



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES

Glaucia Danielle Leirose da Silva

Investigação de Novas Metodologias de Análise e Controle de  
Qualidade para o Ácido Tartárico

Belo Horizonte  
2017

**Glaucia Danielle Leirose da Silva**

**Investigação de Novas Metodologias de Análise e Controle de Qualidade  
para o Ácido Tartárico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Técnicas Nucleares da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências e Técnicas Nucleares

Área de concentração: Ciência das Radiações

Orientador: Prof. Dr. Arno Heeren de Oliveira

Belo Horizonte

2017

S586i Silva, Glaucia Danielle Leirose da.  
Investigação de novas metodologias de análise e controle de qualidade para o ácido tartárico [manuscrito] / Glaucia Danielle Leirose da Silva. - 2017. 91 f., enc.

Orientador: Arno Heeren de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndices: f. 89-91.

Bibliografia: f. 81-88.

1. Engenharia nuclear - Teses. 2. Ácido tartárico - Teses. 3. Análise multivariada - Teses. I. Oliveira, Arno H. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 621.039(043)



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Investigação de Novas Metodologias de Análise e Controle de Qualidade para o Ácido Tartárico**

### GLÁUCIA DANIELLE LEIROSE DA SILVA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES, área de concentração CIÊNCIAS DAS RADIAÇÕES.

Aprovada em 30 de novembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Arno Heeren de Oliveira - Orientador  
Departamento de Engenharia Nuclear - UFMG

Prof. Danilo Chagas Vasconcelos  
IPEMED - Ciências Médicas

Dra. Amenônia Maria Ferreira Pinto  
CDTN/CNEN

Prof. Mario Roberto Martins de Souza Silva Braga  
UNA

Prof. Clarysson Alberto Mello da Silva  
Departamento de Engenharia Nuclear - UFMG

Belo Horizonte, 30 de novembro de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos orientadores:

Arno Heeren e Mme Marie-Florence Grenier-Loustalot.

Professores do Departamento de Engenharia Nuclear:

Antonella Lombardi, Cláudia Pereira, Maria Auxiliadora Fortini, Tarcísio Passos, Clarysson Alberto.

Aos amigos que contribuíram ativamente neste trabalho:

Danilo Vasconcelos, Janine Muniz Toledo, Davidson Lütkenhaus, Isabela Ferreira Lopes, Flávia Vieira Braga, Patrícia Lima Reis.

Colegas e amigos:

Edna Carla, Margarete Guimarães, Adalberto Leles, Roger Ferreira, Victor Hugo, Neriene Alves, Anderson Rosa, Raquel Lage, Fernando Pereira, Fabiana Beghini, Victor Faria, Ana Carolina Vilhena.

Familiares:

Ivan Leirose, Polyane Araújo Leirose, João Guilherme Leirose.

Colaboradores:

Celine Roy, Oriane Tascone, Laure Saint-Lary, François Xavier, Yoann Fillatre, Elisabet Dunach, Elodie Morand, Elisabeth Teulon.

## EPIGRAFE

“Un peu de science éloigne de Dieu, mais beaucoup y ramène.”  
Louis Pasteur

## RESUMO

O ácido tartárico é um ácido orgânico natural encontrado na fermentação de polpas de fruta, principalmente uva e tamarindo. Ele desempenha um importante papel na indústria vinícola além de ser usado como aditivo em diversos setores. Existem três métodos de produção do ácido tartárico: natural como subproduto do vinho, síntese química e síntese biotecnológica. Conhecer o método de produção e origem geográfica deste produto é importante para evitar fraudes comerciais e rotulações falhas, e assim também abordar questões de segurança alimentar para o consumidor. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o ácido tartárico com a finalidade de estabelecer parâmetros de qualificação e rastreabilidade. Diversas técnicas analíticas como UPLC, NMR e FT-IR foram utilizadas visando, inicialmente, identificar a presença de impurezas e/ou traços da rota sintética do ácido tartárico. Porém, os dados obtidos não foram promissores devido a elevada pureza desse produto. A técnica de espectrometria de massas de razão isotópica foi então aplicada associada a análise estatística multivariada. Assim foi possível fazer a distinção com relação ao método de produção e origem geográfica do ácido tartárico. A combinação dessas técnicas permitiu a correta classificação de 100% das amostras de acordo com o método de produção e continente de origem. Também foram avaliados quatro derivados do ácido tartárico: bitartarato de potássio, ácido metatartárico, tartarato de cálcio e tartarato de sódio potássio. A análise da razão isotópica comparada com o ácido tartárico possibilitou a distinção do método de produção, com melhores resultados para o bitartarato de potássio e ácido metatartárico. Mesmo que mais estudos futuros incluindo maior número de amostras de cada grupo sejam necessários para validar esses resultados, pode-se concluir que a análise isotópica associada a análise multivariada deve ser considerada como uma importante metodologia para o estudo e controle de qualidade do ácido tartárico e seus derivados.

**Palavras-chave:** ácido tartárico, análise isotópica, rastreabilidade, análise multivariada.

## ABSTRACT

Tartaric acid is an organic acid, naturally contained in some fruits, especially grape and tamarind. It plays an important role in the wine industry and it is an important additive applied in several sectors. There are essentially three methods of obtaining tartaric acid: natural as a by-product of wine, chemical synthesis and biotechnological synthesis. Information about production method and geographic origin of this product is relevant to avoid commercial frauds and mislabeling, but also to address safety issues to consumers. The objective of this work was to characterize tartaric acid in order to establish parameters of qualification and traceability. Initially several analytical techniques, such as UPLC, NMR and FT-IR, were applied to identify presence of impurities and/or traces from synthetic route of tartaric acid. However, the data obtained was not promising, due to high purity of the products. Then isotope-ratio mass spectrometry technique was applied and distinguished isotopic profiles of the samples were obtained. IRMS associated with different multivariate statistics methods were able to classify tartaric acid samples by production and geographic production of tartaric acid. The combination of both techniques allowed the correct classification of 100% of the samples according to their production method and continent of origin. Four tartaric acid derivatives were also evaluated: potassium bitartrate, metatartaric acid, calcium tartrate and, potassium sodium tartrate. Isotopic analysis of derivatives were compared to isotopic profile of tartaric acid, with notorious results for potassium bitartrate and metatartaric acid. Even though further studies including a larger number of samples in each group are needed in order to validate these findings, we can conclude that isotopic analysis associated with multivariate analysis should be considered as an important methodology for the study and quality control of tartaric acid and its derivatives.

**Key words:** tartaric acid, isotope analysis, traceability, multivariate analysis.



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
1.1    Objetivos Específicos .....	19
<b>CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
1.1    Produtos Naturais .....	20
1.2    Ácido Tartárico.....	21
1.2.1    Propriedades .....	21
1.2.2    Tecnologias de produção.....	23
1.2.3    Aplicações .....	27
1.2.4    Aspectos econômicos .....	28
1.2.5    Regulamentação .....	31
<b>CAPÍTULO 2. INVESTIGAÇÃO DE IMPUREZAS E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO TARTÁRICO .....</b>	<b>33</b>
2.1    Parte experimental .....	33
2.1.1    Extrações .....	33
2.1.2    Ponto de fusão .....	33
2.1.3    Cromatografia líquida de ultra eficiência.....	34
2.1.4    Cromatografia quiral .....	35
2.1.5    Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier .....	36
2.1.6    Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	37
2.2    Resultados e discussão.....	38
2.2.1    Investigação de impurezas por extração.....	38
2.2.2    Investigação de impurezas por UPLC .....	40

2.2.3	Ensaio de caracterização.....	45
2.3	Conclusão .....	51
<b>CAPÍTULO 3. ANÁLISE ISOTÓPICA DO ÁCIDO TARTÁRICO.....</b>		<b>52</b>
3.1	Aspectos gerais .....	52
3.1.1	Análise isotópica .....	52
3.1.2	Espectrometria de massas de razão isotópica.....	54
3.1.3	Notações e padrões para análises isotópicas .....	59
3.1.4	Análise multivariada .....	60
3.2	Parte experimental .....	62
3.2.1	Determinação de razão isotópica.....	62
3.2.2	Análise estatística.....	63
3.3	Resultados e discussão.....	64
3.3.1	Método de produção.....	64
3.3.2	Origem geográfica.....	66
3.4	Conclusão .....	68
<b>CAPÍTULO 4. ANÁLISE ISOTÓPICA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO TARTÁRICO.....</b>		<b>69</b>
4.1	Aspectos gerais .....	69
4.1.1	Bitartarato de potássio .....	69
4.1.2	Tartarato de cálcio .....	70
4.1.3	Tartarato de sódio e potássio .....	70
4.1.4	Ácido metatartárico .....	70
4.2	Parte experimental .....	72
4.2.1	Análise dos derivados do ácido tartárico por IRMS .....	72
4.3	Resultados e discussão.....	73
4.4	Conclusão .....	78
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES.....</b>		<b>79</b>

5.1	Perspectivas futuras .....	80
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do ácido tartárico. ....	21
Figura 2. Representação das estruturas do ácido tartárico. Modificado de [11]. ....	23
Figura 3. Gestão da produção do ácido tartárico dentro do processo de produção de vinho. ..	24
Figura 4. Processo de produção do ácido tartárico (TA) e seus principais sais, tartarato de cálcio (CaT), tartarato de sódio e potássio (KNaT) e bitartarato de potássio (KTA). Modificado de [15]. ....	26
Figura 5. Estrutura do ácido cis-epóxi succínico. ....	27
Figura 6. Mercado consumidor de ácido tartárico. Modificado de [34]. ....	29
Figura 7. Volume do mercado mundial do ácido tartárico por aplicação, 2012-2020 (em mil toneladas) [36]. ....	29
Figura 8. Progresso do consumo de ácido tartárico proveniente da China na Europa. Fonte: Faure S.A. ....	30
Figura 9. Comparativo da evolução do preço do ácido tartárico proveniente da Europa e China. Fonte: Faure S.A. ....	31
Figura 10. Cromatograma do ácido tartárico sintético, Parâmetros A. ....	39
Figura 11. Cromatograma do ácido tartárico sintético, Parâmetros B. ....	40
Figura 12. Cromatogramas dos padrões do ácido tartárico, ácido maleico e anidrido maleico. ....	41
Figura 13. Cromatograma e espectro de massas do anidrido maleico. ....	42
Figura 14. Comparação entre os cromatograma de ácido tartárico sintético (A) e natural (B). ....	43
Figura 15. Cromatograma GC-FID para o ácido tartárico L(+) e DL com três tempos de injeções após a metilação. ....	46
Figura 16. Cromatograma GC-FID para o ácido tartárico L(+) e DL variando a quantidade de agente de metilação. ....	47
Figura 17. Cromatograma para diferentes porcentagens de L(+)/D(-) do ácido tartárico. ....	47
Figura 18. Espectro de FTIR para o ácido L(+)-tartárico natural, ácido L(+)-tartárico sintético e ácido DL-tartárico. ....	49
Figura 19. Espectro do <sup>13</sup> C-NMR para as amostras do ácido L(+)-tartárico natural, ácido L(+)-tartárico sintético e ácido DL-tartárico. ....	50
Figura 20. Espectro do <sup>1</sup> H-NMR para as amostras do ácido L(+)-tartárico natural, ácido L(+)-tartárico sintético e ácido DL-tartárico. ....	50

Figura 21. Esquema de um espectrômetro de massa de razão isotópica na análise de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . Modificado de [66].	56
Figura 22. Diagrama esquemático do analisador elementar com IRMS (EA-IRMS). Modificado de [62; 66].	57
Figura 23. Diagrama esquemático do EA/IRMS em modo de pirólise (TC/EA-IRMS). Modificado de [62; 66].	58
Figura 24. Gráfico de PCA para método de produção usando os dois primeiros componentes principais para dados de $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ .	65
Figura 25. Gráfico de PCA para origem geográfica de ácidos tartáricos naturais usando os dois primeiros componentes principais para dados de $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ .	66
Figura 26. Estrutura do ácido tartárico e seus principais derivados.	69
Figura 27. Formação do ácido metatartárico [78].	70
Figura 28. Gráfico da análise de componente principal para o ácido metatartárico.	75
Figura 29. Gráfico da análise de componente principal para o bitartarato de potássio e tartarato bruto.	75
Figura 30. Gráfico da análise de componente principal para o tartarato de cálcio.	77
Figura 31. Gráfico da análise de componente principal para o tartarato de sódio potássio.	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do ácido tartárico.....	22
Tabela 2. Classificação dos subprodutos do vinho. ....	24
Tabela 3. Divisão do mercado do ácido tartárico.....	28
Tabela 4. Produção e consumo do ácido tartárico na Europa. ....	30
Tabela 5. Percentual de recuperação nas extrações de ácido tartárico sintético. ....	38
Tabela 6. Razão massa/carga do ácido tartárico e seus reagentes.....	40
Tabela 7. Variação da tensão do capilar na análise de ácido cis-epoxisuccínico.....	44
Tabela 8. Variação da tensão do cone na análise de ácido cis-epoxisuccínico.....	44
Tabela 9. Influência da quantidade de ácido tartárico na identificação de ácido cis-epoxisuccínico.....	45
Tabela 10. Abundância de isótopos estáveis naturais do hidrogênio, carbono e oxigênio. ....	52
Tabela 11. Razões isotópicas dos padrões de referência do hidrogênio, carbono e oxigênio..	60
Tabela 12. Razões de isótopos estáveis de carbono, oxigênio e hidrogênio do ácido tartárico para diferentes métodos de produção e origens geográficas. ....	64
Tabela 13. Propriedades do L(+)-ácido tartárico e alguns de seus derivados.....	71
Tabela 14. Razões de isótopos estáveis de carbono, oxigênio e hidrogênio para o ácido tartárico e derivados.....	73

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Notação delta de variação de isótopos estáveis
$\sigma$	Desvio padrão
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> (Reflexão Total Atenuada)
CNRS	<i>Centre National de la Recherche Scientifique</i>
DA	<i>Discriminant analysis</i> (Análise Discriminante)
EA-IRMS	<i>Elemental analyser - Isotope ratio mass spectrometry</i> (Analisador Elementar - Espectrometria de Massas de Razão Isotópica)
EEC	<i>European Economic Community</i>
EI	<i>Electron Ionisation</i> (Impacto de Elétrons)
ERINI	<i>European Research Institute on Natural Ingredients</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT/IR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier)
GC-FID	<i>Gas Chromatography - Flame Ionization Detector</i> (Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas)
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IEAE	<i>International Atomic Energy Agency</i> (Agência Internacional de Energia Atômica)
IRMS	<i>Isotope-ratio Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas de Razão Isotópica)
m/z	Relação massa/carga

NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear)
OIV	<i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i> (Organização Internacional da Vinha e do Vinho)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCA	<i>Principal Componentes Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PDB	<i>Pee Dee Belemnite</i> Padrão de referência internacional para a razão isotópica do carbono, substituído por VPDB
SMOW	<i>Standard Mean Ocean Water</i> (Padrão da Água Média do Oceano) Padrão de referência internacional para a razão isotópica do hidrogênio e oxigênio, substituído por VSMOW
TC/EA-IRMS	<i>Thermal conversion/Elemental analyser - Isotope ratio mass spectrometry</i> (Conversão térmica/Analisador Elementar - Espectrometria de Massas de Razão Isotópica)
TMSH	Trimetilsulfonio hidróxido
UNICE	<i>Université Nice Sophia Antipolis</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
VPDB	<i>Vienna Pee Dee Belemnite</i> Padrão de referência internacional para a determinação da razão isotópica do carbono
VSMOW	<i>Vienna Standard Mean Ocean Water</i> Padrão de referência internacional para a razão isotópica do hidrogênio e oxigênio



## INTRODUÇÃO

Produtos naturais são importantes fontes primárias para diversos tipos de indústrias. Um relevante e forte crescimento do mercado destes produtos vem se destacando ao longo das últimas décadas. Dois fatores que conduziram a isto podem ser destacados: mudanças nas regulamentações e aumento da demanda do consumidor [1]. De outra parte, a síntese química apresenta processos e técnicas de produção de compostos sintéticos similares aos naturais. A diferença entre os compostos naturais e sintéticos vem se tornando cada vez menor.

Produtos de origem natural são expostos a múltiplas fontes de fraude e adulterações, sendo a principal dela com relação a sua origem natural. Outros tipos comuns de fraude são quanto a origem geográfica e adição de substâncias adulterantes. Além disso, soma-se o desafio de controlar substâncias naturais complexas na indústria, já que isso demanda tecnologia e conhecimentos científicos elevados sobre qualificação e autenticação [2]. Desse modo, pesquisa e desenvolvimento de métodos de caracterização de produtos naturais são essenciais para garantir a sua qualidade e para segurança dos consumidores. Um produto natural que ilustra perfeitamente esta problemática é o ácido tartárico.

O ácido tartárico é um composto orgânico de forma molecular  $C_4H_6O_6$ . Sua nomenclatura oficial é ácido 2,3-dihidroxitartárico. Este ácido orgânico é amplamente aplicado na indústria alimentícia, farmacêutica e têxtil. É encontrado na fermentação de polpas de fruta, principalmente uva e tamarindo [3; 4]. Ele pode ser sintetizado pela reação do anidrido maleico com peróxido de hidrogênio [5], sendo este primeiro um produto derivado do petróleo. Outra forma de produção é a síntese biotecnológica, na qual o ácido cis-epóxissuccínico, também derivado do petróleo, é convertido em L(+)-ácido tartárico [6].

Atualmente, há uma ausência de legislação e normas específicas que permitam diferenciar e qualificar o ácido tartárico de acordo com sua origem. Este vácuo legal impossibilita a garantia de qualidade para o consumidor. E como as aplicações do ácido tartárico chegam diretamente ao consumidor, seja por alimentos ou produtos de higiene, esta falta de clareza quanto a sua forma de produção impede a escolha do consumidor por produtos naturais.

Este trabalho foi dividido em cinco capítulos, cada um descrito a seguir. O Capítulo 1 foi apresentado uma revisão bibliográfica sobre o ácido tartárico trazendo um panorama sobre suas propriedades, processos de produção, aspectos econômicos e atual legislação. Em seguida, o Capítulo 2 trata sobre a investigação de prováveis impurezas provenientes da síntese do ácido tartárico, como um meio de identificar sua origem. E também o uso de diferentes técnicas

analíticas para caracterizar o ácido tartárico. O Capítulo 3 relata a aplicação da espectrometria de massas de razão isotópica com análise multivariada para classificação do ácido tartárico de acordo com seu modo de produção e origem geográfica. Os derivados do ácido tartárico foram estudados no Capítulo 4 através de análise isotópica, comparando-os com os resultados do ácido tartárico. E então, no Capítulo 5, as principais conclusões obtidas são apresentadas bem como as perspectivas futuras deste trabalho.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar o ácido tartárico com a finalidade de estabelecer parâmetros de qualificação e rastreabilidade.

### **1.1 Objetivos Específicos**

- Estudar o ácido tartárico e seus diferentes métodos de produção;
- Utilizar técnicas cromatográficas e espectroscópicas para verificar a presença de impurezas e/ou traços que identifiquem sua origem;
- Caracterizar do ácido tartárico com relação à suas propriedades físico-químicas;
- Determinar razões isotópicas de ácido tartárico de diferentes origens;
- Identificar relações de razões isotópicas com método de produção e origem geográfica;
- Determinar razões isotópicas de derivados do ácido tartárico;
- Analisar a origem dos derivados comparando com ácido tartárico natural e sintético.

# CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Produtos Naturais

Produtos naturais podem ser de fonte terrestre ou marinha, como plantas, animais e microrganismos. Para que um produto possa ser denominado como produto natural ele deve pertencer a um dos seguintes casos [2]:

- Ser um organismo inteiro que não foi submetido a nenhum tipo de processo ou tratamento, a não ser processos de preservação;
- Parte de um organismo;
- Extrato de um organismo ou parte dele;
- Composto puro isolado de organismos;
- Metabólitos secundários, produzidos por um organismo que não os necessita estritamente para a sobrevivência.

Os produtos naturais extraídos de plantas exercem um papel importante na economia. São usados nos mais diversos tipos de indústrias, principalmente alimentícia e farmacêutica. Podem também atuar como modelos estruturais para a síntese de novas substâncias. Seu uso é observado desde as mais antigas civilizações [7].

O conhecimento das estruturas e propriedades dessas substâncias é primordial para desenvolver suas aplicações e ainda garantir a segurança de quem faz uso da mesma. A caracterização desses produtos é realizada há mais de 200 anos. Porém, a análise de compostos naturais nunca foi simples. A quantidade de compostos orgânicos, a dificuldade de separação e a baixa concentração são fatores complicadores na análise orgânica. Estudos dos produtos naturais evoluíram significativamente, juntamente com o avanço das técnicas de caracterização. Assim, novos métodos e procedimentos foram desenvolvidos, apesar de ainda não abrangerem todas as substâncias conhecidas. Ademais, o desenvolvimento da ciência gerou também novas rotas de sínteses. Produtos antes exclusivamente naturais, agora são fabricados sinteticamente em escala industrial. Logo, criou-se a necessidade de diferenciação da origem desses produtos. Atualmente, é plausível obter alto teor de purificação, assim como detectar elementos em nível ultra traço. Como efeito, novos estudos podem documentar a história de uma substância, determinando sua origem, contaminação, concentração real e adição, subtração ou substituição de constituinte [8].

Um ramo importante de produtos naturais são os ácidos orgânicos. Diversos ácidos orgânicos são de origem natural e fazem parte do nosso cotidiano, o ácido tartárico é um exemplo.

## 1.2 Ácido Tartárico

O ácido tartárico é um ácido orgânico natural encontrado na fermentação de polpas de fruta, principalmente uva e tamarindo. O ácido tartárico é um composto orgânico de forma molecular  $C_4H_6O_6$ , sua estrutura está representada na Figura 1. Sua nomenclatura oficial é ácido 2,3-dihidroxiбутanodioico.

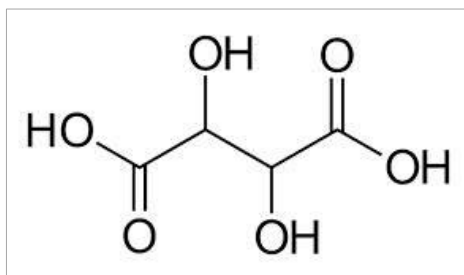


Figura 1. Estrutura do ácido tartárico.

Desde a Antiguidade, gregos e romanos conheciam o ácido tartárico e seus derivados como subprodutos da fermentação da uva. O nome deste ácido tem origem medieval, do termo *tartarus*. A partir do tartarato de potássio, o químico islâmico Jabir ibn Hayyan foi o primeiro a isolar o ácido tartárico, em 800 [9]. O método moderno de obtenção foi desenvolvido em 1769, pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele. O isolamento foi feito a partir do creme de tártaro, um sal ácido de potássio do ácido tartárico ( $KC_4H_5O_6$ ). Scheele ebuliu creme de tártaro com giz e, em seguida, tratou com ácido sulfúrico [10; 11]

Já em 1832, Jean Baptiste Biot, físico e matemático francês, descobriu a propriedade de desvio da luz polarizada do ácido tartárico. O estudo dessa propriedade foi aprofundado por Louis Pasteur, em 1847. Ele observou diferença de formatos nos cristais de ácido tartárico. Pasteur usou pinças muito finas para separar os dois tipos de cristais do ácido, descobrindo sua assimetria. Assim, foi feito o primeiro isolamento dos isômeros, ácido tartárico L(+) e ácido tartárico D(-) [12]. A diferença entre eles era a direção de desvio da luz polarizada, quando em solução. Os sinais, positivo e negativo, foram adotados aos nomes do ácido por convenção. Estudos com o ácido tartárico continuaram na busca de métodos de obtenção e purificação mais simples e eficientes, de forma a possibilitar seu processamento comercial.

### 1.2.1 Propriedades

O ácido tartárico apresenta dois grupos de hidroxila (OH) e dois grupos carboxílicos (COOH). Este composto é estável e, quando isolado, é um sólido cristalino branco, inodoro e solúvel em água. Apresenta seu forte paladar ácido, por apresentar pH próximo a 1,6. Na Tabela 1 encontram-se as principais propriedades físico-químicas deste ácido.

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do ácido tartárico

Propriedade	Valor
Nome oficial	Ácido 2,3-dihidroxiбутanodioico
Fórmula molecular	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>
Massa molecular	150,09g.mol <sup>-1</sup>
Estado físico	Sólido
Aparência	Branco, cristalino
Odor	Não apresenta
Sabor	Muito azedo
Solubilidade em água	1390g.L <sup>-1</sup> (20°C)
Ponto de fusão	168-170°C
Densidade aparente	1,76g.cm <sup>-3</sup>
Decomposição térmica	>170°C
pH	~1,6
Ponto de inflamabilidade	210°C
Rotação específica	Entre +11,5° e +13,5° (em solução aquosa, 20°C)

Fonte: [12; 13].

Outra importante característica do ácido tartárico é a presença de dois centros quirais que apresentam os mesmos substituintes. Dois dos quatro estereoisômeros possíveis para esta substância são idênticos devido ao seu plano de simetria. Os três estereoisômeros do ácido tartárico estão representados na Figura 2. Duas dessas formas são opticamente ativas: ácido L(+)-tartárico e ácido D(-)-tartárico. Sendo que o L(+) desvia o plano de vibração da luz polarizada para a esquerda (levógiro) e o D(-) desvia o plano de vibração da luz polarizada da luz para a direita (dextrógiro). Eles são enantiômeros, ou seja, imagens especulares um do outro. Já a terceira forma é um aquiral diastereoisômero de ambos os enantiômeros, ácido dextro e levotartárico. Ele é denominado ácido meso-tartárico e é opticamente inativo. Ainda é possível obter uma mistura racêmica dos dois enantiômeros, a qual é denominada DL-tartárico [10; 14].

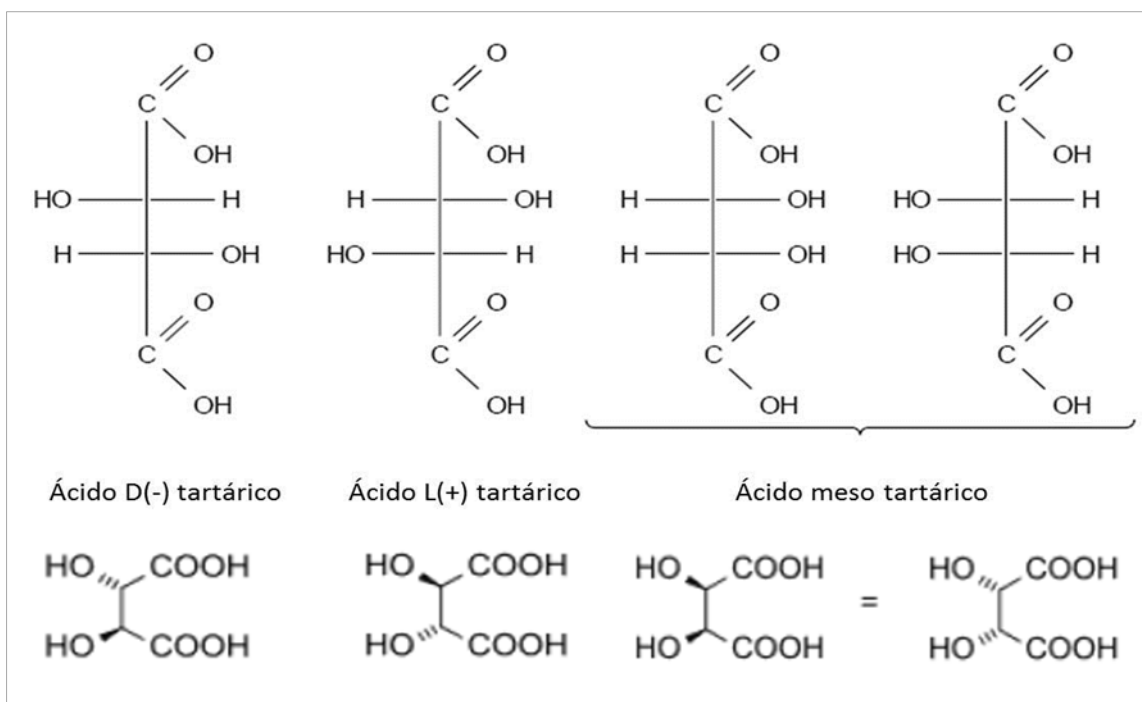


Figura 2. Representação das estruturas do ácido tartárico. Modificado de [11].

O ácido tartárico é obtido natural e sinteticamente em grande quantidade na forma L(+) e apresenta diversas aplicações. A mistura racêmica e o ácido meso tartárico podem ser produzidos industrialmente. Enquanto a forma D(-) é rara e quase não apresenta aplicabilidade [15; 16].

### 1.2.2 Tecnologias de produção

Existem comercialmente três métodos de obtenção do ácido tartárico: produção natural como um subproduto do vinho, síntese química e síntese biotecnológica.

#### 1.2.2.1 Produção natural

As substâncias de partida para a produção do ácido L(+)-tartárico são subprodutos da vinificação. Normalmente, o ácido tartárico está presente como um sal, sendo o mais comum o bitartarato de potássio ( $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ), seguido em menor quantidade do tartarato de cálcio ( $\text{CaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ). Subprodutos do vinho são utilizados na produção do ácido tartárico e são classificados de acordo com a sua formação e concentração de bitartarato de potássio, como descrito na Tabela 2 [13].

Tabela 2. Classificação dos subprodutos do vinho.

Subproduto	Concentração de bitartarato de potássio	Formação
Tártaro bruto	80-90%	Parede dos recipientes de fermentação
Borra	19-38%	Fundo dos recipientes de fermentação
Borra seca	55-70%	Borra tratada
Bagaço de uva	-	Esmagamento da uva

Fonte: [13].

Nas destilarias o tartarato é obtido na forma de tartarato de cálcio, borras e bagaços de uva são tratados com hidróxido de cálcio.

Para a produção do ácido tartárico, subprodutos do vinho e resíduos se tornam matéria-prima e tem diferentes caminhos no processo industrial devido as diferenças na sua composição e características. Na Figura 3 é apresentado um esquema do processamento dos subprodutos tartáricos dentro do processo de produção do vinho. Três caminhos são possíveis para obter o ácido tartárico. Este esquema foi baseado e fornecido por uma empresa francesa produtora de ácido tartárico.

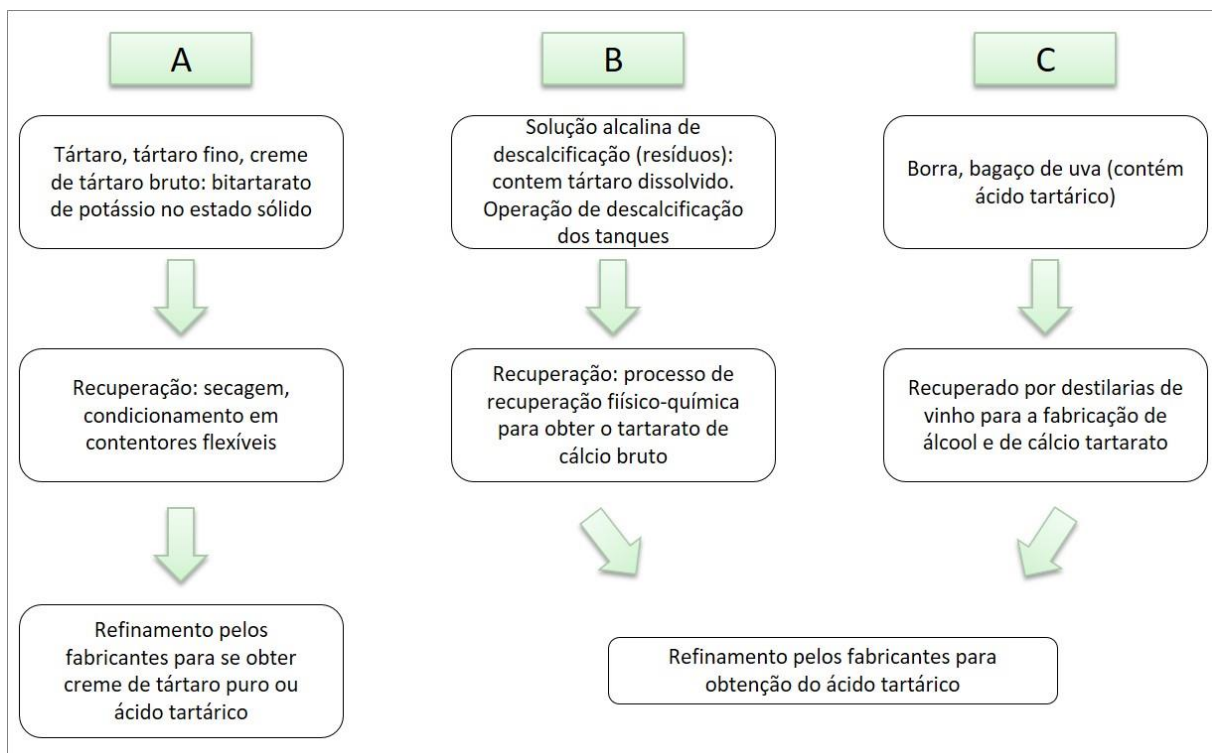
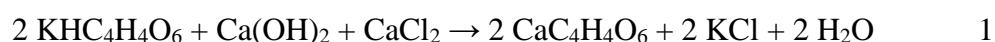


Figura 3. Gestão da produção do ácido tartárico dentro do processo de produção de vinho.

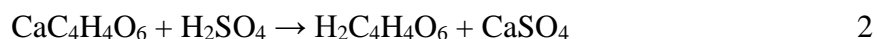


A preparação da matéria-prima para a produção de ácido tartárico consiste basicamente em ebulição com água, filtração e cristalização do líquido destilado. Em seguida, é realizada uma etapa de secagem, na qual o material é aquecido até 160° por cerca de duas horas [3; 15].

A produção de ácido tartárico inicia-se com a formação do tartarato de cálcio. Solução de hidróxido de cálcio ou carbonato de cálcio é adicionado lentamente ao bitartarato de potássio bruto, juntamente com cloreto de cálcio ou sulfato de cálcio para uma reduzir perdas, Equação 1. O tartarato de cálcio formado apresenta baixa solubilidade em água (0,525 g.L<sup>-1</sup>, 20°C), possibilitando a precipitação do produto.



A separação do tartarato de cálcio da solução é feita por centrifugação. Os cristais precipitados são retirados e a solução residual é tratada. O tartarato de cálcio é convertido em ácido tartárico por tratamento com ácido sulfúrico 5% em excesso, Equação 2. Tartarato proveniente das destilarias não necessitam dessas etapas prévias, portanto segue por este mesmo tratamento com ácido sulfúrico.

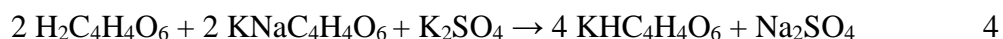


O sulfato de cálcio formado é insolúvel em água e é separado por filtração. A solução de ácido tartárico é concentrada e resfriada lentamente para cristalização e, em seguida, os cristais são secos. O produto obtido apresenta pureza de 99,9%, aproximadamente.

Outros sais do ácido tartárico apresentam aplicabilidade e valor econômico, sendo também produzidos em escala industrial, principalmente o tartarato de sódio e potássio e o bitartarato de potássio. Tartarato de sódio e potássio (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>), também conhecido como sal de Rochelle ou sal de Seignette, é produzido a partir bitartarato de potássio com carbonato de sódio, Equação 3. Após filtração e centrifugação, o sólido resultante é levado e seco, obtendo-se o produto final.



Já o bitartarato de potássio, ou creme de tártaro, pode ser obtido diretamente do tártaro bruto, sendo necessário apenas um processo de purificação. Ele também pode ser produzido a partir de solução de ácido tartárico com solução de sal de Rochelle acrescida de sulfato de potássio, Equação 4.



Na Figura 4 o diagrama agrupa as etapas básicas da produção do ácido tartárico e seus principais sais.

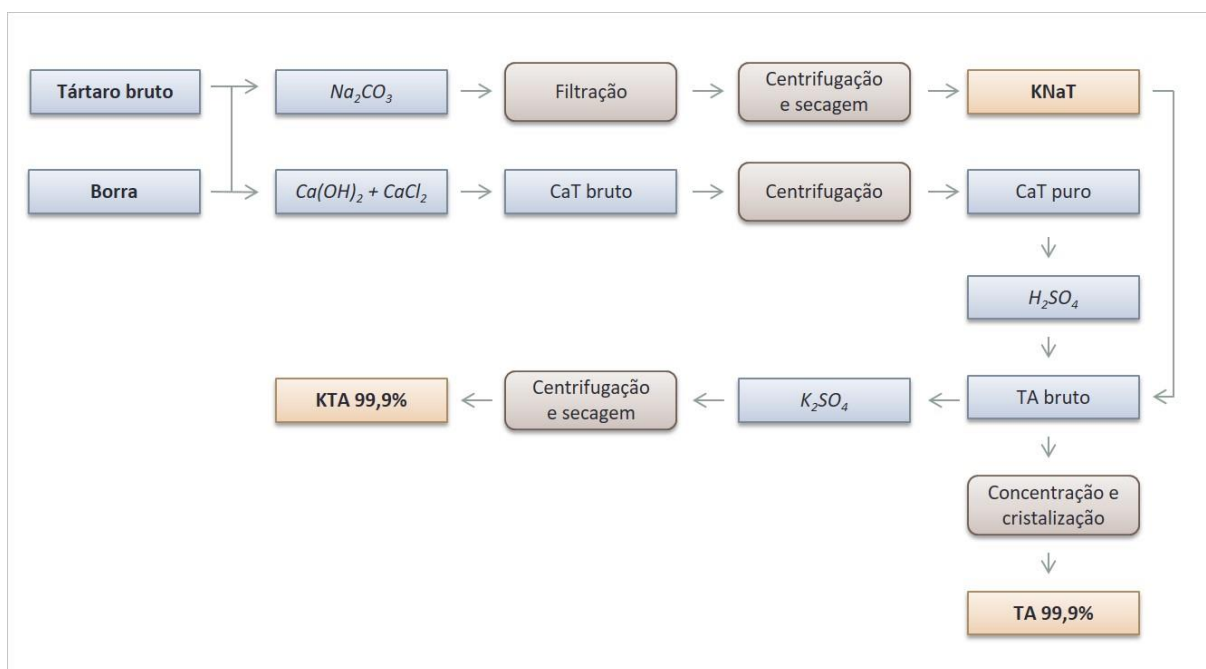


Figura 4. Processo de produção do ácido tartárico (TA) e seus principais sais, tartarato de cálcio (CaT), tartarato de sódio e potássio (KNaT) e bitartarato de potássio (KTA). Modificado de [15].

### 1.2.2.2 Síntese química

Uma rota sintética para produção do ácido tartárico em grande escala para propósitos comerciais foi descrita por Church (1951). Esta síntese é realizada a partir do ácido maleico, que é uma substância derivada do petróleo. Ela consiste na hidroxilação do ácido maleico ( $C_4H_4O_4$ ) com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), na presença do ácido tungstíco ( $H_2WO_4$ ) como catalisador [5]. O composto intermediário formado, ácido cis-epóxi succínico ( $C_4H_4O_5$ ), é hidrolisado para a formação do ácido tartárico [17].

A solução formada é concentrada e o produto é cristalizado em baixa temperatura e seco, obtendo-se ácido tartárico de alta pureza.

### 1.2.2.3 Síntese biotecnológica

Uma segunda forma de obtenção do ácido tartárico a partir do ácido cis-epóxi succínico é através da sua fermentação. Uma enzima capaz de hidrolisar o grupo epóxi do ácido epóxi succínico é adicionada neste processo, Figura 5. Ela pode ser proveniente de diversas espécies como *Nocardia*, *Acetobacter*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*,

*Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus* [18; 19; 20]. As vantagens desta forma de produção é seu baixo custo, abundância do ácido epóxi succínico e alta seletividade da biotransformação em ácido L(+)-tartárico [6].

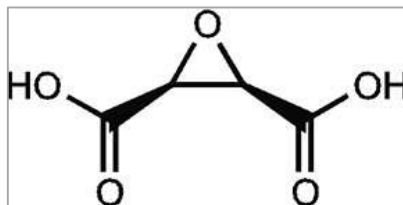


Figura 5. Estrutura do ácido cis-epóxi succínico.

Neste método um microrganismo é incubado em meio de cultura e adiciona-se uma solução de ácido cis-epóxi succínico. A enzima hidrolase ácido cis-epoxisuccínico catalisa a hidrólise do ácido cis-epoxisuccínico racêmico para a forma ácido L(+)-tartárico. Cloreto de cálcio ou outro sal de cálcio deve ser adicionado à solução, caso ela não contenha cálcio. Os cristais de tartarato de cálcio formados são separados por filtração. A recuperação do tartarato em ácido tartárico é realizada em uma resina de troca iônica [21].

### 1.2.3 Aplicações

O ácido tartárico é uma substância amplamente utilizada na indústria. Os principais ramos da indústria que fazem uso deste composto são o alimentício e o farmacêutico. Ele é um importante controlador de acidez e colabora no controle de microrganismos [15].

A aplicação mais importante do ácido L(+)-tartárico é na produção de vinho. Dentre os ácidos orgânicos presentes no vinho, ele é o mais forte [22]. Este ácido influencia diretamente no pH e características sensoriais do vinho. Mesmo estando presente naturalmente nas uvas em forma salificada, ele pode ser adicionado no processo de produção. Em grande quantidade, o ácido tartárico concede aspereza e adstringência ao vinho; já em concentrações adequadas, é responsável pela sua fineza ácida [23].

Continuando na indústria alimentícia, o ácido tartárico e seus sais são usados como intensificadores de sabor, especialmente em sabores de uva. Em bebidas carbonatadas é utilizado como regulador de acidez. E na panificação, é utilizado como fermento. Ele reage com o bicarbonato de sódio e libera dióxido de carbono gasoso, provocando o crescimento de massas e misturas, sem a necessidade de adição de culturas de leveduras [12]. Ademais, o ácido tartárico pode ser usado como conservante, estabilizador, antiaglomerante e espessante [24]. Os produtos nos quais se pode encontra-lo são os mais diversos, por exemplo: sobremesas, sucos

artificiais, balas, geleias, frutas e vegetais em conserva, goma de mascar e chocolate em pó [10; 25; 26; 27].

Outra área industrial que utiliza a combinação de produtos tartáricos e bicarbonato de sódio é a farmacêutica; eles são adicionados em produtos efervescentes [28]. Em produtos de higiene o ácido tartárico é encontrado em shampoos e hidratantes corporais [25].

Em menor escala, ele é usado na fabricação de cimento, gesso e produtos têxteis [29]. Na síntese orgânica, este ácido é utilizado em separações enantiosseletivas e em formações de complexos com metais [30; 31]

#### **1.2.4 Aspectos econômicos**

O mercado do ácido tartárico é considerado em crescimento e promissor. A produção de vinhos representa a maior parte da aplicação desta substância, seguido do uso como emulsificantes e produtos farmacêuticos, como descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Divisão do mercado do ácido tartárico.

Mercado	Porcentagem
Bebidas alcoólicas	30%
Emulsificantes	20%
Farmacêuticos	15%
Alimentos	10%
Têxtis	10%
Eletroquímicos	10%
Outros	5%

Fonte: [15].

Como pode ser observado na Figura 6, a Europa é o maior mercado consumidor do ácido tartárico. Sendo a Europa a região com os maiores produtores de vinho esse amplo consumo era esperado. Em 2012, de acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), os maiores países produtores de vinho são França, Itália e Espanha [32; 33]. Não foram encontrados dados de produção e/ou consumo de ácido tartárico no Brasil.

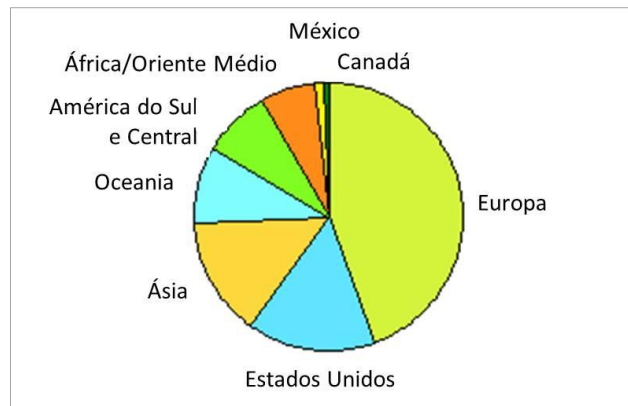


Figura 6. Mercado consumidor de ácido tartárico. Modificado de [34].

No início dos anos 2000 a estimativa de produção mundial deste ácido era de 58000 toneladas. Já a do seu sal, bitartarato de potássio, era de 20000 toneladas [15]. A demanda mundial deste produto somente em bebidas e alimentos foi de cerca de 28000 toneladas em 2010. Enquanto na América Latina foi esperado um consumo acima de 10000 toneladas no mesmo ano [35]. A expectativa de crescimento do mercado global do ácido tartárico foi de aproximadamente 2,25%, no período de 2001 a 2010. Novos índices apontam que, dos anos de 2009 a 2014, o consumo global do ácido tartárico e seus derivados cresce a uma taxa anual de 3,4% [34]. A Figura 7 mostra uma projeção do mercado global do ácido tartárico até 2020. Observa-se que em todas as áreas industriais o crescimento do mercado é esperado.

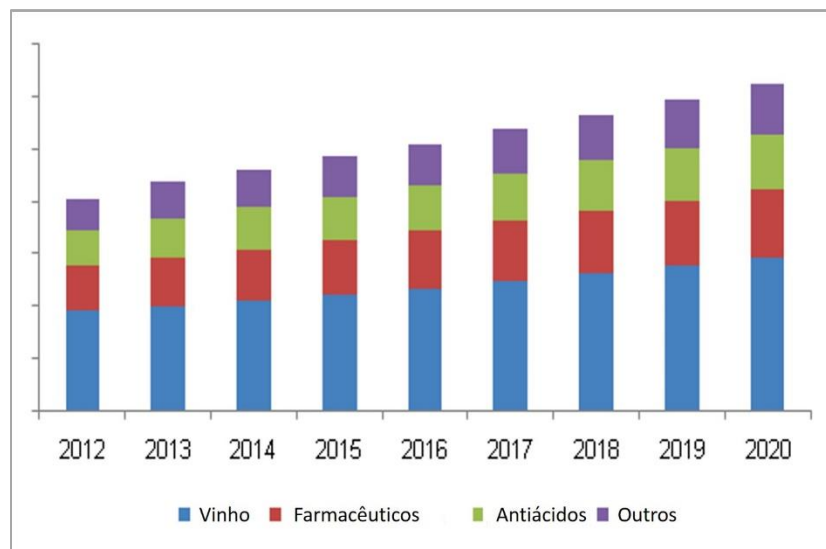


Figura 7. Volume do mercado mundial do ácido tartárico por aplicação, 2012-2020 (em mil toneladas) [36].

Outro ponto importante do comércio do ácido tartárico é com relação a sua forma de produção. Atualmente, ácido tartárico sintético está formando um mercado estável, especialmente na Europa. As figuras e tabelas seguintes foram fornecidas por uma empresa francesa, parceira deste estudo. A China é um maciço fabricante deste produto, ela representa 35% da produção mundial. Sendo que cerca de 33% da produção da China é importada para a União Europeia. Mesmo com o crescimento de consumo do ácido tartárico, produtores europeus têm visto sua porção no mercado da União Europeia diminuir, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Produção e consumo do ácido tartárico na Europa.

	2007	2008	2009	2010
Volume de produção na União Europeia (em toneladas)	29000	27500	25000	30588
Consumo total na Europa (em toneladas)	26931	25333	22983	29964
Parcela dos produtores europeus na União Europeia	76,10%	71,10%	72,70%	68,80%

Fonte: Faure S.A.

Em contraste, a quantidade de ácido tartárico chinês no mercado europeu foi multiplicada por cinco entre 2003 e 2013. A Figura 8 mostra o progresso dos produtores da China de 1999 até 2013.

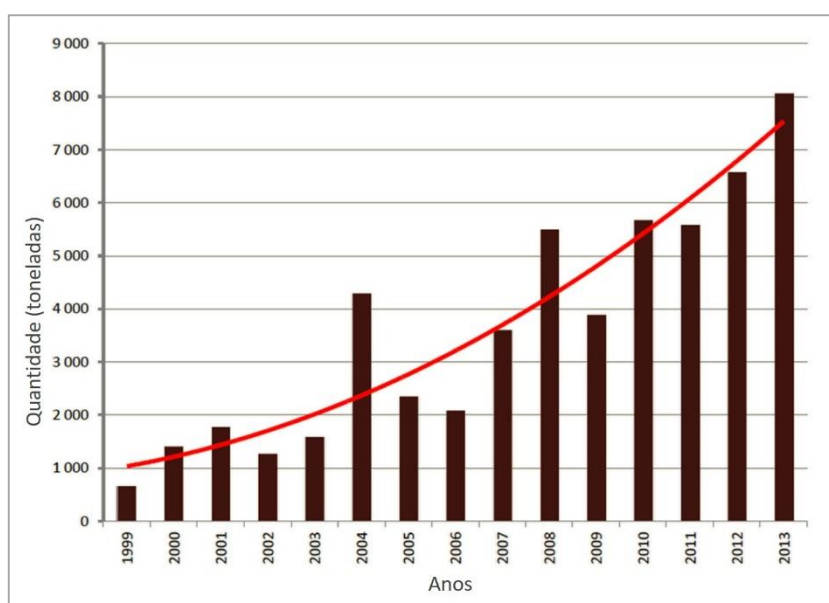


Figura 8. Progresso do consumo de ácido tartárico proveniente da China na Europa.

Fonte: Faure S.A.

Essa mudança no mercado resulta na modificação do preço. Ácido tartárico sintético custa menos que o obtido naturalmente, e a diferença nestes valores tem se acentuado com os anos. Na Figura 9 observa-se o aumento do preço do ácido tartárico europeu, geralmente obtido de forma natural comparado ao ácido de origem chinesa, de produção majoritariamente sintética.

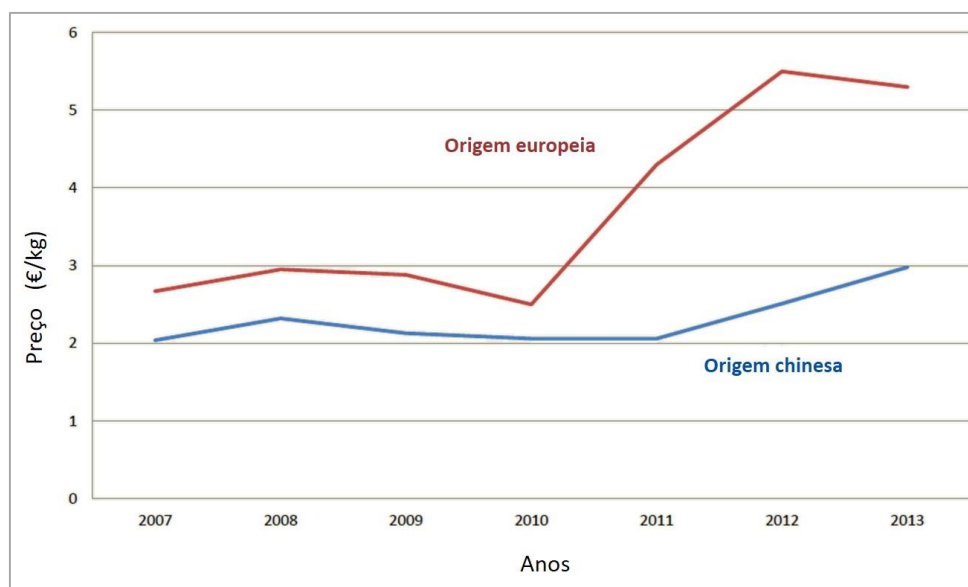


Figura 9. Comparativo da evolução do preço do ácido tartárico proveniente da Europa e China. Fonte: Faure S.A.

### 1.2.5 Regulamentação

Na Europa, o órgão *European Economic Community* (EEC) autoriza o uso de ácido tartárico nos alimentos quando produzido naturalmente. Neste caso, assume-se que esta substância é obtida a partir de plantas (889/2008 EEC, 2008). Critérios de pureza e qualidade do ácido tartárico foram definidos pela *Commission Directive 2008/84/EC* [37].

Na tentativa de regulamentar as importações do ácido tartárico e reduzir a desigualdade de preço entre o ácido tartárico natural e sintético, medidas *anti-dumping*<sup>1</sup> foram tomadas pelo Tribunal Geral da União Europeia [39]. A imposição de *antidumping* nos produtos tartáricos atingiu principalmente aqueles provenientes da China [39].

---

<sup>1</sup>*Dumping* é uma prática comercial pela qual empresas vendem seus produtos no mercado externo a um preço extremamente baixo, muitas vezes, inferior ao custo de produção, visando prejudicar a concorrência e conquistar uma fatia maior do mercado [38].

Nos Estados Unidos o órgão regulatório FDA (*US Food and Drug Administration*) se refere ao ácido tartárico como uma substância não agrícola permitida como ingrediente em produtos processados rotulados como “orgânicos” ou “feito com orgânicos”. Além disso, ele é descrito como “componente não sintético” se feito a partir de vinho de uvas; e como “substância sintética permitida” se produzido a partir do ácido maleico [12]. Em 2006, este mesmo órgão concluiu que o ácido L(+)-tartárico produzido por conversão do anidrido maleico através de ação enzimática é semelhante ao produzido naturalmente, sendo permitido seu uso para as mesmas aplicações que o natural [40].

Em âmbito internacional, a *Codex Alimentarius* regulamenta o uso do ácido tartárico. Desenvolvida por uma comissão que envolve a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) da Organização das Nações Unidas (ONU) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), a *Codex Alimentarius Commission* estabelece uma série de padrões e códigos de conduta relativas a alimentos, sua produção e segurança alimentar. As funções por eles descritas para o ácido tartárico são regulador de acidez, antioxidante, emulsificante, conservante, umectante, antiaglomerante e outros.

O *International Oenological Codex* descreve os principais produtos químicos, orgânicos ou produtos gasosos usados na fabricação e conservação de vinhos. O ácido tartárico é um destes produtos. Nele é detalhado o limite de solubilidade, rotação específica, volatilidade, impurezas orgânicas e nível de metais traços, oxalatos e sulfatos para permissão do seu uso em vinhos [4].

No Brasil, o ácido tartárico é um aditivo permitido pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), porém nenhum detalhe sobre sua produção é citado em regulamentações.

A carência de um controle de qualidade que distinga a procedência do ácido L(+)-tartárico e, conseqüentemente, produza uma regulamentação mais específica; é um dos pontos a ser suprido por este trabalho. Dessa forma, diferentes instrumentos de análise foram utilizados a fim de desenvolver uma metodologia eficaz para a identificação da origem do ácido tartárico e, posteriormente, de seus produtos derivados.



## CAPÍTULO 2. INVESTIGAÇÃO DE IMPUREZAS E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO TARTÁRICO

### 2.1 Parte experimental

Todo o projeto experimental foi realizado em colaboração com o *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS), organismo público de pesquisa francês. Os experimentos foram feitos no *European Research Institute on Natural Ingredients* (ERINI), instituto ligado ao CNRS que promove a junção do setor acadêmico com empresas privadas e é voltado à pesquisa de produtos naturais, localizado em Grasse, França. Além deste instituto algumas análises foram feitas na *Université Nice Sophia Antipolis* (UNICE), em Nice, também localizada na França.

Um grande grupo de amostras de ácido tartárico foi reunido em colaboração com a empresa Faure S.A (França). Este grupo incluía amostras de diferentes partes do mundo e de origem natural e sintética. Ao todo, 36 amostras de ácido tartárico foram coletadas, sendo 35 amostras de ácido L(+)-tartárico e 1 de ácido DL-tartárico. Das 35 amostras de ácido L(+)-tartárico, 24 amostras eram de origem natural e 11 de origem sintética. As técnicas e métodos de análises utilizados nestes produtos estão descritos a seguir.

#### 2.1.1 Extrações

Extração por refluxo foi aplicada para extrair possíveis impurezas provenientes do processo de síntese em amostras de ácido tartárico. Três amostras de ácidos tartáricos foram usadas, todas sintéticas. Já os solventes orgânicos usados foram: acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), tolueno ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ ) e clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), todos da Sigma-Aldrich, França.

Em um balão de destilação 20g de amostra foi adicionada com 100mL de solvente. O balão foi conectado a um sistema de extração por refluxo em extrator Soxhlet. A mistura foi aquecida até o início da ebulição do solvente e mantida por 8 horas. O sólido foi separado da solução por filtração simples com papel filtro qualitativo (5-13 $\mu\text{m}$ , tamanho 125mm, VWR European). A secagem foi feita a temperatura ambiente. As amostras foram pesadas antes e depois da extração para determinação do percentual de recuperação.

#### 2.1.2 Ponto de fusão

Medidas de ponto de fusão foram feitas para controle da pureza, esse dado foi coletado para todas as amostras. A determinação do ponto de fusão foi realizada no aparelho Ponto de

Fusão M-560 (Buchi, Suíça) com capilares de vidro de fundo fechado de 90mm. As medições foram feitas com taxa de aquecimento de  $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , em duplicata.

### 2.1.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência

A técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*) foi aplicada para identificar possíveis impurezas no ácido tartárico comercial proveniente do seu processo de síntese, como ácido maleico, anidrido maleico e ácido cis-epoxisuccínico. Diferentes métodos foram usados de acordo com o tipo de impureza esperado. Um cromatógrafo líquido UPLC nanoACQUITY acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo tempo de voo (Q-TOPF) com ionização por nanoeletrospray (nanoESI) foi empregado nas análises. Os dados foram adquiridos no *software* Mass Lynx 4.1. Os padrões utilizados foram ácido L(+)-tartárico ( $\geq 99,7\%$ , FCC, FG), ácido maleico (ReagentePlus) e anidrido maleico (Puriss), todos adquiridos da Sigma-Aldrich, França. E, por fim, ácido cis-epóxi succínico ( $>97\%$ ), da TCI Europe.

Primeiramente, amostras de ácido tartárico de antes e depois das extrações foram analisadas por um método chamado A. Neste Método A foi usada uma coluna Acquity BEH Shield RP18 (2,1x100mm;  $1,7\mu\text{m}$ ), Waters, França. A eluição foi conduzida com fase móvel A (água + 0,1% ácido fórmico) e fase móvel B (acetonitrila + 0,1% ácido fórmico), mantendo-se 95% de fase móvel A e 5% de fase móvel B. Volume de injeção de  $2\mu\text{L}$ , temperatura  $40^{\circ}\text{C}$  e vazão de  $0,2\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$  foram as condições do método. Modo negativo (ES-), energia de colisão 6eV, tensão no cone 40V, tensão do capilar 2,5kV, temperatura da fonte  $120^{\circ}\text{C}$ , temperatura de dessolvatação  $550^{\circ}\text{C}$ , vazão do gás no cone  $10\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  e vazão do gás de dessolvatação  $1000\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  foram ajustados.

Já um Método B foi usado em amostras de ácido tartárico sem extração, visando a identificação da presença de ácido maleico e/ou anidrido maleico. No Método B foi utilizada uma coluna Acquity HSS T3 (2,1x100mm,  $1,8\mu\text{m}$ ), Waters, França. A eluição foi composta da fase móvel A (água + 0,25% ácido fórmico) e fase móvel B (metanol), com rampa de gradiente inicial até 1min de 95% A, de 95 a 50% de A de 1 a 5 min, mantendo-se em 50% de A de 5 a 7min e de 50 a 95% de A de 7 a 10min. Os demais parâmetros estão descritos a seguir: volume de injeção de  $2\mu\text{L}$ , temperatura  $30^{\circ}\text{C}$ , vazão de  $0,3\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ , modo negativo (ES-), energia de colisão 10eV, tensão no cone 15V, tensão do capilar 1,5kV, temperatura da fonte  $130^{\circ}\text{C}$ , temperatura de dessolvatação  $500^{\circ}\text{C}$ , vazão do gás no cone  $50\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  e vazão do gás de dessolvatação  $800\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  foram ajustados.

### ***Método para ácido cis-epoxisuccínico***

Um importante intermediário na produção biotecnológica do ácido tartárico é o ácido cis-epoxisuccínico. Um método para sua identificação por UPLC foi desenvolvido. O padrão de ácido cis-epoxisuccínico da TCI Europe, Bélgica, foi usado nas análises utilizando coluna Acquity HSS T3 (2,1x100mm, 1,8 $\mu$ m), Waters, França. A eluição foi composta da fase móvel A (água + 0,25% ácido fórmico) e fase móvel B (metanol), com rampa de gradiente inicial até 1min de 95% de A, de 95 a 50% de A de 1 a 5 min, mantendo-se em 50% de A de 5 a 7min e de 50 a 95% de A de 7 a 10min, e mantendo essa proporção por mais um minuto. Os demais parâmetros estão descritos a seguir: volume de injeção de 2 $\mu$ L, temperatura 30°C, vazão de 0,3mL.L<sup>-1</sup>, modo negativo (ES-), energia de colisão 10eV, temperatura da fonte 130°C, temperatura de dessolvatação 500°C, vazão do gás no cone 50L.h<sup>-1</sup> e vazão do gás de dessolvatação 800L.h<sup>-1</sup> foram ajustados.

A otimização do método foi feita ajustando os valores de tensão do capilar e do cone. A tensão do capilar foi testada em 0,5; 1,0 e 1,5kV. E a tensão do cone foi testada em 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30V. Soluções com 100ppm de ácido cis-epoxisuccínico foram injetadas nestas análises.

Alguns parâmetros de validação foram determinados seguindo o guia para procedimentos analíticos da ICH (*International Conference on Harmonization*) [41]. O limite de detecção foi estabelecido com base na relação sinal-ruído. Esta relação é determinada pela comparação de sinais de amostra de baixas concentrações já conhecidas do analito com sinais do branco. Relação sinal-ruído entre 3 ou 2:1 é geralmente aceita para estimar o limite de detecção. Neste trabalho foi adotada a relação sinal-ruído 2:1. Preparou-se soluções com 0,1; 1,0; 10 e 100ppm de ácidos cis-epoxisuccínicos. Três soluções para cada quantidade de amostra foram preparadas e injetadas em duplicata.

Com base no limite de detecção obtido, verificou-se a concentração de ácido tartárico ideal para identificação de ácido cis-epoxisuccínico. Como estamos procurando impureza a níveis traço, buscou-se a quantidade máxima de amostras que pode ser analisada mantendo o limite de detecção obtido anteriormente. Preparou-se soluções de ácido tartárico de: 100, 200, 300, 400 e 500ppm.

#### ***2.1.4 Cromatografia quiral***

A cromatografia quiral foi utilizada para verificar a estereoisomeria das amostras de ácido tartárico. Amostras de ácido L(+)-tartárico natural e sintético e ácido DL-tartárico foram analisadas seguindo este método, variando suas concentrações.

Todas as amostras analisadas passaram por reação de derivatização previamente, já que ela influencia favoravelmente a enantiosseletividade. A derivatização envolveu a metilação de ambos ácidos carboxílicos do ácido tartárico para obter dimetil tartarato. Trimetilsulfônio hidróxido (TMSH), de fórmula molecular  $(\text{CH}_3)_3\text{S}(\text{OH})$ , foi o agente de metilação. Foi utilizado TMSH 0,2M em metanol, da Macherey-Nagel, Alemanha. O procedimento da reação consistiu inicialmente em dissolver 200mg de amostra em 5mL de metanol. Em seguida, diretamente em um vial para cromatografia gasosa misturou-se 25 $\mu\text{L}$  desta solução com 50 $\mu\text{L}$  de TMSH. O vial foi aquecido até 85°C por 10 minutos para assegurar completamente a reação.

A cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (GC-FID) foi usada para diferenciação do ácido L(+)-tartárico do ácido D(-)-tartárico. Uma coluna quiral Hydrodex  $\beta$ -Pm, 50mx0,25mmID, (Macherey-Nagel, Alemanha) foi usada no cromatógrafo Agilent 7890 A GC System com detector de ionização de chamas. Volume de injeção 1 $\mu\text{L}$ , gás de arraste hélio 1,7mL.min<sup>-1</sup>, modo split 150mL.mim<sup>-1</sup>, temperatura do injetor 250°C, temperatura do forno 170°C e temperatura do detector 250°C foram os parâmetros das medições. As análises isotérmicas foram feitas por 25 minutos.

A cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (GC-MS) foi aplicada para confirmar a identificação dos picos obtidos no GC-FID. Foi utilizado um cromatógrafo Agilent 700 triplo quadrupolo interligado com um Agilent 7890A GC System e amostrador automático Agilent 7683 com injetor split/splitless. O aparelho foi usado juntamente com uma coluna ZB-1MS (30mx250 $\mu\text{m}$ x0,25 $\mu\text{m}$ ID), Zebron. Volume de injeção 1 $\mu\text{L}$ , gás de arraste hélio 1mL.min<sup>-1</sup>, modo split 150mL.mim<sup>-1</sup>, temperatura do injetor 250°C e temperatura do detector 300°C foram os parâmetros das medições. O atraso do solvente foi ajustado para 1,5 minutos. A temperatura inicial do forno foi de 60°C por 1 minuto, em seguida aumentou-se a temperatura até 200°C com taxa de 10°C por minuto; e mantida assim por 14 minutos. O intervalo de varredura do MSD foi de 35-450m/z.

### ***2.1.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier***

Esta técnica foi usada para identificar bandas e picos característicos do ácido tartárico. Medições de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT/IR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) foram feitas em um espectrômetro FT/IR-4600 tipo A com reflexão total atenuada ATR PRO450-S, Jasco. As análises foram medidas na região espectral de 400-4000cm<sup>-1</sup> e com resolução de 4cm<sup>-1</sup>. Amostras de ácido L(+)-tartárico natural, ácido L(+)-tartárico sintético e ácido DL-tartárico foram estudadas.

### **2.1.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear**

Complementando as análises de caracterização do ácido tartárico, os elementos hidrogênio e carbono foram analisados pela técnica de RMN com amostras de ácido L(+)-tartárico natural e sintético e ácido DL-tartárico. O espectro de  $^1\text{H}$ -NMR (200MHz) e  $^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz) foram obtidos no espectrômetro Bruker Avance 500. O solvente usado nas duas análises foi água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

## 2.2 Resultados e discussão

### 2.2.1 Investigação de impurezas por extração

As extrações apresentaram percentual de recuperação maior que 90%, aproximadamente, como detalhado na Tabela 5. Visualmente, não havia diferença entre os sólidos obtidos após a secagem e o sólido inicial. Isso já é uma indicação da ausência de impurezas.

Tabela 5. Percentual de recuperação nas extrações de ácido tartárico sintético.

	Acetonitrila	Tolueno	Clorofórmio
Amostra 1	89,85% ± 2,16	90,35% ± 5,63	97,86% ± 1,67
Amostra 2	92,67% ± 2,15	96,97% ± 0,61	98,86% ± 0,56
Amostra 3	94,66% ± 0,28	97,56% ± 0,83	89,73% ± 1,23

Foram realizadas medições do ponto de fusão em todas as amostras como indicativo de sua pureza. A média e desvio padrão da temperatura de fusão foi  $168,4^{\circ}\text{C} \pm 0,6$ . Todas as amostras apresentaram valores condizentes com a literatura, todos estavam dentro do intervalo teórico. Não houve diferença significativa no ponto de fusão entre ácido tartárico natural e sintético.

Continuando a averiguação de impurezas, agora em nível traço, foi utilizada a técnica de análise de cromatografia líquida de ultra eficiência. Três amostras de ácido tartárico sintético foram estudadas e submetidas a extração. Após a extração com acetonitrila, tolueno e clorofórmio, as amostras foram comparadas com as sem extração. Diversas mudanças de parâmetros foram feitas na metodologia de análise usando a coluna BEH Shield RP18 até chegar na descrita na seção 2.1.3.

A comparação dos cromatogramas pré e pós extração em todos os solventes não apontou presença de impurezas, todos eram extremamente similares, Figura 10. O perfil do pico referente ao ácido tartárico apresenta uma cauda, comum em análise de ácidos orgânicos [42]. Isto já era esperado, mas não tão acentuado. Os picos anteriores ao do ácido tartárico são referentes a sua fragmentação. Já no espectro de massa referente a este pico, o erro para determinação de massa exata estava acima de 5ppm. Este alto valor de massa exata aliado aos picos largos e de baixa resolução impossibilitam a suposição de composição elementar e busca por pequenos picos que indicassem presença de impurezas traços.

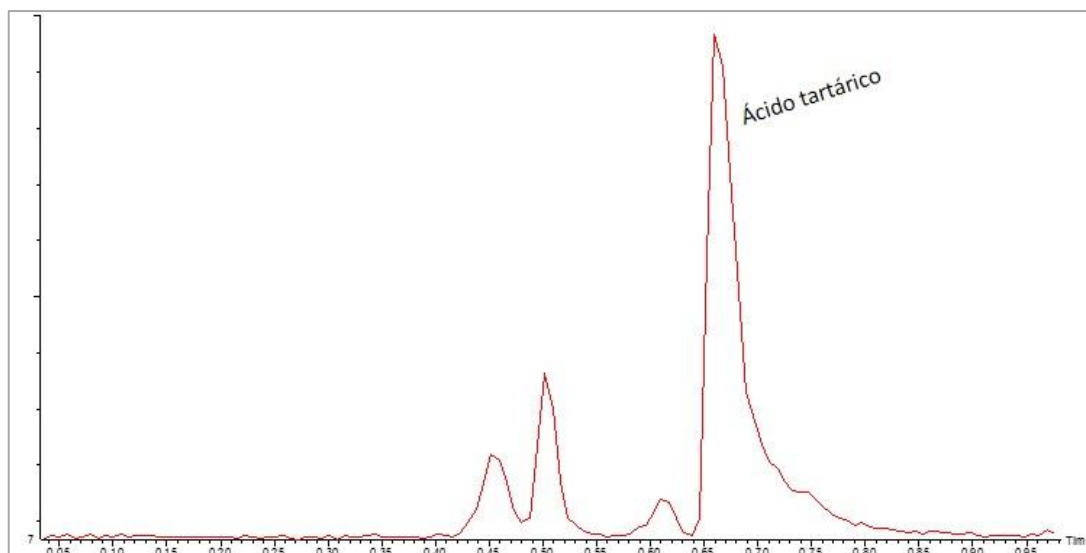


Figura 10. Cromatograma do ácido tartárico sintético, Parâmetros A.

Alguns parâmetros do equipamento foram mudados de forma a melhorar a resolução dos cromatogramas. Utilizando o Método B, a coluna BEH Shield RP18 foi trocada pela HSS T3, mais indicada para composto polar e de grande compatibilidade com fase aquosa segundo informações do fornecedor. A energia de colisão foi aumentada enquanto a tensão no cone e no capilar foram diminuídas. Além disso, a acetonitrila foi substituída por metanol na fase móvel com uso de gradiente. Como resultado, picos bem mais definidos e intensos foram alcançados, assim o Método B passou a ser aplicado em todas as análises seguintes. A Figura 11, apresenta um cromatograma que exemplifica todos os obtidos com o uso do Método B. Dois picos foram identificados, o primeiro é referente ao ácido fórmico que foi usado como aditivo e o segundo pico referente ao ácido tartárico.

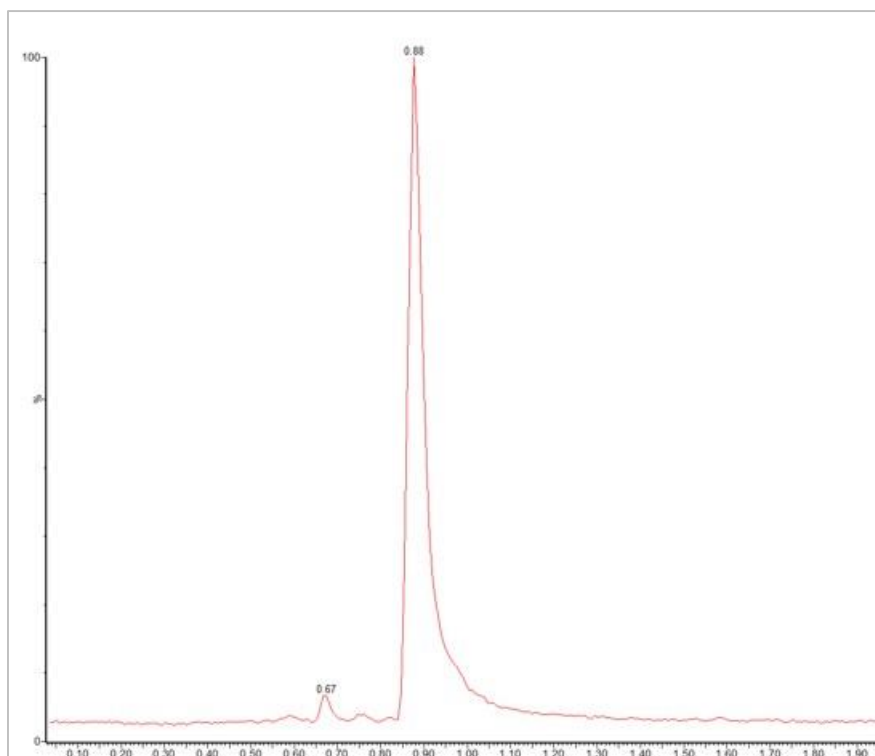


Figura 11. Cromatograma do ácido tartárico sintético, Parâmetros B.

Todas as amostras com e sem extração foram novamente analisadas utilizando o Método B, e mais uma vez, nenhuma diferença foi identificada. Conclui-se que a extração não auxilia na busca de impurezas do ácido tartárico sintético, assim o processo de extração precedente a análise por UPLC foi suspensa.

### 2.2.2 *Investigação de impurezas por UPLC*

Em seguida, UPLC foi usada para estudo dos reagentes do ácido tartárico por síntese química, já que eles são impurezas indicadoras de origem sintética do ácido. Duas substâncias foram analisadas: ácido maleico e anidrido maleico. Padrões de anidrido maleico e ácido maleico foram examinados separadamente e depois misturados com o ácido tartárico. Na Tabela 6 estão os valores da razão massa/carga destas substâncias.

Tabela 6. Razão massa/carga do ácido tartárico e seus reagentes.

Composto	Íon	m/z
Ácido tartárico	$C_4H_5O_6^-$	149
Ácido maleico	$C_4H_3O_4^-$	115
Anidrido maleico	$C_4HO_3^-$	97

Como pode ser observado na Figura 12, na análise conjunta dos padrões foram obtidos picos bem definidos e separados para cada um. A análise individual do ácido tartárico



apresentou um único pico, assim como a do ácido maleico, identificados pelo espectro de massas. Já o anidrido maleico exibiu três picos em seu cromatograma.

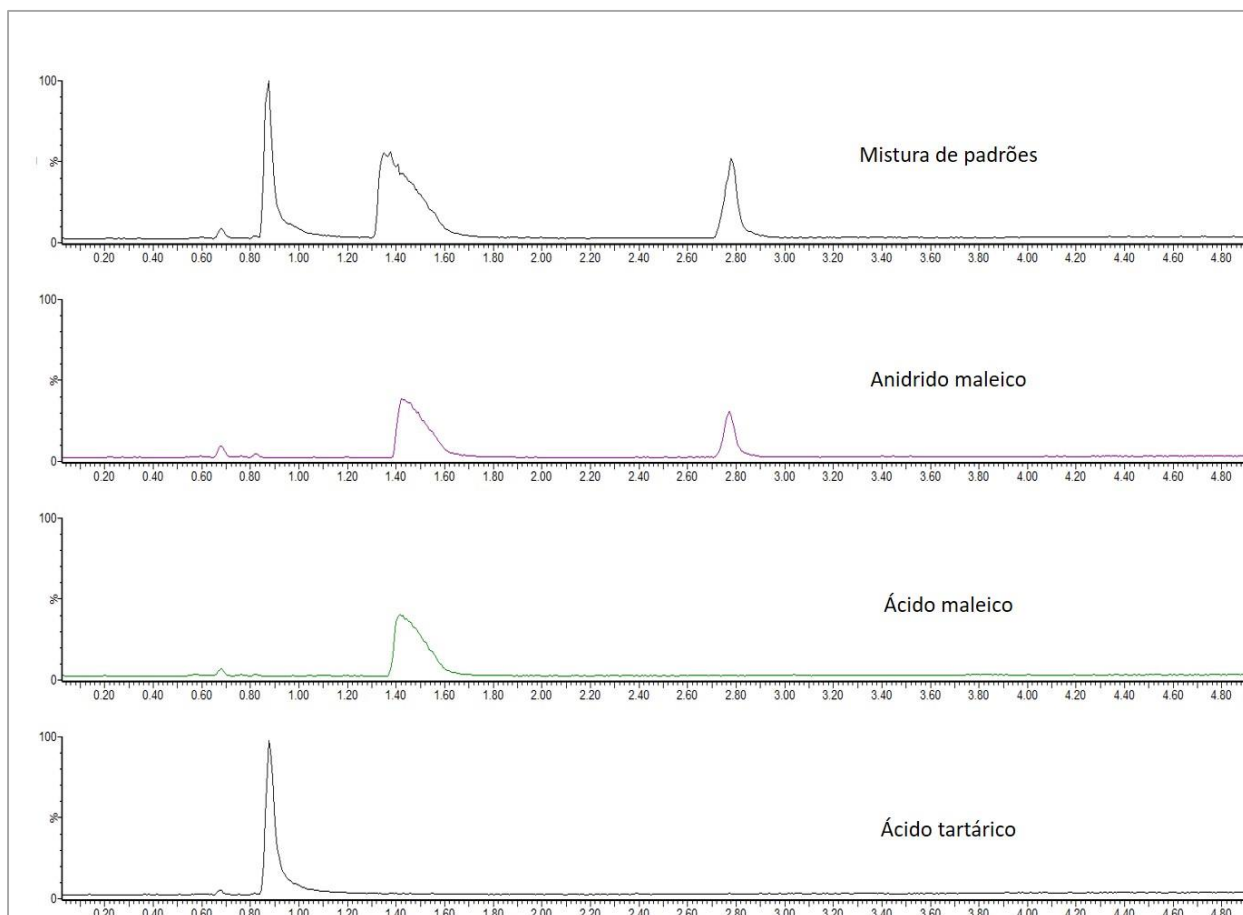
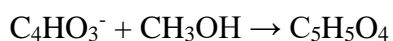


Figura 12. Cromatogramas dos padrões do ácido tartárico, ácido maleico e anidrido maleico.

A Figura 13 mostra detalhes do cromatograma e espectro de massas do anidrido maleico. O primeiro e menor deles é referente a hidroxilação do anidrido maleico, formando o íon  $C_4HO_4^-$  ( $m/z$  113). Parte da amostra sofre hidrólise formando ácido maleico, como verificado no segundo pico. E no terceiro pico uma parcela da amostra já desprotonada interagiu com a fase móvel metanol, formando  $C_5H_4O_4$ , identificado pelo  $m/z$  129, Equação 5.



5

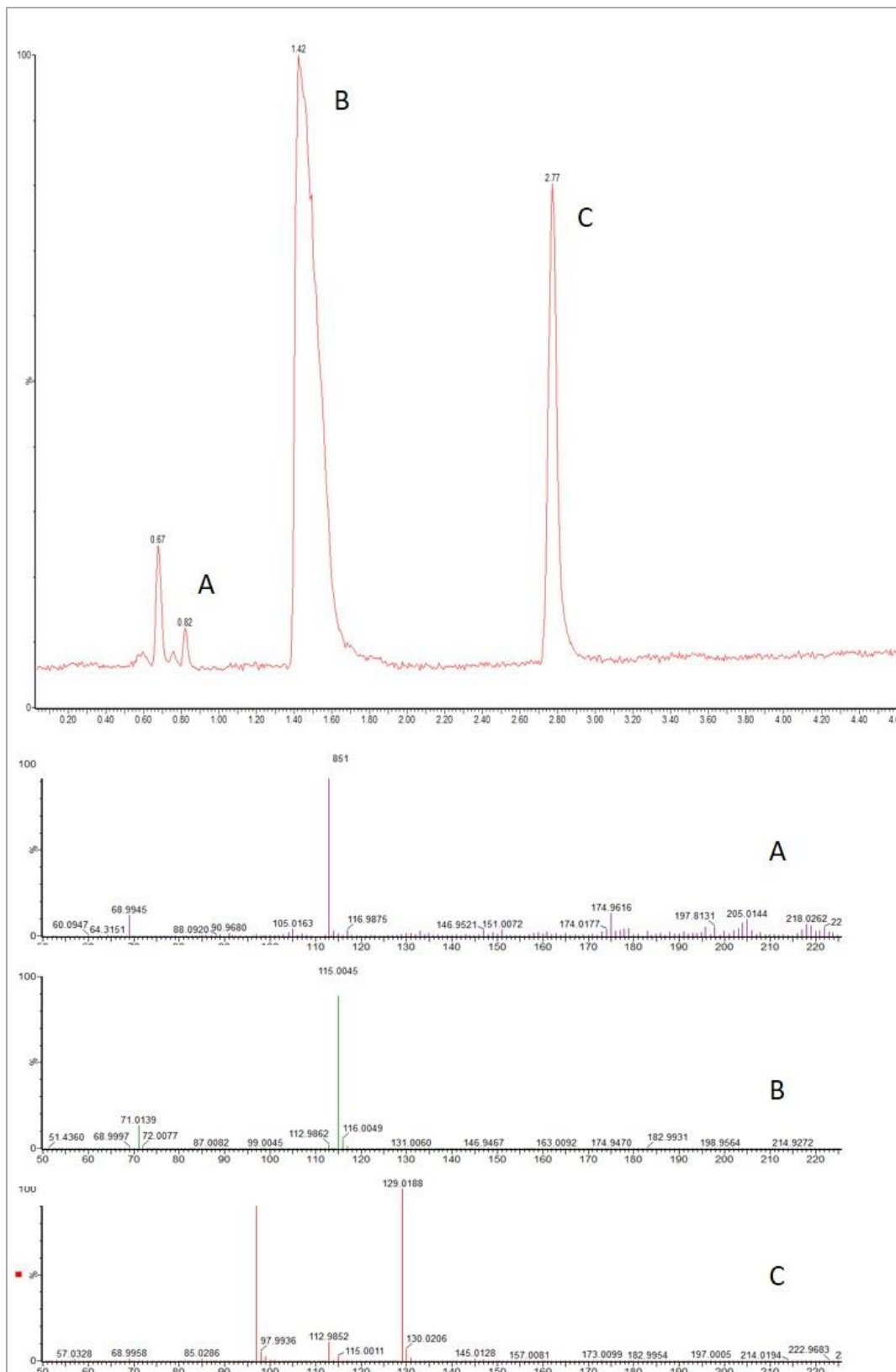


Figura 13. Cromatograma e espectro de massas do anidrido maleico.

Um novo cromatograma do anidrido maleico foi feito 24 horas após o preparado da sua solução, notou-se que todo composto foi convertido em ácido maleico por hidrólise. Dessa forma, é de suma importância a rápida análise desta substância para sua detecção.

Com base nos cromatograma dos padrões, foram investigadas três amostras de ácido tartárico naturais e três sintéticas. Como é constatado no cromatograma da Figura 14, os picos apresentam o mesmo tempo de retenção, 0,88min, e sua forma é muito similar.

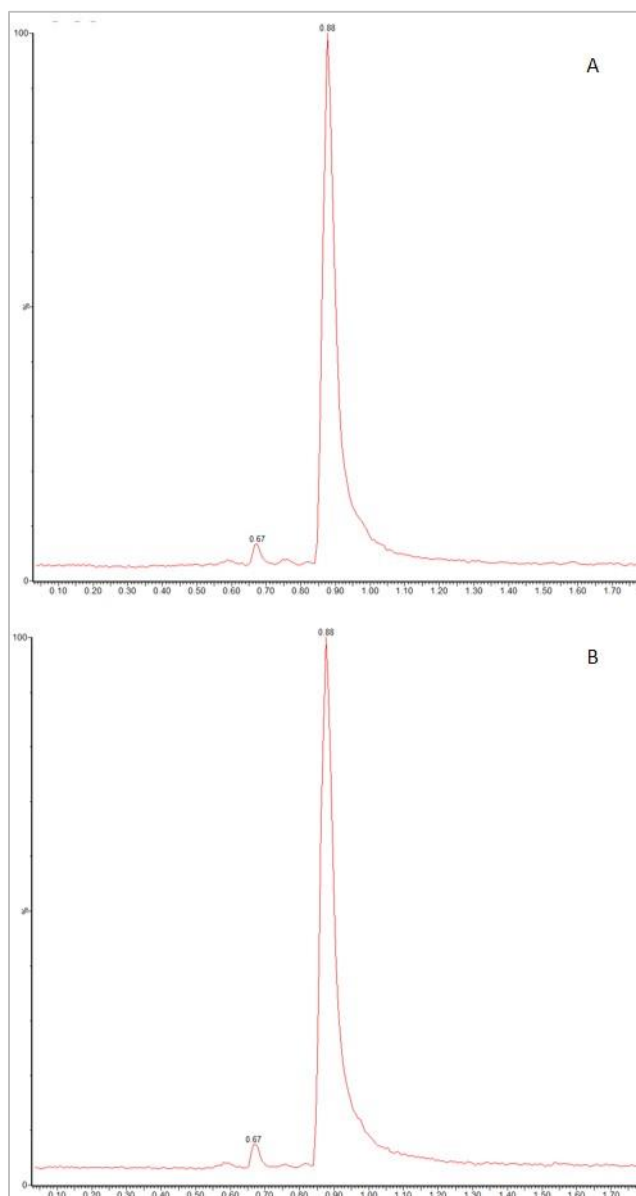


Figura 14. Comparação entre os cromatograma de ácido tartárico sintético (A) e natural (B).

Não ocorre distinção entre as amostras naturais e sintéticas ao longo de todo o cromatograma de forma que possa ser apontada a presença de qualquer impureza. Esta análise

foi realizada com todas as sintéticas do ácido tartárico e este perfil perdurou em todas as amostras.

Dessa forma, esta análise foi considerada ineficiente para identificação de ácido maleico e anidrido maleico como indicadores de síntese do ácido tartárico.

### *Estudo do ácido cis-epoxisuccínico*

A produção de ácido tartárico sintético por via biotecnológica utiliza o ácido cis-poxysuccínico como reagente, por isso sua presença como impureza também foi investigada. A método de análise foi otimizado variando a tensão do cone e a tensão do capilar. A tensão do cone foi estudada em 0,5; 1,0 e 1,5kV, os valores de área e altura estão na Tabela 7.

Tabela 7. Variação da tensão do capilar na análise de ácido cis-epoxisuccínico.

Tensão do capilar (kV)	Área	Altura
0,5	7809,966	109393
1,0	7120,378	103164
1,5	6936,767	98602

A tensão de capilar mais baixa aplicada que apresentou melhor resposta foi a de 0,5kV, sendo este o valor escolhido para continuação das análises.

Já para a tensão do cone, os valores de 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30V foram testados, como pode ser observado na Tabela 8. Na tensão de cone de 15V obteve-se a melhor resposta e os valores extremos testados apresentaram respostas mais baixas. A tensão de cone de 15V foi definida para a sequência das análises.

Tabela 8. Variação da tensão do cone na análise de ácido cis-epoxisuccínico.

Tensão do cone (V)	Área	Altura
15	19949,863	274646
20	18141,055	247403
10	15235,523	212835
25	12882,029	177131
5	7721,782	106351
30	6580,288	89995
2	3506,419	48824

Definidos esses parâmetros, o limite de detecção do ácido cis-epoxisuccínico foi calculado. Com base na relação sinal-ruído 2:1, 10ppm foi o menor valor injetado aceito por este teste.

Assim, soluções com 10ppm de ácido cis-epoxisuccínico foram preparadas com diferentes quantidades de ácido tartárico, de forma a verificar sua influência na identificação do resíduo. Valores de 100, 200, 300, 400 e 500ppm de ácido tartárico cada um com 10ppm de ácido cis-epoxisuccínico foram avaliados, os resultados estão na Tabela 9. Os melhores resultados foram considerados com avaliação da relação área pela altura. Os melhores resultados foram obtidos com as maiores concentrações, sendo que a concentração de 400ppm de ácido tartárico foi adotada para evitar saturação da coluna.

Tabela 9. Influência da quantidade de ácido tartárico na identificação de ácido cis-epoxisuccínico.

Quantidade de ácido tartárico (ppm)	Área	Altura
500	15089,089	155202
400	14153,891	183405
300	10750,412	135154
200	12587,034	154323
100	11213,546	147847

Por fim, injetou-se amostras de ácido tartárico sintético com os parâmetros otimizados: tensão de capilar 0,5kV, tensão de cone 15V e 400ppm de ácido tartárico. Mais uma vez todas as amostras sintéticas foram analisadas e nenhum pico que possa ser atribuído ao ácido cis-epoxisuccínico foi verificado em nenhuma delas.

Em resumo, é possível afirmar que as amostras sintéticas possuem alto nível de pureza. Até o limite de detecção de 10ppm, nenhuma impureza de ácido cis-epoxisuccínico foi identificada. E, de acordo com a capacidade dos métodos usados neste trabalho, não é possível fazer a distinção entre ácidos tartáricos naturais e sintéticos baseando na presença desta impureza.

### 2.2.3 *Ensaio de caracterização*

Outras técnicas de análise foram aplicadas para avaliação de propriedades do ácido tartárico e/ou seu uso para confirmação em casos de resultados suspeitos.

#### *Cromatografia Quiral*

A cromatografia quiral foi usada para examinar a estereoisomeria do ácido tartárico. O cromatograma obtido por GC-FID da misturas de ácido tartárico L(+) e DL (50:50) está apresentado na Figura 15. O primeiro e majoritário pico é referente ao ácido L(+)-tartárico. O segundo pico é a presença do ácido D(-)-tartárico, sua menor intensidade é devido a sua menor concentração. Os picos foram confirmados por GC-MS pelo composto formado na metilação,

tartarato dimetil ( $C_6H_{10}O_6$ ). Em um primeiro momento verificou-se a eficiência da metilação com relação ao tempo. Três tempos de injeção após a reação de metilação foram testados: injeção após preparação, injeção após 2h, injeção após 1 dia. O pico da injeção após 2h foi 1,7 maior que a injeção imediata, sendo a melhor escolha para análise. Esse tempo é necessário porque o ácido tartárico é dicarboxílico com  $pK_{a1} = 2,89$  e  $pK_{a2} = 4,40$ ; assim um tempo maior é necessário para assegurar a dupla metilação.

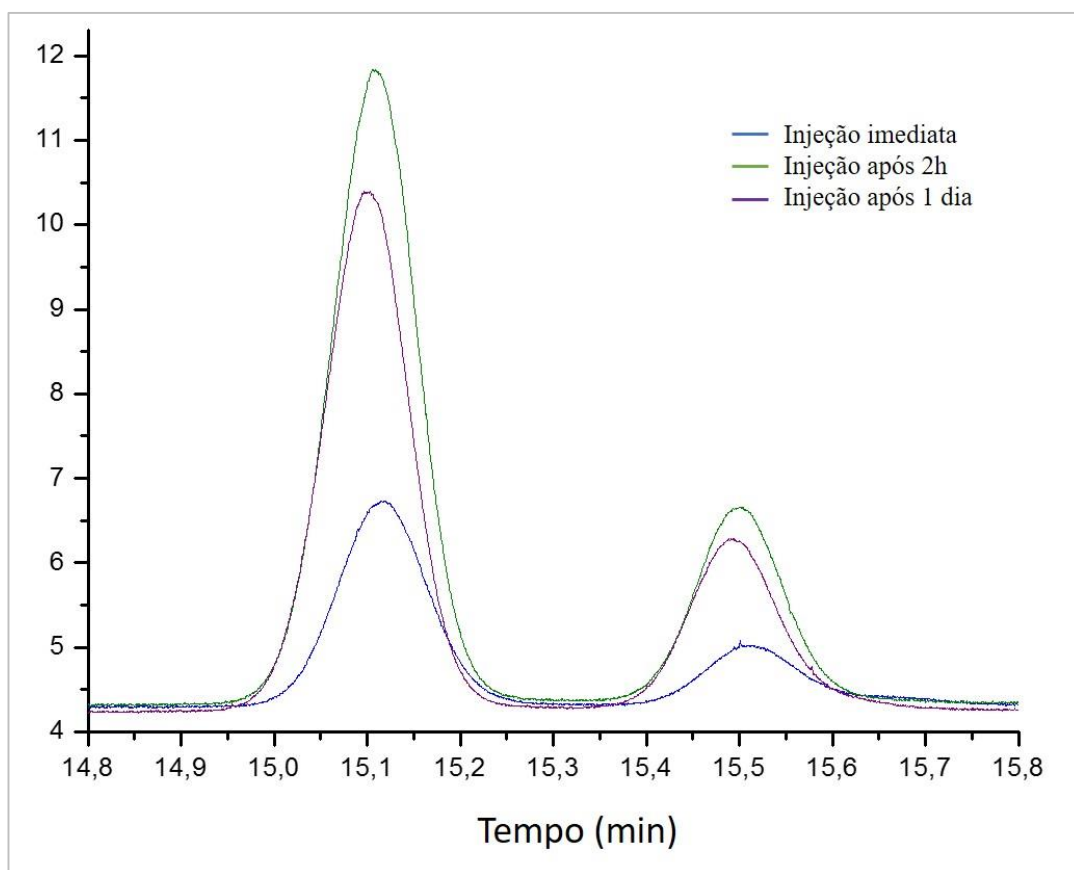


Figura 15. Cromatograma GC-FID para o ácido tartárico L(+) e DL com três tempos de injeções após a metilação.

A quantidade de agente de metilação (TMSH) também foi testada com três valores:  $25\mu\text{L}$ ,  $75\mu\text{L}$  e  $100\mu\text{L}$ . A Figura 16 apresenta os cromatogramas obtidos para cada quantidade. O melhor resultado foi obtido utilizando  $75\mu\text{L}$  de TMSH. Isso implica que o excesso de reagente não necessariamente favorece a resolução desta análise.

Assim, adotou-se o uso de  $75\mu\text{L}$  de TMSH para reação de metilação e injeções no cromatógrafo após 2h. A porcentagem mínima do ácido D(-)-tartárico que pode ser identificada foi calculada testando sua concentração de 5 a 25% em uma mistura com ácido L(+)-tartárico, Figura 17.

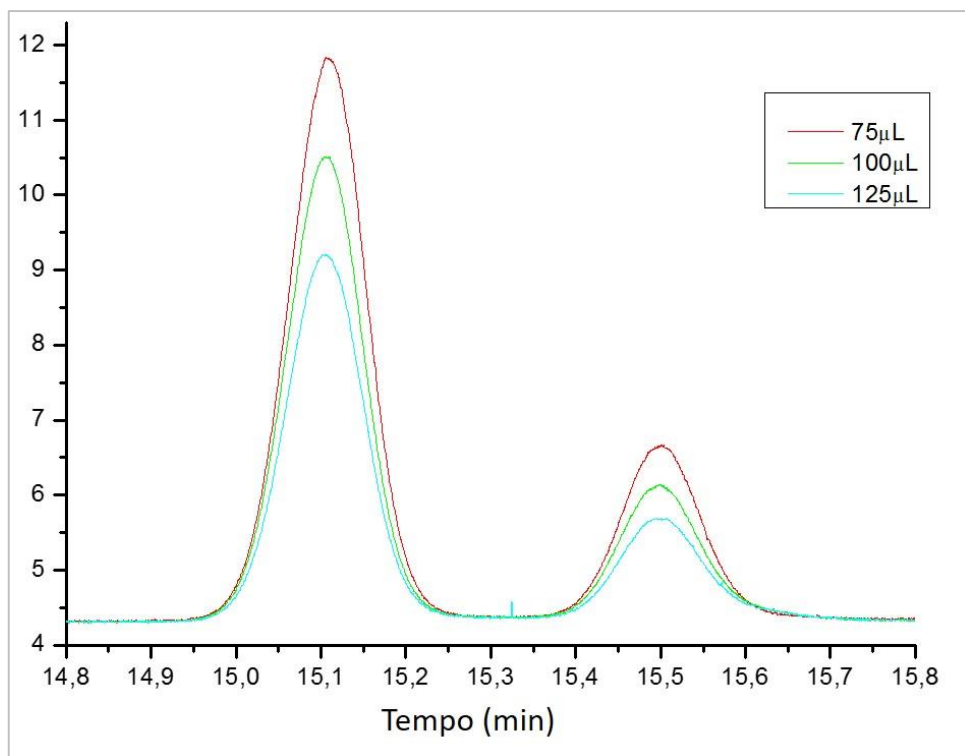


Figura 16. Cromatograma GC-FID para o ácido tartárico L(+) e DL variando a quantidade de agente de metilação.

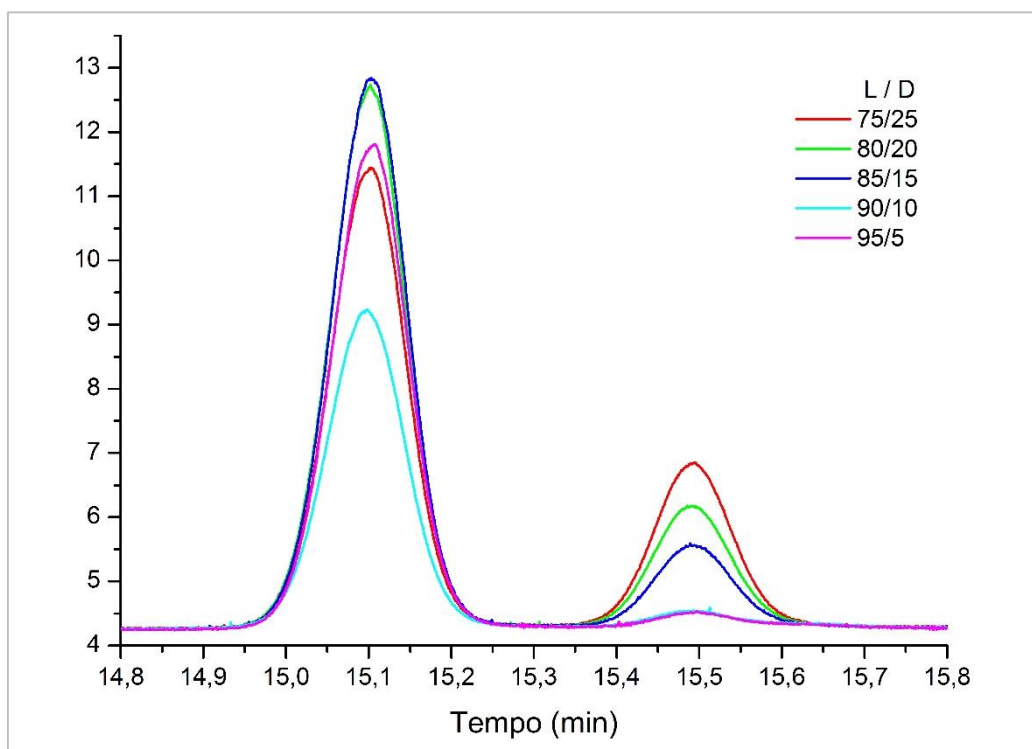


Figura 17. Cromatograma para diferentes porcentagens de L(+)/D(-) do ácido tartárico.

Os picos para concentrações de 5 e 10% de D(-) apresentaram a mesma altura para o segundo pico, referente ao ácido D(-)-tartárico. Assim esta metodologia demonstra ser útil para identificação enantiomérica do ácido tartárico para até 5% de D(-). Valores abaixo disso estão muito próximos da linha de ruído do aparelho.

### ***Espectroscopia na região do infravermelho***

Três tipos de amostras foram escolhidas para as análises por espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear: ácido L(+)-tartárico natural, ácido L(+)-tartárico sintético e ácido DL-tartárico.

A espectroscopia na região do infravermelho foi usada para identificar bandas e picos característicos do ácido tartárico. Dessa forma, esta técnica poderia ser utilizada para confirmação de resultados de casos suspeitos. Os espectros na região do infravermelho para os três ácidos estão expostos na Figura 18, como os espectros se sobrepuseram eles foram deslocados verticalmente para melhor visualização. A banda característica para ácidos orgânicos é entre  $1728-1732\text{cm}^{-1}$ , devido ao estiramento da ligação C=O do ácido carboxílico. Em  $1078\text{cm}^{-1}$  tem-se um pico devido a ligação C-O de álcool primário [14]. Importantes faixas de bandas para calibração do ácido tartárico foram definidas por Moreira [43] para calibração do ácido tartárico em vinhos. Os picos em  $1466\text{cm}^{-1}$ ,  $1404\text{cm}^{-1}$ ,  $1227\text{cm}^{-1}$  e  $1142\text{cm}^{-1}$  coincidem com os reportados por Moreira [43]. Além disso, outros dois picos destacam-se no início dos espectros, em  $3333-3404\text{cm}^{-1}$  devido a ligações intermoleculares (ligações de hidrogênio) e em  $2360\text{cm}^{-1}$  em efeito da presença de  $\text{CO}_2$ .



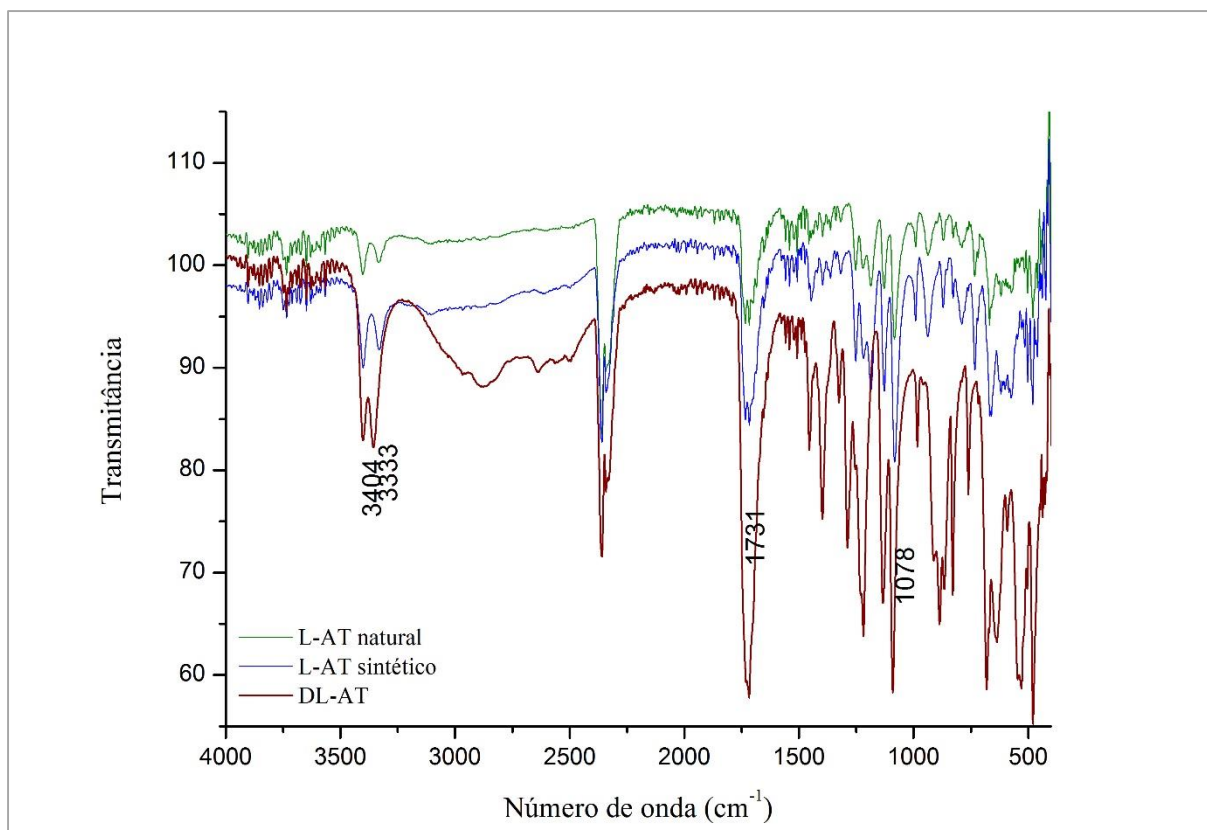


Figura 18. Espectro de FTIR para o ácido L(+)-tartárico natural, ácido L(+)-tartárico sintético e ácido DL-tartárico.

Esta não é uma técnica capaz de distinguir enantiômeros, por isso a similaridade do espectro das amostras L e DL de ácido tartárico. Alguma diferença entre os ácidos naturais e sintéticos era esperada, proveniente de alguma impureza e/ou contaminação; entretanto nenhuma diferença significativa foi observada. Esse fato era provável, já que outros trabalhos na literatura [17; 25] também não discriminaram a origem do ácido tartárico por meio destas técnicas, devido ao seu elevado nível de pureza.

### ***Ressonância magnética nuclear***

Nos espectros obtidos pela ressonância magnética nuclear do <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H nenhuma diferença estrutural foi verificada, como apresentado nas Figura 19 e Figura 20. Ambos espectros mostraram pequenas defasagens de deslocamento químico devido essencialmente a efeito de concentração. No entanto, os deslocamentos químicos observados estão de acordo com as estruturas químicas dos produtos estudados [44].

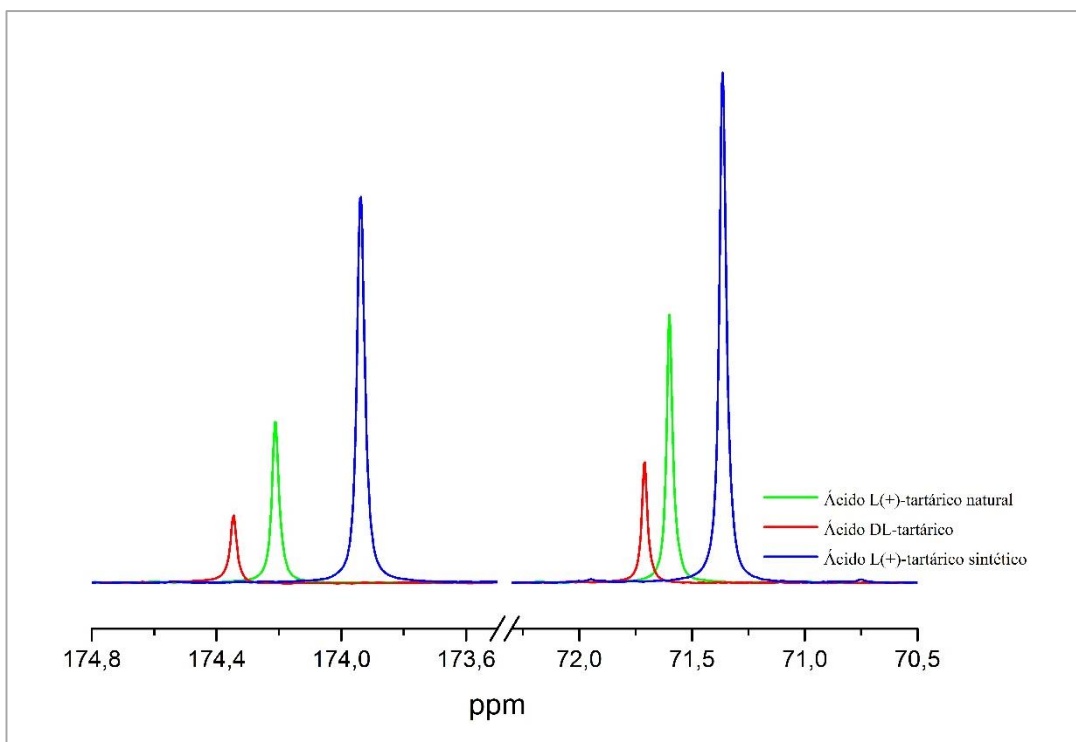


Figura 19. Espectro do  $^{13}\text{C}$ -NMR para as amostras do ácido L(+)-tartárico natural, ácido L(+)-tartárico sintético e ácido DL-tartárico.

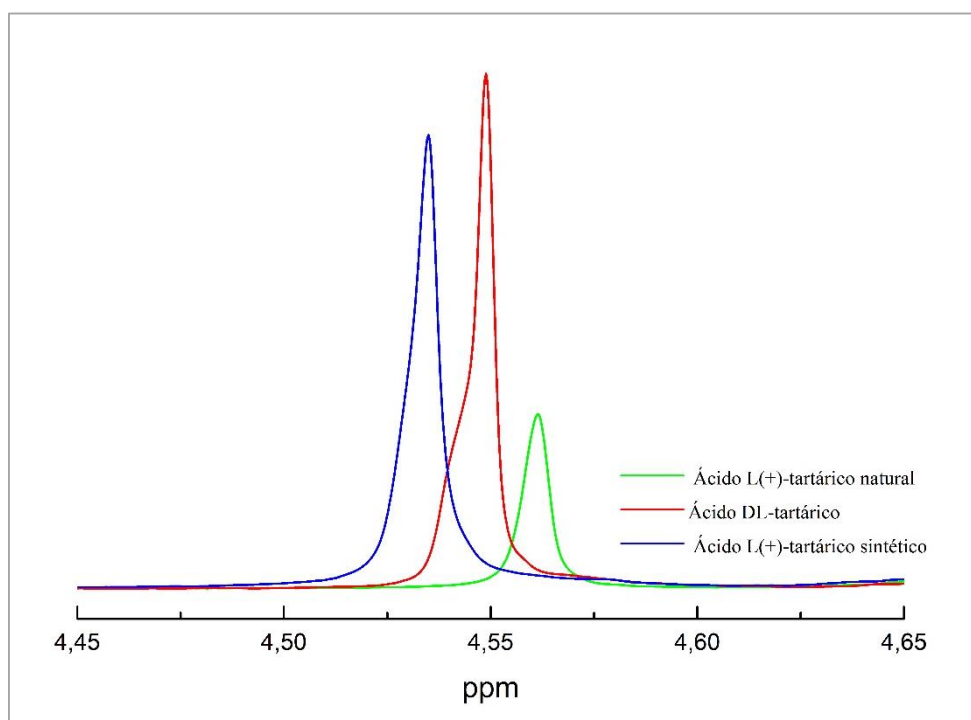


Figura 20. Espectro do  $^1\text{H}$ -NMR para as amostras do ácido L(+)-tartárico natural, ácido L(+)-tartárico sintético e ácido DL-tartárico.

Nenhum indício de impureza foi detectado por meio desta técnica. Para distinção dos enantiômeros seria indicado o uso da técnica de NMR quiral. O uso de NMR 2D foi cogitado, porém devido ao seu alto valor a técnica de espectrometria de massas de razão isotópica foi testada antes.

### **2.3 Conclusão**

A investigação de impurezas de síntese é uma maneira de identificar o método de produção de um produto. Porém, para o ácido tartárico esse estudo não foi promissor para as impurezas ácido maleico, anidrido maleico e ácido cis-epoxisuccínico. Este composto apresenta nível de pureza no produto final muito alto e, mesmo com técnicas analíticas de alta resolução como UPLC e NMR, não foi possível detectar substâncias provenientes da síntese em nível traço. A espectroscopia na região do infravermelho, apesar de não diferenciar amostras naturais das sintéticas, é uma importante técnica que pode ser utilizada para confirmação de casos suspeitos de não serem ácido tartárico.

Já a caracterização por cromatografia quiral permite identificar a presença do enantiômero D(-) em ácido L(+)-tartárico quando presente em no mínimo 5% da mistura.

## CAPÍTULO 3. ANÁLISE ISOTÓPICA DO ÁCIDO TARTÁRICO

### 3.1 Aspectos gerais

#### 3.1.1 Análise isotópica

Isótopos são átomos de um elemento químico cujos núcleos têm o mesmo número de prótons, mas números diferentes de nêutrons. Eles podem ser classificados em estáveis e instáveis (radioativos). A abundância isotópica é a fração do número de átomos de um isótopo de um elemento em relação ao número total de átomos desse mesmo elemento. A Tabela 10 lista os isótopos de hidrogênio, carbono e oxigênio e suas respectivas abundâncias.

Tabela 10. Abundância de isótopos estáveis naturais do hidrogênio, carbono e oxigênio.

Elemento	Isótopo	Abundância (%)
Hidrogênio	$^1\text{H}$	99,9855
	$^2\text{H}$	0,0145
Carbono	$^{12}\text{C}$	98,892
	$^{13}\text{C}$	1,108
Oxigênio	$^{16}\text{O}$	99,7587
	$^{17}\text{O}$	0,0375
	$^{18}\text{O}$	0,2039

Fonte: [45].

Compostos contendo isótopos leves de elementos químicos como carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio são mais voláteis, reativos e rápidos em participar de reações bioquímicas naturais. Por isso, diferenciações isotópicas ocorrem durante processos físicos e biológicos, tornando possível o uso de razões isotópicas como marcadores de autenticidade de amostras químicas e biológicas. Essas amostras podem ser investigadas quanto à origem, identidade, adulteração, entre outros [46]. A globalização dos mercados tem aumentado a preocupação com o controle de autenticidade dos produtos. Além das análises químicas convencionais, as medidas de razões isotópicas se mostraram especialmente úteis neste campo de aplicação, especialmente para alimentos. Diversos estudos demonstraram isso para os mais diversos produtos, como laticínios [47], vinho [48; 49], café [50], suco de laranja [51] e arroz [52]. Comerciantes, produtores e consumidores estão especialmente interessados na rotulagem correta da origem, rastreabilidade e ausência de adulteração de alimentos. Para o caso do ácido

tartárico, os isótopos  $^{13}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}$  e  $^2\text{H}$  poderiam fornecer informações muito interessantes sobre sua origem natural ou sintética e proveniência geográfica.

O carbono apresenta dois isótopos estáveis de ocorrência natural  $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ . A principal fonte de carbono em plantas é gás carbônico absorvido da atmosfera usado para a produção de carboidratos. O carbono presente no ácido tartárico natural tem origem em plantas, especialmente em videiras. A fixação de  $\text{CO}_2$  pode ocorrer por dois caminhos principais (C3 ou C4), nos quais efeitos isotópicos conduzem a diferenciação de isótopos de carbono [53].

O ciclo C3 ou Calvin é a via metabólica para a fixação de carbono na fotossíntese utilizada pela maioria das plantas, principalmente de regiões tropicais úmidas. O produto originado na reação fotossintética é uma molécula com três carbonos, o ácido 3-fosfoglicérico, via enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase. Já a via C4 ou Hatch-Slack forma o ácido oxalacético, uma molécula com quatro átomos de carbono, via enzima carboxilase fosfoenolpiruvato [54]. As plantas que fazem esta via possuem grande afinidade com  $\text{CO}_2$  e perdem menos água que plantas C3 durante a fixação do carbono e fotossíntese. De maneira simplificada, plantas C3 discriminam contra  $^{13}\text{CO}_2$  e apresentam relativamente menor razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  que plantas que fixam o carbono por via C4. Como vantagem elas podem sobreviver em ambientes áridos [55; 56]. Como plantas C4 predominam em climas quentes e de baixas altitudes e plantas C3 são mais comuns em altas altitudes, pode se dizer que há uma tendência de diminuição da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  em plantas do equador para os polos [57]. A razão isotópica de carbono em plantas C3 apresenta uma faixa de valores entre -24% a -32%, enquanto os valores de plantas C4 é entre -11% a -15% [45].

A principal planta produtora de ácido tartárico, a videira, apresenta via fotossintética C3 e é cultivada sob condições climáticas rigorosas [46]. Conseqüentemente, a relação  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  é restrita a uma faixa pequena de valores. Em contraste a produção de ácido tartárico sintético por matéria-prima proveniente do petróleo permite uma ampla gama de valores para a relação isotópica de carbono, o que pode gerar valores sobrepostos no ácido tartárico natural [17]. Logo, esta medida não é determinante para a identificação do ácido tartárico, porém permite uma análise preliminar já que amostras que não estiveram dentro da faixa natural, indicam origem sintética.

Medidas de isótopos estáveis de oxigênio e hidrogênio, de maneira geral, fornecem informações sobre a origem geográfica de um composto ou produto. Uma das principais fontes desses isótopos é a água. Em escala global, a concentração de deutério e oxigênio-18 em água de precipitação é característica das condições climáticas locais [58; 59]. Dessa forma, a composição isotópica é controlada principalmente por processos em escala regional, como:

proveniência de massas de ar úmido, trajetórias do transporte de vapor de água para os continentes, evaporação e condensação e a média histórica de chuva [49; 60].

Para o ácido tartárico natural, proveniente de plantas a água é a única fonte de hidrogênio para a fotossíntese. Enquanto que para o oxigênio, além da água de precipitação, ocorre absorção por CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> atmosférico. A absorção de água não promove fracionamento dos isótopos de oxigênio, já a absorção do gás carbônico sim. Essa molécula é absorvida para o processo de fotossíntese fracionando os isótopos de oxigênio e carbono de acordo com seu meio de fixação. A absorção de O<sub>2</sub> é feita pela respiração celular nas folhas, processo que também provoca fracionamento de isótopos. O nível de fracionamento é afetado pelas condições locais, como por exemplo temperatura, exposição à luz, umidade relativa e estresse hídrico, provocando enriquecimento de isótopos pesados [17; 49].

O oxigênio presente no ácido tartárico sintético tem como fonte única a água usada nas diversas etapas de reações químicas na produção industrial [17]. A diferença da origem dos isótopos naturais de oxigênio do ácido tartárico natural e sintético favorece a diferenciação entre eles. Em suma, ácido tartárico natural apresenta maior razão isotópica de <sup>18</sup>O que o sintético. Essa mesma afirmação não pode ser feita para os isótopos de hidrogênio, pois para os dois tipos de produção de ácido tartárico, eles provem da mesma fonte: água de precipitação. Entretanto, isso torna a relação <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H extremamente dependente da região e do clima.

### **3.1.2 Espectrometria de massas de razão isotópica**

O espectrômetro de massa é uma das ferramenta analítica mais usada para obter informações sobre massa molecular, identificação, quantificação e confirmação de compostos [45]. A espectrometria de massas de razão isotópica (IRMS) é desenvolvida especificamente para medição precisa de pequenas diferenças isotópicas de elementos leves, como <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N e <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O. Na natureza a variação da razão dos isótopos estáveis é muito sutil, sendo necessária medições muito precisas para detectá-las. Tanto um espectrômetro de massas comum, quanto um IRMS são capazes de medir isótopos, entretanto eles se diferem quanto a precisão da medição. Essa precisão é definida como um desvio padrão entre quatro e seis algarismos significativos [61]. A desvantagem desta alta precisão é que o IRMS aceita o analito na forma de apenas uma única espécie química e no estado gasoso; sendo que este gás deve ser isotopicamente representativo da amostra original.

Antes da análise por IRMS as amostras devem ser convertidas a gases simples como H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e CO. Esta conversão depende da composição da amostra e do isótopo de interesse. O que será medido é a razão dos íons correspondentes a estes gases considerando os isótopos do

elemento de interesse [62; 63]. Permanentemente, a razão isotópica da amostra é comparada a razão isotópica de um composto de referência, garantindo alta precisão para esta medida. Ao longo dos últimos anos a determinação da razão dos isótopos estáveis de elementos leves, principalmente, carbono, oxigênio e hidrogênio, tem sido utilizada não apenas para elucidação de vias bioquímicas e mecanismos de reação, mas têm aumentado sua importância no controle de autenticidade e garantia de origem de alimentos e ingredientes de alimentos, entre outros.

Assim, como qualquer espectrometria de massas, o princípio básico da IRMS é gerar íons do composto analisado, seja ele orgânico ou inorgânico, acelerar este íon por um potencial, injetá-lo em um campo magnético uniforme e detectá-lo [64]. Se um íon de massa,  $m$ , e carga,  $z$ , é acelerado por uma diferença de potencial fixa,  $V$ , então cada molécula irá adquirir uma velocidade,  $v$ . Quando esses íons são submetidos a um campo magnético,  $B$ , as suas trajetórias se tornam curvas com raio,  $r$ . O movimento deste íon é definido pela Equação 6:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V} \quad 6$$

Assim, a combinação dos campos eléctrico e magnético permite selecionar quais íons realizam uma curvatura que permita atingir o detector [65].

Um espectrômetro de massas de razão isotópica é composto por um sistema de introdução de amostra, uma fonte de íons, um analisador para separação dos íons de acordo com sua razão  $m/z$  e um detector. A Figura 21 apresenta um diagrama esquemático do IRMS. Na fonte de íons do espectrômetro de massas, moléculas de gases são ionizadas por impacto de elétrons (*electron ionisation*, EI), onde um feixe de elétrons acelerados (normalmente utiliza-se uma lâmpada de filamento de tungstênio aquecida) bombardeia a molécula causando a ionização. As moléculas ionizadas são então aceleradas a vários kV para dentro analisador magnético. Os íons passam por um campo magnético antes de atingir os detectores de copos de Faraday (*Faraday cup*). A força do campo magnético e diferença de potencial determina a trajetória dos íons e onde eles entrarão nos detectores. O uso de múltiplos detectores, com um copo para cada isotópomo, permite a medição da razão de intensidade iônica, anulando flutuações na intensidade do feixe de íons. As correntes dos íons resultantes são continuamente monitoradas e seguem para um sistema de tratamento de dados.

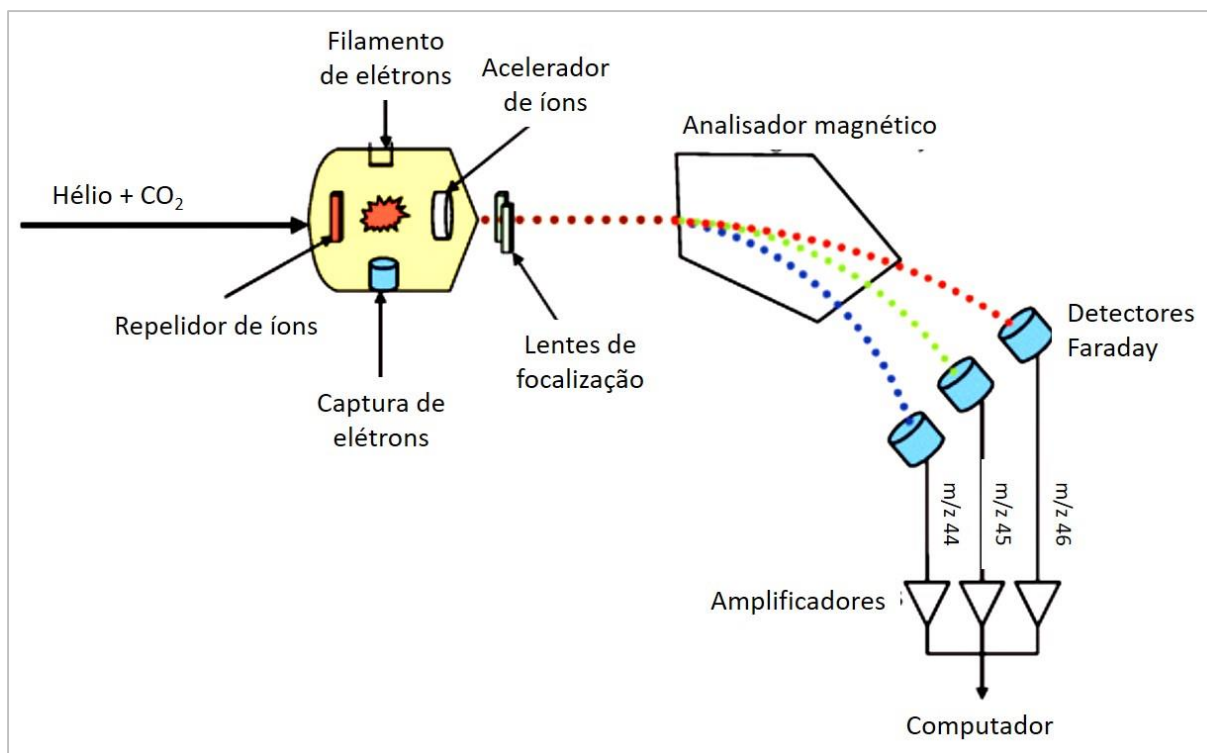


Figura 21. Esquema de um espectrômetro de massa de razão isotópica na análise de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . Modificado de [66].

A determinação da abundância isotópica é feita simultaneamente com um copo de Faraday dedicado a cada razão  $m/z$ . No caso do carbono que é convertido em  $\text{CO}_2$ , três isotopômeros são quantificados  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ,  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$  e  $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ , com as respectivas relações  $m/z$  44, 45 e 46. Para o oxigênio, que é baseado no  $\text{CO}$ , as razões  $m/z$  28 e 30 referentes a  $\text{C}^{16}\text{O}$  e  $\text{C}^{18}\text{O}$  são identificadas. E para o hidrogênio, os isotopômeros  $^1\text{H}_2$  e  $^1\text{H}^2\text{H}$ , de  $m/z$  2 e 3 respectivamente, são detectados [63; 67].

Como dito anteriormente, as amostras devem apresentar-se no IRMS na forma de um gás puro, o que requer o uso de sistemas complexos para a preparação de amostras antes da sua introdução no espectrômetro de massas. Por isso, geralmente a técnica de IRMS é associada com outra; sendo que uma das mais utilizadas é o analisador elementar (EA) que permite dois tipos de associações. Para análises de carbono e nitrogênio as amostras passam por combustão em atmosfera de oxigênio, essa técnica é conhecida como EA-IRMS (*Elemental analyser isotope ratio mass spectrometry*) ou EA-IRMS em modo de combustão. E para análises de hidrogênio e oxigênio as amostras passam por conversão térmica em alta temperatura, chamada de TC/EA-IRMS (*Thermal conversion / Elemental analyser isotope ratio mass spectrometry*) ou EA/IRMS em modo de pirólise [62; 66; 68].

A análise por EA-IRMS e TC/EA-IRMS pode ser dividida em 4 etapas: combustão ou conversão térmica da amostra no analisador elementar, introdução dos gases envolvidos na



fonte de íons do espectrômetro de massas pela interface, ionização das moléculas de gases seguido de separação e detecção no espectrômetro de massas e tratamento de dados.

### ***EA-IRMS***

Esta técnica é aplicável em uma ampla gama de materiais e permite estabelecer as razões isotópicas de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . Sem preparação de amostra significativa, após serem pesadas, substâncias sólidas ou não voláteis são introduzidas no analisador elementar usando cápsulas de estanho [66].

A Figura 22 representa um diagrama esquemático do analisador elementar com IRMS. A cápsula com amostra é abaixada em um forno de combustão através de um amostrador automático de carrossel, então a amostra é queimada a temperaturas elevadas sob um fluxo de oxigênio e produz  $\text{NO}_x$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Este catalisador de combustão contém  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e  $\text{Co}_3\text{O}_4/\text{Ag}$  para restringir enxofre e halogênios, e também fragmentos de quartzo para coletar cinzas e resíduos da amostra e cápsula. A temperatura pode variar de  $900\text{-}1100^\circ\text{C}$ , mas o calor de combustão da cápsula de estanho pode elevá-la até  $1800^\circ\text{C}$  [62]. Os produtos da combustão são carregados por um fluxo de hélio até uma câmara de redução, onde óxidos de nitrogênio são convertidos em  $\text{N}_2$  e o excesso de  $\text{O}_2$  é removido. Esta câmara usualmente é preenchida com cobre de alta pureza e as reações ocorrem a temperatura de  $650^\circ\text{C}$ , podem ocorrer variações de acordo com a análise desejada e/ou modelo do aparelho. Em seguida, o analito é levado para um armadilha química contendo perclorato de magnésio,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ , para remoção de água que foi produzida na combustão. E então os gases resultantes,  $\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2$ , são separados por uma coluna cromatográfica de enchimento, passam pelo detector de condutividade térmica que permite visualizar a separação dos picos dos gases e, por fim, entram no espectrômetro de massas de razão isotópica [68].

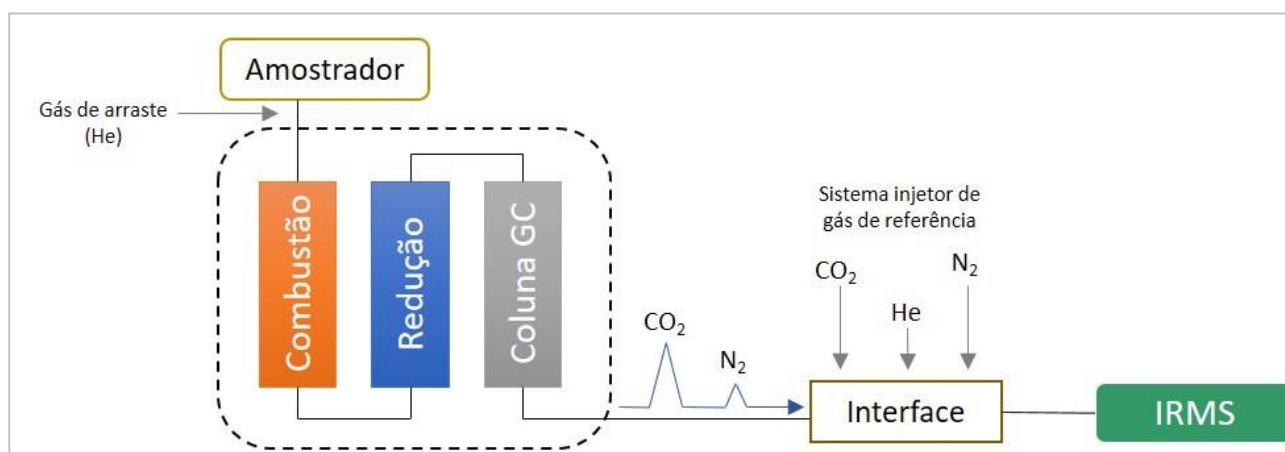


Figura 22. Diagrama esquemático do analisador elementar com IRMS (EA-IRMS).  
Modificado de [62; 66].

Como as razões isotópicas são definidas com relação a gás de referência previamente calibrado com padrões internacionais, os melhores resultados são obtidos quando a intensidade de sinal da amostra e do gás de referência são de magnitude similar e quando eles são analisados tão próximos quanto possível com relação ao tempo.

### ***TC/EA-IRMS***

Também conhecido como modo de pirólise, este acoplamento se difere do EA-IRMS no tipo de reator utilizado e no seu enchimento. Neste caso, o reator é constituído de cerâmica ao invés de quartzo, e no seu interior encontra-se um tubo de carbono vítreo. Como preenchimento são utilizados pequenos fragmentos de carbono vítreo e lã de prata para blindar átomos de halogênios.

TC/EA-IRMS permite medir as razões isotópicas  $^2\text{H}/^1\text{H}$  e  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  de amostras orgânicas ou inorgânicas. As amostras são convertidas em gases por pirólise, ou seja, na ausência de oxigênio; a decomposição química ocorre pela ação da temperatura [68].

A Figura 23 apresenta um diagrama esquemático desta técnica. As amostras são introduzidas no sistema em cápsulas de prata. A decomposição do analito em gases, como  $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$  e  $\text{CO}$  dependendo da amostra, ocorre em temperaturas entre  $1250\text{-}1450^\circ\text{C}$ . Assim como no EA, existem variações recomendadas para análises específicas. Os gases formados são, então, separados por uma coluna GC e os picos são identificados por um detector de condutividade térmica. E enfim,  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}$  são analisados por um espectrômetro de massas de razão isotópica.

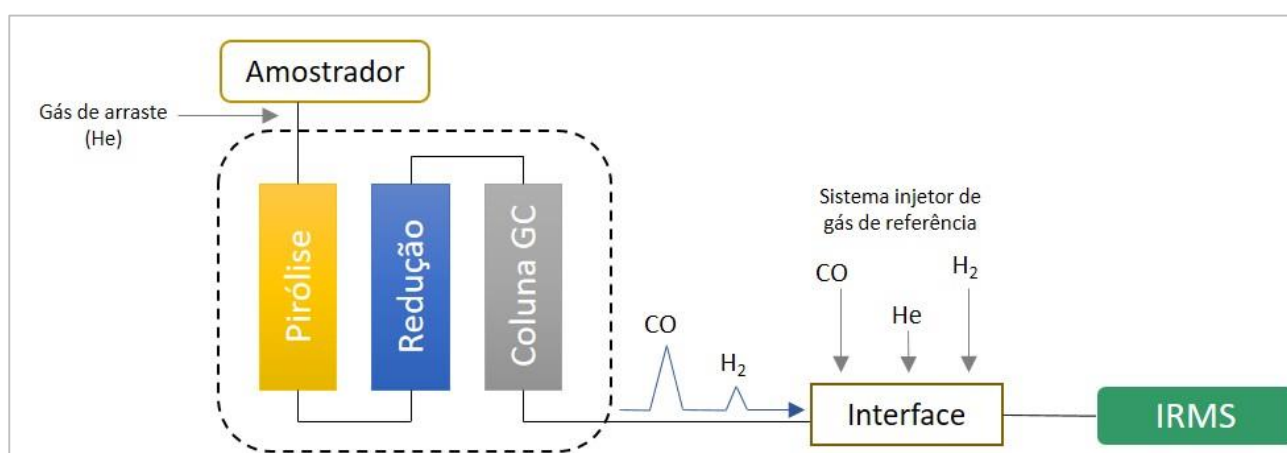


Figura 23. Diagrama esquemático do EA/IRMS em modo de pirólise (TC/EA-IRMS).  
Modificado de [62; 66]

### 3.1.3 Notações e padrões para análises isotópicas

Variações na abundância natural de isótopos estáveis são expressas usando a notação delta ( $\delta$ ) como mostrado nas Equações 7 e 8.

$$\text{razão } (R) = \frac{\text{abundância do isótopo mais pesado}}{\text{abundância do isótopo mais leve}} \quad \text{Equação 7}$$

$$\delta = \left( \frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{padrão}}} - 1 \right) \cdot 1000 \text{ (‰)} \quad \text{Equação 8}$$

Onde  $R_{\text{amostra}}$  é razão isotópica da amostra e  $R_{\text{padrão}}$  é a razão isotópica do padrão. Como os valores de  $\delta$  geralmente são muito pequenos, eles são multiplicados por mil e são reportados em partes por mil (‰ ou *per mil*) [62].

Como evidenciado pela notação delta, a razão isotópica, em níveis de abundância natural, é medida com relação a padrões que definem a escala de medida para isótopos particulares. Com isso, são eliminados qualquer viés ou erro sistemático nas medidas.

A Agência Internacional de Energia Atômica (IEAE - International Atomic Energy Agency; Viena, Áustria) e o Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos (NIST – National Institute of Standard and Technology; Washington, EUA) são os órgãos que fornecem uma gama de material de referência padrão. Para referência na medição da razão isotópica de oxigênio e hidrogênio foi sugerido o uso de uma “água média do oceano”, denominada SMOW (*Standard Mean Ocean Water*), em 1961 [69]. O padrão hipotético SMOW era como o ponto zero de uma escala convencional em termos de águas de referência reais. As razões isotópicas de SMOW foram compiladas fazendo uma média ponderada das medidas da razão isotópica de diferentes águas do mar disponíveis no momento. Como nunca existiu um padrão real de SMOW, sua composição isotópica foi definida com base em um padrão de água conhecido como NBS-1, uma amostra de água do rio Potamac localizado em Washington, Estados Unidos. Inicialmente SMOW foi definido como padrão de referência primário para expressar as variações relativas de  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  e  $^2\text{H}/^1\text{H}$  em águas naturais, porém rapidamente ele foi adotado para os demais materiais naturais. Esse padrão atendeu bem as análises, principalmente de água, já que o oceano apresenta composição isotópica uniforme e corresponde a aproximadamente 97% da água existente na crosta terrestre, além de ser o maior reservatório de hidrogênio na Terra [68]. Porém, devido à falta de um padrão para calibração de medidas laboratoriais e dúvidas sobre o estado de conservação do padrão NBS-1, esse padrão foi substituído. Em 1967, um novo padrão denominado VSMOW (*Vienna Standard Mean Ocean Water*) foi preparado buscando uma composição isotópica praticamente idêntica à do SMOW. Para obter esse padrão água do oceano Pacífico (latitude  $0^\circ$  e longitude  $180^\circ$  em julho

de 1967) foi misturada com pequenas quantidades de outras águas, até atingirem a composição isotópica desejada. Em 2006, como o padrão VSMOW estava esgotando, então um novo padrão foi produzido pela IEAE, chamado de VSMOW 2 e com valores similares ao seu padrão original [70].

O material de referência do carbono é chamado de Pee Dee Belemnite (PDB) e é baseado em um carbonato de cálcio marinho de uma belemnite do Cretácio, *Belemnitella americana*, originária da formação Pee Dee, na Carolina do Sul, Estados Unidos. Suas razões isotópicas são similares as dos calcários marinhos, conhecido por ser enriquecido em carbono 13 comparado à compostos orgânicos. O bicarbonato dissolvido no oceano controla a composição isotópica do CO<sub>2</sub> atmosférico, e esses dois compostos constituem as duas grandes fontes de materiais de partida de carbono no seu ciclo biogeoquímico. Como a razão isotópica do PDB é muito próxima do bicarbonato dissolvido no oceano pode-se dizer que ele é para o carbono o equivalente ao SMOW para os isótopos de hidrogênio e oxigênio. Como a demanda esgotou os padrões de PDB, outros padrões foram calibrados para as mesmas razões isotópicas, sendo um dos mais utilizados o VPDB (*Vienna Pee Dee Belemnite*).

A Tabela 11 apresenta as razões isotópicas dos padrões de referência do hidrogênio, carbono e oxigênio usados neste trabalho [71] *adaptado*.

Tabela 11. Razões isotópicas dos padrões de referência do hidrogênio, carbono e oxigênio.

Padrão de referência	Isótopo	Razão isotópica	Delta (‰)
VSMOW	<sup>2</sup> H/ <sup>1</sup> H	0,00015576	0,00
VPDB	<sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C	0,011224	0,00
VSMOW	<sup>16</sup> O/ <sup>18</sup> O	0,0020052	0,00

Todos os padrões utilizados em métodos isotópicos estão calibrados relativamente a estes padrões de referência.

### 3.1.4 *Análise multivariada*

A análise multivariada é o uso de ferramentas quimiométricas apropriadas para extrair informações relevantes e estabelecer padrões entre diferentes amostras. Para isso um grande número de amostras e variáveis são medidas e relacionadas a fatores externos, como clima, variedade geográfica e processos de produção [72; 73]. Dois dos principais métodos de análise multivariada são análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante (DA).

A análise de componentes principais (PCA) é um tratamento estatístico usado para simplificar a matriz de dados com base na correlação entre as variáveis. A colinearidade elevada é uma forte indicação de que é possível encontrar novas bases que melhor representem a

informação fornecida nas medidas [74]. Ela permite demonstrar diferenças entre as várias amostras ou grupos de amostras através de novas variáveis formadas, referidas como componentes principais, determinando ao mesmo tempo quais variáveis estão envolvidas principalmente. A componente principal é a ordenação que melhor retrata a distribuição dos dados e a componente secundária é perpendicular a ela. Além de demonstrar diferenças ao longo do estudo das amostras, esta técnica analítica reduz a complexidade do sistema, sendo muito aplicada em reconhecimento de padrões.

A análise discriminante (DA) classifica um conjunto de amostras em diferentes grupos baseando-se em um conjunto de características semelhantes que os descrevem. Estes grupos são conhecidos ou pré-determinados como desejado [75]. Essa classificação é avaliada se os diferentes grupos podem ser matematicamente distinguidos de acordo com o conjunto de dados diferente. Para verificar a adequada categorização de uma amostra aleatória em um grupo o método de validação cruzada pode ser aplicado. Neste método a análise discriminante é repetida  $n$  vezes excluindo uma amostra de cada vez, e esta amostra é atribuída a um grupo usando a função discriminante obtida. Dessa forma, todos os elementos são atribuídos sem participarem da construção da função discriminante, portanto, todos elementos são usados como amostras de validação. Se a taxa de êxito obtida na validação cruzada é similar a obtida na análise discriminante de todas amostras, a validação é positiva e os resultados são aceitos para toda a população [73].

## 3.2 Parte experimental

Nesta etapa, 35 amostras de ácido tartárico foram obtidas em parceria com a empresa francesa Faure S.A. Elas foram classificadas de acordo com seu método de produção e região geográfica. Todas elas tiveram o nível de pureza monitorado de acordo com o ponto de fusão, como descrito na seção 2.1.2, e apresentaram pureza acima de 95,5%.

As amostras foram quebradas criogenicamente para assegurar a homogeneidade na distribuição de tamanho e foram mantidas em dessecador sob atmosfera inerte para evitar erros devido a condições do meio ambiente. O alto nível de pureza e homogeneidade das amostras permitiu a análise de IRMS sem a necessidade de preparações complexas.

### 3.2.1 Determinação de razão isotópica

A determinação de isótopos estáveis  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  e  $^2\text{H}/^1\text{H}$  foi feita por espectrometria de massas de razão isotópica.

As medidas de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  foram feitas em um analisador elementar Flash EA1112 acoplado a um IRMS Delta V Plus, ambos da Thermo Scientific. As amostras de ácido tartárico foram introduzidas na unidade de combustão na temperatura de 1000°C sob fluxo de oxigênio e hélio. O carbono foi convertido em  $\text{CO}_2$  e os sinais de  $m/z$  44, 45, e 46, referentes aos seus isotopômeros, foram usados para medir a relação  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

As medidas de  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  e  $^2\text{H}/^1\text{H}$  foram realizadas em analisador elementar de conversão térmica em alta temperatura TC/EA (*TC/EA high temperature conversion elemental analyzer*) também acoplado com IRMS Delta V Plus, da Thermo Scientific. As amostras foram depositadas na unidade pirólise com temperatura de 1400°C. Hidrogênio e oxigênio foram convertidos em  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}$ , respectivamente. A razão  $^2\text{H}/^1\text{H}$  foi calculada baseada nas medidas dos sinais  $m/z$  2 e 3, referentes aos isotopômeros de  $\text{H}_2$ . E, por fim, a razão  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  foi determinada usando os sinais coletados de  $m/z$  28 e 30, referentes aos isotopômeros de  $\text{CO}$ .

Os resultados das medidas isotópicas obtidas foram expressos na notação delta ( $\delta$ ) em parte por mil (‰), como na Equação 10.

Os padrões internacionais usados como referências para  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  foi Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB). Já para  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  e  $^2\text{H}/^1\text{H}$  foi utilizado Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW).

### **3.2.2 *Análise estatística***

As técnicas estatísticas multivariadas foram realizadas com o Minitab® Statistical Software versão 17.1.0 (Minitab Inc., State College, EUA). As técnicas aplicadas foram análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante (DA) com validação cruzada. As variáveis isotópicas foram tratadas de acordo com seu método de produção e origem geográfica.

### 3.3 Resultados e discussão

Os dados experimentais da razão isotópica do carbono, oxigênio e hidrogênio estão resumidos na Tabela 12. Primeiramente as amostras de ácido tartárico foram separadas conforme o método de produção. Em seguida as amostras de ácido tartárico naturais foram divididas segundo sua origem geográfica. As razões isotópicas de carbono, oxigênio e hidrogênio de todas as amostras medidas encontram-se no Apêndice A.

Tabela 12. Razões de isótopos estáveis de carbono, oxigênio e hidrogênio do ácido tartárico para diferentes métodos de produção e origens geográficas.

	$\delta^{13}\text{C}$				$\delta^{18}\text{O}$				$\delta^2\text{H}$			
	Média	$\sigma$	Min	Max	Média	$\sigma$	Min	Max	Média	$\sigma$	Min	Max
<i>Método de produção</i>												
Natural (n = 24)	-22,65	0,39	-23,30	-21,81	28,13	2,75	23,43	34,20	-81,92	22,27	-126,50	-49,00
Sintético (n = 11)	-25,06	4,20	-31,53	-21,19	17,40	1,78	13,85	19,60	-40,73	21,30	-72,00	-9,00
<i>Origem geográfica</i>												
Europa (n = 18)	-22,58	0,44	-23,23	-21,81	29,25	2,15	26,40	34,20	-70,33	10,69	-85,00	-49,00
América do Sul (n = 6)	-22,85	0,28	-23,30	-22,55	24,79	1,40	23,43	27,70	-116,67	8,69	-126,50	-103,00

As amostras de ácido tartárico sintético apresentam valores de  $\delta^{13}\text{C}$  abaixo das amostras naturais e com maior desvio padrão. Uma maior dispersão desses valores já era esperada devido ao processo de síntese que utiliza carbono proveniente do petróleo, com ampla gama de valores para  $\delta^{13}\text{C}$ . Uma maior diferença entre valores de amostras naturais e sintéticas é notada na comparação da razão isotópica do oxigênio. A média de  $\delta^{18}\text{O}$  ainda apresenta baixo desvio padrão, pressupondo uma importante medida para classificação do método de produção das amostras. Já os valores de  $\delta^2\text{H}$  apesar de distintos possuem alto desvio padrão, ou seja, há uma grande dispersão e sobreposição dos dados.

Para as amostras naturais agrupadas pela origem geográfica a maior diferença entre as razões isotópicas de Europa e América do Sul é verificada para o hidrogênio. Para os dados de  $\delta^{18}\text{O}$  também ocorre uma importante distinção sem sobreposição de valores.

As razões isotópicas de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  foram condicentes e similares a trabalhos anteriores [17; 76]. Não foi encontrado na literatura medições de  $\delta^2\text{H}$  em ácido tartárico para comparação.

Para correlacionar os resultados obtidos com as razões de isótopos estáveis de carbono, oxigênio e hidrogênio foi empregada a análise multivariada.

#### 3.3.1 Método de produção

O conjunto de dados dos três isótopos medidos ( $\delta^{13}\text{C} + \delta^{18}\text{O} + \delta^2\text{H}$ ) para as 35 amostras de ácido tartárico foi sujeito a análise de componente principal (PCA), o gráfico obtido está na



Figura 24. O gráfico retrata uma clara separação entre amostras de produção natural e sintética usando os dois primeiros componentes principais. Como pode-se ver as amostras sintéticas têm valores mais dispersos que os naturais. Essa tendência é percebida devido a diferentes fontes de carbono usadas na produção sintética feita em diferentes partes do mundo. Além disso, a diferença na composição de isótopos da água utilizada na síntese é um importante fator que contribui para esta separação.

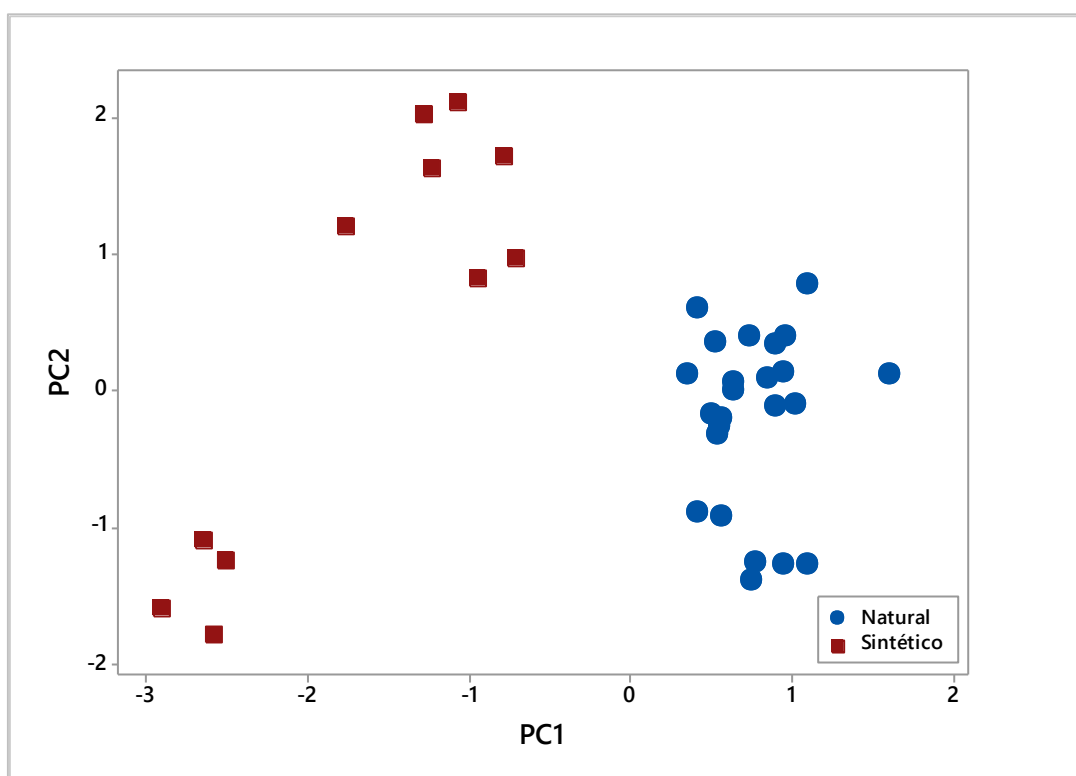


Figura 24. Gráfico de PCA para método de produção usando os dois primeiros componentes principais para dados de  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^2\text{H}$ .

Apenas um *outlier* foi identificado, proveniente de uma amostra de ácido tartárico sintético com alto valor de  $\delta^{13}\text{C}$ . Como o carbono de amostra sintéticas provem de derivados do petróleo e pode apresentar ampla gama de valores, este dado não é surpreendente. A remoção deste *outlier* na análise PCA não altera significativamente a divisão entre grupo natural e sintético.

A análise discriminante com validação cruzada confirmou os resultados de PCA. Todas as amostras foram corretamente classificadas, 100% para o desempenho geral e 100% para a validação cruzada.

### 3.3.2 Origem geográfica

Proseguindo a análise multivariada, as amostras naturais de ácido tartárico foram classificadas de acordo com a origem geográfica. Novamente, uma separação das amostras foi observada com base nos dados de PCA dos três isótopos ( $\delta^{13}\text{C} + \delta^{18}\text{O} + \delta^2\text{H}$ ), Figura 25. A segmentação mais pronunciada foi entre amostras da Argentina e aquelas de países europeus. A combinação de dados da razão isotópica de  $^2\text{H}/^1\text{H}$  e  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ , que fornecem informações sobre a origem geográfica, foi crucial para esta diferenciação. Os processos de fracionamento de isótopos que as plantas realizam variam com a condição climática, gerando perfis de ácido tartárico distintos de acordo com a sua procedência.

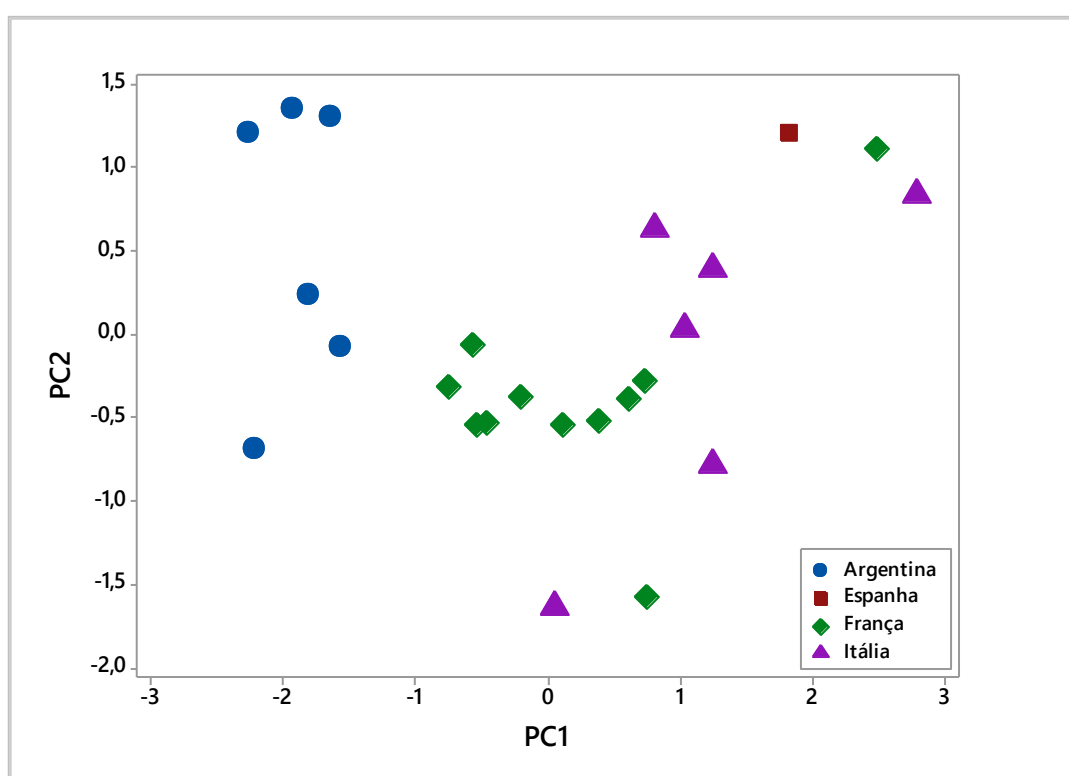


Figura 25. Gráfico de PCA para origem geográfica de ácidos tartáricos naturais usando os dois primeiros componentes principais para dados de  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^2\text{H}$ .

Da mesma forma que o método de produção, a separação geográfica foi confirmada por DA com validação cruzada. Considerando o conjunto de amostras da Argentina e conjunto da Europa, a correta classificação das amostras foi de 100% para o desempenho geral e 100% para a validação cruzada. Já a divisão por países gerou um desempenho geral de 78,3% enquanto a validação cruzada reduziu este valor para 73,9%. As amostras categorizadas erroneamente eram da França e Itália. Como estes países são de regiões adjacentes, um perfil de dados semelhante é esperado. A semelhante fonte de água de precipitação e proximidade geográfica geram dados

com diferenças sutis ou quase não existentes, além de sobreposição de dados. Amostras adicionais desta região podem colaborar para um melhor ajuste na classificação.

### 3.4 Conclusão

Este estudo descreveu um novo método de análise de razão de isótopos estáveis combinado com tratamento de dados por análise multivariada para classificar o ácido tartárico com base no método de produção e na origem geográfica. Recomenda-se a combinação de dados dos três isótopos possíveis,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^2\text{H}$ , uma vez que isso permite duas classificações do ácido tartárico com apenas um conjunto de dados. A análise de componente principal foi uma ferramenta precisa para obter a classificação adequada, o que foi confirmado com a verificação por análise discriminante

O número de amostras utilizadas neste estudo confirma a aplicabilidade desta técnica ao controle de qualidade do ácido tartárico. Porém, acredita-se que uma classificação mais acurada possa ser realizada com mais amostras de outras regiões geográficas.

## CAPÍTULO 4. ANÁLISE ISOTÓPICA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO TARTÁRICO

### 4.1 Aspectos gerais

Diversos produtos provenientes da estrutura base do ácido tartárico são comercializados. Sais e ésteres são as substâncias derivadas mais produzidas, com destaque para o bitartarato de potássio, tartarato de cálcio, tartarato de sódio potássio e ácido metatartárico.

Compartilhando do mesmo esqueleto químico do ácido tartárico essas substâncias se diferem quanto a sua função química, como pode ser observado na Figura 26.

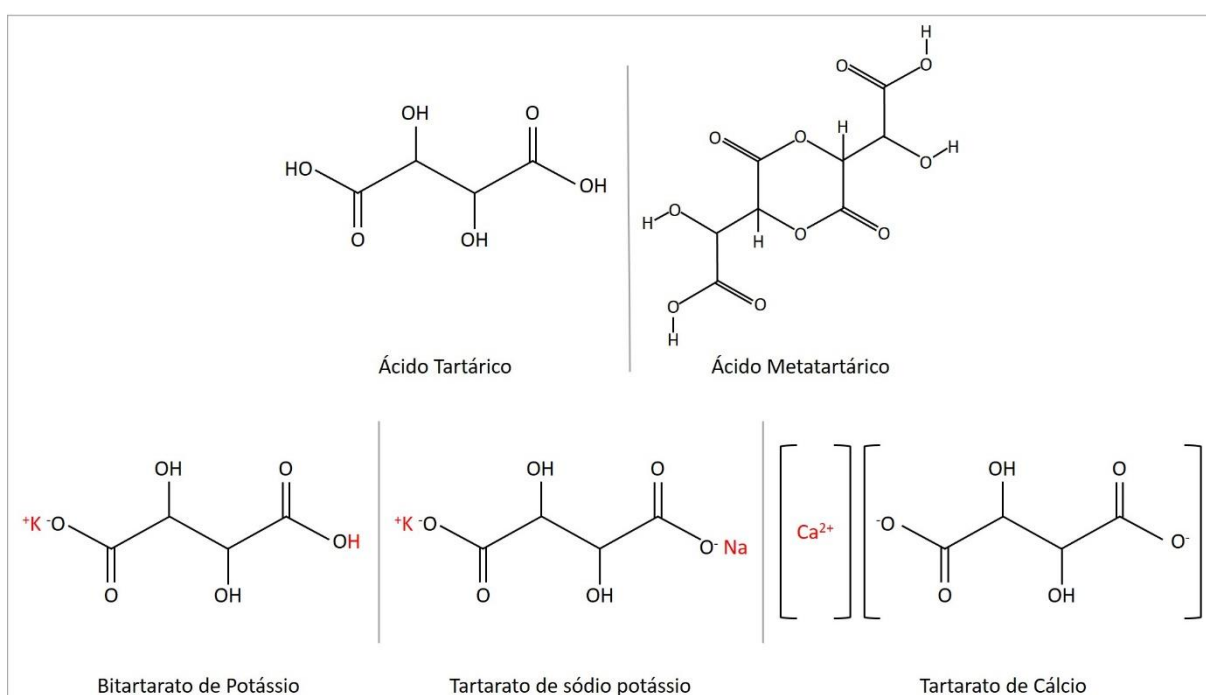


Figura 26. Estrutura do ácido tartárico e seus principais derivados.

#### 4.1.1 Bitartarato de potássio

Também conhecido como creme de tártaro, essa substância é formada nos tanques de vinho e se depositam espontaneamente na forma de pequenos cristais ortorrômnicos. Este sal de fórmula molecular  $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  é solúvel em água e álcool; e apresenta sabor levemente ácido. Conhecido desde a antiguidade, o creme de tártaro tem sua maior produção proveniente de borras e bagaços de uvas. Ele é usado nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e químicas. Em alimentos, é usado como estabilizante, anti-aglomerante e espessante. Na viticultura, ele atua como indutor de cristalização dos sais do ácido tartárico. Em preparações farmacêuticas é

utilizado junto com o ácido tartárico para produzir diuréticos e laxantes. E na área química é largamente usado como padrão para soluções tampão [3; 13].

#### 4.1.2 Tartarato de cálcio

O tartarato de cálcio é produzido a partir do bitartarato de potássio presente nos resíduos do vinho e é encontrado naturalmente na forma L(+). Este sal cristaliza em formato tetra hidratado e apresenta solubilidade extremamente baixa em água e álcool. Sua principal aplicação é na produção de ácido tartárico e como aditivo na fabricação de vinhos atuando na desacidificação. Ademais, ele pode ser usado como regulador de acidez em produtos alimentícios [77].

#### 4.1.3 Tartarato de sódio e potássio

Conhecido também como sal de Rochelle e sal de Seignette, esta substância foi descoberta em 1672 pelo farmacêutico Pierre Seignette. Este sal de fórmula molecular  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  forma cristais ortorrômbicos e apresenta piezoelectricidade. Normalmente ele é formado a partir do creme de tártaro e é insolúvel em água. O tartarato de sódio e potássio é usado como regulador de acidez, antioxidante, estabilizador e emulsificante.

#### 4.1.4 Ácido metatartárico

É o produto obtido pela desidratação do ácido L(+)-tartárico à temperatura de 160-170°C, usualmente em baixa pressão, Figura 27. O ácido metatartárico é adicionado no vinho para prevenir a precipitação do ácido tartárico. Ele é altamente solúvel em água e álcool, mas hidrolisa com rapidez [77]. Geralmente este produto é comercializado na forma de fino pó, apresenta odor fraco de torrado e cor amarelo claro.

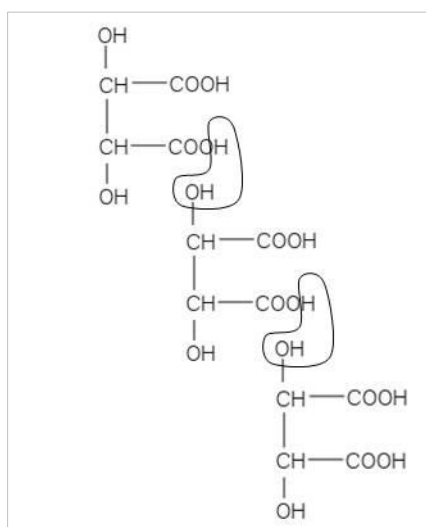


Figura 27. Formação do ácido metatartárico [78].

As principais características do ácido tartárico e dos derivados descritos acima estão resumidas de maneira comparativa na Tabela 13.

Tabela 13. Propriedades do L(+)-ácido tartárico e alguns de seus derivados.

	L-ácido tartárico	Bitartarato de potássio	Tartarato de cálcio	Ácido metatartárico	Tartarato de sódio potássio
Outros nomes	L-Ácido 2,3-dihidroxiбутanedioico	Tartarato monopotássico Creme de tártaro	L-2,3-dihidroxiбутanedioato de cálcio	Ácido ditartárico	Sal de Seignette Sal de La Rochelle
Massa molecular	150,1	118,18	190,14	-	210,22
Fórmula química	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	KC <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	CaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>10</sub>	KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
Estrutura					
Ponto de fusão	168-170°C	>250°C	650°C	170°C-	70-80°C
Solubilidade	Água, álcool, glicerol	Baixa solubilidade em água	Baixa solubilidade em água e álcool	Água, álcool	Água
Rotação específica	[α] +11.5 and +13.5° (aq. sol. 20g/100mL, 20°C)	-	[α] +7,2 ± 0,2° (20°C)	-	-
Resíduos de enxofre	>1g/kg	-	-	-	-
Cloretos	>1g/kg	-	-	-	>5g/kg
Sulfatos	>1g/kg	-	>1g/kg	-	>5g/kg
Sódio	-	1 pp 100	-	-	-
Ácido cítrico	Teste com solução de sulfato de mercúrio (II) e solução de permanganato de potássio, nenhum precipitado branco deve ser formado	-	-	-	-
Ácido oxálico e bário	Solução deve permanecer clara	-	-	-	-
Oxalato	>100mg/kg	>100mg/kg	-	-	-
Ferro	>10mg/kg	>10mg/kg	-	-	>10mg/kg
Chumbo	>5mg/kg	>5mg/kg	>5mg/kg	>5mg/kg	>5mg/kg
Mercúrio	>1mg/kg	>1mg/kg	>1mg/kg	>1mg/kg	-
Arsênio	>3mg/kg	>3mg/kg	>3mg/kg	>3mg/kg	-
Outros	-	Após 4 horas de secagem em forno a 105°C, perda de massa deve ser < 1 pp 100	Perda de massa deve ser ≤ 2.5 pp 100.	O produto usado em vinhos deve conter pelo menos 105 pp 100 de ácido tartárico após hidrólise e 32 pp 100 de ácido esterificado	-

Fonte: [77; 79].

## 4.2 Parte experimental

### 4.2.1 *Análise dos derivados do ácido tartárico por IRMS*

Assim como para o ácido tartárico, um conjunto de amostras de derivados deste ácido foram coletadas de diferentes fornecedores e de diversas partes do mundo. Como o ácido tartárico apresentou bons resultados na classificação do método de produção, essas amostras foram usadas na comparação com os derivados, verificando se estes derivados eram de origem natural ou sintética. Os resultados foram comparados com as informações obtidas dos fornecedores e de rotulagem das amostras.

Nesta fase, 74 amostras de derivados foram analisadas, sendo que 34 amostras eram de tartarato de cálcio, 23 de bitartarato de potássio, 6 de tartarato de sódio potássio e 4 de ácido metatartárico. E ainda 7 amostras de tartarato bruto, que apresenta de 80 a 90% de bitartarato de potássio.

As amostras foram quebradas criogenicamente para assegurar a homogeneidade na distribuição de tamanho e foram mantidas em dessecador sob atmosfera inerte para evitar erros devido a condições do meio ambiente. O alto nível de pureza e homogeneidade das amostras permitiu a análise de IRMS sem a necessidade de preparações complexas.

Todas as amostras foram analisadas por espectrometria de massas de razão isotópica seguindo a metodologia descrita na seção 3.2.1. Os dados obtidos foram analisados por análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante (DA) com validação cruzada, por meio do Minitab® Statistical Software versão 17.1.0 (Minitab Inc., State College, EUA).



### 4.3 Resultados e discussão

As amostras foram submetidas a análise dos isótopos estáveis de carbono, oxigênio e hidrogênio. A Tabela 14 contém os valores médios e desvio padrão dessas medidas, bem como seus máximos e mínimos. Os dados de  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^2\text{H}$  de todas as amostras estão apresentadas no Apêndice B.

Tabela 14. Razões de isótopos estáveis de carbono, oxigênio e hidrogênio para o ácido tartárico e derivados.

		Média	$\sigma$	Mínimo	Máximo
Ácido tartárico natural	$\delta^{13}\text{C}$	-22,61	0,45	-23,32	-20,98
	$\delta^{18}\text{O}$	28,62	2,67	21,70	34,70
	$\delta^2\text{H}$	-79,80	19,89	-137,00	-40,00
Ácido tartárico sintético	$\delta^{13}\text{C}$	-24,86	3,96	-31,53	-21,19
	$\delta^{18}\text{O}$	15,77	7,48	-15,80	20,80
	$\delta^2\text{H}$	-47,05	21,39	-91,00	-9,00
Ácido metatartárico	$\delta^{13}\text{C}$	-22,15	0,42	-22,84	-21,74
	$\delta^{18}\text{O}$	26,35	2,15	24,60	30,00
	$\delta^2\text{H}$	-113,50	21,38	-130,00	-77,00
Bitartarato de potássio	$\delta^{13}\text{C}$	-22,83	1,19	-27,93	-21,97
	$\delta^{18}\text{O}$	25,28	3,61	19,70	34,30
	$\delta^2\text{H}$	-127,29	36,00	-191,00	8,40
Tartarato de cálcio	$\delta^{13}\text{C}$	-22,87	1,36	-25,48	-16,50
	$\delta^{18}\text{O}$	18,64	4,31	7,10	28,90
	$\delta^2\text{H}$	-72,17	12,37	-106,00	-40,00
Tartarato de sódio potássio	$\delta^{13}\text{C}$	-22,94	3,77	-31,22	-20,45
	$\delta^{18}\text{O}$	15,52	5,00	8,50	21,70
	$\delta^2\text{H}$	-69,17	12,90	-90,00	-50,00
Tartarato bruto	$\delta^{13}\text{C}$	-23,38	0,44	-23,91	-22,57
	$\delta^{18}\text{O}$	28,80	2,54	24,90	31,40
	$\delta^2\text{H}$	-83,00	7,58	-99,00	-73,00

Todas as amostras apresentaram valores médios  $\delta^{13}\text{C}$  próximos. Destaca-se o tartarato bruto com a média de  $\delta^{13}\text{C}$  mais baixa entre os derivados, com valores próximos do ácido tartárico sintético. Este é um possível indicativo de presença de amostras sintéticas.

Nas medidas de razão isotópica do oxigênio as menores médias encontradas foram para tartarato de sódio potássio e tartarato de cálcio. Apesar do valor de desvio padrão dessas medidas, elas se encontram mais próximas dos valores de ácido tartárico sintético do que do natural.

Já as medidas de  $\delta^2\text{H}$  foram as com maior dispersão entre os valores, resultando em alto desvio padrão. Mesmo com a sobreposição de valores, novamente tartarato de sódio potássio e tartarato de cálcio apresentaram valores mais próximos do ácido tartárico sintético.

. Os valores médios de razão isotópica isolados não são suficientes para analisar estes compostos. Assim, a análise multivariada foi empregada para estabelecer relações entre os dados obtidos. O conjunto de dados dos isótopos estáveis de carbono, oxigênio e hidrogênio foram analisados por análise de componentes principais (PCA).

A Figura 28 apresenta o resultado para o ácido metatartárico. Todas as amostras encontram-se na região do ácido tartárico natural, indo de encontro com os dados de fornecedores das amostras que afirmavam ser de origem natural.

O tartarato bruto é composto de 80 a 90% de bitartarato de potássio. Devido a semelhança de sua composição com o bitartarato de potássio, estas amostras foram analisadas juntamente, como mostrado na Figura 29.

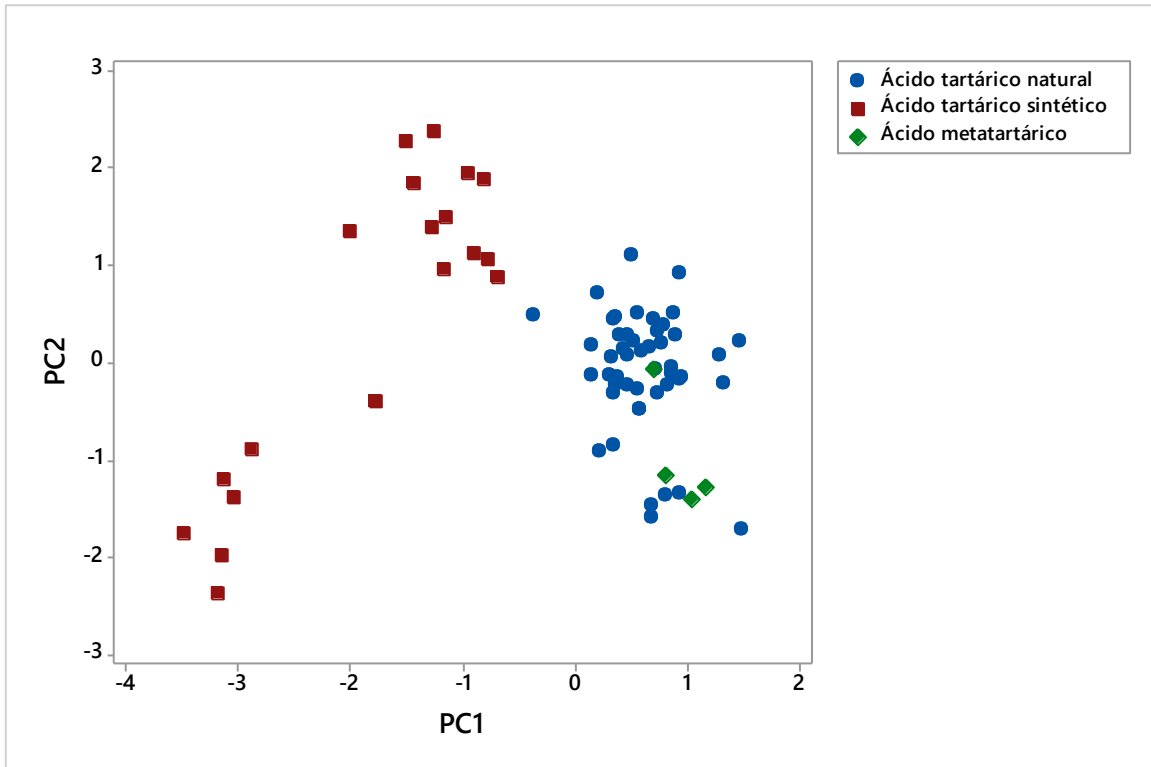


Figura 28. Gráfico da análise de componente principal para o ácido metatartárico.

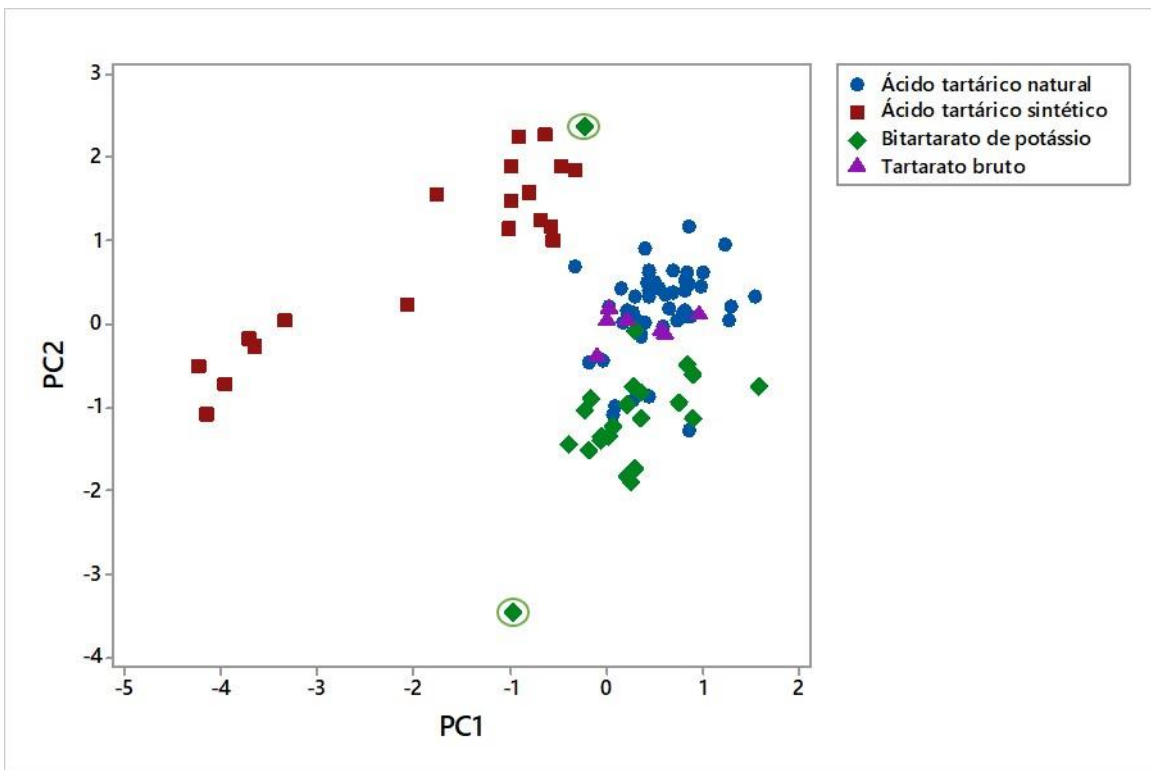


Figura 29. Gráfico da análise de componente principal para o bitartarato de potássio e tartarato bruto.

A maioria das amostras de bitartarato de potássio e todas de tartarato bruto situam-se na área do ácido tartárico natural. As informações pré-análise eram de que uma amostra era sintética e as demais de origem natural. As amostras circuladas foram classificadas pela DA diferentemente das informações dos fornecedores. A amostra circulada no alto do gráfico era tida como natural de origem da América do Sul pelo fornecedor, porém, pela análise discriminante ela foi classificada como sintética. Já amostra circulada mais abaixo da figura foi informada como de origem sintética, e DA a indicou como natural. O isolamento desta única amostra de ambos grupos, sintéticos e naturais, corrobora a informação de sua origem sintética. Isso porque a variação dos dados da razão isotópica para produtos sintéticos é maior que dos naturais.

A Figura 30 mostra a análise de PCA para o tartarato de cálcio. Um claro deslocamento dessas amostras é observado em direção à área dos ácidos tartáricos sintéticos. A principal causa é o maior valor da razão  $^2\text{H}/^1\text{H}$ . Dados dos fornecedores afirmaram que todas as amostras eram naturais. A análise por DA classificou as quatro amostras circuladas como sintéticas. Para este produto este tipo de análise não torna a sua origem tão evidente, visto a localização de suas amostras no intermédio entre os produtos naturais e sintéticos.

Por fim, a Figura 31 apresenta o gráfico de PCA para o tartarato de sódio potássio. Esta substância apresentou grande dispersão no gráfico. Duas amostras foram reclassificadas por DA, elas estão circuladas na figura. Ditas como naturais, elas foram apontadas como sintéticas. O baixo número de amostras e espalhamento dos seus dados impossibilitam afirmações sobre a origem do tartarato de sódio potássio. Um maior grupo de amostras e certificação do método de produção poderão indicar a adequação desta técnica para esta substância.

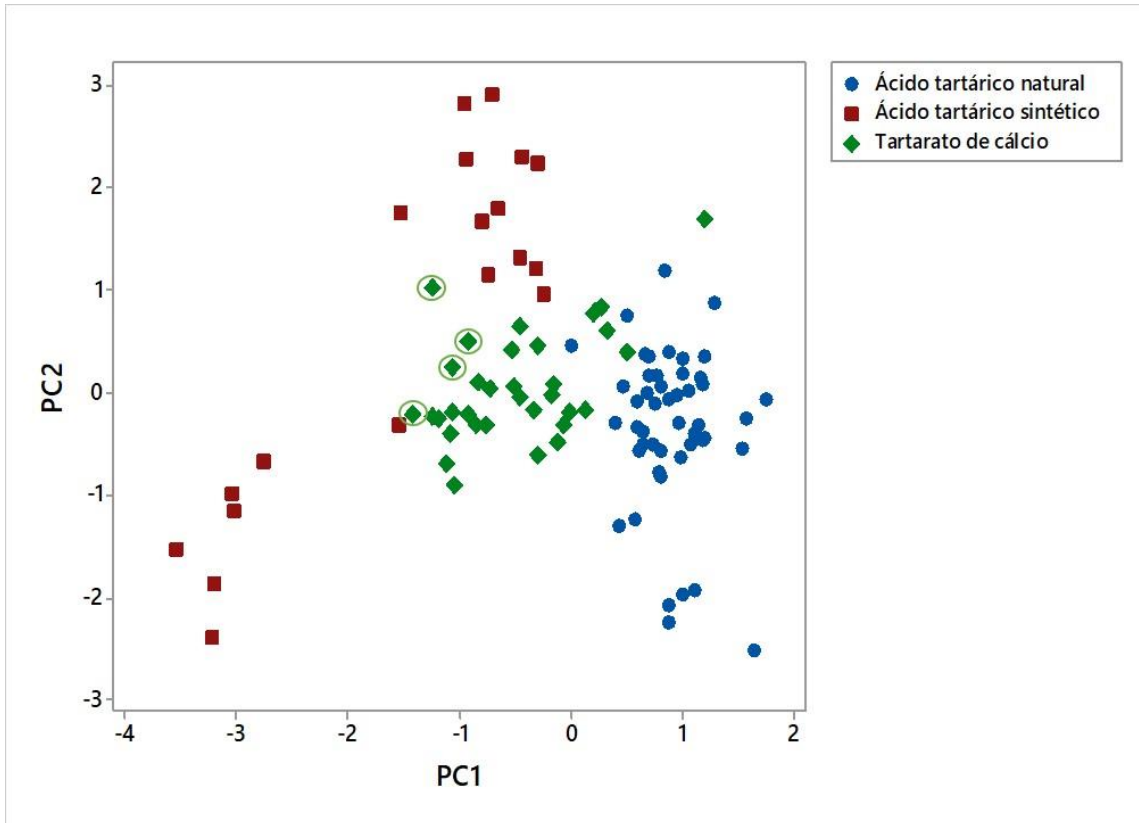


Figura 30. Gráfico da análise de componente principal para o tartarato de cálcio.

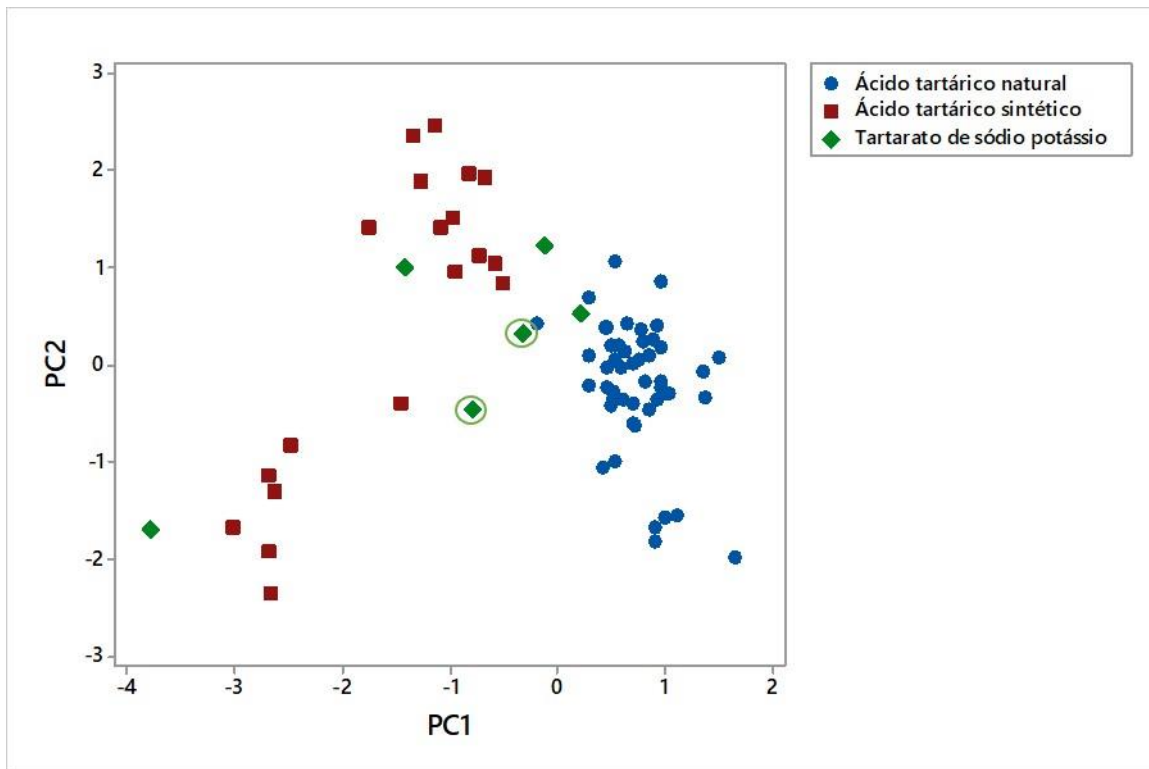


Figura 31. Gráfico da análise de componente principal para o tartarato de sódio potássio.

#### **4.4 Conclusão**

A análise de derivados do ácido tartárico por espectrometria de massas de razão isotópica é inovadora e demonstra capacidade de bons resultados para classificar as amostras como naturais ou sintéticas. Para uma primeira exploração a determinação de origem por comparação com ácido tartárico é bastante promissora para o bitartarato de potássio (creme de tártaro) e tartarato bruto. A distinção entre amostras naturais e sintéticas é significativa. Os resultados de IRMS para o ácido metatartárico indica boa classificação para amostras naturais. Para confirmação destes resultados a análise de amostras sintéticas é necessária.

Para os demais derivados, tartarato de sódio potássio e tartarato de cálcio, é necessário um maior número de amostras de forma a confirmar as tendências dos dados. Além disto, a certificação da origem destes produtos permitiria averiguar a adequação desta técnica para esta análise.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

Este trabalho desenvolveu um estudo sobre os meios de produção e utilizou-se técnicas de caracterização do ácido tartárico, incluindo seus principais derivados a fim de estabelecer parâmetros de qualificação e rastreabilidade.

Técnicas analíticas instrumentais como cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear não mostraram resultados efetivos, devido à simplicidade desta molécula e alta pureza obtida com a síntese. A caracterização do ácido tartárico por espectroscopia na região do infravermelho apesar de não identificar a sua origem, é uma importante técnica que pode ser utilizada para confirmação de casos suspeitos de não serem ácido tartárico. Já a caracterização por cromatografia quiral foi otimizada e permitiu identificar a presença do enantiômero D(-) em ácido L(+)-tartárico quando presente em no mínimo 5% da mistura.

As análises de isótopos estáveis com análise multivariada oferecem a abordagem mais promissora baseada em hipóteses para estabelecer método de produção e origem geográfica do ácido tartárico. Esta técnica é de fácil preparação de amostras e possibilita que grandes quantidades de dados sejam geradas rapidamente. Os resultados colhidos corroboram aqueles encontrados na literatura e adiciona a eles a separação geográfica, com amostras de diferentes continentes. Este método é uma combinação de perfis de isótopos analisados estatisticamente com interpretações que podem variar de acordo com o software de multivariáveis. Portanto, a robustez desta metodologia deve ser testada por testes cegos e ensaios interlaboratoriais.

O estudo dos derivados do ácido tartárico por IRMS abriu uma nova metodologia de análise e controle de qualidade. De acordo com nossas pesquisas, esse trabalho representa a primeira vez que IRMS foi utilizada na análise de derivados do ácido tartárico para avaliar o método de produção, o que pode ajudar no controle de práticas fraudulentas na indústria. Por ser uma primeira exploração é importante um aprofundamento deste estudo, entretanto este caminho já se apresenta com fortes indícios de aplicabilidade futura.

Dessa maneira, como sugestão de trabalhos futuros inclui-se obtenção de maior quantidade de amostras de ácido tartárico de diversas regiões geográficas, de modo a criar um banco de dados isotópicos mais amplo. Da mesma forma para os derivados do ácido tartárico, a ampliação do número de amostras é importante, além da certificação de sua origem. Além disso, realizar a síntese dos derivados a partir de amostras naturais e sintéticas do ácido tartárico permitiria acompanhar o perfil isotópico mediante este processo. Por fim testes de robustez da

metodologia por IRMS contribuiriam também na investigação da necessidade de desenvolver metodologias para cada derivado.

## **5.1 Perspectivas futuras**

Padrões de isótopos podem ser usados no controle desta substância, seja como produto final ou como produto enológico.

Baseado nos resultados deste trabalho foi apresentada um novo método de análise do ácido tartárico por IRMS para identificar sua origem. E que posteriormente possa ser usada na legislação. Além disso, como desdobramento deste trabalho uma nova rotulagem do ácido tartárico que indique “origem natural” foi proposta na farmacopeia americana. Isso permitiria melhorar significativamente a segurança do uso desse produto e garantir aos consumidores uma legibilidade e transparência reais na rotulagem quando o ácido tartárico é colocado em produção.

Desse modo, uma maior quantidade de amostras de ampla diversidade permitiria a geração de banco de dados de diferentes locais geográficos, que poderiam ser incorporados em sistemas de rastreabilidade.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ITC. **The North American Market for Natural Products: Propects for Andean and African Products**. International Trade Centre. Geneva, p.99. 2012
- [2] SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural products isolation: methods in biotechnology: n. 20**. 2nd. Totowa: Humana Press, 2006.
- [3] BRAGA, F. G. **Valorização Industrial de Subprodutos Vinícolas - Produção de ácido tartárico e de corantes a partir das borras e dos bagaços** 2002. 253 Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto.
- [4] CODEX, I. O. **L(+)** **Tartaric Acid**. COEI-1-LTARAC. WINE, I. O. O. V. A. 2007.
- [5] CHURCH, J. M.; BLUMBERG, R. Synthesis of Tartaric Acid - by the hydroxylation of maleic acid. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1780-1786, 1951. ISSN 0019-7866.
- [6] WANG, Z. et al. Improvement of the Production Efficiency of l-(+)-Tartaric Acid by Heterogeneous Whole-Cell Bioconversion. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3989-4001, 2014/04/01 2014. ISSN 0273-2289.
- [7] DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: Wiley, 2003.
- [8] SHRINER, R. L.; MACEDO, H. **Identificação sistemática dos compostos orgânicos: manual de laboratório**. Guanabara Dois, 1983.
- [9] CONSIDINE, G. D. Tartaric Acid. In: (Ed.). **Van Nostrand's Scientific Encyclopedia**: John Wiley & Sons, Inc., 2005. ISBN 9780471743989.
- [10] MIRANDA, V. A. C. **Ácido Tartárico como Molécula de Partida para a Síntese de Moléculas Quirais**. 2012. 124 Dissertação (Mestrado). Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- [11] BASARAN, T. Y. **Ion Exchangers in The Recovery of Tartaric Acid From Aqueous Solutions**. 2006. 98 Tese (Doutorado). Graduate Scholl of Natural and Applied Sciences, Middle East Technical University, Ankara.
- [12] AGRICULTURE, U. S. D. O. **Tartaric Acid**. Agricultural Marketing Service, p.12. 2011
- [13] KASSAIAN, J.-M. Tartaric Acid. In: (Ed.). **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000. ISBN 9783527306732.

- [14] SOLOMONS, G. T. W.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- [15] BLAIR, G. T.; DEFRAITIS, J. J. Hydroxy Dicarboxylic Acids. In: (Ed.). **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**: John Wiley & Sons, Inc., 2000. ISBN 9780471238966.
- [16] CARVALHO, E. C. P.; CURVELO-GARCIA, A. S. Aplicação dos Ácidos L-Tartárico, L-Láctico e DL-Málico na Acidificação de Mostos e Vinhos. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 15, p. 64-73, 2000. ISSN 0254-0223.
- [17] SERRA, F. et al. <sup>13</sup>C and <sup>18</sup>O isotopic analysis to determine the origin of L-tartaric acid. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 10, p. 1227-1230, 2005. ISSN 1097-0231.
- [18] ROSENBERG, M.; MIKOVA, H.; KRISTOFIKOVA, L. Production of L-tartaric acid by immobilized bacterial cells *Nocardia tartaricans*. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 6, p. 491-495, Jun 1999. ISSN 0141-5492.
- [19] LI, X. et al. Purification and characterization of a cis-epoxysuccinic acid hydrolase from *Bordetella* sp. strain 1–3. **Protein Expression and Purification**, v. 69, n. 1, p. 16-20, 1// 2010. ISSN 1046-5928.
- [20] WANG, Z.; WANG, Y.; SU, Z. Purification and characterization of a cis-epoxysuccinic acid hydrolase from *Nocardia tartaricans* CAS-52, and expression in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2433-2441, 2013. ISSN 1432-0614.
- [21] KAMATANI, O. Y. et al. **Production of L(+)-Tartaric Acid**. PATENT, U. S.: Takeda Chemical Industries, Ltd., Japan C12D 1/02 1976.
- [22] FERNANDES, E. N.; REIS, B. F. Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process. **Analytica Chimica Acta**, v. 557, n. 1–2, p. 380-386, 1/31/2006. ISSN 0003-2670.
- [23] RIZZON, L. A.; MIELE, A. Concentração de ácido tartárico dos vinhos da serra gaúcha. **Ciência Rural**, v. 31, p. 893-895, 2001. ISSN 0103-8478.
- [24] PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, N. S. Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827-839, May 2011. ISSN 0963-9969.

- [25] YALCIN, D. et al. Characterization and recovery of tartaric acid from wastes of wine and grape juice industries. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 94, n. 3, p. 767-771, Dec 2008. ISSN 1388-6150.
- [26] GOMEZ, A. V. et al. Emulsifiers: Effects on Quality of Fibre-Enriched Wheat Bread. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 5, p. 1228-1239, May 2013. ISSN 1935-5130.
- [27] DAVIDOVIC, D. N. et al. The Application of Natural Organic Compounds in Bakery Industry. **Hemijaska Industrija**, v. 64, n. 5, p. 411-421, Sep-Oct 2010. ISSN 0367-598X.
- [28] SHIRSAND, S. B. et al. Formulation Design and Optimization of Fast Disintegrating Lorazepam Tablets by Effervescent Method. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 4, p. 431-436, Jul-Aug 2010. ISSN 0250-474X.
- [29] BISHOP, M.; BARRON, A. R. Cement hydration inhibition with sucrose, tartaric acid, and lignosulfonate: Analytical and spectroscopic study. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 21, p. 7042-7049, Oct 2006. ISSN 0888-5885.
- [30] YEUNG, H. H. M.; CHEETHAM, A. K. Phase selection during the crystallization of metal-organic frameworks; thermodynamic and kinetic factors in the lithium tartrate system. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 1, p. 95-102, 2014. ISSN 1477-9226.
- [31] ZAPPOLI, S.; MORSELLI, L.; OSTI, F. Application of ion interaction chromatography to the determination of metal ions in natural water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 721, n. 2, p. 269-277, Jan 1996. ISSN 0021-9673.
- [32] OIV. **OIV Wine & Vine Outlook (2010-2011)**. Organisation Internationale de la vigne et du vin. Paris. 2014
- [33] \_\_\_\_\_. **Statistical report on world vitiviniculture**. International Organisation of Vine and Wine. 2013
- [34] IHS. Tartaric Acid. **Chemical Economics Handbook**, 2010. Disponível em: < <http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/tartaric-acid.aspx> >. Acesso em: 06 de abril de 2014.

- [35] PRWEB. San Jose, 2008. Disponível em: < [http://www.prweb.com/releases/chemical/acid\\_tartaric/prweb855914.htm](http://www.prweb.com/releases/chemical/acid_tartaric/prweb855914.htm) >. Acesso em: 03 de Abril de 2014.
- [36] GRAND VIEW RESEARCH, I. Tartaric acid Market Analysis By Application (Food & Beverages, Wine, Pharmaceuticals, Antacids) And Segment Forecasts To 2020. 2015. ISSN 978-1-68038-369-0. Disponível em: < <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/tartaric-acid-market> >. Acesso em: 3 March 2015.
- [37] **Commission Directive 2008/84/EC**. COMMUNITIES, C. O. T. E.: Official Journal of the European Union: 175 p. 2008.
- [38] VASCONCELOS, C. R. F.; VASCONCELOS, S. P. Medidas "antidumping" e resultados colusivos: o caso do PEBDL na economia brasileira. **Nova Economia**, v. 15, p. 117-141, 2005. ISSN 0103-6351.
- [39] UNION, C. O. T. E. **Council Implementing Regulation (EU) No 626/2012 of 26 June 2012 amending Implementing Regulation (EU) No 349/2012 imposing a definitive anti-dumping duty on imports of tartaric acid originating in the People's Republic of China** 2012.
- [40] ADMINISTRATION, U. S. F. A. D. **Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000187**. NUTRITION, C. F. F. S. A. A. 2006.
- [41] ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. p.
- [42] SOYER, Y.; KOCA, N.; KARADENIZ, F. Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, n. 5, p. 629-636, 2003/10/01/ 2003. ISSN 0889-1575.
- [43] MOREIRA, J. L.; SANTOS, L. Analysis of organic acids in wines by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 2, p. 421-425, 2005. ISSN 1618-2650.
- [44] VARIANKAVAL, N. et al. Preparation and Solid-State Characterization of Nonstoichiometric Cocrystals of a Phosphodiesterase-IV Inhibitor and l-Tartaric Acid. **Crystal Growth & Design**, v. 6, n. 3, p. 690-700, 2006/03/01 2006. ISSN 1528-7483.

- [45] ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**, v. 17, n. 3, p. 347-381, 2001/07/31 2001. ISSN 8755-9129.
- [46] GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCIA-ROMERO, E. Effect of irrigation and variety on oxygen ( $\delta^{18}\text{O}$ ) and carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) stable isotope composition of grapes cultivated in a warm climate. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, n. 2, p. 283-289, 2010. ISSN 1755-0238.
- [47] PILLONEL, L. et al. Geographic origin of European Emmental. Use of discriminant analysis and artificial neural network for classification purposes. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6, p. 557-562, 2005/06/01/ 2005. ISSN 0958-6946.
- [48] COSTINEL, D. et al. The Impact of Grape Varieties to Wine Isotopic Characterization. **Analytical Letters**, v. 44, n. 18, p. 2856-2864, 2011/12/01 2011. ISSN 0003-2719.
- [49] RACO, B. et al. O–H–C isotope ratio determination in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin. **Food Chemistry**, v. 168, p. 588-594, 2015/02/01/ 2015. ISSN 0308-8146.
- [50] WECKERLE, B. et al. Origin assessment of green coffee (*Coffea arabica*) by multi-element stable isotope analysis of caffeine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, n. 5, p. 886-890, November 01 2002. ISSN 1618-2650.
- [51] SIMPKINS, W. A. et al. Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. **Food Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 385-390, 2000/08/15/ 2000. ISSN 0308-8146.
- [52] CHUNG, I.-M. et al. Authenticity of rice (*Oryza sativa* L.) geographical origin based on analysis of C, N, O and S stable isotope ratios: a preliminary case report in Korea, China and Philippine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 7, p. 2433-2439, 2016. ISSN 1097-0010.
- [53] ZYAKUN, A. M. et al. Mass spectrometric analysis of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  abundance ratios in vine plants and wines depending on regional climate factors (Krasnodar krai and Rostov oblast, Russia). **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 1136-1141, 2013. ISSN 1608-3199.
- [54] BOUTTON, T. W. **Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change**. New York, NY: New York, NY, United States: Marcel Dekker, 1996. 47-82

- [55] BOUTTON, T. W. 11 - Stable Carbon Isotope Ratios of Natural Materials: II. Atmospheric, Terrestrial, Marine, and Freshwater Environments A2 - Coleman, David C. In: FRY, B. (Ed.). **Carbon Isotope Techniques**: Academic Press, 1991. p.173-185. ISBN 978-0-12-179730-0.
- [56] BOUTTON, T. W.; ARCHER, S. R.; NORDT, L. C. CLIMATE, CO<sub>2</sub> AND PLANT ABUNDANCE. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 625-626, Dec 1994. ISSN 0028-0836.
- [57] KELLY, S.; HEATON, K.; HOOGEWERFF, J. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 12, p. 555-567, 2005. ISSN 0924-2244.
- [58] MERLIVAT, L.; JOUZEL, J. Global climatic interpretation of the deuterium-oxygen 18 relationship for precipitation. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 84, n. C8, p. 5029-5033, 1979. ISSN 2156-2202.
- [59] VAN LEEUWEN, K. A. et al. Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry for Traceability and Authenticity in Foods and Beverages. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, p. 814-837, 2014. ISSN 1541-4337.
- [60] ROZANSKI, K.; SONNTAG, C.; MÜNNICH, K. O. Factors controlling stable isotope composition of European precipitation. **Tellus**, v. 34, n. 2, p. 142-150, 1982. ISSN 2153-3490.
- [61] BRENNAN, J. T. et al. High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 16, n. 5, p. 227-258, Sep-Oct 1997. ISSN 0277-7037.
- [62] CARTER, J. F.; BARWICK, V. J. **Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry**. FIRMS, 2011. ISBN 978-0-948926-31-0.
- [63] SILVA, G. C. D. **Diferenciação de fontes de combustíveis fósseis e biocombustíveis utilizando razões isotópicas de hidrogênio, carbono e oxigênio**. 2015. 150 (Doutorado). Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- [64] HOFFMANN, E. D.; STOOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. Third ed. John Wiley & Sons, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [65] MCLAFFERTY, F. W.; TURECEK, F. **Interpretation of Mass Spectra**. 4th. American Chemical Society, 1994. A54 ISBN 0021-9584.

- [66] MUCCIO, Z.; JACKSON, G. P. Isotope ratio mass spectrometry. **Analyst**, v. 134, n. 2, p. 213-222, 2009. ISSN 0003-2654.
- [67] BACON, J. R. et al. Atomic mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, n. 8, p. 1025-1053, 2000. ISSN 0267-9477.
- [68] FERREIRA, A. I. A. J. V. **Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas**. 2008. 348 (Tese). Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- [69] AGENCY, I. A. E. **Reference and Intercomparison Materials for Stable Isotopes of Light Elements**. Vienna: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1995.
- [70] TIWARI, M.; SINGH, A. K.; SINHA, D. K. Chapter 3 - Stable Isotopes: Tools for Understanding Past Climatic Conditions and Their Applications in Chemostratigraphy A2 - Ramkumar, Mu. In: (Ed.). **Chemostratigraphy**. Oxford: Elsevier, 2015. p.65-92. ISBN 978-0-12-419968-2.
- [71] SESSIONS, A. L. Isotope-ratio detection for gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1946-1961, 2006. ISSN 1615-9314.
- [72] ARVANITOYANNIS, I. S.; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. Implementation of chemometrics for quality control and authentication of meat and meat products. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 43, n. 2, p. 173-218, 2003. ISSN 1040-8398.
- [73] ORTEA, I.; GALLARDO, J. M. Investigation of production method, geographical origin and species authentication in commercially relevant shrimps using stable isotope ratio and/or multi-element analyses combined with chemometrics: An exploratory analysis. **Food Chemistry**, v. 170, p. 145-153, 2015. ISSN 0308-8146.
- [74] WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1, p. 37-52, 1987/08/01/ 1987. ISSN 0169-7439.
- [75] COOMANS, D.; MASSART, D. L.; KAUFMAN, L. Optimization by statistical linear discriminant analysis in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 112, n. 2, p. 97-122, 1979/06/15/ 1979. ISSN 0003-2670.
- [76] ROJAS, J. M. M. et al. Control of oenological products: discrimination between different botanical sources of L-tartaric acid by isotope ratio mass spectrometry.

- Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 15, p. 2447-2450, 2007. ISSN 1097-0231.
- [77] RIBEREAU-GAYON, P. et al. Organic acids in wine. In: (Ed.). **Handbook of Enology vol. 2 The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments**. 2nd. New York: John Wiley & Sons, LTD., v.2, 2006. ISBN 978-0-470-01037-2.
- [78] MORENO, J.; PEINADO, R. **Enological Chemistry**. Elsevier Science, 2012. ISBN 9780123884398.
- [79] MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. 1. New York, NY: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-74116-1.



## APÊNDICES

### A. Dados de IRMS do ácido tartárico

Tipo	Código	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$
Natural	N1	-23,23	29,70	-67,00
	N2	-22,73	26,30	-70,00
	N3	-22,71	31,50	-61,00
	N4	-22,60	28,30	-62,00
	N5	-22,62	29,90	-71,00
	N6	-22,80	28,40	-73,00
	N7	-22,90	26,80	-79,00
	N8	-22,87	26,40	-85,00
	N9	-22,90	27,20	-80,00
	N10	-22,80	30,00	-77,00
	N11	-22,74	26,40	-84,00
	N12	-23,00	29,50	-49,00
	N13	-22,46	30,40	-71,00
	N14	-21,90	34,20	-75,00
	N15	-22,30	29,70	-81,00
	N16	-22,55	25,10	-123,00
	N17	-22,55	23,80	-122,50
	N18	-22,67	23,43	-126,50
	N19	-23,30	24,30	-103,00
	N20	-22,90	24,40	-107,00
	N21	-23,10	27,70	-118,00
	N22	-22,22	29,20	-63,00
	N23	-21,81	32,50	-52,00
	N24	-21,84	30,05	-66,00
Sintético	S1	-22,77	13,85	-32,00
	S2	-22,00	17,80	-22,00
	S3	-22,51	18,20	-47,00
	S4	-21,80	18,40	-9,00
	S5	-21,24	19,00	-10,00
	S6	-29,23	14,45	-63,00
	S7	-31,53	16,30	-62,00
	S8	-21,95	19,20	-46,00
	S9	-21,19	19,60	-25,00
	S10	-31,20	17,20	-72,00
	S11	-30,20	17,40	-60,00

**B. Dados de IRMS dos derivados do ácido tartárico**

Amostra	Código	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$
Ácido metatartárico	AMeta 1	-22,84	30,00	-77,00
	AMeta 2	-21,93	25,00	-130,00
	AMeta 3	-21,74	25,80	-127,00
	AMeta 4	-22,08	24,60	-120,00
Bitartarato de potássio	KHT 1	-27,93	27,00	-191,00
	KHT 2	-22,23	29,20	-111,00
	KHT 3	-22,05	20,00	-133,00
	KHT 4	-22,52	29,70	-105,00
	KHT 5	-22,83	26,00	-115,00
	KHT 6	-22,47	21,90	-142,00
	KHT 7	-22,78	21,70	-147,00
	KHT 8	-22,19	21,80	-143,00
	KHT 9	-22,97	24,90	-159,00
	KHT 10	-23,31	27,60	8,40
	KHT 11	-22,30	34,30	-114,00
	KHT 12	-22,00	21,80	-140,00
	KHT 13	-22,12	25,20	-93,00
	KHT 14	-22,74	29,15	-121,00
	KHT 15	-22,56	19,70	-146,00
	KHT 16	-22,06	24,50	-123,00
	KHT 17	-22,67	22,40	-142,00
	KHT 18	-23,19	27,10	-127,00
	KHT 19	-23,95	25,60	-115,00
	KHT 20	-23,18	26,20	-121,00
	KHT 21	-22,19	22,50	-162,00
	KHT 22	-21,97	22,80	-159,00
	KHT 23	-22,90	30,30	-127,00
Tartarato bruto	TB 1	-23,91	29,50	-77,00
	TB 2	-23,26	24,90	-99,00
	TB 3	-23,47	31,00	-85,00
	TB 4	-23,02	25,60	-84,00
	TB 5	-23,72	31,40	-82,00
	TB 6	-23,74	27,80	-73,00
	TB 7	-22,57	31,40	-81,00

Amostra	Código	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^2\text{H}$
Tartarato de cálcio	CaT 1	-22,12	8,86	-106,00
	CaT 2	-22,88	14,63	-84,00
	CaT 3	-23,20	20,20	-61,00
	CaT 4	-22,65	20,60	-63,00
	CaT 5	-16,50	16,90	-70,00
	CaT 6	-23,31	11,40	-80,00
	CaT 7	-24,19	15,50	-85,00
	CaT 8	-24,11	16,40	-78,00
	CaT 9	-23,85	16,20	-74,00
	CaT 10	-22,68	15,20	-74,00
	CaT 11	-23,59	13,80	-78,00
	CaT 12	-24,15	18,80	-40,00
	CaT 13	-21,77	23,50	-63,00
	CaT 14	-23,46	16,10	-77,00
	CaT 15	-23,52	18,60	-69,00
	CaT 16	-22,76	18,30	-76,00
	CaT 17	-25,48	20,20	-64,00
	CaT 18	-23,88	17,50	-62,00
	CaT 19	-22,27	18,60	-61,00
	CaT 20	-23,25	19,70	-70,00
	CaT 21	-23,49	17,30	-79,00
	CaT 22	-23,88	19,30	-55,00
	CaT 23	-21,67	23,30	-58,00
	CaT 24	-23,15	28,90	-58,00
	CaT 25	-22,98	21,70	-80,00
	CaT 26	-22,86	19,30	-78,00
	CaT 27	-22,80	21,80	-78,00
	CaT 28	-22,67	19,80	-87,00
	CaT 29	-23,58	25,60	-71,00
	CaT 30	-21,52	22,10	-61,00
	CaT 31	-23,11	22,30	-69,00
	CaT 32	-22,79	18,30	-90,00
	CaT 33	-22,23	24,50	-55,00
	CaT 34	-23,07	21,70	-72,00
Tartarato de sódio potássio	KNaT 1	-20,82	21,70	-50,00
	KNaT 2	-22,69	14,50	-90,00
	KNaT 3	-31,22	8,50	-67,00
	KNaT 4	-20,45	20,60	-75,00
	KNaT 5	-21,05	10,00	-58,00
	KNaT 6	-21,38	17,80	-75,00

