

UTILIZAÇÃO
DA CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA
NO ESTUDO DOS AROMAS DOS VINHOS
E DAS AGUARDENTES

POR

ANTÓNIO SÉRGIO CURVELO GARCIA
(Centro Nacional de Estudos Vitivinícolas)

E

ANA MARIA DE OLIVEIRA SIMÕES
(Centro Nacional de Estudos Vitivinícolas)

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	3
1 — MÉTODOS EXPERIMENTAIS DE ESTUDO	4
1.1 — Instrumentação utilizada	4
1.2 — Separação dos constituintes dos aromas dos vinhos e das aguardentes, por cromatografia em fase gasosa	4
1.2.1 — Generalidades	4
1.2.2 — Injecção directa das amostras a analisar	5
1.2.2.1 — Utilização da coluna de FFAP na sepa- ração de alguns constituintes dos aro- mas dos vinhos e das aguardentes, por injecção directa	5
1.2.2.2 — Utilização da coluna de PORAPAK Q. na separação de alguns constituintes dos aromas dos vinhos e das aguardentes, por injecção directa	6
1.2.3 — Extracção dos constituintes dos aromas dos vinhos por um gás inerte	6

Recebido para publicação em 18/3/71.

1.2.4 — Extracção dos constituintes dos aromas dos vinhos por solventes orgânicos. Utilização do pentano como solvente extractor	10
1.2.4.1 — Estudo dos ácidos livres	10
1.2.4.1.1 — Separação cromatográfica dos ácidos (directamente)	11
1.2.4.1.2 — Preparação e separação dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos a identificar	11
1.2.4.2 — Estudo dos ésteres	12
1.2.4.2.1 — Análise, por cromatografia em fase gasosa, da fracção II	13
1.2.4.2.2 — Análise, por cromatografia em fase gasosa, da fracção III	14
1.2.4.2.3 — Análise, por cromatografia em fase gasosa, dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos constituintes da fracção IV	14
1.2.4.3 — Estudos dos álcoois	14
1.2.4.4 — Estudo dos compostos carbonilados	14
1.3 — Doseamento dos constituintes dos aromas dos vinhos e das aguardentes, por cromatografia em fase gasosa	15
1.3.1 — Doseamento por injeccção directa	15
1.3.2 — Doseamento após extracção por um gás inerte	15
2 — RESULTADOS OBTIDOS	16
2.1 — Injeccção directa	17
2.1.1 — Utilização da coluna de FFAP	17
2.1.2 — Utilização da coluna de PORAPAK Q.	17
2.2 — Extracção por um gás inerte (azoto)	18
2.3 — Extracção pelo pentano	18
2.3.1 — Estudo dos ácidos livres	18
2.3.1.1 — Separação cromatográfica dos ácidos	18
2.3.1.2 — Separação dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos a identificar	19
2.3.2 — Estudo dos ésteres	19
2.3.2.1 — Análise da fracção II	19
2.3.2.2 — Análise da fracção III	20
2.3.2.3 — Análise dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos constituintes da fracção IV	20
2.3.2.4 — Esteres identificados	20
2.3.3 — Estudo dos álcoois	21
2.3.4 — Estudo dos compostos carbonilados	21

RESUMO	22
RÉSUMÉ	23
SUMMARY	23
BIBLIOGRAFIA	24

INTRODUÇÃO

JÁ já aproximadamente dois anos que se têm vindo a processar, nos laboratórios do Centro Nacional de Estudos Vitivinícolas (C. N. E. V.), diversos estudos sobre identificação e doseamento dos constituintes dos aromas dos vinhos, mostos e aguardentes, por cromatografia em fase gasosa. Iremos seguidamente apresentar um resumo dos métodos experimentais por nós ensaiados e as principais conclusões que inferimos dos trabalhos que realizámos, até ao presente momento, no C. N. E. V.

Muito concretamente, o nosso primeiro objectivo, ao realizar esses trabalhos, tem sido:

- a) Definir as técnicas de preparação das amostras a analisar por cromatografia em fase gasosa, englobando-se nesta alínea os métodos de concentração dos constituintes dos aromas dos vinhos, mostos e aguardentes, existentes em concentrações muito pequenas.
- b) Definir os métodos a usar na separação e identificação, por cromatografia em fase gasosa, dos diferentes constituintes desses aromas.
- c) Estabelecer as técnicas a utilizar no doseamento, por cromatografia em fase gasosa, de alguns desses constituintes.

A separação, a identificação e o doseamento desses compostos permitirão alcançar, além de outros, os seguintes objectivos:

- a) Interpretar, ou auxiliar a interpretar, os mecanismos de formação desses compostos, com o fim de estudar técnicas que incrementem ou retardem essa formação, conforme tais compostos forem desejáveis ou não.

- b) Estudar a influência das técnicas de preparação e conservação dos vinhos, bem como da sua origem, nas características dos respectivos aromas. Mais concretamente, procurar-se-á estudar, dentro deste capítulo, a influência da casta, da data de início da vindima, das leveduras, dos factores climáticos e dos diferentes processos tecnológicos utilizados, nas características dos aromas dos vinhos obtidos.
- c) Recolher dados que possam ser utilizados como controlo da qualidade dos vinhos e aguardentes.
- d) Estudar a influência dos diferentes processos de destilação dos vinhos nas características dos aromas das respectivas aguardentes, bem como estudar, para esses diferentes processos, a influência dos diversos factores tecnológicos nessas mesmas características.

1 — MÉTODOS EXPERIMENTAIS DE ESTUDO

1.1 — INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA

- a) Cromatógrafo PERKIN-ELMER, mod. 881 (equipado com detector de ionização de chama).
- b) Registador HITACHI PERKIN-ELMER, mod. 159.
- c) Seringas HAMILTON 701-NCH (10 μ l).

1.2 — SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES DOS AROMAS DOS VINHOS E DAS AGUARDENTES, POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

1.2.1 — Generalidades

Tratando-se de obter um conhecimento químico dos compostos responsáveis pelos aromas dos vinhos e das aguardentes, e encontrando-se grande número desses compostos presentes nessas bebidas em concentrações muito fracas, uma primeira grande dificuldade se nos depara; para a remover, teremos de recorrer a uma ou mais técnicas de concentração dessas substâncias; para tal, guiámo-nos fundamentalmente pelos trabalhos de J.-N. BOIDRON, P. RIBÉREAU-GAYON e A. BERTRAND (1963, 1964, 1967, 1968) da «Faculté des Sciences de l'Université

de Bordeaux», de A. D. WEBB, R. KEPNER, L. MAGGIORA e W. GALETTO (1964, 1968, 1969) da «University of California (Davis)» e de L. USSEGLIO-TOMASSET (1966) da «Stazione Enologica Sperimentale — Asti».

1.2.2 — Injecção directa das amostras a analisar

Com o emprego de detectores de ionização de chama, bastante sensíveis aos compostos orgânicos e praticamente insensíveis à água, é perfeitamente possível separar (e mesmo dosear), por cromatografia em fase gasosa, diversos constituintes dos aromas dos vinhos e das aguardentes, por injecção directa da amostra a analisar; os correspondentes picos do cromatograma obtido são mensuráveis com uma boa precisão, e as análises tornam-se extremamente rápidas, em virtude de não haver necessidade de realizar qualquer preparação prévia da amostra.

Quando as amostras apresentarem suspensões, que possam vir a contaminar a câmara de vaporização do cromatógrafo ou a deteriorar as colunas, procedemos a uma destilação prévia; a duração das análises é pouco aumentada e a precisão obtida é da mesma ordem de grandeza.

1.2.2.1 — Utilização da coluna de FFAP na separação de alguns constituintes dos aromas dos vinhos e das aguardentes, por injecção directa

Condições experimentais

Coluna: FFAP s/ AW-DMCS Chromosorb W. 80-100 mesh
10:90 (coluna em aço inox., diâm. ext. 1/8", comp. 2 m).

Temperatura do forno: 73° C.

Temperatura do bloco de injecção: 150° C.

Temperatura do detector: 100° C.

Gás vector: azoto (30 ml/min).

Detector: FID (hidrogénio — 30 ml/min; ar — 600 ml/min).

Volume de injecção: 1 μ l.

1.2.2.2 — Utilização da coluna de PORAPAK Q. na separação de alguns constituintes dos aromas dos vinhos e das aguardentes, por injeção directa

Condições experimentais

Coluna: PORAPAK Q. 100-120 mesh (coluna em aço inox., diâm. ext. 1/8", comp. 2 m).

Temperatura do forno: 178° C.

Temperatura do bloco de injeção: 205° C.

Temperatura do detector: 188° C.

Gás vector: azoto (30 ml/min).

Detector: FID (hidrogénio — 30 ml/min; ar — 600 ml/min).

Volume de injeção: 1 µl.

1.2.3 — **Extracção dos constituintes dos aromas dos vinhos por um gás inerte**

Um dos métodos de concentração dos constituintes dos aromas dos vinhos que temos utilizado nos nossos trabalhos, e cuja necessidade tivemos já ocasião de referir, consiste em extrair as substâncias voláteis do vinho a analisar por uma corrente de um gás inerte, condensando-as seguidamente; o extracto obtido é então analisado por cromatografia em fase gasosa.

Para pôr este método em execução, guiámo-nos fundamentalmente pelos trabalhos de A. BERTRAND (1968). O vinho a analisar é colocado num vaso de extracção (b, fig. 1) que se encontra num banho-maria termostatado (a); um agitador magnético (e) permite levar o vinho, uniformemente, à temperatura desejada, antes do início da extracção. O gás inerte borbulha no vinho, graças a um tubo mergulhador (d), terminado, na sua parte inferior, por um alongamento tronco-cónico (cuja base, com cerca de 2 cm de diâmetro, é constituída por uma placa de «vidro poroso»). O débito de gás arrastador, que pode ser facilmente medido por intermédio dum fluxímetro de filme de sabão, é regulado por meio duma válvula (n). A pressão é medida com o auxílio dum manómetro de mercúrio (H₁); esta pressão deve ser muito pequena, para um perfeito funcionamento do extractor. As substâncias extraídas pela corrente gasosa são condensadas em dois tubos: um (i),

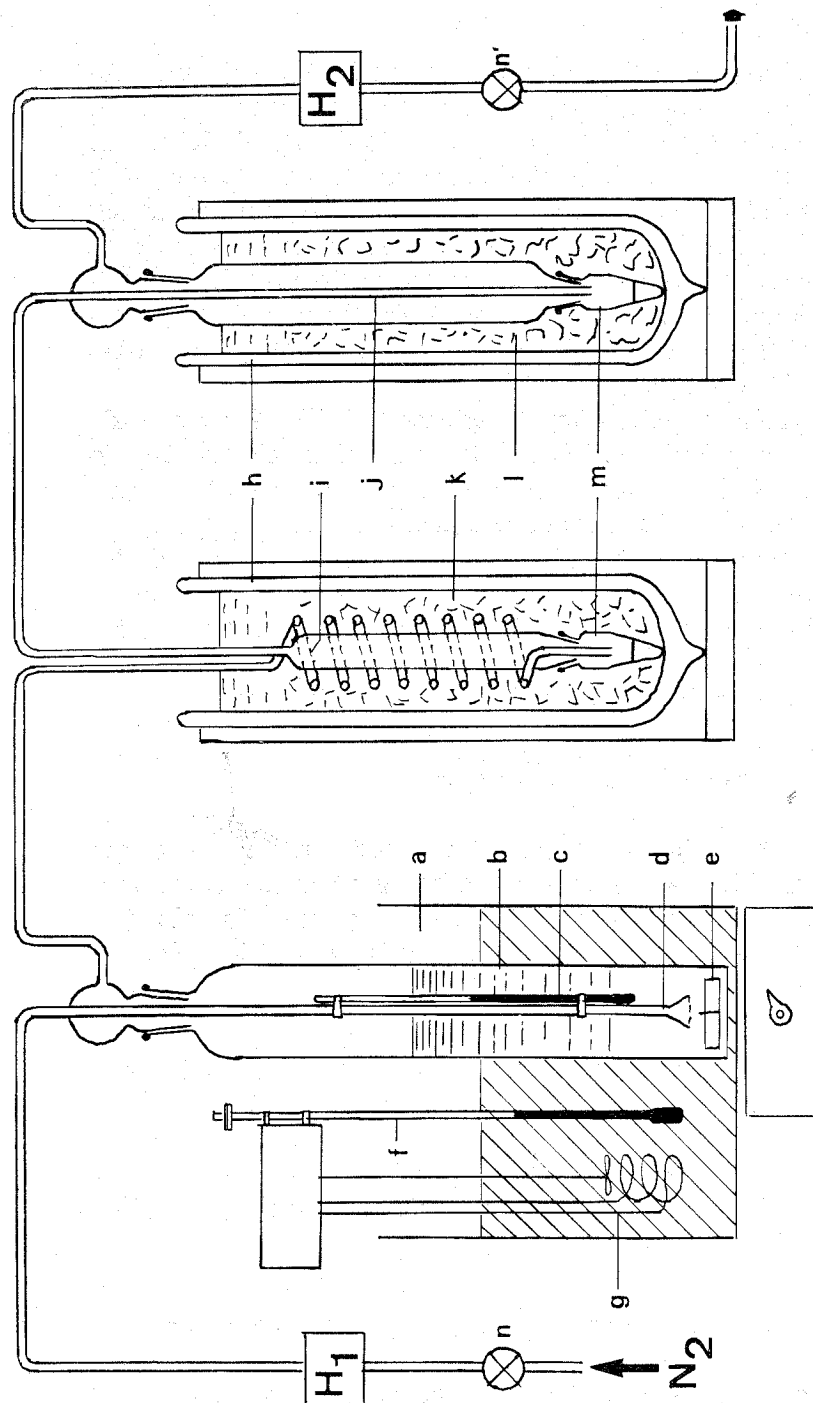


Fig. 1 — Esquema da aparelhagem para a extracção das substâncias voláteis (extraído de «Utilization de la chromatographie en phase gazeuse pour le dosage des constituants volatils du vin», A. BERTRAND, Tese apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Bordéus para o título de Doutor em Química, 1968, pág. 40). a — banho-maria; b — vaso de extracção; c — termómetro; d — tubo mergulhador; e — agitador magnético; f — fluxímetro de contacto; g — resistência para aquecimento do banho-maria; h — mistura água + gelo; i — tubo para condensação das substâncias extraídas; k — mistura água + gelo; l — mistura neve carbónica + acetona; m — recipiente para recolha das substâncias extraídas; n e n' — válvulas; H₁ e H₂ — manómetros de mercúrio.

de forma helicoidal, colocado num vaso de Dewar (h) contendo uma mistura de gelo e água, e outro (j), mais curto e direito, colocado noutro vaso de Dewar (h) contendo uma mistura de neve carbónica e acetona; o primeiro serve para condensar a água arrastada pelo gás inerte, durante a extracção; no segundo, é condensado o extracto a analisar. Todo este conjunto funciona sob um vazio de cerca de 30 cm de mercúrio, destinado a favorecer a extracção das substâncias voláteis; esse vazio, medido com um manómetro de mercúrio (H_2), deve poder ser regulado (válvula n').

Terminada a extracção, o extracto obtido é conservado a $-20^\circ C$, no próprio recipiente em que foi recolhido, tapado com uma rolha de vidro esmerilado, durante todo o tempo necessário aos estudos cromatográficos.

Foi realizado um estudo pormenorizado e criterioso dos parâmetros que podem influenciar as características da extracção, baseado nos referidos trabalhos de A. BERTRAND (1968), parâmetros esses que indicamos seguidamente, assim como um resumo das principais conclusões a que se chegou:

1) *Natureza do gás arrastador*

A influência da natureza do gás arrastador na composição do extracto obtido é praticamente nula; escolheu-se o azoto «R», por razões de natureza económica e de pureza do gás (em comparação com os outros gases utilizáveis — hélio, gás carbónico, etc.).

2) *Débito do gás arrastador e pressão sob a qual é realizada a extracção*

Foi fixado o valor de $150 \text{ cm}^3/\text{min}$, como valor óptimo do débito de gás arrastador; o vazio foi fixado em 31 cm de mercúrio.

3) *Volume de vinho a utilizar em cada extracção*

Um volume de 300 cm^3 é já suficiente para se poder obter uma quantidade de extracto perfeitamente utilizável.

4) *Tempo de extracção*

A. BERTRAND (1968) chegou à conclusão que o tempo de extracção que fornece os melhores resultados é da ordem dos 30 minutos; contudo, pelo menos nas condições em que trabalhamos, um tempo ainda mais curto (20 minutos) fornece resultados mais interessantes, continuando a quantidade de extracto obtido a ser perfeitamente utilizável; na verdade, a concentração das substâncias muito voláteis (extraídas no início da operação), no extracto obtido, diminui com a duração da extracção, pois vão sendo diluídas pelo etanol extraído (a quantidade de etanol extraído é aproximadamente proporcional à duração da extracção).

5) *Temperatura da extracção*

Foi fixada em $25^\circ C$, pois além de ser fácil de se conseguir, permite que as amostras sejam levadas rapidamente a uma mesma temperatura; é suficientemente baixa para não originar modificações apreciáveis no vinho a extrair.

6) *Influência da saturação do vinho por um sal mineral*

Verificou-se que a saturação dum vinho por um sal mineral (cloreto de sódio ou sulfato de amónio, por exemplo) vem enriquecer o extracto obtido em substâncias voláteis; na verdade, essa saturação, diminuindo a tensão de vapor da água, vem favorecer a extracção das outras substâncias.

7) *Formas e dimensões dos diferentes elementos do extractor*

A influência das formas e dimensões dos diferentes elementos do extractor, muito em especial dos tubos em que se processa a condensação da água e das substâncias voláteis extraídas, é bastante acentuada.

Análise cromatográfica

Condições experimentais

Coluna: Carbowax 400 + Hallcomid M-18 s/ Chromosorb W. 80-100 mesh (coluna em aço inox., diâm. ext. $1/8''$, comp. 2 m).

Temperatura do forno: 90° C.

Temperatura do bloco de injeção: 175° C.

Temperatura do detector: 162° C.

Gás vector: azoto (20 ml/min).

Detector: FID (hidrogénio — 30 ml/min; ar — 600 ml/min).

Volume de injeção: 1 µl.

1.2.4 — Extracção dos constituintes dos aromas dos vinhos por solventes orgânicos. Utilização do pentano como solvente extractor

A extracção dos constituintes dos aromas dos vinhos por um solvente orgânico constitui o método de concentração dessas substâncias mais generalizadamente empregue no seu estudo.

Têm sido estudadas diversas técnicas de extracção e ensaiados diversos solventes — pentano, cloreto de metileno, mistura azeotrópica éter etílico/pentano (2/1, v/v), mistura éter etílico/acetona (1/1, v/v), mistura hexano/acetona (2/1, v/v) e éter de petróleo.

Nos nossos trabalhos, temos utilizado o pentano, como solvente extractor, realizando a extracção em contínuo, durante 240 h, com base na técnica estudada por J.N. BOIDRON, P. RIBÉREAU-GAYON e A. D. WEBB (1964, 1967).

Em cada operação, o volume de vinho a extrair é cerca de 1.5 l, e o de pentano de 0.4 a 0.5 l; o vinho é transvasado para o extractor, sob uma atmosfera de azoto, com o objectivo de se evitar, tanto quanto possível, a oxidação de determinados constituintes; pela mesma razão, toda a operação de extracção é igualmente realizada sob uma atmosfera de azoto.

Terminada a operação de extracção, a fase extractora é seca por sulfato de sódio anidro, e o solvente é eliminado por destilação à pressão atmosférica; obtém-se um extracto (0.5 a 1 ml), não totalmente isento de pentano residual, que será conservado até ao momento das análises, a -4° C e sob uma atmosfera de azoto (A. WEBB, P. RIBÉREAU-GAYON & J.-N. BOIDRON, 1964).

1.2.4.1 — Estudo dos ácidos livres

Segundo A. WEBB, P. RIBÉREAU-GAYON & J.-N. BOIDRON (1964), o extracto obtido é tratado com uma solução aquosa

de Na₂CO₃ a 10 %, à qual se adiciona uma quantidade igual de éter; os ácidos livres são transformados em sais de sódio solúveis na fase aquosa, permanecendo as outras substâncias na fase etérea. A fase aquosa, após ser separada da fase etérea, é tratada com H₂SO₄ 5N; os ácidos então libertados são extraídos de novo pelo éter etílico; essa solução etérea é seca por sulfato de sódio anidro e o solvente é eliminado por destilação à pressão atmosférica; obtém-se um resíduo oleoso, contendo todos os ácidos gordos livres do extracto inicial (fracção I).

No estudo desses ácidos, por cromatografia em fase gasosa, utilizámos duas técnicas diferentes: separação directa dos ácidos, em coluna de FFAP, e separação dos correspondentes ésteres metílicos, em coluna de NPGA.

1.2.4.1.1 — Separação cromatográfica dos ácidos (directamente)

Condições experimentais

Coluna: FFAP s/ AW-DMCS Chromosorb W. 80-100 mesh 10:90 (coluna em aço inox., diâm. ext. 1/8", comp. 2 m).

Temperatura do forno: 148° C.

Temperatura do bloco de injeção: 273° C.

Temperatura do detector: 190° C.

Gás vector: azoto (17.5 ml/min).

Detector: FID (hidrogénio — 30 ml/min; ar — 600 ml/min).

Volume de injeção: 1.5 µl.

1.2.4.1.2 — Preparação e separação dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos a identificar

Em virtude das dificuldades existentes na preparação de alguns ésteres metílicos, por intermédio do metanol em presença do trifluoreto de boro, decidimo-nos pela técnica de metilação pelo diazometano, utilizada por A. D. WEBB, P. RIBÉREAU-GAYON & J.-N. BOIDRON (1964); preparou-se este reagente, no momento da sua utilização, pela acção da nitrosometil-ureia sobre o hidróxido de potássio, segundo a reacção:



Os ésteres metílicos obtidos foram separados por cromatografia em fase gasosa, nas condições experimentais indicadas seguidamente.

Condições experimentais

Coluna: NPGA s/ AW-DMCS Chromosorb G. 80-100 mesh 10:90 (coluna em aço inox., diâm. ext. 1/8", comp. 2 m).

Temperatura do forno: 130° C.

Temperatura do bloco de injeção: 203° C.

Temperatura do detector: 155° C.

Gás vector: azoto (14,5 ml/min).

Detector: FID (hidrogénio — 30 ml/min; ar — 600 ml/min).

Volume de injeção: 0.5 µl.

1.2.4.2 — Estudo dos éteres

Realizada a extracção das substâncias aromáticas, pelo pentano, tratou-se o extracto obtido com uma solução aquosa de carbonato de sódio a 10 % e uma quantidade igual de éter, como focámos anteriormente — os ácidos, sob a forma de sais de sódio, permanecem na solução aquosa, e os constituintes neutros ficam, inalterados, na fase etérea; realizada a separação dessas duas fases, secou-se a solução etérea com sulfato de sódio anidro e eliminou-se o éter dessa solução, por evaporação: obteve-se assim a fracção neutra do extracto (fracção II), que se analisou por cromatografia em fase gasosa.

Efectuada essa análise cromatográfica, os ésteres, constituintes desta fracção, foram saponificados pelo hidróxido de potássio N, em dietileno-glicol, a 130° C, durante aproximadamente 30 minutos, e sob pressão (A. D. WEBB, P. RIBÉREAU-GAYON & J.-N. BOIDRON, 1964); realizada a saponificação, a mistura reaccional foi arrefecida rapidamente e diluída com água. Seguidamente, procedeu-se a uma extracção com éter etílico dos constituintes neutros dessa mistura: os ácidos resultantes da saponificação, sob a forma de sais de potássio, permanecem na solução aquosa (solução A), enquanto que os álcoois, igualmente provenientes da saponificação, passam, juntamente com as substâncias insaponificáveis, para a fase etérea, a qual, após eliminação do éter, conduz à fracção III, que foi

igualmente analisada por cromatografia em fase gasosa, nas condições experimentais utilizadas no estudo da fracção II.

Da análise dos cromatogramas correspondentes às fracções II e III (antes e depois da saponificação), poder-se-ão tirar algumas conclusões quanto à identificação dos ésteres presentes no extracto inicial, atendendo a que:

- a) As substâncias existentes em concentrações mais elevadas na fracção III que na fracção II deverão corresponder a álcoois parcialmente livres e parcialmente esterificados, no extracto inicial.
- b) As substâncias existentes na fracção III, mas inexistentes na fracção II, deverão corresponder a álcoois inteiramente esterificados, no extracto inicial.
- c) As substâncias existentes na fracção II, mas inexistentes na fracção III, deverão corresponder a ésteres.

Finalmente, a solução A, contendo, sob a forma de sais de potássio, os ácidos provenientes da referida saponificação, foi tratada com H₂SO₄ concentrado, procedendo-se em seguida a uma extracção com éter etílico; esses referidos ácidos, assim regenerados, passam para a fase etérea a qual, por eliminação do solvente, conduz à fracção IV, que foi igualmente analisada por cromatografia em fase gasosa, segundo a técnica por nós indicada anteriormente a propósito do estudo dos ácidos livres (análise cromatográfica dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos a estudar).

1.2.4.2.1 — *Análise por cromatografia em fase gasosa, da fracção II*

Condições experimentais

Coluna: NPGA s/ AW-DMCS Chromosorb G. 80-100 mesh 10:90 (coluna em aço inox., diâm. ext. 1/8", comp. 2 m).

Temperatura do forno: 150° C.

Temperatura do bloco de injeção: 189° C.

Temperatura do detector: 168° C.

Gás vector: azoto (14 ml/min).

Detector: FID (hidrogénio — 30 ml/min; ar — 600 ml/min).

Volume de injeção: 1 µl.

1.2.4.2.2 — *Análise, por cromatografia em fase gasosa, da fracção III*

Condições experimentais

As utilizadas na análise da fracção II.

1.2.4.2.3 — *Análise, por cromatografia em fase gasosa, dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos constituintes da fracção IV*

Condições experimentais

Coluna: NPGA s/ AW-DMCS Chromosorb G. 80-100 mesh 10:90 (coluna em aço inox., diâm. ext. 1/8", comp. 2 m).

Temperatura do forno: 130° C.

Temperatura do bloco de injeção: 203° C.

Temperatura do detector: 155° C.

Gás vector: azoto (30 ml/min).

Detector: FID (hidrogénio — 30 ml/min; ar — 600 ml/min).

Volume de injeção: 0.5 µl.

1.2.4.3 — *Estudo dos álcoois*

Os álcoois livres presentes no extracto inicial foram estudados directamente (fracção II), por cromatografia em fase gasosa, nas condições referidas seguidamente.

Condições experimentais

Coluna: NPGA s/ AW-DMCS Chromosorb G. 80-100 mesh 10:90 (coluna em aço inox., diâm. ext. 1/8", comp. 2 m).

Temperatura do forno: 85° C.

Temperatura do bloco de injeção: 164° C.

Temperatura do detector: 115° C.

Gás vector: azoto (30 ml/min).

Detector: FID (hidrogénio — 30 ml/min; ar — 600 ml/min).

Volume de injeção: 1 µl.

1.2.4.4 — *Estudo dos compostos carbonilados*

Os compostos carbonilados foram também estudados directamente (fracção neutra do extracto inicial), por cromatografia em fase gasosa, em condições experimentais semelhantes às utilizadas no estudo dos álcoois livres.

Condições experimentais

Coluna: NPGA s/ AW-DMCS Chromosorb G. 80-100 mesh 10:90 (coluna em aço inox., diâm. ext. 1/8", comp. 2 m).

Temperatura do forno: 87° C.

Temperatura do bloco de injeção: 162° C.

Temperatura do detector: 112° C.

Gás vector: azoto (30 ml/min).

Detector: FID (hidrogénio — 30 ml/min; ar — 600 ml/min).

Volume de injeção: 1 µl.

1.3 — **DOSEAMENTO DOS CONSTITUINTES DOS AROMAS DOS VINHOS E DAS AGUARDENTES, POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA**

1.3.1 — **Doseamento por injeção directa**

Por injeção directa da amostra a analisar (vinho ou aguardente) na câmara de vaporização do cromatógrafo, foi-nos já possível dosear diversos constituintes dessas bebidas; como já dissemos anteriormente, não havendo necessidade de qualquer preparação prévia da amostra, a precisão obtida é boa e as análises tornam-se extremamente rápidas.

Os constituintes dos vinhos e das aguardentes que doseámos por este método foram: metanol, propanol-1, metil-2 propanol-1, metil-3 butanol-1, metil-2 butanol-1, etanal e acetato de etilo; o metil-3 butanol-1 e o metil-2 butanol-1, separados em coluna de Diglicerol, foram por nós doseados conjuntamente. As condições experimentais utilizadas foram já referidas anteriormente (alíneas 1.2.2.1 e 1.2.2.2).

1.3.2 — **Doseamento após extracção por um gás inerte**

Não foi ainda concluído o estudo da aplicação deste método (extracção das substâncias voláteis por um gás inerte) à análise quantitativa dos constituintes dos aromas dos vinhos. Contudo, dos estudos já efectuados, podemos desde já tirar algumas conclusões, que passamos a expor:

- a) Como vimos anteriormente, a influência dos diferentes parâmetros de que depende a extracção sobre a com-

posição do extracto obtido é enorme, pelo que se torna fundamental fixar perfeitamente os valores desses parâmetros, antes da realização de qualquer série de análises. Ter-se-á igualmente que atender, como referiu A. BERTRAND (1968), à influência do grau alcoólico do meio a analisar sobre a composição do extracto.

- b) Pretendendo analisar-se quantitativamente os constituintes dos vinhos, presentes no extracto obtido por este método, torna-se absolutamente necessário conhecer as razões das massas dessas substâncias no extracto e no meio a analisar, isto é, os coeficientes de extracção; para tal, seremos levados a efectuar uma série de ensaios destinados a determinar experimentalmente esses coeficientes.
- c) Do que dissemos, concluímos desde já que este método de doseamento, em comparação com o de injeção directa, apresenta uma primeira grande desvantagem: o tempo da duração das análises é muito mais longo; além disso, verificámos ainda experimentalmente que, também em comparação com o método de injeção directa, a reprodutibilidade das análises e a precisão obtida são um pouco inferiores. Por tudo isto, somos levados a concluir que o método de doseamento baseado numa extracção deste tipo só será de utilizar para o caso de substâncias existentes nos vinhos com concentrações tão baixas que se torne completamente impossível proceder ao seu doseamento por injeção directa, e que, além disso, apresentem coeficientes de extracção suficientemente elevados.

2 — RESULTADOS OBTIDOS

Apresentamos seguidamente os resultados obtidos e as principais conclusões que inferimos da aplicação dos diferentes métodos indicados anteriormente ao estudo da composição qualitativa dos aromas de diversas amostras de vinhos portugueses. O método de injeção directa foi igualmente aplicado a diversas amostras de aguardentes, tendo-se chegado aos mesmos resultados que nos vinhos, quanto à natureza das substâncias identificadas.

2.1 — INJEÇÃO DIRECTA

2.1.1 — Utilização da coluna de FFAP

De acordo com as condições experimentais indicadas em 1.2.2.1, elaborámos o Quadro I, que apresentamos seguidamente.

QUADRO I

Tempos de retenção das substâncias identificadas, relativos ao do metil-3 butanol-1

Substância identificada	Tempo de retenção relativo ao do metil-3 butanol-1
acetato de etilo	0.21
etanol	0.27
metil-2 propanol-1	0.52
metil-3 butanol-1 (*)	1.00
metil-2 butanol-1 (*)	1.00

(*) Estes compostos são separados em coluna de Diglicerol.

2.1.2 — Utilização da coluna de PORAPAK Q

Apresentamos seguidamente o Quadro II, elaborado de acordo com as condições experimentais indicadas em 1.2.2.2

QUADRO II

Tempos de retenção das substâncias identificadas, relativos ao do metil-3 butanol-1

Substância identificada	Tempo de retenção relativo ao do metil-3 butanol-1
metanol	0.08
etanol	0.14
propanol-1	0.28
metil-2 propanol-1	0.48
metil-3 butanol-1 (*)	1.00
metil-2 butanol-1 (*)	1.00
etanal	0.10

(*) Estes compostos são separados em coluna de Diglicerol.

2.2 — EXTRACÇÃO POR UM GÁS INERTE (AZOTO)

Os tempos de retenção das substâncias indicadas, relativos ao do metil-3 butanol-1, e de acordo com as condições experimentais indicadas em 1.2.3, são apresentados no Quadro seguinte.

QUADRO III

Tempos de retenção das substâncias identificadas, relativos ao do metil-3 butanol-1

Substância identificada	Tempo de retenção relativo ao do metil-3 butanol-1
acetato de metilo (*)	0.16
acetato de etilo	0.20
acetato de n-butilo (*)	0.63
acetato de isoamilo	0.92
metanol	0.16
etanol	0.20
propanol-1	0.34
butanol-1	0.63
pentanol-1	1.27
butanol-2	0.34
metil-2 propanol-1	0.49
metil-3 butanol-1 (**)	1.00
metil-2 butanol-1 (**)	1.00
acetona (*)	0.16

(*) Existem ainda dúvidas quanto à identificação destes compostos.

(**) Estes compostos são separados em coluna de Diglicerol.

2.3 — EXTRACÇÃO PELO PENTANO

2.3.1 — Estudo dos ácidos livres

2.3.1.1 — Separação cromatográfica dos ácidos

A separação directa dos ácidos livres, de acordo com as condições experimentais indicadas em 1.2.4.1.1, conduziu aos valores apresentados no Quadro IV.

QUADRO IV

Tempos de retenção dos ácidos identificados, relativos ao do ácido capróico

Ácido identificado	Tempo de retenção relativo ao do ácido capróico
ácido n-butírico	0.39
ácido isovalérico	0.50
ácido capróico	1.00
ácido heptanóico	1.42
ácido caprílico	2.45

2.3.1.2 — Separação dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos a identificar

No Quadro V, apresentamos os valores obtidos, referente a essa separação, de acordo com as condições experimentais indicadas em 1.2.4.1.2

QUADRO V

Tempos de retenção dos ésteres metílicos identificados, relativos ao do caprilato de metilo

Éster identificado	Tempo de retenção relativo ao do caprilato de metilo
n-butirato de metilo	0.13
isovalerato de metilo	0.20
n-valerato de metilo (*)	0.22
caproato de metilo	0.38
heptanoato de metilo	0.65
caprilato de metilo	1.00
pelargonato de metilo	1.62
caprato de metilo (*)	2.63
undecanoato de metilo	4.50
laurato de metilo	7.45
undecilenato de metilo (*)	4.00
succinato de etilo e metilo (*)	2.05

(*) Existem ainda dúvidas quanto à identificação destes compostos.

2.3.2 — Estudo dos ésteres

2.3.2.1 — Análise da fracção II

Os valores obtidos, de acordo com as condições experimentais indicadas em 1.2.4.2.1, são apresentados no Quadro VI.

QUADRO VI

Tempos de retenção das substâncias identificadas, relativos ao do metil-3 butanol-1

Substância identificada	Tempo de retenção relativo ao do metil-3 butanol-1
acetato de etilo	0.23
n-butilato de etilo	0.77
acetato de isoamilo (*)	1.00
lactato de etilo	1.77
succinato de dietilo	5.55
acetato de fenil-2 etilo	6.45
metanol	0.21
etanol	0.25
metil-2 butanol-1 (**)	1.00
metil-3 butanol-1 (**)	1.00
hexanol-1	2.00
fenil-2 etanol (*)	6.45

(*) Existem ainda dúvidas quanto à identificação destes compostos.

(**) Estes compostos são separados em coluna de Diglicerol.

2.3.2.2 — Análise da fracção III

A análise da fracção III (condições experimentais indicados em 1.2.4.2.1) conduziu aos valores apresentados no Quadro VII.

QUADRO VII

Substância identificada	Tempo de retenção relativo ao do metil-3 butanol-1
metanol	0.21
etanol	0.25
metil-2 butanol-1 (*)	1.00
metil-3 butanol-1 (*)	1.00
hexanol-1	2.00
fenil-2 etanol	6.45

Obs. — As concentrações de todos estes álcoois são nitidamente superiores nesta fracção III que na fracção II.

(*) Estes compostos são separados em coluna de Diglicerol.

2.3.2.3 — Análise dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos constituintes da fracção IV

A análise desses ésteres, de acordo com as condições experimentais indicadas em 1.2.4.2.3, conduziu aos valores apresentados no Quadro VIII.

QUADRO VIII

Tempos de retenção dos ésteres metílicos identificados, relativos ao do caprilato de metilo

Éster identificado	Tempo de retenção relativo ao do caprilato de metilo
acetato de metilo	0.03
n-butilato de metilo	0.13
n-valerato de metilo	0.22
caproato de metilo	0.38
heptanoato de metilo	0.65
caprilato de metilo	1.00
succinato de metilo e etilo	2.05

2.3.2.4 — Ésteres identificados

Associando todos estes resultados experimentais ao que dissemos anteriormente sobre a análise dos cromatogramas obtidos, poderemos concluir quais os ésteres identificados no extracto obtido do vinho ensaiado: acetato de etilo, n-butilato de etilo, succinato de dietilo, acetato de fenil-2 etilo e, existindo ainda dúvidas quanto à sua identificação, lactato de etilo.

2.3.3 — Estudo dos álcoois

No Quadro IX, apresentamos os tempos de retenção relativos aos álcoois identificados, relativamente às condições experimentais indicadas em 1.2.4.3

QUADRO IX

Tempos de retenção dos álcoois identificados, relativos ao do metil-3 butanol-1

Álcool identificado	Tempo de retenção relativo ao do metil-3 butanol-1
etanol	0.25
propanol-1	0.34
butanol-2	0.38
metil-2 propanol-1	0.50
butanol-1	0.58
metil-2 butanol-1 (*)	1.00
metil-3 butanol-1 (*)	1.00
hexanol-1	2.10

(*) Estes compostos são separados em coluna de Diglicerol.

Obs. — No estudo dos ésteres, como vimos anteriormente, foram ainda identificados mais dois álcoois, nas condições experimentais então utilizadas: metanol e fenil-2 etanol.

2.3.4 — Estudo dos compostos carbonilados

Os resultados obtidos, de acordo com as condições experimentais indicadas em 1.2.4.4, são apresentados no Quadro X.

QUADRO X

Tempos de retenção dos compostos identificados, relativos ao do etanal

Composto identificado	Tempo de retenção relativo ao do etanal
etanal	1.00
acetona	1.58

Obs. — O estudo destes referidos compostos carbonilados encontra-se ainda longe de estar concluído; contudo, e além dos compostos perfeitamente identificados (etanal e acetona) a que nos referimos anteriormente, verificámos ainda a possibilidade de existência de formaldeído, não confirmada no entanto. Foi ainda ensaiada uma técnica de identificação destes referidos compostos, com base na preparação e análise de correspondentes derivados químicos — reacção dos compostos carbonilados com

2,4-dinitrofenilhidrazina e subsequente análise, por cromatografia em fase gasosa, do precipitado obtido e da fase sobrenadante; contudo, o estudo deste método de identificação não foi ainda concluído, por razões de ordem vária (J.-N. BOIDRON, P. RIBÉREAU-GAYON, 1967).

RESUMO

No presente trabalho, foi feito um estudo da aplicação do cromatografia em fase gasosa à identificação e ao doseamento dos constituintes dos aromas dos vinhos e das aguardentes.

Paralelamente, foi também efectuado um estudo de dois processos de extracção e concentração desses referidos constituintes — extracção por arrastamento por azoto e extracção em contínuo pelo pentano; essas técnicas de extracção são sobretudo necessárias na análise dos constituintes existentes em concentrações muito fracas, nos meios a analisar.

Dos resultados a que se chegou, pode concluir-se que:

- a) Por simples injeção directa da amostra a analisar, no cromatógrafo, foi possível identificar e dosear, com uma boa precisão, diversos constituintes dos aromas dos vinhos e aguardentes, existentes em concentrações não muito pequenas (em geral, superiores a 10 mg/l).
- b) Para alguns dos constituintes dos aromas dos vinhos, existentes em concentrações mais baixas, sobretudo os mais voláteis, foi ainda possível proceder ao seu doseamento, por recurso à técnica de extracção das substâncias voláteis por arrastamento por azoto.
- c) Com o auxílio da técnica de extracção por solventes orgânicos, nomeadamente com o emprego de pentano, foi ainda possível identificar um grande número de constituintes dos aromas dos vinhos, não identificados pelos outros métodos ensaiados.

RÉSUMÉ

Dans ce travail, on a fait un étude de l'application de la chromatographie en phase gazeuse à l'identification et dosage des constituants des arômes des vins et des eaux-de-vie.

En même temps, on a fait un étude de deux méthodes d'extraction et concentration de ces constituants-extraction par barbotage d'azote et extraction en continu par le pentane; ces méthodes d'extraction sont surtout nécessaires à l'analyse des constituants présents en de très faibles quantités dans les produits à analyser.

Les résultats conduisent aux observations suivantes:

- a) Par simple injection directe de l'échantillon à analyser, a été possible d'identifier et doser, avec une bonne précision, divers constituants des arômes des vins et des eaux-de-vie, présents en des concentrations raisonnables (en général, au-dessus de 10 mg/l).
- b) Pour quelques constituants des arômes des vins, présents en concentrations plus faibles, surtout les plus volatils, a été encore possible de faire son dosage, à l'aide de la technique d'extraction des substances volatiles par barbotage d'azote.
- c) À l'aide de la technique d'extraction par des solvants organiques, en particulier à l'emploi du pentane, a été encore possible d'identifier un grand nombre de constituants des arômes des vins, pas encore identifiés par les autres méthodes essayés.

SUMMARY

In the present work, it has been studied the application of gas chromatography in quantitative analysis of the aroma of wines and brandies.

It has also been studied two different procedures to extract and concentrate the components — extraction by nitrogen current and a continuous extraction by pentane; these extractions are specially necessary in the analysis of the less concentrated components in the samples.

We have found that:

- a) By direct injection of the sample, it has been possible to identify and measure, with a good accuracy, several components of wines and brandies, present not in very high concentrations (generally, above 10 mg/l).

- b) For some components of the aroma of wines, present in very low concentrations, specially the most volatile, it has still been possible to make their quantitative analysis, using the extraction of volatile components by nitrogen current.
- c) With the extraction by organic solvents, namely pentane, it has been possible to identify a great number of components in the aroma of wines, not yet identified by the other applied methods.

BIBLIOGRAFIA

- ANDRE, L.
1966 Caractérisation des composés carbonylés et dosage de l'acétaldéhyde dans certains vins par chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Techn. Agric.*, **15** (2): 159-171.
- BERTRAND, A.
1968 Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour le dosage des constituants volatils du vin. Thèse de doct. Fac. Sciences de l'Université de Bordeaux.
- BOIDRON, J.-N. & RIBÉREAU-GAYON, P.
1967 Les techniques de laboratoire appliquées à l'identification des arômes des vins. *Ind. Alim. Agric.* (6): 883-893.
- KEPNER, R., WEBB, A. & MAGGIORA, L.
1968 Sherry aroma. VII—Some volatile components of Flor Sherry of spanish origin (Acidic compounds). *Am. J. Enol. Vitic.*, **19** (2): 116-120.
- RIBÉREAU-GAYON, P.
1964 L'acetate d'ethyle dans les vins, son dosage par chromatographie en phase gazeuse. *Qual. Plant. et Mat. Veget.*, sep. 2-4.
- USSEGlio-TOMASSET, L.
1966 L'aroma di moscato nelle uve e nei vini. *Est. da Ind. Agr.*, **4** (5): 1-31.
- WEBB, A., KEPNER, R. & GALETTO, W.
1964 Comparison of the aromas of Flor Sherry, Baked Sherry and Submerged-culture Sherry. *Am. J. Enol. Vitic.*, **15** (1): 1-10.
- WEBB, A., KEPNER, R. & MAGGIORA, L.
1969 Some volatile components of wines of Vitis Vinifera, varieties Carbernet-Sauvignon and Ruby Cabernet. II—Acidic compounds. *Am. J. Enol. Vitic.*, **20** (1): 25-31.
- WEBB, A., RIBÉREAU-GAYON, P. & BOIDRON, J.-N.
1963 Premières observations sur l'étude des substances odorantes des vins. *Acad. d'Agric. France*: 115-123.
1964 Composition d'une essence extraite d'un vin de V. Vinifera (var. Cabernet-Sauvignon). *Ext. du Bull. de la Soc. Chim. de France*: 1415-1420.

DE VINEA ET VINO PORTUGALIÆ DOCUMENTA

Abrev.: *Vin. Port. Doc.*

TRABALHOS PUBLICADOS:

VOLUME VI

Série II — ENOLOGIA

- 1 . *Garcia, António Sérgio Curvelo e Ana Maria de Oliveira Simões* —
Utilização da cromatografia em fase gasosa no estudo dos aromas
dos vinhos e das aguardentes.