

# As potencialidades da técnica SPME aplicada à análise de vinhos

**Jean-Michel RIBOULET, Luiz Armando Reis ALVES**

CEVAQOE – Laboratório de Análises Agro-Alimentar, Lda.

Rua dos Eucaliptos nº 9 ♦ 4535-311 Paços de Brandão ♦ Portugal

Tel.: (351) 22 745 56 91 / 94 80 ♦ Fax: (351) 22 746 00 14

E-mail: cevaqoe@netvisao.pt

## 1 – INTRODUÇÃO

No domínio agro-alimentar, a qualidade das análises dos compostos orgânicos, presentes apenas em quantidades vestigiais, em matrizes alimentares, está assente na especificidade e na eficácia das etapas de extracção e de purificação, bem como, na sensibilidade dos métodos cromatográficos utilizados. Esta metodologia deve ser considerada no sentido de incrementar as análises de compostos voláteis, de aromas, de pesticidas ou de todos os outros contaminantes químicos qualquer que seja a matriz alimentar. Isto é igualmente válido para o vinho, para o qual a caracterização dos aromas ou das moléculas responsáveis por falsos gostos bem como a segurança da sua qualidade sanitária, devem ser baseadas em métodos de análise sensíveis e selectivos.

A preparação das amostras de vinho, antes da análise por cromatografia, recorre frequentemente a técnicas de extracção líquido-líquido ou purificação em fase sólida (SPE). Técnicas menos correntes são igualmente utilizadas, como a “Purge and Trap” ou a extracção por fluido em fase supercrítica (SFE). Apesar da sua eficácia, estas operações são bastante dispendiosas quer em tempo quer em termos monetários, requerem quantidades substanciais de solventes, ou são de difícil realização.

A Microextracção em Fase Sólida (SPME) é uma técnica de concentração que não necessita de solventes e onde a preparação da amostra é frequentemente limitada pela sua amostragem. Esta técnica consiste na partição dos compostos a analisar entre a matriz da amostra e uma fase polimérica específica suportada por uma fibra de sílica.

Introduzida no início dos anos 1990 por Pawliszin et al. <sup>[1]</sup> e <sup>[2]</sup>, esta técnica permite o tratamento das amostras em todo o tipo de matrizes (sólidas, líquidas, gasosas) e tem aplicações numerosas em domínios tão variados como o ambiente, farmácia ou agro-alimentar. A técnica SPME pode ser utilizada em conjunto com a cromatografia gasosa ou líquida.

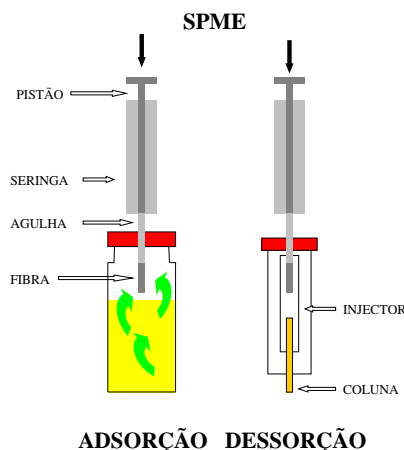
O objectivo deste artigo é dar uma panorâmica actual sobre as utilizações já correntes e sobre as potencialidades da técnica SPME aplicadas à análise de vinhos.

## 2 – DESCRIÇÃO DA TÉCNICA SPME

### 2.1 - Generalidades

O princípio da concentração por SPME está esquematizado na figura 1 e consiste na adsorção ou absorção, consoante a natureza das interacções em causa, dos compostos químicos sobre uma fase polimérica suportada por uma fibra de sílica.

Em função da tensão de vapor dos compostos químicos pesquisados, a concentração sobre a fibra de SPME pode ser conduzida em modo de espaço de cabeça (headspace), ou em modo de imersão. Em modo de headspace, a fibra adsorve os analitos em causa na fase gasosa, situada acima da matriz líquida ou sólida a analisar. O modo de imersão é reservado às fases líquidas e a fibra é mergulhada na matriz.



**Figura 1:** Princípio da análise por SPME

Uma vez concentrados na fibra de SPME, os compostos químicos podem ser desorvidos termicamente no injetores de um cromatógrafo em fase gasosa. No caso de um acoplamento com um cromatógrafo em fase líquida (HPLC), os compostos químicos concentrados sobre a fibra são eluídos por um solvente adequado ou pela fase móvel, para serem seguidamente injectados numa coluna empacotada.

## 2.2 – Parâmetros importantes

A eficácia da técnica SPME depende principalmente da quantidade de analitos que é possível concentrar sobre a fibra. Esta concentração do analito na fase polimérica é estabelecida pelas constantes de equilíbrio termodinâmicas, que regem os equilíbrios de partição entre a matriz da amostra, a fase líquida ou gasosa onde se encontra a amostra e a fase polimérica. Estes equilíbrios termodinâmicos dependem dos diferentes parâmetros físico-químicos:

- **Temperatura:**  
O aumento de temperatura pode facilitar a transferência dos compostos voláteis ou semi-voláteis da fase líquida ou sólida para a fase gasosa (espaço de cabeça).
- **pH:**  
O pH do meio deve ser ajustado em função dos caracteres ácido-básicos dos compostos pesquisados, para que estes estejam no estado neutro no meio.
- **Força iónica:**  
A adição de sal até saturação, como por exemplo o cloreto de sódio ou o sulfato de sódio, em matrizes líquidas permite aumentar a força iónica do meio. Isto tem como efeito diminuir a solubilidade de numerosos compostos orgânicos, que migram assim para a fase gasosa do espaço de cabeça.
- **Agitação:**  
A agitação da amostra durante a amostragem por SPME permite atingir mais rapidamente os equilíbrios de partição dos analitos entre as diferentes fases.
- **Natureza da fibra:**  
Vários tipos de fibra estão disponíveis comercialmente. Estas diferem entre elas pela natureza do polímero e da sua quantidade. Certas fibras podem igualmente ter dois ou três polímeros diferentes. Cada tipo de fibra apresenta uma especificidade para uma dada classe de compostos. O **quadro I** agrupa as fibras de SPME mais utilizadas.

### *Quadro I: Especificidade das fibras SPME*

<b>Tipos de fibra</b>	<b>Classe de compostos</b>
100 µm PDMS	Voláteis e semi-voláteis
65 µm Carbowax-DVB	Compostos polares, ácidos voláteis
65 µm PDMS-DVB	Voláteis e semi-voláteis
75 µm Carboxen-PDMS	Gases, compostos voláteis
50-30µm DVB-Carboxen-PDMS	Gases, compostos voláteis e semi-voláteis

(PDMS: Polidimetilsiloxano; DVB: Divinilbenzeno)

## **3 – UTILIZAÇÃO DA SPME NA ANÁLISE DE VINHOS**

### **3.1 – Caracterização dos aromas do vinho**

O “bouquet” de um vinho é o resultado da associação de numerosos compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis correspondentes a diferentes aromas. Entre estes compostos, os álcoois terpénicos e os ésteres etílicos representam a maior parte. Trata-se em particular dos analitos seguintes: óxidos de linalol cis- e trans-, linalol, ho-trienol, alfa-terpineol, propanoato de etilo, butanoato de etilo, hexanoato de etilo, lactato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo e dodecanoato de etilo.

Todos estes compostos podem ser extraídos do vinho por partição líquido-líquido recorrendo a solventes usuais, tais como o diclorometano ou o pentano. Esta técnica é muito demorada e coloca problemas de segurança, pois utiliza volumes consideráveis de solventes. Além disso, a etapa de concentração por evaporação, pode levar à perda de analitos presentes em baixas concentrações e que podem ter um impacto organoléptico bastante significativo.

A utilização da SPME permite contornar estes obstáculos limitando a preparação da amostra à sua amostragem. O trabalho de preparação analítica consiste agora, essencialmente, na optimização das condições de extracção por SPME (temperatura, adição de sal, tipo de fibra, tempo de adsorção, ...) e dos parâmetros cromatográficos.

Numerosos autores [3], [4], [5] e [6] utilizaram a técnica de SPME para caracterizar os constituintes do “bouquet” dos vinhos. A automatização desta técnica permite igualmente efectuar estudos estatísticos que podem conduzir à classificação de diferentes tipos de vinho segundo o seu perfil cromatográfico.

A título de exemplo, a equipa de De la Calle Garcia [3] interessou-se pelos derivados norisoprenoides (álcoois terpénicos) presentes nos vinhos de origem Alemã. A extracção destes compostos foi conduzida sobre tomas de ensaio de 600µL de vinho, por adsorção à temperatura ambiente durante 60 minutos sobre uma fibra de SPME em poliacrilato. Com base na repartição dos compostos norisoprenoides, um estudo estatístico permitiu classificar os vinhos segundo a sua origem (Riesling, Silvaner, Mueller-Thurgau).

Um outro estudo conduzido pela equipa de Bonino [6] interessou-se pelos perfis aromáticos do vinho de origem Italiana. A extracção dos vinhos, realizados com o auxílio de uma fibra PDMS-Divinilbenzeno, permitiu identificar 59 compostos, dos quais 23 nunca tinham sido evidenciados pela extracção líquido-líquido.

### **3.2 – Defeitos organolépticos do vinho**

Numerosos defeitos podem alterar a qualidade organoléptica dos vinhos. O **quadro II** agrupa os defeitos mais frequentemente observados e para os quais os marcadores químicos estão claramente identificados.

**Quadro II:** Principais defeitos sensoriais do vinho e marcadores químicos associados.

Defeitos	Marcadores químicos	Nível de percepção nos vinhos
Mofo	Cloroanisóis; 2,4,6-tribromoanisol	A partir de 2 ng/litro
Terroso	Geosmina	A partir de 30 ng/litro
	2-metilisoborneol	3 ng/litro (água)
	2-metoxi-3-isopropilpirazina	2 ng/litro
Animal, fumo	Fenóis voláteis	420 µg/litro

○ *Sensação “mofo”:*

A sensação do tipo “mofo” ou “cortiça” é muito frequentemente associada à presença nos vinhos de cloroanisóis (2,4,6-tricloroanisol e 2,3,4,6-tetracloroanisol) ou de 2,4,6-tribromoanisol. Os anisóis tri-halogenados podem apresentar níveis de percepção extremamente baixos (até 0,5 ng/litro) dependendo do tipo de vinho. Assim, as técnicas de extracção clássicas (partição líquido-líquido, purificação sobre cartucho) podem, por vezes, não ser suficientemente sensíveis para caracterizar este tipo de defeito sensorial.

Numerosas publicações apareceram desde 1997 sobre a extracção dos haloanisóis por SPME <sup>[7], [8] e [9]</sup>. Na maioria dos casos, a extracção dos compostos odoríferos é conduzida sobre uma fibra em PDMS de 100µm de espessura. A análise por GC-MS (cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massa) permite utilizar padrões analíticos deuterados, como o 2,4,6-tricloroanisol, e aumentar assim a fiabilidade e a robustez do método. A sensibilidade destes métodos pode atingir entre 0,2 e 0,5 ng/litro.

○ *Sensação “terroso”:*

A sensação do tipo “terroso” nos vinhos engloba outras percepções, tais como “beterraba vermelha”, “terra revolvida” e “mofo”. A geosmina é, actualmente, o marcador químico normalmente mais atribuído a este tipo de defeito. Outras moléculas podem ser associadas a este tipo de sensação, nomeadamente, a 2-metoxi-3-isopropilpirazina ou o 2-metilisoborneol.

A 2-metoxi-3-isopropilpirazina foi identificada em vinhos tintos com um nível de percepção de cerca de 2 ng/litro <sup>[10]</sup>.

O 2-metilisoborneol é responsável pelas sensações “terroso” em águas contaminadas. Visto a molécula ser instável em meio ácido, a sua presença nos vinhos é neste momento hipotética.

A análise de todos estes compostos pode ser realizada por SPME acoplada com GC-MS. No caso da geosmina, a extracção é realizada sobre uma fibra PDMS de 100µm de espessura a 40°C durante 30 minutos. A quantificação é baseada numa padronização interna relativamente à geosmina deuterada <sup>[11]</sup>.

A 2-metoxi-3-isopropilpirazina, bem como as pirazinas análogas (metoxietilpirazina e metoxi-isopropilpirazina), podem igualmente ser analisadas por SPME acoplada com a GC-MS, mas com fibras muito mais adsorventes, tais como o DVB-Carboxen-PDMS.

○ *Sensação “animal”, “fumo”:*

O 4-etilfenol e o 4-etilgaiacol são responsáveis nos vinhos tintos pelas notas do tipo “animal” ou “fumo”. O nível de percepção destes compostos situa-se próximo de

400µg/litro. Assim, as técnicas clássicas de extracção por partição líquido-líquido adaptam-se bem e são suficientemente sensíveis.

A utilização da SPME é, no entanto, mais interessante, no sentido que ela permite reduzir o tempo de tratamento das amostras e portanto limitar as perdas destes compostos extremamente voláteis. A análise cromatográfica pode indiferentemente ser efectuada por GC-MS ou GC-FID (detector de ionização de chama) <sup>[12]</sup> e <sup>[13]</sup>.

### **3.3 – Contaminantes químicos**

Os resíduos de produtos fitossanitários são os principais contaminantes químicos pesquisados nos vinhos. Os métodos de análise mais correntemente utilizados consistem normalmente numa etapa de concentração sobre cartucho SPE, seguido de uma eventual derivação química (cuja finalidade é facilitar a análise cromatográfica). Os extractos obtidos são analisados por cromatografia em fase gasosa ou em fase líquida.

O recurso à técnica de SPME desenvolveu-se sobretudo no sector ambiental e nomeadamente no caso das análises de água. Este trabalho preliminar serviu de base para o desenvolvimento de métodos de análise de pesticidas nas bebidas em geral e no vinho em particular.

Os produtos fitossanitários caracterizam-se frequentemente por um peso molecular elevado (> 200 g/mol) e uma tensão de vapor relativamente baixa. Assim, as condições de extracção por SPME são mais drásticas que no caso da análise de aromas. O aquecimento das amostras acima de 50°C pode ser suficiente para certos compostos. Noutros casos, a imersão da fibra no líquido a analisar é por vezes o único caminho para atingir uma sensibilidade suficiente. Por fim, a escolha da fibra tem igualmente uma influência não desprezável. As fibras mistas (PDMS-DVB, PDMS-Carboxen-DVB) mostram-se por vezes mais adaptadas que as fibras simples (PDMS, poliacrilato).

A título de exemplo, a análise de produtos anti-botritis: ciprodinil e fludioxonil pode ser conduzida nos vinhos por SPME acoplada a GC-MS <sup>[14]</sup>. A extracção é conduzida em modo de imersão sobre uma fibra composta PDMS-Carboxen-DVB. Com limites de detecção compreendidos entre 100 e 200 ng/litro, esta técnica é mais sensível que os modos operatórios clássicos e é de mais fácil implementação.

O vinho pode igualmente conter, de forma accidental, vestígios de hidrocarbonetos derivados do benzeno (BTEX), solventes halogenados e estireno. Estes compostos têm origem em contaminações atmosféricas ou são transmitidos pelo revestimento das cubas onde eles são armazenados.

Para estes compostos, voláteis e semi-voláteis, a extracção por SPME mostra-se muito eficaz e muito sensível. Assim, uma extracção de 15 minutos no espaço de cabeça sobre uma fibra mista (PDMS-Carboxen-DVB), permite atingir uma sensibilidade compreendida entre 1 e 5µg/litro para todos estes compostos.

## **4 – CONCLUSÕES**

Efectuamos neste artigo uma visão sobre as potencialidades das aplicações da Microextracção em Fase Sólida no domínio dos vinhos. As vantagens sobre as técnicas clássicas de extracção são consideráveis, pois a utilização de solventes é suprimida e o tempo de preparação é consideravelmente reduzido.

Os métodos de análise dos aromas e dos desvios sensoriais beneficiam consideravelmente das vantagens desta técnica. Rápidas e fiáveis, adequam-se melhor para controlos de qualidade regulares.

No domínio dos contaminantes químicos das análises de pesticidas, de hidrocarbonetos aromáticos e de solventes, estas técnicas são utilizadas em rotina. No entanto, devido ao peso molecular, à polaridade excessiva e/ou baixa tensão de vapor de certos compostos, é necessário um trabalho de preparação mais aprofundado e cuidado.

Existem no entanto algumas pistas para uma melhoria, tais como, o desenvolvimento de novas fibras, a utilização de uma maior quantidade de adsorvente polimérico, ou ainda a derivatização “*in situ*” de compostos muito polares.

## 5 – BIBLIOGRAFIA

- (1) Arthur C.L., Pawliszin J., *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145.
- (2) Zhang Z., Pawliszin J., *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1843.
- (3) De la Calle D., Reichenbacher M., Danzer K., Hurlbeck C., Bartzch C., Feller K-H., *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, 21, 373.
- (4) Marengo E., Aceto M., Maurino V., *J. Chromatogr. A.* **2001**, 943, 123.
- (5) Rodriguez-Bencomo J.J., Conde J.E., Rodriguez-Delgado M.A., Garcia-Montelongo F., Perez-Trujillo J.P., *J. Chromatogr. A.* **2002**, 963, 213.
- (6) Bonino M., Schellino R., Rizzi C., Aigotti R., Delfini C., Baiocchi C., *Food Chemistry.* **2003**, 80, 125.
- (7) Fisher C., Fisher U., *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1995.
- (8) Juanola R., Subira D., Salvado V., Garcia Regueiro J.A., Antico E., *J. Chromatogr. A.* **2002**, 953, 207.
- (9) Riu M., Mestres M., Busto O., Guash J., *J. Chromatogr. A.* **2002**, 977, 1.
- (10) Allen M.S., Lacey M.J., Boyd S., *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 1734.
- (11) Dumoulin M., Riboulet J-M., *Revue Française d’œnologie.* **2004**, 208, 28.
- (12) Martorell N., Marti M.P., Mestres M., Busto O., Guash J., *J. Chromatogr. A.* **2002**, 975, 349.
- (13) Mejias R.C., Marin R.N., Moreno V.G., Barrose C.G., *J. Chromatogr. A.* **2003**, 995, 11.
- (14) Otero R.R., Ruiz C.Y., Grande B.C., Gandara J.S., *J. Chromatogr. A.* **2002**, 942, 41.