



Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de castas Portuguesas

David Manuel Lopes Ferreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Viticultura e Enologia

Orientador: Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva

Co-orientador: Doutora Paula Guedes de Pinho

Júri:

Presidente: Doutor Manuel Belo Moreira, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutor Rogério Albino Neves de Castro, Professor Catedrático aposentado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Doutora Paula Guedes de Pinho, Investigadora Auxiliar do REQUIMTE / Laboratório Associado para a Química Verde - Tecnologias e Processos Limpos.

Lisboa, 2011

“The Quality in wines is much easier to recognize than to define”

(Amerine)

*“Les jeunes vigneronns doivent vivre avec leur temps, en particulier apprendre l'œnologie...
mais pour apprendre à s'en passer.”*

(Henri Jayer)

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Professor Doutor Jorge Ricardo da Silva por me ter inspirado, apoiado e encorajado na escolha deste tema e elaboração do trabalho.

À D^a Maria Júlia e D^a Graziela do Laboratório de Enologia do ISA pela ajuda prestada.

À Doutora Paula Guedes de Pinho pela orientação mas também por ter permitido e providenciado as conexões de cooperação entre o ISA, a Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto.

Agradeço a Dra. Isabel Vasconcelos pela liberdade concedida na manipulação do material analítico e no uso das instalações dos laboratórios de química fina da Escola Superior de Biotecnologia do Porto.

Agradeço especialmente à Dra. Nathalie Moreira pela paciência e apoio no trabalho realizado sobretudo nas fases finais que se revelaram bastante tensas! O meu Obrigado também a Dra. Cristina pelo apoio concedido com o equipamento de cromatografia em fase gasosa.

Agradeço a Sra. Condessa Teresa Alvares Pereira de Schoenborn-Wiesentheid, da Exm^a Casa Cadaval por me ter cedido o tempo necessário para concretizar o mestrado.

Agradeço aos responsáveis das adegas do ISA, a Cooperativa de Almeirim, Ervideira, Fiuza, J.M da Fonseca e Romeira pela cedência das amostras de vinho.

Um muito sentido obrigado a todos os meus colegas de curso pelo companheirismo e apoio presente no momento certo.

Agradeço ao Marco Bento a ajuda prestada na obtenção de amostras de vinho e pelo apoio na organização da análise sensorial dos vinhos.

Obrigado ao Ricardo Chagas pela ajuda prestada na análise estatística dos dados e nas constantes críticas construtivas ao trabalho efectuado.

Obrigado ao José Machado pela presença amigável, pelas acomodações concedidas muito gentilmente e sobretudo pelos momentos de boa disposição proporcionados nos dias por vezes longos e difíceis passados no Porto.

Obrigado ao Jorge Afonso pelos conselhos acertados.

Agradeço por fim, aos meus pais, às minhas duas irmãs e à minha companheira, Nita, pela paciência e apoio moral proporcionado durante os momentos difíceis do curso.

RESUMO

O potencial aromático varietal associado a compostos de enxofre de 7 vinhos de castas portuguesas foi comparado ao mesmo potencial de um vinho de Sauvignon Blanc. Os compostos voláteis enxofrados, tal com o acetato de 3-mercaptohexilo, o 3-mercaptohexanol e a 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona foram procurados nos vinhos. Os vinhos foram analisados com cromatografia em fase gasosa, nomeadamente com GC-FPD, GC-FID, GC-MS e GC-Olfactometria. A técnica de olfactometria permitiu confirmar a presença de três zonas olfactométricas relativas a 4MMP (4-mercapto-4-metilpentan-2-ona) e ao 3MH (3-mercaptohexanol) em todos os vinhos de casta portuguesas estudadas e A3MH (acetato de 3-mercaptohexilo) em dois vinhos novos de casta portuguesa, posteriormente introduzidos no estudo.

A concentração nos vinhos dos três compostos detectados não foi determinada, só se obteve uma ordem relativa de grandeza entre os vinhos. No entanto foi calculada um valor semi-quantitativo para a concentração de 3MH nos vinhos de Casta Portuguesa.

Palavras chave: Castas Portuguesas, 3MH, A3MH, 4MMP, Cromatografia em fase gasosa, Olfactometria

ABSTRACT

In this work, the sulphur varietal compound aromatic potencial of 7 Portuguese Grapes wines was studied in comparision with Sauvignon Blanc. The aroma compounds containing sulphur compounds as 3-mercaptohexyl acetate (A3MH), 3-mercaptohexanol (3MH) and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) were searched in particular. GC-FPD, GC-MS and GC-Olfactometry analysis were conducted to obtain confirmation of the existence of those compounds.

Only GC-olfactometry revealed the presence of two olfactory zones relatives of the 4MMP and 3MH in all Portuguese Grape varieties wines from 2009, and a third intermediary olfactory zone relative of A3MH only revealed in the young 2010 wines from Arinto and Fernão Pires.

The 4MMP and the A3MH were not quantified nevertheless the olfactometric measures allow to determine relative differences among wines. The 3MH was semi-quantified in 5 of the Portuguese varieties wines using GC-FPD equipment.

Some of the portugueses grape wines presented varietal tiol aromatic intensity comparable in scale with the Portuguese Sauvignon Blanc Wine

Keywords: Portuguese Grape Varieties, 3MH, 3MHA, 4MMP, Gas-chromatografy, Olfactometry.

EXTENDED SUMMARY

One of the main attributes of white wine is its aroma, this characteristic of wine is an important factor of choice for the consumer (Robinson, 2007).

Many chemical compounds contribute for the final aroma of white wines: terpenes, esters, methoxypyrazines, C13 norisoprenoids and varietal thiols are the major ones (Cacho, 2008).

Varietal thiols, as 3-mercaptohexanol (3MH), 4-mercapto-4-methylpentan-2-ona (4MMP), and 3-mercaptohexyl acetate (A3MH) are the most important varietal thiols that can be found in white wines. These compounds were firstly detected in Sauvignon Blanc wines, revealing the source of this french variety typical aromas of box wood (4MMP), passion fruit (3MH, A3MH) and sweat (3MH) (Tominaga *et al.*, 1996, 1998, 2000).

The main objective of this work, is to prove the existence of these sulphur varietal compound (thiols) in a Portuguese Sauvignon Blanc wine and in a selection of 7 other Portuguese Grapes wines. Those wines, 5 were from the 2009 vintage (Antão Vaz, Arinto, Fernão Pires, Verdelho and Viosinho) and 2 others, from 2010 vintage (Arinto and Fernão Pires).

Sensorial analysis of the 5 portuguese wines from 2009 were conducted and analysed statistically.

A Liquid/Liquid extraction with dichloromethane and analysed by GC-FPD, GC-FID, GC-MS and GC-Olfactometry analysis were conducted on those wines to obtain a confirmation of the existence of these compounds in wines.

GC-olfactometry revealed the presence of two olfactory zones relative of the 4MMP and 3MH in all Portuguese grape wines from 2009, and a third intermediary olfactory zone relative of A3MH only was revealed in the young wines from 2010.

The 4MMP and the A3MH were not quantified, nevertheless the olfactometric measures allow to determine relative differences among wines.

Some of the portuguese grape wines presented varietal thiol aromatic intensity comparable with the Portuguese Sauvignon Blanc Wine.

Comparing the results of the sensorial analysis with the GC-O results, some of the wines in study can probably present quantities of 4MMP and 3MH above the sensorial threshold.

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

The compound 3MH was semi-quantified in all Portuguese varieties using GC-FPD equipment.

This semi-quantification was possible, comparing the chromatographic result from the white wines in study, with the chromatographic results from of a 2010 red wine that revealed a great aromatic potencial in 3MH.

The extraction method used in this work to obtain aroma wine extract is actually quite easy to realize, and has conducted to some interesting results considering the analysis of 3MH, with GC-FPD. In further researchs, it will be important to validate this methodology, by doing recovery, repeatability and linearity studies.

ÍNDICE

páginas

AGRADECIMENTOS-----	II
RESUMO -----	III
ABSTRACT-----	III
EXTENDED SUMMARY -----	IV
ÍNDICE-----	V
LISTA DE QUADROS-----	IX
LISTA DE FIGURAS -----	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS-----	XI
1-INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS-----	1
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	3
2.1. O que é um aroma?-----	3
2.2. Fisiologia do olfacto-----	3
2.3. O aroma do Vinho-----	4
2.4. Classificação e origem dos principais compostos aromáticos	
do vinho branco-----	6
2.4.1. Esteres. -----	6
2.4.2. Álcoois Superiores-----	7
2.4.3. Terpenos-----	8
2.4.4 Norisoprenóides em C13 -----	9
2.4.5. Metoxipirazinas-----	10
2.4.6. Compostos de Enxofre-----	11
2.4.6.1. Compostos de enxofre varietais-----	12
2.4.6.2. A função dos Precusores S-conjugados da cisteína -----	17
2.4.6.3. Os principais tióis varietais -----	18
2.4.6.4. Aspectos tecnológicos relacionados com a	
obtenção de S conjugados da cisteína e tióis em	
mostos e vinhos.-----	18
2.4.6.5. Influência das práticas vitícolas sobre a obtenção de	
S conjugados da cisteína	
e conservação de tióis varietais.-----	19
2.4.6.6. Influência da vinificação e do processo	
de envelhecimento -----	20

	páginas
2.4.6.7. Outros tióis não de origem varietal	
com interesse enológico-----	27
2.5. Metodologias de análise do aroma de vinhos-----	27
2.5.1. A avaliação sensorial.-----	27
2.5.2 Avaliação instrumental do aroma de vinhos.-----	28
2.5.2.1. A extracção de aromas do vinho.-----	29
2.5.2.2. Análise instrumental.-----	30
3-MATERIAIS E MÉTODOS -----	34
3.1. Amostras de vinho-----	34
3.2. Prova Sensorial-----	35
3.3. Preparação das amostras para análise	
com Cromatografia em fase gasosa.-----	35
3.4. Preparação das soluções padrões-----	36
3.5. Análise com Cromatografia em fase gasosa -----	36
com Detector fotométrico de chama. (GC-FPD)-----	36
3.6. Análise com Cromatografia em fase gasosa	
e detector de ionização por chama (GC-FID)-----	37
3.7. Análise com Cromatografia em fase gasosa	
e Espectometria de massa. (GC-MS)-----	37
3.8. Análise com Cromatografia em fase gasosa e Olfactometria.-----	37
3.9. Calibrações efectuadas-----	39
3.10. Análises estatísticas.-----	39
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	40
4.1. Resultados da prova sensorial-----	40
4.2. Perfil aromático dos vinhos estudados.-----	41
4.3 Pesquisa da 4-mercaptopentano-2-ona,	
do Acetato de 3-mercaptopentano	
e do 3-mercaptopentanol nos vinhos estudados.-----	45
4.3.1. Estudo das Soluções de Referência de 4MMP, A3MH e 3MH.-----	45
4.3.1.1. Estudo das soluções de referência	
com os sistemas de GC-olfactometria e GC-FID.-----	45
4.3.1.2. Estudo das Soluções de referência	
com a técnica de GC-FPD-----	48

4.3.1.3. Estudo das Soluções de referência com a técnica Cromatografia em fase gasosa com Espectrometria de massa.-----	49
4.3.2. Estudo dos extractos dos vinhos.-----	49
4.3.2.1. Estudo dos extractos orgânicos de aroma dos vinhos com recurso a cromatografia em fase gasosa com olfactometria(GC-O) -----	49
4.3.2.2. Estudo dos extractos orgânicos de aroma dos vinhos com recurso a cromatografia em fase gasosa com espectroscopia de massa. (GC-MS) -----	53
4.3.2.3. Estudo dos extractos de aroma dos vinhos com recurso a cromatografia em fase gasosa com detector de fotometria de chama (GC-FPD)-----	56
5-CONCLUSÕES-----	61
5.1. Dados conclusivos -----	61
5.2. Conclusões reservadas.-----	62
5.3. Criticas a Metodologia utilizada-----	63
5.4. Perspectivas Futuras. -----	63
5.4.1. Proposta de metodologias mais adaptadas a extracção dos tióis varietais para analise em meios cromatográficos em fase gasosa. -----	63
5.4.2. Melhoria da metodologia utilizada -----	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	66
ANEXOS-----	74

LISTA DE QUADROS	páginas
Quadro 1. Descrição sensorial, limiar de detecção e temperatura de ebulição de alguns compostos de enxofre do vinho-----	12
Quadro 2. Compostos tióis varietais presentes em Vinhos-----	14
Quadro 3. Principais S-conjugados da cisteína do vinho.-----	15
Quadro 4. Análise sensorial da componente aromática dos vinhos em estudo.-----	40
Quadro 5. Compostos detectados e quantificados com auxílio dos dados obtidos com a cromatografia em fase gasosa com detecção fotométrica de chama (GC-FPD) (os valores a negrito correspondem a OAV > 1 -----	44
Quadro 6. Principais estímulos percebidos na olfactometria nos vinhos. -----	50
Quadro 7: Diferentes tempos de retenção relativamente aos tióis voláteis estudados, tendo em conta as colunas semelhantes de marcas distintas. -----	51
Quadro 8: Concentração em 3MH dos vinhos estudados, obtidos pela análise dos dados de cromatografia em fase gasosa com detector fotométrico de chama. (GC-FPD)-----	59

LISTA DE FIGURAS

páginas

Figura 1. Vias de entrada dos compostos aromáticos no aparelho sensorial humano -----	4
Figura 2. Grupo Tiól-----	13
Figura 3. Cisteína-----	14
Figura 4. Obtenção de S-3-(hexanol) – L-cisteína-----	16
Figura 5. Mecanismo bioquímico com que a cisteína- β -liase converte os S-conjugados da cisteína em tióis aromáticos no vinho, na Levedura <i>S.cerevisiae</i> CSL1 (OGM, com gene de <i>E. Coli</i> triptofanase)-----	23
Figura 6. Níveis de 4MMP após tratamento com bentonite.-----	26
Figura 7. Configuração do equipamento olfactométrico semelhante ao utilizado.-----	38
Figura 8. Análise da componente aromática de toranja nos vinhos: Os valores associados a letras iguais não são significativamente diferentes-----	41
Figura 9. Cromatograma resultante da solução de referência da 4-mercapto-metilpentan-2-ona, obtido com GC-FID.-----	46
Figura 10. Cromatograma resultante da solução de referência do Acetato de 3-mercaptohexilo obtido com GC-FID.-----	47
Figura 11. Cromatograma resultante da solução de referência de 3-mercaptohexanol obtido com GC-FID.-----	47
Figura 12. Cromatograma obtido a partir da solução de referência do acetato de 3-mercaptohexilo e do 3-mercaptohexanol.	

com detector fotométrico (GC-FPD)-----48

Figura 13. Cromatogramas comparados da solução de referencia de 3MH com o extrato do vinho tinto Duriense 2010. Os tempos de retenção estão indicados junto aos picos.-----54

Figura 14. Espectro de massa do composto identificado no vinho tinto Duriense de 2010, com os fragmentos característicos do 3MH.-----55

Figura 15. Exemplo de cromatograma obtido dos vinhos (Antão Vaz - 113) a partir do sistema GC-FPD, o pico apontado corresponde ao 3MH.-----56

Figura 16. Cromatograma do vinho tinto duriense, obtido a partir de GC-FPD, o pico apontado corresponde ao 3MH.-----57

Figura 17. Curva de calibração, do 3-mercaptophexanol, aplicada ao GC-FPD.-----58

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

113 : Vinho da casta Antão Vaz

118 : Vinho da Casta Arinto

191 : Vinho da Casta Sauvignon Blanc

205 : Vinho da Casta Verdelho da madeira

209 : Vinho da Casta Viosinho

605 : Vinho da Casta Fernão Pires

3MH : 3-mercaptohexanol

4MMP : 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona

4MMPOH : 4-mercapto-4-metilpentan-2-ol

A3MH : Acetato de 3-mercaptohexilo

Anova : análise da variância

APE : acetato de 2-feniletilo

Cys-3MH : S-(3-hexanol)-L-cisteína

Cys-4MMP : S-4 -(4-mercapto-2 pentanona)-L-cisteína

DAP : fosfato de diamónio

DCM : Diclorometano

DMS : Sulfureto de dimetilo

DES : Sulfureto de dietilo

DEDS : Disulfureto de dietilo

DMDS : Disulfureto de dimetilo

DOC : denominação de origem controlada

Fe(III) : íão Ferro Ferroso

FFT : 2-furanmetanetiol

FTIR : Espectroscopia de Infra Vermelho transformada de Fourier

GAP1 : Permease de aminoácidos geral

GC : Cromatografia em Fase Gasosa

GC-FID : Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de ionização de chama

GC-FPD : Cromatografia em Fase Gasosa com Detector fotométrico.

GC-MS : Cromatografia em Fase Gasosa com espectrometria de Massa

GC-O : Cromatografia em Fase Gasosa com olfactometria

H₂S : Acido sulfídrico

HPLC : Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

HS-SPME : Micro-extracção em fase sólida no espaço de cabeça

ITV: Institut Technologique de la Vigne et du Vin.

ISA: Instituto Superior de Agronomia.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

NCR: Repressão catábólica do Azoto

NIST : National Institute of Standards Technology (U.S.A)

NMR : Ressonância magnética nuclear

m/z: razão massa / carga

OAV : Valor de actividade odométrica.

PE: 2-feniletanol

PfBBR : Brometo de 2,3,4,5,6 Pentafluorobenzilo

pHMb : p-hidromercuribenzoato

SPME : Micro extracção em fase sólida

TLC : Cromatografia em camada fina

TDN: Trimetil-1,2-dihidronaftaleno

1-INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

O sector Viti-vinícola em Portugal tem uma importância sócio-cultural e económica de destaque. O mercado dos produtos vinícolas é muito competitivo e a inovação no desenvolvimento de novos produtos obriga a um esforço constante da parte dos intervenientes do sector, para adequar os produtos às necessidades da procura.

A produção de vinhos em Portugal tem sido pautada por tendências flutuantes em que o mercado numa dada conjuntura exige produtos diferenciados segundo fenómenos de moda.

Um exemplo deste efeito é a flutuação entre o consumo de vinhos brancos e tintos em Portugal. Nos últimos anos tem-se assistido a uma procura crescente de vinhos brancos tanto no mercado nacional como no internacional. Nesta óptica a oferta de vinhos que se diferenciam pelas suas características é uma vantagem não negligenciável no que diz respeito a escolha de um vinho pelo consumidor. (Robinson, 2007)

Um factor de diferenciação importante para um vinho é o seu aroma, ou composição aromática, sendo também que o aroma do vinho está directamente relacionado com características gustativas

Várias classes de compostos químicos contribuem para o aroma do vinho. Ao longo de décadas de investigação na área da química enológica, descobriu-se a importância de vários tipos de grupos de compostos aromáticos, o linalol e outros terpenos em vinhos do tipo moscatel e com perfil “aromático” e os esterés e álcoois superiores formados durante as vinificações de vinhos brancos e tintos, são alguns dos exemplos. Em vinhos de castas mais específicas descobriram-se outros tipos de compostos, como as metoxipirazinas cujas notas de pimentos caracterizam as castas de tipo Sauvignon, dos norisprenóides em C13 que contribuem para o perfil floral dos vinhos de Touriga Nacional, e recentemente dos S-conjugados de cisteína, precursores dos compostos aromáticos denominados por tióis voláteis que contribuem para o aroma varietal de um número restrito de castas como por exemplo a Sauvignon Blanc (Cacho, 2008).

Em 1991, Darriet detectou duas zonas olfactométricas precisas, relativas ao aroma varietal de Sauvignon Blanc, dando o primeiro passo na investigação destes compostos.

Em 1995, Darriet e Tominaga da Universidade de Bordéus, descobrem a origem química dos aromas varietais dos vinhos da casta Sauvignon Blanc. Estes compostos commumente denominados de tióis voláteis: a 4-mercaptopentano-2-ona (4MMP), o 3-mercaptopentanol (3MH) e o acetato de 3-mercaptopentilo (A3MH), com descritores aromáticos de buxo, toranja e maracujá, são libertados durante a vinificação, a partir de precursores não odorantes, pela acção das leveduras por via de uma reacção enzimática β -liase, análoga a que existe em bactérias.

Os substratos desta reacção são vários tipos de compostos precursores que existem na uva, os S-conjugados da cisteína, conjugados da glutatona e o (E)-hexen-2-al entre outros ainda não identificados (Murat *et al.*, 2001; Subileau *et al.*, 2008).

Tominaga *et al.* (2000), demonstraram que vinhos da casta Sauvignon Blanc não eram os únicos a desenvolverem as “*nuances*” aromáticas própria da casta em questão. Num estudo em que compararam 9 vinhos comerciais de diversas castas (Gewurztraminer, Pinot Gris, Riesling, Muscat, Pinot Blanc, Sylvaner, Colombard, Petit Manseng, Semillon botrytisado) estes autores provaram que os tióis voláteis responsáveis pelas nuances aromáticas dos vinhos de Sauvignon Blanc, se encontram presentes na maioria das castas estudadas, contudo com intensidade diferentes.

Na mesma óptica, e partindo do facto que certos vinhos produzidos a partir de castas brancas portuguesas apresentam desde que vinificados com determinados preceitos, aromas que se assemelham a vinhos da casta Sauvignon Blanc, partimos neste trabalho para uma busca semelhante à que foi feita por Darriet *et al.* (1991) e mais tarde por Tominaga *et al.* (1995), sendo que o objectivo deste trabalho é provar a existência dos tióis voláteis supra citados em vinhos elementares de castas Portuguesas.

Esta perspectiva abre um novo horizonte para o sector da enologia, oferecendo mais flexibilidade na elaboração de vinhos brancos, contribuindo para novos conhecimentos sobre as castas nacionais no que respeita a suas composição aromática e podendo assim adequar as práticas enológicas, no sentido de obter e conservar este potencial.

Este trabalho propõe responder a esta questão: existem tióis varietais semelhantes aos que podemos encontrar na casta Sauvignon Blanc em castas brancas portuguesas, nomeadamente nas castas Antão Vaz, Arinto, Fernão Pires, Verdelho e Viosinho?

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O que é um aroma ?

A palavra aroma provem das palavras em grego e latim “*aroma*” o que significa respectivamente nas duas línguas: especiaria e perfume, no século XII o termo toma unicamente o sentido de perfume, sendo esse emitido por essência vegetais ou de outra substância volátil. Actualmente a palavra aroma faz referência a família de odores com carácter hedónico, ou agradável (Moisseeff *et al.*, 2006). Mais especificamente refere os odores do vinho com os termos aroma e “*bouquet*”. Segundo Peynaud (1983) estes dois termos são considerados sinónimos embora alguns profissionais, reservem o termo “*bouquet*” para os vinhos tintos, e aroma para os brancos. A verdade é que o “*bouquet*” está geralmente associado ao processo de envelhecimento do vinho algo que pode não ser associado exclusivamente a vinhos tintos.

Conclui-se que o termo aroma deverá ser associado a uma componente olfactivamente activa dos vinhos de carácter jovem e, o termo “*bouquet*”, reservado aos vinhos com odores adquiridos durante o envelhecimento (Peynaud, 1983).

2.2. Fisiologia do Olfacto.

O aroma é detectável de duas formas: 1. por via nasal ou ortonasal, quando os aromas penetram directamente no nariz, ou por via retronasal; 2. quando o aroma atinge os órgãos olfactivos através da boca, subindo através de ductos respiratórios até às fossas nasais (Martins, 2009) (Figura 1.).

O aroma traduz a sensação recebida pelo cérebro quando o epitélio olfactivo é atingido por moléculas aromáticas.

A sensação olfactiva não depende somente da concentração desse composto na fase líquida mas também da sua volatilidade, da sua pressão de vapor e do seu limiar de percepção olfactivo (Meilgaard *et al.*, 1999).

O limiar de percepção pode ser definido como a mais pequeno estímulo capaz de produzir uma sensação olfactiva em pelo menos 50 % dos provadores de um júri. Se os provadores forem capazes de identificar o odor, pode-se falar de um limiar de reconhecimento. Quando o composto aromático existe já na solução a provar, pode definir-se um limiar de diferença, que corresponde à mais pequena quantidade adicionada

susceptível de provocar uma alteração do estímulo sensorial (Dubois, 1993; Meilgaard *et al.*, 1999).



Figura 1. Vias de entrada dos compostos aromáticos no aparelho sensorial olfativo humano.
(Adaptado de Martins, 2009)

2.3. O aroma do vinho.

O vinho é composto principalmente por água e etanol, os restantes constituintes, inúmeros compostos de origens variáveis, são responsáveis pelas suas características, sabor, aroma, e pelas diferenças subtis que ocorrem entre vinhos diferentes.

De entre os inúmeros compostos que constituem a matriz complexa que é o vinho, apenas as substâncias voláteis são capazes de estimular os órgãos sensoriais responsáveis pelo olfacto. São moléculas de pequeno tamanho, de hidrofobicidade média e peso molecular compreendido, geralmente, entre 30 g/mol e 300 g/mol (Oliveira, 2000).

Segundo Emile Peynaud (1983), as componentes aromáticas do vinho podem ser classificadas segundo 3 classes:

- O aroma primário que provém directamente da uva que originou o vinho, corresponde ao aroma do “fruto” estando presente nas películas e na polpa da uva antes da vinificação sendo directamente influenciado pela variedade.
- O aroma secundário ou fermentativo, aroma que se desenvolve pela acção das leveduras e de bactérias, cuja volatilidade muito elevada influencia intensamente a componente aromática durante as primeiras fases de evolução do vinho, e fornece o principal carácter aromático aos vinhos de castas neutras.
- Por ultimo, o aroma terciário ou “bouquet”, que surge de processos físico químicos durante a fase de envelhecimento e guarda do vinho. As condições de guarda sendo de carácter oxidativas ou redutivas, de temperaturas altas ou baixas, de diferentes teores de humidade, têm uma influência diferente no produto final. Nem todos os vinhos têm a capacidade de adquirir aromas terciários, depende muito da capacidade de conservação do produto.

Numa classificação mais recente, classifica-se os aromas dos vinhos em quatro categorias: 1. aromas varietais, 2. aromas pré-fermentativos, 3. aromas fermentativos e por fim 4. aromas post-fermentativos. (Bayonove *et al.*, 1998).

Esta classificação tem em consideração os aromas originados durante a fase pré-fermentativa, aromas estes que só são libertados após processamento da uva por via de reacções enzimáticas. (Botelho, 2008)

Em concordância com as considerações expostas anteriormente podemos classificar as castas existentes, de uma maneira empírica, em dois grupos principais, as castas aromáticas que possuem uma componente aromática claramente influenciada pela presença de moléculas odorantes já existentes no mosto e, outras, ditas neutras, que não apresentam um carácter aromático antes da fermentação, mas que adquiram durante esta fase. O aroma final do vinho provem de precursores químicos existentes no mosto que dão origem à posteriori a moléculas aromáticas existentes no produto final.

Nas últimas décadas e com o desenvolvimento de novas técnicas de Química Analítica, nomeadamente da cromatografia em fase gasosa (GC) per si ou acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), de cromatografia em camada fina (TLC), de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), de espectroscopia de infra vermelho

de Fourier (FTIR) e de ressonância magnética nuclear (NMR) permitiram a identificação e quantificação de mais de 500 compostos em diferentes tipos de vinhos.

Muitos destes compostos ocorrem nos vinhos a concentrações residuais, compreendidas entre 10^{-4} e 10^{-9} g/L, sendo que muito deles estão muito abaixo dos limiares de percepção humana.

Muitos destes compostos não têm uma influência directa sobre as características do vinho, mas podem em combinação (efeitos aditivos e/ou sinérgicos) com outros compostos apresentar um efeito significativo (Jackson, 2000).

O aroma de um vinho não resulta somente do somatório dos efeitos dos compostos aromáticos que o compõem, mas de uma combinação complexa, como que uma equação em o efeito da concentração de cada composto e da sua interacção com os diferentes componentes em solução pode dar resultados muito diferentes.

O impacto de cada componente no aroma do vinho depende das propriedades específicas do próprio vinho, pois, noutro vinho pode ser diferente, podendo inclusivamente resultar no aparecimento de um “off-flavour” (Ribereau-Gayon *et al.* 1999)

A complexidade do aroma de um vinho está em consonância com a sua complexidade química sendo o resultado de interacções complexas entre muitos componentes químicos. A intensidade de uma sensação olfactiva não depende somente da concentração desse componente na fase líquida mas também da sua volatilidade, da sua pressão de vapor e do seu limiar de percepção olfactivo. (González *et al.*, 2007) Os compostos que interferem no aroma de um vinho, acabam por ter uma maior influência no aroma característico, estes compostos são geralmente denominados por “aromas chave” (Fisher, 1997).

2.4. Classificação e origem dos principais compostos aromáticos do vinho branco

2.4.1. Ésteres.

Os ésteres formam-se quando a função álcool de um composto, reage com a função ácida de outro, resultando na eliminação de uma molécula de água. Esta reacção é reversível em meio aquoso, mas limitada pela reacção inversa de hidrólise do éster, dependendo de vários factores como da temperatura e do pH do meio (Riberau-Gayon *et.al.*, 2000). Os ésteres têm origens diversas, podem ser provenientes da própria uva, sendo extraídos ao longo do processamento do vinho ou então serem resultantes da

actividade metabólica das leveduras durante os processos fermentativos sendo por isso influenciados pela fonte de azoto disponível, podem ainda resultar de fenómenos físico-químicos que ocorrem durante o envelhecimento e conservação do vinho.

A principal proveniência destes compostos aromáticos é a actividade metabólica das leveduras, contribuindo favoravelmente para a qualidade do vinho, quanto maior a quantidade de ésteres presentes, mais acentuado o aroma será. Os principais ésteres resultam de esterificação enzimática entre os álcoois livres e os ácidos carboxílicos na sua forma activa, esta reacção está relacionada com a existência de enzimas esterases. Os ésteres que contribuem para o aroma são os de cadeia curta, mas com o aumento do peso molecular passam a ter odores mais desagradáveis descritos como “sabão” e “ranço” (Oliveira, 2000).

Os descritores associados ao compostos com menor peso molecular são os frutos frescos.

A formação destes compostos é mais intensa em condições de baixa temperatura e intensa clarificação dos mostos, quando a fermentação é lenta e difícil. Os ésteres formados durante a fermentação alcoólica hidrolisam-se lentamente durante a conservação do vinho, razão pela qual grande parte do aroma dos vinhos desaparece com o tempo. Estas reacções de hidrólise são puramente químicas e ocorrem até que se atinja um estado de equilíbrio. A velocidade da reacção em causa é dependente do equilíbrio entre a concentração em álcool, ácido e éster no meio, do pH e da temperatura (Oliveira, 2000).

2.4.2. Álcoois superiores

Os álcoois superiores são compostos hidrocarbonados com uma única função álcool e com mais de dois átomos de carbono (Fortunato, 2006). A sua presença no vinho resulta de duas vias de formação, da fermentação dos açúcares pelas leveduras sendo por isso, influenciados pela fonte de azoto disponível e da desaminação oxidativa de um aminoácido, com posterior descarboxilação. Estes compostos estão praticamente ausentes nos mostos, existindo apenas alguns com mais de seis átomos de carbono, que podem encontrar-se em concentrações relativamente elevadas. No seu conjunto podem apresentar teores superiores a 100 mg/l (Oliveira, 2000).

Sempre que as suas concentrações ultrapassam os limites de percepção olfactivos contribuem negativamente para o aroma, onde se verifica a atribuição de cheiro e sabor

forte e pungente. Os álcoois superiores de baixo peso molecular apresentam um aroma penetrante e desagradável e em doses elevadas contribuem para a baixa qualidade dos vinhos e quando presentes em baixas concentrações (menos de 300 mg/l) podem contribuir positivamente para o aroma. (Oliveira, 2000).

2.4.3. Terpenos.

Os terpenos pertencem a uma classe de compostos estruturalmente derivados do isopreno (C₅) e formam-se por condensação de várias moléculas. Podem ser classificados em diferentes

famílias consoante o número de átomos de carbono ou de unidades isoprénicas (Fortunato, 2006). Dentro desta família, temos os monoterpenos (compostos com 10 átomos de carbono) e os sesquiterpenos (compostos com 15 átomos de carbono), formados de duas ou três unidades de isopreno, respectivamente. Conferem aromas florais bem conhecidos nos vinhos, mas ainda não se conhecem completamente as vias da biossíntese destes compostos nas uvas. (Ribereau Gayon *et al.*, 2000)

Estão presentes nas uvas na forma de precursores glicosilados inodoros, libertando-se desta forma através da fermentação ou por hidrólise enzimática. (Rogerson, 2001; Fortunato, 2006).

Os precursores glicosilados são bastante numerosos e relativamente abundantes. Nas castas moscatel, o teor dos mais comuns pode atingir valores entre os 6,5 mg/L e os 28 mg/L (Bayonove *et al.*, 1998). No entanto a maioria das variedades possui compostos aromáticos na forma livre e na forma glicosilada, sendo estes últimos, em geral, mais abundantes (Günata *et al.*, 1985). Estes compostos são constituídos por uma ou duas moléculas de açúcar ligadas entre si e que, por sua vez, estão ligadas a uma aglicona volátil; esta última pode ser um álcool monoterpénico como o linalol, o geraniol e o nerol mas também pode ser um composto não terpénico.

Foram já identificados cerca de 70 compostos terpénicos, cerca de 40 na uva e 30 no vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Esses compostos pertencem a várias famílias químicas: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ácidos. Na maioria são compostos monoterpénicos e alguns sesquiterpenos.

No entanto, os que se apresentam mais interessantes do ponto de vista olfactivo são os álcoois monoterpénicos como o linalol, o geraniol, o nerol, o α -terpineol, o citronelol, o hidróxitrienol e alguns óxidos monoterpénicos como o óxido de nerol e o óxido de linalol.

Os aldeídos (geranial, neral e citronelal) são bastante odoríferos, mas são mais agressivos que os álcoois correspondentes. Os óxidos de linalol possuem limiares de percepção bastante superiores, da ordem dos 3 mg/L a 6 mg/L. Os dióis terpénicos também não apresentam propriedades olfactivas de interesse, com excepção do (*E*)-8-hidroxilinalol (Bayonove *et al.*, 1998); podem, contudo, actuar como precursores de compostos odoríferos, ao pH ácido normal dos vinhos.

É interessante referir que quando vários terpenos são misturados exercem um efeito sinérgico uns sobre os outros e, por isso, o limiar de percepção de uma mistura de terpenóis é inferior ao do seu componente mais odorífero (Oliveira, 2000).

A maioria das castas tintas ou brancas de tipo aromáticas ou não, contém terpenóis.

As variedades moscatéis são as castas mais ricas nestes compostos, representando entre 40 % e 50 % das substâncias aromáticas quantificáveis nestas castas, a que correspondem concentrações da ordem dos 500 μ g/L a 1700 μ g/L (Günata *et al.*, 1985).

Uma vez que os resultados quantitativos disponíveis são obtidos utilizando diferentes técnicas de análise e dizem respeito a amostras colhidas em anos e regiões diferentes, não é fácil estabelecer uma comparação directa das diferentes castas no que concerne aos teores em compostos aromáticos. No entanto, é possível estabelecer uma classificação geral das castas com base no teor em monoterpénos permitindo a sua divisão em variedades moscatel, variedades aromáticas não moscatel e variedades neutras (Oliveira, 2000).

2.4.4. Norisoprenoides em C13

Os norisoprenóides são formados através da degradação oxidativa dos carotenóides que podem originar derivados com 9, 10, 11 ou 13 átomos de carbono. Os derivados com 13 átomos (C13-norisoprenóides) têm propriedades odoríferas interessantes (Riberau-Gayon *et al.*, 2000). Estes podem ainda subdividir-se em megastigmanos e não-megastigmanos.

Os primeiros são caracterizados pela substituição de um ciclo de benzeno substituído nos carbonos 1, 5 e 6, e uma cadeia alifática insaturada com quatro átomos de carbono

ligados ao carbono 6 (existindo ainda uma divisão: série ionona, com esqueleto oxigenado no carbono 9, e série damascenona, com o esqueleto oxigenado no carbono 7)

enquanto que os segundos derivam dos megastigmanos por reacções químicas em meio ácido.

Os principais norisoprenóides em C13 são a β -ionona, a β -damascenona, o 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (ou TDN), o vitispirano, o teaspirano, a isoforona e o 3-oxo- α -ionol. (Riberau-Gayon *et al.*, 2000)

2.4.5. Metoxipirazinas.

As metoxipirazinas são uma família de compostos heterocíclicos azotados provenientes do metabolismo dos aminoácidos. Estes compostos tipificam o vinho, conferindo significativas notações aromáticas, de que é exemplo a casta Cabernet-Sauvignon à qual está associado um aroma herbáceo, que relembra o pimento verde e que caracteriza os vinhos jovens por ela produzidos (Bayonove *et al.*, 1998; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000)

Essas notas de aroma devem-se principalmente a três pirazinas: isobutilmetoxipirazina, isopropilmetoxipirazina e s-butilmetoxipirazina. Estes compostos são de difícil análise e ainda não se conhecem totalmente as vias biossintéticas na uva, provavelmente devido à sua pequena concentração em mostos e vinhos da ordem de alguma dezenas de ng/L. Apesar destas reduzidas concentrações, as pirazinas contribuem decisivamente para caracterizar um aroma típico (Bayonove *et al.*, 1998).

A identificação das pirazinas foi feita pela primeira vez na uva (Cabernet-Sauvignon) por Bayonove *et al.* (1975). Depois destes primeiros trabalhos a isobutilmetoxipirazina e as outras pirazinas foram identificadas nas uvas e no vinho de numerosas castas tais como Sauvignon Blanc, Cabernet Franc, Merlot, Semillon, Pinot Noir, Gewürztraminer, Chardonnay, Riesling (Augustyn *et al.*, 1982; Harris *et al.*, 1987; Calo *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1994).

Uma fracção importante da isobutilmetoxipirazina encontra-se na película das uvas de Cabernet Sauvignon (Bayonove *et al.*, 1975), facto este que faz com que os vinhos de prensa contenham uma concentração superior de pirazinas que os vinhos de gota.

Estas substâncias altamente odoríferas possuem limiares de percepção extremamente baixos, da ordem de alguns nanogramas por litro. Somente a 2-metoxi-3-isobutilpirazina e a 2-metoxi-3-isopropilpirazina parecem contribuir para a definição aromática das variedades citadas já que a 2-metoxi-3-sec-butilpirazina está presente quase sempre abaixo do limiar de percepção.

2.4.6. Compostos de enxofre.

Os compostos de enxofre presentes no vinho têm um papel determinante no aroma do vinho. Estes compostos possuem alta volatilidade e reactividade e são em norma poderosos odorantes mesmo a muito baixas concentrações. (Rauhut *et al.*, 1993)

Os compostos de enxofres, contribuem em grande escala para defeitos organolépticos no vinho, dando origem a aromas próximos do ácido sulfídrico, que relembra o cheiro a ovos podres e reduzido. Em regra estes compostos são eliminados dos vinhos graças ao auxílio das práticas enológicas actuais, consegue-se produzir vinhos com valores abaixo do limiar de detecção organoléptica. Em condições desfavoráveis, isto é: em casos de redução intensa, na presença de resíduos de fitofármacos, em vinificações em condições de carência azotada e até quando existem más condições de conservação (directa incidência de luz) os vinhos desenvolvem off-flavours já enunciados. (Moreira, 2009).

Podemos classificar os compostos de enxofre segundo varias nomenclaturas, baseadas no seus grupos funcionais respectivos: tióis, sulfuretos, polisulfuretos, tioésteres, tioálcoois e compostos enxofrados heterocíclicos (Moreira 2009).

Os compostos de enxofres são, além disso, classificados em função da temperatura de ebulição que apresentam, sendo os “leves” ou altamente voláteis (temperatura de ebulição menor que 90°C) e os compostos “pesados” (temperatura de ebulição maior que 90°C) (Moreira, 2009)

Os compostos de enxofres leves, sendo os mais comuns o Acido sulfídrico, metanetiol e etanetiol (entre outros tióis) são responsáveis pelos defeitos de aroma que dão origem a descritores do tipo: alho, cebola, borracha queimada e couve. Estes compostos por serem altamente voláteis não representam um grande problema de ordem tecnológico, por poderem ser facilmente removidos através de um arejamento. No entanto os compostos “pesados”, já representam um maior problema no ponto de vista enológico. Estes compostos são dificilmente eliminados devido à sua fraca volatilidade e reactividade com o cobre.

Os compostos “pesados” possuem limiares de percepção olfactiva mais elevados do que os compostos mais leves, dando origem a aromas desagradáveis a concentrações muito baixas, além disso podem dar origem posteriormente a compostos de peso molecular mais baixo ainda mais odoríferos (Chatonnet *et al.*, 1992; Anocibar Belouqui *et al.*, 1995; Darriet *et al.*, 1999 ; Mestres *et al.* 2000).

Como exemplo podemos enunciar alguns destes compostos: sulfureto de dietil, disulfureto de dietilo e disulfureto de dimetilo que dão origem a aromas cujo descritores são os vegetais cozidos, cebolas e borracha (Quadro 1.)

Quadro 1. Descrição sensorial, limiar de percepção e temperatura de ebulição de alguns compostos de enxofre do vinho (Adaptado de Moreira, 2009)

Composto de enxofre	descrição sensorial	Limiar de percepção ($\mu\text{g/L}$)	Ponto de ebulição ($^{\circ}\text{C}$)
Sulfureto de hidrogénio (H_2S)	ovos podres	0,5	-61
Metanotiol $\text{CH}_3\text{-SH}$	água estagnada, couve	1,5	6
Sulfureto de dimetilo (DMS $\text{CH}_3\text{-S-CH}_3$)*	trufa, espargos, marmelo	10	35
Sulfureto de dietilo (DES : $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$)	vegetais cozidos	0,9	92
Disulfureto de dietilo (DEDS: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_3$)	alho, borracha e cebola	4,3	151
Disulfureto de dimetilo (DMDS: $\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$)	cebola	15	109
2-mercaptoetanol	capoeira, aliácea, borracha queimada	3200-4500	>90

2.4.6.1. Compostos de enxofre varietais

No decorrer das últimas duas décadas, uma série de trabalhos foram efectuados para a identificar os aromas associados a compostos de enxofre.

A maioria dos compostos de enxofres são considerados como prejudiciais para o aroma de vinhos brancos. No entanto, alguns dos compostos dão origem à “*nuances*” de aroma agradáveis, e considerados como aromas varietais.

Inicialmente detectados e estudados na casta Sauvignon Blanc estes aromas são comumente descritos como aromas de “Sauvignon Blanc” e têm como descritores mais comuns os seguintes: espargos, relva, físalis, buxo, giesta, gomos de cassis, eucalipto, toranja, maracujá (Tominaga *et al*, 2000).

Os compostos associados a esta gama aromática, foram detectados pela primeira vez em vinhos por Darriet *et al*. (1991). Presentes em concentrações muito pequenas em vinhos da casta Sauvignon Blanc, estes compostos foram identificados como sendo tióis, e são considerados como varietais por possuírem uma origem em precursores existentes na uva.

Os tióis são compostos químicos constituídos por um grupo (-SH) (Figura 2.) designado por grupo sulfídrico. Em linguagem corrente os tióis são conhecidos também por mercaptanos com a seguinte fórmula estrutural:



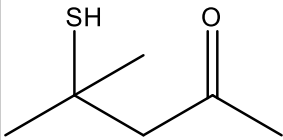
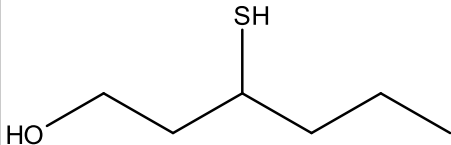
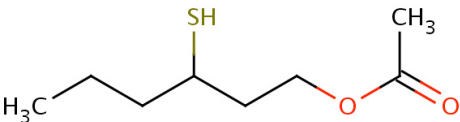
Figura 2. – Grupo Tiól é composto por -SH

Em termos de reactividade normalmente compara-se o átomo de enxofre (S) a um átomo de oxigénio (O), contudo os tióis são mais ácidos que álcoois. Esta característica faz com que estes compostos sofram facilmente desprotonizações perdendo rapidamente o átomo de hidrogénio.

Consequentemente o anião tiolato formado, sofre facilmente uma substituição nucleófila de tipo $\text{S}_{\text{N}}2$. Esta facilidade encontra-se na base das reacções que iremos ver de seguida. A ligação entre o átomo de enxofre e o átomo de hidrogénio é praticamente apolar devido à baixa electronegatividade existente entre os dois átomos. Esta característica faz com que estes compostos apresentem uma baixa tendência para criarem ligações por pontes de hidrogénio, reagirem com água e até entre outros tióis. Esta fraca tendência para formarem ligações por pontes de hidrogénio é a principal causa da existência de tióis voláteis. (Patai, 1974)

Dentro dos tióis voláteis que se conhecem iremos destacar 3 tióis que contribuem, de forma importante, para o aroma do vinho branco e, que se encontram actualmente em estudo: 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, o 3-mercaptohexanol e o acetato de 3-mercaptohexilo (Quadro 2).

Quadro 2– Compostos tióis varietais presentes em vinhos

Composto	Estrutura Química
4-mercapto-4-metilpentan-2-ona	
3-mercaptohexanol	
acetato de 3-mercaptohexilo	

A ausência de tióis voláteis nas uvas revela a importância que a espécie de levedura de fermentação contribui para o aparecimento destes compostos ao contrário do que ocorre para os monoterpenos e norisoprenóides, que existem no bago, os tióis voláteis são libertados, no decorrer da fermentação

Estudos revelam que estes aromas dependem da existência de determinados precursores presentes nos bagos das uvas (Tominaga *et. al* 1998).

A cisteína ($C_3H_7NO_2S$) é um aminoácido com um grupo tiól. Devido á presença deste grupo, a cisteína é extremamente reactiva tornando-se um componente estrutural e funcional de diversas enzimas e proteínas.

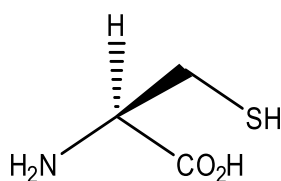
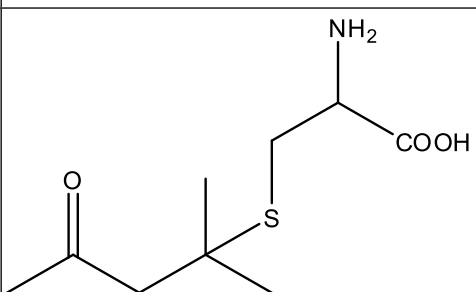
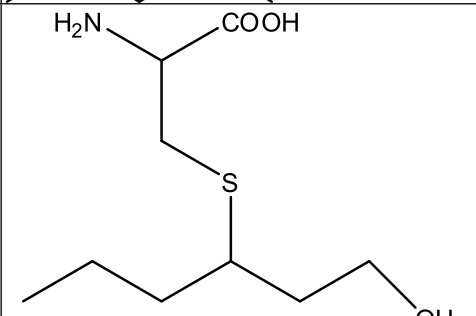


Figura 3: Cisteína

Actualmente tem-se conhecimento de alguns precursores responsáveis pela libertação dos tióis voláteis identificados.

Sabe-se que o 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona é libertada do precursor S-4- (4-metil-2-pentanona)-L-cisteína, o 3-mercaptohexanol e respectivo acetato do respectivo precursor S-3-hexanol-L-cisteína. (Peyrot des Gachon et al. 2002). (Quadro 3.)

Quadro 3. Principais S-conjugados da cisteína

Composto-Precursor	Estrutura Química
<u>S-4-(4-mercapto-pentan-2-ona)-L-cisteína</u>	
<u>S-(3-hexanol)-L-cisteína</u>	

O mecanismo de formação dos grupos conjugados de S-cisteína ainda não está bem elucidado. Contudo, estudos elaborados em plantas e em alguns animais, demonstram que estes conjugados de cisteína são intermediários da quebra de ligações de conjugados de S-glutationa. Relativamente às uvas, a formação destes precursores encontra-se associada hipoteticamente, como intermédios de uma via de desintoxicação através da glutaciona como precursor.

Peyrot des Gachons *et al.* (2002) propõem que em plantas de videira, compostos xenobióticos são inactivados pela conjugação enzimática à glutaciona.

Segundo estes autores a formação destes precursores surge como uma via de desintoxicação (Figura 4.).

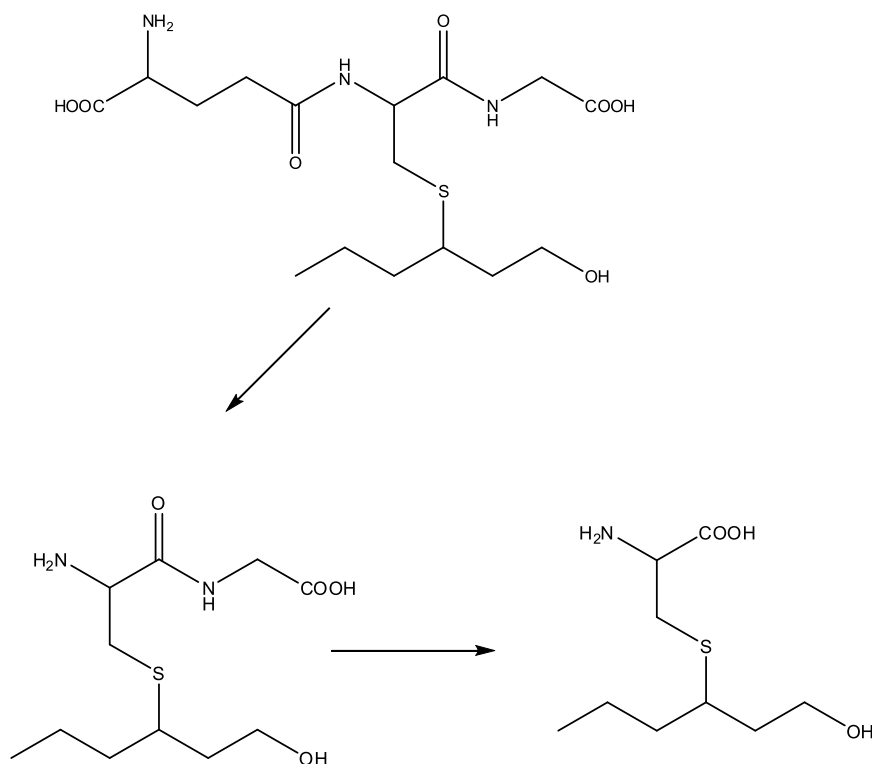


Figura 4. Obtenção de S-3-(hexanol) - L-cisteína

O aparecimento dos tiois voláteis a partir dos precursores necessita da acção da levedura presente.

Pensa-se que libertação destes compostos durante a fermentação seja devida à acção de uma família de enzimas conhecidas por β -liases. Esta família de enzimas encontra-se identificada em extracto da bactéria *Eubacterium limosum*, mas ainda não se conseguiu identificar as enzimas com a mesma actividade (β -carbono-Enxofre liase) em leveduras envolvidas na libertação destes compostos em mostos e vinhos.

Actualmente existem diversos estudos a decorrer no âmbito de se perceber melhor como este mecanismo ocorre. Um questão importante é saber que a quantidade de precursores existentes se encontra relacionada com as concentrações finais dos compostos tiois voláteis.

Estes compostos poderão ser mais ou menos benéficos consoante as concentrações em que se encontram. Partindo deste princípio torna-se importante para o enólogo ter um conhecimento acerca de como controlar as quantidades formadas de voláteis, de acordo com o produto final pretendido.

A metabolização pela levedura de tióis voláteis a partir dos precursores S conjugados da cisteína foi considerada até recentemente como a única via de libertação destes compostos no vinho.

Os S-conjugados da glutatona como o S-3-(hexan-1-ol)-glutathione têm sido apontados como precursores do 3-mercaptohexanol, graças a acção de enzimas γ -glutamyltranspeptidase e de carboxypeptidase, estas enzimas ainda não foram isoladas no vinho. (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002)

Outros estudos têm sido desenvolvidos considerando a via de formação a partir do (E)-hexen-2-al, como outro precursor do 3-mercaptohexanol em vinhos. (Schneider *et al.* 2001; 2006)

No entanto, investigações efectuadas no INRA Montpellier em França têm revelado que o contributo destes precursores S-conjugados da cisteína no total de tióis obtidos no vinho, é muito limitado, da ordem dos 3-7% no caso pontual do 3MH (Subileau *et al.*, 2008b). Este facto favorece e confirma a tese que existem ainda outras vias de síntese dos tióis voláteis do vinho, vias estas que podem ter ainda uma maior contribuição para a presença destes compostos no vinho.

O facto da síntese de tióis tais como o 3MH não ser dependente unicamente de precursores varietais S-conjugados da cisteína, poderá explicar a ubiquidade destes compostos em diferentes castas de todo o mundo (Schneider *et al.*, 2006).

2.4.6.2. Função dos precursores S-conjugados da cisteína.

O papel dos compostos S-conjugados da cisteína nas uvas ainda não foi descoberto, no entanto existem na natureza compostos do mesmo tipo (sulfóxidos com ligações a cisteína) que têm como papel repulsar animais devido ao cheiro nauseabundo que emitem, tal como acontece nos alhos e cebolas (Peyrot de Gachons *et al.*, 2002).

Nas uvas, uma das hipóteses aceites para justificar a presença destes compostos, é que eles participam numa reacção de desintoxicação dos tecidos. Peyrot des Gachons *et al.*

(2002) propõe que nas videiras os compostos xenobióticos são desactivados pela combinação com a glutatona, que posteriormente dão origem aos S-conjugados da cisteína.

2.4.6.3. Principais tióis varietais do vinho e seus descritores aromáticos.

A 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona transmite um aroma que lembra o buxo, a giesta, o rebento de cassis e por vezes a urina de gato. Este composto foi identificado nos vinhos da casta Sauvignon Blanc e Scheurebe (Tominaga *et al.*, 1998; Cacho, 2008).

O 3-mercaptohexanol transmite notas de manga verde e buxo. foi identificado inicialmente na casta Cabernet-Sauvignon e Merlot. (Tominaga *et al.*, 1998)

No entanto posteriormente foi detectado em muito outros vinhos monovarietais (Tominaga, *et al.* 2000). É um dos compostos chave em vinhos Rosados (Murat, *et al.* 2001) e também de vinhos brancos elaborados com a variedade suíça Petit Arvine (Fretz, 2005.)

O acetato de 3-mercaptohexilo, cujo descritor aromático é o maracujá ou buxo foi encontrado inicialmente em vinhos de Sauvignon Blanc (Tominaga, *et al.* 1995), no entanto pode existir em muito mais vinhos. (Tominaga, *et al.* 2000). É o composto que confere o carácter varietal, frutado e tropical da casta Verdejo da região da Rueda (Ferreira *et al.*, 2007).

Recentemente, identificaram-se dois enantiómeros deste composto em vinhos, distinguidos, pelas suas características odorantes no vinho (Subileau *et al.*, 2007).O enantiómero “R” confere aroma de maracujá e forma “S” confere aroma herbáceo do buxo. A forma “R” possui um limiar de percepção inferior a forma “S”.

2.4.6.4. Aspectos tecnológicos relacionados com a obtenção de S conjugados da Cisteína e tióis em mostos e vinhos.

Os tióis voláteis estão quase sempre ausentes nos mostos. Aparecem nos vinhos durante a fermentação alcoólica sob a acção do metabolismo da levedura. Estes compostos são libertados a partir de precursores não aromáticos presentes nas uvas cuja estrutura foi recentemente identificada como S-conjugados da cisteína (Tominaga *et al.* 1995). A 4 MMP é libertada a partir S-4-(4-metilpentan-2-ona)-cisteína e o 3 MH a partir do S-3-(3-

hexan-1-ol)-cisteína durante a fermentação alcoólica, enquanto a A3MH resulta acetilação do 3MH por parte das leveduras (Tominaga *et al.* 1998).

Como a descoberta destes compostos foi feita recentemente, ainda não existem dados consistentes sobre a sua evolução durante a maturação da uva. No entanto, parece que o solo exerce influência importante sobre esta evolução (Tominaga *et al.*, 2000).

Estes autores referem que o precursor da 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona decresce sempre durante a maturação, dependendo do terreno. O precursor do 3-mercaptohexanol parece ser o mais afectado pelo tipo de solo, tendo comportamento oposto para duas situações diferentes. Assim o conteúdo de 4MMP e de 3MH depende do nível de precursores presentes nas uvas. Durante a maturação a evolução dos precursores conjugados da cisteína variou de acordo com o ambiente (solo, teor de azoto nas uvas). Para aferir da localização dos S-conjugados da cisteína nas uvas, Peyrot des Gachons *et al.* (2002) mostraram que o conteúdo de S-4-(4-metil-2-pentanol) precursor de 4MMP é muito superior na polpa do que na película, enquanto que a concentração de S-3-(3-hexan-1-ol) precursor de 3MH foi quase dez vezes maior na película. Em comparação com uma modalidade de prensagem imediata, uma modalidade de maceração de contacto da película só permitiu um ligeiro aumento na concentração do precursor de 4MMP, mas enriqueceu o mosto consideravelmente com a precursores de 3MH. A diferença de comportamento entre o 4MMP e o 3MH é explicada pela sua localização dentro do bagos.

2.4.6.5. Influência das práticas vitícolas sobre a obtenção de S conjugados da cisteína e conservação de tióis varietais.

Em relação à variação das concentrações dos precursores dos aromas tiolados durante a maturação das uvas é indiscutível que o solo e as características climáticas (o “terroir”) bem como o impacto das práticas culturais na vinha (clones, porta-enxertos, fertilização, tratamentos fitossanitários, etc.) são importantes (Shinkaruk *et al.*, 2008), sendo contudo um tema muito pouco estudado.

Os solos em carência de azoto favorecem a produção de vinhos com mercaptanos mas não dos que designamos de tióis varietais.

É igualmente conhecido que os tratamentos fitossanitários à base de cobre, dada a sua reactividade com o enxofre, podem diminuir a formação de tióis (Dubourdieu *et al.*, 1996).

Segundo Choné *et al.* (2006), o azoto das videiras na fase do vingamento dos frutos aumenta o potencial aromático das uvas e também aumenta a quantidade de precursores derivados dos S-conjugados da cisteína.

O stress hídrico severo é um factor muito limitante para a obtenção de uvas ricas em S-conjugados da cisteína, sendo que este parâmetro é negativo em todos os sentidos, ao nível do rendimento da qualidade mas também na perenidade da cultura em geral.

No entanto, um stress moderado foi apontado como um factor potenciador da acumulação dos precursores dos tióis (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002).

Além de todas estas condições relativas à condução da vinha, o factor mais importante continua a ser a casta. Assim apesar destes compostos serem característicos somente dos vinhos da casta *Sauvignon Blanc*, foram também identificados em vinhos de outras castas brancas como já foi referido anteriormente, bem como em vinhos rosados a partir de castas tintas como a *Cabernet-Sauvignon* e a *Merlot* (Murat *et al.*, 2001) assim como *Grenache* e *Syrah* (Cacho, 2004).

2.4.6.6. A influência da Vinificação e do envelhecimento.

Os S-conjugados da cisteína presentes na uva, não sendo voláteis, não possuem propriedades odorantes. Estes compostos têm de ser convertidos a tióis para poderem participar no aroma dos vinhos. Esta conversão ocorre durante a fermentação alcoólica do mosto e é promovida pelas leveduras.

Os processos bioquímicos que ocorrem durante a vinificação são portanto de máxima importância, para o enólogo poder controlar o aroma final dos vinhos.

Os pontos a controlar durante o processo de vinificação são: 1. As operações pré-fermentativas, 2. A fermentação alcoólica, 3. O período de conservação, 4. O envelhecimento.

Como já foi dito anteriormente os S-conjugados da cisteína acumulam-se na polpa mas principalmente nas películas das uvas dependendo da natureza do precursor e da casta.

Este facto permite que tecnologicamente a extracção destes compostos para fins enológicos se possa fomentar por via da maceração com utilização de enzimas pectolíticas, aumentando o período de contacto do mosto com as películas.

No entanto não existe uma correlação directa entre a extracção dos polifenóis e os S-conjugados da cisteína, demonstrando que a libertação destes diferentes tipos de compostos, ocorre de uma forma distinta ao longo da maceração (Howell *et al.* 2003).

A temperatura de maceração pode também influenciar os níveis de tióis no vinho, segundo Murat *et al.* (2001), em ensaios fazendo incrementar as temperaturas numa gama de 10° a 18°C, obtiveram-se rendimentos sensivelmente mais elevadas no caso de temperaturas mais altas.

Os precursores da 4MMP e do 3MH, localizam-se de um modo diferente ao nível da uva, havendo uma maior proporção do precursor de 3MH na película face ao precursor da 4MMH (que está localizado mais na polpa), este facto contribui para a complexidade do controlo da extracção, permitindo extracções diferenciada, incrementando a possibilidade de controlo sobre o perfil de aromas tiolados no vinho (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002).

Como já foi referido, os tióis voláteis são praticamente inexistentes do mosto, os mecanismos que promovem a conversão dos precursores conjugados da cisteína presentes na uva são promovidos pelas leveduras do género *Saccharomyces*.

A quantidade de 4MMP ou 3MH libertados é muito dependente da estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na fermentação, alguns fermentos comerciais foram seleccionados para promoverem mais a libertação de tióis, tais como as estirpe de referência "VL3" para a libertação de 4MMP (Dubourdieu *et al.*, 2000). É também de anotar que as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae ssp. bayanus* tem uma maior capacidade face às melhores estirpes de *S. cerevisiae* em libertar 4MMP. No caso do A3MH, pensa-se que a sua formação depende da esterificação do 3MH pelas leveduras durante a fermentação (Tominaga *et al.*, 2006).

A libertação de tióis a partir dos seus precursores depende da acção de uma família de enzimas conhecidas por β -liases (Tominaga *et al.* 1995) existentes na *Sacharomyces cerevisiae*. Embora seja conhecido que existe uma correlação entre a quantidade de S conjugados extraída nos mostos e a concentração de tióis presentes nos vinhos resultantes, a proporção de conversão é muito baixa, e só uma pequena fracção dará origem a tióis aromaticamente activos. Os estudos apontam para valores na ordem de 5% no caso da libertação do 4MMP em relação a concentração do seu precursor e 9% no caso do 3MH (Murat *et al.* 2001).

O principal factor determinante para a libertação destes compostos é a estirpe da levedura utilizada, isto é, a capacidade de uma determinada levedura em libertar um tipo de composto não está relacionada com a sua capacidade em libertar outros.

Existem no mercado fermentos comerciais aconselhados por exemplo para libertar 4MMP e outras para o 3MH (Dubourdieu *et al.* 2000).

Recentemente King *et al.* (2008), demonstraram que co-inoculações de várias estirpes de leveduras podem dar origem a resultados complementares, modulando as concentrações relativas dos diferentes compostos tiolados, permitindo o aproveitamento do potencial dos vários tipos de S-conjugados da cisteína contidos no mosto numa só vinificação, conjugando estes diferentes substratos com cada uma das estirpes associadas.

Os mecanismos enzimáticos relacionados com a libertação de tióis, foram pela primeira vez sugeridos por Tominaga *et al.* em 1995, e basearam-se na utilização de uma enzima de extractos celulares da bactéria *Eubactérium limosum*, e de uma triptofanase de *E. coli*; enzimas que apresentam actividade β -liase nos S-conjugados da cisteína.

Investigações recentes de engenharia biológica conduzidos na Austrália, permitiram a obtenção de estirpes de *S. cerevisiae* geneticamente modificada em que foi clonado um gene de *E.coli* que codifica uma enzima, a triptofanase, necessária para uma maior expressão da actividade β -liase, aproveitando com mais eficiência o potencial de S-conjugados da cisteína no mosto. Neste caso a levedura liberta até 25 vezes mais 4MMP e 3MH do que uma estirpe padrão (King *et. al.* 2006). Este tipo de leveduras pode ter um grande interesse em castas que acumulam quantidades limitadas de S-conjugados da cisteína, permitindo a obtenção de tióis a níveis perceptíveis quando dificilmente seriam atingíveis em vinificações com uma estirpe comercial padrão (Figura 5).

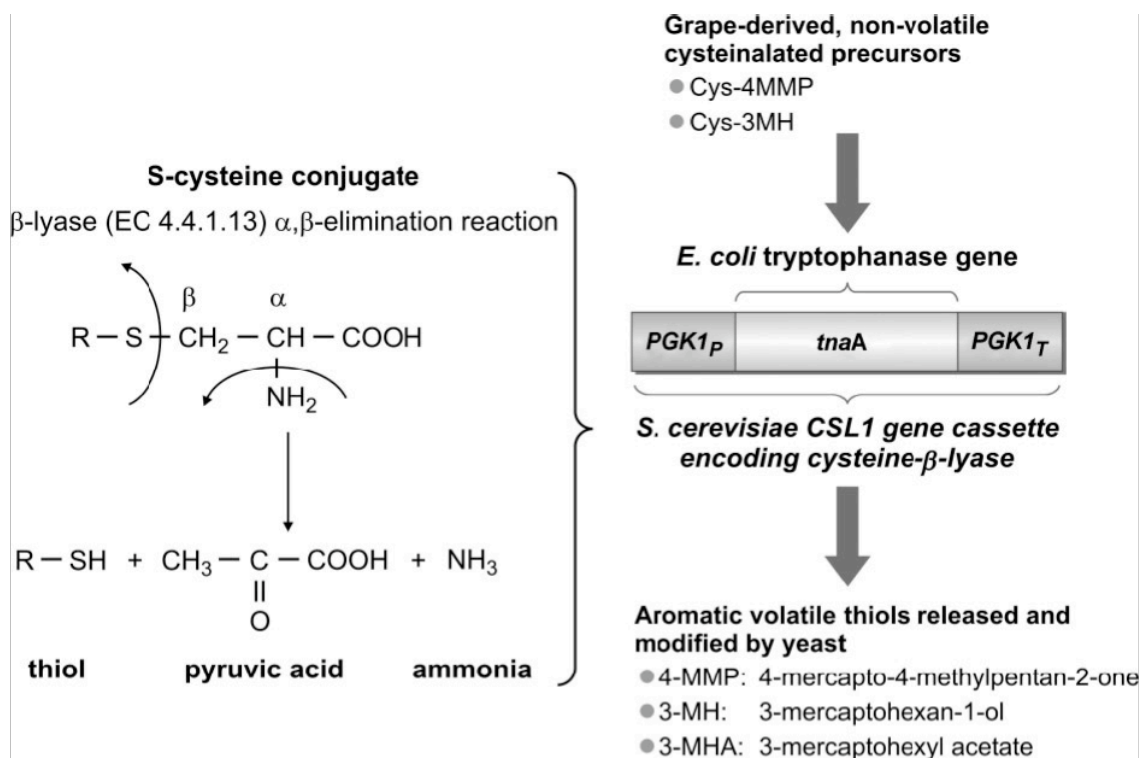


Figura 5. Mecanismo bioquímico com que a cisteína- β -liase converte os S-conjugados da cisteína em tióis aromáticos no vinho, na Levedura *S.cerevisiae* CSL1,OGM, com gene de *E. Coli* triptofanase. (Extraída de King *et al.* 2006)

A escolha da estirpe de levedura, sendo à partida um parâmetro de maior importância para a libertação de compostos tióis voláteis, tem de ser acompanhada de determinados cuidados de vinificação.

A temperatura da fermentação parece ser um factor de grande importância na libertação de tióis, vários trabalhos já demonstraram que a libertação destes tióis é facilitada a temperaturas mais elevadas. Masneuf-Pomarède *et al.* (2006) indicam que em ensaios de fermentação com várias estirpes de *S. cerevisiae*, a temperatura compreendidas entre 13 e 20°C, os resultados mais promissores em relação a concentração de 4MMP e 3MH foram obtida na fermentação a 20°C. Estes autores também referem o trabalho de Howell *et al.* em 2004 que demonstraram o mesmo efeito da temperatura, conduzindo fermentações a temperatura de 18°C e 28°C.

Segundo Masneuf-Pomarède *et al.* (2006) a libertação de ésteres aromáticos como acetato de isoamilo é facilitada em regra por fermentações a baixas temperaturas, no entanto a esterificação do 3MH em acetato de 3MH (ou A3MH) é maior nas modalidades de fermentação com maior temperatura, visto a presença deste éster ser directamente correlacionado com a quantidade de 3MH no vinho (cuja concentração é também

proporcional, a temperatura de fermentação). No entanto, a tese de Masneuf-Pomarède *et al.* (2006) é válida para perfis de temperatura de fermentação estáticos. No caso de fermentação com perfil de temperatura decrescente, com início a quente, 18-20°C, baixando a temperatura abaixo de 14°C ao fim de 3 a 4 dias do início da fermentação; existe um maior rendimento na reacção de esterificação do 3MH para A3MH. Esta técnica consegue conciliar um aumento de rendimento da reacção de esterificação pelo efeito da temperatura baixa sobre o metabolismo da levedura, sem a limitar por falta de substrato. (I.T.V., 2005)

Tudo aponta para que o aumento da temperatura de fermentação fomente a produção de tióis pela levedura. Este mecanismo está ainda mal estudado, é provavelmente devido a modificações ao nível dos ácidos gordos da membrana das leveduras, que se tornam mais permeáveis a entrada dos precursores com o aumento da temperatura (Masneuf-Pomarède *et al.* 2006).

Contrariamente a outros compostos de enxofre, a libertação dos tióis voláteis do vinho, não parece ser influenciada positivamente por carências nutritivas da levedura, ao nível dos compostos azotados e do oxigénio. Pelo contrario, carências nutritivas poderão enfraquecer o metabolismo da levedura e toda a actividade enzimática necessária para a conversão dos S-conjugados em tióis. Será portanto importante uma adequada nutrição azotada para permitir a condução da fermentação por leveduras sem carências. No entanto é de evitar a utilização de correcções com fosfato diámonio (DAP), pois foi provado em estudos recentes (Subileau *et al.* 2008) em que a presença de DAP no meio acaba por induzir o fenómeno descrito como “**NCR**” (Nitrogen Catabolite Repression) ou repressão catabólica azotada, em que a levedura acaba por reprimir o gene que controla de entrada de aminoácidos na célula, designado por “**GAP1**” (General Amino acid Permease), dando preferência a substratos assimilados sob forma de iões de amónia como no caso da adição de DAP.

A repressão desta via “**GAP**”, impossibilita também a entrada dos precursores dos tióis, na levedura, pois são moléculas derivadas de aminoácidos. Este facto dá origem a perdas de rendimento ao nível da libertação dos tióis, ficando os precursores no mosto após a fermentação.

Com este trabalho Subileau *et al.* (2008), demonstraram que o potencial aromático contido nos precursores S-conjugados da cisteína é muitas vezes subaproveitado, nomeadamente devido a questões de ordem nutricionais da levedura.

A presença de oxigénio é apontada como um factor determinante para a estabilidade dos tióis voláteis, durante a fermentação e durante a conservação dos vinhos.

Os processos de envelhecimento em barrica podem ser por isso considerado como negativos para a conservação do potencial aromático associado a tióis.

É sabido que os polifenóis (sobretudo epicatequinas) do vinho têm um papel importante sobre a depreciação do perfil aromático dos vinhos da casta Sauvignon.

Os tióis voláteis, por possuírem uma natureza nucleófila tendem em reagir com electrófilos como os polifenóis existentes no vinho. (Nikolantonaki *et al.*, 2010)

A oxidação dos mostos pode fazer diminuir a concentração em tióis do vinho respectivo, a presença de quinonas provenientes da oxidação dos polifenóis da uva, pela sua grande afinidade com os tióis pode ser nefasta para o perfil aromático pretendido, sendo por isso aconselhável uma correcção com sulfuroso e/ou com ácido ascórbico, de maneira a evitar a actividade polifenoloxidase. (Blanchard *et al.*, 2004).

O 3MH apresenta maior sensibilidade a este tipo de reacção, a sua concentração diminui em presença de oxigénio em soluções ricas em catequinas. (Blanchard *et al.*, 2004).

Choné *et al.* (2006), relacionaram o conteúdo azotado do mosto com a conservação dos aromas varietais de vinhos da casta Sauvignon Blanc, neste trabalho sugerem que vinhas com adequada nutrição azotada, dão origem a mostos mais ricos em glutatona e com menor quantidade de polifenóis, permitindo uma maior conservação dos tióis, devido a diminuição das interacções dos polifenóis com tióis, e pela protecção da glutatona, que se liga preferencialmente às quinonas do que os tióis.

Nikolantonaki *et al.*, (2010) mostraram recentemente que o Fe(III) possui um papel importante de catalização na oxidação de polifenóis e posterior reacção com os tióis do vinho, demonstraram outra vez que o 3MH é mais afectado do que a 4MMP.

Uma solução para evitar as perdas de tióis em vinhos, foi recentemente apresentada pela empresa Laffort e consiste na aplicação de adjuvantes enriquecidos em glutatona, de maneira a proteger o mosto nas fases finais da fermentação. Uma aproximação semelhante, apresentada por Murat *et al.* (2005) consiste na aplicação da prática de “*batonnage*”, demonstrando o poder protector das borras finas sobre o perfil aromático associado a tióis varietais.

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

O excesso de tióis pode afectar a qualidade do vinho, sobretudo quando estamos perante uma grande quantidade de 4MMP que pode conferir aromas desagradáveis de urina de gato.

A aplicação de sulfato de cobre é apontada como a técnica enológica mais eficaz para eliminar aromas ligados a compostos enxofrado, incluindo os tióis que conferem aromas positivos ao vinho. (Darriet *et. al*, 1999)

O processo pelo qual o vinho é submetido antes do acondicionamento em garrafa pode ser determinante, influenciando sobre a estabilidade dos tióis obtidos durante a fermentação.

A colagem dos vinhos brancos com bentonite é apontada como um dos factores de perdas dos tióis voláteis benéficos para o vinho.

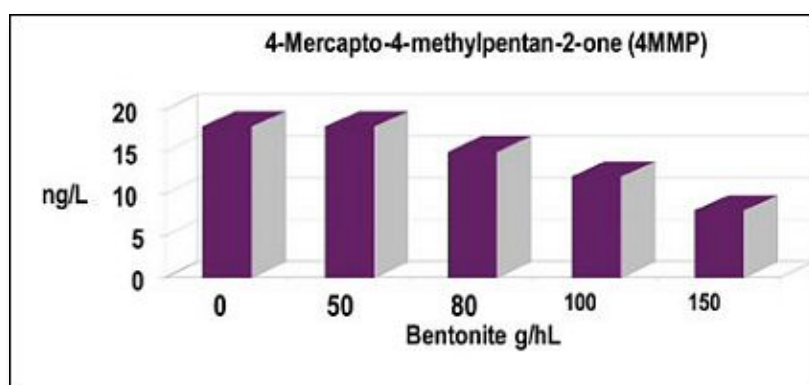


Figura 6. Níveis de 4MMP após tratamento com Bentonite em 4 modalidades de aplicação diferentes.

(adaptado de Boywer, Laffort Oenologie, 2008)

Estudos efectuados com vinhos da casta Sauvignon Blanc, pela empresa de produtos enológicos Laffort oenologie, demonstraram que a utilização de bentonite acima da dose de 50 mg/L pode fazer diminuir substancialmente a concentração de tióis voláteis no vinho (Figura 6.)

O envelhecimento na garrafa tem geralmente efeitos negativos sobre o potencial de aromas de origem fermentativa. Para os tióis este processo também ocorre e existe perdas naturais de compostos em função do tempo e devido a reacções de oxidação. (Dubourdieu *et al*. 2004)

Um tratamento com anidrido sulfuroso no vinho é muito importante para travar todo o tipo de reacção de oxidação. No entanto este antioxidante perde a sua eficácia perante uma fonte importante de epicatequinas. (Nikolantonaki *et. al.*, 2010)

Trabalhos recentes sugerem que os S-conjugados da cisteína que ainda subsistem após o final da fermentação podem durante a prova ser hidrolisados enzimaticamente, ao serem transformados em tióis voláteis pelos microorganismos anaeróbios da flora existente na cavidade bucal. (Stackenmann *et al.*, 2008).

Este efeito, explica o poderoso aroma retronasal persistente, que certos vinhos da variedade Sauvignon Blanc possuem.

2.4.6.7. Outros tióis não varietais com interesse enológico

É de anotar a presença e importância de outros tipos de tióis no vinho, cuja origem não é varietal.

O Furfuriltiol (FFT, ou 2-Furanmetanetioli) é um composto com forte aroma a café, supõe-se que a sua síntese esteja relacionada com a reacção entre o furfural proveniente da madeira das barricas e o ácido sulfídrico formado durante a fermentação (Blanchard, *et al.* 2001). Este aroma está geralmente associado a vinhos envelhecidos em barrica no entanto existem exemplos de vinhos que não são envelhecidos em barricas que apresentam estes aromas, tais como vinhos envelhecidos na região de Champagne. (Tominaga *et al.* , 2003).

2.5. Metodologias de análise do aroma de vinhos

O aroma do vinho tem de ser analisado pela vertente sensorial e instrumental. Na caracterização dos aromas, é necessário uma descrição das propriedades sensoriais do vinho aliada a identificação das estruturas químicas associadas. (Fretz, 2005)

2.5.1. A avaliação sensorial.

A avaliação sensorial é uma disciplina científica que identifica, quantifica e interpreta reacções sensoriais em relação a alimentos, percebendo-se pela visão, olfacto, gosto e também pelo sentido táctil. A grande quantidade de interferências que podem fazer desviar a avaliação sensorial faz com que seja necessário conduzir estas sessões em condições controladas e com indivíduos devidamente treinadas para o efeito (Noble, 1988).

Diferentes tipos de fichas de prova têm sido desenvolvidas e utilizadas para medir a qualidade dos vinhos. Estas fichas têm sido desenvolvidas em paralelo com sistemas de terminologia associadas ao vinho, de maneira a fazer corresponder os conceitos descritos em fichas, com referências standardizadas. (Noble *et al.*, 1987)

Para a avaliação do vinho, várias abordagens foram tomadas para descrever sensorialmente os vinhos por meio de referências. Jaubert (1995) descreveu na sua publicação “*Le champ des odeurs*” 45 odores de referência cada qual definido directamente por um composto químico. Esta metodologia permite formar painéis promovendo a utilização de uma linguagem comum. (Dratz, 2001).

O sistema inventado por Jean Lenoir, “*Le nez du vin*” utiliza pequenos frascos com essências para uso em comparações. Noble *et al.* (1987) desenvolveu a roda dos aromas onde uma terminologia especificamente desenvolvida para os vinhos, está hierarquicamente estruturada ao longo de uma roda em três níveis. Para cada descritor do último nível (o mais detalhado) descreve uma referência que permite treinar o painel de provadores. Estas referências são geralmente compostas por um vinho neutro no qual se mistura uma essência de um fruto e/ou especiaria como descritor. Esta aproximação tem em consideração a complexidade dos aromas naturais, contrariamente a outras que só tem em consideração um único composto químico com descritor. (Fretz, 2005)

Os principais tiois voláteis do vinho podem ser considerados como “aromas chave” ou altamente activos, pois são compostos que podem transmitir as suas características, sem necessidade de suporte por outros componentes do vinho (Ferreira *et al.*, 2007).

Isto deve-se ao facto que estes tiois, nomeadamente o 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP), o 4-mercapto-4-metilpentan-2-ol (4MMPOH), o 3-mercaptohexanol assim como o acetato de 3-mercaptohexilo (3MH e A3MH) serem dos compostos aromáticos mais poderosos que existem no vinho.

Os níveis de detecção do 4MMP são os mais baixos de todos os compostos aromáticos conhecidos no vinho, sendo apenas necessário 0,8 ng deste composto num litro de vinho para ele poder ser detectado, seguem-se o A3MH, 4MMPOH e o 3MH com respectivos limiares de percepção de 4 ng/L, 55 ng/L e 60 ng/L (Swiegers *et al.* 2007).

2.5.2. Avaliação instrumental dos compostos voláteis dos vinhos.

A química analítica é um ramo da química com grande interesse no estudo de aromas

pois permite identificar e quantificar as moléculas odorantes em várias matrizes alimentares.

A maioria dos instrumentos analíticos presentes actualmente em diversos laboratórios, não consegue analisar directamente matrizes complexas como o vinho. É necessário uma fase prévia de preparação da amostra para se poder efectuar a pesquisa com o equipamento analítico. Esta preparação consiste na extracção, isolamento e quando necessário concentração dos compostos em estudo.

2.5.2.1. A extracção de aromas dos vinhos.

A extracção líquido/líquido, com solventes orgânicos é o método clássico para isolar compostos voláteis. O princípio deste método assenta na baixa polaridade destes compostos e na sua melhor solubilidade em solventes orgânicos do que na água (Fretz, 2005).

Uma característica importante dos solventes para o sucesso da extracção, é o a temperatura de ebulição ser mais baixa do que a dos compostos voláteis a extrair, de maneira a ser possível a concentração do extracto para análise instrumental (Climâco, 1987).

O método de extracção líquido/líquido é conveniente para soluções aquosas e bebidas alcoólicas como é o caso do vinho. Num estudo em cervejas, foram efectuadas em condições semelhantes extracções com diferentes solventes, como o hexano, o acetato de etilo e diclorometano, sendo este último o que forneceu extractos mais representativos do aroma inicial da matriz (Soares da Costa *et. al*, 2004).

A grande desvantagem do método é o uso excessivo de solventes que acabam como resíduos, bem como o tempo dispensado nas sucessivas extracções.

Outro método usado refere-se à destilação, que depende directamente das características de volatilidade diferenciadas que encontramos nos diferentes componentes do vinho. Métodos, com base na destilação sobre corrente de vapor é utilizada correntemente em concentração de aromas (Augusto *et al.*, 2003).

A análise directa em espaço de cabeça ou “headspace”, é uma técnica que permite isolar directamente os aromas de um vinho. O maior problema da técnica reside no facto de existir concentrações muito baixas dos compostos aromáticos na zona de headspace, obrigando ao uso de colunas de adsorção ou de armadilhas criogénicas, que concentram e conservam os compostos do headspace a temperaturas abaixo do ponto de volatilização.

A técnica de SPME ou Solid Phase Micro-Extraction, permite a extracção directa a partir do headspace da amostra e permite capturar as moléculas voláteis a partir de uma fibra de sílica revestida de uma fase estacionária (adsorvente), sendo a quantidade de compostos adsorvidos proporcional a concentração da amostra, quando atingido um ponto de equilíbrio entre o headspace e a fibra. Posteriormente, os compostos são desorvidos no interior do injector do cromatografo de gás (Valente *et al.* 2000).

Em estudos específicos, em que tratamos de uma avaliação qualitativa e quantitativa de determinados analitos, tal como no exemplo dos tióis voláteis, é muito vantajoso utilizar técnicas de extracção selectiva. Foi neste âmbito que Bouchilloux *et al.* (1998) desenvolveram um sistema combinando destilação sobre vácuo e uma armadilha de tióis, através do recurso a uma reacção com ácido *p*-hidroxi-mercurobenzóico, que permitiu separar o perfil aromático tão característico dos vinhos de *Sauvignon Blanc* da região de Bordéus.

2.5.2.2. Análise instrumental.

Para analisar o perfil aromático de vinhos, temos de separar os diferentes constituintes do extracto obtido a partir da amostra,

A separação dos compostos pode ser efectuada usando a cromatografia em fase gasosa (GC). Os compostos ao passarem pela coluna do cromatógrafo são separados pois possuem características físicas distintas e afinidades diferentes em relação à fase estacionária da coluna. Após separação os compostos são analisados no detector que tem de ser apropriado ao tipo de analito estudado.

Dos sensores mais utilizados podemos falar do detector de inonização por chama (FID) que deve a sua popularidade ao facto de originar linhas de base muito estáveis, e ser pouco sensível às variações de fluxo na coluna que podem ocorrer quando se trabalha com perfis de temperaturas controladas (Corrêa, 1996)

Outro sistema de detecção, o FPD ou detector fotométrico de chama, destaca-se por ser selectivo, detectando apenas compostos que possuem átomos de enxofre. Este equipamento revela ser de grande interesse na análise de compostos como os tióis em matrizes complexas como o vinho

A cromatografia em fase gasosa quando acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), torna-se uma ferramenta muito poderosa na identificação de compostos. Após terem sido separados pela coluna do cromatógrafo, os compostos eluídos são ionizados, e a razão massa/carga (m/z) dos fragmentos é detectado no analisador que pode ser um “ion trap” ou um “quadrupole”.

Este sistema baseia-se no princípio de que as partículas carregadas electricamente, movendo-se num campo eléctrico ou magnético, podem ser separadas de acordo com a sua relação massa e carga (m/z) (Corrêa, 1996).

Os espectros de massa dos compostos do analito podem ser identificados graças a comparação com espectros compilados em bibliotecas de substâncias de referência.

A técnica de GC-MS torna-se particularmente eficiente para identificar moléculas que apresentam tempos de eluição muito próximos.

Em amostras complexas é necessário aplicar um padrão interno, cuja concentração na amostra é conhecido, de maneira a poder quantificar os outros compostos analisados (Fretz, 2005). Ao serem eluídos pela coluna e detectados pelo sensor, obtemos um cromatograma, que representa os compostos em picos ao longo do tempo. O tempo em que as substâncias são eluídas indica a natureza do composto, no entanto, podem obter-se tempos de eluição idênticos para compostos diferentes (IUPAC, 1997.) (Anexo 3)

O tempo de retenção relativo a um composto só é válido para uma dada configuração do cromatógrafo, de fase estacionária e de programação de temperatura do forno. Existe um índice que possibilita a uniformização dos tempos de retenção, graças à comparação e relação entre os tempos obtidos e os tempos observados para um conjunto de alcanos, com cadeias carbonadas lineares entre 8 e 20 carbonos (índice de Kováts). Os índices de Kováts, são geralmente muito semelhantes para fases estacionárias iguais, este índice possibilita a comparação de resultados entre laboratórios diferentes. (IUPAC, 1997.) (Anexo 3)

Para quantificar uma substância podemos, graças à integração dos picos obtidos no cromatograma e do pico do padrão interno cuja concentração é conhecida, obter o valor de concentração da substância, baseando-se numa curva de calibração que relacione a razão entre as duas áreas já referidas e a concentração do composto.

A cromatografia de gás pode ainda ser acoplada a instrumentos de olfactometria (GC-O ou GC-sniffing). É uma importante ferramenta para o estudo dos aromas, pois nesta técnica o detector utilizado após a eluição da amostra é o aparelho sensorial olfactivo humano, o nosso nariz. A técnica do sniffing permite detectar e diferenciar os compostos que afectam particularmente o aroma de um vinho (Abbot *et al.*, 1993).

A olfactometria é uma ferramenta poderosa para identificar novos compostos desconhecidos associados a aromas distintos no vinho.

Sendo o aparelho olfactivo humano muito sensível, esta técnica é muito eficaz na detecção de compostos que por vezes se encontram em concentrações abaixo das capacidades de detecção dos sensores electrónicos (Plutowska *et al.*, 2008).

Os maiores inconvenientes da técnica de GC-olfactometria, residem nos factores humanos a ela associada. Os factores fisiológicos e psíquicos dos intervenientes na olfactometria podem influenciar negativamente os resultados. O ambiente onde é conduzida a prova, como na análise sensorial convencional, é particularmente importante para a robustez dos resultados. A técnica é limitada também pelos factores de fadiga e de desconforto; é assumido que não se pode efectuar olfactometria por mais de 40 à 60 minutos (Darriet *et al.*, 1991).

Embora sejam normalmente utilizadas as técnicas de GC acoplada a diversos detectores (FID,FPD,MS) para quantificar os compostos numa amostra, é possível quantificar com a técnica de GC-O, sendo que os efeitos do factor humanos são particularmente evidentes neste caso.

Existem três classes de métodos para quantificação de compostos com base em medições olfactométricas:

- 1.Métodos baseados a quantificação da frequência de detecção do estímulo por painéis de provadores.
- 2.Métodos baseados na diluição da amostra, até obter o limiar de detecção do estímulo, estimando deste modo a concentração aproximada tendo em conta o limiar de detecção do composto estudado em vinho.
- 3.Métodos baseados na intensidade directa do estímulo durante a sessão de olfactometria.

Nos dois primeiros métodos, os avaliadores só registam a existência do estímulo olfactivo

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

o terceiro método destaca-se por exigir o registo da intensidade do estímulo e a duração do estímulo percebido. Este método permite a obtenção de olfactogramas semelhantes a cromatogramas obtidos com detectores electrónicos (Plutowska *et al.*,2008).

Bouchilloux *et al.*, (1996) demonstraram que existe uma boa correspondência entre a duração da percepção de zonas olfactométricas e os teores do composto determinados por métodos mais convencionais.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras de vinho.

Os vinhos estudados foram obtidos directamente dos produtores e podem separar-se em 3 grupos.

O primeiro grupo, corresponde aos vinhos do ano 2009 e foram obtidos no início do estudo, passando pela prova sensorial

O segundo grupo, são os vinhos vinificados em 2010, e entraram no estudo para serem analisados pela técnica de olfactometria, visto terem sido vinificados pensando em incrementar o perfil aromático ao nível dos tióis.

Foram ainda apresentado os resultados sobre pesquisas efectuadas com um vinho tinto, que apresentou características interessantes ao nível de um tiól varietal o 3MH, este resultados têm um valor de comparação e prova.

Os vinhos são os seguintes:

1º Grupo: Vinhos 2009:

- ★Vinho branco DOC Alentejo, 100% Antão Vaz.
- ★Vinho branco DOC Bucelas, 100% Arinto
- ★Vinho branco DOC Do Tejo, 100% Fernão Pires.
- ★Vinho branco DOC Do Tejo, 100% Sauvignon Blanc, como “padrão de comparação”
- ★Vinho branco Regional Península de Setúbal, 100% Verdelho da Madeira
- ★Vinho branco de Mesa, da Tapada da Ajuda em Lisboa, 100% Viosinho.

2º Grupo: Vinhos 2010

- ★Vinho branco DOC Do Tejo 100% Arinto
- ★Vinho Branco DOC Do Tejo 100% Fernão Pires

3º Grupo: Vinhos fora do estudo em curso, mas com interesse para a análise dos resultados:

- ★Vinho Tinto DOC Douro, colheita 2010 de vinhas velhas sem castas diferenciadas.

Todos os vinhos 2009 foram conservados num local fresco (15-20°C) ao longo do período do estudo (entre Março e Novembro 2010) nas respectivas garrafas de vidro rolhadas com rolha de cortiça natural. Após cada abertura, as garrafa foram conservadas não além

do próprio dia, e descartadas de seguida, para poder garantir que os vinhos se encontrava no máximo da sua genuinidade durante a manipulação e preparação das amostras.

Os vinhos 2010, foram transportados da adega ao laboratório no mesmo dia em que a se realizaram as análises.

3.2. Prova Sensorial

Os vinhos foram provados por um painel de 10 provadores treinados, na sala de prova sensorial do Instituto Superior Agronomia em Lisboa.

Os provadores foram convidados a provar os 6 vinhos estudados em conjunto, tendo sido apresentados numa ordem aleatória com a codificação seguinte:

Antão Vaz 2009: **113**

Arinto 2009: **118**

Sauvignon Blanc 2009: **191**

Verdelho 2009:**205**

Viosinho 2009:**209**.

Fernão Pires 2009: **605**

Os provadores preencheram uma ficha de prova (Anexo 1), em que tiveram de anotar as pontuações de 1 a 5 (em que 1 corresponde a inexistente, 2 Pouco intenso, 3 mediamente intenso, 4 Intenso e 5 muito intenso). No que diz respeito aos parâmetros de côr, aroma e gosto. Os parâmetros relativos a côr e ao gosto, são de pouco interesse para o âmbito deste trabalho, no entanto não foram retirados da ficha para não influenciar os provadores.

O parâmetro de interesse para este trabalho reside no aroma, e a ficha apresentou 8 subcategorias para o qualificar. A intensidade do aroma, a componente “Frutada”, “Floral”, de “Toranja”, “Maracujá”, “Urina de Gato” e Vegetal. Para acabar solicitava-se uma notação para o “Equilíbrio geral” do vinho.

No final da ficha ainda existia uma parte referente a “observações” para quem quisesse acrescentar mais algumas informações.

3.3. Preparação das amostras para análise em Cromatografia em fase gasosa.

A extração do vinho para análise dos compostos de enxofre, foi feita seguindo a metodologia de Moreira (2009), foram utilizadas 50 mL de amostra de vinho adicionados

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

de 50 µL de padrão interno e de 4g de sulfato de sódio anidro, em balões volumétricos de 100 mL, a cada amostra foi adicionado 5mL de diclorometano. As duas fases são agitadas magneticamente durante 5 minutos e decantada em ampolas de decantação, recolhendo apenas a fase orgânica. Esta operação é repetida duas vezes (2x 5 mL de diclorometano). As fases orgânica são recolhidas num frasco, e é lhes adicionado o sulfato de sódio anidro para remover os resíduos de agua ainda presentes na amostras. A fase orgânica é então concentrada 10 vezes com um fluxo de azoto (1-2mL/min). Injecta-se 2µL do concentrado no cromatógrafo.

Os padrões internos utilizados para a análise foram os seguintes:

GC-FID foi: 3-Octanol. (concentração da solução inicial : 445 mg/L)

Para o GC-FPD: acetato de metiltioetilo. (Concentração da solução inicial : 184 mg/L)

Para o GC-MS:3-Octanol (concentração da solução inicial : 445 mg/L)

3.4. Preparação das soluções de referência.

Os extractos das soluções de referência de 4MMP e de 3MH foram obtidos pelo mesmo método de extracção utilizado nos vinhos, a partir de uma 50 mL de uma solução aquosa dos padrões numa concentração de de 1 mg/L de composto:

Origem dos Padrões:

4MMP: Shijiazhuang Lida Chemical Co. Ltd., China.

3MH: Sigma Aldrich, Espanha.

A3MH: Síntese própria: Foi obtido a partir da esterificação do 3-mercaptohexanol com ácido acético puro e agitação magnética constante com aquecimento durante 24 h.

3.5. Análise por cromatografia em fase gasosa com detector fotométrico de chama. (GC-FPD)

Para a análise dos compostos de enxofre de alto peso molecular foi utilizado um Cromatografo de Gás de marca Hewlett-Packard 5890

equipado com um detector fotométrico de chama (FPD), tal como descrito por Moreira *et al.* (2004). A coluna utilizada foi uma coluna SGE BP21 (FFAP) de 50 m x 0,22 mm e com 0,25µm de espessura de fase. O programa de temperatura foi o seguinte:

Início a 40°C durante 10 minutos seguido de um aumento de 2°C por minuto até atingir 220°C que permanece à esta temperatura durante 40 min até perfazer os 130 minutos do programa. O injector é regulado em modo splitless com um caudal de 30mL/min a temperatura manteve-se a 250°C e a do detector manteve-se aos 220°C. O gás de araste utilizado foi hidrogénio com um caudal de 1 ~ 2 mL / min.

Os 2µL de extracto foram injectados automaticamente através de um injector automático, HP 6890 series injector.

3.6. Análise com Cromatografia em fase gasosa e detector de ionização por chama (GC-FID).

Um cromatógrafo de gás Hewlett-packard 5890 series II foi utilizado para esta determinação. A coluna utilizada foi uma BP20 (SGE) de 50 m x 0,22 mm com 0,25 µm de espessura de fase. O programa de temperatura utilizado foi o seguinte:

40°C durante 1 minuto, seguido de um aumento de 2 °C por minuto até atingir 220°C ficando a esta temperatura durante mais 30 minutos (120 minutos). A temperatura do injector manteve-se a 220°C.A injeção fez-se em modo splitless. O gás de transferencia utilizado foi Hidrogénio com um caudal de 1 ~ 2 mL / min.

Foram injectados 2 µL de extracto para cada amostra de vinho e de solução padrão.

3.7. Análise com Cromatografia em fase gasosa e Espectrometria de massa (GC-MS).

As amostras foram submetida a análise num cromatógrafo de gás Varian CP-3800, equipado de uma coluna Stabilwax de 60 m x 25mm e 0,25 µm de espessura de fase, com um detector "Ion trap". As configurações utilizadas são idênticas às descritas por Moreira (2009) e Ferreira *et al.* (2003)

Foram injectados apenas 1µL de cada extracto no sistema.

3.8. Análise com Cromatografia em fase gasosa e Olfactometria (GC-O).

Injectou-se 2µL do extracto orgânico obtido a partir de cada vinho com uma micro-seringa graduada em modo Splitless, num cromatógrafo de gás equipado com uma coluna SGE

BP 20 (WAX). A configuração térmica do cromatógrafo foi a mesma do que a utilizada no GC-FID descrito neste trabalho.

O equipamento olfactométrico utilizado, e descrito na figura, foi o ODO1 da Scientific Glass Engineerings (Australia) é semelhante ao descrito por Darriet *et al.*,(2001); Lavigne *et. al.* (1991); Falcão *et al.*, (2008).

O sniffer é suplementado por uma corrente de ar humidificada a pressão de 100 kPa para evitar a desidratação do nariz do analista.

As sessões de olfactometria não foram efectuadas em sincronia com as do GC-FID, embora tenha sido possível o fazer. Verificou-se num 1º ensaio que ao fazer uma repartição do efluente da coluna em partes iguais, para o detector FID e para o “sniffer”, as intensidade aromáticos detectadas durante a sessão olfactométrica eram muito ténues e difíceis de perceber, dificultando o registo. Assim, decidiu-se efectuar a injeção da amostra para o GC-FID e GC-O em separado.

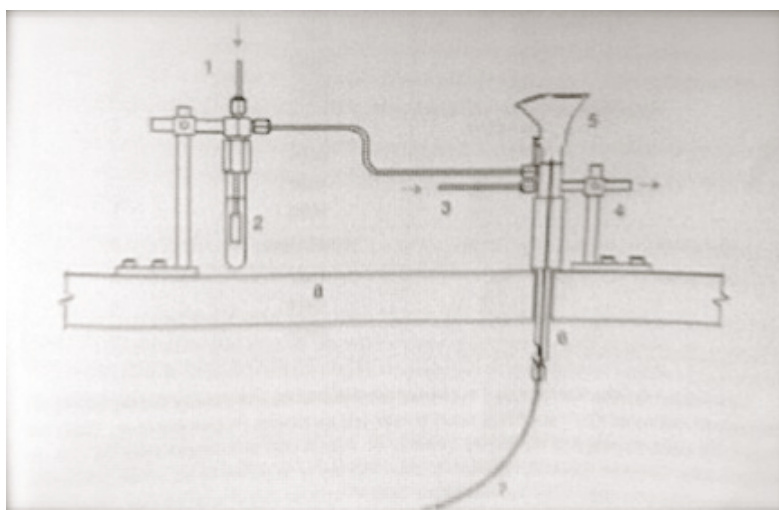


Figura 7. Configuração do equipamento olfactométrico semelhante ao utilizado. (Extraído de Darriet *et al.* 1991):

- 1- Alimentação do gás. 2- humidificador (água destilada) .3-Alimentação do gás de transferência do efluente .4-Saída do ar quente proveniente do cromatógrafo. 5-Cone nasal. 6- tubo de passagem da coluna. 7- coluna capilar.
- 8- Parede do forno do Cromatógrafo.

À medida que a eluição da amostra ia decorrendo, foram-se anotando os tempos de retenção de cada “zona olfactiva” apreciada, com um crónometro de bolso, obtendo se assim um olfactograma. Cada zona olfactiva foi caracterizada por uma descriptor, e quantificada em dois aspectos: Intensidade e clareza do aroma e período de persistência, anotando consoante estas duas variáveis numa escala de 1 a 3: Sendo **1** a intensidade correspondente a um estímulo muito fraco, **2** a intensidade correspondente a um estímulo patente e **3** a intensidade correspondente a um estímulo muito marcado e duradouro.

3.9. Calibrações efectuadas

Para a determinação das concentrações dos tióis estudados neste trabalho foi necessário efectuar a calibração do sistema GC-FPD.

A calibração consistiu na injeção no cromatógrafo de gás com detector fotométrico de chama (FPD) de soluções dos compostos de referência em 6 concentrações preestabelecidas, em matriz de vinho branco (Sauvignon Blanc 2009 - 191).

A análise dos dados recolhidos, com base na integração dos picos obtidos para cada um dos compostos estudados permitiu a obtenção de curva de calibração que relaciona a razão entre área do pico do composto e a área do Padrão interno com a concentração do composto estudado. (Figura. 17)

Para o cálculo das concentrações dos outros compostos não tióis varietais, apresentados no trabalho, as curvas de calibração para cada composto, e baseadas na utilização do GC-FID foram obtidas a partir da base de dados fornecida pela Dra. N. Moreira, da Escola Superior de Biotecnologia do Porto, da Universidade Católica Portuguesa.

3.10. Análises estatísticas.

Os dados relativos à análise sensorial e análises semi-quantitativas foram recolhidos e tratados em folhas de cálculo no software Numbers da apple. As médias foram tratadas com o software SPSS 19 for MAC da IBM, em análises de variância (ANOVA) com o teste de separação de Tuckey para um $p < 0.05$.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados da prova sensorial, e da análise dos compostos aromáticos dos vinhos (Excepto os tióis).

As médias e respectivos desvios padrão das pontuações obtidas em cada vinho durante a prova sensorial estão apresentados no quadro seguinte (Quadro 4):

Quadro 4. Análise sensorial da componente aromática dos vinhos em estudo. Valores médios obtidos e desvio padrão.

Modalidade Aroma	Antão Vaz		Arinto		Fernão Pires		Sauvignon Blanc		Verdelho		Viosinho	
	média	s	média	s	média	s	média	s	média	s	média	s
frutado	1,0	0,8	3,2	0,6	3,4	1,3	2,7	0,9	2,9	0,7	2,5	0,7
floral	2,0	0,8	2,5	1,1	2,8	1,0	2,4	1,2	2,2	1,2	2,4	1,2
toranja	3,2	1,5	2,5	0,5	2,5	1,1	2,4	1,2	2,4	1,1	1,7	0,9
maracujá	2,6	1,0	2,9	1,0	2,4	1,2	1,9	1,1	2,6	1,1	1,6	0,8
x. de gato	2,5	1,1	1,7	0,7	1,4	0,5	2,1	1,0	1,4	0,7	2,2	1,8
vegetal	2,1	1,0	1,7	0,7	1,7	1,1	2,2	1,1	1,6	0,8	2,0	1,1

Legenda:

A pontuação máxima observada em cada modalidade de aroma está a negrito

A pontuação máxima observada em cada vinho está em itálico.

Pela análise das médias das notações obtidas podemos verificar que os vinhos provados não se destacam muito claramente entre eles.

Uma análise estatística mais aprofundada, mostrou que não existem diferenças significativas entre os vinhos nas modalidades destacadas. Os vinhos enquadram-se em grupos homogéneos, exceptuando uma única situação: na modalidade de "Toranja" entre o Viosinho e o Antão vaz para $p < 0.05$. (Figura 8.)

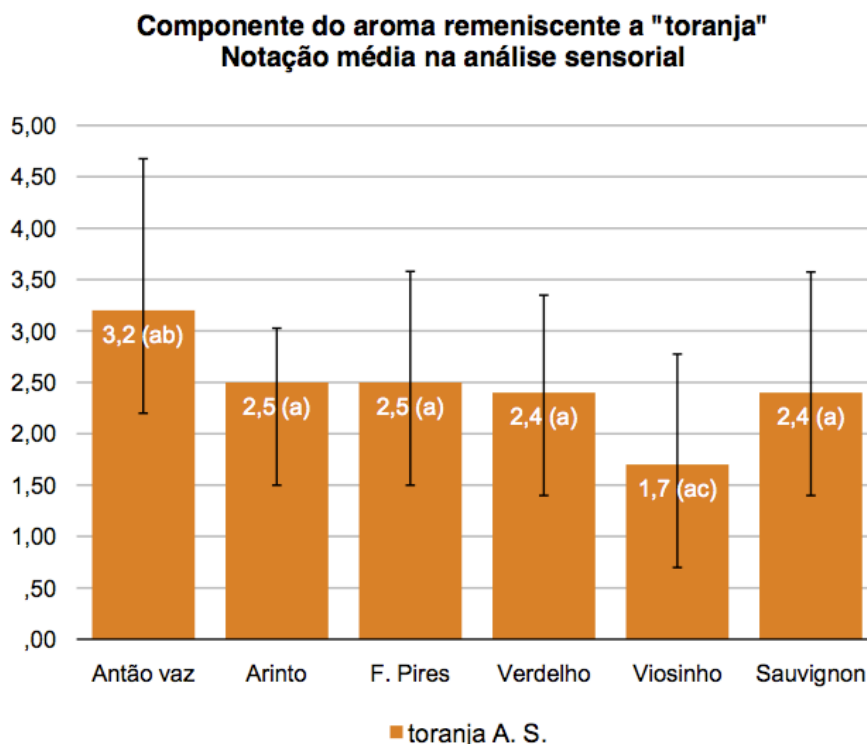


Figura 8. Análise da componente aromática de toranja nos vinhos: Os valores associados a letras iguais não são significativamente diferentes (Análise da variância, com utilização do teste separação de tuckey com valor de $p < 0.05$)

Esta homogeneidade entre os vinhos era de esperar pois os vinhos foram escolhidos de maneira a apresentar perfis aromáticos semelhantes com uma componente “tiolada” vincada. No entanto o painel de provadores pela sua heterogenidade deu origem a resultados cujo variabilidade é muito elevada, o valor elevado dos desvios padrão é testemunha deste facto.

A própria configuração da prova foi propensa a este tipo de resultado, pois a semelhança existente entre vinhos (escolhidos por apresentar aromas de tiós) ficou patente no resultado final.

No entanto, pela observação das médias presentes na tabela de resultados somos capazes de observar algumas tendências de interesse que possam diferenciar os vinhos, nomeadamente sob 3 aspectos:

1. Em cada vinho fomos capazes de observar um descritor que obteve nota máxima (valores em *itálico* no Quadro 4), esta pontuação fornece uma ideia da tipologia aromática de cada vinho. Todos os vinhos obtiveram a maior nota na componente frutada, menos o vinho de Antão Vaz, que obteve a maior nota na componente tropical.

2. A maior nota de cada componente aromática observado na totalidade dos vinhos foi também isolada (Valores em negrito no Quadro 4). Esta nota indica o vinho que se destacou mais para uma dada nota aromática: o Fernão Pires teve nota máxima para o Frutado e Floral, o Antão Vaz para a Toranja e urina de Gato, o Arinto para o Maracujá e por fim o Sauvignon Blanc para a nota vegetal.

3. Da leitura destas tendências na sua generalidade: observamos que o vinho com o carácter mais tiolado (com mais consistência nas pontuações dos descritores geralmente associados a tióis: toranja, urina de gato, maracujá, vegetal) foi o Antão Vaz. A casta que se destacou num perfil aromático mais floral e frutado foi a casta Fernão Pires, embora tenha apresentado valores médios de notação consideráveis para os descritores relativos a toranja e maracujá. A casta Sauvignon Blanc, demonstrou curiosamente pontuações muito equilibradas em todas as componentes, mas destacando-se ligeiramente na componente vegetal, tipicamente associada a esta casta.

A casta Verdelho, não demonstrou uma dominância nos aromas com notas vegetais (vegetal, buxo - urina de gato), neste estudo mostrou um carácter mais frutado e tropical (maracujá e toranja).

Por fim a casta Viosinho destacou-se por demonstrar o menor carácter tropical, tendo tido pontuações menores para os aromas de toranja e maracujá, nas outras componentes demonstrou-se mais pontuação nos aromas florais e frutados.

Os extractos orgânicos dos vinhos estudados de 2009, foram analisados por GC-FID, para obter a concentração dos compostos mais importantes dos vinhos estudados. (Quadro 5)

Comparando as concentrações de cada composto nos vinhos, calculamos o "OAV" (odour activity value) em concordância com valores de limiar de percepção encontradas em diversas publicações.

Comparando as tendências observadas na prova sensorial já apresentada, reparamos que a análise instrumental confirma algumas observações.

Nos dados da tabela deverá ler-se tendências com a expressão na prova da análise sensorial, nomeadamente nas notações para os descritores de Frutado e Floral.

O facto do vinho de Casta Fernão Pires ter apresentado valores superiores ao nível dos descritores Floral, está patente na análise pois apresenta uma concentração de linalol 5

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

vezes acima do limiar de percepção olfactiva e valores de geraniol bem superior a todos os outros vinhos em estudo.

As diferenças obtidas na análise sensorial ao nível do descritor “frutado” podem ser devido a diferentes combinações de compostos acima do limiar de percepção detectados nos diferentes vinhos. O efeito de matriz, efeitos de antagonismo e sinergias têm um papel preponderante no resultado final do “bouquet” de um vinho, razão pela qual não se consegue ver um padrão muito coerente entre os valores obtidos na análise instrumental e a análise sensorial.

Quadro 5. Compostos detectados e quantificados com os dados obtidos com a Cromatografia GC-FID, os valores a negrito correspondem a OAV > 1 (média aritmética para 2 réplicas)

Compostos (mg/L)	Limiar de percepção olfactiva mg/L	Fernão Pires		Antão Vaz		Viosinho		Verdelho		Sauvignon		Arinto							
		média	s	média	s	média	s	média	s	média	s	média	s						
Alcoóis superiores																			
2-Feniletanol	10 (Guth, 1997)	12,4	0,1	1,2	17,2	0,1	1,7	36,2	1,9	3,6	20,0	0,8	2,0	12,4	0,2	1,2	19,5	0,4	1,9
Aldéidos																			
Acetaldeído	0,5 (Guth, 1997)	211,0	7,3	422,1	144,6	6,2	289,3	62,8	14,3	125,6	37,4	9,5	74,8	94,2	36,7	188,4	65,8	13,9	131,7
Acetatos dos Alcoóis superiores																			
Acetato de isoamilo	0,030 (Guth, 1997)	6,6	0,7	221,4	3,3	0,6	109,0	0,3	0,0	10,1	3,1	0,2	101,8	3,3	0,1	110,9	2,9	0,1	98,1
Acetate de hexilo	n.i.	0,7	0,0	ni	0,2	0,0	ni	0,0	0,0	ni	0,2	0,0	ni	0,3	0,0	ni	0,2	0,0	ni
Acetato de 2-feniletilo	0,25 (Guth, 1997)	0,3	0,0	1,1	0,2	0,0	0,9	0,1	0,0	0,3	0,2	0,0	1,0	0,2	0,0	0,6	0,2	0,0	1,0
Esteres etílicos de ácidos gordos																			
Butirato de etilo	0,02 (Ferreira et al., 2000)	0,6	0,1	29,4	0,6	0,1	32,2	0,5	0,1	27,3	0,7	0,2	35,0	0,5	0,2	24,3	0,5	0,1	24,0
Hexanoato de etilo	0,014(Ferreira et al. 2000)	1,8	0,1	126,6	1,9	0,3	134,8	0,7	0,0	52,6	1,5	0,0	107,1	1,3	0,1	89,3	1,6	0,0	114,5
Octanoato de etilo	0,005 (Ferreira et al. 2000)	2,5	0,0	495,7	2,3	0,3	459,5	0,8	0,0	151,6	2,1	0,0	419,2	1,9	0,1	379,3	2,6	0,0	522,2
Decanoato de etilo	0,2 (Ferreira et al. 2000)	0,6	0,1	2,9	0,5	0,1	2,5	0,3	0,0	1,5	0,6	0,0	2,8	0,6	0,0	2,8	0,9	0,0	4,3
Acetato de etilo	20(Guth, 1997)	54,1	6,7	2,7	76,3	3,2	3,8	46,6	7,1	2,3	52,9	2,2	2,6	34,3	23,7	1,7	49,0	2,3	2,5
Succinato de dietilo	200(Tominaga et al., 1998)	0,63	0,02	0,00	1,03	0,21	0,01	3,88	0,70	0,02	2,27	0,07	0,01	0,58	1,01	0,00	1,01	0,04	0,01
Ácidos Gordos																			
acido isobutírico	0,23 (Ferreira et al. 2000)	1,9	0,3	8,1	2,0	0,7	8,5	10,3	1,4	44,9	1,6	0,2	6,9	0,0	0,0	0,0	2,8	0,4	12,0
acido butírico	0,173 (Ferreira et al. 2000)	6,1	0,4	35,1	3,6	1,3	20,8	4,8	0,1	27,8	5,5	0,5	32,1	4,3	0,4	24,8	4,6	0,4	26,6
acido hexanoico	0,42 (Ferreira et al. 2000)	27,5	0,7	65,5	23,5	5,1	55,9	10,2	0,4	0,2	22,6	0,8	53,8	17,0	0,6	40,5	23,0	1,1	54,8
acido octanoico	0,5 (Ferreira et al. 2000)	57,5	3,1	115,0	51,2	2,6	102,5	15,0	0,3	29,9	45,5	0,2	90,9	40,6	0,9	81,2	54,9	1,1	109,7
acido decanoico	1 (Ferreira et al. 2000)	18,3	2,4	18,3	14,7	0,8	14,7	7,5	0,3	7,5	16,7	0,5	16,7	16,1	1,5	16,1	24,3	0,4	24,3
Terpenos																			
linalol	0,025 (Ferreira et al. 2000)	0,143	0,019	5,708	0,004	0,004	0,149	0,004	0,001	0,177	0,001	0,003	0,037	0,026	0,004	1,035	0,019	0,004	0,749
geraniol	n.i.	111,5	14,8	ni	0,9	0,0	ni	8,6	1,3	ni	12,6	0,5	ni	35,1	13,6	ni	14,8	0,9	ni

4.3. Pesquisa da 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, do Acetato de 3-mercaptohexilo do 3-mercaptohexanol nos vinhos estudados.

4.3.1. Estudo das soluções de referência de 4MMP, A3MH e 3MH.

A primeira etapa da determinação, consistiu na injeção de extratos orgânicos (c/ diclorometano) obtidos de padrões dos compostos 3-mercaptohexanol, Acetato de 3-mercaptohexilo e 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona no GC-FID.

Conseguiu-se confirmar o tempo necessário para a eluição dos compostos em estudo. (cromatogramas nas Figuras: 10 e 11)

4.3.1.1. Estudo das soluções de referência com os sistemas de GC-olfactometria e GC-FID.

Os extractos de composto concentrado (soluções referências) foram analisados com a técnica de olfactometria. Nesta determinação, os tempos de retenção das zonas olfactivas “urina de gato/buxo”, buxo/maracujá, “maracujá/suor” nos vinhos corresponderam sensivelmente aos mesmos tempos em que conseguimos identificar os picos cromatográficos no GC-FID.

As diferenças de tempo de retenção entre os picos observados e o tempo de eluição dos compostos aromáticos descritos na olfactometria devem-se provavelmente a diferença de comprimento da coluna que existe entre a configuração do porto de olfactometria e do detector FID. Exceptuando o caso da 4MMP em que os tempos de retenção foram quase coincidentes, existe uma diferença de cerca de 2 minutos entre a detecção do composto pelo FID e a eluição do composto aromático no sistema de olfactometria tanto no 3MH como no A3MH.

Descrevemos de seguida os dados relativos a cada um dos padrões:

- Figura 9, 4MMP: No FID o tempo de retenção é de: 21'40" embora tenha aparecido um pico aos 13'10", este revelou-se ser uma impureza da solução padrão pois não se detectou nada na olfactometria, ao mesmo tempo de retenção. A olfactometria da solução de referência houve percepção de um forte aroma a “urina de gato” a partir do 21'25" descritor utilizado por Tominaga *et al.* (2000).

- Figura 10, A3MH: No FID o tempo de retenção a saída do composto foi de 40'42" no FID e a percepção do um aroma do padrão, com nota de “maracujá” deu-se entre 41' 40"

e 42'30". Detectamos na olfactometria aos 49'30" a nota característica de suor do 3MH e no cromatograma em modo FID um pequeno pico aos 47' 26", que deve ser referente ao 3MH, utilizado na reacção de esterificação.

•Figura 11, 3MH: No FID o tempo de retenção a saída do pico foi 47'26" - Na olfactometria do padrão do composto, houve percepção do aroma a "suor" forte a partir dos 49' 30" até 50'15". Nesta solução padrão detectou-se a presença de um pequeno pico aos 40'46" no cromatograma, provavelmente devido a acetilação do 3MH em acetato de 3-mercaptohexilo na solução. Durante a olfactometria detectou um ligeiro aroma a buxo ao tempo de retenção aproximado de 42' confirmando a natureza do composto em questão.

Todos as soluções de referências foram identificadas olfactometricamente com a correspondência dos descritores encontrados na bibliografia: Tominaga *et al.* (2000), Tominaga *et al.* (1996) e Darriet *et al.* (1991).

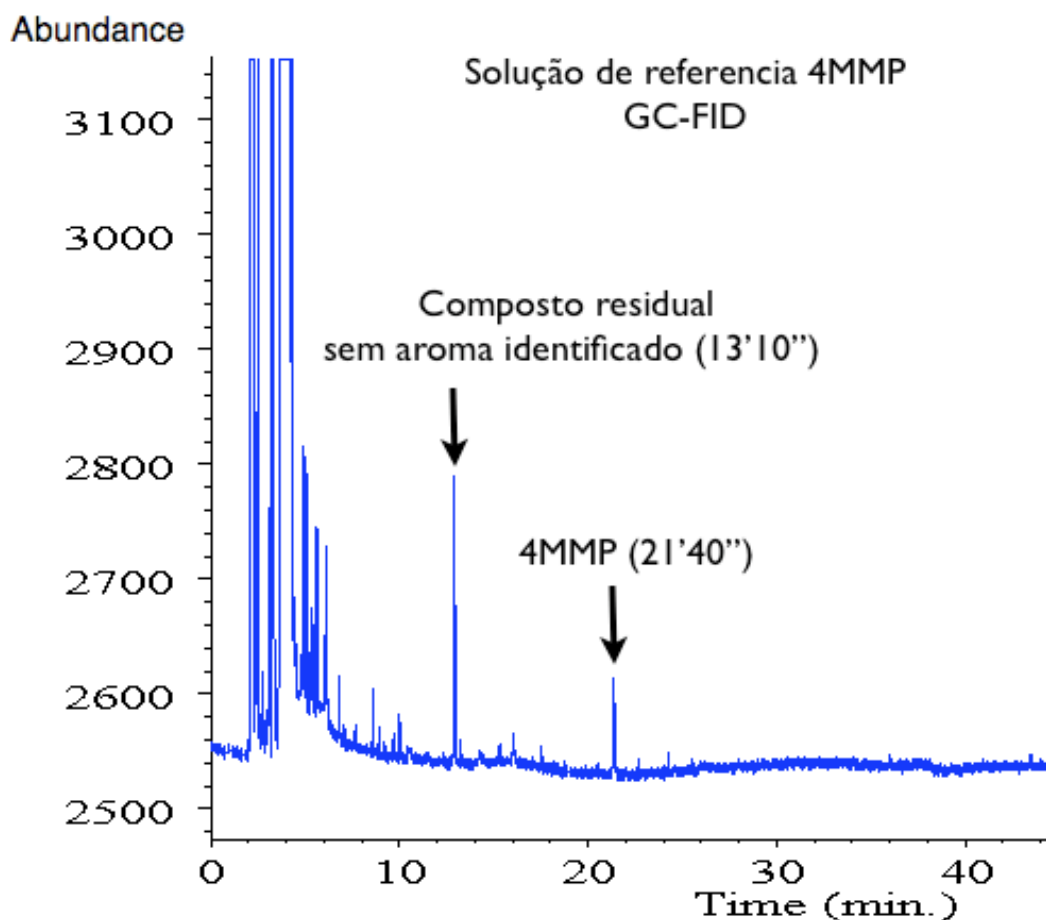


Figura 9. Cromatograma em GC-FID do extracto orgânico (DCM) da solução de referência da 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona.

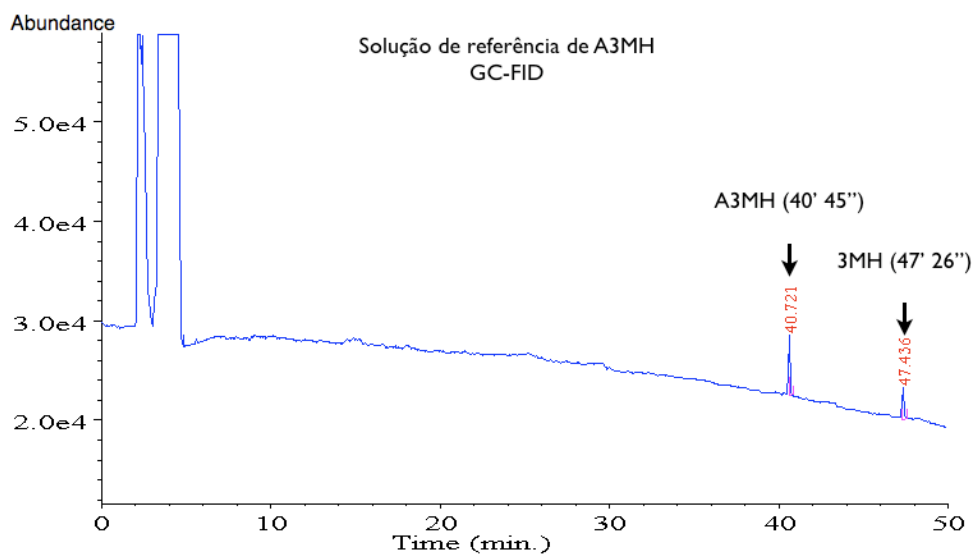


Figura 10. Cromatograma em GC-FID do extracto orgânico (DCM) da solução de referência do Acetato de 3-mercaptohexilo,

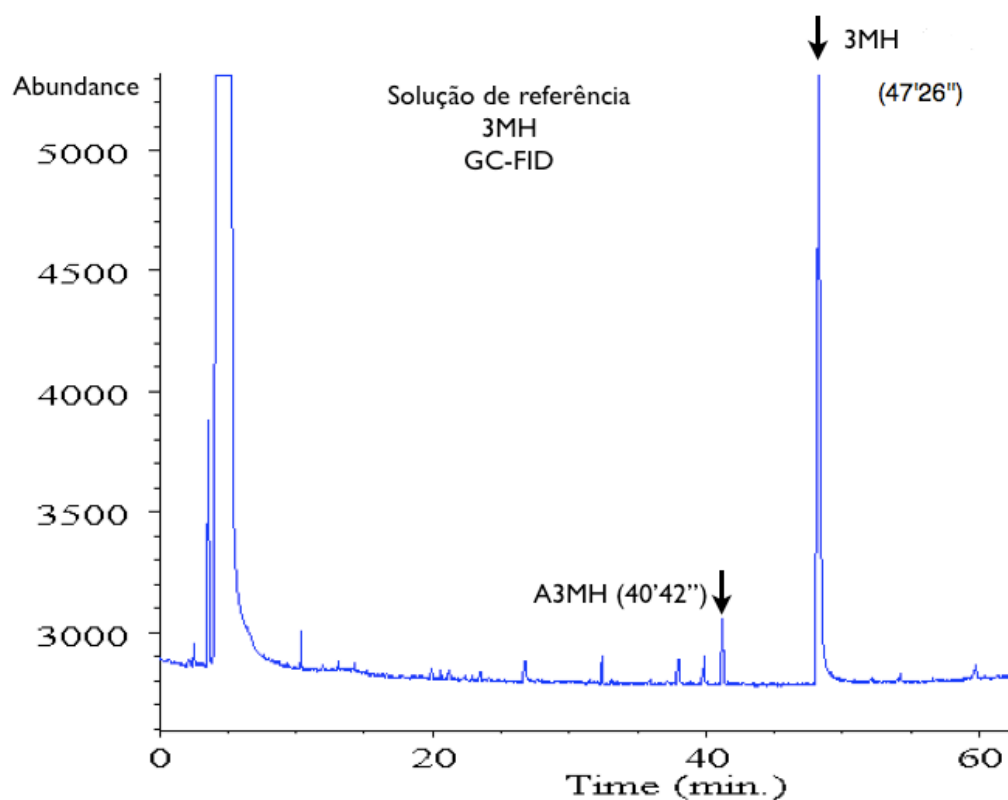


Figura 11. Cromatograma em GC-FID do extracto orgânico (DCM) da solução de referência de 3-mercaptohexanol

4.3.1.2 Estudo das Soluções de referência com a técnica de GC-FPD

Os extractos orgânicos das soluções de referência foram injectados no sistema GC-FPD, apurando-se os tempos de retenção para as condições de coluna e de detecção já referidas no capítulo anterior.

Só a solução de A3MH + 3MH deu origem a picos cromatográficos. (Figura 11)

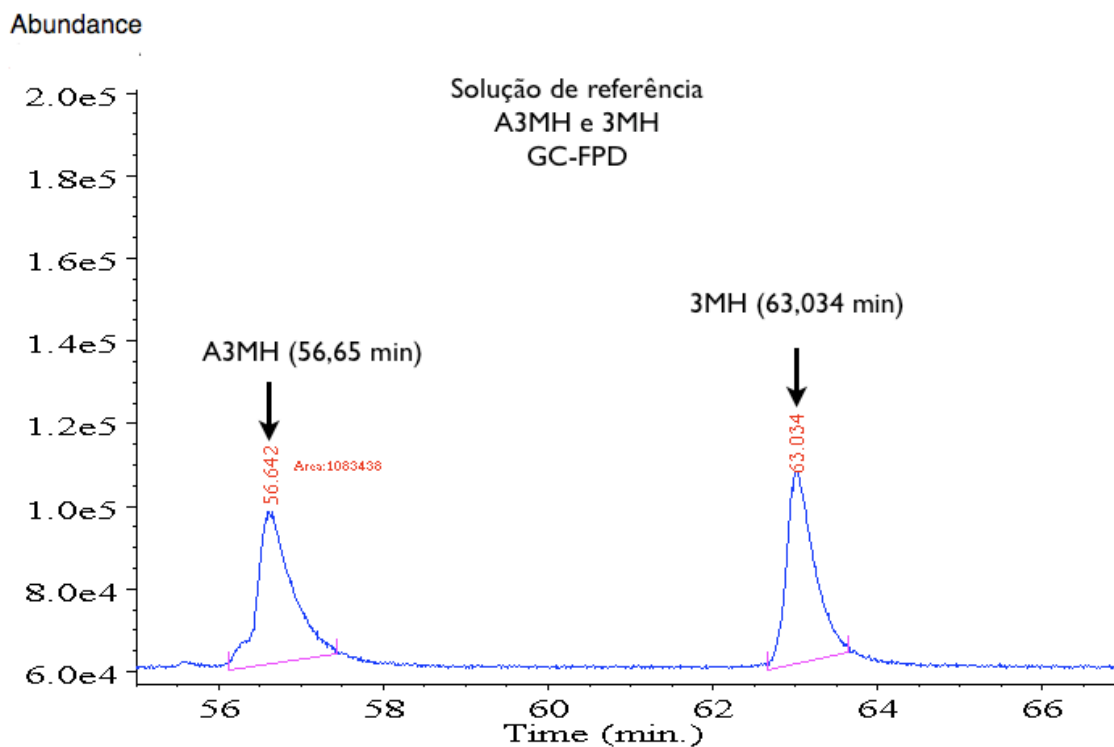


Figura 12. Cromatograma obtido a partir da solução de referência do Acetato de 3-mercaptohexilo e do 3-mercaptohexanol. com sensor de detecção de chama fotométrica (GC-FPD)

Nesta configuração cromatográfica, os compostos foram eluídos ligeiramente mais tarde do que na configuração do GC-Detector de ionização por chama (FID). Os tempos de retenção apurados para a coluna BP21 (FFAP) com o detector fotométrico de chama foram os seguintes:

- 4MMP: não se conseguiu apurar.
- A3MH :56 minutos e 39 segundos.
- 3MH: 63 minutos e 2 segundos.

4.3.1.3 Estudo das Soluções de referência com a técnica Cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massa.

Com esta técnica, só se injectaram no cromatografo de gás os padrões relativos a 3-mercaptohexanol e 4-mercapto-4-metilo-pentan-2-ona. Devido ao facto da solução de acetato de 3-mercaptohexilo não estar ainda sintetizada no momento da análise.

Os tempos de retenção apurados para estes dois compostos nas condições já expostas nos materiais e métodos são as seguintes:

4MMP: confirmou-se a presença de um pico de 4MMP após análise do espectro de massa com a biblioteca *NIST 05* presente no software do GC-MS aos 27,2 minutos, confirmando se a presença dos iões característicos, com as seguintes massas: 45,55,75 e 132 m/z.

3MH: A eluição do 3MH foi confirmada aos 54,0 minutos confirmando-se a presença dos iões com as massas 82, 100, 134 m/z

4.3.2 Estudo dos extractos orgânicos de aromas dos vinhos.

4.3.2.1 Estudo dos extractos de aromas dos vinhos com GC-O

Os vinhos em estudo foram analisados com o sistema GC-olfactometria e apurou-se 13 zonas olfactométricas comuns a todos os vinhos de 2009 e ainda se conseguiu apurar mais uma zona nos vinhos novos de 2010. (Quadro 6.).

Os aromas relativos as zonas olfactométricas 3 e 14 do Quadro 6. foram respectivamente identificados por comparação dos olfactogramas das soluções padrões como sendo relativos a 4-metil-mercaptopentan-2-ona e ao 3-mercaptohexanol respectivamente.

Os índices de Kováts calculado por Darriet *et. al.* (1991), na 1ª zona olfactiva relativa ao aroma varietal da um vinho de casta Sauvignon Blanc, corresponde à zona que foi detectada nos vinhos estudados neste trabalho para a posição do 4MMP. Já a segunda zona olfactiva apresentada por este autor, não corresponde (índice de retenção) a 2ª zona por nós apresentada (3MH) por corresponder provavelmente ao acetato de 3-mercaptohexilo (A3MH), que não foi detectada nos vinhos 2009, mas identificado olfactometricamente nos vinhos de 2010 de Arinto e Fernão Pires (vinhos novos acabados de fermentar).

Quadro 6. Principais estímulos detectados durante a ofactometria dos 7 Vinhos estudados

nº do estímulo	Tempo de retenção	Índice de Kovats calculado	Índice de Kovats *	descriptor	Sauvignon Blanc	Anão vaz	Arinto	Fernão Pires	Verdelho	Viosinho	Fernão Pires de 2010	Arinto de 2010	compostos prováveis
1	12'10"	1210	n.i	chulé	1	1	1	1	1	2	1	2	n.i.
2	13'30"	1223	n.i	frutado	1	1	1	1	1	1	1	2	n.i.
3	21'25"	1398	1394 (a)	xixi de gato/Buxo	3	1	1	1	2	1	2	1	4MMP
4	23'-23'30"	1424	1400 (b)	palha/coco/seco	1	1	0	1	1	1	0	1	PI: 3-octanol
5	25'30"	1465	1449 (a)	Vinagre	1	2	2	2	1	2	1	2	Ac. Acético
6	27'40"	1502	n.i	Borracha/Alho	1	2	1	2	1	1	2	1	n.i.
7	29'05"	1525	n.i	Coentros	1	2	2	2	3	3	2	3	n.i.
8	36'10"	1545	n.i	palha/erva seca	1	1	1	1	1	2	0	1	n.i.
9	36'30"	1649	1644 (a)	queijo	2	2	2	2	2	3	1	2	Ac. Butírico
10	39'00"	1691	n.i	Crisântemo	1	2	1	2	1	1	3	3	n.i.
11	41'10"	1728	n.i	couve/vegetal	2	0	0	1	0	1	0	0	n.i.
12	41'50"-42'30"	1741	1735 (a)	Buxo/marcuja	0	0	0	0	0	0	1	2	A3MH
13	47'30"	1842	1822 (c)	Rosa / mel	2	2	2	2	2	3	2	2	APE
14	49'30"-50'15"	1883	1872 (d)	Suor/marcuja	3	3	2	2	2	3	3	3	3MH
15	53'30"	1959	1965 (b)	floral / Rosa	2	2	2	2	0	3	2	2	PE

* Base de dado Pherobase:
 * (a)- Ferreira et al., 2001
 * (b)- Yung et al., 1993
 * (c)- Schermann et al., 1997
 * (d)- Cullere et al., 2004

LEGENDA:
 0 - não detectado
 1- Fraca Intensidade
 2- Intensidade média
 3- Intenso

Os Valores a **negrito** são as notações atribuídas as zonas olfatométricas relativas aos tíos voláteis.

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

Este composto foi detectado a um índice de retenção de Kovats muito próximo do valor apresentado por Darriet *et al.* (1991) na segunda zona olfactiva referida na publicação que revelou a primeira vez a posição dos 2 principais compostos varietais da casta Sauvignon Blanc. (1718 no caso do trabalho de Darriet *et al.* (1991) contra 1743 no caso dos vinhos de 2010 deste trabalho).

Outras comparações de índices de retenção de Kováts, calculados mais recentemente em diversas colunas são apresentados no Quadro 7.

Quadro 7: diferentes tempos de retenção relativamente aos tióis voláteis estudados, tendo em conta as colunas semelhantes de marcas distintas.

Composto	FFAP (a)	DBWAX (b)	BP20 (c)
4MMP	1382	1394	1398
A3MH	1727	1735	1743
3MH	1853	1872	1885

(a) Vermeulen *et al.* 2003

(b) V.Ferreira *et al.* 2001/ Cullere *et al.* 2004

(c) O presente trabalho, na olfactometria.

Um valor de prova, que conforta a identificação do 3MH foi encontrada no trabalho de Fretz (2005) em que na casta suíça Petite Arvine, o composto foi identificado claramente por olfactometria entre os tempos de eluição do acetato de 2-feniletilo (APE) e o 2-feniletanol (PE). Os descritores floral / rosa e Floral / Mel estão geralmente respectivamente associado a estes dois compostos e foram encontrados em todos os vinhos antes e depois da zona olfactométrica 14 que corresponde segundo os dados obtidos ao 3MH. O índice de retenção de Kováts deste álcool e do seu éster, calculados com os dados da olfactometria, correspondem sensivelmente aos índices calculados em outros trabalhos (Ferreira *et al.* 2001; Vermeulen *et al.* 2003).

Analisando os resultados das notações olfactométricas, as duas zonas aromáticas correspondentes ao 3MH e a 4MMP, estão presentes, com intensidade aromática diferentes, em todos os vinhos (Quadro 6.).

De facto para os Vinhos de Sauvignon Blanc, Viosinho e Antão Vaz, foi sentido uma grande intensidade aromática ao nível da zona olfactométrica relativa ao 3MH. Para estes

4 vinhos, esta zona corresponde a um aroma chave que superou a intensidade de todas as outras zonas olfactivas.

Esta zona nos vinhos referidos cronometrou-se, uma persistência muito elevada:

1. Sauvignon Blanc: 1'45"
2. Viosinho: 1'30"
3. Antão Vaz: 1'

Para as Castas Sauvignon Blanc e Verdelho, ressentiu-se alguma intensidade ao nível da zona da 4MMP. Nestes dois vinhos a intensidade foi tal que o aroma descreveu-se como “urina de gato”, prolongando-se 30 e 20 segundos respectivamente, valor significativamente mais alto do que nos outros vinhos em que a sensação foi de curta duração, nunca além de 5 segundos. (Quadro 6.)

Comparando os resultados obtidos na análise sensorial com os da olfactometria notamos alguns padrões comuns interessantes.

A casta Antão Vaz, recebeu notas elevadas ao nível dos descritores tropicais como toranja e maracujá, destacou-se também na olfactometria ao nível da zona do 3MH igualmente. Esta tendência pode ser uma indicação que este vinho possui concentrações deste composto acima do limiar de percepção olfactivo.

O Viosinho não obteve notas elevadas na prova sensorial ao nível do carácter tropical (“Toranja” e “Maracujá”), devido provavelmente a antagonismos, como se pode reparar no quadro da olfactometria, este vinho apresenta outras zonas olfactométricas com pontuação máxima, nomeadamente ao nível do ácido butírico, do acetato de 2-feniletano e do 2-feniletanol.

As castas Sauvignon Blanc e Verdelho, que apresentaram maior intensidade ao nível olfactométrico na zona da 4MMP, não obtiveram notas de destaque ao nível do descritor “urina de gato”, mas o Sauvignon Blanc teve pontuação máxima no descritor “Vegetal”. Este facto pode ter sido ocasionado pela escolha do descritor que pode ter confundido os provadores pouco habituados a esta terminologia. No entanto o 4MMP pode ser associada a nota de “Buxo” que pode de facto ser considerada “Vegetal”. (Tominaga *et al.* 2000)

A zona olfactométrica correspondente ao A3MH (nº13 do Quadro 8) foi claramente identificada nos vinhos novos, mas nunca nos vinhos do ano 2009. Os vinhos 2010 demonstraram em ambos os casos as 3 zonas olfactométricas de uma maneira vincada, sobretudo no caso do Arinto, que apresentou nas zonas correspondentes ao 3MH e ao A3MH uma grande intensidade sensorial. (Quadro 6.)

A existência de A3MH nestes vinhos está relacionado provavelmente com os factores de vinificação, nomeadamente.

- As temperaturas ao longo da fermentação foram controlados para permitir o máximo rendimento na conversão do precursores de aroma S conjugados em tióis, efectuando os primeiros dias a temperaturas relativamente altas na ordem dos 18-20°C, a 2ª fase da fermentação destacou-se pela descida das temperaturas de maneira a facilitar tanto a esterificação do 3MH já formado como a conservação dos compostos aromáticos já existentes no vinho, tal como aconselhado pelo ITV (2005).

- A utilização de estirpes de leveduras seleccionadas para a obtenção de tióis, também pode ter jogado a favor da maior acumulação dos três tióis. O uso de um co-adjuvante rico em glutathione no final da fermentação, pode ter também contribuído para a conservação dos aromas com base nos tióis daqueles vinhos, tal como defendido por Murat *et al.* (2005).

- A protecção contra as oxidações devido a presença de CO₂ residual nos vinhos estudados, são factores que podem também ter influenciado a conservação dos tióis detectados com a olfactometria.

Os resultados analíticos diferentes obtidos para os vinhos de mesma casta vinificados em 2009 e 2010 podem assim ser explicados.

4.3.2.2 Estudo dos extractos orgânicos dos aromas dos vinhos com recurso a Cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massa (GC-MS).

Os resultados obtidos das análises efectuadas por GC-MS não foram satisfatórias não se tendo encontrado os picos relativos aos três tióis estudados neste trabalho. Isto deve se ao facto de não existir uma concentração suficiente dos compostos no extracto, por um lado, mas também devido a falta de selectividade do método. Os cromatogramas obtidos apresentam uma grande quantidade de picos muito deles sobrepostos a tempos de retenção muito próximos ou coincidentes.

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

No entanto, tendo em conta resultados obtidos pela Dra. Moreira num vinho tinto de 2010, conseguiu-se isolar o 3-mercaptohexanol no GC-MS como comprovam os cromatogramas da Figura 13.

Este vinho permitiu obter um critério de comparação em relação as medições no sistema de GC-FPD já que o vinho tinto em questão também demonstrou picos de interesse neste método.

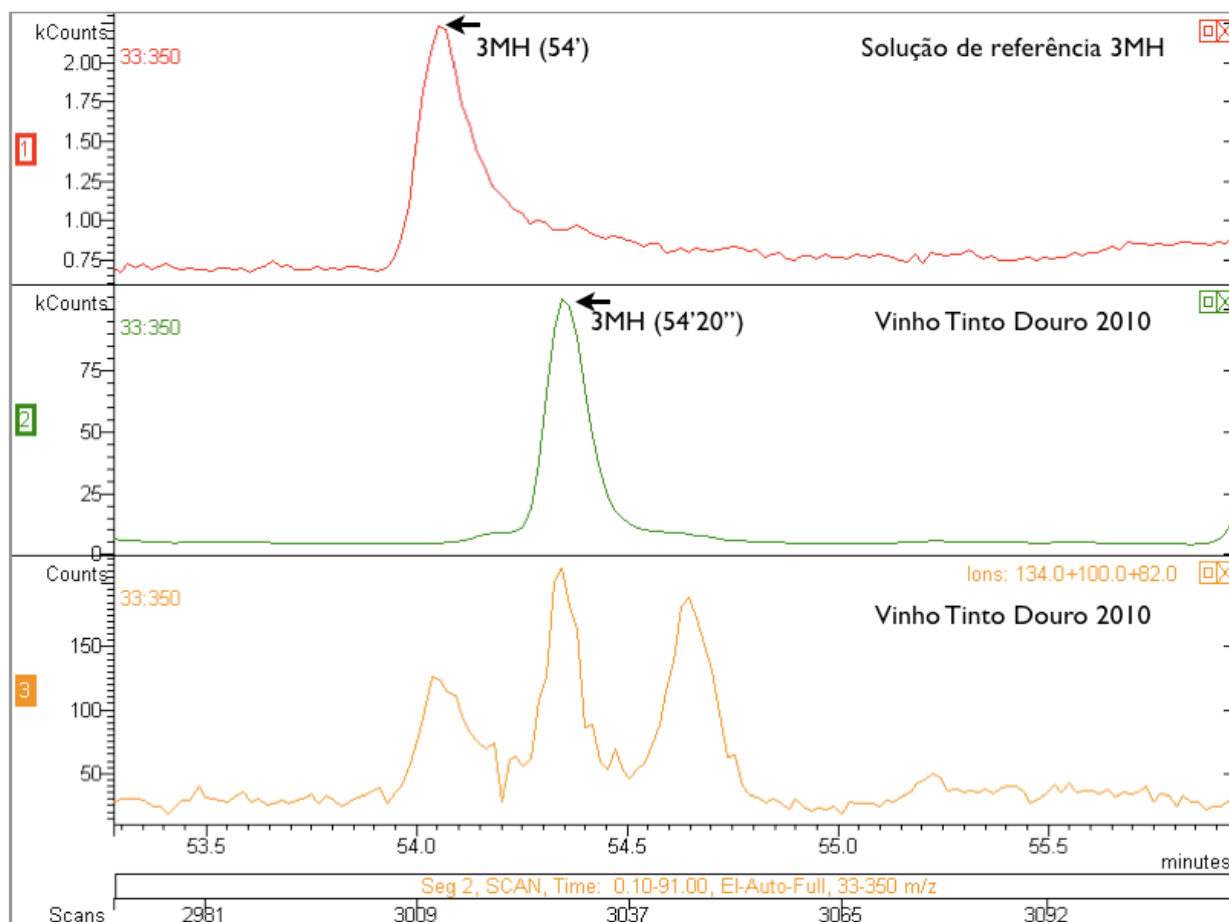


Figura 13. Cromatogramas comparados da solução de referencia de 3MH com o extracto do vinho tinto Duriense 2010. Os tempos de retenção estão indicados junto aos picos.

O espectro de massa do composto no vinho tinto foi confirmado ao tempo de retenção de 54', e analisando os iões do seu espectro de massa.

Os iões de qualificação deste composto com razão massa/carga de 82, 100 e 134 m/z foram formalmente identificados tendo como base a biblioteca *NIST05* existente no software utilizado.

(Figura 13)

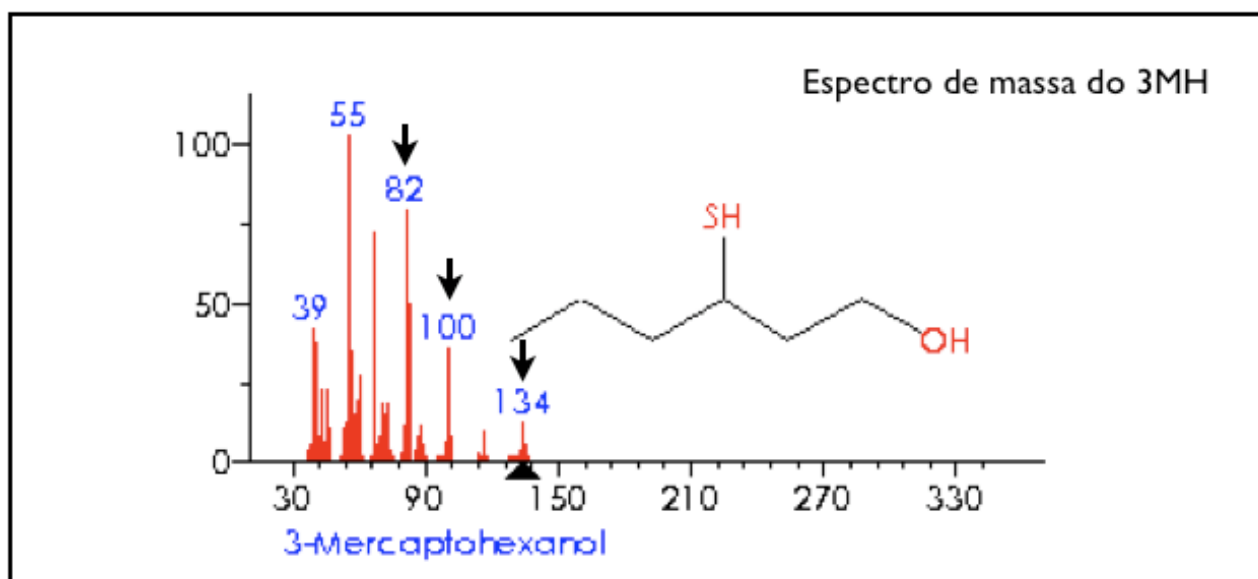
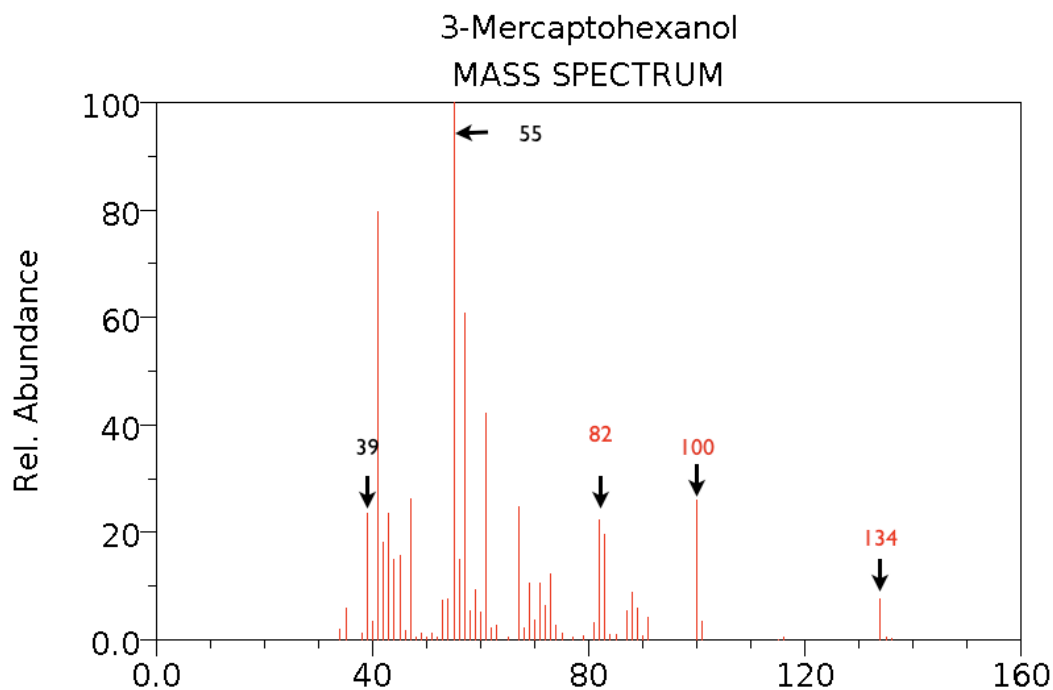


Figura 14. Espectros de massa do composto identificado no vinho tinto Duriense de 2010, com os fragmentos característicos do 3MH. comparação do espectro encontrado no composto do vinho (em baixo) e do espectro encontrado no Webbook NIST (em cima).

4.3.2.3 Estudo dos extractos de aromas dos vinhos com recurso a Cromatografia em fase gasosa com detector de fotometria de chama (GC-FPD)

Os resultados relativos à análise do extracto orgânico por GC-FPD não foram muito significativos. Comparando os cromatogramas das soluções de referência com os

cromatogramas das amostra conseguiu-se apurar a presença de um pequeno pico ao tempo de eluição correspondente ao 3MH (Figura 15). Analisando o vinho tinto, em que se confirmou a presença deste composto com espectrometria de massa, encontramos o mesmo pico mas com uma área bem maior (Figura 14).

Observamos os mesmos pontos comuns nos dois cromatogramas, sensivelmente ao mesmo tempo apurados (existe um pequeno desfasamento entre todos os picos do cromatograma de cerca de 2 minutos, explicado pelo facto da coluna cromatográfica ter sido cortada entre as duas injeções) com a solução de referência, indicando nos com alguma segurança a presença do mesmo composto em ambos os vinhos.

O exemplo utilizado é relativo ao vinho da casta Antão vaz, mas no entanto todos os vinhos analisados demonstraram o mesmo pico naquele tempo de retenção. (Anexo 2)

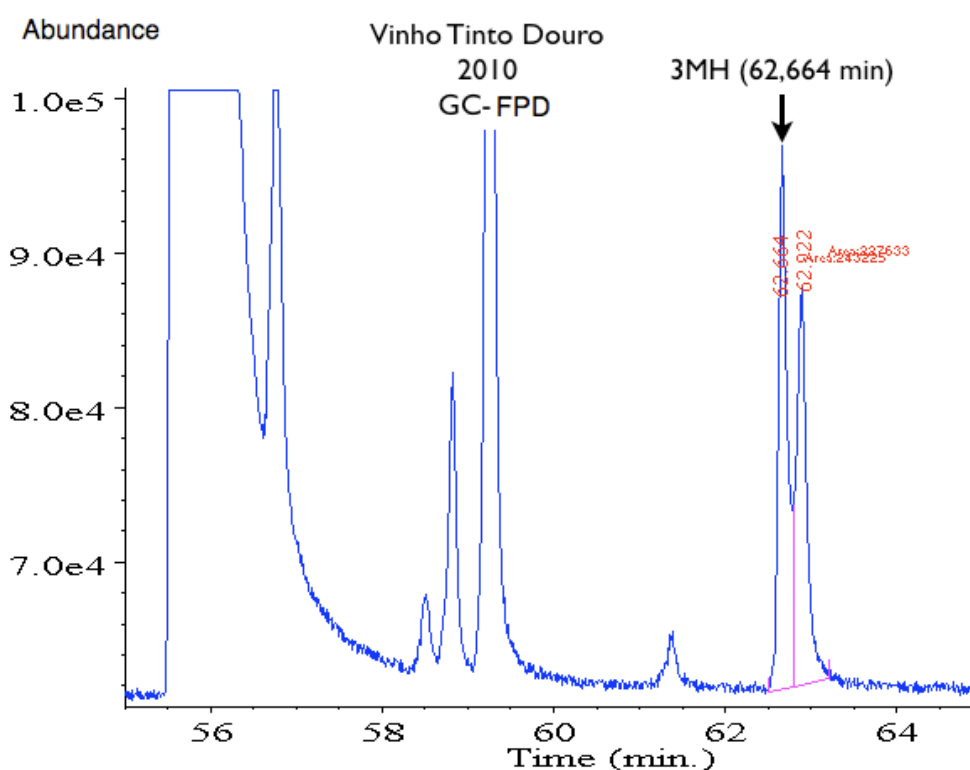


Figura 15. Cromatograma do vinho tinto duriense, obtido a partir de GC-FPD, o pico apontado corresponde ao 3MH.

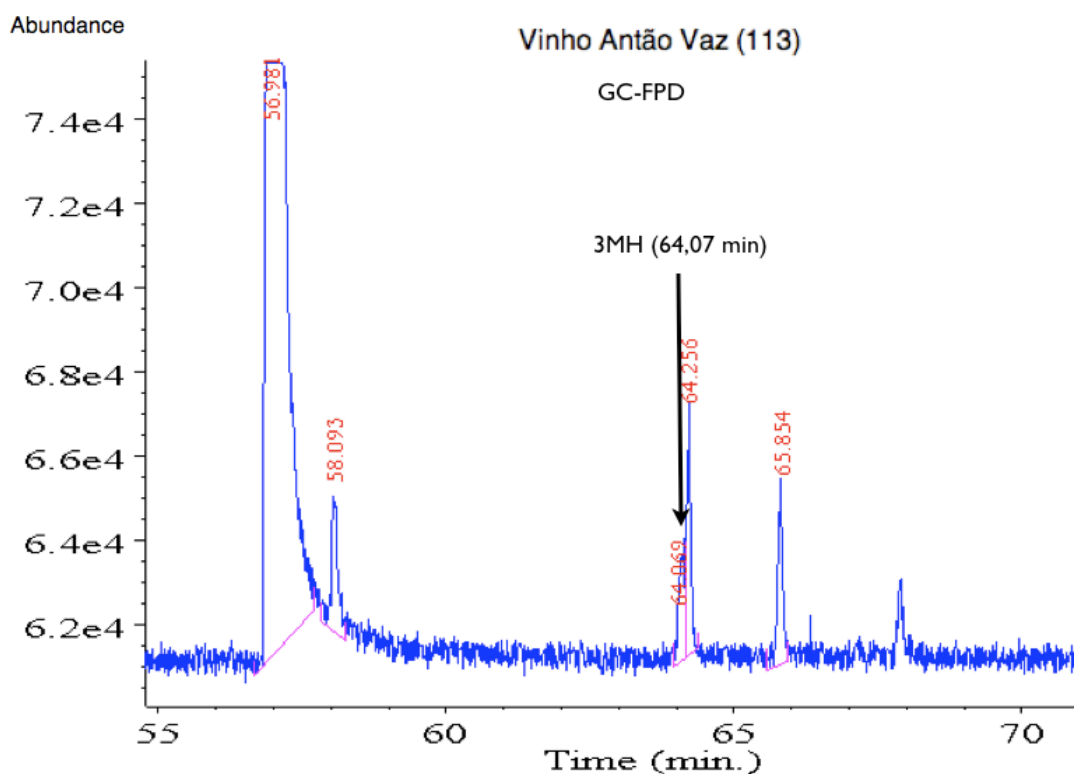


Figura 16. Exemplo de cromatograma obtido dos vinhos (Antão Vaz) a partir do sistema GC-FPD, o pico apontado corresponde ao 3MH.

Tendo sido possível a obtenção de picos com resolução suficiente para determinarmos a área relativa ao 3MH, efectuou-se a integração dos picos em questão e graças a curva de calibração (Figura. 17), calculou-se para todos os vinhos uma concentração aproximada do composto que foi identificado como sendo o 3-mercaptophexanol.

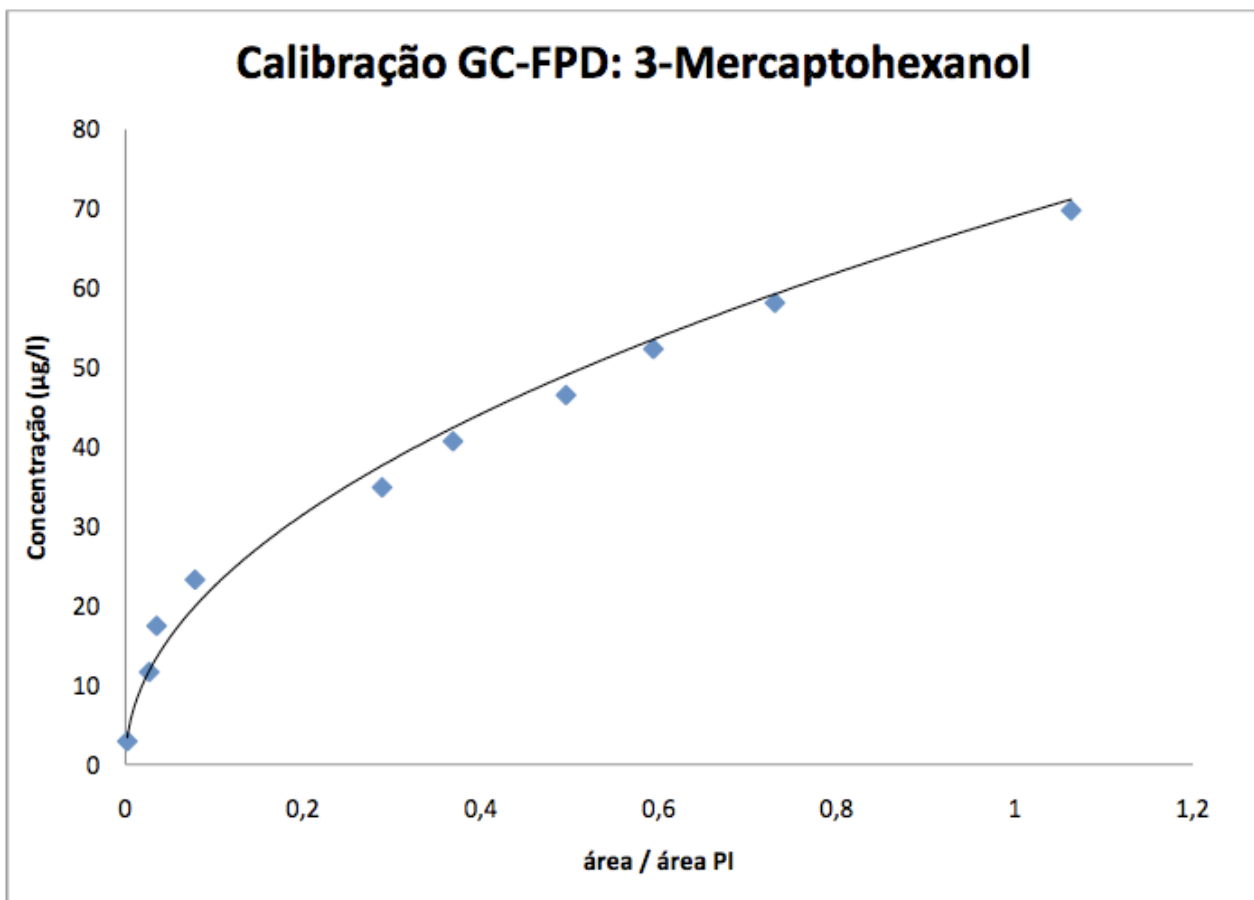


Figura 17. Curva de calibração, do 3-mercaptohexanol, aplicada ao GC-FPD

Quadro 8. Resultados relativos à concentração aproximada em 3MH dos vinhos estudados, obtidos pela análise com GC-FPD.

Vinho	Concentração apurada em 3MH (ng/L)	Limiar de percepção *	OAV
Antão Vaz 113	≈ 10000(ab)	60 ng/L em solução aquosa com 12% EtoH (Tominaga <i>et al.</i> 1998b)	166
Arinto 118	≈ 10600 (a)		176
Fernão Pires 605	≈ 5500 (c)		91
Verdelho 205	≈ 7400 (c)		123
Viosinho 209	≈ 10200		170
Sauvignon Blanc 191	≈ 7390 (bc)		123

*Os valores apresentando a mesma letra não apresentam diferenças significativas. (Teste de separação de tuckey $p < 0,05$)

Os valores apresentados no Quadro 8. são muito elevados, equivalentes a valores observados nos vinhos de Sauvignon Blanc com a mais elevada tipicidade, sendo que o máximo registado tenha sido 12822 ng/L. (Tominaga *et al.* 1998)

Temos que realçar que o método utilizado não foi validado para se fazer análise quantitativa deste composto, pelo que os valores obtidos têm de ser visto nesta perspectiva.

Os valores apresentados acompanham em ordem de grandeza relativa, os resultados obtidos com a olfactometria. (Quadro 6.)

Exceptuado o caso da casta Arinto, os vinhos com menor pontuação na olfactometria apresentam também os menores concentrações de 3MH nesta análise cromatográfica.

O Sauvignon Blanc apresenta uma concentração em 3MH inferior aos valores analisados no Arinto e Antão Vaz, no entanto o teste de separação de tuckey, demonstrou que este vinho apresenta valores de concentração não significativamente diferentes dos apresentados pelo vinho de Antão Vaz (Quadro 8.).

Comparando os resultados da semi-quantificação (Quadro 8.) com os resultados obtidos na análise sensorial (quadro 4.), descobrimos um padrão comum. Nas castas com maior

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

pontuação nos descritores de maracujá e toranja, observamos que são as que contém mais 3MH, a casta Arinto e Antão Vaz respectivamente.

Em relação aos dois outros tióis de destaque neste trabalho, o A3MH e a 4MMP, não foi possível isolar os picos cromatográficos respectivos nos cromatogramas dos extractos dos vinhos, em modo GC-FPD.

No caso do 4MMP não se conseguiu determinar os tempos de retenção com a solução de referência.

No caso do A3MH este composto co-eluiu, nos cromatogramas dos extractos dos vinhos, com outro composto não identificado cujo pico recobre uma grande área a proximidade do tempo de eluição do A3MH, aos 56' como podemos observar na figura Figura 15.

5-CONCLUSÕES

Devido a grande dificuldade que envolve a pesquisa dos tióis varietais nos vinhos, já que estes existem em pequeníssimas concentrações, tivemos de recorrer a aplicação de técnicas como o GC-FID e o GC-MS que por si só não se mostram capazes de identificar e quantificar os tióis varietais. No entanto, com uso da olfactometria e do GC-FPD conseguimos obter informações importantes relativas a estes compostos.

5.1. Dados conclusivos:

A combinação das metodologia de GC-Olfactometria, e de GC-FID permitiu concluir com alguma segurança que existem em todos os vinhos estudados, dois dos compostos procurados, a 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona e o 3-mercaptohexanol.

O acetato de 3-mercaptohexilo só foi detectado na prova olfactiva dos vinhos de casta Arinto e Fernão Pires de 2010. Esta diferença prende-se ao facto dos vinhos de 2010 terem sido fruto dum processo de vinificação muito específico e elaborado de forma à obter vinhos com esta características bem expressas.

Os resultados relativos aos ensaios efectuados com GC-FPD, comparados com os obtidos com o GC-MS, permitiram a confirmação da existência de 3MH em todos vinhos estudados. No culminar desta análise, determinamos semi-quantitativamente a concentração do composto 3MH em todos os vinhos estudados.

Com a utilização da técnica de GC-O, na tentativa de quantificar a intensidade dos aromas percebidos, conseguiu-se determinar que o vinho da casta Verdelho é o que apresenta nas condições deste ensaio, uma intensidade aromática na zona olfactiva “buxo/urina de Gato” (4MMP) mais próxima da do vinho de Sauvignon Blanc.

As mesmas considerações foram tomadas em relação ao vinho Antão Vaz e Viosinho no que diz respeito a zona olfactiva “ Toranja / Maracujá” (3MH). Esta consideração tem mais peso, por corresponder a uma das tendências observada na análise sensorial unicamente para a casta Antão Vaz, que teve a melhor pontuação na componente de Toranja.

Existe no entanto para as outras castas pouca correspondência entre os resultados obtidos na análise por GC-olfactométrica e a prova de análise sensorial convencional, este facto deve-se provavelmente à pouca significância dos dados obtidos durante a análise sensorial, e também à influência de efeitos de matriz que podem dar origem a fenómenos de antagonismos e sinergias aumentando ou diminuindo as sensações

olfactivas na prova convencional. Este facto toma especial importância para o caso do vinho de casta Viosinho, que apresentou notas baixas nas componentes de Maracujá e Toranja durante a análise sensorial, mas obteve na olfactometria a nota máxima na zona do 3MH.

5.2. Conclusões reservadas.

Embora tenha sido possível a semi-quantificação do 3MH nos vinhos, os resultados relativos a concentração encontradas são provavelmente elevados, nos seus valores absolutos. No entanto parece-nos muito provável que o composto esteja presente em todos os vinhos acima do limiar de percepção, pela correspondência encontrada entre a análise sensorial e a ordem de grandeza dos valores de concentração apurados com o GC-FPD. Os valores obtidos são 90 a 170 vezes superiores ao limiar de percepção, sendo que o vinho com mais 3MH já analisado apresentava um valor 213 vezes superior ao limiar de percepção (12822 ng/L), valor que corresponde ao maior grau de tipicidade para a casta Sauvignon Blanc. (Tominaga *et al.* 1998)

A análise efectuada com os resultados cromatográficos do FPD, foram provavelmente afectados pela calibração efectuada. Nesta calibração usamos concentrações de 3MH muito acima dos valores normalmente encontrados nos vinhos descrevendo uma curva não ajustada aos valores encontrados nos vinhos. (Figura 17)

A ordem de grandeza para a concentração de 3MH em cada vinho, deverá seguir de qualquer modo a ordem apresentada, sendo que a Casta Sauvignon Blanc demonstrou, tendencialmente, valores em concentração de 3MH, inferiores aos valores calculados em 3 das castas portuguesas, o Arinto, Viosinho e Antão Vaz.

Apenas o vinho de Arinto apresentou resultados discordantes na olfactometria e na análise semi-quantitativa com FPD do 3MH. No entanto, esta casta obteve a maior nota na análise sensorial para o descritor “maracujá”, facto de interesse para a validade dos dados obtidos na prova de análise sensorial.

As outras castas demonstraram, em ordem de grandeza, valores de concentração coincidente em 3MH com as pontuações obtidas na zona olfactometrica cujo descritor é o suor/ maracujá, facto que conforta os resultados obtidos na olfactometria.

Podemos justificar algumas falhas de correspondência entre resultados, com os desvios naturais que podem ocorrer na prática de olfactometria, sendo muito dependente dos

factores humanos, tendo em conta que foi efectuada por um único analista e não por um painel de vários analistas.

5.3. Críticas a metodologia utilizada

Concluimos findo este trabalho, que a metodologia de extracção utilizada não é a mais indicada para a obtenção de resultados tanto no GC-FID como no GC-MS para concretizar a quantificação dos compostos nos vinhos.

A extracção utilizada revela-se muito pouco selectiva e não possibilita uma concentração suficiente dos compostos estudados, que em regra se encontram nos vinhos a concentrações baixíssima na ordem das ng quanto muito μg . A combinação destes dois factos penaliza grandemente a interpretação dos cromatogramas, pois torna-se muito difícil identificar um pico, mesmo conhecendo o seu tempo de eluição na coluna utilizada. A co-eluição de vários compostos e a falta de resolução dos detectores utilizados foram duas razões para não se conseguir quantificar os 3 tipos de tióis nos vinhos estudados. No entanto a extracção foi satisfatória para uso em cromatografia acoplada a olfactometria.

5.4. Perspectivas futuras

5.4.1. Proposta de metodologias mais adaptadas a extracção dos tióis varietais para análise em meios cromatográficos em fase gasosa.

A metodologia proposta por Bouchilloux *et. al.* (1996) é a mais utilizada em estudos sobre tióis voláteis. Consiste numa técnica para concentrar o 4MMP e outros tióis do vinho para injeção em Cromatografia em fase gasosa. Assim o tiól volátil é extraído do vinho com uma corrente de p-hidroximercuribenzoato (pHMB) sendo a reacção reversível em presença de um tiól não volátil. O extracto obtido é muito limpo e concentrado e permite eluições que dão origem a picos bem resolvidos, nas condições de cromatografia em fase gasosa acoplada ao FPD e em condições semelhante no GC-MS. Esta técnica no entanto tem muitos inconvenientes, é muito exigente tecnicamente, obriga a manipulação de compostos carcinogénicos e dá origem a muitos resíduos de difícil tratamento.

Recentemente uma nova técnica de extracção e concentração de tióis é preconizada e utiliza a derivatização.

A derivatização consiste na utilização de um composto derivatizante como por exemplo o Brometo de 2,3,4,5,6 pentafluorobenzilo (PFBBr) que ao ligar-se a uma molécula com

baixo peso molecular, como os tióis voláteis, faz aumentar a sua selectividade em métodos de extracção, facilitando a sua separação em matrizes complexas como a do vinho. Esta técnica facilita ainda a análise com GC-MS, pois favorece uma fragmentação mais informativa com iões de massa mais elevada. (Knapp, 1979)

Ferreira *et al.* (2007) introduziram ao estudo dos vinhos, os primeiros trabalhos sobre derivatização dos tióis, directamente em fibras utilizadas nas técnicas de SPME.

Mateo Vivarancho *et al.* (2007) desenvolveram um método que retém selectivamente os tióis num sistema SPE (extracção em fase sólida.) usando directamente um reagente de derivatização, o PFBBr (brometo de pentafluorobenzilo) num cartucho. O método obriga o tratamento prévio do vinho directamente antes da extracção para aumentar a capacidade de derivatização da função tiól da molécula de 4MMP.

Esta técnica permite um extracção para concentrações abaixo do limiar de detecção das moléculas de FFT, 4MMP, A3MH e 3MH. (Mateo Vivarancho *et al.* 2007)

Recentemente, Rodriguez-Bencomo *et al.* (2009) optimizaram o método de Ferreira *et al.* (2007) inspirando-se do trabalho de Mateo Vivarancho *et al.* (2007) com a utilização de técnicas de HS-SPME (Head Space Solid Phase Micro Extraction), após uma prévia derivatização dos tióis pelo PFBBr. Este método permitiu melhorar a repetibilidade do método anterior com a mesma sensibilidade.

É claro que este tipo de metodologias, muito inovadoras, exige um grande controlo e conhecimento dos processos envolvidos.

5.4.2 Melhoria da metodologia utilizada

A metodologia de extracção aplicada neste trabalho, é relativamente fácil de efectuar, conseguindo-se detectar com possibilidade de quantificar por GC-FPD o 3MH, que geralmente é de difícil detecção às concentrações habitualmente encontradas no vinho. Este método revela-se assim um modo muito mais simples do que os métodos já publicados para quantificar 3MH.

Para melhorar o método, seria importante conseguir uma maior concentração do extracto e o uso de uma coluna com uma polaridade mais adequada para poder obter picos cromatográficos melhor resolvidos para a quantificação do composto. É importante introduzir uma melhoria na calibração do instrumento, nomeadamente utilizando soluções de concentrações em 3MH menores, mais próximas dos valores encontrados no vinho.

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

No próximo passo da investigação este método deverá ser validado para a quantificação do 3MH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abbot, N; Etievant, P; Issanchou, S; Langlois, D.,1993. Critical evaluation of two commonly used techniques for the treatment of data from extract dilution sniffing analysis. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*. **41**, 1698-1703.

Anocibar Beloqui A., Bertrand, A.,1995. Study of sulphur compounds in wine: preliminary results. *Italian Journal of Food Sciences*, **3**, 279.

Augusto F., Lopes A.L.E., Zini C.A., 2003. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trac Trends Anal. Chem.* **22**, 160-169.

Augustyn O.P.H., Rapp A., van Wyk C.J., 1982. Some volatile aroma components of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **3**, 53-60.

Bayonove C.L., Cordonnier R.E., Dubois P. 1975. Étude d'une fraction caractéristique de l'arôme de raisin de la variété Cabernet-Sauvignon; mise en évidence de la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **281**, 75-78.

Bayonove C.L., Baumes R.L., Crouzet J., Günata Y.Z. (1998) Arômes. Œnologie - Fondements Scientifiques et Technologiques, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 163-235.

Belitz H.-D. et al. 2004. Food Chemistry. 3^a ed. Berlim: Springer-Verlag.

Botelho G., 2008. Characterisation of the aroma components of clonal grapes and wines from Aragonez and Trincadeira *Vitis vinifera* L. cultivars. Dissertation with the aim of obtaining a PhD degree in Food Science. Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Vila Real.

Blanchard L, Darriet P, Dubourdiou D, 2004. Reactivity of 3-Mercaptohexanol in red wine: Impact of Oxygen, Phenolic Fractions, and Sulfur Dioxide. *American society for Enology na Viticulture*. **55**, 115-120.

Bouchilloux P. Darriet Ph., Dubourdiou D.,1996. Mise au point d'une méthode de dosage de la 4-Mercapto-4-Méthylpentan-2-one dans les vins de Sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **30**, 23-29.

Bouchilloux, P., Darriet P., Henry, R. Lavigne-Cruegue,V. Dubourdiou, D.,1998. Identification of volatile and powerful odorous thiols in bordeaux red wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44** , 557-566.

Cacho J., 2004. Relation entre l'analyse physicochimique et sensorielle des vins rosés. *rencontres Internationales du Vin Rosé*, 12-13.

Cacho J., 2008. Influencia de los aromas varietales, de fermentación y de crianza en los distintos estilos de vinos. *Conferências da tapada de 2008*, Instituto superior de Agronomia Lisboa.

Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron, J.N.,1992. Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur constitution en substances cedées par le bois. *Science des Aliments*, **12**, 665.

Choné X., Lavigne-Cruege V., Tominaga T., Van Leeuwen C., Castagnede C., Saucier C. Dubourdieu D., 2006. Effect of wine nitrogen status on grape aromatic potential: Flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **40**,1-6.

Clímaco, M. C., 1987. Efeitos do envelhecimento na composição aromática e na qualidade de vinhos tintos. INIA-EVN, Dois Portos. Portugal.

Corrêa P. D. L. R.,1996. Influência de Tecnologias de acabamento no Aroma de Vinhos Brancos, Relatório do Mestrado em Viticultura & enologia, U.T.L., I.S.A., Lisboa.

Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. 2004. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *J. Agric. Food Chemistry*, **52**,1653-1660.

Darriet, Ph, Lavigne,V, Boidron J.N., Dubourdieu D.,1991. Caracterization de l'arôme varietal des vins de sauvignon blanc par couplage chromatographie en phase gazeuse-odometrie. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **25**, 167-174.

Darriet P., Lavigne-Cruege V., Tominaga T.,1999. A paradox: the volatile sulfur compounds responsible for both defects and qualities in wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **33**,127–133.

Dratz M.T., 2001. Le champ des odeurs de Jean Noel Jaubert. Interet pedagogique et application en analyse sensorielle descriptive. *Annales des falsifications de l'expertise chimique e toxicologique*. **954**, 69-78.

Dubois D., 1993. Les arômes des vins et leurs défauts. *Rev. Fr. Œnol.*, **144**, 63-72.

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

Dubourdieu D., Tominaga T., Masneuf I., Peyrot des Gachons C., Murat ML., 2000. The role of yeast in grape flavor development during fermentation : the example of Sauvignon blanc. *American Journal of Enology and Viticulture*, **51**, 196-203.

Falcão L.D., de Revel G., Rosier J.P., Bordignon-Luiz M.T., 2008. Aroma impact components of Brazilian Cabernet Sauvignon wines using detection Frequency analysis (GC-olfactometry). *Food Chemistry*, **107**, 497-505.

Fisher C., 1997. Food flavours, Biology and Chemistry. *R.S.C. the Royal Society of Chemistry*, herts U.K.

Ferreira V., Lopéz R., Cacho J.F. , 2000. Quantitative determination of odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the science of food and agriculture*, **67**, 381-392.

Ferreira V., Aznar M., Lopez R., Cacho J., 2001. Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, **49**, 4818-4824.

Ferreira, V. , 2002. Chemical characterization of the aroma of Grenache Rosé wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory re- constitution studies. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, **50**, 4048-4054.

Ferreira, V., 2007. La base química del aroma del vino: Un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. *Rev. Real Academia de Ciencias*, **62**, 7-36.

Fortunato, N., 2006. Identificação de compostos responsáveis por aromas característicos em Vinhos de Mesa da Casta Touriga Nacional. Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Fretz B., 2005. Aroma Active Sulphur compounds and their precursors in petite arvine wine, dissertation for the degree of Doctor of technical sciences. Swiss Federal institute of technology, Zurich.

Gómez-Míguez M.J.,Cacho J.F.,Ferreira V. Vicario I.M., Heredia, F.J., 2007. Volatile components of zalema white wines. *Food Chemistry*, **100**, 1464-1473.

González, V., 2007. La base química del aroma del vino: Un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. *Rev. Real Academia de Ciencias*, **62**, 7-36.

Gunata Y.Z., Bayonove C.L., Baumes R.L., Cordonnier R.E., 1985. The aroma of grapes. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some aroma components. *J. Chromatography*, **331**, 83-90.

Guth, H., 1997. Identification of character impact odorants of different white wines varieties. *Journal of agriculture & food chemistry*, **45**, 3022-3026.

Harris R.L.N., Lacey M.J., Brown W.V., Allen M.S. (1987) Determination of 2-methoxy-3-alkylpyrazines in wine by gas chromatography/mass spectrometry. *Vitis*, **26**, 201-207.

Howell K., Bartowsky E., De Barros Lopes M., 2003. Volatile thiol formation by yeast during fermentation. *AWRI technical review*, **143**.

I.T.V., 2005. Agronomie viticole, rapport d'activités annuel.

I.U.P.A.C., 1997. IUPAC compendium of Chemical Terminology. 2nd Edition.

Jaubert J.N., Tapiero, C e Dore J.C., 1995. The field of odors: toward a Universal Language for odor relationships. *Perfumer and flavorist*.

Jackson R. S., 2000. Wine Science, Principles, Practice, Perception , 2nd Ed.

King E., Swiegers J., Travis B., Francis L., Bastian S., Pretorius I., 2008. Coinoculated Fermentation Using *Saccharomyces* yeasts Affects the Volatile Composition and Sensory Properties Of *Vitis vinifera* L. Cv Sauvignon Blanc Wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56**, 10829-10837.

Knapp, D.K., 1979. Handbook of Analytical Derivatization Reactions, Wiley&Sons, Inc., New York.

Lavigne, V., Boidron, J.N. et Dubourdieu, D., 1992. Formation des composé soufrés lourds au cours de la vinification des vins blanc secs. *Journal International des Sciences de la vigne et du vin*, **26**, 75-85.

Nikolantonaki M., Chichuc I., Tessedre P.L., Darriet Ph., 2010. Reactivity of volatile thiols, with polyphenols in a wine model medium: Impact of iron, oxigen and sulfur dioxide. *Analytica Chimica Acta* , **660**, 102–109 .

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

Noble A.C. Arnold R.A. Buechsenstein, J., Leach E.J., Schmidt, J.O, Stern, P.M.,1987. Modification of a standardized system of wine aroma terminology. *American Journal of Enology & Viticulture* **28**, 143-146.

Noble, A.C., 1988. Analysis of wine sensory properties. In *Wine Analysis, modern methods of plant analysis*. Jackson, J.F. ,Likens H.F. , Springer Verlag, Berlin.

Martins, R., 2009 Extracção e isolamento de compostos responsáveis pelas características aromáticas do vinho do Porto- desenvolvimento de metodologias de análise de compostos voláteis. Tese de Mestrado em tecnologia, ciência e segurança alimentar. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto - Escola de Engenharia da Universidade do Minho.

Masneuf-Pomarède, V., Mansour, C., Murat, M. L., Tominaga T.,Dubourdieu, D., 2006. Influence of fermentation Temperature on volatile thiol concentration in Sauvignon blanc wines. *International Journal Of Microbiology*, **108**, 385-390.

Meilgaard M.C., Civille G.V., Carr B.T.,1999. *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press, 3rd edition

Mestres M., Busto O., Gualsh J., 2000. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography*, **945**, 211.

Moisseff M., Casamayor P., 2006. *Arôme du vin*, Hachette,Paris.

Moreira N.,2009. Heavy Sulphur compounds and other volatiles in Wine: Influence of grape must composition and contribution of apiculate yeasts. PhD thesis. Universidade Católica Portuguesa, Escola de Biotecnologia do Porto.

Murat M.L., Tominaga T., Dubourdieu D., 2001. Mise en évidence de composés clefs dans l'arôme des vins rosés et clarets de Bordeaux. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. **35**, 99-105.

Oliveira, J.M. 2000. Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas Loureiro e Alvarinho, Tese de doutoramento, Universidade do Minho.

Patai, S., 1974. *The chemistry of the thiol group*. Ed. Wiley, London.

Peynaud, E.,1983. *Le gout du vin*, Dunod, Paris.

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

Peyrot des Gachons C., Tominaga T., Dubourdieu D., 2000. Measuring the Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc Grapes by Assaying S-Cysteine Conjugates, Precursors of the Volatile Thiols Responsible for Their Varietal Aroma. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, **48**, 3387-3391

Peyrot des Gachons C., Tominaga T., Dubourdieu D., 2002. Sulfur Aroma Precursor Present in S-glutathione Conjugate Form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in Must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *American Journal of Enology and Viticulture*, **50**, 4076-4079.

Peyrot des Gachons C., Tominaga T., Dubourdieu D. 2002b. Localization of S-Cysteine Conjugates in the Berry: Effect of Skin Contact on Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc Must. *American Journal of Enology and Viticulture*, **53**, 144-146.

Plutowska B., Wardencki W., 2007. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages- A review. *Food Chemistry*, **107**, 449-463.

Rauhut, D., 1993. Production of sulphur compounds. Chapter 6. Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Switzerland.

Ribereau-Gayon P., Glories Y. Maujean A. Dubourdieu D., 1999. Handbook of enology – vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. Wiley and sons Ltd.

Robinson J., 2007. Vinho Branco? Yes!, *Blue Wine*, **12**.

Rodrigues, H. R., 2004. O efeito da colagem com pvpp e caseinato de potássio na componente aromática dos vinhos brancos. Relatório do trabalho de fim de curso em engenharia Agronómica. Instituto superior de Agronomia Lisboa.

Rodriguez-Bencomo J.J., Schneider R., Lepoutre J.P., Rigou P., 2009. Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextracton after derivatization. *Journal of chromatography* , **1216**, 5640-5646.

Rogerson, F.S.S., 2001. Identification of two chemicals with sweet aroma descriptors found in Portuguese wines from the Douro region: 2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione and diacetyl. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 263 – 269.

Silva Ferreira A.C., Rodrigues P., Hogg T, Guedes de Pinho, P. ,2003. Influence of Some Technological Parameters on the Formation of Dimethyl Sulfide, 2-Mercaptoethanol, Dimethyl Sulfone in Port Wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 727–732.

Shinkaruk S., Thibon C., Schmitter J., Babin P., Tominaga T., Degueil M., Desbat B., Jussier C., Bennetau B., Dubourdieu D., Bennetau-Pelissero C., 2008. Surprising Structural Lability of a Cysteine-S-Conjugate Precursor of 4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-one, a Varietal Aroma in Wine of *Vitis vinifera* L.cv.Sauvignon Blanc. *Chemistry and Biodiversity*, **5**, 273-809.

Soares da Costa M.,Gonçalves C.,Ferreira A.,Ibsen C.,Guedes de Pinho P., Silva Ferreira A.C., 2004. Further insights into the role of methional and phenylacetaldehyde in lager beer flavor stability. *Jornal of Agriculture and food chemistry*, **52**, 7911-7917.

Stakenmann C., Le Calvé Y., Niclass B., Cayeux, S. Beccucci, I., Troccaz M., 2008. Olfactory perception of Cysteine-S conjugates from fruit and vegetables.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56**, 9575-9580.

Subileau M., Schneider R., Salmon J. M., Degryse E., 2008. Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon blanc at the level of precursor transport. *Federation of European Microbiological Societies, Yeast Research*, **8**,771-780.

Subileau M.,Schneider R., Salmon J. M., Degryse E.,2008b. New insights on 3-Mercaptohexanol (3MH) Biogenesis in Sauvignon Blanc Wines: Cys-3MH and (E)-Hexen-2-al are not the major precursors. *Journal of Agricultural and food chemistry*, **56**, 9230-9235.

Tominaga T., Masneuf I., Dubourdieu D., 1995. A S-cysteine conjugate, precursor of aroma of white sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. **29**, 227-232.

Tominaga T.,Darriet P., Dubourdieu D., 1996. Identification de l'acetate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. *Vitis*,**35**,207-210.

Tominaga T., Peyrot des Gachons C., Dubourdieu D., 1998. A new-type of flavors precursors in *Vitis Vinifera* L. Cv. Sauvignon S-cystéine conjugates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**, 5215-5219.

Pesquisa de compostos voláteis de enxofre varietais em vinhos brancos elementares de Castas Portuguesas.

Tominaga T., Furrer F., Henry R., Dubourdieu D., 1998b, Identification of new volatile thiols in the aroma of vitis vinifera L. Sauvignon. *Flavour fragrance Journal*. **13**, 159-162.

Tominaga T., Baltenweck-Guyot R., Peyrot des Gachon C., Dubourdieu D., 2000. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several Vitis vinifera grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, **51** , 178–181.

Tominaga T., Dubourdieu. 2003, D. Role of Certain Volatile Thiols in the Bouquet of Aged Champagne Wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*., **51** , 1016–1020.

Valente, A.L.P., Augusto F., 2000. Microextração em fase sólida. *Química Nova*, **23**, 523-530.

Vermeulen C., Guyot-Declerck C., Collin S., 2003. Combinatorial synthesis and sensorial properties of mercapto primary alcohols and analogues. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 3623-3628.

Sítios Internet Consultados:

URL: <http://chemdata.nist.gov/> (Acedido em Dezembro 2010)

URL: <http://www.pherobase.com/database/kovats/> (Acedido em Dezembro 2010)

URL: <http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200806bentonite.php3> (Acedido em Maio 2008)

ANEXOS

ANEXO 1

Prova Sensorial

Figura. I

Ficha de prova utilizada

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA						
Ficha de Prova de Vinhos Brancos						
Nome: <input style="width: 250px;" type="text"/>		Data: <input style="width: 150px;" type="text"/>			Sessão: <input style="width: 80px;" type="text"/>	
Prove os Vinhos na ordem apresentada e classifique os diferentes atributos utilizado as seguintes escalas:						
Para Côr, Aroma e Gosto: 1. Inexistente 2. Pouco Intenso(a) 3. Mediamente Intenso(a) 4. Intenso(a) 5. Muito Intenso(a)						
Para Equilíbrio (aroma e gosto) e Apreciação Global: 1. Mediocre 2. Satisfatório 3. Bom 4. Muito Bom 5. Excelente						
		VINHOS/CÓDIGOS				
CÔR	Amarelo					
	Verde					
AROMA	Intensidade					
	Frutado					
	Floral					
	Toranja					
	Maracujá					
	Chichi de Gato					
	Vegetal					
GOSTO	Equilíbrio					
	Intensidade					
	Acidez					
	Volume					
Persistencia						
Equilíbrio						
APRECIÇÃO GLOBAL:						

Observações:

ANEXO 2

Cromatogramas dos extractos de aroma dos vinhos, não apresentados no texto.

Figura II. GC-FPD Sauvignon Blanc- 191.

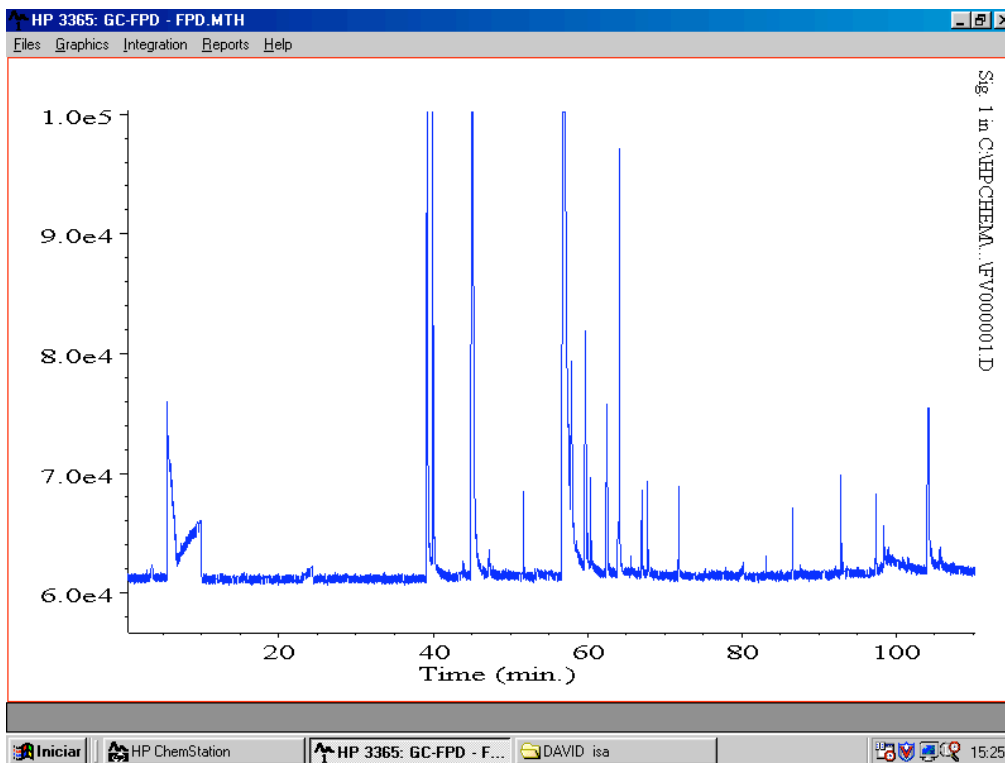


Figura III. GC-FPD: Antão Vaz-113.

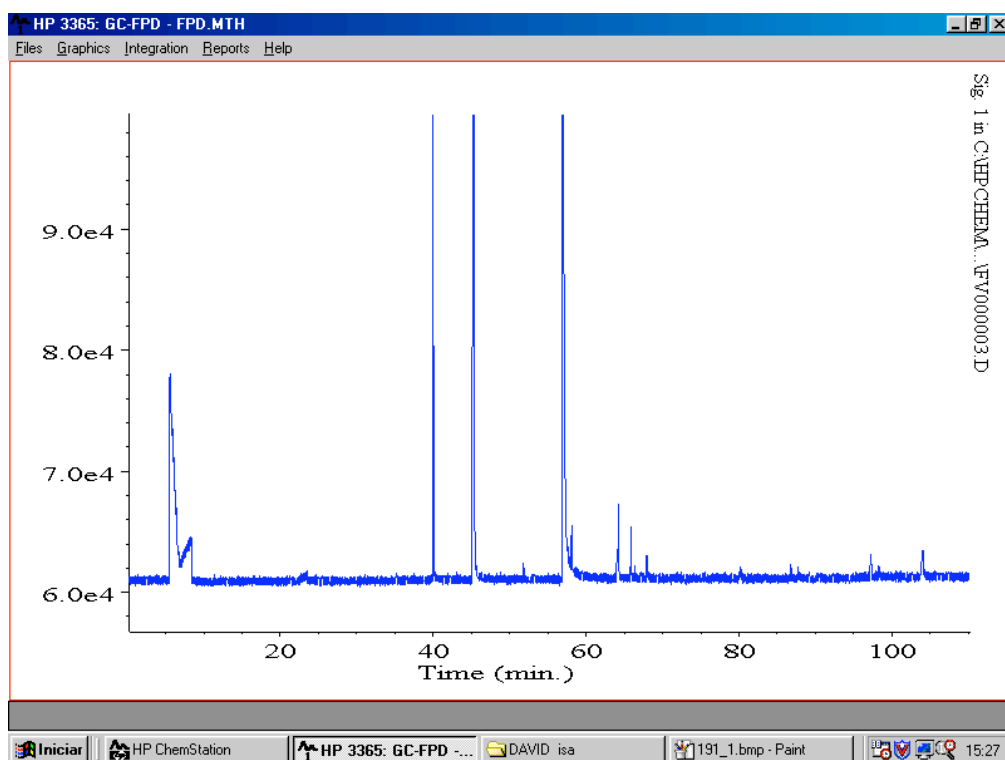


Figura IV. GC-FPD: Arinto-118.

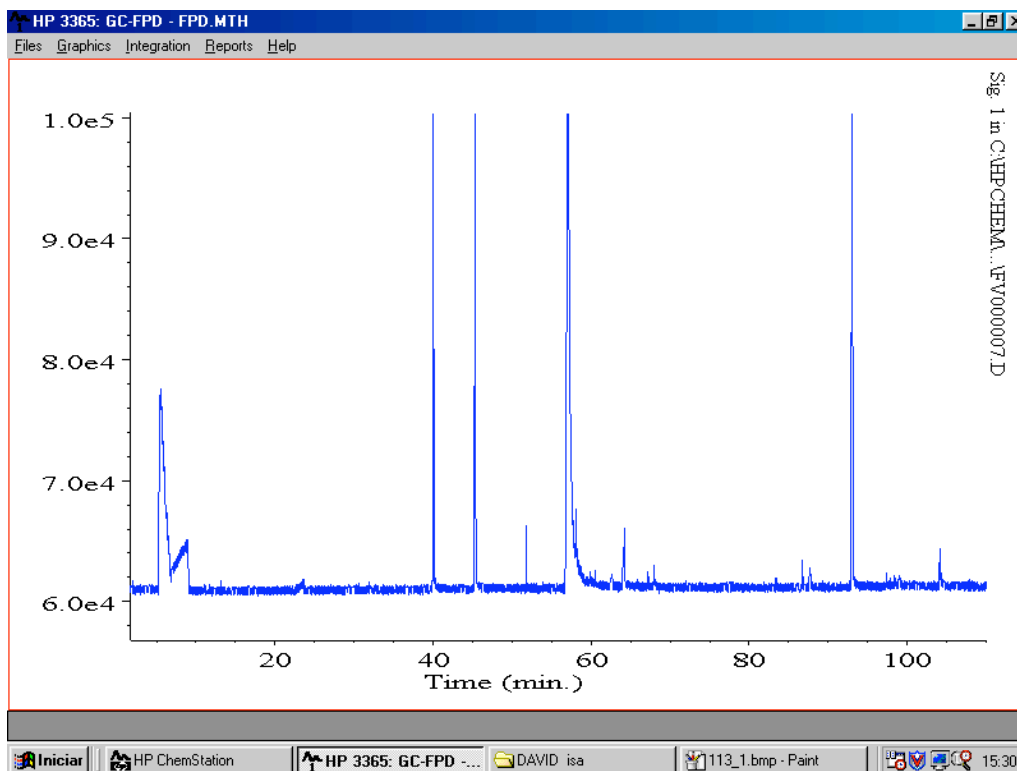


Figura V. GC-FPD: Verdelho da Madeira-205.

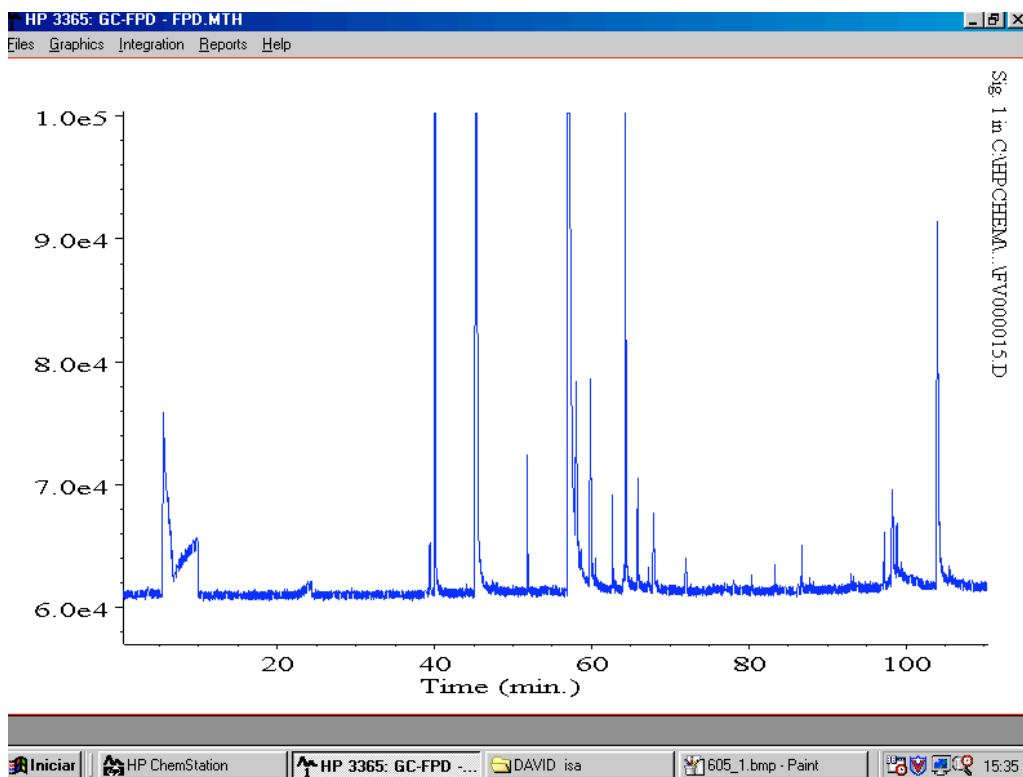


Figura VI. GC-FPD: Fernão Pires-605.

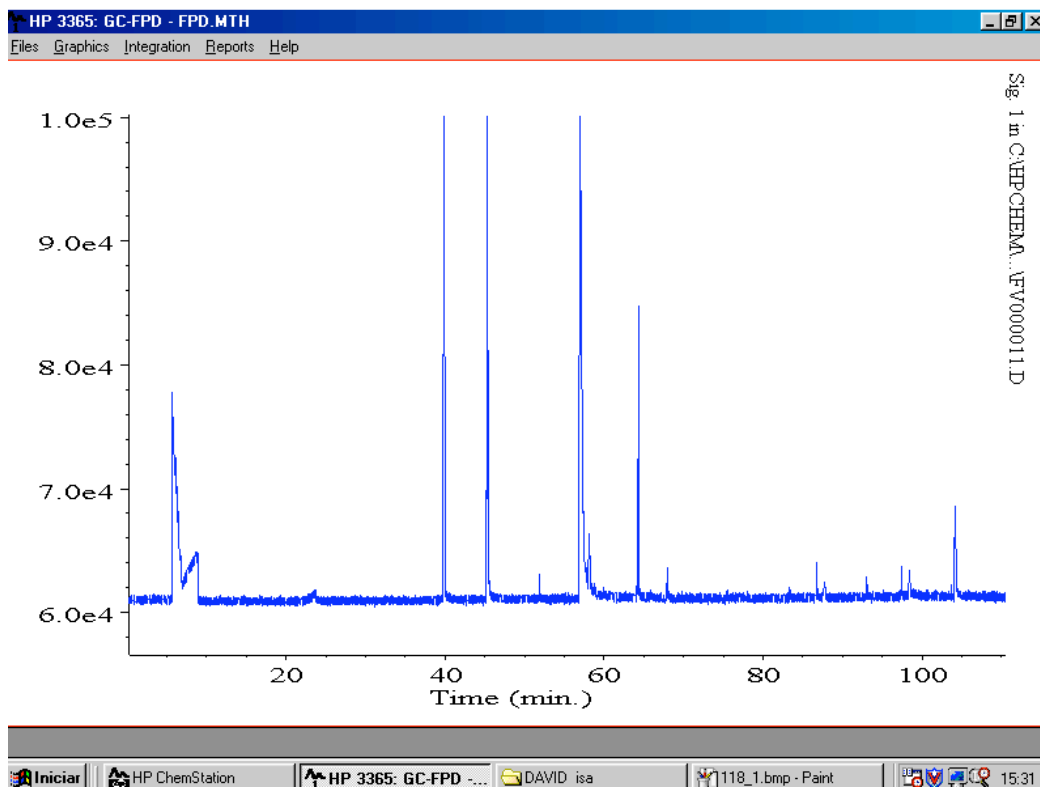


Figura VII. GC-FPD: Viosinho-209.

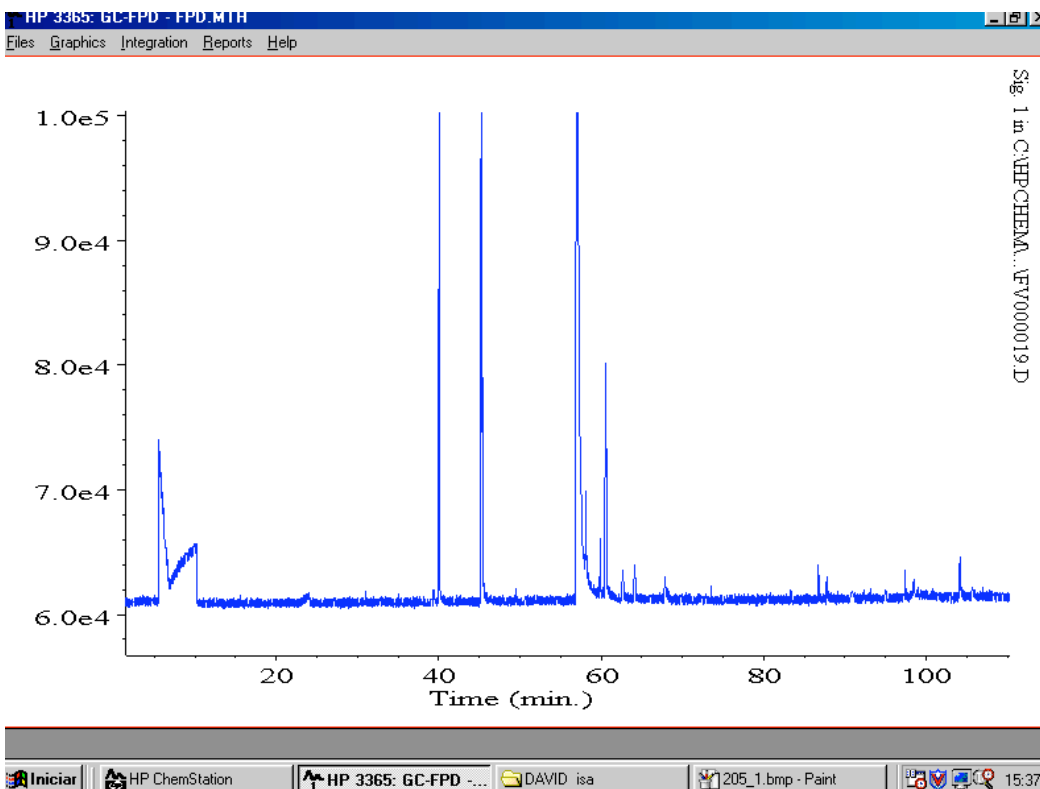
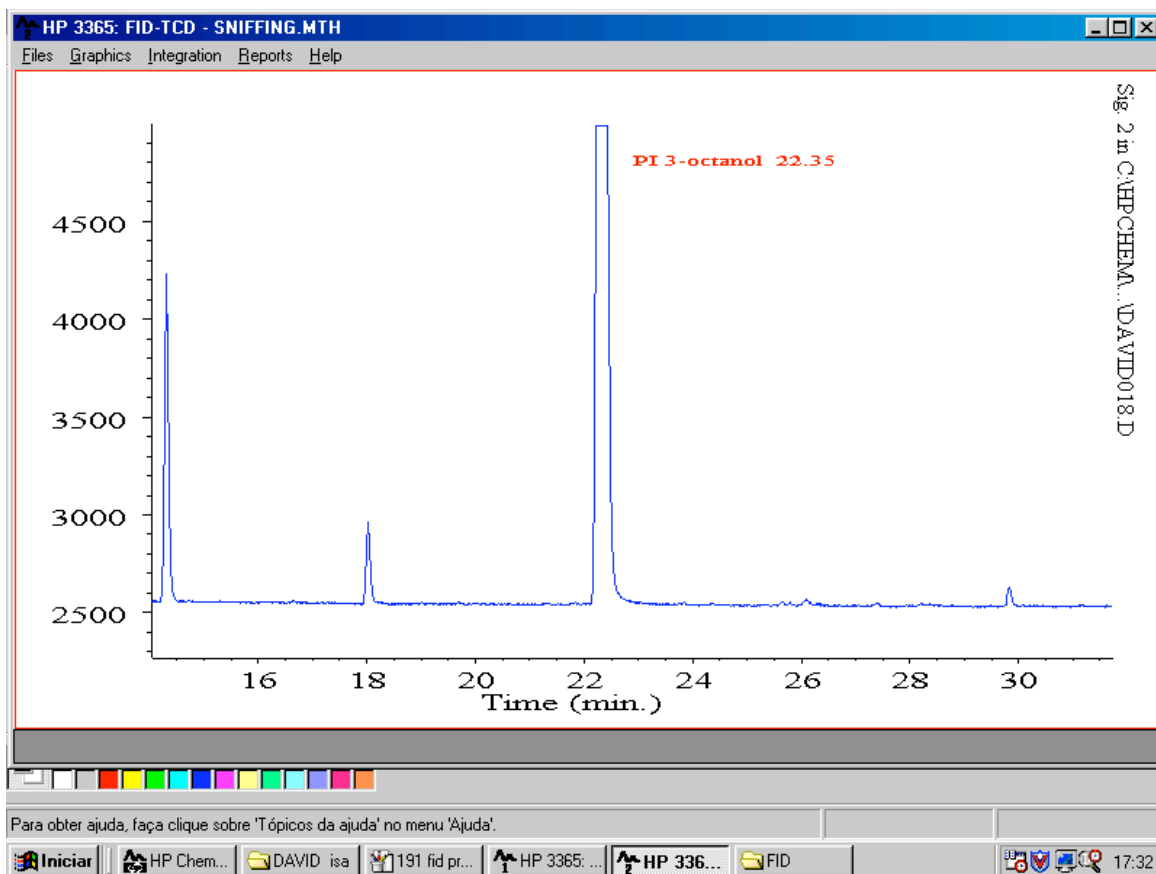


Figura VIII. GC-FID: 3-Octanol (solução de referência do Padrão Interno)



ANEXO 3

Método de cálculo para obter o índice de retenção de Kováts. (Extraído da IUPAC)

retention index (in column chromatography), I

The retention index of a sample component is a number, obtained by interpolation (usually logarithmic), relating the *adjusted retention volume* (time) or the retention factor of the sample component to the adjusted retention volumes (times) of two standards eluted before and after the peak of the sample component.

In the Kováts index or Kováts retention index used in gas chromatography, n -alkenes serve as the standards and logarithmic interpolation is utilized:

$$I = 100 \left[\frac{\log X_i - \log X_z}{\log X_{(z+1)} - \log X_z} + z \right]$$

where X refers to the adjusted retention volumes or times, z is the number of carbon atoms of the n -alkane eluting before and $(z + 1)$ is the number of carbon atoms of the n -alkene eluting after the peak of interest:

$$V_{Rz}' < V_{Ri}' < V_{R(z+1)}$$

The Kováts (retention) index expresses the number of carbon atoms (multiplied by 100) of a hypothetical normal alkene which would have an adjusted retention volume (time) identical to that of the peak of interest when analysed under identical conditions.

The Kováts retention index is always measured under isothermal conditions. In the case of temperature-programmed gas chromatography a similar value can be calculated utilizing direct numbers instead of their logarithm. Since both the numerator and denominator contain the difference of two values, here we can use the total retention volumes (times). Sometimes this value is called the linear retention index.

$$I^T = 100 \left[\frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} + z \right]$$

where t_R^T refers to the total retention times (chart distances) measured under the conditions of temperature programming. The value of I^T will usually differ from the value of I measured for the same compound under isothermal conditions, using the same two phases.

1993, 65, 844; O.B. 108