

ANÁLISE DE MOSTOS E VINHOS

I. MÉTODOS DE DOSEAMENTO DE AÇÚCARES

M. ARMINDA ALVES e MARGARIDA A. FERREIRA

Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia,
Universidade do Porto

RESUMO

Mencionam-se as técnicas utilizadas na análise dos açúcares dos mostos e dos vinhos durante o nosso século.

Faz-se um estudo comparativo dos vários processos actualmente disponíveis e aceites — métodos químicos, enzimáticos e cromatográficos — com base na rapidez e na facilidade de execução, e em termos de repetibilidade, precisão, exactidão e custos.

Sallentam-se as vantagens e inconvenientes dos métodos de cromatografia em fase gasosa e de cromatografia líquida de alta pressão. Dada a rapidez, simplicidade e precisão deste último, selecciona-se como o método preferencial de análise dos açúcares.

INTRODUÇÃO

A importância do estudo enológico dos açúcares nos mostos e nos vinhos deve-se fundamentalmente ao papel determinante que estes assumem no futuro teor alcoólico dos vinhos e nas características organolépticas. Não só é relevante o estudo dos açúcares totais, mas também a sua quantificação individualizada. De facto, a natureza dos açúcares dum vinho e as suas proporções relativas influenciam as suas características sápidas. Tomando o sabor açucarado da sacarose como unitário, considera-se vulgarmente o poder edulcorante da frutose igual a 1,73, da glucose a 0,74 e das pentoses a 0,4. Assim, para um mesmo teor em açúcares redutores, o sabor açucarado de um vinho doce depende fundamentalmente da relação entre os seus açúcares maioritários, frutose e glucose.

Do ponto de vista comercial, que se confunde com o interesse enológico, é importante o doseamento dos açúcares na manutenção e uniformidade da marca e tipicidade de vinho.

OS AÇÚCARES NOS MOSTOS E NOS VINHOS

Como referência aos açúcares já detectados e quantificados em mostos e vinhos, inscrevem-se no Quadro I os citados em Amerine e Joslyn (1970), Curvelo-Garcia (1988), Ribeiro (1961-1962) e Ribéreau-Gayon (1976). Incluem-se referências ao vinho do Porto, devido ao interesse particular no estudo e caracterização deste vinho.

QUADRO I

Os açúcares nos mostos e nos vinhos
Les sucres dans les moûts et les vins

	Mostos (g/l)	Vinhos (g/l)	Vinhos do Porto (g/l)
frutose	5-100	0,5-2	20-75
glucose	5-100	0,5-2	20-75
ribose	0,1	< 0,1	< 0,1
ramnose	0,1	< 0,1	< 0,1
arabinose	0,26-1,65	< 0,1	< 0,1
xilose	0,00-0,44	< 0,1	< 0,1
sacarose	2-5	< 0,1	< 0,1
maltose	< 0,1	< 0,1	< 0,1
lactose	< 0,1	< 0,1	< 0,1
rafinose	< 0,1	< 0,1	< 0,1
melibiose	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Os dois constituintes mais abundantes são monossacáridos, hexoses, nomeadamente D-frutose e D-glucose, presentes em quantidades muito variáveis, dependentes do grau de maturação das uvas, castas e outros factores. O teor conjunto dos dois açúcares varia de 150 a 200 g/l nos mostos (Ribéreau-Gayon, 1976), de 1 a 4 g/l nos vinhos de consumo (Ribéreau-Gayon, 1976) e de 40 a 150 g/l nos vinhos do Porto (Ribeiro, 1961-1962). A acumulação de ambos até ao período de maturação pode ir

desde 10 a 15 g/l na uva verde até 200 g/l na uva pintada. Dentro dos monossacáridos, existem também as pentoses, considerados açúcares não fermentescíveis pelas leveduras. Aparecem nos mostos no estado combinado, donde são libertados no decurso da fermentação, em teores de 0,3 a 2 g/l (Amerine e Joslyn, 1970). São essencialmente a arabinose (0,26 a 1,65 g/l), a xilose (0 a 0,44 g/l), a ribose (0,1 g/l) e a ramnose (0,1 g/l) (Ribeiro, 1961-1962 e Curvelo-Garcia, 1988). A presença de di- e trissacáridos também foi detectada: respectivamente, a sacarose (2 a 5 g/l nos mostos e vestígios no vinho), a maltose, a lactose e a rafinose (vestígios) e a melibiose (vestígios) (Ribéreau-Gayon, 1976).

REVISÃO CRONOLÓGICA DOS MÉTODOS DE DOSEAMENTO DOS AÇÚCARES

Métodos físicos

Como método quantitativo de avaliação dos açúcares deve-se a Baumé, em 1766 (Azevedo, 1973), a utilização dos primeiros densímetros destinados a pesar líquidos *mais ou menos ricos em açúcar*, denominados vulgarmente areómetros. Surgiram inúmeras variantes, até se reconhecer a necessidade de criar um areómetro específico para mostos e vinhos, o qual veio a aparecer no início do séc. XX, sob o nome de pesa-mostos. Este instrumento apresentava uma graduação correspondente à escala Baumé (escala convertível em pesos específicos) e dava uma ideia da riqueza sacarina do mosto. Em 1881, depois dos consagrados trabalhos de Gay-Lussac que estabeleceu em bases físicas conhecidas e cientificamente definidas o seu famoso densímetro, a Casa Salleron em Paris construiu, para controlo dos mostos, o mostímetro, ainda hoje utilizado pelo vinicultor dos nossos dias para conhecer o teor em açúcar do mosto e o seu grau alcoólico em potência (cerca de 17 g/l de açúcar <> 1° alcoólico). Neste instrumento existem duas escalas: densidade ou peso de um litro de mosto e grau alcoólico após a fermentação.

Estes métodos são extremamente limitativos, influenciáveis por substâncias estranhas passíveis de dosear como açúcares. Por este facto, apenas se devem utilizar em mostos de compo-

sição normal e provenientes de uvas em bom estado sanitário. Actualmente, ainda são utilizadas:

- 1) *a densimetria*, através dos areómetros já referidos e cuja conversão em teor de açúcares foi proposta por Jaulmes, em 1966 (Curvelo-Garcia, 1988);
- 2) *a refractometria*, com base na determinação do índice de refacção dos açúcares e fórmulas de conversão de Jaulmes, em 1966 (Curvelo-Garcia, 1988);
- 3) *a polarimetria*, baseada no poder rotatório conferido pela assimetria molecular dos açúcares; esta técnica exige a defecação prévia do vinho para eliminar as substâncias estranhas dotadas de poder rotatório e por isso passíveis de serem abrangidas no doseamento.

A densimetria e a refractometria possibilitam a análise quantitativa dos açúcares em excesso, estimando-se que 5% representem substâncias estranhas, nomeadamente polifenóis, gliceróis e pigmentos corados (Vine, 1981). A polarimetria é usada na avaliação da relação frutose/glucose e na determinação da sacarose, embora seja um método impreciso.

Métodos químicos

Os métodos químicos, surgidos no início do séc. XX, baseiam-se nas propriedades redutoras dos açúcares sobre os halogéneos e certos iões de metais pesados, normalmente o ião cúprico.

Exigem uma defecação prévia, operação necessária para eliminar as substâncias interferentes, com particular relevo para proteínas e polifenóis. A defecação actualmente indicada pelo OIV e pela CEE efectua-se com acetato de chumbo ou com ferrocianeto de zinco e é também a adoptada pela norma oficial portuguesa (Portaria 985/82 e pr NP-2223).

O doseamento propriamente dito pode ser efectuado por diversos métodos (Curvelo-Garcia, 1988), dos quais destacamos:

- 1) *método iodométrico de Luff-Schoorl* — método do OIV (doc. OIV 1373/86), adoptado em Portugal (NP-2223) e também método oficial comunitário;

- 2) *método de Lane e Eynon* — utilizado nos vinhos do Porto e estudado largamente por Ribeiro (1961-1962) — método oficial da AOAC (Amerine e Ough, 1980);
- 3) *método ponderal de Munson e Walker* — método oficial (Portaria 985/82);
- 4) *método de Bertrand*;
- 5) *método de Rebelein* — adaptação do método de Loof-Schoorl, visando maior rapidez.

Estes métodos são utilizados na avaliação dos açúcares redutores. São também propostas outras técnicas químicas, para o doseamento das pentoses, baseando-se na sua transformação em furfural, e para o doseamento da sacarose (Curvelo-Garcia, 1988).

Como principais desvantagens atribuídas aos métodos químicos aponta-se a sua limitação ao doseamento dos açúcares redutores totais (não identificação e quantificação dos açúcares individuais), a necessidade de defecação prévia e, para a avaliação da sacarose, a possibilidade de dosear outros açúcares não redutores como sendo sacarose.

Segundo o OIV (Doc. 1373/86), a repetibilidade do método de Luff-Schoorl, por exemplo, é de 0,09 g/l (vinhos secos), 0,4 g/l (vinhos com açúcares residuais) e 1,81 g/l (vinhos doces); a reprodutibilidade, pelo mesmo método, é de 0,33 g/l (vinhos secos), 1,29 g/l (vinhos com açúcares residuais) e 6,96 g/l (vinhos doces), resultados expressos em açúcar invertido (Curvelo-Garcia, 1988).

Métodos enzimáticos

Lawson *et al.* (1979), referem que, em 1970, Dako utilizou métodos enzimáticos para dosear frutose, glucose e sacarose em diversos frutos. No mesmo ano, Bergmeyer *et al.* (1970) descreveram o doseamento da frutose e da glucose, através da enzima glucose-6-fosfatodesidrogenase.

Junge (1983) estuda a sua aplicação aos vinhos, propondo uma técnica analítica que foi adoptada pelo OIV. É uma técnica específica, rápida, exacta e apresenta uma boa reprodutibilidade. Fornece resultados sistematicamente inferiores, comparativamente aos métodos químicos, cuja falta de especificidade conduz ao aparecimento da interferência de outras substâncias redutoras

(Curvelo-Garcia, 1988). Como principal desvantagem da utilização das enzimas é de apontar o seu custo, por vezes proibitivo.

Recentemente, Henniger e Mascaro (1985) apresentaram os resultados de um estudo colaborativo entre 18 laboratórios europeus e americanos, baseado em técnicas enzimáticas com hexocinases, glucose-6-fosfato-desidrogenase e fosfoglucose-isomerase. A repetibilidade e a reprodutibilidade, expressas no coeficiente de variação, oscilam, respectivamente, entre 2,2 % a 9,2 % e 3,7 % a 10,4 %, para a glucose, e 1,5 % a 7,5 % e 3,8 % a 7,6 %, para a frutose.

Métodos cromatográficos

Cromatografia em papel

Ribéreau-Gayon (1976) refere que, em 1952, Dedonder utilizou a cromatografia em papel para a detecção de açúcares em alimentos. Posteriormente Hough e Jones (1962) e outros identificaram diversos açúcares: frutose, glucose, xilose, ramnose, sacarose, rafinose, lactose e maltose, pela mesma técnica.

Esau e Amerine (1966) e Rice *et al.* (1968) referiram-se a técnicas directamente aplicáveis a vinhos. Pela sua natureza, a cromatografia em papel foi importante em análise qualitativa, para a pesquisa não só dos açúcares como de substâncias anormalmente existentes no meio. Por ser uma técnica morosa e de reduzida exactidão foi substituída por outras, tendo caído em desuso.

Cromatografia em coluna

Como referência, deveremos citar duas técnicas pouco utilizadas — cromatografia em coluna de carvão activado e de célite, referida em Moll *et al.* (1978), e em coluna de gele tipo Sephadex ou Biogel (Moll *et al.*, 1978). A primeira apresentava uma resolução inaceitável e a segunda era muito lenta.

A introdução de resinas de permuta iónica [Khim e Zill (1952), Kesler (1967) e Floridi (1971)] representou um grande avanço na análise de glúcidos. Utilizaram-se resinas aniónicas, baseadas na aptidão dos açúcares em formar complexos com os iões borato e resinas catiónicas, utilizando uma mistura água/metanol como fase móvel. Floridi (1971) utilizou uma

coluna de permuta iónica (Dowex I X4), um sistema de eluição de gradiente com tampões de borato e detecção colorimétrica. Obteve valores de reprodutibilidade da ordem de 1 a 3 % (expressos em desvio padrão) e limites de detecção entre 20 μg (pentoses) e 50 μg (hexoses e polissacáridos). A grande desvantagem era a lentidão do processo e a necessidade de regeneração das colunas. Dependendo do eluente e do pH utilizado, cada análise podia demorar entre 6 e 8 horas. Estas ideias foram aproveitadas posteriormente, com o desenvolvimento da cromatografia líquida e dos novos sistemas de detecção.

Jandera e Churacek (1974) obtiveram limites de detecção da ordem do micrograma, combinando cromatografia líquida em resina de permuta iónica com derivatização pós-coluna para a detecção colorimétrica.

Nesta data, os métodos de cromatografia líquida caracterizavam-se por uma fraca resolução e lentidão de separação. Foram, no entanto, os precursores da actual cromatografia líquida de alta pressão — HPLC — que debateremos em pormenor após a cromatografia gás-líquido.

Cromatografia em camada fina

Ghebregzalber *et al.* (1976) e outros utilizaram a cromatografia em camada fina para a determinação de vários açúcares, desde pentoses a tetrassacáridos. Esta técnica exige defecação prévia e a eliminação de outras substâncias interferentes através da passagem da amostra por resina permutadora de catiões.

Segundo Ghebregzalber *et al.* (1976), o limite de detecção rondava 1 μg , mas o tempo de análise era da ordem das 8 horas. A quantificação, extremamente difícil, podia ser feita por dois processos: 1) análise *in situ*, aproximada e subjectiva; 2) desenvolvimento com má resolução de alguns açúcares, como a manose e a frutose, recuperação lenta da amostra e posterior leitura espectrofotométrica.

A diminuição de utilização destes métodos, ou quase abandono, deveu-se à sua lentidão e fraca resolução.

Cromatografia em fase gasosa

Um processo alternativo, descrito por Sweley *et al.* (1963), reside na cromatografia gás-líquido, que é uma técnica rápida e

com boa capacidade de separação de açúcares. Devido à relativamente reduzida volatidade dos açúcares, surgiu a necessidade de utilização de derivados, nomeadamente trimetilsililados (TMS). Contudo, os derivados e reagentes utilizados na sua obtenção são extremamente sensíveis à humidade, sendo mesmo destruídos, a não ser que as amostras sejam liofilizadas. As separações dos tri- e tetrassacáridos, tais como a rafinose e estaquiose, são também difíceis de efectuar. A reprodutibilidade por este método de derivatização, análise GLC e detector de ionização de chama, ronda os 8-10% (Bazard *et al.*, 1981). Os limites de detecção apontados por Lawson (1979), utilizando o detector de ionização de chama, situam-se na ordem dos 10 ng. Bertrand *et al.* (1975) afinaram uma técnica de doseamento de açúcares e polióis, a partir dos seus derivados TMS. A técnica exige preparação prévia da amostra para a eliminação dos ácidos, através da fixação sobre uma resina de permuta iónica (Dowex). Este método conduz a valores inferiores aos dos métodos químicos.

Iverson e Bueno (1981) e Laker (1979) reviram os processos de derivatização e as condições de cromatografia gás-líquido. Sugeriram a utilização de derivados trimetilsililados das oximas que simplificam a interpretação dos cromatogramas, anulando a multiplicidade de picos que apareciam na separação de mono- e dissacáridos.

No entanto, os problemas relativos à humidade e os inerentes às reacções de derivatização, especialmente no que se refere às misturas de açúcares mais complexas, mantêm-se.

Hoje em dia, com o avanço da cromatografia gasosa e das técnicas de detecção, estuda-se a possibilidade de aplicação ao doseamento dos açúcares do método de cromatografia gasosa em colunas capilares aliado ao detector de espectrometria de massa. No entanto, já em 1979, Smedt *et al.* (1979) utilizaram a cromatografia gasosa em coluna capilar, com derivados trimetilsililados dos ácidos, açúcares e polióis nos vinhos para detecção simultânea por espectrometria de massa. Apresentaram valores de 7% para a repetibilidade da glucose, 4% para a trealose e dificuldades de quantificação da frutose. É um processo dispendioso que parece não justificar ainda a sua utilização para o doseamento dos açúcares.

Cromatografia líquida de alta pressão

A cromatografia líquida de alta pressão tornou-se, na última década, o método mais útil na determinação dos açúcares nos vinhos e nos alimentos em geral.

A evolução rápida até aos nossos dias fez-se à custa da melhoria nas colunas e sistemas de detecção, que permitem obter uma precisão aceitável que torna o método, já de si competitivo, superior aos outros.

Colunas. Palmer e Brandes (1974) utilizaram uma coluna de permuta iónica para determinar teores de frutose, glucose e sacarose em extractos alimentares. A coluna era Aminex Q-150-S, com diâmetro de partículas 20-35 μm , o detector um refractómetro diferencial e a separação ocorria a 60-80° C. O método revelou-se preciso para relações frutose: glucose de 1:1, mas apresentava dificuldades de resolução para razões superiores a 1. Além disso, a capacidade de separação de outros açúcares revelou-se também difícil, como no caso da sacarose e maltose que são eluídas simultaneamente, assim como o etanol e a frutose.

A limitação da análise a certo número de açúcares e a necessidade de operação a temperaturas elevadas levaram Palmer e Conrad (1976) a utilizar outro tipo de colunas — de sílica, de fase ligada aminoalquilo — efectuando a separação à temperatura ambiente.

O progresso da tecnologia permitiu a utilização de enchimentos com micropartículas de 10 μm (e actualmente de 5 μm), melhorando a sua eficiência e passando a obter-se uma precisão idêntica à de cromatografia gasosa.

A introdução das colunas de fase ligada aminoalquilo — Schwarzenbach (1976) e Jones *et al.* (1979) — e as colunas exclusivas de análise de açúcares — Palmer (1975), Linden e Lawhead (1975), Rabel *et al.* (1976) e outros — revolucionaram a análise de açúcares por HPLC, porque obtiveram precisões idênticas às obtidas por outros métodos, especialmente às de cromatografia gás-líquido, e resolveram as desvantagens por estes apresentadas, dispensando a preparação prévia da amostra e aumentando a rapidez de execução.

A desvantagem destas colunas reside na sua fácil deterioração com o uso, devido à oxidação da fase estacionária e/ou

formação de bases de Schiff. Aitzetmüller (1978) sugeriu a impregnação *in situ* das colunas de sílica com uma amina polifuncional, para evitar a deterioração das colunas, e conseguiu obter performances idênticas. Actualmente, os métodos de análise de açúcares, principalmente monossacáridos, apontam para duas vias — cromatografia de partição líquido-líquido e cromatografia de permuta iónica.

Na cromatografia de partição líquido-líquido utilizam-se fases estacionárias ligadas quimicamente, normalmente grupos amina e/ou nitrilo ligados à sílica — Hurst *et al.* (1979), Nuor *et al.* (1979), Brandão *et al.* (1980), Bazard *et al.* (1981), Richmond *et al.* (1981), Vidal-Valverde *et al.* (1985), Tusseau et Benoit (1986) — ou fases impregnadas *in situ* — Aitzetmüller (1978), Porsch (1982) e Heyraud *et al.* (1985). As colunas de fase ligada, por exemplo, Spherisorb-NH₂ da Phase Separation, μ -Bondapak-NH₂ da Waters, Bio-Sil Amino 5S da Bio-Rad, Partisil 10PAC da Wathman, Lichrosorb-NH₂ da Merck, permitem obter boa separação de mono-, di-, trissacáridos, mas apresentam a desvantagem da utilização de eluente rico em acetoneitrilo (acetoneitrilo/água, variando de 75% a 95%) e possibilidade de deterioração da fase estacionária.

As colunas de fase impregnada *in situ*, apesar de utilizarem o mesmo eluente, diminuem a probabilidade de deterioração da coluna, por impregnação da coluna de sílica com uma poliamina adicionada ao eluente (0.01 a 1% de poliamina), obtendo-se separações idênticas às das colunas de fase ligada.

A utilização de resinas de permuta iónica está descrita por diversos autores — Auguste e Bertrand (1980), Bazard *et al.* (1981), Vidal-Valverde *et al.* (1982) e Wenz *et al.* (1982). Em enologia, são de citar os trabalhos de Auguste e Bertrand (1980) e Colagrande *et al.* (1986), apresentados em reuniões de especialistas do OIV (Office International de la Vigne et du Vin). Neste tipo de cromatografia são usadas colunas de permuta iónica (Aminex HPX-87 e HPX-87P da Bio-Rad, Sugar Pak da Waters, etc.) que funcionam à temperatura de 85°C e usam água como eluente. A detecção é feita por refractometria. Como inconvenientes são apontados a necessidade de trabalhar a temperaturas elevadas e a dessalificação das amostras. De Vries *et al.* (1979 e 1983) eliminam a interferência do cloreto de sódio lavando a coluna com tetraetilenopentamina (TEPA) e Wills

(citado em Yeransin *et al.*, 1985) adiciona o reagente de par iónico fosfato de tetrabutílamónio à fase móvel, para o mesmo fim. Tusseau e Benoit (1986) consideram que as colunas de permuta iónica se aplicam essencialmente à análise de monosacáridos, pois apresentam dificuldades de resolução para dissacáridos.

Bazard *et al.* (1981) apresentaram um estudo comparativo entre as colunas de permuta iónica Aminex HPX 87 e de fase ligada sílica-NH₂. As condições operatórias e técnicas exigidas pelas duas colunas, bem como as vantagens e desvantagens que cada uma apresenta, encontram-se compiladas no Quadro II.

Detectores. O detector mais frequentemente utilizado é o refractómetro diferencial, cujo limite de detecção é cerca de 20 µg (Palmer, 1975). É um detector universal, que tem como grande vantagem a simplicidade de utilização, mas que torna difícil e pouco precisa a análise de vestígios. A reprodutibilidade das medições é da ordem dos 10 % para componentes presentes em pequenas quantidades, como é o caso das pentoses e polissacáridos, nos mostos e nos vinhos. Como tal são ainda discutidos actualmente outros sistemas de detecção, especialmente para estes casos.

Para aumentar a sensibilidade, diversos autores — Nachtman e Budna (1977) e outros — sugerem a derivatização pós-coluna para detecção no ultravioleta, cujo limite de detecção é da ordem do nanograma.

Yeransin *et al.* (1985), num vasto artigo de revisão, referem que, em 1983, Shaw *et al.* melhoraram a sensibilidade das determinações de frutose, glucose e sacarose em frutos, através da detecção por absorção no ultravioleta em 190 nm, com reacções de derivatização pós-coluna. No mesmo artigo é referido que os sistemas de derivatização pós-coluna incluem o uso de fumarato/borato de 2-aminopropionitrilo (Kato), cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (Betteridge), hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico (Woollard) e cianoacetamida (Schlabach). Outros métodos de detecção menos utilizados incluem a detecção amperométrica, após redução de cobre (Watanabe), detecção amperométrica de impulso após cromatografia de permuta iónica (Rocklin), detecção electroquímica (Buchberger) e actualmente a detecção por espectrometria de massa após cromatografia

QUADRO II

Comparação das condições operatórias e técnicas entre as colunas NH₂ e Aminex HPX 87 [adaptado de Bazard *et al.* (1981)]

Comparaison des conditions operatoires et techniques pour les colonnes de NH₂ et Aminex HPX 87 [adapté de Bazard et al. (1981)]

	Coluna NH ₂	Coluna Aminex HPX 87
eluente	* CH ₃ CN/H ₂ O	* H ₂ O a 85° C
débito	* 100 ml/h	* 50 ml/h
preparação da amostra	* filtro 0.45 µm	* filtro 0.45µ m/Sep-Pak/ pré-coluna de resina
n.º de análises por dia	* 35	* 40
n.º de análises por coluna	* 230 (média)	* 500 (mínimo)
duração da análise	* 20 min	* 15 min
vantagens	<ul style="list-style-type: none"> * separação dos dissacáridos * existência de fase para substituir as colunas * adaptação das condições operatórias à separação desejada * menor custo 	<ul style="list-style-type: none"> * eluente: água * estabilidade dos tempos de retenção e da qualidade da coluna * possibilidade de dosear o etanol
desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> * eluente caro e tóxico * variação dos tempos de retenção * rápida degradação da coluna 	<ul style="list-style-type: none"> * preparação da amostra trabalhosa e dispendiosa * não separação dos dissacáridos

líquida de partição (MacRae *et al.*), sendo estes dois últimos detectores extremamente sensíveis.

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ACTUAIS DE ANÁLISE

Existem na bibliografia alguns artigos de comparação entre os métodos actuais de análise dos açúcares nos mostos e nos vinhos — químicos, enzimáticos e cromatográficos — [Binder (1980), Ghernati *et al.* (1982), Goiffon *et al.* (1980), Reyes *et al.* (1982) e Schlabach e Robinson (1983)]. Salientam-se os trabalhos de comparação entre cromatografia gasosa e líquida de alta pressão de Iverson e Bueno (1981) e Bazard *et al.* (1981) e o artigo de análise estatística em HPLC de Tusseau e Benoit (1986).

Dessa recolha de dados e do que foi dito atrás resultou uma comparação entre as técnicas referidas, inscrita no Quadro III, de acordo com os factores que nos propusemos discutir. O método cromatográfico por HPLC a que se refere o Quadro III é o que utiliza a coluna de NH₂ e como detector um refractómetro dife-

QUADRO III

Comparação entre os principais métodos de análise de açúcares
Comparaison parmi les principales méthodes d'analyse des sucres

+ — reduzido *petit*
++ — médio *moyen*
+++ — elevado *haut*

Factores	Métodos		Cromatográficos	
	Químicos	Enzimáticos	Fase gasosa	HPLC
duração da análise	1-2 h	60 min	60 min	20-60 min
facilidade de execução	++	++	+	+++
sensibilidade	+	++	+++	++
precisão	+++	++	++	++
exactidão	+	+++	+++	+++
custos	+	+++	++	++

rencial. Este processo parece ser o preferido, devido fundamentalmente à desvantagem revelada pela coluna de permuta iónica de não separação dos dissacáridos e à maior facilidade de execução, com a mesma precisão, em relação aos outros sistemas usados em HPLC.

Convém ainda realçar que um método torna-se melhor ou pior de acordo com a finalidade a que se destina. Mesmo dentro de cada um, existe uma diversidade de condições operatórias que afectam os factores apontados no Quadro III. Daí a nossa opção por uma comparação qualitativa e não quantitativa.

CONCLUSÕES

Para os métodos em confronto — físicos, químicos, enzimáticos e cromatográficos — conclui-se que os processos físicos já não justificam actualmente a sua utilização em laboratórios de análises e/ou para fins de investigação e reservam-se como ferramenta útil aos vinicultores.

Os métodos químicos, ainda utilizados, são caracterizados por elevada precisão. No entanto, dão unicamente uma informação global da composição glucídica dos mostos e vinhos e raramente permitem a identificação dos açúcares presentes. Por vezes, são pouco exactos por poderem dosear substâncias interferentes como sendo açúcares.

Os métodos enzimáticos são reprodutíveis, mas apresentam custos elevados, por vezes proibitivos, em misturas complexas de açúcares, pela necessidade de utilização de enzimas específicas para cada um dos açúcares presentes.

Os métodos cromatográficos surgem como uma alternativa importante. As técnicas cromatográficas sobre papel e camada fina são lentas, trabalhosas e com fraco poder de resolução, pelo que distinguiremos apenas a cromatografia gás-líquido e a cromatografia líquida de alta pressão. A cromatografia em fase gasosa permite a separação rápida dos açúcares, mas exige preparação prévia da amostra, lenta e laboriosa — liofilização e derivatização, o que origina, por sua vez, perda de reprodutibilidade do processo.

A cromatografia líquida de alta pressão é o método de eleição para a análise dos açúcares nos alimentos, em geral e, consequentemente, nos mostos e vinhos, por ser um método rápido,

simples, que proporciona boas separações e cuja precisão depende do detector utilizado. A detecção por absorção no ultra violeta, aliada a reacções de derivatização pós-coluna, proporciona resultados muito reprodutíveis e especialmente importantes na análise de vestígios, embora apresente a grande desvantagem de exigir derivatização. O refractómetro diferencial é o detector menos específico, embora o mais utilizado, pela simplicidade de operação e não exigência de derivatização. Apresenta dificuldades na análise de vestígios. Conduz a valores de reprodutibilidade do processo global da ordem dos 5%, aceitáveis para o seu uso corrente nas análises de mostos e vinhos e, por isso, está aceite pelo OIV.

Finalmente, no momento actual, em termos de colunas para HPLC, as duas manifestamente importantes são as de fase ligada aminoalquilo e as de permuta iónica. As últimas possibilitam separações rápidas e precisas, mas apresentam como desvantagem a necessidade de operar a temperaturas elevadas, de preparação prévia da amostra, o aparecimento de substâncias interferentes que podem ser eluídas simultaneamente com os açúcares e não separação dos dissacáridos. As primeiras apresentam facilidades de execução por permitirem trabalhar à temperatura ambiente e sem preparação prévia da amostra, a não ser filtração, separações rápidas e boas para mono-, di- e trissacáridos. Como desvantagem, apontam-se a sua deterioração com o uso e a necessidade de um eluente rico em acetonitrilo, que é um eluente de custo elevado.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do Protocolo n.º 314.86.21 FCI, celebrado entre JNICT/I. V. P./SIDUL/LAB. Bromatologia da F. F. U. P.

RÉSUMÉ

Analyse des moûts et des vins. I. Méthodes de dosage des sucres

Les techniques d'analyse des sucres des moûts et des vins pendant ce siècle sont mentionnées. Un étude comparatif est fait pour les divers processus couramment disponibles et acceptés — des méthodes chimiques, enzymatiques et chromatographiques — concernant la rapidité et aise d'exécution, répétabilité, précision et coût. Les avantages et les inconvénients

sont mis en évidence pour la chromatographie en phase gazeuse et chromatographie liquide à haute performance. Ce dernier est la méthode de choix pour l'analyse des sucres par la rapidité, simplicité et précision.

SUMMARY

Musts and wines analysis. I. Methods of determination of sugars

A reference is made to the methods used in the analysis of sugars in musts and wines throughout our century.

A comparative study is carried out of the various processes presently available and accepted — chemical, enzymatic and chromatographic methods — based on the speed and simplicity of execution and taken in terms of the repetibility, precision, accuracy and costs.

The advantages and inconvenients of gas liquid chromatography and high pressure liquid chromatography are pointed out. Given the speed, simplicity and precision of the last method, it is preferred in the analysis of the sugars.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitzetmüller, K.

1978 Sugar analysis by high-performance liquid chromatography using silica columns, *J. Chromatogr.*, **156**: 354-358.

Amerine, M. A. e M. A. Joslyn

1970 *Tables Wines*. University of California Press. 2nd edition.

Amerine, M. A. e C. S. Ough

1980 *Methods of analysis of musts and wines*. John Wiley. USA.

Auguste, M. H e A. Bertrand

1980 Dosage du glucose, du fructose et du glycérol par chromatographie en phase liquide à haute performance, *Feuillets Verts de l'OIV*, n° 722.

Azevedo, M. P.

1973 *O auxiliar do analista*. Instituto do Vinho do Porto. 2.ª edição. Porto.

Bazard, D., G. Cibus e M. Moll

1981 Détermination des glucides, de l'éthanol et du glycérol dans le moût et la bière par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), *Ind. Aliment. et Agric.*, **98**: 1033-1038.

Bazard, D., R. Flayeux e M. Moll

1981 Utilisation de la chromatographie liquide haute performance dans un laboratoire de l'industrie alimentaire, *Ind. Aliment. et Agric.*, **98**: 55-61.

Bergmeyer, H. B. e E. Schmidt

1970 *Methods of enzymatic analyses*. Academic Press. London.

Bertrand, A., M. Dubernet e P. Ribéreau-Gayon

1975 Dosage des sucres résiduels dans les vins secs par chromatographie en phase gazeuse, *Feuillets verts de l'OIV*, n° 526.

- Binder, H.
1980 Separation of monosaccharides by high-performance liquid chromatography: comparison of ultraviolet and refractive index detection, *J. Chromatogr.*, **189**: 414-420.
- Brandão, S. C., M. L. Richmond, J. I. Gray, I. D. Morton e C. M. Stine
1980 Separation of mono- and di-saccharides and sorbitol by HPLC, *J. Food Sci.*, **45**: 1492-1493.
- Colagrande, O., A. Casozzi, A. Bonatti e A. Silva
1983 Détermination de l'histamine dans les vins par chromatographie en phase liquide à haute performance, *Feuillets Verts de l'OIV*, n° 768.
- Curvelo-Garcia, A. S.
1988 *Controlo de qualidade dos vinhos*. Instituto da Vinha e do Vinho. Lisboa.
- De Vries, J. W., H. L. Chang, J. C. Heroff e K. D. Johnson
1983 Elimination of Sodium Chloride Interference During High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Sugars, *J. Assoc. Off. An. Chem.*, **66** (1): 197-198.
- De Vries, J. W., J. C. Heroff e D. C. Egberg
1979 High Pressure Liquid Chromatographic determination of Carbohydrates in Food products: Evaluation of Method, *J. Assoc. Off. An. Chem.*, **62** (6): 1292-1296.
- Esau, P. e M. A. Amerine
1966 Quantitative Estimation of Residual Sugars in Wine, *Am. J. Enol. Vitic.*, **17** (4): 265-267.
- Floridi, A.
1971 An improved method for the automated analysis of sugars by ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **59**: 61-70.
- Ghernati, H. M., Abdeddaim e M. H. Guermouche
1982 Rapid HPLC methods for the separation and quantification of a mono-, di-, and tri-saccharides mixtures and applications, *J. Liq. Chromatogr.*, **5**: 1725-1748.
- Ghrebregzabher, M., S. Rufini, B. Monaldi e M. J. Lato
1976 Thin-layer chromatography of carbohydrates, *J. Chromatogr., Chromatographic Reviews*, **127**: 133-162.
- Golffon, J.-P., A. Blachere, J.-L. Perez e A. Portal
1980 Dosage du glycérol dans les vins par chromatographie en phase liquide: comparaison avec différentes méthodes, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **73**, n° 782: 17-24.
- Henniger, G. e L. Jr. Mascaro
1985 Enzymatic-Ultraviolet Determination of Glucose and Fructose in Wine: Collaborative Study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68** (5): 1021-1024.
- Heyraud, A., M. Rinaudo e Saïemis
1985 Chromatographie Haute Performance en Phase Liquide (H.P.L.C.) des oligo et polysaccharides, *Les cahiers de chromatographie*, May, 1-15.

- Hough, L. e J. K. N. Jones
1962 in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1: 21-31. Academic Press. New York.
- Hurst, W. J., Jr. R. A. Martin e B. L. Zoumas
1979 Application of HPLC to characterization of individual carbohydrates in foods, *J. Food Sci.*, **44**: 892-895.
- Iverson, J. L. e M. Bueno
1981 Evaluation of High Pressure Liquid Chromatography and Gas-Liquid Chromatography for Quantitative Determination of Sugars in Foods, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **64** (1): 139-143.
- Jandera, P. e J. Churacek
1974 Ion-exchange chromatography of aldehydes, ketones, ethers, alcohols, polyols and saccharides, *J. Chromatogr., Chromatographic Reviews*, **98**: 55-104.
- Jones, A. D., L. W. Burns, S. G. Sellings e J. A. Cox
1977 Preparation, optimisation and slurry packing of an amino bonded phase for the analysis of sugars in food by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **144**: 169-180.
- Junge, Ch.
1983 Étude collaborative pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité des méthodes d'analyse, *Feuilles Verts de l'OIV*, n° 753.
- Kesler, R. B.
1967 Rapid Quantitative Anion-Exchange Chromatography of Carbohydrates, *Anal. Chem.*, **39**, 12: 1416-1422.
- Khim, J. X. e L. P. Zill
1952 The Separation of Sugars by Ion Exchange, *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**: 2090-2094.
- Laker, M. F.
1979 Estimation of disaccharides in plasma and urine by gas-liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **163**: 9-18.
- Lawson, M. A., G. R. Takeoka e G. F. Russell
1979 Reducing sugar derivatization for ultraviolet absorption detection in HPLC analysis, *Liquid chromatographic analysis of food and beverages*, **2**: 380-393.
- Linden, J. C. e C. L. Lawhead
1975 Liquid chromatography of saccharides, *J. Chromatogr.*, **105**: 125-133.
- Moll, M., D. Bazard e R. Flayeux
1978 Dosage des sucres fermentescibles dans le moût par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), *Bios*, **9**: 23-26.
- Nachtmann, F. e K. W. Budna
1977 Sensitive determination of derivatized carbohydrates by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **136**: 279-287.
- Nuor, S. K., J. Vialle e J.-L. Rocca
1979 Détection des sucres en chromatographie en phase liquide à haute performance après leur dérivation post-colonne, *Analisis*, **7**: 381-385.

- Palmer, J. K.
1975 A versatile system for sugar analysis via liquid chromatography, *Anal. Lett.*, **8**: 215-224.
- Palmer, J. K. e E. C. Conrad
1976 Rapid Analysis of Carbohydrates by High-Pressure Liquid Chromatography, *Food Technology*, October: 84-92.
- Palmer, J. K. W. B. Brandes
1974 Determination of Sucrose, Glucose, and Fructose by Liquid Chromatography, *J. Agr. Food Chem.*, **22** (4): 709-712.
- Porsch, B.
1982 High-Performance Liquid Chromatography of Sugar Mixtures Containing Xylose and Arabinose on Primary Amino-Bonded phases, *J. Chromatogr.*, **253**: 49-54.
- Rabel, F. M., A. G. Caputo e E. T. Butts
1976 Separation of carbohydrates on a new polar bonded phase material, *J. Chromatogr.*, **126**: 731-740.
- Reyes, F. G. R., R. E. Wrolstad e C. J. Cornwell
1982 Comparison of Enzymic, Gas-Liquid Chromatographic, and High Performance Liquid Chromatographic Methods for Determining Sugars and Organic Acids in Strawberries at Three Stages of Maturity, *J. Assoc. Off. An. Chem.*, **65** (1): 126-131.
- Ribeiro, M. B.
1961-1962 *Sobre o doseamento dos açúcares redutores no Vinho do Porto*. Anais do Vinho do Porto. Porto.
- Ribéreau-Gayon, J.
1976 *Sciences et techniques du vin*. Tome 1. Dunod. Paris.
- Rice, A. F., J. W. Ferguson e R. Belscher
1968 Residual Sugars in New York State Wines, *Am. J. Enol. Vitic.*, **19** (1): 1-5.
- Richmond, M. L., S. C. Brandão, J. I. Gray, P. Markakis e C. M. Stine
1981 Analysis of simple sugars and sorbitol in fruit by HPLC, *J. Agric. Food Chem.*, **29**: 4-7.
- Schlabach, T. D. e J. Robinson
1983 Improvements in sensitivity and resolution with the cyanoacetamide reaction for the detection of chromatographically separated reducing sugars, *J. Chromatogr.*, **282**: 169-177.
- Schwarzenbach, R.
1976 A chemically bonded stationary phase for carbohydrate analysis in liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **117**: 206-210.
- Smedt, P., P. A. P. Liddle, B. Cresto e A. Bossard
1979 Analyse des composés fixes du vin, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **72**, n° 781: 633-642.
- Sweeley, C. C., R. Bentley, M. Makita e W. W. Wells
1963 Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**: 2497-2507.

Tusseau, D. e C. Benoit

1986 Détermination du glycérol et des glucides dans les moûts, vins et champagnes par chromatographie liquide haute performance: répétabilité, reproductibilité, *Science des aliments*, **6**, n° 4: 559-577.

Vidal-Valverde, C., C. Martin-Villa e B. Olmedilla

1982 Improved separation of polyols and carbohydrates by high pressure liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, **5**: 1941-1946.

Vidal-Valverde, C., S. Valverde, C. Martin Villa, I. Blanco e E. Rojas-Hidalgo

1985 High performance liquid chromatography determination of soluble carbohydrates in commercial soft drinks, *J. Sci. Food Agric.*, **36**: 43-48.

Vine, R. P.

1981 *Commercial winemaking*. Avi Publishing Company. Connecticut.

Wenz, F. E., A. D. Marcy e M. J. Gray

1982 Analysis of wood sugars in pulp and paper industry by HPLC, *J. Chromatogr. Sci.*, **20**: 349-352.

Yeransin, J. K. Sloman e A. Foltz

1985 Food, *Anal. Chem.*, **57**: 287R-315R.