should be close to the total concentration, the results were between 81 and 120%. The bioaccessible fraction of the elements Zn, Cu, Ba, Pb, Mn were in the range of 13.5 to 52.8%. However, the Fe that despite being present in the samples in considerable concentrations, had its bioaccessible fraction below the LOD_m. It is important to point out that Pb, which is considered a non-essential and potentially toxic element, showed high bioaccessibility, which highlights the need to monitor essential and potentially toxic elements in these samples, which helps to the destination of these residues.

Keywords: reflux system, grape skin; acid decomposition; total concentration; bioaccessibility; MIP OES.

Lista de figuras

Figura 1	Esquema de instrumentação de um MIP OES.....	28
Figura 2	Esquema do sistema <i>multimode</i> (MSIS) para introdução de amostra.	31
Figura 3	A) Sistema de dedo frio com resfriamento, acoplado aos tubos digestores de vidro. B) Imagem real do sistema de dedo frio.....	34
Figura 4	Sistema de digestão ácida com dedo frio (B) com sistema de recirculação de água termostatzada (A).....	35
Figura 5	Locais de digestão, secreção e absorção.....	42
Figura 6	Amostras das cultivares Cabernet Sauvignon e Tannat.....	47
Figura 7	Sobrenadante + parte sólida (A) e fração não-bioacessível depois da retirada do sobrenadante (B).....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1	Área cultivada com videiras, por estado, em hectares, 2014/2016.....	20
Tabela 2	Parâmetros operacionais para determinação dos metais por MIP OES.....	45
Tabela 3	Programa de aquecimento do bloco de digestão com sistema de refluxo.....	49
Tabela 4	Concentração dos reagentes utilizados nas soluções do sistema digestivo.....	51
Tabela 5	Soluções utilizadas para simular o sistema digestivo.....	51
Tabela 6	Parâmetros de mérito obtidos por MIP OES para as determinações das concentrações totais de metais em amostras de casca de uva.....	55
Tabela 7	Parâmetros de mérito da fração bioacessível.....	56
Tabela 8	Concentrações obtidas em mg kg^{-1} de Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu em casca de uva, média da concentração em $\text{mg kg}^{-1} \pm$ desvio (RSD) e % de recuperação.....	58
Tabela 9	Concentrações obtidas em mg kg^{-1} de Fe, K, Mg, Mn, Pb, Zn em casca de uva, média da concentração em $\text{mg kg}^{-1} \pm$ desvio (RSD) e % de recuperação.....	59
Tabela 10	Resultados comparativos entre os métodos com sistema de refluxo e fechado aplicado as amostras de casca de uva da cultivar Tannat.....	60
Tabela 11	Concentração total de metais nas amostras de casca de uva por MIP OES.....	62
Tabela 12	Concentração da fração bioacessível (FB) e não bioacessível (FNB) nas amostras de casca de uva obtidas por MIP OES.....	67

Lista de abreviaturas e Siglas

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CCD	Dispositivo de carga acoplada, do inglês <i>Charge-Coupled Device</i>
F AAS	Espectrometria de absorção atômica em chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
FAO	Organização para agricultura e alimentação, do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
FG AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
FIESP	Federação das indústrias do estado de São Paulo
GI	Gastrointestinal
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> .
ITAL	Instituto de tecnologia de alimentos
JECFA	Comitê conjunto de especialistas em aditivos alimentares, do inglês <i>Expert Committee on Food Additives</i>
LABMEQUI	Laboratório de metrologia química
LOD _m	Limite de detecção do método
LOQ _m	Limite de quantificação do método
MIP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, do inglês <i>Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry</i>

MSIS	Sistema de introdução de amostra <i>multimode</i> , do inglês <i>Multimode Sample Introduction System</i>
OMS	Organização mundial da saúde
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoretileno
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
WHO	Organização mundial da saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>
% FB	Porcentagem da Fração Bioacessível
% FNB	Porcentagem da Fração Não Bioacessível

Sumário

1.	Introdução.....	17
2.	Revisão da literatura.....	19
2.1	Panorama da vitivinicultura brasileira.....	19
2.2	Subprodutos da indústria vitivinícola.....	21
2.3	Utilização dos subprodutos da produção de vinho.....	23
2.4	Cultivares.....	25
2.4.1	Cabernet Sauvignon.....	25
2.4.2	Tannat.....	25
2.5	Principais doenças na videira, medidas de controle e fertilização.....	26
2.6	Técnicas analíticas para determinação de metais.....	27
2.6.1	Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas.....	28
2.7	Preparo de amostras.....	32
2.7.1	Decomposições de materiais orgânicos por via úmida.....	32
2.7.2	Digestão ácida com sistema de dedo frio.....	33
2.7.3	Frasco de Teflon.....	35
2.8	Micro e macroelementos em videiras e fruto.....	37
2.9	Micro e macroelementos no metabolismo humano.....	37
3.	Sistema gastrointestinal.....	39
4.	Objetivos.....	43
4.1	Objetivos gerais.....	43
4.2	Objetivos específicos.....	43
5.	Materiais e métodos.....	44
5.1	Instrumentação.....	44

5.2	Materiais e reagentes.....	46
5.3	Amostras.....	46
5.4	Teor de umidade.....	47
5.5	Sólido totais dissolvidos e acidez.....	48
5.6	Método de preparo das amostras.....	49
5.6.1	Decomposição ácida em bloco digestor com sistema de refluxo.....	49
5.6.2	Digestão ácida em sistema fechado de alta pressão – Frasco de teflon.	50
5.7	Fração bioacessível.....	50
5.8	Fração não bioacessível.....	53
6.	Resultados e discussão.....	55
6.1	Teor de umidade.....	54
6.2	Sólidos totais dissolvidos e acidez.....	54
6.3	Parâmetros de mérito.....	54
6.4	Validação da metodologia proposta.....	57
6.5	Resultados da determinação da concentração total nas amostras de casca de uva.....	61
6.6	Resultados da determinação da fração bioacessível nas amostras de casca de uva.....	65
7.	Considerações finais.....	71
	Referências Bibliográficas.....	72
	Apendicês.....	89

1. Introdução

No ano de 1532, Martin Afonso de Souza trouxe as primeiras videiras da cultivar *Vitis Viníferas* ao Brasil para serem plantadas na Capitania de São Vicente, porém ele encontrou clima e solo desfavoráveis para a realização do seu experimento. Foi então que um membro da sua expedição, Brás Cubas, em 1551, transfere as videiras para o Planalto Atlântico e consegue elaborar o primeiro vinho brasileiro. No Rio Grande do Sul o plantio é creditado a chegada dos jesuítas a região das Missões, através do Padre Roque Gonzales de Santa Cruz (VINHOS DO BRASIL).

A diversidade climática e a criatividade dos brasileiros, levou o país a alcançar uma vitivinicultura completamente original. A vinda de milhares de imigrantes, principalmente a de europeus, aliada ao investimento em inovação, resultou na elaboração de vinhos distintos, onde cada zona produtora desenvolveu sua especialidade, com características próprias. Hoje, a área de produção vitivinícola no Brasil soma 79,1 mil hectares, divididos principalmente entre seis regiões (Serra Gaúcha, Serra do Sudeste e Campos de Cima da Serra, no Rio Grande do Sul, Planato Catarinense e Vale do São Francisco) . Essas regiões abrigam a maioria das mais de 1,1 mil vinícolas espalhadas pelo país, as quais estão instaladas principalmente em pequenas propriedades, com uma média de 2 hectares de vinhedos por família. (IBRAVIN., 2018).

A Serra Gaúcha ocupa a primeira colocação na produção de vinhos, seguido da Campanha Gaúcha, a qual apresenta aproximadamente dois mil hectares de vinhedos, todos em espaldeira, correspondendo a nível nacional, a soma de 35 % do total de uvas *vitis viníferas* cultivadas, aliando o cultivo a paisagem, inovação, preservação e sustentabilidade (DEBON., 2015).

No entanto, nos últimos anos tem se constatado a necessidade de destinar corretamente os resíduos gerados pelas indústrias vinícolas, os quais podem representar até 30 % do peso total das uvas, dependendo das condições da colheita. Assim, com base no volume considerável de resíduos gerados e a importância relacionada às questões de sustentabilidade e problemas de caráter ambiental, cresce cada vez mais a demanda por novas perspectivas que

possibilitem o reuso destes subprodutos (AHMAD & ALI SIAHSAR, 2011; ROCKENBACH et al., 2008).

Os resíduos sólidos da uva processada industrialmente que podem ter algum interesse econômico potencial são o engaço, o bagaço, sementes, material filtrado dos líquidos e outros. Dependendo do tipo de resíduo, das condições climáticas e de cultivo, esses são compostos de água, carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas e minerais, bem como por compostos com propriedades biológicas importantes, como fibras, vitamina C e compostos fenólicos (AHMADI & ALI SIAHSAR, 2011; BURIN et al., 2010; ROCKENBACH et al., 2008;).

Com base nas propriedades funcionais dos compostos presentes nesses resíduos, os quais se caracterizam por atuar auxiliando no metabolismo humano, estudos vêm evidenciando o interesse das indústrias para a extração desses compostos, com o objetivo de agregar valor aos produtos alimentícios, auxiliando na melhoria do padrão e segurança alimentar da população, além de prevenir diversos tipos de doenças (CETIN et al., 2011; DENG et al., 2011). Cabe salientar que, novos estudos também vêm evidenciando um potencial promissor desses subprodutos a ser utilizado como alimentação animal e humana, bem como sua incorporação na adubação orgânica (GALLON et al, 2013; KLINGER et al, 2013; LOPES et al, 2013; PAZ et al, 2015; OLIVEIRA et al, 2016; ZHU et al, 2019 no prelo;).

Com base no contexto da reutilização destes resíduos aplicados as mais diversas áreas, e sabendo-se da importância dos teores de metais para garantir a qualidade e o valor nutricional do fruto, é de fundamental importância a determinação da concentração total e da fração bioacessível de metais através de um preparo de amostras adequado, bem como uma técnica analítica instrumental que apresente precisão e exatidão adequadas.

Dentre os vários elementos pesquisados neste trabalho, o Pb e Cd são considerados potencialmente tóxicos. Porém, normalmente, são encontrados em concentrações baixas, na ordem de ppb, desta forma foi necessário aplicar o sistema *multimode* com geração de hidretos ao MIP OES para sua determinação, com o intuito de aumentar a sensibilidade da técnica analítica (KODURU & LEE, 2014; DONATI et al., 2013; D'ULIVO et al., 2011).

2. Revisão da literatura

2.1 Panorama da vitivinicultura brasileira

A viticultura no Brasil é muito própria e característica nas suas principais regiões produtoras. Há regiões onde a produção se destina principalmente ao consumo in natura, outras para processamento, transformando a uva em suco e vinho. Há também regiões onde se predomina o cultivo de uvas americanas ou híbridas, e outras com cultivo exclusivo de variedades de *Vitis viniferas*, como é o caso da Campanha Gaúcha. A agricultura familiar é a principal fonte produtora de uvas, mas também há médias e grandes empresas envolvidas no setor, as quais muitas vezes fazem parcerias com as pequenas empresas e/ou agricultura familiar para aumentarem o seu volume de produção. Os produtos finais, como suco e vinho apresentam características distintas, uma vez que a uva é cultivada em diferentes solos, clima e o modo de fazer estão relacionados com a cultura local. A elaboração de vinhos de mesa e suco (integral e concentrado) representa a maior parte do processamento da produção, mas também há o reconhecimento internacional dos vinhos finos, sejam eles espumantes ou tranquilos (MELLO, 2016).

A área cultivada com videiras no Brasil, em 2016, foi de aproximadamente 78,5 mil hectares, apresentando aumento de 0,68% em relação ao ano anterior (Tabela 1), sendo o Rio Grande do Sul o estado com maior representatividade, em torno de 60 % da área vitícola nacional, concentrando mais de 60% da área vitícola nacional com 50.044 hectares. Na principal microrregião produtora, Caxias do Sul, caracterizada pela produção de uvas destinadas a elaboração de vinhos e suco de uva, em 2015, apresentava 79,68% das propriedades vitícolas do estado, sendo a agricultura familiar a principal fonte produtora (MELLO, 2016).

Estado/Ano	2014	2015	2016
Rondônia	25	27	27
Piauí	9	7	7
Ceará	25	38	38
Paraíba	202	122	132
Pernambuco	6.797	6.814	7.143
Bahia	2.862	2.861	2.519
Minas Gerais	784	856	911
Espírito Santo	138	148	180
Rio de Janeiro	10	7	7
São Paulo	8.040	7.803	7.939
Paraná	4.681	4.465	4.500
Santa Catarina	4.897	4.846	4.823
Rio Grande do Sul	50.007	49.739	50.044
Mato Grosso do Sul	18	13	56
Mato Grosso	57	51	56
Goiás	150	150	106
Distrito Federal	77	79	65

Tabela 1. Área cultivada com videiras, por estado, em hectares, 2014/2016.

Fonte: MELLO, 2016.

Segundo a Organização Mundial do Vinho (OIV) em 2016 a previsão de área utilizada no cultivo de videiras foi de 7,5 milhões de hectares. Deste total o Brasil apresentou no ano de 2013 aproximadamente 90 mil hectares e em 2016, 85 mil hectares, onde produziu 1,4 milhões e 1,1 milhões de toneladas de uva, respectivamente. Porém apenas 33% do volume total produzido teve como destino a produção de vinho (OIV, 2016).

No Rio Grande do Sul em 2017, de acordo com o IBRAVIN/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)/Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação(SEAPI-RS) foram processadas 753,3 mil toneladas de uva (viníferas, americanas/híbridas), sendo que 77,9 mil toneladas foram de uvas viníferas (IBRAVIN, 2017).

Dentre as viníferas tintas, e que foram utilizadas neste presente trabalho a cultivar Cabernet Sauvignon se destaca em área plantada. No período de 1996/2015 a área permaneceu estável, com 433 hectares, aumentando para 1.868 ha em 2007, e reduzindo-se a 1.028 hectares em 2015. A cultivar Tannat apresentou crescimento até o ano de 2007, atingindo 421 hectares e após teve reduções anuais, chegando a 352 hectares em 2015 (IBRAVIN, 2017).

De acordo com o Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN) neste ano de 2018 a safra de uva no Rio Grande do Sul é caracterizada por sua qualidade, onde foram colhidos 663,2 milhões de quilos de uvas destinados ao processamento de produtos vinícolas. Isso corresponde a 90 % da produção nacional, sendo que deste total 597.699.541 foram de uvas americanas e híbridas e 65.540.421 de *Vitis viníferas* (IBRAVIN, 2018).

Nesta safra, 113 variedades de uva foram colhidas em 129 municípios do Rio Grande do Sul, com processamento realizado em 64 cidades do Estado. Assim como nos últimos seis anos, 50% da produção foi destinada à elaboração de suco (IBRAVIN, 2018).

2.2 Subprodutos da indústria vitivinícola

De acordo com a Associação Brasileira de Normas técnicas (ABNT), NBR 10004/2004, os resíduos são classificados como “todo material nos estados sólido e semi-sólido, que resulta de atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição”. Além disso, segundo a Resolução do CONAMA nº5, ficam incluídos também nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água.

A classificação dos resíduos sólidos, de forma mais específica, conforme a norma, é definida em 4 classes, tais como perigosos, não perigosos, inertes e não inertes (ABNT, 2004).

Em todo mundo, milhões de toneladas de resíduos provenientes de atividades agroindustriais são gerados todo ano, sendo que alguns deles são usados como complemento em ração animal e outros dispostos em campo aberto. Embora a maioria seja biodegradável, necessitam de certo tempo para sofrer a mineralização, o que pode causar danos ao meio ambiente pelo descarte de forma incorreta (MAKRIS, 2007; CATANEO, 2008).

Dentre os inúmeros resíduos provenientes do agronegócio no Brasil, se destacam os do setor vinícola pelo alto volume gerado de resíduos, de aproximadamente 20 a 30 %, comparado com o peso total, dependendo da cultivar e

do processo de prensagem. Esse resíduo é composto pelo engaço, bagaço (casca e sementes) e a borra resultante do processo fermentativo, o que torna esse setor promissor como fonte de substâncias naturais (MAKRIS et al., 2007; DWYER et al., 2014).

O engaço é rico em compostos tânicos, os quais apresentam alto potencial nutracêutico e farmacológico. A casca da uva representa, em média, 82 % do peso do bagaço (KAMMERER et al., 2004) sendo uma fonte de antocianidinas e antocianinas, que são corantes naturais e possuem propriedades antioxidantes. Além disso, apresenta açúcares e macro e micronutrientes (MURGA et al., 2000; YILMAZ & TOLEDO, 2006), sendo também uma excelente fonte de fibra alimentar, que corresponde de 50 a 60 % da composição total das cascas (DENG et al., 2011). A semente da uva é composta aproximadamente de: 40% fibra, 16% óleo, 11% proteínas, 7% compostos fenólicos complexos (taninos), açúcares e sais minerais, sendo rica em óleo essencial, o qual possui um alto valor agregado, sendo utilizado nas indústrias químicas de cosméticos e farmacêuticas. (MURGA et al., 2000).

O bagaço de uva representa um importante subproduto da indústria vinícola e sua composição química pode variar bastante, dependendo do tipo de bagaço, a natureza das castas de que provêm o modo de vinificação, as condições atmosféricas que presidem à vegetação do vinhedo, as quais têm uma influência marcada na composição das uvas e na sua condução e o estado sanitário das uvas no momento da vindima (FAMUYIWA & OUGH, 1982).

Segundo dados da indústria, na produção de 100 litros de vinho branco obtêm-se 31,7 kg de resíduos, enquanto que na produção de 100 litros de vinho tinto obtêm-se 25 kg de resíduos, gerando 20 Kg e 17 Kg de bagaço, respectivamente. Hoje, estes subprodutos estão sendo utilizados como ração animal e como adubo de vinhedos, beneficiando os sistemas agrícolas familiares, e por outro lado, permitindo às vinícolas a doação ou mesmo a venda deste subproduto (CAMPOS, 2005).

No estudo realizado pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e pela Fundação das Indústrias do Estado de São Paulo (Fiesp) em 2010, denominado Brasil Food Trends 2020, foi demonstrado que os consumidores estão buscando hábitos alimentares cada vez mais saudáveis e que estão exigindo mais responsabilidade por parte das indústrias alimentícias no controle dos seus resíduos e o reaproveitamento destes (ITAL, 2010)

O aumento do interesse do consumidor em relação ao perfil ambiental em produtos, especialmente aqueles ligados ao setor de alimentos e bebidas, aliado às pressões governamentais e das comunidades locais, vem encorajando empresas a tomarem práticas sustentáveis na cultura da uva e na produção de vinho (RUGANI et al, 2013).

2.3 Utilização dos subprodutos da produção de vinho

Como é de conhecimento, os resíduos gerados pelas agroindústrias podem ser aproveitados como ingredientes na elaboração de novos produtos. Dentre estes destaca-se os subprodutos gerados a partir do processamento da uva, já que as uvas são consideradas ótimas fontes naturais de antioxidantes e compostos fenólicos, os quais contribuem na redução de doenças cardiovasculares, neurológicas e cancerígenas (ABE et al, 2007; LOPES, 2013; ZHU, 2019, no prelo).

De acordo com trabalhos citados na literatura, o bagaço de uva, que é composto da casca e semente, vem sendo utilizado para a extração de ácido cítrico, malatos, tartaratos de potássio, compostos fenólicos e óleo proveniente da semente (GONZALES-PARAMAS et al, 2004; ROCKENBACH et al, 2008), os quais podem ser utilizados na composição de cosméticos, suplementos alimentar, fitoterápicos, dietéticos e como antioxidantes na indústria de alimentos. Estas visam desenvolver formulações que tenham como objetivo melhorar a qualidade dos produtos alimentícios, atendendo a demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis e naturais.

Também há relatos do uso da farinha de bagaço de uva em pães (PAZ et al., 2015), barra de cereais, massas, o que torna uma excelente alternativa para os diabéticos, uma vez que tem o consumo restrito de frutas *in natura* devido ao alto teor de açúcar presente (OLIVEIRA et al, 2016), assim como uso de antioxidantes oriundos de fontes naturais, em substituição aos aditivos sintéticos, aplicados principalmente em produtos cárneos vem sendo o foco de muitos trabalhos (NEGRO et al, 2003). Outras aplicações conhecidas para os resíduos gerados a partir da indústria do vinho são: material orgânico para condicionamento do solo, alimentação animal (ovinos, suínos e bovinos) (BARROSO et al, 2006; LOULI, 2004; SHIRAHIGUE et al, 2010).

Barroso e colaboradores (2006) relatam que nas regiões semiáridas, como as encontradas em locais do nordeste brasileiro, as quais também são produtoras de uva, por apresentarem poucos recursos forrageiros devido à fatores climáticos, como a falta de chuva, o suprimento alimentar dos rebanhos é afetado, acarretando em uma deficiência nutricional. Em vista disso, o uso do bagaço de uva na sua forma desidratada e ensilada pode garantir um bom suplemento de nutrientes para os animais, já que apresentam em média 14,77 % de proteína bruta e 66 % de carboidratos totais.

Para a incorporação desse subproduto na alimentação do gado leiteiro, é indicada uma proporção de 6 a 10% da dieta, e para o gado de corte esta proporção pode ser maior, o que se torna um atrativo financeiro para as vinícolas uma vez que podem transformar esse subproduto em um bem econômico, ao invés de despender gastos para trata-lo. Porém, estudos vêm evidenciando que quando fornecido esse alimento a vacas em períodos de lactação, com a incorporação acima de 10% da silagem de bagaço de uva na alimentação de vacas leiteiras, pode haver alteração nas características do leite, resultando em aroma e sabor desagradáveis em produtos lácteos pela transferência de antioxidantes polifenólicos presentes no bagaço (GALLON et al, 2013).

Além do uso para animais de grande porte já citados acima, há também a possibilidade do uso do bagaço como ingrediente alternativo no arração de coelhos em crescimento. Neste estudo ficou demonstrado que a adição do bagaço misturado ao feno aumentou o ganho de peso e o consumo de ração, possivelmente pelo seu efeito palatilizante e aromatizante (KLINGER et al, 2013).

A compostagem dos resíduos da produção do vinho confere características adequadas para seu uso como condicionador de solo devido à presença de micro e macronutrientes. Além disso, a lama de tratamento de vinho mostra-se um adsorvente eficaz para poluentes potencialmente tóxicos (ARANITOYANNIS; LADAS; MAVROMATIS, 2006).

2.4 Cultivares

2.4.1 Cabernet Sauvignon

É uma cultivar clássica, apresenta cachos de comprimento e largura medianos, tamanho tendente a pequeno, cilíndrico-cônico, mais longo que largo, pouco alado, com ocorrência de dois a três cachos secundários pouco desenvolvidos. (ZOCCHÉ, 2009)

Nas regiões úmidas onde é cultivada, exigem um número e uma intensidade de tratamentos preventivos de doenças e pragas que elevam os custos de produção. Embora seja uma uva de amadurecimento tardio e produção pouco volumosa, oferece um mosto doce e agradável, resultando após a vinificação, um vinho tinto escuro, encorpado, com um persistente odor agradável. O processo de envelhecimento é lento, portanto, exigindo um longo tempo de guarda. Quando jovem o vinho mostra-se um pouco adstringente e taninoso (ZOCCHÉ, 2009).

2.4.2 Tannat

Segundo RIZZON e MIELE (2004), a cultivar Tannat é originária do Sudoeste da França, sendo responsável pelas características dos vinhos tintos de Madiran na França, e do Uruguai, que se tornaram emblemáticos para essas regiões. Foi introduzida no Rio Grande do Sul, em 1971, pela Estação Experimental de Caxias do Sul. Ela apresenta elevado vigor e brotação tardia, o que lhe garante proteção dos efeitos prejudiciais das geadas primaveris. No entanto, é sensível a doenças, como o míldio e ao oídio. O vinho Tannat apresenta elevada intensidade de cor e concentração de taninos, por isso necessita de mais de seis meses de amadurecimento em barrica de carvalho para adquirir equilíbrio e maciez. O destino dessa produção é para a elaboração de vinho tinto, utilizado principalmente para corte.

2.5 Principais doenças na videira, medidas de controle e fertilização.

A videira quando cultivada em condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de patógenos durante o período vegetativo, está sujeita a uma série de doenças, que podem ocorrer em todas as partes da planta, como raízes, troncos, ramos, folhas, brotos e cachos. Algumas dessas doenças, de natureza fúngica ou virótica, provocam grandes perdas e, frequentemente, tornam-se fatores limitantes ao cultivo, se medidas de controle adequadas não forem adotadas. Dentre as doenças, as principais são as fúngicas que ocorrem principalmente em uvas finas. Dentre elas destacam-se o míldio (*Plasmopara viticola*), oídio (*Uncinula necator*), podridões de cachos (*Glomerella cingulata*, *Botrytis cinérea*), antracnose (*Elsinoe ampelina*) e ferrugem (*Phakopsora euvitis*). Além das doenças fúngicas, as viroses também podem causar sérios prejuízos aos viticultores (NAVES et al., 2005).

A pulverização com fungicidas de contato é o método de controle adotado com maior frequência pelos produtores para a prevenção e tratamento destas doenças (SÔNEGO & GARRIDO, 2005), que requerem diversas aplicações durante o ciclo de crescimento e produção da videira (MADDEN et al., 2000). Os fungicidas sistêmicos e mesostêmicos, por apresentarem sítios de ação mais específicos, podem induzir o aparecimento de raças resistentes na população dos patógenos. Dessa forma, produtos que possuam ação sistêmica e pertençam ao mesmo grupo químico, não devem ser utilizados em mais de duas ou três aplicações por ciclo vegetativo. (NAVES et al., 2005)

Na safra de 2018, correspondente as amostras utilizadas neste trabalho, foram realizadas aproximadamente 52 aplicações em ambas as cultivares com concentrações diversas, utilizando 16 fungicidas diferentes. Também foram aplicados fertilizantes, aproximadamente 70 vezes, sendo 23 diferentes, para desenvolvimento da planta e fruto.

Tendo em vista a diversidade de defensivos e fertilizantes aplicados em toda a etapa de desenvolvimento da planta até a colheita do fruto, é possível que uma parte desta aplicação seja absorvida e/ou retida pela planta e fruto. Sendo assim a caracterização quanto aos metais presentes nestas amostras é de extrema importância, visto que pode haver metais potencialmente tóxicos que prejudiquem o desenvolvimento da planta e causem doenças ao organismo humano, o que está

relacionado às inúmeras aplicabilidades destas matrizes nos mais diversos setores industriais.

Para a determinação destes analitos diversas técnicas estão disponíveis, entre elas se destacam as de espectrometria atômica.

2.6 Técnicas analíticas para determinação de metais

De acordo com a literatura, diversas técnicas analíticas instrumentais vêm sendo utilizadas para a determinação de metais. A escolha da técnica mais adequada de análise deve levar em consideração o objetivo do trabalho, a natureza das amostras a serem analisadas, os analitos, a quantidade de amostra disponível, exatidão requerida, bem como os recursos disponíveis (KRUG, 2010)

Dentre as técnicas analíticas citadas na literatura que apresentam sensibilidade, detectabilidade e precisão adequada para a determinação de metais em diferentes tipos de matrizes, destacam-se as técnicas de espectrometria atômica, como absorção atômica em chama (F AAS), em forno de grafite (GF AAS) ou com plasma como a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (FIGUERÊDO RÊGO et al., 2012; GARCÍA-RICO et al., 2007; KREJČOVÁ et al., 2012; MINDAK et al., 2008; PEREIRA & ARRUDA, 2008; SORIANO et al., 2007; WELZ & SPERLING, 1999)

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES), além das características já apresentadas pelas técnicas que usam plasma, se diferencia pelo uso de nitrogênio retirado da atmosfera, o que a torna extremamente competitiva frente às outras técnicas semelhantes (AMAIIS et al., 2013; LI et al., 2013).

A sensibilidade e o LOD são muito importantes quando se está trabalhando com concentrações muito pequenas de elementos e as técnicas que utilizam plasma citadas acima se diferenciam frente a esses dois parâmetros, sendo a técnica de ICP-MS a que apresenta maior sensibilidade (PERKINELMER, 2000).

2.6.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas

O plasma induzido por micro-ondas (MIP) se destaca devido seu baixo consumo de energia e gás, facilidade de operação, aliado a uma boa sensibilidade para determinação de vários elementos (JANKOWSKI, RESZKE, 2010; MATUSIEWICZ, 2004).

Um sistema típico de MIP OES consiste nos seguintes componentes principais: um sistema de introdução de amostras, uma fonte de excitação (gerador de microondas), um sistema de alimentação de gás de plasma, um sistema óptico e um instrumento para controlar o equipamento, armazenar e processar os resultados. (JANKOWSKI, RESZKE, 2010). A Figura 1 apresenta o esquema instrumental de um MIP OES.

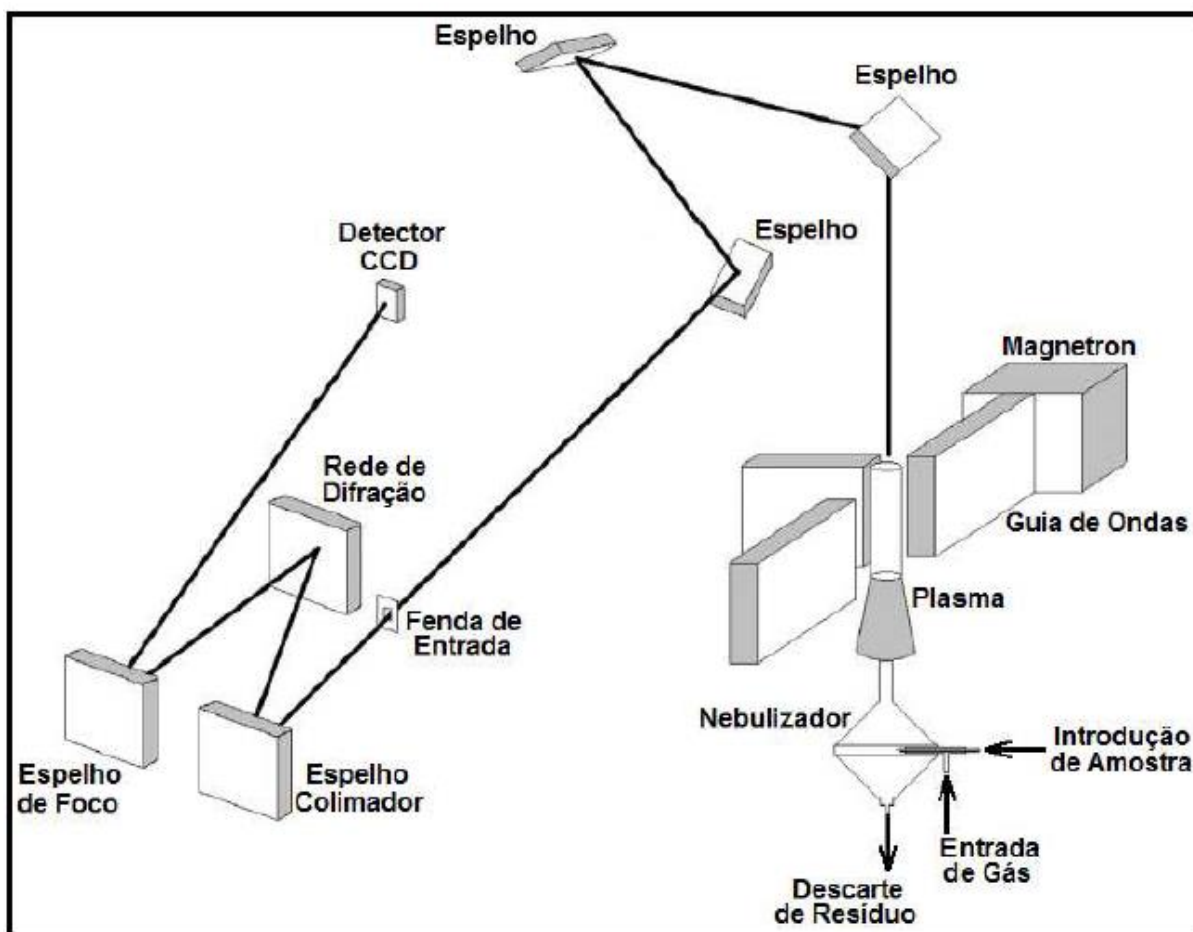


Figura 1: Esquema de instrumentação de um MIP OES Conferir a numeração.

Fonte: ORESTE, 2017

Após o preparo da solução analítica padrão (curva analítica) e da solução da amostra, a qual provavelmente passou por um pré-tratamento, ocorrem suas introduções no equipamento através de seu sistema de aspiração promovido por uma bomba peristáltica, onde a solução passa por um sistema de nebulização sob alta pressão que as convertem em pequenas gotas de diversos tamanhos, formando um aerossol. Esse aerossol é projetado para uma câmara ciclônica, onde as gotas maiores são descartadas pela ação da gravidade e somente as micro gotas seguem para o destino final, que é a tocha do plasma (JANKOSWKI., RESZKE, 2010). Quando as micro gotas atingem o plasma ocorre primeiramente a etapa de dessolvatação, em que o solvente evapora para produzir um aerossol molecular de partículas finamente divididas, que é então volatilizado para formar moléculas gasosas. A dissociação da maior parte dessas moléculas produz um gás atômico, os quais são excitados resultando em espectros de emissão atômica. Essa radiação emitida pela tocha passa por uma série de componentes ópticos, sendo os comprimentos de onda selecionados passam por um monocromador e são enviados para um detector CCD (dispositivo de carga acoplada, do inglês *charge-coupled device*) que tem a função de detectar e multiplicar os sinais caso tenham baixa intensidade. Por fim, esses dados são registrados e armazenados em um dispositivo eletrônico (HOLLER et al, 2009; JANKOSWKI & RESZKE, 2010).

Está técnica se torna atrativa, pela possibilidade de utilização de diferentes gases, Ar, He, N₂, ou mistura deles, Ar/He e N₂/O₂, para gerar o plasma. No MIP OES que utiliza a combinação N₂/O₂, o plasma é sustentado por nitrogênio à pressão atmosférica, sendo a amostra introduzida em forma de aerossol a partir de um nebulizador pneumático convencional. O nitrogênio que é utilizado, é fornecido por um gerador de N₂ a partir do ar atmosférico, fazendo com que o custo de operação seja o mais baixo, em comparação com qualquer outra técnica de espectrometria atômica. É importante salientar também que o desempenho da respectiva técnica foi comparado com o da análise tradicional de ICP-OES e apresentou resultados correspondentes em termos de LOD, LOQ (JANKOWSKI & RESZKE, 2010; LI et al., 2013).

No entanto, cabe salientar que a respectiva técnica de análise, assim como as demais técnicas instrumentais, também está sujeita a inferências espectrais ou não espectrais.

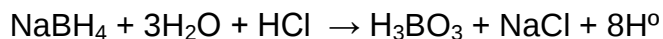
As interferências espectrais, as quais são mais comuns, como as interferências químicas, de ionização e os efeitos de matriz, de acordo com a literatura podem ser minimizadas a partir da diluição da amostra, através do emprego da padronização interna, utilização do método de adição de analito ou separação do analito da matriz da amostra (HOLLER et al., 2009; ZHANG & WAGATSUMA, 2002).

Uma forma de contornar essas interferências é a partir da geração química de vapor (CVG), a qual se caracteriza por transformar a espécie de interesse em um composto volátil que é posteriormente transportado para o instrumento de medição (MACHADO, 2017; TAKASE et al., 2002; WELNA et al., 2017; WELZ & SPERLING, 1999).

Das técnicas de CVG, a geração de hidretos destaca-se dentre as demais, pois baseia-se na formação de compostos voláteis a partir de uma reação química, sendo o analito em solução, separado da matriz de forma seletiva, e transportado ao atomizador (TAKASE et al., 2002).

Dentre os agentes redutores utilizados para converter o elemento a seu respectivo hidreto, o borohidreto de sódio (NaBH_4) apresenta-se como o reagente mais utilizado. A solução de NaBH_4 é preparada em meio alcalino, sendo este meio responsável por sua estabilização, o que possibilita uma melhor reprodutibilidade, associado a uma reação mais homogênea e com cinética mais definida. Em relação ao ácido, o HCl é o mais utilizado, sendo a concentração dependente do elemento em estudo. Assim, estas condições devem ser otimizadas para cada analito, o que irá garantir a eficiência da respectiva técnica (TAKASE et al., 2002; VIEIRA et al., 2009).

Esta técnica possibilita a formação de hidretos voláteis de elementos como As, Bi, Cd, Ge, Hg, In, P, Pb, Sb, Se, Sn, Te e Ti. A reação química abaixo, equação 1, representa o mecanismo para a geração de hidretos voláteis, onde “E” representa o analito de interesse, o qual é transformado na forma de hidreto volátil, podendo ser conduzido até o atomizador; “m” é o estado de oxidação do analito e “n” é o número de coordenação do hidreto formado (MACHADO, 2017; TAKASE et al., 2002).



Equação 1



A determinação em baixas concentrações, dos elementos formadores de hidretos, é possível a partir do acoplamento da geração de hidretos (HG) a técnicas como a espectrometria de absorção atômica com chama (HG-FAAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (HG-ICP OES) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (HG-GF AAS) (MACHADO, 2017; TAKASE et al., 2002).

É possível acoplar também a geração de hidretos a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (HG-MIP OES), através do sistema de introdução de amostra *multimode* (MSIS), o qual permite a introdução da amostra por meio da geração de vapor e nebulização convencional, simultaneamente.

A Figura 2 representa o sistema de introdução MSIS, permitindo a introdução da amostra por nebulização convencional e por geração de hidretos (Agilent Technologies, 2016).

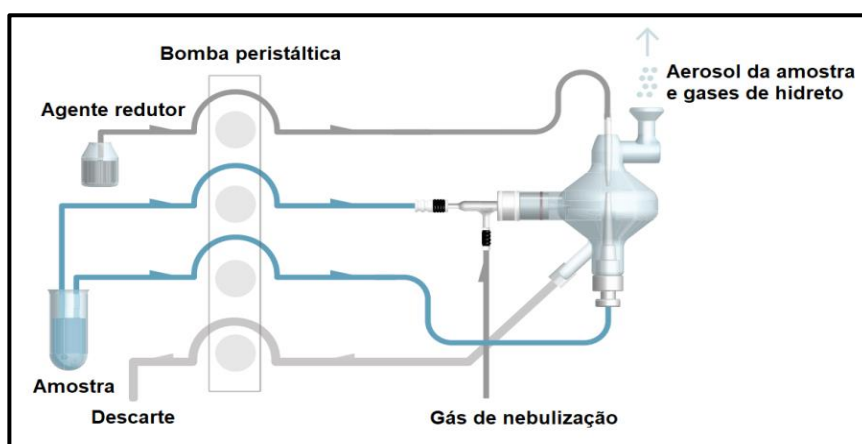


Figura 2. Esquema do sistema *multimode* (MSIS) para introdução de amostra.
Fonte: Agilent Technologies, 2016.

Neste trabalho foi usado o sistema *multimode* de introdução de amostra, para todos os elementos em estudo, visto que Bi, Cd e Pb podem formar hidretos

voláteis. Desta forma todos os elementos, formadores e não formadores de hidretos podem ser determinados simultaneamente (WILTSCHE et al, 2008).

2.7 Preparo de amostras

De forma geral, uma análise química normalmente exige um tratamento prévio da amostra visando sua preparação para a forma mais apropriada de inserção no instrumento de medida. No entanto, esse tratamento pode variar, desde um simples polimento da superfície da amostra, até sua completa transformação da forma sólida para a forma de uma solução, sendo esta compatível com o método de determinação. Deste modo, muitos fatores precisam ser avaliados quando se vai decompor uma amostra, entre eles, a natureza dessa matriz, bem como os analitos em estudo e a concentração dos mesmos na amostra, além do método a ser utilizado, associados à precisão e exatidão requeridas (KRUG, 2010).

2.7.1 Decomposição ácida por via úmida

O preparo de amostras pode ser realizado através de sistemas abertos e fechados de decomposição. A decomposição de materiais orgânicos por via úmida normalmente requer o aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, da mistura de ácidos com diferentes propriedades, ou do uso de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio (KRUG, 2008; OLIVEIRA, 2003). Desta forma, é possível converter a maioria dos elementos em uma forma apropriada para sua determinação. Esse método é particularmente útil para a determinação de baixas concentrações de elementos em vários tipos de amostras, sendo os analitos de interesse convertidos em cátions inorgânicos simples e não voláteis, que permanecem no meio ácido. Porém, alguns elementos podem sofrer volatilização e serem perdidos, como halogênios, antimônio, arsênio, boro, mercúrio e selênio, dependendo do procedimento utilizado, além de estarem passível de contaminação pelo ambiente (KRUG, 2008; KRUG & ROCHA, 2016).

Dentre os equipamentos utilizados na decomposição por via úmida em sistema aberto pode-se citar o forno mufla, bico de Bunsen, chapa de aquecimento e

bloco digestor, porém existe a possibilidade de perda do analito por volatilização, bem como de contaminação (KRUG, 2008; KRUG & ROCHA, 2016).

Com o intuito de resolver tais problemas outros sistemas vêm sendo utilizados, como o sistema de digestão ácida com uso do dedo frio proposto por Oreste e colaboradores (2013) e decomposição ácida em sistema fechado, como o frasco de teflon, que apresenta o inconveniente de não poder se trabalhar com massas elevadas de matéria orgânica, devido apresentar risco de explosão (KRUG, 2008; OLIVEIRA, 2003).

2.7.2 Digestão ácida com sistema de dedo frio

Com o intuito de melhorar as condições relacionadas à etapa de preparo das amostras, o que garante maior exatidão das análises e tendo como base o trabalho realizado por Ferreira e colaboradores (2013), os quais idealizaram o sistema de refluxo, o grupo de pesquisa do Laboratório de Metrologia Química (LABMEQUI) da UFPel desenvolveu um novo desenho do sistema de refluxo. Esse novo sistema eliminou alguns inconvenientes como aquecimento da água do dedo frio, bem como proporcionou uma melhora com relação ao risco de explosão.

Esse novo sistema também foi pensado para que as análises de rotina fossem atendidas de forma satisfatória, e que também se pudesse decompor várias matrizes diferentes. O sistema modificado da digestão ácida com refluxo proposto por Oreste e colaboradores (2013) avaliou a eficiência deste novo sistema comparado com o convencional em sistema aberto. O sistema proposto se mostrou sem risco de perda do analito e do ácido por volatilização, isso devido o desenvolvimento de um conector de politetrafluoretileno (PTFE), com uma abertura lateral, representado pelo número três na Figura 3, que alivia a pressão interna que é produzida pela formação de gases ácidos e CO_2 . Isso possibilitou o emprego de temperaturas acima dos pontos de ebulição dos ácidos.

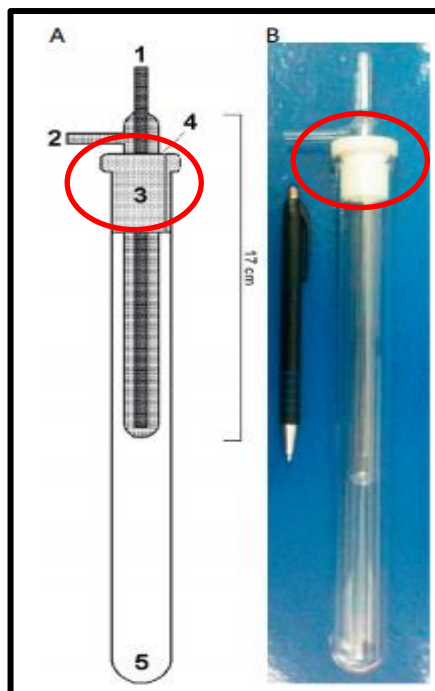


Figura 3: A) Sistema de dedo frio com resfriamento, acoplado aos tubos digestores de vidro. B) Imagem real do sistema de dedo frio

Fonte: ORESTE et al., 2013.

Todo o sistema de refluxo consiste em um tubo de decomposição alongado que é encaixado no bloco digestor, onde por sua vez outro tubo (dedo frio) é acoplado a este, no seu interior, o qual é fixado pela tampa de PTFE. Além disso, a temperatura de condensação é controlada pela passagem contínua de água, a qual é realizada por um equipamento que mantém a água termostaticada à 15 °C, garantindo a condensação dos vapores gerados e o retorno destes ao meio reacional, impedindo perdas de reagentes e analitos por volatilização. A eficiência do sistema foi comprovada no trabalho desenvolvido por Pereira e colaboradores (2018).

A Figura 4 representa o sistema de refluxo durante o preparo das amostras por decomposição ácida, bem como o banho termostaticado utilizado para controle da temperatura da água de circulação.

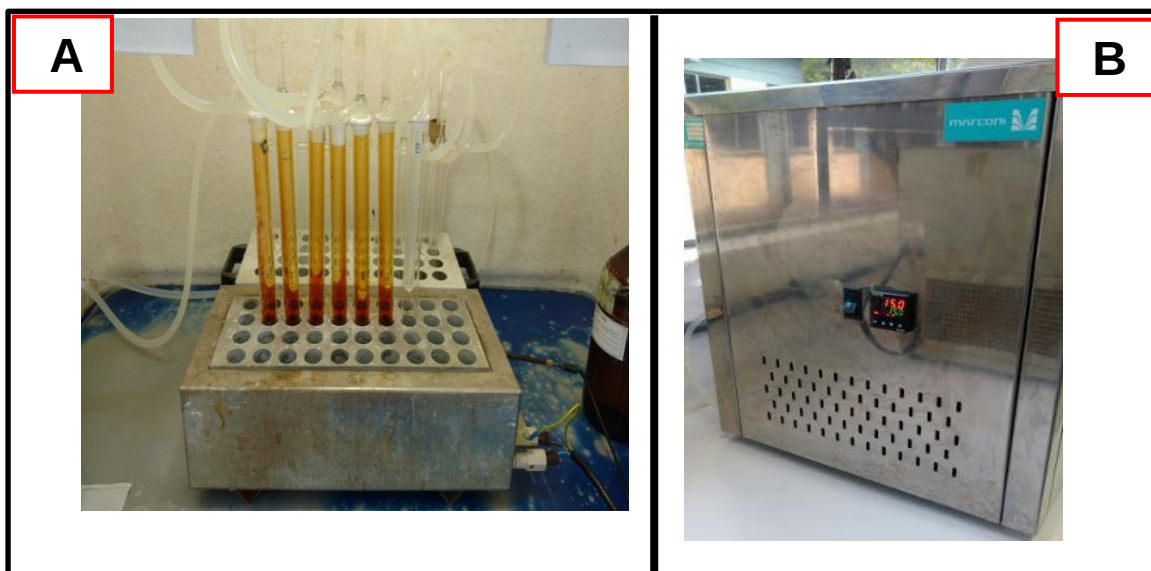


Figura 4: Sistema de digestão ácida com dedo frio (A) com sistema de recirculação de água termostatzada (B).

2.7.3 Frasco de Teflon

As decomposições por via úmida em sistema fechado, como o uso em frasco de politetrafluoretileno, também conhecido comercialmente como Teflon, ao contrário dos sistemas abertos apresentam diversas vantagens, como redução da quantidade de reagentes, diminuindo-se os valores dos brancos; as reações podem ser mais curtas com temperaturas acima do ponto de ebulição do reagente; não há perdas por volatilização dos elementos e não há riscos de contaminação por fontes externas. Porém, devido o sistema trabalhar a pressões elevadas, em torno de 20 bar, à risco de explosão o que limita a massa de amostra a ser utilizada (KRUG, 2008; OLIVEIRA, 2003).

Ainda segundo Krug, temperaturas ótimas para oxidação dos constituintes da matriz em amostras biológicas estão na faixa de 170 e 180°C e o uso de 2,0 mL de HNO_3 65-69% são necessários para mineralizar uma quantidade de amostra biológica que corresponda a 100 mg de carbono puro por um período de 3 horas.

Nos últimos anos várias pesquisas vêm sendo realizadas para se determinar a concentração de minerais em diferentes partes da baga, utilizando-se diferentes técnicas de preparo de amostras.

Yang e colaboradores (2010) determinaram a concentração de dezoito elementos em amostras de uvas, na casca, polpa e semente, em três variedades distintas. O preparo das amostras se deu pesando 0,5 g de amostra diretamente em frascos de PTFE ,adicionando-se em seguida 5 mL de HNO_3 65% e 0,25 mL de H_2SO_4 40%. Os frascos de PTFE foram colocados em placas de aquecimento elétrico para decomposição por 90 minutos com agitação manual para homogeneização em intervalos de tempo. Após a dissolução das amostras, foi adicionado 1 mL de H_2O_2 30% v/v para clareamento da solução e agitados por 45 minutos. Posteriormente, a solução resultante foi transferida para vials de 50 mL. Essas soluções foram analisadas por ICP-MS.

Em outro trabalho citado na literatura, inicialmente as amostras (bagaço de uva) foram secas em estufa com posterior trituração e passagem por peneira granulométrica. As amostras foram digeridas através de uma mistura nitroperclórica, sendo os elementos Ca, Fe, Mg, Zn, Mg determinado por espectrometria de absorção atômica, e Na e K determinados pela técnica de fotometria de chama (SOUSA et al, 2014).

Fagundes e colaboradores (2017) determinaram as concentrações de Ca, K, Mg na polpa e na casca de uva vinífera Cabernet Sauvignon, e para isso as amostras foram decompostas com H_2SO_4 (98%) e H_2O_2 30% com posterior determinação por espectrometria de absorção atômica. Para as determinações de Ca e Mg empregou-se 0,1% La na forma de La_2O_3 .

Como pode ser observado nos trabalhos citados acima, as amostras de uva foram decompostas a partir do uso de misturas de reagentes, ácidos oxidantes fortes, os quais podem colocar em risco o analista em operação. É importante salientar que a solução de ácido perclórico concentrada libera vapores muito corrosivos, tanto para pele e olhos, devendo ser manuseada com extremo cuidado, é um produto instável que pode sofrer decomposição de forma explosiva, especialmente na presença de altas temperaturas. Já o uso do H_2SO_4 como meio oxidante limita o método de análise, já que forma alguns sulfatos insolúveis como CaSO_4 , BaSO_4 , SrSO_4 e PbSO_4 .

Desta forma, o desenvolvimento de métodos analíticos voltados principalmente à etapa de preparo das amostras ainda é considerado um grande desafio.

2.8 Micro e macronutrientes em videiras e fruto

O crescimento das plantas, geração e qualidade de seus frutos, como a uva, são afetados pela ação antrópica como também por variações edafoclimáticas, o que acaba resultando em um produto final com diferentes padrões físico-químicos nas diferentes safras (BORGUEZAN et al, 2011; ALI & MALTESE, 2010), o que preocupa o produtor, assim como o enólogo, já que há um impacto direto nos produtos gerados a partir do processamento das uvas (MPELASOKA, 2003).

Dentre os micronutrientes essenciais para a videira, como Fe, Zn, Mn, Cu, Co (LIKAR et al, 2015; MAGNA, 2013), o Mn tem relação direta com o metabolismo do nitrogênio e com a síntese da clorofila (LIKAR et al, 2015; BROADLEY et al, 2012). Já o Ca, K, Mg considerados macronutrientes apresentam um importante papel no crescimento e na fisiologia da planta (Marschner, 2012). Os elementos Ba (Jiménez-Ballesta, 2010) e Pb (Bravo et al, 2017), embora presentes no solo e plantas não são considerados micronutrientes essenciais, sendo possivelmente tóxicos em baixas concentrações.

Segundo Bravo e colaboradores (2017), que avaliaram a influência do pH do solo na bioacumulação de nutrientes nas folhas da videira, estudos evidenciaram que os elementos Ca, Zn e Cu tem a sua maior absorção em pH ácido e os elementos K, Pb, Mn, Fe e Ba em pH alcalino, entretanto todos tem uma parcela de absorção pela planta em pH entre 6 a 9.

Assim como os macro e micronutrientes são importantes para as plantas (videiras), eles também desenvolvem funções essenciais para o metabolismo humano.

2.9 Micro e macronutrientes no metabolismo humano

O alimento fornece energia e matéria para as incontáveis substâncias essenciais para o crescimento e a sobrevivência de todo ser humano. Os processos

de digestão, absorção e transporte de nutrientes convertem uma infinidade de gêneros alimentícios complexos em nutrientes individuais prontos para serem utilizados no metabolismo. Os macronutrientes (proteínas, gorduras e carboidratos) contribuem para o conjunto de energia total, mas na realidade a energia que produzem é particularmente voltada para o trabalho dos músculos e órgãos do corpo. A liberação de energia para a síntese, o movimento e outras funções requer que os micronutrientes (vitaminas e minerais) funcionem como coenzimas, cocatalisadores e tampões na área aquosa do metabolismo. O modo como os nutrientes tornam-se partes integrantes do corpo e contribuem para funcionamento corporal adequado depende fortemente dos processos fisiológicos e bioquímicos que governam as suas ações (MAHAN et al, 2012).

Os minerais representam de 4 a 5% do peso corporal, ou 2,8 a 3,5 kg em mulheres e homens adultos, respectivamente. Aproximadamente 50% desse peso é cálcio e outros 25% são fósforo, existindo como fosfatos. Quase 99% do cálcio e 70% dos fosfatos são encontrados nos ossos e dentes. Os outros cinco macrominerais estabelecidos (magnésio, sódio, potássio, cloro e enxofre) e os onze microminerais apurados (ferro, zinco, iodo, selênio, manganês, flúor, molibdênio, cobre, cromo, cobalto e boro) constituem os 25% restantes. Os elementos ultra-traço (μg), tais como arsênico, alumínio, estanho, níquel, vanádio e silício, fornecem uma quantidade insignificante de peso. Os minerais também existem como componentes de compostos orgânicos, tais como fosfoproteínas, fosfolipídios, metaloenzimas e outras metaloproteínas, como a hemoglobina (MAHAN et al, 2012).

Entre os constituintes inorgânicos encontrados nos alimentos, os macroelementos são os necessários em maior quantidade, com uma dose diária mínima de 100 mg. Pode-se citar como exemplo o Ca, P, Mg, K, e Na, porém só serão objeto de estudo desta dissertação os macroelementos Ca, K e Mg. Em quantidades menores necessárias ($< 15 \text{ mg/dia}$), mas também com grande relevância para a manutenção da saúde estão os microelementos como o Cu, Zn, Fe, Mn, Cr, Co, Cr (MAHAN et al, 2012). Elementos que não tem função nutricional como, Ba, Pb e Bi também são encontrados em alimentos, devido a fatores antropológicos.

Conforme apresentado, os elementos podem ou não apresentar funcionalidade ao organismo humano, assim a determinação quantitativa dos

mesmos nos subprodutos gerados a partir do processamento das uvas é de extrema importância, o que vem a contribuir de forma significativa no destino correto dos resíduos gerados.

3. Sistema gastrointestinal

Pesquisas na área da química analítica tem mostrado interesse em investigar a presença de macro e micro nutrientes em diversas matrizes alimentares, porém o conhecimento da concentração total de nutrientes presentes em um alimento não possibilita discutir se esse teor suprirá as necessidades dos indivíduos que o estão ingerindo, uma vez que não se sabe o quanto de fato será liberado do alimento e absorvido pelo organismo em suas funções metabólicas. (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; INTAWONGSE et al., 2006; COSTA et al., 2015). Além disso, alguns fatores como espécie ou forma química contida no alimento, necessidade nutricional do indivíduo, fatores genéticos ou também a composição da matriz, podem favorecer ou não a liberação dos nutrientes (INTAWONGSE et al., 2006).

A partir deste ponto surgem dois termos importantes a serem explicados, a bioacessibilidade e a biodisponibilidade, os quais simulam o sistema gastrointestinal.

O termo bioacessibilidade pode ser definido como uma fração de um nutriente que é liberado de sua matriz no trato intestinal, tornando-se disponível para ser absorvido e passível de ser levado para a corrente sanguínea (BENITO et al., 1998; INTAWONGSE et al., 2006; MINEKUS et al., 2014).

Já o termo biodisponibilidade se caracteriza pela absorção e transporte dos nutrientes para os tecidos corporais relevantes (ETCHEVERRY et al, 2012; FAIRWEATHER-TAIT, 1992). As células do tipo Caco-2, que são células de adenocarcinoma do cólon humano, tem sido bastante utilizadas para esta finalidade, pois permitem o estudo da competição de nutrientes e componentes alimentares no local da absorção (ETCHEVERRY et al, 2012.; SILVA et al., 2015.; MINEKUS et al., 2014).

Tanto a fração bioacessível como a biodisponível podem ser determinadas por testes *in vivo* e *in vitro*, nos quais ambos os métodos apresentam suas vantagens e desvantagens. Nos testes *in vivo* são usados animais, como ratos,

coelhos, porcos, macacos ou seres humanos, podendo ser determinados de duas maneiras: através do nível de nutrientes no sangue ou balanço de massa. Esses testes possuem limitações, pois necessita de coleta de material biológico e dessa forma ser invasivo. Além disso, como os produtos alimentícios são mastigados e digeridos de diferentes maneiras, a rigidez e texturas diferentes são características que influenciarão como a digestão ocorrerá. Sendo assim existem vários fatores fisiológicos e físicos que vão influenciar o processo como um todo e será único em cada indivíduo (DICKINSON, 2014.; MINEKUS et al., 2014.; MOREDA-PIÑEIRO, 2011.; WANG et al, 2016).

Já nos testes *in vitro*, compostos químicos e enzimáticos são aplicados diretamente sobre a amostra a fim de simular as condições fisiológicas do sistema gastrointestinal, levando em consideração a presença de enzimas digestivas, pH, tempo de digestão, concentração de sais, entre outros fatores. Por esta razão este tipo de teste vem sendo utilizado com maior frequência, devido não esbarrar em questões éticas, serem mais rápidos, fáceis e por ter um custo menor, ao contrário dos testes *in vivo* (DEY, 2015.; MINEKUS et al., 2014.; MOREDA-PIÑEIRO, 2011.; OOMEN, 2002).

Todo o processo do sistema gastrointestinal se inicia na boca e termina no intestino. Na boca inicia-se o processo através da trituração e esmagamento do alimento pelos dentes, onde o bolo alimentar é simultaneamente umedecido e lubrificado pela saliva, que é rica em mucina, a qual é expelida por três pares de glândulas salivares (parótidas, submaxilar e sublingual). Essa secreção contém a enzima α -amilase que inicia a quebra das moléculas de amido a um pH de 6-8, sendo inativada quando alcança a segunda etapa do processo (o estômago) devido seu conteúdo ácido (MAHAN et al., 2012; MINEKUS et al., 2014; VERSANTVOORT et al., 2005).

No estômago os alimentos são propulsionados para frente por contrações e misturados com as bebidas ingeridas juntamente com secreções gástricas, as quais são excretadas diariamente em torno de 2 a 2,5 L. Essas secreções contém ácido clorídrico, uma protease, lipase gástrica, muco, fator intrínseco (glicoproteínas que facilitam a absorção de vitamina B₁₂ no íleo) que auxiliam na decomposição alimentar e que também são importantes para aumentar a disponibilidade e absorção intestinal de cálcio, ferro e zinco (MAHAN et al., 2012.; SOYBEL, 2005). A

protease é a enzima pepsina, a qual é secretada em sua forma inativa, sendo então ativada apenas no estômago, a uma pH entre 1 a 4, quando em contato com ácido clorídrico e serve principalmente para modificar a forma e o tamanho de algumas proteínas presentes na refeição. No processo final de digestão gástrica a maioria dos alimentos é transformada em um quimo (bolo alimentar) semilíquido com aproximadamente 50 % de água que é liberado para o intestino delgado. Essa liberação do quimo se dá em quantidades pequenas, na ordem de mililitros, e pode durar de uma a duas horas para refeições líquidas e de duas a três horas para sólidas. Já em uma refeição mista vai depender das características do alimento e do volume total (MAHAN et al, 2012; MINEKUS et al.,2014; VERSANTVOORT et al., 2005).

Na última etapa, que corresponde ao intestino delgado, ocorre a maior parte da digestão e absorção de nutrientes. O intestino delgado é dividido em duodeno, jejuno e íleo, os quais tem 0,5 metros, de 2 a 3 metros e de 3 a 4 metros, respectivamente. A maior parte dos processos digestivos se dá no duodeno e na parte superior do jejuno, já a absorção da maioria dos nutrientes praticamente se completa quando chega ao meio do jejuno, como demonstrado pela Figura 5. O quimo, que se encontra em pH ácido, ao entrar no duodeno, é misturado com o suco duodenal e secreções do pâncreas e do sistema biliar, os quais contém principalmente bicarbonato que neutralizam o pH do meio favorecendo as enzimas do pâncreas (pancreatinina) e intestino delgado (bile) para atuarem de forma satisfatória (MAHAN et al, 2012; MINEKUS et al.,2014; VERSANTVOORT et al., 2005).

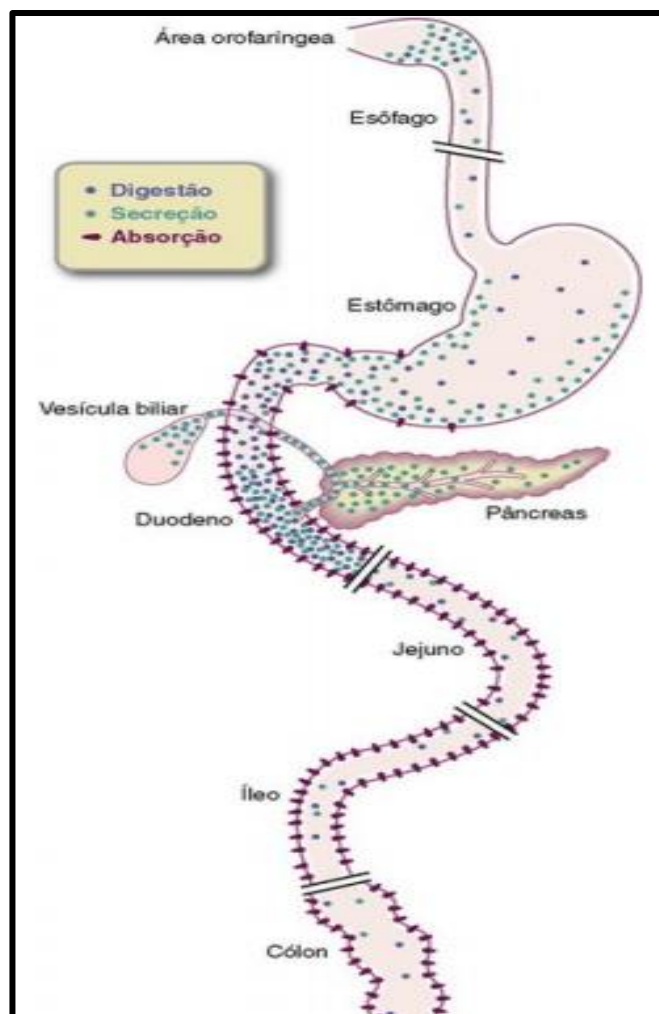


Figura 5: Locais de digestão, secreção e absorção.

Fonte: MAHAN et al, 2012

4. Objetivos

4.1 Objetivos gerais

Determinar e avaliar a concentração total e a fração bioacessível de metais provenientes da casca de uva das espécies *Vitis Viníferas* Tannat e Cabernet Sauvignon, pela técnica de MIP OES.

4.2 Objetivos específicos

- Aplicar o método de decomposição ácida para determinação da concentração total de Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb, Zn em amostras de casca de uva das cultivares Cabernet Sauvignon e Tannat por MIP OES;
- Aplicar um método comparativo (Frasco de teflon);
- Desenvolver o método de preparo de amostra sob refluxo para a casca de uva, utilizando o sistema *multimode* de introdução de amostra com geração de hidretos;
- Validar os métodos para determinação da concentração total e da bioacessibilidade;
- Aplicar o método de digestão *in vitro* para determinação da bioacessibilidade de Ba, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn em amostras de casca de uva por MIP OES;
- Relacionar as concentrações de metais encontradas no teor total e no teor da fração bioacessível, bem como, com os valores de limites diários estabelecidos ou recomendados de ingestão para os analitos estudados.

5. Materiais e métodos

5.1 Instrumentação

Para a determinação multielementar das concentrações dos analitos Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb e Zn nas amostras de casca de uva foi utilizado o MIP OES, modelo 4200 (Agilent Technologies), equipado com um detector CCD (do inglês, charge-couple device), monocromador Czerny-Turner com distância focal de 600 mm, com faixa de comprimento de onda de 178-780 nm, equipado com nebulizador One Neb e câmara de nebulização multimodal. O nitrogênio gasoso (N_2) utilizado para operação do plasma foi obtido através de um gerador de nitrogênio, modelo 4107 (Agilent Technologies), o qual produz N_2 com pureza superior a 99,5 %.

Todas as medidas foram realizadas em triplicata com um tempo de leitura de três segundos, para cada elemento, com velocidade de bomba peristáltica de 15 rpm e tempo de estabilização de 15 s, os quais são recomendados pelo fabricante. Os sinais de fundo foram corrigidos de forma automática através da subtração entre os espectros do branco e das amostras. As condições operacionais do MIP OES estão apresentadas na Tabela 2

Tabela 2. Parâmetros operacionais para determinação dos metais por MIP OES

Analito	Comprimento de onda(nm)	Posição de visualização do plasma(mm)	Vazão de nebulização (L min ⁻¹)
Ba	455,403	-10	1,00
Bi	306,772	0	0,65
Ca	393,366	10	0,6
Cd	228,802	10	0,55
Co	340,512	0	0,65
Cr	425,433	-10	0,95
Cu	324,754	0	0,6
Fe	371,993	0	0,75
K	766,491	10	1,00
Mg	285,213	10	0,7
Mn	403,076	0	0,85
Pb	405,781	-10	0,7
Zn	213,857	0	0,55

As amostras foram homogeneizadas em um liquidificador com 400 w de potência, (Arno, Brasil). Em seguida, as amostras foram pesadas utilizando uma balança analítica com resolução de 0,1 mg e tara máxima de 210 g (Modelo AR 2140, Ohaus Adventurer, EUA).

Para a etapa de decomposição ácida das amostras foi utilizado um bloco digestor convencional (modelo MA-4025, Marconi, Brasil), onde foi adaptado a cada um dos tubos digestores um sistema de refluxo (Figura 4), com recirculação a temperatura de 15°C, a qual era provida através de um sistema de banho termostatzado, modelo Q214S2 (Quimis, Brasil).

Para a determinação do teor de umidade foi utilizada uma estufa de esterilização e secagem, marca Odontobrás.

Para o estudo da fração bioacessível se utilizou um pHmetro modelo PHS-3B (PHTek, Brasil), um banho Dubnoff com aquecimento e agitação, modelo Q226M2 (Quimis, Brasil) e uma centrífuga Eppendorf, modelo 5804 R (Alemanha).

5.2 Materiais e reagentes

Para o processo de elaboração do vinho foram utilizadas garrafas de vidro, rolhas sintéticas, válvula de Miller, levedura (Zymaflore Xpure, França).

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções empregadas foram preparadas com água destilada e deionizada.

As soluções dos analitos foram preparadas em meio ácido a partir de uma solução estoque contendo 100 mg L⁻¹ para, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Pb e Zn (Sigma-Aldrich, St.Louis - USA), 10.000 mg L⁻¹ para K, Fe e Mg (Merck, Alemanha) e 1000 mg L⁻¹ Bi (Fluka Analytical, Suíça) e Ca (Merck, Alemanha). Para o método de decomposição ácida, foi utilizado o H₂O₂ 30% (Dinâmica, Brasil) e o HNO₃ 65% bidestilado (Neon, Brasil). Para a geração química de vapor, foram utilizadas soluções de NaBH₄ 0,5 % (m/v) estabilizada em meio alcalino com NaOH 0,5 % (m/v).

Os reagentes utilizados para os estudos de bioacessibilidade foram: CaCl₂, NaOH, KCl, NaCl, KH₂PO₄, MgCl₂(H₂O)₆ (Synth, Brasil), NaHCO₃ e HCl (Merck, Alemanha), (NH₄)₂CO₃ (J.T. Baker, EUA), α Amilase da *Aspergillus oryzae* (Sigma 86250, China), Pepsina (Sigma P7000, Suíça), Bile (Sigma B8631, Nova Zelândia) e Pancreatina 3x (Sigma P1625, EUA).

Foi utilizado com meio de suporte para pesagem das amostras papel de tipo ceda, 100% celulose, da marca aLeda.

5.3 Amostras

As uvas das cultivares Tannat e Cabernet Sauvignon, Figura 6, foram adquiridas através da doação da vinícola Guatambu, localiza no município de Dom Pedrito-RS. Foram coletados diversos cachos em locais diferentes do vinhedo, de forma a ter maior representatividade. Ambos os vinhedos se encontram na mesma propriedade localizada no interior do município, a qual tem a seguinte localização geográfica: Tannat (Latitude: -30.98811597843 Sul, -54.492673088443 Oeste) e Cabernet Sauvignon (Latitude: -30.9855753741855 Sul, -54. 4943688125776 Oeste).



Figura 6: Amostras das cultivares Cabernet Sauvignon e Tannat

Fonte: autor

As uvas foram lavadas com água ultrapura, Milli-Q, e posteriormente foi realizado o desengace manual e separação da casca da polpa e semente. Em seguida a polpa foi prensada manualmente a fim de se obter o mosto. As cascas juntamente com o mosto foram adicionadas em frascos de vidro para o processo de fermentação e, sendo que após quatro dias as cascas foram separadas do processo de elaboração do vinho para serem trituradas e armazenadas em frascos de PP e congeladas em freezer doméstico.

5.4 Teor de umidade

O teor de umidade foi realizado nas amostras de casca de uva analisadas, para saber a quantidade de água presente em sua composição. Esse estudo se faz necessário uma vez que a quantidade de água influencia na eficiência dos reagentes adicionados no preparo de amostras.

A determinação do teor de umidade foi realizada em triplicata, de acordo com metodologia adaptada do Instituto Adolfo Lutz (2008). Para isso foi pesado

aproximadamente 5 g das diferentes amostras de casca de uva diretamente em béqueres e posteriormente, levadas para aquecimento em estufa a 105 °C, por 3 horas. Posteriormente, as amostras foram retiradas da estufa e colocadas em um dessecador até atingirem temperatura ambiente para proceder com a pesagem das mesmas. Este processo foi repetido até a estabilização do peso.

A porcentagem de umidade foi então calculada usando a fórmula descrita na equação 2:

$$\% \text{ umidade} = \frac{100 \times N}{P} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde N é o número de gramas de umidade (perda de massa em gramas) e P é o número de gramas da amostra.

5.5 Sólidos totais dissolvidos e acidez

O teor de sólidos dissolvidos totais foi adaptado da metodologia descrita por Adolf Lutz (2008), onde primeiramente foi realizada uma decomposição ácida em bloco digestor com 5 mL de ácido nítrico 65% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% v/v, em triplicata. Para isso foi usada a massa aproximada de 2,5 g das cultivares Tannat e Cabernet Sauvignon. Após, foi retirada uma alíquota de aproximadamente duas gramas, sendo esta pesada em balança analítica, e posteriormente adicionada a um béquer, a qual foi levada a secar em chapa aquecedora para evaporação dos ácidos. Em seguida as amostras foram levadas para estufa a 180 °C por 1 hora e resfriadas em dessecador até temperatura ambiente para serem pesadas. Repetiu-se a passagem até atingir peso constante, utilizando o mesmo cálculo da umidade.

A análise de acidez total foi realizada através de método titulométrico, usando como titulante NaOH 0,1 mol L⁻¹, previamente padronizado com Bftalato de Potássio. O indicador usado foi a Fenolftaleína 1% e o ponto de viragem se deu no primeiro aparecimento da cor rosa, de forma persistente. O volume de titulado usado foi de 0,5 mL. A porcentagem de acidez foi calculada levando-se em consideração a massa do HNO₃.

5.6 Método de preparo das amostras

5.6.1 Decomposição ácida em bloco digestor com sistema de refluxo

Neste procedimento, foram inicialmente pesados 2,5 g de amostra, em triplicata, e embaladas em ceda 100% celulose para que fosse inserido no tubo de digestão. Em seguida foi adicionado pérolas de vidro em cada tubo de digestão e 5 mL de HNO₃ 65%, encaminhado a aquecimento no bloco de digestão submetido a um programa de aquecimento, conforme apresentado na Tabela 3. O sistema de refluxo foi acoplado aos tubos digestores, e foi utilizado uma recirculação interna de água a qual foi mantida constantemente a 15 °C.

Tabela 3. Programa de aquecimento do bloco de digestão com sistema de refluxo.

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	10	80
2	10	150
3	120	200
4	60	150

Na etapa 4 se esperou a temperatura baixar a 150°C para a adição de 1 mL de H₂O₂ 30% v/v.

Ao término da última etapa, as soluções resultantes nos tubos digestores foram transferidas de forma quantitativa para frascos de PP (polipropileno), previamente descontaminados, e estes foram aferidos a 20 mL com água deionizada. Todas as análises foram realizadas em triplicata, para verificar a precisão do método proposto. A exatidão do método foi comprovada a partir de testes de adição e recuperação de analito na presença da matriz da amostra, bem como através da comparação dos resultados com um método comparativo de decomposição ácida em sistema fechado.

5.6.2 Digestão ácida em sistema fechado de alta pressão – Frasco de teflon

Para este estudo foi utilizado um sistema fechado com frascos de PTFE em bloco digestor. Utilizou-se esse procedimento como um método comparativo à decomposição ácida em bloco digestor com sistema de refluxo, a fim de validar o referido método de preparo de amostra.

A análise foi realizada em triplicata, onde se pesou diretamente em todas os frascos, a quantidade aproximada de 321 mg de amostra na presença de 2,5 mL de HNO_3 .

No frasco do branco foi adicionado apenas o meio reacional (2,5 mL de HNO_3). Após os frascos foram fechados e colocados no bloco de digestão por 3 horas a uma temperatura de 140 °C. Finalizado o tempo, se esperou esfriar e em seguida se transferiu a solução para frascos de PP sendo estes avolumados a 20 mL com água deionizada para posterior leitura no MIP OES.

5.7 Fração Bioacessível

O teste de bioacessibilidade *in vitro* empregado foi um método adaptado de Minekus e colaboradores, 2014. O método consiste em três etapas consecutivas, as quais representam o sistema digestivo humano: a primeira etapa simula a boca na qual é adicionada uma solução de amylase, a qual simula a saliva, em meio neutro (pH=7). A segunda etapa simula o estômago, utilizando solução de pepsina em meio ácido (pH=3) e a última etapa simula a digestão intestinal, onde utiliza-se uma solução de pancreatinina e bile, em pH neutro. Para este estudo primeiramente, foram preparadas as soluções de sais que simulam as substâncias ativas do sistema digestivo (saliva, suco gástrico e suco intestinal), representadas na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração dos reagentes utilizados nas soluções do sistema digestivo

Reagentes	Concentração	Reagentes	Concentração
KCl	37,3 g L ⁻¹	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	7,5 mmol L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	34,0 g L ⁻¹	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	2,0 mmol L ⁻¹
NaHCO ₃	84,0 g L ⁻¹	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	9,0 mmol L ⁻¹
NaCl	117,0 g L ⁻¹	NaOH	1 mol L ⁻¹
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	15,25 g L ⁻¹	HCl	6,0 mol L ⁻¹
(NH ₄) ₂ CO ₃	12,0 g L ⁻¹	HCl	1,0 mol L ⁻¹
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	12,0 g L ⁻¹		

Em seguida foram preparadas as soluções utilizadas para simular o sistema digestivo, as quais se deram pela a adição das enzimas e reagentes, conforme a Tabela 5.

Tabela 5. Soluções utilizadas para simular o sistema digestivo

Reagentes	Amylase Volume final: 50 mL	Pepsina Volume final: 100 mL	Pancreatinina + Bile Volume final: 200 mL
Enzima	1,24 g	2,2 g	0,536 g + 5,4 g
KCl	1,5 mL	1,4 mL	2,72 mL
KH ₂ PO ₄	750 µL	36 µL	640 µL
NaHCO ₃	675 µL	2,5 mL	17 mL
NaCl	-----	2,35 mL	3,85 mL
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	100 µL	160 µL	880 µL
(NH ₄) ₂ CO ₃	25 µL	400 µL	-----
HCl 1M	60 µL	-----	-----
HCl 6M	-----	260 µL	280 µL

Para a realização dos estudos da fração bioacessível, primeiramente pesou-se aproximadamente 5 g de amostra, em triplicata de cada uma das variedades estudadas, Cabernet Sauvignon e Tannat, em frascos de 50 mL. Em seguida

adicionou-se 4 mL da solução de saliva (amylase) e 1 mL de CaCl_2 7,5 mM, e em seguida o pH foi ajustado a 7 com NaOH pela adição de 150 μL , e encaminhado para o banho Dubnoff com agitação e aquecimento a 37 °C por 10 minutos.

Na segunda etapa, a qual simula o estômago (pepsina), foi adicionado 9,1 mL da solução de suco gástrico, 700 μL de CaCl_2 2 mM e 600 μL de HCl 1 mol L^{-1} para ajuste do pH=3 e em seguida os frascos foram encaminhados para o banho a 37 °C por duas horas. Já na última etapa do sistema gastrointestinal, o intestino, foi adicionado aos vials 18,5 mL da solução do suco intestinal (pancreatina e bile), 1,35 mL de CaCl_2 9 mM e 100 μL de NaOH 1 mol L^{-1} para ajustar o pH a 7, e encaminhados para o banho Bubnoff por 2 horas a temperatura de 37 °C.

Após, as soluções foram colocadas em banho de gelo por 20 minutos, e em seguida as amostras foram centrifugadas por 20 min a 10.000 rpm para separar a fase sólida, a qual corresponde a fração não bioacessível, da sobrenadante, utilizada para a determinação da fração bioacessível, conforme apresentado na Figura 8. O sobrenadante foi diluído três vezes com um volume final de 15 mL para posterior leitura no MIP OES.

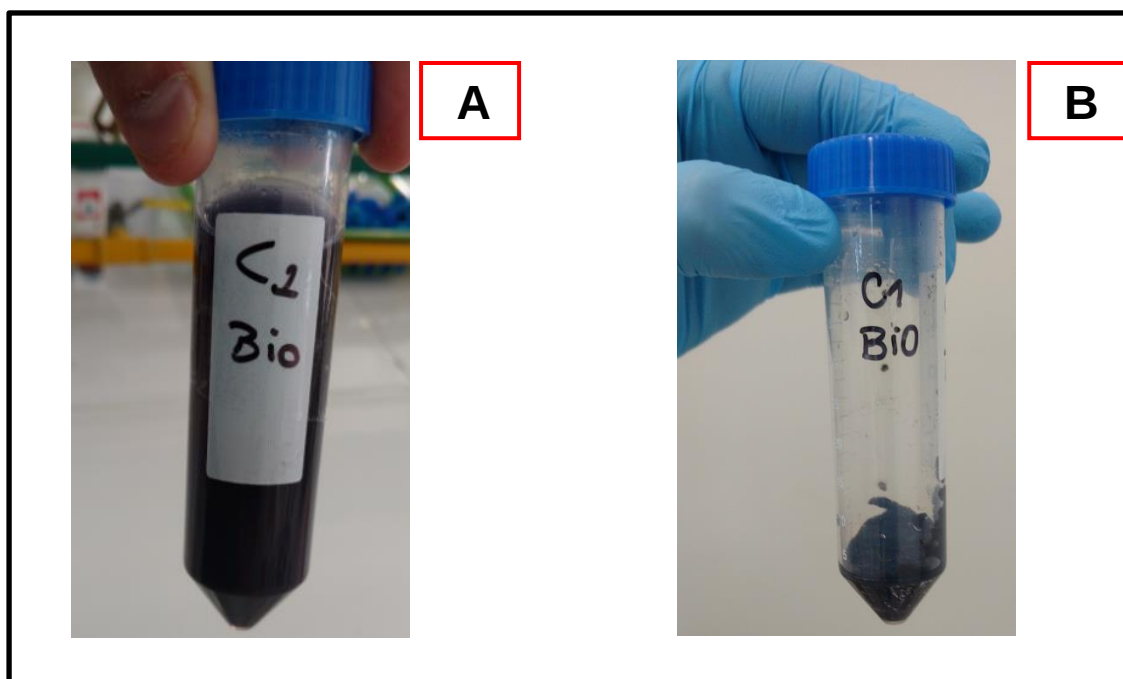


Figura 8: Sobrenadante + parte sólida (A) e fração não-bioacessível depois da retirada do sobrenadante (B).

5.8 Fração não bioacessível

Com o intuito de comprovar a eficiência do método, foi realizada a determinação dos analitos na fração não bioacessível (parte sólida), para verificar se a soma das duas frações corresponde à concentração total encontrada para os respectivos analitos. Esse método de validação foi usado e comprovado no trabalho desenvolvido por SOUZA (2018). Para isso, foram pesadas em papel celulose, em triplicata, aproximadamente 2,5 g da fração sólida após a centrifugação e submetidos ao processo de decomposição ácida citado anteriormente, para posterior leitura no MIP OES.

6. Resultados e discussão

6.1 Teor de umidade

As análises das amostras foram feitas em triplicata, sendo que a média do teor de umidade da cultivar Tannat foi de 68,68 % e da Caberbet Sauvignon foi de 68,82 %, demonstrando que ambas praticamente não apresentam diferença no seu teor de umidade. Esse valor está muito próximo do exposto por Ferreira (2010), no qual ele relata que a umidade média é encontrada entre 70 e 80 %.

6.2 Sólidos totais dissolvidos e acidez

Os sólidos totais dissolvidos (STD) apresentaram uma média de 0,37 % (m/v) para cultivar Tannat e de 0,84 % (m/v) para cultivar Cabernet Sauvignon. Já a porcentagem de acidez foi de 2,7 % (v/v) e 2,9 % (v/v) para Tannat e Cabernet Sauvignon, respectivamente. Essas análises demonstram que os valores estão abaixo do limite máximo permitido pelo equipamento analítico MIP OES, que é no máximo 3 % (m/v) para STD e menos de 5 % (v/v) para acidez, o que garante sua segurança e bom funcionamento do equipamento.

6.3 Parâmetros de mérito

Os parâmetros de méritos relacionados à quantificação total dos elementos presentes na casca de uva e das frações bioacessíveis, obtidas por MIP OES com MSIS, estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Parâmetros de mérito obtidos por MIP OES para as determinações das concentrações totais de metais em amostras de casca de uva.

Analito	Faixa Linear (mg L⁻¹)	a (L mg⁻¹)	R	LOD_(m) (mg Kg⁻¹)	LOQ_(m) (mg Kg⁻¹)
Ba	0,025 – 0,2	174,02	0,998	0,0014	0,0048
Bi	0,025 – 0,2	802,34	0,999	0,0086	0,028
Ca	0,025 – 0,2	165,77	0,993	0,171	0,572
Cd	0,025 – 0,2	24,98	0,999	0,045	0,15
Co	0,025 – 0,2	26,18	0,994	0,08	0,27
Cr	0,025 – 0,2	38,05	0,999	0,0043	0,014
Cu	0,025 – 0,2	166,52	0,999	0,018	0,061
Fe	0,025 – 0,2	13,90	0,999	0,095	0,318
K	0,525 – 5,2	28,74	0,999	0,167	0,557
Mg	0,025 – 0,2	92,94	0,990	0,14	0,27
Mn	0,025 – 0,2	51,44	0,999	0,0038	0,012
Pb	0,025 – 0,2	7,05	0,994	0,045	0,153
Zn	0,025 – 0,2	25,54	0,991	0,22	0,76

a: coeficiente de correlação angular da curva; LOD: limite de detecção do método; LOQ: limite de quantificação do método; R: coeficiente de correlação linear

Tabela 7. Parâmetros de mérito da fração bioacessível.

	Faixa Linear	a	R	LOD(m)	LOD(m)
Analitos	(mg L ⁻¹)	(L mg ⁻¹)		(mg Kg ⁻¹)	(mg Kg ⁻¹)
Ba	0,025 – 0,2	408,80	0,999	0,0022	0,0074
Cu	0,025 – 0,2	171,50	0,999	0,122	0,408
Fe	0,025 – 0,2	11,79	0,995	0,208	0,694
Mn	0,025 – 0,2	53,92	0,999	0,086	0,287
Pb	0,025 – 0,2	6,13	0,999	0,11	0,363
Zn	0,025 – 0,2	22,65	0,998	0,079	0,263

a: coeficiente de correlação angular da curva; LOD_m: limite de detecção do método;

LOQ_m: limite de quantificação do método; R: coeficiente de correlação linear

Como pode ser observado nas Tabelas 6 e 7, foram obtidos bons coeficientes de correlação linear para todos os analitos investigados ($R > 0,99$). Os limites de quantificação e detecção obtidos foram menores na determinação da concentração total, exceto para o Zn. Esse fator, possivelmente, se deve a complexidade da matriz utilizada para simular o sistema gastrointestinal humano.

Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) dos elementos foram calculados de acordo com as Equações 3 e 4.

$$\text{LOD} = \frac{3XS_{\text{Branco}}}{a} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{LOQ} = \frac{10XS_{\text{Branco}}}{a} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: S_{Branco} é o desvio padrão de 10 leituras do branco de cada elemento; a: é a inclinação na curva analítica.

Os LOD do método para a quantificação total e para a fração bioacessível foram calculados de acordo com as Equações 6 e 7, respectivamente. Para a equação 5 o valor “20” representa o volume aferido e o valor “2,5” corresponde a

massa da amostra em gramas. Já para a equação 6 o valor “32” representa a soma dos volumes das soluções do sistema gastrointestinal adicionadas e o valor “5” representa a massa (em gramas) da amostra usada.

$$\text{LODm} = \text{LD} \times 20 / 2,5 / 1000 \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{LODm} = \text{LD} \times 32 / 5 / 1000 \quad (\text{Equação 6})$$

6.4 Validação da metodologia proposta

Com o objetivo de avaliar a exatidão da metodologia proposta, testes de adição e recuperação dos analitos foram realizados utilizando amostras de casca de uva da cultivar Tannat fortificadas e não fortificadas com os analitos de interesse. Este estudo foi feito em três diferentes níveis de concentrações (baixo, médio e alto em relação à curva analítica), conforme apresentado nas Tabela 8 e 9.

Tabela 8. Concentrações obtidas em mg kg^{-1} de Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu em casca de uva, média da concentração em $\text{mg kg}^{-1} \pm$ desvio (RSD) e % de recuperação.

Analito	Adição (mg Kg^{-1})	Média $\pm$ desvio padrão (RSD)	Recuperação (%)
Ba	0	$5,72 \pm 0,22$ (3,8)	-
	0,8	$6,59 \pm 0,11$ (1,7)	111
	1,6	$7,00 \pm 0,26$ (3,7)	81
	2,4	$8,11 \pm 0,06$ (0,7)	100
Bi	0	< LODm	-
	0,8	$0,63 \pm 0,04$ (6,3)	79
	1,6	$1,36 \pm 0,04$ (2,9)	85
	2,4	$2,02 \pm 0,05$ (2,5)	84
Ca	0	105 ± 3 (2,9)	-
	56,4	161 ± 2 (1,2)	99
	112,8	206 ± 5 (2,4)	89
	169,2	290 ± 19 (6,6)	109
Cd	0	< LODm	-
	0,8	$0,67 \pm 0,03$ (4,5)	84
	1,6	$1,34 \pm 0,01$ (0,7)	84
	2,4	$2,18 \pm 0,005$ (0,2)	91
Co	0	$0,79 \pm 0,01$ (1,3)	-
	0,8	$1,47 \pm 0,03$ (2,0)	85
	1,6	$2,15 \pm 0,07$ (3,3)	85
	2,4	$2,89 \pm 0,05$ (1,7)	88
Cr	0	< LODm	-
	0,8	$0,96 \pm 0,05$ (5,2)	120
	1,6	$1,64 \pm 0,003$ (0,2)	103
	2,4	$2,59 \pm 0,04$ (1,5)	108
Cu	0	$3,59 \pm 0,15$ (4,1)	-
	0,8	$4,46 \pm 0,06$ (1,3)	109
	1,6	$5,38 \pm 0,03$ (0,5)	112
	2,4	$6,24 \pm 0,05$ (1,7)	110

Tabela 9. Concentrações obtidas em mg kg^{-1} de Fe, K, Mg, Mn, Pb, Zn em casca de uva, média da concentração em $\text{mg kg}^{-1} \pm$ desvio (RSD) e % de recuperação

Analito	Adição (mg Kg^{-1})	Média $\pm$ desvio padrão (RSD)	Recuperação (%)
Fe	0	$5,99 \pm 0,3$ (4,0)	-
	4,4	$11,1 \pm 0,2$ (1,8)	107
	8,8	$15,7 \pm 0,9$ (5,7)	110
	12,4	$17,9 \pm 0,3$ (1,6)	87
	0	3991 ± 105 (2,6)	-
K	1600,4	5782 ± 84 (1,4)	112
	3200,8	7798 ± 173 (2,2)	119
	4801,2	9721 ± 190 (1,9)	119
	0	$91,6 \pm 8,8$ (9,6)	-
Mg	32,4	$128,5 \pm 0,2$ (0,1)	114
	56,8	$151,3 \pm 5,6$ (3,7)	105
	81,2	$158,9 \pm 4,5$ (2,8)	83
	0	$2,21 \pm 0,20$ (9,0)	-
Mn	0,8	$3,18 \pm 0,09$ (2,8)	117
	1,6	$3,79 \pm 0,03$ (0,8)	97
	2,4	$4,94 \pm 0,06$ (1,2)	112
	0	$0,51 \pm 0,03$ (5,8)	-
Pb	0,8	$1,25 \pm 0,05$ (4,0)	92
	1,6	$1,82 \pm 0,04$ (2,2)	82
	2,4	$2,62 \pm 0,05$ (1,9)	88
	0	$1,72 \pm 0,03$ (1,74)	-
Zn	0,8	$2,58 \pm 0,01$ (0,38)	110
	1,6	$3,24 \pm 0,13$ (4,01)	96
	2,4	$4,22 \pm 0,06$ (1,4)	105
	0	$1,72 \pm 0,03$ (1,74)	-

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 8 e 9, pode-se verificar uma faixa de recuperação dos respectivos analitos na presença da amostra que variou de 79 a 120 % com valores de desvio padrão relativo (RSDs) inferiores a

10 %, o que comprova a exatidão do método proposto, exceto para o Bi, e uma precisão adequada, tendo em vista a boa reprodutibilidade dos resultados.

A exatidão do método proposto também pode ser verificada a partir da comparação dos resultados obtidos por diferentes procedimentos de preparo de amostra. Este estudo foi realizado através da análise dos analitos nas amostras de casca de uva da cultivar Tannat, demonstrado na Tabela 10.

TABELA 10: Resultados comparativos entre os métodos com sistema de refluxo e fechado aplicado as amostras de casca de uva da cultivar Tannat.

Analitos	Concentração, $\bar{x} \pm SD$ (RSD), mg Kg ⁻¹	
	Tannat Digestão ácida – sistema refluxo	Método Comparativo (Frasco de teflon)
Bi	< LODm	< LODm
Ba	5,72 ± 0,22 (3,8)	5,18 ± 0,11 (2,1)
Ca	105 ± 3 (2,8)	99 ± 3 (3,0)
Cd	< LODm	< LODm
Co	0,79 ± 0,01 (1,3)	< LODm
Cr	< LODm	< LODm
Cu	3,59 ± 0,15 (4,2)	3,02 ± 0,28 (9,3)
Fe	5,99 ± 0,3 (5,6)	7,3 ± 0,5 (6,8)
K	3991 ± 105 (2,6)	3908 ± 59 (1,5)
Mg	91,6 ± 8,8 (9,6)	78,4 ± 3,0 (3,8)
Mn	2,21 ± 0,20 (9,0)	1,95 ± 0,02 (1,0)
Pb	0,51 ± 0,03 (5,9)	< LODm
Zn	1,72 ± 0,03 (1,7)	2,08 ± 0,14 (6,7)

Nos resultados apresentados na Tabela 10, foi aplicado o teste estatístico *t* de Student pareado para um limite de confiança de 95 %, a fim de verificar se existe

diferença entre os resultados encontrados para os dois métodos. Este teste demonstrou que não há diferenças significativas entre os resultados encontrados na decomposição com sistema de refluxo em relação à decomposição em sistema fechado. A exatidão das concentrações encontradas para os elementos Co e Pb não puderam ser verificadas a partir deste estudo pois suas concentrações ficaram abaixo do LD quando utilizado o sistema fechado para o preparo das amostras. Isso se deve a massa de amostra utilizada (321 mg), a qual é substancialmente menor que a utilizada no sistema de refluxo, uma vez que há risco de explosão em sistemas fechados de decomposição com quantidades elevadas de matéria orgânica.

Assim, podemos dizer que o sistema de decomposição com refluxo apresentou eficiência na decomposição das amostras de casca de uva possibilitando a subsequente determinação dos elementos de interesse. É importante ressaltar que, esta eficiência no processo de preparo das amostras está relacionada à zona de baixa temperatura proporcionada pelo uso do dedo frio, a qual é responsável pela condensação dos vapores gerados, aumentando assim a capacidade de decomposição da amostra.

Através dos resultados apresentados, também foi possível verificar a aplicabilidade do sistema de decomposição proposto para determinação de elementos voláteis, devido aos bons percentuais de recuperação obtidos para o Cd (84 a 91%) e para o Pb (88 a 92%) na amostra analisada. Por se tratar de um sistema semifechado, certamente, na superfície do dedo frio, é gerada uma película fina de nitratos (decorrente da decomposição com o ácido nítrico), que permite a absorção dos analitos, sem que estes sejam perdidos durante esta etapa.

6.5 Resultados da determinação da concentração total nas amostras de casca de uva.

A determinação da concentração total dos elementos em estudo nas amostras de casca de uva se faz necessária, a fim de verificar se há possibilidade, devido à concentração presente dos elementos, da inserção deste coproduto da vinificação em alimentos de origem humana e animal. Além disso, também é importante investigar a existência de possíveis elementos não essenciais e

potencialmente tóxicos. Na Tabela 11 estão apresentados os resultados das concentrações das cultivares Tannat e Cabernet Sauvignon.

Tabela 11: Concentração total de metais nas amostras de casca de uva por MIP OES.

Analitos	Concentração, $\bar{x} \pm SD$ (RSD), mg Kg ⁻¹	
	Tannat	Cabernet Sauvignon
Ba	5,70 $\pm$ 0,22 (3,8)	2,36 $\pm$ 0,07 (3,0)
Bi	< LOD _m	< LOD _m
Ca	105 $\pm$ 3 (2,8)	132 $\pm$ 5 (3,8)
Cd	< LOD _m	< LOD _m
Co	0,79 $\pm$ 0,01 (1,3)	1,13 $\pm$ 0,05 (4,4)
Cr	< LOD _m	0,012 $\pm$ 0,0008 (6,2)
Cu	3,59 $\pm$ 0,15 (4,2)	2,39 $\pm$ 0,20 (8,4)
Fe	5,99 $\pm$ 0,3 (5,6)	5,50 $\pm$ 0,5 (9,1)
K	3991 $\pm$ 105 (2,6)	3495 $\pm$ 130 (3,7)
Mg	91,6 $\pm$ 8,8 (9,6)	49,2 $\pm$ 1,8 (3,6)
Mn	2,21 $\pm$ 0,20 (9,0)	1,92 $\pm$ 0,07 (3,6)
Pb	0,51 $\pm$ 0,03 (5,9)	0,25 $\pm$ 0,01 (4,0)
Zn	1,72 $\pm$ 0,03 (1,7)	3,35 $\pm$ 0,19 (5,7)

De acordo com a Tabela 11, em ambas as amostras das cultivares, o Cd e o Bi foram os únicos elementos que apresentaram concentrações abaixo do LOD_m para ambas as amostras, não trazendo risco ao consumidor numa possível ingestão (MAGNA et al, 2013; YANG et al, 2011) , uma vez que se necessitaria um consumo elevado para se ter um efeito tóxico, de 0,05 mg Kg⁻¹ e 221 mg Kg⁻¹, respectivamente (BRASIL, 2013.; MAHAN.,2012). Já o Cr teve seu LOQ_m abaixo em ambas as cultivares, ficando com valores abaixo do consumo diário

recomendado, uma vez que é recomendado o consumo entre 0,021 a 0,035 mg Kg⁻¹ para meninos e meninas, a partir dos 9 anos de idade. O fato de sua concentração ter ficado abaixo do LOD_m pode ser devido a uva não estar entre os principais alimentos detentores deste analito, como levedo de cerveja, ostras, fígado e batatas. (COZZOLINO, 2016.; MAHAN, 2012). Todos os demais elementos ficaram acima do LOQ_m.

A nutrição mineral nas culturas de frutíferas, como as de videiras, é muito importante para o seu desenvolvimento, uma vez que a absorção pela planta dos micro e macrominerais depende de diversos fatores relacionados ao sistema solo-planta. Como consequência, deve-se ter conhecimento para que se necessário seja feita a fertilização ou tratamento de suas doenças para que o produto final, a fruta, tenha a composição físico-química adequada (PROTANO & ROSSI; 2014).

Para uma melhor visualização dos resultados das concentrações totais dos elementos, no apêndice A (Figura 1), que é referente à Tabela 10, estão os elementos Zn, Cu, Co, Ba, Pb, Fe, Mn, Cr, os quais foram encontrados em menores quantidades e na Figura 2 estão apresentados os elementos Ca, Mg e K, que fazem parte dos macroelementos e estão em maior quantidade.

O Mn e o Fe apresentaram valores muito próximos entre as duas cultivares. Já o Cu apresentou um valor de aproximadamente 50% maior para a Tannat em comparação com a Cabernet Sauvignon, enquanto a concentração do Zn, Ba, Mg Pb tiveram uma grande diferença entre as cultivares. Esse fato provavelmente está relacionado com a diferença entre as cultivares, onde é relatado também por Ko e colaboradores (2007) que reportaram diferentes concentrações em cultivares distintas. Outro fator que corrobora essa possibilidade é de as videiras das diferentes cultivares estarem muito próximas entre si, no mesmo tipo de solo.

Comparando os resultados obtidos dos elementos deste trabalho com os obtidos por Yang e colaboradores (2010), que avaliaram a quantidade de diversos elementos na casca, polpa e sementes em três cultivares, entre elas a Cabernet Sauvignon que apresentou, aproximadamente, a concentração de 3, 2,5, 8 e 1,5 mg kg⁻¹ para os analitos Zn, Cu, Fe e Mn presentes na casca, respectivamente, se mostrando com valores próximos dos resultados deste estudo. Já o elemento Co, apresentou uma concentração de 0,0045 mg kg⁻¹, estando bem abaixo da encontrada neste trabalho.

A DRI para o Co é de 0,002 a 0,003 mg, o que necessitaria apenas do consumo de menos de 3 g de casca, comparando com a concentração encontrada para a cultivar Tannat, para suprir a necessidade, porém ela se encontra principalmente como parte integrante da vitamina B₁₂, a qual não é sintetizada por espécies monogástricas, como os seres humanos. Desta forma, a melhor via para garantir as necessidades deste elemento é alimentos de origem animal (COZZOLINO, 2016.; MAHAN, 2012).

De acordo com a RDC Nº 42 da ANVISA, que dispõe sobre os limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos, o Pb é de 0,2 mg Kg⁻¹ para frutas frescas de bagos (Brasil, 2013). Desta forma a concentração total de Pb encontrada para a cultivar Tannat ultrapassa 2,5 vezes o limite permitido e para a Cabernet Sauvignon foi de 25 % a mais, uma vez que os valores encontrados foram 0,51 e 0,25 mg Kg⁻¹, respectivamente, para as cultivares. Isso demonstra a necessidade de se ter mais controle deste metal possivelmente tóxico a saúde. Para a Organização Mundial de Saúde e a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (OMS/FAO), através da Comissão Codex Alimentar (OMS, 2018) o limite máximo do Pb é de 0,1 mg Kg⁻¹, o que tornaria ainda mais preocupante a concentração encontrada. Já o elemento Cd teve sua concentração abaixo do LOD_m o que garante segurança a esse produto.

Entre os macronutrientes oriundos deste trabalho, o K é o analito que apresenta a concentração mais elevada na casca, necessitando de uma DRI mínima de 4.700 mg, o que vem a ser uma ótima fonte de consumo, já que ele é o principal cátion do líquido intracelular, sendo responsável por promover o crescimento celular e muscular, bem como manter equilíbrios osmótico e ácido-base (COZZOLINO., 2016.; MAHAN.,2012). Apresentou valores próximos entre as cultivares e quando comparado aos elementos Mg e Ca, está com uma concentração muito superior. Comparando esses dados com o trabalho realizado por Fagundes e colaboradores (2017) percebe-se a mesma lógica na quantidade encontrada desses três macroelementos na casca de uva da cultivar Cabernet Sauvignon, onde foi encontrada as seguintes quantidades em mg Kg⁻¹: K (2692,9), Ca (143,33) e Mg (128,7).

As altas concentrações de K na casca de uva estão de acordo com o trabalho publicado por Mpelasoka e colaboradores (2003), os quais relatam que as maiores

quantidades deste elemento estão concentradas na casca, seguido das sementes e da polpa, e que é transportado via xilema e floema, sendo esta última via a principal entrada de K para a baga.

Assim como o K, o Ca e o Mg tem grande relevância para o organismo humano, os quais apresentam uma DRI recomendada de 1000 a 1300 mg e 320 a 420 mg, respectivamente, dependendo do sexo (COZZOLINO.,2016.; MAHAN.,2012) . Com base na Organização Mundial da Saúde e a Organização das nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (WHO/FAO.,2003), que recomendam um consumo de 400 g diários de vegetais e frutas, e comparando com a média das concentrações totais entre as cultivares deste trabalho, que foi de 70 mg Kg⁻¹ para o Mg e 118 mg Kg⁻¹ para o Ca, mostram que o Mg é o segundo macroelemento que mais contribui para as funções do organismo humano, seguido do Ca.

Em relação à precisão, os melhores resultados foram alcançados para os elementos Ca, Ba e K, estando estes com um RSD abaixo de 5 %. Porém os demais elementos como Zn, Cu, Mg, Fe, Mn apresentaram um RSD acima, que variou entre de 1,0 a 9,6 % dependendo do elemento e do método. Os demais elementos como Cd, Cr e Bi não foram citados, pois em um dos métodos o resultado ficou abaixo do LOD_m.

6.6 Resultados da determinação da fração bioacessível nas amostras de casca de uva.

As concentrações bioacessíveis dos micro e macroelementos foram determinadas usando o procedimento de bioacessibilidade *in vitro* e estão apresentadas na Tabela 12. Para uma melhor visualização dos resultados, pode-se também consultar o apêndice B (Figura 1).

Os elementos K, Ca, Mg, que estão presentes nos estudos da concentração total, não foram possíveis de serem investigados no estudo da bioacessibilidade, devido estarem em concentrações muito elevadas nos reagentes utilizados para simular o sistema gastrointestinal.

Cabe salientar que não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando como amostra a casca de uva para testes de bioacessibilidade. Porém existem

outros trabalhos com outras frutas como no desenvolvido por Pereira (2018), onde foram utilizadas amostras de amora, morango, mirtilo e framboesa. Também a estudos com maçã, desenvolvido por Lima e colaboradores (2014) e romã, Sengul e colaboradores (2014).

TABELA 12: Concentração da fração bioacessível (FB) e não bioacessível (FNB) nas amostras de casca de uva obtidas por MIP OES.

Analitos	Tannat					Cabernet Sauvignon				
	FB	FNB	%FB	%FNB	Rec (%)	FB	FNB	%FB	%FNB	Rec (%)
Zn	0,33 ± 0,006	1,36 ± 0,06	19,2	79,1	98,3	0,45 ± 0,023	2,27 ± 0,11	13,4	67,8	81,2
Cu	1,17 ± 0,07	2,78 ± 0,04	32,6	77,4	110,0	0,79 ± 0,007	1,47 ± 0,13	33,0	61,5	94,5
Ba	0,79 ± 0,026	3,96 ± 0,04	13,8	69,2	83,0	0,32 ± 0,012	1,74 ± 0,10	13,6	73,7	87,3
Pb	0,13 ± 0,004	0,41 ± 0,03	25,7	80,4	106,1	0,13 ± 0,013	0,13 ± 0,01	52,0	52,0	104,0
Fe	< LODm	5,55 ± 0,4	-----	92,6	92,6	<LODm	5,65 ± 0,4	-----	102,7	102,7
Mn	0,75 ± 0,06	1,66 ± 0,06	33,5	75,1	108,6	0,67 ± 0,06	1,26 ± 0,06	34,9	65,6	100,5

Média ± desvio-padrão; %FB Fração Bioacessível; %FNB porcentagem da fração não bioacessível; Rec (%) Porcentagem da recuperação.

O cálculo para obtenção da porcentagem da fração bioacessível é dada pela seguinte expressão matemática:

$$\% \text{ fração bioacessível} = (\text{Conc.}_{\text{bioac}} / \text{Conc.}_{\text{total}}) \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde: $\text{Conc.}_{\text{bioac}}$ é a concentração encontrada no teste de bioacessibilidade; $\text{Conc.}_{\text{total}}$ é a concentração total encontrada na casca de uva após a decomposição ácida.

Para validar o estudo da bioacessibilidade *in vitro* primeiramente foi necessário realizar a quantificação das concentrações totais dos elementos, e em seguida foi determinada a concentração da fração líquida ou sobrenadante (fração bioacessível) e da parte sólida (não bioacessível), sendo que a soma destas duas frações correspondem ao total de alimento ingerido e deve ser compatível com a determinação da concentração total. Na Tabela 12 é possível observar que a recuperação de todas as amostras ficou entre 81,2 e 108,6 %, mostrando assim a confiabilidade das análises, uma vez que o somatório das frações foi compatível com a concentração total.

Observando a Tabela 12 fica evidente que apenas uma pequena fração do que é ingerido torna-se passível de ser absorvido e utilizado pelo organismo, em comparação com a concentração total ingerida. O elemento Fe, que é tão difundido perante a população pela sua importância nutricional, teve sua fração bioacessível abaixo do LOD_m e uma recuperação próxima de 100 % da fração não bioacessível, ou seja, a que foi excretada pelo organismo.

Diversos fatores podem ser responsáveis pela não liberação, entre eles pode-se citar a quantidade de taninos hidrolisáveis presentes na casca (CERBARO et al, 2016), os quais complexam-se com facilidade com íons metálicos e tendem a reduzir a capacidade de liberação e absorção do Fe (SCALBERT, 1991; MUELLER-HARVEY & McALLAN, 1991; KRUGER, 2013). Outros fatores possíveis são a presença de grupos fosfatos, os quais ocorrem naturalmente em vegetais, como na polpa da uva (BORGES, 2008), e que prejudicam a liberação destes analitos para serem absorvidos pelo sistema gastrointestinal pela formação de quelatos (MAHAN,

2012.; OU et al, 2011). Além disso, as enzimas amilase, tripsina e pepsina são inibidas e/ou prejudicadas pela interação por grupos fosfatos com as proteínas, que são responsáveis por promover a ligação com o mineral, o que desfavorece sua liberação (LEAL et al, 2010.; BENEVIDES et al, 2011. Também pode ser devido a ação das fibras insolúveis que estão presentes em cascas de alimentos, que aceleram o tempo do trânsito intestinal, carreando junto os minerais e diminuindo a possibilidade de absorção (MAHAN, 2012). Em vista disso, a fonte de origem animal é a melhor forma de absorção deste mineral.

O Zn, teoricamente, sofre as mesmas ações que o Fe perante os fosfatos e fibras, porém mesmo tendo uma concentração total mais baixa em relação ao ferro, apresentou um comportamento diferente, sendo capaz de ser liberado no organismo para ser absorvido.

Os elementos Cu, Ba e Mn para ambas as cultivares apresentaram porcentagens das frações bioacessíveis praticamente idênticas mesmo tendo concentrações totais diferentes entre si e entre as cultivares, evidenciando que a parcela liberada de nutrientes destes elementos é limitada. Para o Zn a cultivar Tannat se mostrou um pouco mais elevada.

No caso do elemento Pb, embora a concentração total presente na cultivar Tannat ($0,51 \text{ mg kg}^{-1}$) tenha apresentado um valor duas vezes maior que a Cabernet Sauvignon ($0,25 \text{ mg kg}^{-1}$), e levando-se em consideração as porcentagens da fração bioacessível (%FB) que foram respectivamente, 25,5 e 52,8 %, os valores da concentração bioacessível em mg kg^{-1} para ambas as cultivares foram muito similares, como pode ser visto na Tabela 12.

O elemento Ba, assim como o Pb não apresentam nenhuma funcionalidade no organismo, sendo considerados como elementos potencialmente tóxicos. O Pb apresenta um limite de ingestão diária admissível de $0,0035 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo (MAGNA et al, 2014), o que comparando esse valor com a fração bioacessível de $0,132 \text{ mg kg}^{-1}$ é possível observar que o valor se encontra dentro do tolerável ($0,245 \text{ mg}$), levando-se em consideração uma pessoa com massa corpórea de 70 Kg, o que não causaria riscos à saúde do consumidor. Já o Ba pode apresentar níveis de intoxicação de 3 a 7 mg kg^{-1} por peso corpóreo, estando a concentração da fração liberada abaixo do estipulado (NIELSEN & LADEFOGED, 2013).

Os elementos Cu e Mn apresentaram as concentrações mais elevadas da fração bioacessível, e isso se deve ao fato da sua possível ligação com proteínas, facilitando sua quebra pelas enzimas digestivas e assim tornando-se mais solúveis no pH do trato intestinal (do NASCIMENTO da SILVA et al, 2018; SOUZA, 2018).

Os valores dos micronutrientes essenciais recomendados (INSTITUTE OF MEDICINE, 2011; FOOD AND NUTRITION BOARD, 2001), em média para homens e mulheres adultas, para o consumo diário dos elementos Mn, Zn, e Cu, são de 2, 9, e 0,9 mg, respectivamente. Comparando a necessidade diária com a fração bioacessível, percebe-se que a quantidade de nutrientes está muito aquém do necessário, principalmente para o Zn que apresenta uma concentração 20 vezes, em média, menor que o recomendado. Já quando comparado com a recomendação diária de ingestão de frutas e verduras pela WHO/FAO (2003), que é de 400g, as quantidades Mn, Zn e Cu ficariam em 0,56, 0,15 e 0,39 mg, em média. Esses baixos valores são esperados, visto que o consumo diário está baseado em diversas fontes de alimentos e não exclusivamente na amostra em estudo.

Em vista destes resultados, uma alternativa para usar esse subproduto da fabricação de vinho, seria a sua inserção em outros alimentos, como barra de cereais, snack extrusado, farinhas para bolo e pães, macarrão e doces (BENDER, 2016; STRAPASSOM, 2016), para que se complemente na composição destes alimentos minerais provenientes de uma fonte orgânica.

7. Considerações finais

Através dos resultados obtidos foi possível observar que o método de decomposição ácida com sistema de refluxo utilizado para o preparo das amostras de casca de uva apresentou-se como um método eficiente, simples e seguro, apresentando exatidão e precisão adequadas para a análise de metais por MIP OES. Sendo assim, uma alternativa promissora aos métodos convencionais de análise. Os valores de recuperação encontrados para ambas as amostras, bem como a utilização de um método comparativo de preparo das amostras confirmam a exatidão do método proposto.

Através deste estudo foi possível verificar que cultivares distintas, mesmo estando no mesmo solo, apresentam diferentes níveis de concentração elementar na casca de uva. Pode-se observar também uma relação direta entre a concentração total dos micro e macroelementos, exceto os não essenciais, necessários para o consumo humano e suas necessidades fisiológicas, com a concentração encontrada na fruta (casca).

Em relação à bioacessibilidade, observa-se que as porcentagens da fração bioacessível foram próximas para a maioria dos minerais liberados entre as cultivares. Observou-se também que a quantidade liberada para absorção pelo organismo não é suficiente para a necessidade diária destes minerais, sendo a casca de uva um subproduto com potencial para ser consumido de forma complementar na dieta, através da sua inserção em outros alimentos ou na fabricação destes. Os elementos considerados não essenciais, como Ba e Pb mostraram-se bioacessíveis, principalmente o Pb, ficando desta forma o alerta para que se tenha mais controle e estudo em alimentos, e divulgação destes resultados para sociedade .

Referências Bibliográficas

ABE, L. T.; da MOTA, V. R.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 394-400, 2007.

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas, Norma Brasileira NBR 10004, Classificação de Resíduos Sólidos, 2004.

AGILENT TECHNOLOGIES. Disponível em: <<http://www.agilent.com/en-us/products/mp-aes/mp-aes-systems/4200-mp-aes>>. Acesso em: 14 abr 2015.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Use of the Agilent Multimode Sample Introduction System (MSIS) for Simultaneous Hydride Determination and Conventional Nebulization Using the PerkinElmer Optima 7/8x00 Series ICP-OES Systems.** Application Note. 10 p. 2016.

AHMADI, S. M.; ALI SIAHSAR, B. Analogy of physicochemical attributes of two grape seeds cultivar. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 38, p. 291-301, 2011.

ALI, K.; MALTESE, F. Matabolic constituents of grapewine and grape-derives products. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 357-378, 2010.

AMAI, R. S.; DONATI, G. L.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J.A. A simple dilute-and-shoot procedure for Si determination in diesel and biodiesel by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Microchemical Jornal**. v. 106, p. 318–322, 2013.

ARANITOYANNIS, I.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 475-87, 2006.

BARROSO, D. D.; ARAUJO, G. G. L. de.; SILVA, D. S. DA; GONZAGA NETO, S. ; MEDINA, F. T. Performance of sheep in feedlot termination fed with dried grapes residue diets associated with different energy sources. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1553-1557, 2006.

BENDER, A. B. B.; LUVIELMO, M. DE M. L.; LOUREIRO, B. B.; SPERONI, C. S.; BOLIGON, A. A.; DA SILVA, L. P.; PENNA, N. G. Obtention and characterization of grape skin flour and its use in an extruded snack. **Brazilian journal of food technology**, v. 19, 2016.

BENEVIDES, C.M.J.; SOUZA, M.V.; SOUZA, R.D.B.; LOPES, M.V. Fatores antinutricionais em alimentos: Revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.18, p. 67-79, 2011.

BENITO, P.; MILLER, D. Iron Absorption and bioavailability: An uptadet review. **Nutrition Research**, v. 18, p. 581-603, 1998.

BIANCHI, M .L .P.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, J. E. D. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro em alimentos. *Archivos Latinosamericanos de Nutrición*, v. 42, p. 94–100, 1992.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada – RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013**. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0042_29_08_2013.pdf/c5a17d2d-a415-4330-90db-66b3f35d9fbd>. Acesso em: 26 agost. 2018.

BORGES, E. P. **A B C Ilustrado da Vinha e do Vinho**. 2. Ed. Rio de Janeiro- RJ: editora Mauad, 249 p, 2008.

BORGUEZAN, M.; GAVIOLI, O.; PIT, F. A.; da SILVA, A. L. Comportamento vegetativo e produtivo da videira e composição da uva em São Joaquim, Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 398-405, 2011.

BRAVO, S.; AMORÓS, J. A.; PÉREZ-DE-LOS-REYES, C.; GARCÍA, F. J.; MORENO, M. M.; SÁNCHEZ-ORMEÑO, M.; HIGUERAS, P. Influence of the soil pH in the uptake and bioaccumulation of heavy metals (Fe, Zn, Cu, Pb and Mn) and other elements (Ca, K, Al, Sr and Ba) in vine leaves, Castilla-La Mancha (Spain). **Journal of Geochemical Exploration**, v. 174, p. 79–83, 2017.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of Nutrients. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**, p. 191–248, 2012.

BURIN, V. M.; FALCÃO, L. D.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30 p. 1027-1032, 2010.

CERBARO, D.; ROMBALDI, C, V.; SAINZ, R. L.; NOBRE, G, A. Influence of tannins ellagic addition in quality merlot wines of Campaign region. **Journal of bioenergy and food science**, v.3, p.149-160, 2016.

ÇETIN, E. S.; ALTINÖZ, D.; TARÇAN, E.; BAYDAR, N. G . Chemical composition of grape canes. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 994–998, 2011.

COSTA, S.; AFONSO, C.; CARDOSO, C.; BATISTA, I.; CHAVEIRO, N.; NUNES, M. L.; BANDARRA, N. M. Fatty acids, mercury, and methylmercury bioaccessibility in salmon (*Salmo salar*) using an in vitro model: Effect of culinary treatment. **Food Chemistry**, v. 185, p. 268-276, 2015.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 5. Ed. Barueri-SP: editora Manole, 1443 p, 2016.

de CAMPOS, L .M. A. S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva cabernet sauvignon (vitis vinifera): parâmetros de processo e modelagem matemática**. 2005, 141p. Dissertação (Mestre em engenharia de alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2005.

de SOUZA, A. O. **Cereal matinal e infantil: concentração total e bioacessível e pré- concentração de metais por técnicas de espectrometria atômica**. 2018. 130f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

DEBON, A. **A Vindima: O Jornal da Vitivinicultura e da Agricultura Familiar**, 2015. Disponível em: < <http://www.avindima.com.br/?p=7226>> Acesso em: 14 de dez de 2018.

DENG, Q.; PENNER, M. H.; ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. **Food research International**, v. 44, p. 2712-2720, 2011.

DEY, B.; KATAKAM, P.; ASSALEH, F. H.; CHANDU, B. R.; ADIKI, S. K.; MITRA, A. *In vitro–in vivo* studies of the quantitative effect of calcium, multivitamins and milk on single dose ciprofloxacin bioavailability. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, p. 389-395, 2015.

DICKINSON, E. **Understanding Food Structures: The Colloid Science Approach, Food Structures, Digestion and Health**. Academic Press, Chapter 1, San Diego, p. 3-49, 2014.

do NASCIMENTO DA SILVA, E.; FARIAS, L. O.; CADORE, S. The total concentration and bioaccessible fraction of nutrients in purées, instant cereals and infant formulas by ICP OES: a study of Dietary Recommended Intakes and the importance of using a standardized in vitro digestion method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 65-72, 2018.

DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Determination of Cr, Ni, Pb and V in gasoline and ethanol fuel by microwave plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, p. 755-780, 2013.

D'ULIVO, A.; DĚDINA, J.; MESTER, Z.; STURGEON, R. E.; WANG, Q.; WELZ, B. Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, p. 1283–1340, 2011.

DWYER, K.; HOSSEINIAN, F.; ROD, M. The market potential of grape waste alternatives. **Journal of Food Research**. v. 3, p. 91–106, 2014.

ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 317, 2012.

FAGUNDES, E.; PETRI, J. L.; KRETZSCHMAR, A.; A, SCHVEITZER, B.; DE MARTIN, M. S.; UBER, S. C. Composição mineral de uvas 'cabernet sauvignon' produzidas em água doce/SC. **Revista da Jornada da Pós- Graduação e Pesquisa-CONGREGA**, URCAMP, 2017.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of trace elements. **Food Chemistry**, v. 43, p. 213-217, 1992.

FAMUYIWA, O., OUGH, C. S. Grape pomace: possibilities as animal feed. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, p. 44-46, 1982.

FERREIRA, L. F. D. **Obtenção de caracterização da farinha do bagaço de uva e sua utilização em cereais matinais expandidos**. 2010. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós- Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

FERREIRA, S. L. C.; SILVA, L. O. B.; de SANTANA, F. A.; M. M. S.; MATOS, G. D.; dos SANTOS, W. N. L. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 307-310, 2013.

FERNANDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LERIDA, I.; PEREZ-GALVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutricional Research**, v. 29, p. 751-760, 2009.

FIGUERÊDO RÊGO, F.; VIRGILIO, A.; NÓBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A. Determination of lead in medicinal plants by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct solid sampling. **Talanta**, v. 100, p. 21–26, 2012.

FINLEY, J. W. Manganese absorption and retention by young women is associated with serum ferritin concentration. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 70, p. 37-43, 1999.

FOOD AND NUTRITION BOARD, Institute of Medicine. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. Whashington, DC: National Academic Press, 2001.

FOWLER, B. A.; SULLIVAN, D. W.; SEXTON, M. J. Bismuth. **Handbook on the Toxicology of Metals**, p. 655–666, 2015.

GALLON, I.; GALLON, J.; BASEGGIO.; OLIVEIRA, F. G. de.; MENEGOTTO, M. L. A. **Destino e análise do uso alternativo do resíduo bagaço de uva na cadeia do agronegócio**. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INOVAÇÃO EM CADEIAS PRODUTIVAS DO AGRONEGÓCIO., 2013, Caxias do Sul: UCS, 2013. Disponível em: <<http://www.ucs.br/etc/conferencias/index.php/simposioinovacaoagronegocio/simposioinovacaoagronegocio/paper/viewFile/4043/1266>>. Acesso em: 12 dez 2018.

GARCÍA-RICO, L.; LEYVA-PEREZ.; JARA-MARINI, M.E. Content and daily intake of copper, zinc, lead, cadmium, and mercury from dietary supplements in Mexico. **Food and Chemycal Toxicology**, v. 45, p. 1599–1605, 2007.

GONZALES-PARAMAS, A.M.; ESTEBAN-RUANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; PASCUAL-TERESA, SANTOS de.; RIVAS-GONZALO, J. C. Flavanol content and antioxidant activity in winery by products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 234–238, 2004.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: editora Bookman, 1056 p, 2009.

IBRAVIN. Panorama geral 2018. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/Panorama-Geral>>. Acesso em: 20 dez 2018.

IBRAVIN / MAPA / SEAPI-RS. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/estatisticas/1529409592.pdf>>. Acesso em: 02 de mai 2018

IBRAVIN. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/Noticia/cadastro-viticola-mostra-o-novo-mapa-da-viticultura-no-rio-grande-do-sul/261>. Acesso em: 03 mai 2018.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes (DRI's)**. (2001). Disponível em: <http://nationalacademies.org/hmd/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRI-Tables/6_%20Elements%20Summary.pdf?la=en>. Acesso em 08 de nov. de 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, Capítulo IV, p. 83-160, 2008.

INTAWONGSE, M.; DEAN, J. R. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 876-886, 2006.

ITAL – Instituto de Tecnológica de Alimentos. **Brasil Pack trends 2020**. 1 ed. Campinas: ITAL, 2010.

JANKOSWIKI, K. J.; RESKE, E. **Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry**. RSC Analytical Spectroscopy Monographs nº 12. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 264 p, 2010.

JIMÉNEZ-BALLESTA, R.; CONDE, P.; MARTÍN, J.A.; GARCÍA, R. Pedo-geochemical baselines content levels and soil quality reference value of trace elements in soils from de Mediterranean (Castilla-La Mancha, Spain). **Central European Journal of Geosciences**, v. 2, p. 441–454, 2010.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4360-4367, 2004.

KLINGER, A. C. K.; de TOLEDO, G. S. P.; da SILVA, L. P.; MASCHKE, F.; CHIMAISKY, M.; SIQUEIRA, L. Bagaço de uva como ingrediente alternativo no arraçoamento de coelhos em crescimento. **Ciência Rural**, v, 43, p. 1654-1659, 2013.

KO, B. G.; VOGELER, I.; BOLAN, N. S.; CLOTHIER, B.; GREEN, S.; KENNEDY, J. Mobility of copper, chromium and arsenic from treated timber into grapevines. **Science of the Total Environment**, v. 388, p. 35-42, 2007.

KODURU, J. R & LEE, K. D. Evaluation of thiosemicarbazone derivate as chelating agent for the simultaneous removal and trace determination of Cd (II) and Pb (II) in food and water samples. **Food Chemistry**, v. 150, p. 1-8, 2014.

KREJČOVÁ, A.; LUDVÍKOVÁ, I.; ČERNOHORSKÝ, T.; POUZAR, M. Elemental analysis of nutritional preparations by inductively coupled plasma mass and optical emission spectrometry. **Food Chemistry**. V. 132, p. 588–596, 2012.

KRUG, F. G. **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba, 340 p, 2008.

KRUG, F. G.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: Editora SBQ, 572 p, 2016.

KRUGER, J.; TAYLOR, J. R.; DU, X.; DE MOURA, F. F.; LÖNNERDAL, B.; OELOFSE, A. Effect of phytate reduction of sorghum, through genetic modification, on iron and zinc availability as assessed by an in vitro dialysability bioaccessibility assay, Caco-2 cell uptake assay, and suckling rat pup absorption model. *Food Chemistry*, v. 141, p. 1019-1025, 2013.

LEAL, A.S.; GONÇALVES, C.G.; VIEIRA, I.F.R.; CUNHA, M.R.R.; GOMES, T.C.B.; MARQUES, F.R. Avaliação da concentração de minerais e dos fatores antinutricionais fitato 80 e oxalato em multimisturas da Região Metropolitana de Belo Horizonte/MG. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 35, p. 39-52, 2010.

LI, W.; SIMMONS, P.; SHRADER, D.; HERRMAN, T. J.; DAI, S. Y. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper; iron; manganese and zinc in animal feed and fertilizer. **Talanta**, v. 112, p. 43-48, 2013.

LIKAR, M.; VOGEL-MIKUS, K.; POTISEK, M.; HANCEVIC, K.; RADIC, T.; ECEMER, M.; REGVAR, M. Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition. **Science of the Total Environmental**, v. 505, p.724–731, 2015.

LIMA, A. C. S.; SOARES, D. J.; LARISSA MORAIS RIBEIRO DA SILVA, L. M. R. da.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. de.; MENEZES, E. A. *In vitro* bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 161, p. 142-147, 2014.

LISK, D. J. Absorption and excretion of selenium and barium in humans from consumption of Brazil nuts. **Nutrition reports international**, v. 38, p. 183-191, 1988.

LOPES, L. D. **Desenvolvimento e avaliação de subprodutos de uva e sua utilização como ingrediente alimentício**. 2013, 71 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Programa de pós-graduação em Tecnologia de alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2013.

MACHADO, R. C.; AMARAL, C. D. B.; NÓBREGA, J. A.; ARAUJO NOGUEIRA, A. R. Multielemental Determination of As, Bi, Ge, Sb, and Sn in Agricultural Samples Using Hydride Generation Coupled to Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 4839–4842, 2017.

MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A.; LALANCETTE, N.; HUGHES, G.; WILSON, L.L. Evaluation of a disease warning system for downy mildew of grapes. **Plant Disease**, v.84, p.549-554, 2000.

MAGNA, G. A M.; MACHADO, S. L.; PORTELLA, R. B.; CARVALHO, M. F. Chumbo e Cádmio detectados em alimentos vegetais e gramíneas no município de Santo amaro-Bahia. **Química Nova**, v. 36, p. 989-997, 2013.

MAGNA, G. A. M.; MACHADO, S. L.; PORTELLA, R. B.; CARVALHO, M. de F. Avaliação da exposição ao Pb e Cd em crianças de 0 a 17 anos por consumo de alimentos vegetais cultivados em solos contaminados no município de Santo Amaro (BA). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 19, p. 3–12, 2014.

MAHAN, L. K.; SCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 13. ed. Rio de Janeiro: editora Elsevier, 1227 p, 2012.

MAKRIS, D.P.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-foodsolid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p.125-132, 2007.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, 3. ed. San Diego, United States: Elsevier Science Publishing Co Inc, 672 p, 2012.

MATUSIEWICZ, H.; GOLIK, B. Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization. *Microchemical Journal*. **Microchemical Journal**, v. 76, p. 23–29, 2004.

MELLO, L. M. R de. *Viticultura brasileira: panorama 2016*. Bento Gonçalves, Embrapa (Embrapa, Comunicado técnico 199), 7 p, 2017.

MINDAK, W. R.; CHENG, J.; CANAS, B.J; BOLGER,P. M. Lead in women's and children's vitamins. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 6892–6896, 2008.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIE, C.; CARRRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MARCIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v. 5, p.1113-1124, 2014.

MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; ROMARÍS-HORTAS, V.; MOSCOSO-PÉREZ, C .; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S .; PRADA-RODRÍGUEZ, D. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 324-345, 2011.

MPELASOKA, B. S.; SCHACHTMAN, D. P.; TREEBY, M. T.; THOMAS, M. R. A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. **Australian Journal of grape and wine research**, v. 9, p. 154- 168, 2003.

MUELLER-HARVEY, I.; McALLAN, A. B. Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 151-217, 1992.

MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3408-3412, 2000.

NAVES, R. de L.; TESSMANN, D. J.; GARRIDO, L da R.; SÔNEGO, O. R. **Embrapa**. Sistema de produção de uva de mesa no norte do Paraná. Doenças e seu controle, 2005. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/MesaNorteParana/doencas.htm>>. Acesso em: 17 dez 2018.

NEGRO, C.; TOMASSI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 41–44, 2003.

NIEDZIELSKI, P.; KOZAK, L.; WACHELKA, M.; JAKUBOWSKI, K.; WYBIERALSKA, J. The microwave induced plasma with optical emission spectrometry (MIP–OES) in 23 elements determination in geological samples. **Talanta**, v. 132, p. 591–599, 2015.

NIELSEN, E.; LADEFOGED, O. Barium, inorganic water-soluble compounds. Evaluation of health hazards and proposal of health based quality criteria for soil and drink water. **The Danish Environmental Protection Agency**, 42 p, 2013.

OIV-Organização Mundial do Vinho. Disponível em <<http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf>>. Acesso em: 02 mai 2018.

OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 174-182, 2003.

OLIVEIRA, R. M.; OLIVEIRA, F. M.; HERNANDES, J. V.; JACQUES, A. C. Composição centesimal de farinha de uva elaborada com bagaço da indústria vitivinícola. **Revista CSBEA**, v. 2, 2016.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Comité Codex Alimentarius. General standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex Stan 193-1995, 2018. Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B193-995%252FCXS_193e.pdf. Acesso em: 13 nov 2018.

OOMEN, A. G.; HACK, A.; MINEKUS, M.; ZEIJDNER, E.; CORNELIS, C.; SCHOETERS, G.; SIPS, A. J. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminant. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 3326- 334, 2002.

ORESTE, E. Q.; JESUS, A de.; OLIVEIRA, R. M de.; SILVA, M. M da.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of Hg in biological samples by CV-AAS. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 5 -9, 2013.

ORESTE, E. Q. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de metais e classificação de louças cerâmicas de uso doméstico por técnicas de espectrometria atômica**. 2017, 272 p. Tese (Doutorado em química) – Programa de Pós Graduação em Química, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

OU, K.; CHENG, T.; XING, Y.; LIN, L.; NOURT, R.; LIANG, J. Phytate activity in brown rice during steeping and sprouting. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p.598-603, 2011.

PAN, Q. Trace element and rare earth element profiles in berry tissues of three grape cultivars. **American journal of enology and viticulture**, v.61, p. 401-407, 2010.

PAZ, M. F.; MARQUES, R. V.; SCHUMANN, C.; CORRÊA, L. B.; CORRÊA, É. K. Características tecnológicas de pães elaborados com farelo de arroz desengordurado. **Brazilian Journal of Food Technology, Campinas**, v. 18, n. 2, p. 128-136, 2015.

PEREIRA, C. C. **Frutas vermelhas: concentração total, bioacessível e pré-concentração de metais por técnicas de espectrometria atômica**. 2018. 152p.

Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

PEREIRA, C. C.; DE SOUZA, A. O.; ORESTE, E. Q.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO A. S. Evaluation of the use of a reflux system for sample preparation of processed fruit juices and subsequent determination of Cr, Cu, K, Mg, Na, Pb and Zn by atomic spectrometry techniques. **Food Chemistry**, v. 240, p. 959-964, 2018.

PEREIRA, M. G.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in preconcentration procedures for metal determination using atomic spectrometry techniques. **Microchimica Acta**, v. 141, p. 115-131, 2003.

PEREIRA, V. F.; RESENDE, M. L. V DE.; MONTEIRO, A. C. A.; JÚNIOR, P. M. R.; MURILLO DE ALBUQUERQUE REGINA, M. DE A.; MEDEIROS, F. C. L. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45, p.25-31, 2010.

PERKINELMER INSTRUMENTS. Guide to atomic spectroscopy techniques and applications, 40 p, 2000.

PODDALGODA, D.; MACEY, K.; ASSAD, H.; KRISHNAN, K. Development of biomonitoring equivalents for barium in urine and plasma for interpreting human biomonitoring data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 86, p. 303-311, 2017.

PROTANO, G.; ROSSI, S. Relationships between soil geochemistry and grape composition in Tuscany J., v. 177, p. 500–508, 2014.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Tannat para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p.223-229, 2004.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G, L da.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M. I.; GONÇALVES, A. E. de S. S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v.127, p. 174-179, 2011.

RUGANI, B.; VÁZQUEZ-ROWE, I.; BENEDETTO, G.; BENETTO, E. A comprehensive review of carbon footprint analysis as an extended environmental indicator in the wine sector. **Journal of Cleaner Production**, v.54, p. 61–77, 2013.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SENGUL, H.; SUREK, E.; NILUFER-ERDIL, D. Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. **Food Research International**, v. 62, p. 1069-1079, 2014.

SHIMADZU. Disponível em: <http://www.shimadzu.com.br/analitica/noticias/seminarios/seminario_de_quimica-cc_e_ctgas/AAS-undamentos_e_Instrumentacao.pdf>. Acesso em: 11 de dez de 2018.

SHIRAHIGUE, L.D.; PLATA-OVIEDO, M.; de ALENCAR, S. M.; D'ARCE, M. A. B. R.; VIEIRA, T. M. F de S.; OLDONI, T. L. C.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Wine industry residue as antioxidant in cooked chicken meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 863–70, 2010.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: editor Pioneira Thomson Learning, 2006.

SÔNEGO, O.R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**, 2005. 25p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular técnica, 56).

SORIANO, S.; PEREIRA NETTO, A.D.; CASSELLA, R. J. Determination of Cu, Fe, Mn and Zn by flame atomic absorption spectrometry in multivitamin/multimineral

dosage forms or tablets after an acidic extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 304–310, 2007.

SOUSA, E. C.; UCHÔA-THOMAZ, A. M. A.; CARIOCA, J. O. B.; de MORAIS, S. M.; de LIMA, A.; MARTINS, C. G.; ALEXANDRINO, C. D.; FERREIRA, P. A. T.; RODRIGUES, S. P.; SILVA, J. N.; RODRIGUES, L. L. Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis Vinifera* L.) Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. **Food Science and Technology**, v. 34, p.135-142, 2014.

SOYBEL, D. I. Anatomy and Physiology of the Stomach. **Surgical Clinics of North America**, v. 85, p. 875-894, 2005.

STRAPSSOM, G. C. **Caracterização e utilização do resíduo de produção de vinho no desenvolvimento de alimentos com propriedade funcional**. 2016, 147 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, A. S.; GRINBERG, P.; de CAMPOS, R. C. A geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 25, p. 1132–1144, 2002.

VAREJÃO, E. V. V.; BELLATO, C. R. B.; de MELLO, J. W. V.; FONTES, M. P. F. Otimização das condições de pré-redução do as(v) em extratos do método BCR para quantificação de as por HG-AAS. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 875-833, 2009.

VERSANTVOORT, C. H. M.; OOMEN, A. G.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 31–40, 2005.

VINHOS DO BRASIL. Disponível em: <<http://www.vinhosdobrasil.com.br/pt/aprenda/aprenda-historia>>. Acesso em: 14 dez 2018.

WANG, L.; FENG, R.; GAO, J.; XI, Y.; HUANG, J. Generic sustained release tablets of trimetazidine hydrochloride: Preparation and in vitro–in vivo correlation studies. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 417-426, 2016.

WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; POHL, P. A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods. **Food Research International**, v. 53, p. 922–930, 2013.

WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry. 3. ed. Weinheim: Wiley-Vch, 1999, 955 p.

WILTSCHE, H.; BREENER, I. B.; PRATTES, K.; KNAPP, G. Characterization of a multimode sample introduction system (MSIS) for multielement analysis of trace elements in high alloy steels and nickel axially viewed hydride generation ICP-AES. **Jornal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, p. 1253-1262, 2008.

WHO/FAO – **World and Wealth Organization / Food and Agriculture Organization**. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. Reportado da consulta conjunta de especialistas da WHO/FAO. Geneva. Technical Report Series, n. 916, 2003.

YANG, N.; SUN, H. Bismuth: Environmental Pollution and Health Effects. **Encyclopedia of Environmental Health**, p. 414–420, 2011.

YANG, Y.; DUAN, C.; DU, H.; TIAN, J.; PAN, Q. Trace Element and Rare Earth Element Profiles in Berry Tissues of Three Grape Cultivars. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 61, p. 401-407, 2010.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p. 41- 48, 2006.

ZHANG, Z.; WAGATSUMA, K. Comparison of the analytical performance of high-powered, microwave-induced air plasma and nitrogen plasma atomic emission

spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, p. 699–703, 2002.

ZHU, M.; HUANG, Y.; WANG, Y.; SHI, T.; ZHANG, L.; CHEN, Y.; XIE, M. Comparison of (poly)phenolic compounds and antioxidant properties of pomace extracts from kiwi and grape juice. **Food Chemistry**, v. 271, p. 425–432, 2019.

ZOCHE, R. G. S. **Potencial enológico de uvas Tannat, Cabernet Sauvignon e Merlot produzidas no município de Bagé-RS**. 2009, 144 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

Apendicês

Apêndice A: Gráficos referentes à Tabela 10, sobre a concentração total dos elementos.

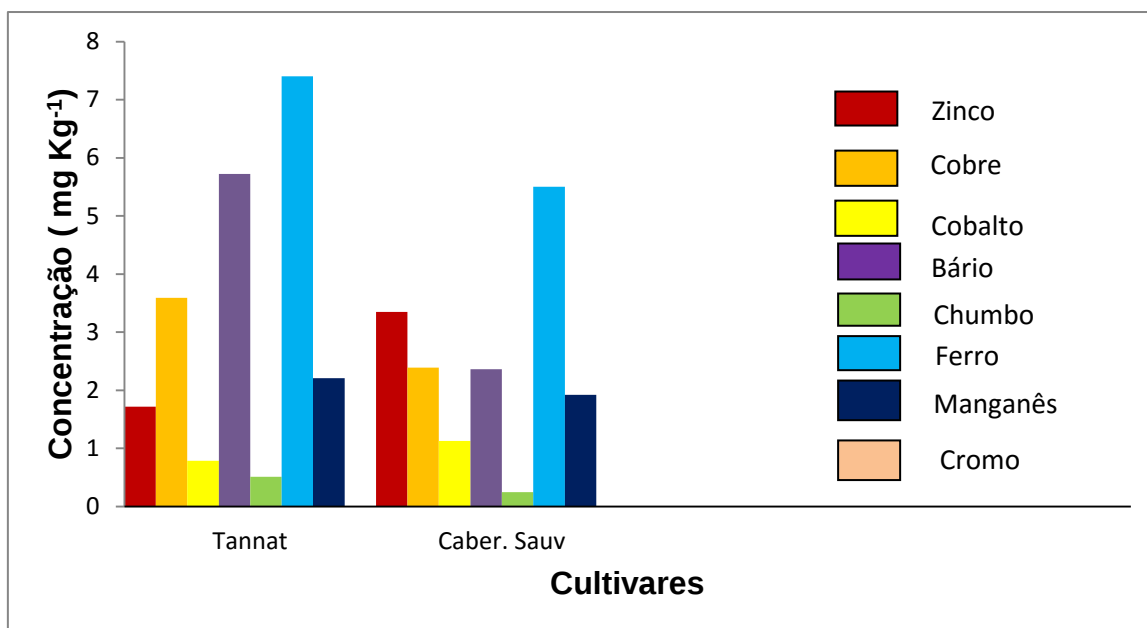


Figura 1: Comparação entre as concentrações dos elementos Zn, Cu, Co, Ba, Pb, Fe, Mn, Cr nas amostras de casca de uva.

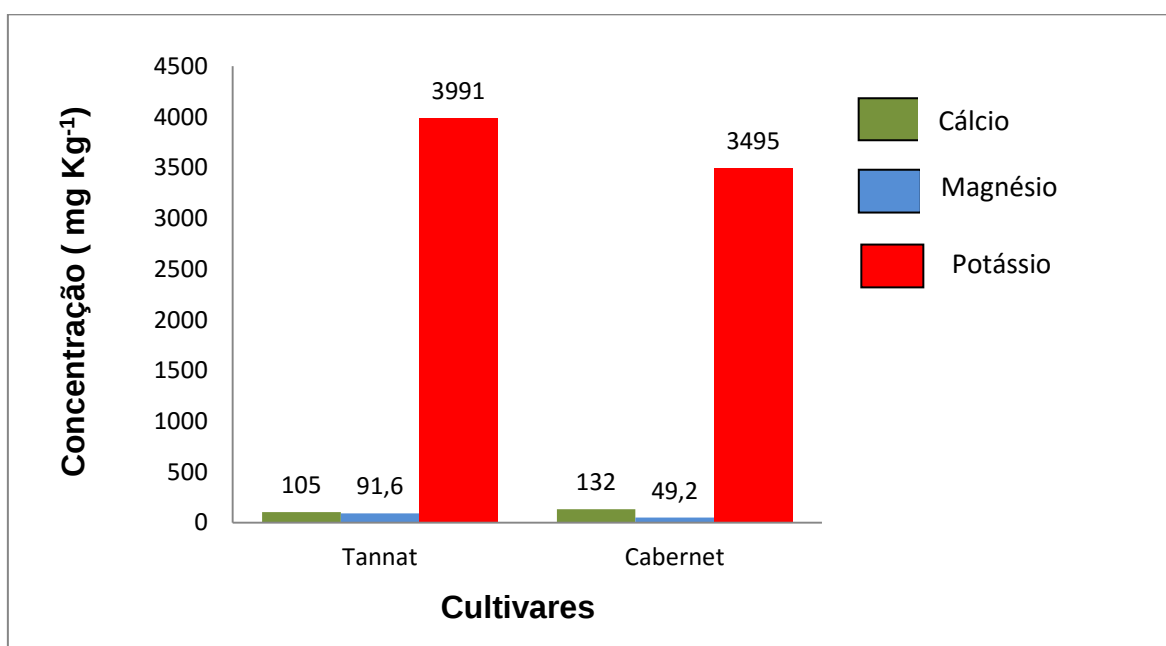


Figura 2: Comparação entre as concentrações totais dos elementos Ca, Mg e K nas amostras de casca de uva.

Apêndice B: Gráfico referente à Tabela 11, sobre a concentração da fração bioacessível.

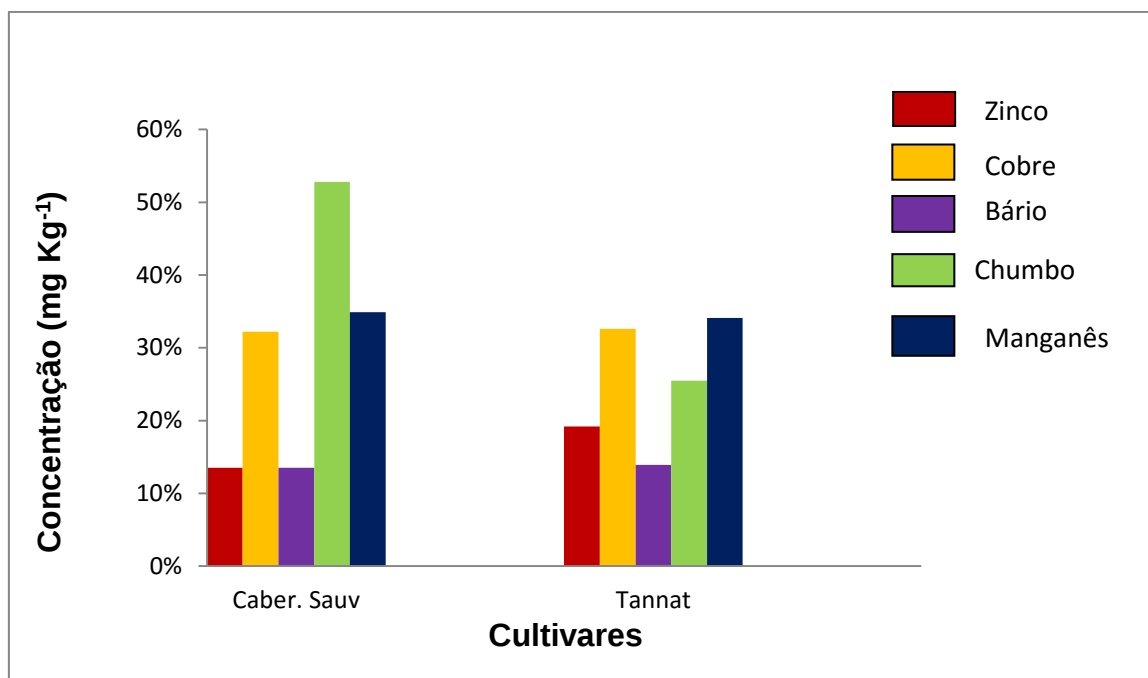


Figura 3: Comparação entre as concentrações bioacessíveis obtidas para Zn, Cu, Ba, Pb e Mn.