

ANÁLISE DE MOSTOS E VINHOS
II. DOSEAMENTO DE AÇÚCARES E POLIÓIS EM MOSTOS
E VINHOS DO PORTO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO

M. ARMINDA ALVES e MARGARIDA A. FERREIRA

Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia.
Universidade do Porto

RESUMO

Apresenta-se um estudo de uma técnica de cromatografia líquida de alta pressão para aplicação à análise simultânea de açúcares e de polióis em mostos e vinhos do Porto. O método oferece grande simplicidade (não exige preparação prévia da amostra), rapidez de execução (separação de glicerol, frutose e glucose em 10 min), boa precisão (valores médios de repetibilidade de 6%, 3% e 8%, para o glicerol, frutose e glucose, respectivamente) e exactidão (recuperação entre 98,3% e 108,3%). Conclui-se da utilidade da técnica em laboratórios de rotina e de investigação, em alternativa aos métodos químicos oficiais, particularmente para o doseamento da glucose, frutose, sacarose e do glicerol. É aplicável também ao doseamento de outros açúcares e polióis quando existam em quantidades superiores ao limiar de detecção (cerca de 150 a 500 mg/l, dependendo do composto em causa).

INTRODUÇÃO

O doseamento dos açúcares em mostos e vinhos pode ser efectuado por métodos químicos (adoptados oficialmente — Portaria 985/82 e prNP-2223), enzimáticos e cromatográficos (Alves e Ferreira, 1988).

Os métodos químicos, trabalhosos e lentos, quantificam globalmente os glúcidos e raramente permitem a identificação dos açúcares presentes. Os métodos enzimáticos, embora muito específicos e precisos, apresentam custos elevados. Os analisadores automáticos (Bouvier e Curvelo-Garcia, 1988) para o

doseamento dos açúcares redutores baseiam-se em técnicas enzimáticas e são muito convenientes para análises de rotina, pela sua capacidade de tratamento de elevado número de amostras. Quando está em jogo um largo número de açúcares conduz a custos por análise inoportáveis.

Dos métodos cromatográficos destacam-se a cromatografia gás-líquido e a cromatografia líquida de alta pressão. A primeira, embora útil na análise de quantidades vestigiárias nos produtos, exige derivatização para aumentar a volatilidade dos açúcares e os compostos formados são muito sensíveis à humidade. Como tal, resulta numa técnica trabalhosa e de prática difícil.

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) surge como uma alternativa importante na análise dos açúcares. Tem sido largamente utilizada no doseamento de açúcares em vários produtos alimentares (Smith *et al.*, 1986), nomeadamente em vinhos (Tusseau e Bouniol, 1984). As técnicas afinadas para os vinhos comuns ou de mesa não são transferíveis para o vinho do Porto sem os necessários ajustamentos, em consequência da sua composição. Dado este carácter particular dos vinhos do Porto, procurou-se afinar uma técnica de HPLC que abrangesse a maior gama de açúcares e de polióis de existência possível em vinhos. Procurou-se adaptar os processos de Tusseau e Benoit (1984) e Tusseau e Bouniol (1984), os quais utilizaram uma coluna cromatográfica de NH_2 , de fase ligada aminoalquilo, um eluente acetonitrilo/água e como detector um refractómetro diferencial. Para o efeito, efectuaram-se algumas adaptações, no que respeita à composição da mistura de eluentes e ao fluxo e estudaram-se as diluições mais convenientes. Além disso, efectuou-se a recuperação do eluente por destilação, o que permitiu uma economia considerável em custos por análise.

A propósito, refira-se que uma das grandes vantagens deste processo reside na possibilidade e facilidade de variação das condições experimentais para otimizar o doseamento de uma vasta gama de açúcares e alguns polióis.

É neste contexto que se julgou pertinente a avaliação da precisão e exactidão do método proposto, para aplicação à análise dos mostos e vinhos do Porto em substituição da técnica oficial de doseamento dos açúcares e também para aplicar ao doseamento do glicerol, uma vez que para este constituinte não há técnica oficial.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Utilizaram-se 4 amostras de vinho do Porto — tawny, vintage, LBV (Late Bottled Vintage) e branco seco — e 4 amostras de mosto proveniente de cada uma das castas touriga francesa e tinta roriz, produtoras de vinho do Porto, recolhidas a 17 e a 28 de Setembro de 1988, na Quinta da Ferradosa, em Peso da Régua.

Reagentes

Os padrões de açúcares e polióis utilizados eram da marca Fluka e o acetonitrilo era p.a. da Merck posteriormente recuperado por destilação. A água usada para cromatografia apresentava resistividade específica superior a 15M Ω .cm.

Aparelhagem e condições operatórias

● Cromatógrafo líquido de alta pressão da marca Gilson, equipado com uma bomba, modelo 302, e um injector Rheodyne, modelo 7125, provido de *loop* de 20 μ l.

● Coluna — Spherisorb NH_2 250 \times 4.6 mm, 5 μ m.

● Solvente — acetonitrilo/água, filtrado por membrana de 0.2 μ m (Schleicher & Schull, NL 16) e degaseificado por vazio e ultra-sons (Bandelin Sonorex RK 100), durante 15 min. A mistura era recuperada por destilação. Visto tratar-se duma mistura azeotrópica, a destilação efectua-se sempre a 76° C, obtendo-se um destilado de composição constante 84:16.

● Detector — refractómetro diferencial da marca Gilson, modelo R401, equipado com banho termostatado a 22°C, atenuação 1.2×10^{-4} RIUFS. De acordo com Tusseau e Bouniol (1984), este detector parece preferível ao espectrofotómetro UV em 190 nm. Com efeito, numerosos produtos do vinho absorvem neste comprimento de onda, dificultando a análise do cromatograma. Outra vantagem não desprezável é a possibilidade de se utilizar sem problema solventes de grau de pureza p.a., cujo custo é cerca de 2 vezes inferior aos solventes Lichrosolv para cromatografia.

● Registador — marca Gilson N1, *output* 10 mV, velocidade do papel 2 mm/min.

Processo analítico

Procedeu-se à avaliação do teor em açúcares e polióis presentes nas amostras referidas e à determinação da repetibilidade e exactidão do processo em estudo.

Preparação das amostras: O mosto foi previamente obtido por esmagamento de uvas frescas numa prensa de Colla, centrifugado durante 10 min a 3600 r/min, filtrado e congelado. No momento da análise, as amostras de mosto foram previamente descongeladas à temperatura ambiente.

Para a determinação da frutose e da glucose as amostras foram diluídas a 10 % e filtradas. Para o doseamento do glicerol foram unicamente filtradas por filtro de NL 16 de 0.45 μ m.

Identificação dos componentes presentes: Pelo recurso a padrões, foram previamente estabelecidos os tempos de retenção dos diversos açúcares e polióis, para três condições operatórias, que se inscrevem no Quadro I. Para cada amostra efectuou-se uma injeção inicial, nas condições II — Quadro I, para identificação dos componentes presentes através da comparação com os respectivos tempos de retenção. Verificou-se em todas as amostras a presença de glicerol, frutose e glucose, vestígios de pentoses e 2 picos não identificados (presentes quer nos mostos quer nos vinhos, e que a adição de inositol mostrou não se tratar deste composto). O doseamento foi sempre realizado nas condições II, inscritas no Quadro I.

No entanto, a necessidade de quantificação de uma mistura de açúcares e polióis mais complexa exige uma optimização das condições, conforme o tipo de componentes a dosear. Com base na análise do Quadro I sugere-se a seguinte metodologia:

- 1) identificação prévia dos compostos presentes através de injeção inicial nas condições II;
- 2) para a optimização dos resultados recomenda-se, no doseamento de:
 - glicerol, manitol, sorbitol, pentoses e hexoses — condições I — ACN/H₂O (90:10), fluxo de 0.8 ml/min;
 - glicerol, frutose, glucose, sacarose e inositol — condições II — ACN/H₂O (84:16), fluxo 2 ml/min;
 - di-, trissacáridos e inositol — condições III — ACN/H₂O (80:20), fluxo 1.0 ml/min.

QUADRO I

Tempos de retenção (relativos à glucose) e limites de detecção dos açúcares e polióis, para diversas condições operatórias

Les temps de rétention (par rapport au glucose) et seuils de détection des sucres et polyols, pour différents conditions opératoires

* Condições

	I	II	III
Acetonitro/água. Acetonitrile/eau	90:10	84:16	80:20
Fluxo (ml/min). Débit (ml/min)	0.8	2.0	1.0

Componentes	Tempo de retenção relativo à glucose			Limite de detecção (mg/l)
	Condições *			
	I	II	III	
1. glicerol	0.35	0.34	0.53	150
2. ribose, ramnose	0.43	0.43	0.61	200
3. xilose	0.54	0.54	0.68	200
4. arabinose	0.61	0.64	0.79	300
5. frutose	0.79	0.79	0.87	200
6. manose	0.86	0.84	0.90	250
7. manitol	0.88	0.86	—	300
8. sorbitol	0.90	0.87	—	300
9. glucose	1.00 14.3 min	1.00 7.0 min	1.00 7.0 min	200
10. galactose	1.12	1.07	—	150
11. sacarose	2.28	2.07	1.46	500
12. inositol	—	2.47	—	500
13. celobiose	—	2.78	1.64	450
14. maltose	—	2.86	1.71	450
15. trealose	—	3.57	1.86	500
16. lactose	—	3.68	2.00	500
17. melibiose	—	4.50	2.29	500
18. melizitose	—	6.18	2.61	500
19. rafinose	—	8.32	3.21	500

Calibração: Utilizou-se o método do padrão externo. Para isso, preparou-se diariamente uma solução padrão de frutose, glucose e glicerol em água, na concentração de 5 g/l, e injectou-se 20 μ l da solução no início e no fim de cada série de ensaios. As determinações foram sempre conduzidas em duplicado.

Foi previamente verificada a linearidade da resposta entre a concentração de cada composto e a altura do pico correspondente, para concentrações entre os limites de 0.1 e 12 g/l.

Cálculos: Para a quantificação dos compostos identificados previamente, injectaram-se as soluções utilizando diluição a 10 % para o doseamento da glucose e frutose e o produto tal qual para o doseamento do glicerol. O teor respectivo, expresso em g/l, foi calculado usando a altura do pico (média de 2 determinações), através da equação:

$$Ca = Ha \cdot (Cp/Hp) \cdot (D/V) \quad (1)$$

Ca — concentração de açúcar na amostra (g/l); Ha — altura do pico no cromatograma obtido com a amostra (cm); Hp — altura do pico no cromatograma obtido com o padrão (cm); Cp — concentração de açúcar no padrão (g/l); D — volume da diluição da amostra (ml); V — volume da amostra (ml).

Para a avaliação da repetibilidade, injectou-se a mesma amostra 6 vezes consecutivas, nas mesmas condições operatórias. Efectuaram-se estudos de repetibilidade das determinações de glicerol, frutose e glucose nas amostras e numa solução padrão, nas condições de análise, isto é, injectadas tal qual e diluídas a 10 %. Os dados estatísticos foram obtidos para um grau de confiança de 95 %, do seguinte modo (Gottschalk e Kaiser, 1979):

- n — n.º de ensaios.
 \bar{x} — média dos resultados — $\bar{x} = (\sum x_i) / n$ (x_i — resultado individual).
s — desvio padrão dos resultados — $s = \sqrt{[\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n-1)]}$.
CV% — coeficiente de variação — $CV\% = s \cdot 100 / \bar{x}$.
 T/\sqrt{n} — intervalo de confiança da média — $T/\sqrt{n} = s \cdot t_{95\%,f} / \sqrt{n}$, [($t_{95\%,f}$ significa t de Student com 95 % de probabilidades e $f=n-1$ graus de liberdade), (T/\sqrt{n}

significa que há 95 % de probabilidades de a média se situar entre $\bar{x} + T/\sqrt{n}$ e $\bar{x} - T/\sqrt{n}$].

R% — repetibilidade dos resultados — $R\% = \sqrt{2} \cdot s \cdot t_{95\%/0,1} \cdot 100/\bar{x}$.

Para avaliação da exactidão, utilizou-se o método das adições (Dunmire e Otto, 1979). No caso presente, o estudo foi feito pela adição de glucose, nas concentrações indicadas no Quadro VI, a amostras de vinho do Porto Vintage, vinho do Porto seco e mosto, por se considerarem representativas dos diversos teores deste açúcar. A recuperação RC desse composto foi calculada do seguinte modo:

$$RC\% = 100 \cdot (m_t - m_a) / m'_a \quad (2)$$

RC% — recuperação em percentagem; m_t — massa do açúcar doseado após a adição, em 10 ml de solução (g); m_a — massa do açúcar doseado antes da adição, em 10 ml de solução (g); m'_a — massa de açúcar adicionado a 10 ml de solução (g).

RESULTADOS

Os resultados dos ensaios realizados constam dos Quadros I a VI.

Embora nos vinhos do Porto a literatura apenas mencione a presença de glicerol, 2,3-butilenoglicol, frutose, glucose e inositol (Amerine e Joslyn, 1970), dado que nos vinhos em geral já foram detectados múltiplos hidratos de carbono e polióis (Alves e Ferreira, 1988), tentámos incluir neste estudo 20 desses compostos, os quais havia disponíveis, sendo 16 açúcares e 4 polióis. Estabeleceu-se para cada um o tempo de retenção em relação à glucose e os respectivos limites de detecção, em diversas condições operatórias, cujos resultados se inscrevem no Quadro I. Os limites de detecção foram obtidos considerando o limite mínimo igual a 2 vezes o ruído de base, de acordo com Johnson e Stevenson (1978). As Figuras 1 a 4 apresentam os cromatogramas obtidos com soluções padrão, em diversas condições operatórias.

Em quatro tipos de vinhos do Porto (tawny, vintage, LBV e seco) e em mostos provenientes das castas touriga francesa e tinta roriz, aplicou-se a técnica afinada, conseguindo-se apenas

QUADRO II

Teores em frutose, glucose e glicérol nas amostras testadas
Dosage du fructose, du glucose et du glycérol des échantillons analysés
 [VP — vinho do Porto tawny, *vin du Porto tawny*; Vint — vinho do Porto vintage, *vin du Porto vintage*; LBV — vinho do Porto Late Bottled, *vin du Porto Late Bottled Vintage*; M — mosto, *moût*; Vseco — vinho do Porto seco, *vin du Porto sec*]

Referência / Data da colheita	Frutose (g/l)	Glucose (g/l)	Açúcares redutores (frut. + gluc.) (g/l)	Glicérol (g/l)
VP1/1954	95.7	58.4	154.1	8.7
VP2/1967	71.4	42.2	113.6	7.3
VP3/1975	83.1	45.8	128.9	7.3
VP4/1986	75.2	53.8	129.0	4.5
Vint1/1955	61.0	35.1	96.1	7.6
Vint2/1963	62.2	35.7	97.9	7.9
Vint3/1975	41.6	37.8	79.4	6.4
Vint4/1985	67.9	33.2	101.1	6.8
LBV1/1969	69.9	44.4	114.3	7.7
LBV2/1974	71.0	44.4	115.4	6.9
LBV3/1976	76.0	48.5	124.5	6.1
LBV4/1983	65.4	41.1	106.5	7.2
M1 t.fr. 17/9	66.2	90.6	156.8	—
M2 t.fr. 25/9	83.3	95.0	178.3	—
M3 t.r. 17/9	69.0	95.8	164.8	—
M4 t.r. 25/9	123.5	130.8	254.3	—
Vseco 1	24.9	13.1	38.0	8.7
Vseco 2	21.9	11.9	33.8	8.1
Vseco 3	21.1	12.0	33.1	8.7
Vseco 4	22.4	13.1	35.5	7.8

QUADRO III

Dados estatísticos referentes à avaliação de glicerol

Résultats statistiques pour les déterminations du glycérol

[n — n.º de determinações, n.º de déterminations; \bar{x} — média, moyenne; T/\sqrt{n} — intervalo de confiança da média, intervalle de confiance; s — desvio padrão, écart type; CV — coeficiente de variação, coefficient de variation; R — repetibilidade, répétabilité]

Amostra	Resultados estatísticos	n	\bar{x} (g/l)	T/\sqrt{n} (g/l)	s (g/l)	CV (%)	R (%)
padrão		6	4.9	0.01	0.01	0.30	1.00
VP1 s/ dil.		6	8.7	0.23	0.09	1.04	3.78
VP1 dil. 10 %		6	7.9	0.18	0.17	2.16	7.85
Vseco 3		6	8.7	0.17	0.16	1.84	6.68

QUADRO IV

Dados estatísticos referentes à avaliação de frutose

Résultats statistiques pour les déterminations du fructose

[n — n.º de determinações, n.º de déterminations; \bar{x} — média, moyenne; T/\sqrt{n} — intervalo de confiança da média, intervalle de confiance; s — desvio padrão, écart type; CV — coeficiente de variação, coefficient de variation; R — repetibilidade, répétabilité]

Amostra	Resultados estatísticos	n	\bar{x} (g/l)	T/\sqrt{n} (g/l)	s (g/l)	CV (%)	R (%)
padrão		6	6.9	0.08	0.08	1.13	4.12
VP1 dil. 10 %		6	95.7	1.02	0.97	1.01	3.68
M1 dil. 10 %		6	66.2	0.74	0.71	1.10	3.90
Vseco 3		6	21.1	0.09	0.09	0.42	1.54

QUADRO V

Dados estatísticos referentes à avaliação de glucose
Résultats statistiques pour les déterminations du glucose

[n — n.º de determinações, n.º de *déterminations*; \bar{x} — média, *moyenne*;
 T/\sqrt{n} — intervalo de confiança da média, *intervalle de confiance*;
s — desvio padrão, *écart type*; CV — coeficiente de variação, *coefficient de variation*; R — repetibilidade, *répétabilité*]

Amostra	Resultados estatísticos	n	\bar{x} (g/l)	T/\sqrt{n} (g/l)	s (g/l)	CV (%)	R (%)
padrão		6	9.0	0.18	0.17	1.90	6.90
VP1 dil. 10 %		6	58.4	0.89	0.85	1.46	5.29
M1 dil. 10 %		6	90.6	2.52	2.40	2.10	9.60
Vseco 3		6	12.0	0.28	0.27	2.23	8.09

QUADRO VI

Exactidão do doseamento da glucose (através do cálculo da recuperação RC)

Exactitude du dosage de la glucose (par calcul de la récupération RC)

Amostra	Resultados	Glucose doseada em 10 ml (mg/l)	glucose adicionada a 10 ml (mg/l)	Glucose total doseada em 10 ml (mg/l)	RC (%)
Vint 1		35.1	25.0	61.2	104.4
dil. 10 %		35.1	50.0	86.4	102.6
		35.1	100.0	141.8	106.7
		35.1	200.0	234.0	99.5
Mosto	tour. fr.	95.0	101.8	197.6	100.8
	tinta roriz	130.9	98.0	227.6	98.3
Vseco 3		119.9	44.3	168.0	108.3

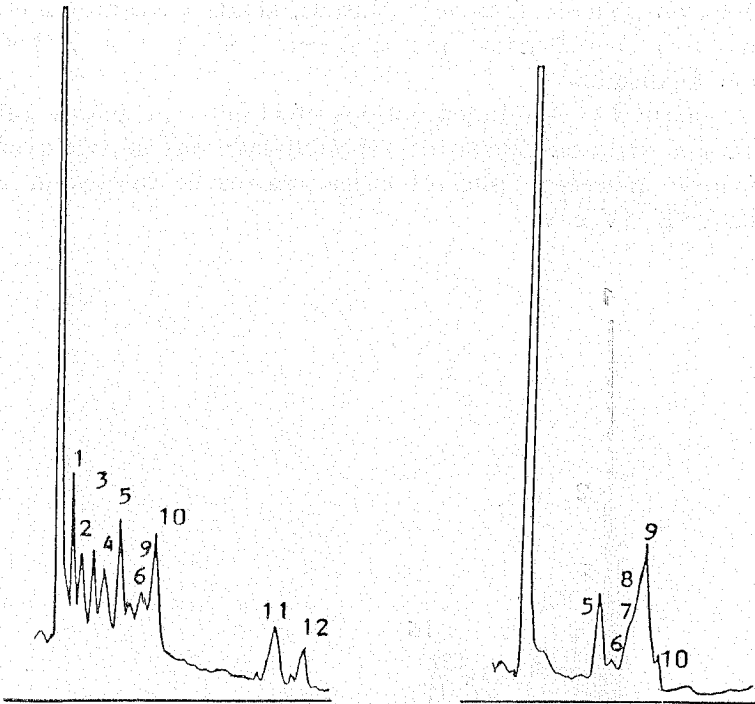


Fig. 1 — Cromatogramas de soluções padrão [ACN/H₂O (90:10) e fluxo 1 ml/min].

[1. glicerol, 2. ribose e ramnose, 3. xilose, 4. arabinose, 5. frutose, 6. manose, 7. manitol, 8. sorbitol, 9. glucose, 10. galactose, 11. sacarose, 12. inositol, 13. celbiose, 14. maltose, 15. trealose, 16. lactose, 17. melibiose, 18. melizitose, 19. rafinose].

Cromatogrammes des mélanges étalons [ACN/H₂O (90:10) et débit 1 ml/min].

[1. glycérol, 2. ribose et rhamnose, 3. xylose, 4. arabinose, 5. fructose, 6. mannose, 7. mannitol, 8. sorbitol, 9. glucose, 10. galactose, 11. saccharose, 12. inositol, 13. celbiose, 14. maltose, 15. thréalose, 16. lactose, 17. mélbiose, 18. mélizitose, 19. raffinose].

quantificar a frutose, a glucose e o glicerol, cujos resultados se inscrevem no Quadro II. Não é de excluir, contudo, a existência de alguns dos outros açúcares e polióis que a técnica permite dosear, mas, a existirem, por certo estarão presentes abaixo do limite de detecção. A Figura 5 apresenta um cromatograma de um vinho do Porto tawny, onde se pode verificar, além da

presença do glicerol, frutose e glucose, sinais de pentoses e de 2 picos não identificados, que aparecem em todos os vinhos e mostos analisados.

A partir dos resultados obtidos efectuou-se a análise estatística com vista ao cálculo da repetibilidade das determinações da frutose, glucose e glicerol cujos valores se inscrevem nos Quadros III, IV e V.

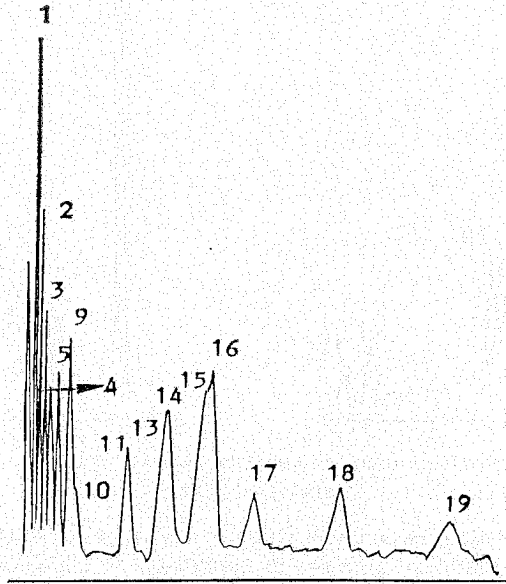


Fig. 2 — Cromatogramas de soluções padrão [ACN/H₂O (84:16) e fluxo 2 ml/min].

- [1. glicerol, 2. ribose e ramosse, 3. xilose, 4. arabinose, 5. frutose, 6. manose, 7. manitol, 8. sorbitol, 9. glucose, 10. galactose, 11. sacarose, 12. inositol, 13. celobiose, 14. maltose, 15. trealose, 16. lactose, 17. melibiose, 18. melizitose, 19. rafinose].

Cromatogrammes des mélanges étalons [ACN/H₂O (84:16) et débit 2 ml/min].

- [1. glycérol, 2. ribose et rhamnose, 3. xylose, 4. arabinose, 5. fructose, 6. mannose, 7. mannitol, 8. sorbitol, 9. glucose, 10. galactose, 11. saccharose, 12. inositol, 13. celobiose, 14. matlose, 15. thréalose, 16. lactose, 17. mélibiose, 18. mélizitose, 19. raffinose].

O estudo da exactidão do processo foi efectuado como atrás se refere, através do cálculo da recuperação, por adição de teores conhecidos de glucose às amostras mencionadas no Quadro VI.

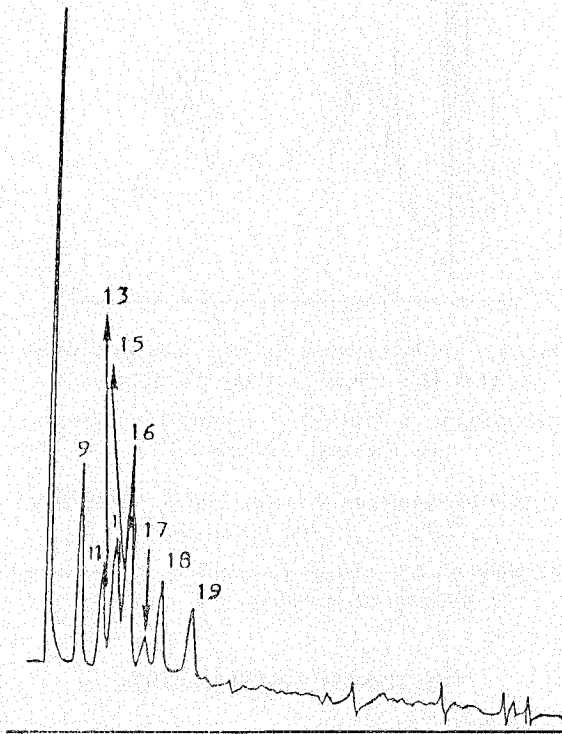


Fig. 3 — Cromatograma de uma solução padrão [ACN/H₂O (80:20) e fluxo 1 ml/min].

[9. glucose, 11. sacarose, 12. inositol, 13. celobiose, 14. maltose, 15. trealose, 16. lactose, 17. melibiose, 18. melizitose, 19. rafinose].

Cromatogramme de mélange étalon [ACN/H₂O (80:20) et débit 1 ml/min].

[9. glucose, 11. saccharose, 12. inositol, 13. celobiose, 14. maltose, 15. thréalose, 16. lactose, 17. mélibiose, 18. mélizitose, 19. raffinose].

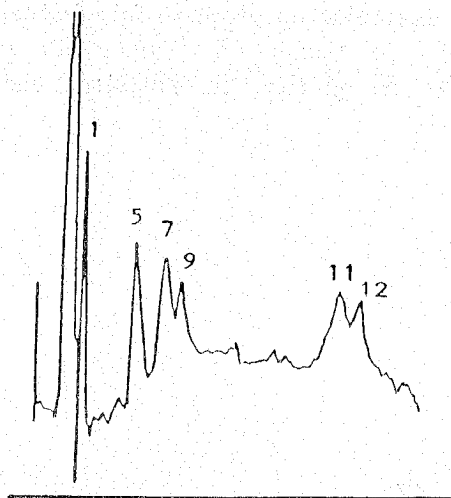


Fig. 4 — Cromatograma de uma solução padrão [ACN/H₂O (90:10) e fluxo 0.8 ml/min].

[1. glicerol, 5. frutose, 7. manitol, 9. glucose, 11. sacarose, 12. inositol].

Cromatogramme de mélange étalon [ACN/H₂O (90:10) et débit 0.8 ml/min].

[1. glycérol, 5. fructose, 6. mannose, 7. mannitol, 9. glucose, 11. saccharose, 12. inositol]

DISCUSSÃO E RESULTADOS

Facilidade e rapidez de execução

Os resultados apresentados no Quadro I, relativos aos tempos de retenção e limites de detecção dos açúcares e do glicerol, provam a capacidade de aplicação da técnica a misturas diversificadas, revelando uma fácil e rápida execução comparativamente a outros métodos de análise dos mesmos compostos.

Sensibilidade do método

A utilização do detector de índice de refração, mesmo actuando a temperatura controlada, conduz a resultados de reduzida sensibilidade, se se comparar com a que outros detectores de HPLC proporcionam. Como se pode deduzir do Quadro I, os limites de detecção da técnica situam-se entre os valores

extremos de 150 mg/l (para o glicerol) a 500 mg/l (para a maior parte dos di- e trissacáridos). Estes resultados são concordantes com os de diversos autores (Tusseau e Bouniol, 1984, Tusseau e Benoit, 1984).

Se se atentar no Quadro II, referente aos valores de frutose, glucose e glicerol nas amostras, pode verificar-se que o total doseado é da ordem dos 40 g/l para os vinhos secos e 100-200 g/l

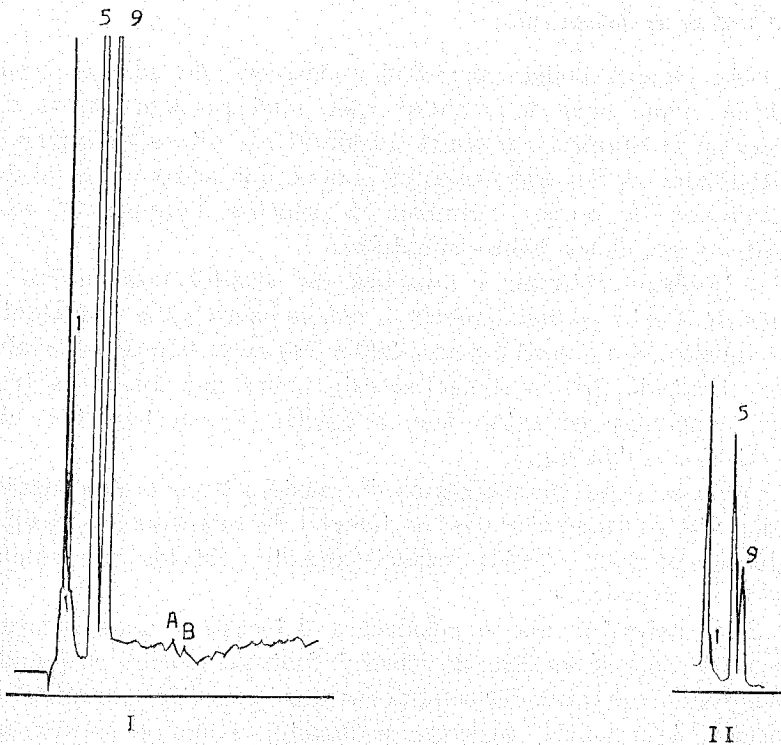


Fig. 5 — Cromatogramas de um vinho do Porto tawny [ACN/H₂O (84:16) e fluxo 2 ml/min].

I — injeção directa; II — injeção de vinho diluído a 10 %;
A e B — picos não identificados; 1. glicerol,
5. frutose, 9. glucose.

Cromatogramme de vin du Porto tawny [ACN/H₂O (84:16) et débit 2 ml/min].

*I — injection directe; II — injection du vin dilué à 10 %;
A et B — pics non identifiés; 1. glycérol, 5. fructose,
9. glucose.*

para os restantes vinhos e mostos. Se se imaginar que as pentoses estão presentes numa concentração global que poderá atingir os 0,5 g/l, como se refere em Alves e Ferreira (1988), então a falta de quantificação destas conduzirá a um erro da ordem de 1 % para os vinhos secos e de 0,5 a 0,3 para os restantes mostos e vinhos do Porto, mesmo assim visivelmente desprezável face à precisão do método.

Possibilidade de doseamento

Esta técnica poderá permitir a detecção de adições fraudulentas, como seja de *sorbitol* (por mistura com sumos de frutas) ou de *manitol* (presença accidental por alteração láctica). A dificuldade de separação destes polióis, que são eluídos muito próximo um do outro e também da glucose (Figura 1), não permite o seu doseamento simultâneo.

É também referida a presença de *inositol* nos mostos e vinhos do Porto, nomeadamente o seu isómero mais abundante *meso-inositol*, em quantidades de 200 a 700 mg/l (Curvelo-Garcia, 1988). Contudo, não se detectou este poliol nas amostras testadas, concluindo-se então que, a existir, o seu teor terá de ser inferior a 500 mg/l.

Como se pode ver na Figura 5, existem 2 picos não identificados até ao momento, com os tempos de retenção em relação à glucose de 2,23 e 2,47, respectivamente, obtidos nas condições II do Quadro I.

É de salientar que é possível a detecção e quantificação através de uma só análise, de glicerol, frutose, glucose e, quando presentes em quantidades superiores aos respectivos limites de detecção, de manitol, sacarose e inositol, como se prova na Figura 4.

Doseamento da frutose, glucose e glicerol

Os valores doseados de açúcares redutores (Quadro II) são concordantes com os referidos por Ribeiro (1961-1962), obtidos com processos químicos. A relação glucose/frutose (G/F) é da ordem de 0,6 para os vinhos e superior a 1 para os mostos. Na verdade, no início da maturação a glucose é o constituinte maioritário. Depois, vai-se dando um enriquecimento progressivo em açúcares, essencialmente à custa da frutose, o que origina

na época da vindima uma relação G/F aproximadamente igual a 1 ou até inferior. Durante a fermentação a glucose é o principal açúcar a ser degradado e, como tal, nos vinhos a relação G/F será nitidamente inferior a 1, embora para o caso particular dos vinhos do Porto, em que a fermentação é interrompida, esse decréscimo não seja tão acentuado.

Quanto ao glicerol, os valores referidos no Quadro II (5 a 7 g/l) são superiores aos valores obtidos quer através de métodos químicos (Ramos e Gomes, 1974-1976), quer por cromatografia gasosa (Ramos e Gomes, 1974-1976) (4 a 6 g/l). É de referir, no entanto, a interferência do 2,3-butilénoglicol e do manitol nos métodos químicos e a falta de precisão dos métodos de cromatografia em fase gasosa.

Sendo o glicerol um produto da fermentação, quanto mais cedo a fermentação for interrompida, maior o teor em açúcares nos vinhos e menor deverá ser o teor em glicerol. Este facto não é evidente nos resultados do Quadro II, embora para os vinhos secos se observem valores ligeiramente superiores aos dos restantes vinhos. Na verdade, existem outros factores em jogo, que afectam estas conclusões, como seja a aguardentação, que é, como se sabe, uma operação tecnológica praticada no vinho do Porto.

Precisão e exactidão do método

As repetibilidades das análises de frutose e glucose (Quadros IV e V) rondam 1,5-4 % e 5-8 %, respectivamente. Estes valores são idênticos aos obtidos por Tusseau e Bouniol (1984). São considerados indicadores de boa precisão para os métodos cromatográficos.

Devido à universalidade do detector de índice de refração, é muito difícil atenuar o ruído de fundo e, por isso, uma variação de 1 mm na altura do pico provoca variações de concentração de 1 g/l para a frutose e 1,5 g/l para a glucose. Assim, para concentrações de 50 g/l, uma variação de 1 mm na altura do pico representa por si só, para cada um dos açúcares referidos, erros de 2 % e 3 %, respectivamente, e se for de 90 g/l serão de 1 % e 1,7 %, respectivamente, o que são erros aceitáveis num método analítico deste tipo.

Quanto à exactidão do método, pode considerar-se que os valores de recuperação — Quadro VI — são bons para análises

destes compostos, na medida em que se situam na mesma ordem de grandeza (98,3 a 108,3 %) dos valores obtidos para a precisão. Para avaliar a exactidão, optou-se pelo método das adições e não pelo processo de referência a outro método, porque os métodos químicos se revelaram com exactidão discutível devido às interferências no doseamento e, de momento, não se pôde utilizar processos enzimáticos. No entanto, Tusseau e Bouniol (Tusseau e Bouniol, 1984) apresentaram uma comparação com um método enzimático e obtiveram resultados concordantes.

Foi feito um ajuste linear para os resultados do Quadro VI referentes às amostras de Vintage 1, em termos de «glucose total doseada» (y) vs «glucose adicionada» (x) (2.^a e 3.^a colunas respectivamente). Obteve-se uma recta $y = 38,18 + 0,99 x$, com coeficiente de correlação 0,999 e para a qual a ordenada na origem representa o teor em glucose na amostra antes das adições. A diferença entre este valor (38,18) e o valor doseado, referido no Quadro VI (35,1) conduz a um erro de 8 %, que é igual ao valor médio obtido para a precisão do método na análise da glucose.

Em relação aos resultados obtidos para a repetibilidade das análises do glicerol — Quadro III — a precisão é superior se se fizer injeção directa de vinho (R = 3,8 %) do que com vinho diluído a 10 % (R = 7,9 %), porque a altura do pico neste caso é pequena e próxima do limite de detecção, logo sujeita a maior erro.

CONCLUSÕES

Como conclusões essenciais, considera-se a técnica estudada útil para o doseamento de frutose, glucose e glicerol, para a detecção de sorbitol e para a detecção e quantificação de manitol, quando presentes em quantidades superiores a 300 mg/l, quer nos mostos quer nos vinhos do Porto.

Revelou-se como um processo adequado para o seguimento da maturação, uma vez que permite a avaliação da relação G/F com segurança.

Não foi possível a identificação de 2 picos que foram visualizados em todos os cromatogramas quer de mostos quer de vinhos. Embora se prossiga a investigação nesse sentido, pode-se

desde já adiantar que é de excluir tratar-se de inositol e dos restantes compostos analisados.

Sugere-se a introdução da técnica como alternativa aos métodos químicos oficiais, pela sua simplicidade (não exige preparação prévia da amostra), pela sua rapidez de execução (separação de glicerol, frutose e glucose em 10 min), pela sua boa precisão (valores médios de repetibilidade de 6 %, 3 % e 8 %, para o glicerol, frutose e glucose, respectivamente) e exactidão (recuperação entre 98,3 % e 108,3 %, para a glucose).

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. II. Détermination des sucres et des polyols dans les moûts et les vins du Porto par chromatographie liquide à haute performance

Une technique de chromatographie liquide à haute performance est étudiée, pour l'application à l'analyse simultanée des sucres et des polyols dans les moûts et les vins du Porto. La méthode offre une grande simplicité (aucune séparation des échantillons), rapidité d'exécution (séparation du glycérol, fructose et glucose en 10 min), bonne précision (moyennes de 6 %, 3 % et 8 % pour la répétabilité du glycérol, fructose et glucose) et exactitude (récupération de 98,3 %-108,3 %, pour la glucose).

C'est donc une méthode bien adaptée aux besoins des laboratoires d'analyses œnologiques en alternative aux méthodes chimiques officielles. Ce protocole est applicable aussi au dosage d'autres sucres et polyols, si présents en plus du seuil de détection respectif (150-500 mg/l).

SUMMARY

Musts and wines analyses. II. Quantitative determination of sugars and polyols in musts and Port wines by high performance liquid chromatography

A method is presented for the simultaneous determination of sugars and polyols in musts and Port wines by HPLC. This method proves simple (no sample preparation is needed), fast (separation of glycerol, fructose and glucose in 10 min), precise (average repeatability of 6 %, 3 % and 8 % for glycerol, fructose and glucose respectively) and accurate (recuperation between 98,3 % and 108,3 %).

The method is a good alternative to the official chemical methods and useful in oenological laboratories, specially for the quantification of glucose, fructose, sacarose and glycerol. It is also applicable in the quantitative determination of other sugars and polyols when present in quantities superior to detection limit (close to 150-500 mg/l, depending of the compound in question).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, M. A. e M. A. Ferreira
1989 *Análise de mostos e vinhos. I. Métodos de doseamento dos açúcares.*
Para publicação na mesma revista.
- Amerine, M. A. e M. A. Joslyn
1970 *Table Wines.* University of California Press. 2nd edition.
- Bouvier, J. C. e A. S. Curvelo-Garcia
1988 *A análise automática em Enologia.* Enologia, 12, 27-43.
- Curvelo-Garcia, A. S.
1988 *Controlo de qualidade dos vinhos.* Instituto da Vinha e do Vinho. Lisboa.
- Dunmire, D. L. e S. Otto
1979 *High pressure liquid chromatographic determination of sugars in various food products.* J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62 (1): 176-185.
- Gottschalk, G. e R.-E. Kaiser
1979 *Tests elementaires pour l'analyse de resultats de mesures,* O. I. V., F. V. 707.
- Johnson, E. L. e R. Stevenson
1978 *Basic liquid chromatography.* Varian Associates, U. S. A., pág. 27.
- Ramos, M. C. e L. G. Gomes
1974-1976 *A glicérina no Vinho do Porto — cromatografia em fase gasosa.*
Anais do Vinho do Porto, I. V. P.
- Ribeiro, M. B.
1961-1962 *Sobre o doseamento dos açúcares redutores no vinho do Porto.* Anais do vinho do Porto, I. V. P.
- Ribéreau-Gayon, J.
1976 *Sciences et techniques du vin.* Tome I. Dunod. Paris.
- Smith, J. S., M. C. Villalobos e C. M. Kottemann
1986 *Quantitative determination of sugars in various food products.*
Journal of Food Science, 51 (5): 1373-1375.
- Tusseau, T. e C. Benoit
1986 *Determination du glicerol et des glucides dans les moûts, vins et champagnes par chromatographie liquide de haute performance: répétabilité, reproductibilité.* Science des aliments, 6: 559-577.
- Tusseau, T. e C. Bouniol
1984 *Determination des glucides dans les moûts, vins et champagnes par HPLC.* O. I. V., F. V. 776.