

ANÁLISE DA GEOSMINA EM VINHOS: CONTRIBUTO DA MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME) ASSOCIADA À ANÁLISE POR GC-MS

JEAN-MICHEL RIBOULET, LUIZ A. R. 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

RESUMO:

Surgiram recentemente no mercado mundial alguns vinhos que apresentam um forte odor a terra, cave e húmus associados à presença frequente de geosmina. Associada aos odores e aos gostos do tipo “mofo – terroso” por vezes encontrados nas águas, a geosmina pode igualmente ser detectada em vinhos. Desenvolvemos no nosso laboratório um método de determinação e quantificação da geosmina em vinhos baseado na microextracção em fase sólida (SPME) associada à espectrometria de massa (MS). O estudo dos parâmetros de adsorção SPME e a utilização do modo MS/MS permitiu-nos otimizar as condições de dosagem da geosmina em vinhos. O nosso método caracteriza-se por uma linearidade entre 10 e 200 ng/L, um limite de detecção inferior a 5 ng/L e uma repetibilidade compreendida entre 6 e 7%.

Foram efectuados ensaios relativos à pesquisa de geosmina sobre alguns vinhos tintos de diversas regiões vinícolas de Portugal (Vinhos Verdes, Douro, Dão, Bairrada, Estremadura, Ribatejo, Alentejo e Terras do Sado) e sobre as 58 amostras ensaiadas (escolhidas aleatoriamente no mercado) nenhuma apresentava defeito imputável a este composto.

Palavras-chave: *geosmina, vinho, SPME, GC-MS.*

INTRODUÇÃO

A detecção de odores a terra nos vinhos não é um fenómeno novo. Alguns tratados de enologia que datam do início do século passado já faziam referência a este fenómeno. No entanto, o aumento da frequência e da intensidade destes defeitos criou um problema económico real desde 2001 (1).

Em crescimento desde há cerca de uma dezena de anos, os odores a mofo-terroso têm vindo a contaminar um bom número de vinhos de várias regiões. A geosmina é a molécula encontrada na maioria dos vinhos que apresentam este defeito. No entanto, várias outras moléculas poderão participar neste desvio. Trabalhos de identificação de outros compostos implicados estão a ser desenvolvidos.

Análises realizadas sobre vinhos que apresentam desvios organolépticos caracterizados por sensações do tipo terroso, beterrabas vermelhas, odor a cave e húmus através da olfactometria associada à espectrometria de massa permitiram evidenciar na maioria destes vinhos a presença de *trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol*, mais conhecido sob a designação de geosmina (2).

A geosmina apresenta um nível de percepção muito baixo, da ordem de algumas dezenas de nanogramas por litro em vinhos: cerca de 25 nanogramas por litro (para um vinho branco seco) e de 60 nanogramas por litro (para um vinho tinto). A partir de 80 nanogramas por litro a percepção é clara (3).

Alguns trabalhos mostraram que os *Penicillium*, e em particular o *Penicillium Expansum* juntamente com a *Botrytis Cinerea*, poderiam estar na origem do aparecimento da geosmina na vinha.

A *Botrytis Cinerea* é maioritária e omnipresente. No entanto, o seu papel e a sua implicação na origem do gosto a mofo-terroso não estão ainda completamente elucidados. Trabalhos sobre a existência de outros microrganismos que poderão também estar implicados na produção de moléculas com carácter mofo-terroso estão em curso (1).

Estudos levados a cabo para identificar a flora presente nos bagos tendem a provar que a geosmina terá uma origem microbiana. De facto, a identificação da flora fúngica nos bagos provenientes de lugares particularmente afectados pelo aparecimento de gostos terrosos nos vinhos, mostra a presença quase sistemática de estirpes de *Penicillium Expansum* em associação com estirpes de *Botrytis Cinerea*. O potencial de produção de geosmina de *Penicillium Expansum* foi demonstrado pelo desenvolvimento das estirpes isoladas nos bagos colocados em cultura (4).

Os protocolos analíticos de determinação da geosmina desenvolveram-se sobretudo no domínio das águas. De facto, em 1965 a geosmina é evidenciada em águas de consumo apresentando gostos do tipo terroso (5). A geosmina apresenta um nível de percepção na água compreendido entre 1 e 10 ng/L, exigindo assim protocolos analíticos muito eficazes. A extracção da geosmina foi realizada inicialmente por concentração sobre adsorventes do tipo carvão activo, derivados de sílica, etc. ou através de separação líquido-líquido com hexano. Estes métodos são demorados e carecem de numerosas operações que podem dar origem a perdas de geosmina conduzindo desta forma a muitas imprecisões nos resultados.

O desenvolvimento da microextracção em fase sólida (SPME) e a utilização em rotina da cromatografia em fase gasosa (GC) associada à espectrometria de massa (MS) permitiram desenvolver métodos de análise da geosmina na água mais fiáveis e mais rápidos (6).

Apresentamos neste artigo os nossos resultados sobre o desenvolvimento do método de análise da geosmina em vinhos baseado na utilização da microextracção em fase sólida associada à cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massa.

Apresenta-se a optimização das condições de análise por espectrometria de massa, bem como o estudo da influência dos parâmetros de adsorção em SPME.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e padrões analíticos

A água de qualidade HPLC, o etanol absoluto, o ácido clorídrico a 37%, o ácido tartárico, o cloreto de sódio e o hidróxido de sódio são fornecidos pela VWR. A (+/-) geosmina a 100 µg/mL em metanol é fornecida pela SUPELCO. A (+/-) geosmina-d5 (PI, padrão interno) (análogo da geosmina em que 5 átomos de hidrogénio são substituídos por 5 átomos de deutério) é fornecida pela ULTRAFINE.

Simulante de vinho

Para o desenvolvimento do método de análise, assim como para a sua validação, é preparada uma mistura de simulante de vinho. Este, é constituído por uma mistura de água de qualidade HPLC contendo 12% de etanol absoluto em volume e 2,5 g/L de ácido tartárico. O seu pH é ajustado a 3,5 por meio de uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 10 mol/L.

Soluções padrão

As soluções de geosmina e geosmina d5 a 10 µg/L são preparadas por diluição dos padrões analíticos em etanol absoluto.

Extracção SPME das amostras de vinho

Nas condições optimizadas, são colocados 5 mL de vinho num frasco (vial) de vidro de 20 mL, saturados por 3 g de cloreto de sódio e diluídos a 50% em água de qualidade HPLC previamente acidificada a $\text{pH} = 3$ por uma solução de ácido clorídrico a 6 mol/L. São igualmente adicionados 100 ng/L de geosmina d5 (PI) à mistura. O vial é capsulado por meio de uma cápsula magnética.

A adsorção SPME é realizada no *headspace* da mistura precedente. Esta é efectuada numa fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm de espessura, a 40°C durante 30 minutos e com agitação.

Análise cromatográfica

Após adsorção do *headspace* da amostra de vinho, os compostos voláteis são dessorvidos durante 10 minutos no injector do cromatógrafo em fase gasosa 3900 VARIAN acoplado a um espectrómetro de massa de armadilha de iões 2100 VARIAN.

A injeção é efectuada em modo *splitless* a 260°C e a separação dos compostos voláteis é conduzida sobre uma coluna capilar VF5-MS (VARIAN) com as seguintes dimensões: 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme.

A programação de temperatura do forno do cromatógrafo é a seguinte:

Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Duração (min)
50	--	1,0
170	8	0,0
280	25	4,6

A análise da geosmina e da geosmina d5 é efectuada em modo MS/MS por fragmentação selectiva dos iões 112 e 114 respectivamente. A quantificação é efectuada nos iões de segunda geração 97 (geosmina) e 99 (geosmina d5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Optimização das condições de análise em espectrometria de massa

Caracterizada por um nível de percepção extremamente baixo, a geosmina necessita de uma técnica de extracção muito eficaz.

A associação da SPME com a GC-MS permite responder a este objectivo. De facto, a SPME permite atingir sensibilidades 10^3 vezes superiores à técnica de injeção de extracto líquido. Além disso, o número limitado de manipulações da amostra (somente a preparação de uma toma de 5 mL de vinho para um vial) elimina todos os riscos de perda de compostos voláteis, entre os quais a geosmina.

Relativamente à espectrometria de massa, esta permite ainda baixar os limites de detecção ao analisar um ou vários iões específicos em modo de impacto electrónico clássico ou em modo MS/MS.

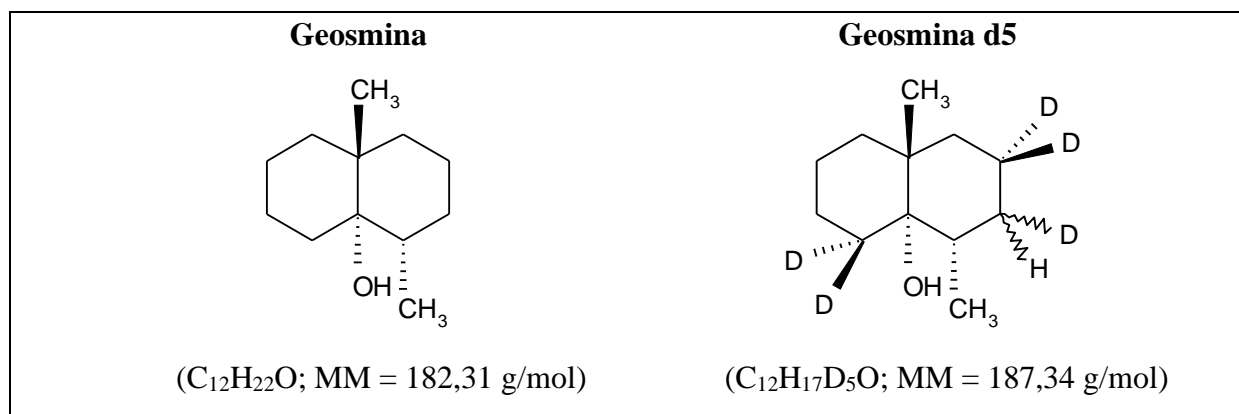


Figura 1: Geosmina e geosmina d5

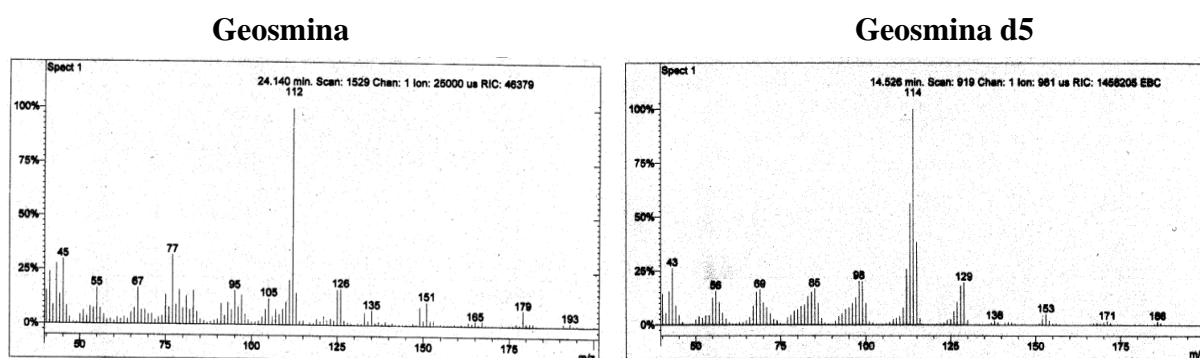


Figura 2: Espectros de massa da geosmina e da geosmina d5

Optámos neste estudo por trabalhar em modo MS/MS ressonante, que apresenta a vantagem de eliminar de forma eficaz o ruído de fundo causado pela matriz bem como a presença de picos interferentes. Este modo consiste em seleccionar um ião (ião precursor) no espectro de massa do composto de interesse e em fragmentá-lo novamente para obter um segundo espectro de massa, no qual é seleccionado um ião (ião de segunda geração) para a quantificação.

O espectrómetro de massa utilizado neste estudo é uma armadilha de iões e a optimização das condições MS/MS é feita na regulação da tensão aos bornes do analisador. No quadro I são apresentadas as condições MS/MS estabelecidas para a análise da geosmina e da geosmina d5.

Quadro I: Condições óptimas de análise MS/MS em modo ressonante da geosmina e da geosmina d5

Analitos	Ião precursor (m/z)	Ião de segunda geração (m/z)
Geosmina	112	97
Geosmina d5	114	99

Influência do tempo de adsorção SPME

A adsorção dos compostos voláteis na fibra SPME é controlada pelo equilíbrio que se produz entre a fase gasosa do *headspace* da amostra e a fase sólida da fibra adsorvente. Este equilíbrio necessita de um tempo suficiente que depende principalmente da temperatura de adsorção.

Para avaliar a influência deste parâmetro, no tempo de retenção da geosmina, medimos a evolução da relação Sinal/Ruído de fundo (S/R) para adsorções a 40°C a diferentes tempos sobre um simulante de vinho dopado com 50 µg/L de geosmina. Os resultados destes ensaios são apresentados no quadro II.

Quadro II: *Influência do tempo de adsorção na relação S/R. Adsorção a 40°C da amostra de simulante de vinho não diluídos sobre fibra PDMS 100 µm. Análise em modo EI-MS simples.*

Tempo (minutos)	30	60	120
S/R (geosmina)	4810	5900	6100

Podemos observar uma evolução significativa da relação S/R entre 30 e 60 minutos indicando que o equilíbrio de adsorção não é completamente alcançado. A evolução é muito mais baixa a partir dos 60 minutos. É provável que o equilíbrio de adsorção seja alcançado a partir dos 60 minutos.

Influência da taxa de diluição da amostra

A sensibilidade da análise por SPME depende principalmente da quantidade de composto a analisar adsorvido na fibra. Esta quantidade, por sua vez, depende do teor do composto a dosear no *headspace*. A adição de cloreto de sódio reduz a solubilidade dos compostos orgânicos em misturas hidroalcoólicas como o vinho. A adição de água, permite igualmente, ao reduzir o teor de etanol, favorecer a passagem dos compostos voláteis da fase líquida para a fase gasosa da amostra. Esta última operação apresenta também a vantagem de limitar consideravelmente o desgaste das fibras SPME, em relação a adsorções nas amostras de vinho não diluídas.

Avaliamos, portanto, num simulante dopado com 50 µg/L de geosmina, o efeito da diluição com água de qualidade HPLC acidificada a pH=3 por meio de ácido clorídrico a 6 mol/L. Os resultados são apresentados no quadro III.

Quadro III: *Influência da taxa de diluição da amostra na relação S/R no tempo de retenção da geosmina. Adsorção a 40°C durante 60 minutos sobre fibra PDMS 100 µm. Análise em modo EI-MS simples.*

Taxa de diluição	Pura	1/2	1/3	1/5
S/R (geosmina)	5940	4920	4890	4450

Estes resultados permitem constatar que a diluição não modifica de forma considerável a relação S/R. A diminuição de S/R não excede 25% quando a amostra é diluída para 1/5. Este facto explica-se simultaneamente por uma solubilidade mais baixa da geosmina na fase líquida e por uma diminuição considerável do ruído de fundo.

A taxa de diluição é interessante, visto ser fácil de implementar e permitir um tempo de utilização mais prolongado da fibra.

Influência da temperatura de adsorção

A temperatura de adsorção tem igualmente um impacto sobre os limites de detecção. Os fenómenos de adsorção e de vaporização (passagem da fase líquida à fase gasosa) são controlados por equilíbrios dependentes directamente da temperatura.

A fim de avaliar se, no caso da geosmina, a temperatura poderia ter um efeito benéfico na sensibilidade do método, comparámos uma adsorção efectuada a 40°C com uma adsorção a 50°C. O quadro IV apresenta os resultados desses dois ensaios realizados num simulante vinho diluído a 50% e dopado com 100 ng/L de geosmina.

Quadro IV: Influência da temperatura de adsorção na relação S/R no tempo de retenção da geosmina. Adsorção a 40°C e a 50°C, 30 minutos sobre fibra PDMS 100 µm. Análise em modo MS/MS otimizado.

Temperatura de adsorção (°C)	40	50
S/R (geosmina)	13800	13200

Podemos constatar que o efeito da temperatura é pouco significativo nas condições de análise fixadas para a geosmina.

Escolha dos parâmetros de análise e desempenho do método

O objectivo do presente estudo consistiu em desenvolver um método de análise da geosmina em vinhos simultaneamente rápido, simples de implementar e apresentando uma boa fiabilidade em relação ao nível de percepção desta molécula nos vinhos (a partir de 25 ng/L).

As condições operacionais que fixámos são as seguintes:

- Tempo de adsorção: 30 minutos
- Temperatura de adsorção: 40°C
- Taxa de diluição da amostra: 0,5
- Aquisição do sinal em modo MS/MS sobre os iões 97 e 99 para a geosmina e a geosmina d5, respectivamente.

O tempo de adsorção escolhido não permite alcançar o equilíbrio, mas a utilização de geosmina d5 como padrão interno permite eliminar as imprecisões resultantes de uma adsorção incompleta.

Nestas condições, os desempenhos do método são os seguintes:

- Limite de detecção: 5 ng/L
- Repetibilidade: 6,7% a 10 ng/L e 6,1% a 100 ng/L.
- Linearidade entre 10 e 200 ng/L com um coeficiente de correlação $R^2 = 0,999$.

DOSAGEM DA GEOSMINA EM AMOSTRAS DE VINHO

Situação dos vinhos Portugueses

Foram efectuados ensaios relativos à pesquisa de geosmina sobre alguns vinhos tintos de diversas regiões vinícolas de Portugal (Vinhos Verdes, Douro, Dão, Bairrada, Estremadura, Ribatejo, Alentejo e Terras do Sado). No quadro seguinte são apresentadas as regiões vinícolas de proveniência das amostras de vinho analisadas bem como os valores obtidos.

Quadro V: Número de amostras de vinho analisadas, respectiva região e valores obtidos.

REGIÃO	Nº Vinhos	Valores obtidos (ng/L)
Vinho Verde	4	< LD
	4	< LQ
	1	15
Douro	7	< LD
Dão	9	< LD
Bairrada	3	< LD
Estremadura	7	< LD
Ribatejo	5	< LD
Alentejo	9	< LD
Terras do Sado	9	< LD

LD – 5 ng/L

LQ – 10 ng/L

No que respeita às amostras ensaiadas (escolhidas aleatoriamente no mercado) nenhuma das 58 amostras apresentava um defeito imputável a este composto, sendo os valores encontrados todos inferiores ao limite de detecção ou de quantificação do método, com excepção de uma amostra.

CONCLUSÕES

Conseguimos demonstrar neste estudo as potencialidades da SPME associada à GC-MS para a análise da geosmina nos vinhos. O método que optimizamos oferece aos profissionais da fileira do vinho uma ferramenta de diagnóstico rápido e fiável para confirmar a qualidade organoléptica dos seus produtos.

Actualmente, em alguns países existe uma preocupação com estes desvios por vezes encontrados nos vinhos, e estão a ser desenvolvidos estudos para melhor conhecer as causas e os responsáveis por estes defeitos.

No que respeita à situação dos vinhos Portugueses e relativamente às amostras analisadas, não foi detectado o composto geosmina responsável pelos odores a mofo-terroso em concentrações que permitam originar um defeito.

BIBLIOGRAFIA

- (1) – Caractères moisi-terreux des vins: origine et prévention. Editions ITV France – juillet 2005.
- (2) – P. Darriet, M. Pons, S. Lamy, D. Dubourdieu. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 4835-4838.
- (3) – Géosmine: encore de nombreuses zones d'ombre. Viti Technique, N° 306, Avril 2005, 20-22.
- (4) – S. La Guerche, D. Blancard, S. Chamont, D. Dubourdieu, P. Darriet. VII^{ème} Symposium International d'œnologie. Bordeaux 19-21 Junho 2003.
- (5) – N. N. Gerber, H. A. Lechevalier. Appl. Microbiol. 1965, 34(6), 935.
- (6) – S. B. Watson, B. Brownlee, T. Satchwill, E. E. Hargesheimer. Water Research: (Oxford). 2000, 34(10), 2818-2828.