

# METODE DE ANALIZĂ INSTRUMENTALĂ A COMPUȘILOR AROMATICI DIN VINURI

N. Furtuna, drd.

Universitatea Tehnică a Moldovei

## INTRODUCERE

Aroma unui produs alimentar rezultă din prezența unui set mixt de compuși volatili care pot stimula receptorii olfactivi. Din punct de vedere cantitativ, acești compuși reprezintă un procent foarte mic din produs. Însă ei sunt de o mare diversitate chimică, în special pentru produsele alimentare care au fost supuse unui tratament termic sau fermentației, unde pot fi găsite peste 800 de compuși volatili. Dintre acești compuși, mai puțin de 5% contribuie la aroma produsului alimentar și sunt numiți compuși de impact [1].

Aroma vinurilor este mult mai complexă decât cea a strugurilor. Au fost identificați numeroși compuși volatili care participă la formarea aromei și buchetului vinurilor: peste 90 esteri, 30 alcooli, 25 aldehide și cetone, 10 terpeni și 25 compuși chimici diverși, printre care acizi grași liberi, lactone și fenoli volatili [2]. Structura chimică diversă implică și metode de analiză diferite, astfel încât să fie evidențiate moleculele respective.

## 1. TIPURI DE AROME

Strugurii majorității soiurilor de *Vitis vinifera* au caracteristici odorante slab dezvoltate, dar care deja conțin componente, care mai târziu vor da note relativ specifice în aroma vinului. Mai multe studii au permis aprofundarea în cunoașterea potențialului aromatic varietal care depinde de soi și de diverși factori externi, cum ar fi: climaterici, geopedologici, fitosanitari și tehnici.

Multitudinea compușilor chimici susceptibili de a contribui la formarea aromei și buchetului vinului se grupează în funcție de originea lor astfel [3]:

a. arome primare (varietale) care provin din struguri și se formează în urma proceselor metabolice ale viței de vie, ca produși secundari, ele sunt responsabile de tipicitatea aromei vinului (muscat, tămâios, floral, erbaceu, etc);

b. arome secundare (de fermentație), datorate activității levurilor și bacteriilor care participă la

formarea vinului, dau în general caracterul de vinozitate, dar și nuanțe aromate specifice;

c. arome terțiare (de maturare și învechire) a vinurilor rezultate în urma proceselor fizico-chimice de oxidare și esterificare ce se petrec în vin, cu formarea esterilor, aldehidelor și cetonei ce contribuie la formarea buchetului vinului.

Fiecare soi aduce în vin arome cu nuanțe diferite, care pot rămâne nemodificate sau, din contra, se modifică în cursul fermentației alcoolice. La formarea aromelor varietale participă mai multe familii de compuși chimici: terpeni și sesquiterpeni, norisoprenoide, pirazine, compuși fenolici volatili și altele. Potențialul aromatic al soiurilor este dat de existența în struguri a două categorii de arome [4]:

1. arome aflate în stare liberă, odorante, direct accesibile mucoasei olfactive și căilor retronazale. Incluz mai ales monoterpeneoide dintre care cele mai reprezentative sunt: linaloolul, geraniolul, nerolul și formele lor oxigenate, hotrienolul, citronerolul și  $\alpha$ -terpineol. Diverșilor compuși terpenici li se atribuie mirosuri specifice de trandafiri (geraniol, nerol), de levănțică, de coriandru (linalool), de flori de câmp (oxid de linalool), de liliac ( $\alpha$ -terpineol), de citrice (geraniol, nerol). Sunt cunoscute, de asemenea, pirazinele cu miros puternic de verdeață care se pot recunoaște la strugurii soiurilor nearomate (Cabernet Sauvignon sau Merlot).

2. arome legate de zaharuri, neodorante, care nu sunt percepute direct de mucoasa olfactivă. Compușii nevolatili sunt cunoscuți sub numele de "precursori de arome" pentru că au posibilitatea de a se transforma în compuși volatili, participând la aroma vinurilor după prelucrarea strugurilor. Ei alcătuiesc "aroma ascunsă". La rândul lor compușii nevolatili pot fi: nespecifici (zaharuri, aminoacizi, etc.), comuni pentru toate soiurile și specifici care dau tipicitate fiecărui soi. Proporția dintre aceste forme, diferențiază soiurile între ele și anume soiurile aromate de cele cu aromă neutră.

Recent, s-au evidențiat în cazul tiolilor volatili precursori ce constau dintr-o moleculă volatilă

legată de cisteină, și s-a identificat un precursor al dimetil sulfurii.

## 2. ANALIZA OLFACTOMETRICĂ

Analiza olfactivă sau gaz cromatografia – olfactometria (GC-O) este o metodă analitică care asociază prin consecutivitate cromatografia în fază gazoasă și percepția senzorială, utilizând astfel nasul uman pe post de detector pentru evaluarea componentelor unei arome [5]. Nasul uman are o limită teoretică de detecție a mirosului de circa  $10^{-19}$  moli, GC-O fiind o tehnică foarte valoroasă și sensibilă pentru detectarea odoranților activi.[6]

Cromatografia gazoasă permite separarea și identificarea componentelor care intră în fracțiunea volatilă a produselor. Cu toate acestea, din cauza diferențelor în pragurile de detecție nu este posibil să se analizeze activitatea senzorială folosind oricare dintre convențiile detectoare suplimentare. Comparând olfactogramele obținute la cromatografe echipate cu detectoare cu ionizare în flacără (FID) sau cu spectrometrie de masă (MS), este relevant faptul că de multe ori compușii care produc semnale mari (picuri) în detectoare convenționale sunt slab detectabile în eluentul din coloană și invers. Ar trebui subliniat și faptul că, uneori, compușii detectați la portul olfactiv nu pot fi detectați cu detectoare convenționale, fapt ce confirmă sensibilitatea enormă a nasului uman.

Nu este neglijabil și faptul că omul este un bun detector și în plus mai poate și comenta sau discuta rezultatele obținute, de aceea mediul în care determinarea olfactivă se desfășoară este foarte important.

Analiza olfactivă are drept scop punerea în evidență a compușilor olfactivi activi din vin prin selecția aromelor de impact în funcție de valorile indicelui olfactiv. Pentru aceasta analiză se pot utiliza trei tipuri de metode:

**1. Diluția succesivă a extractelor de arome** pînă la limita pragului de percepție olfactivă.

Metoda CHARM (*Combined Hedonic Aroma Response Measurement*) [7] se bazează pe cromatografia în fază gazoasă și unul sau mai mulți indivizi al cărui nas servește ca detector. Efluentul gazos la ieșire din coloana cromatografică este perceput de operator/individ, iar debitul efluentului este 20 litri/minut pentru a nu irita mucoasa nazală. Pentru fiecare aromă percepută, operatorul trebuie să indice începutul și sfârșitul mirosului, pe care îl descrie. Operația se repetă printr-o succesiune de diluții, pînă cînd nu se mai înregistrează/ percepe

nici un stimul. Se stabilește valoarea CHARM™ notată cu „c” pentru mirosul perceput:

$$c = d^{n-1},$$

unde:  $d$  este factorul de diluție;  $n$  - numărul percepțiilor

Valoarea CHARM este proporțională cu conținutul extractului în compusul aromat și invers proporțională cu pragul de percepție olfactivă.

Metoda AEDA (*Aroma Extract Dilution Analysis*) [8] este asemănătoare cu metoda CHARM, deosebirea este că nu se ține seama de durata de percepție/stimulare. Se bazează numai pe diluțiile succesive ale extractului de arome și ierarhizarea mirosurilor în funcție de factorul de diluție FD. Factorul de diluție exprimă ultima diluție care mai permite percepția aromei.

**2. Măsurarea intensității stimulilor olfactivi** constă în estimarea directă a intensității extractului de către evaluator fără a efectua diluări. Ea poate fi realizată după două tipuri de metode:

a. metoda post intensitate consistă în evaluarea intensității senzațiilor percepute în efluentul gazos. Evaluatorii apreciază intensitatea pînă sau după descrierea aromei. A fost demonstrat că între logaritmul concentrației stimulului și intensitatea percepută există o relație lineară [9].

b. metodele timp-intensitate (OSME și FSCM).

- OSME (din greacă „miros”) este realizată cu ajutorul unui dispozitiv care să permită înregistrarea duratei și intensității aromei. Metoda se bazează pe evaluarea intensității aromei după o scară numerică concepută în acest scop. Se folosesc mai mulți evaluatori care percep aroma aceluiași extract și descriu intensitatea percepută. După mai multe repetiții se întocmește un profil al extractului (osmograma) ce exprimă calitatea aromei [10].

- FSCM (*Finger Span Cross-modality Matching*) este bazată pe transformarea intensității percepute în răspuns chinestezic, în cazul dat distanța dintre degete. Dispozitivul este constituit dintr-un potențiomtru echipat cu două inele în care evaluatorul introduce degetul mare și cel arătător, fapt ce permite măsurarea distanței dintre ele. Intensitatea maximală fiind echivalentă cu distanța maximală [11].

**3. Determinarea frecvențelor zonelor odorante** folosind ca indici valorile NIF (*Nasal Impact Frequency*) și SNIF (*Surfaces of Nasal Impact Frequency*). Frecvența zonelor odorante este corelată la logaritmul concentrației compusului responsabil de stimul. Această relație este bazată pe ipoteza că pentru un compus dat, pragul de percepție a unei populații au o distribuție gaussiană.

Pornind de la această ipoteză, s-a demonstrat că frecvența de detecție permite estimarea concentrației unui compus. Metoda necesită un număr mai mare de participanți decât la metodele de diluție; efectivul optimal ar fi 7 – 10 evaluatori. Metoda frecvențelor de detecție nu necesită antrenamentul prealabil al evaluatorilor, ci doar familiarizarea cu dispozitivul olfactiv. Fiecare evaluator trebuie să repereze/perceapă începutul și sfârșitul evenimentului de aromă pe care îl descrie. Înălțimea picurilor aromogramei sunt denumite NIF cu valori cuprinse între 0 și 100 % și ariile picurilor sunt denumite SNIF. Osmogramele individuale sunt apoi cumulate într-una globală unde numărul de detecții sau frecvența detecțiilor este reprezentată în funcție de timp sau de indici de retenție. În ambele cazuri, indicii olfactivi permit ierarhizarea zonelor odorante în dependență de impactul olfactiv.

Majoritatea aromelor nu durează mai mult de 4 secunde, prin urmare capacitatea evaluatorilor de a reacționa și a descrie aroma percepută este primordială. Zonele odorante obținute cu ajutorul GC-O sunt caracterizate de trei tipuri de parametri: indice olfactiv, indice linear de retenție (ILR) mediu sau intervalul ILR și descriptorii aromei percepute. Toate aceste informații sunt utilizate ulterior la etapa de identificare. ILR evenimentelor odorante este criteriul principal de compilare a datelor individuale într-o aromagramă globală pe care se bazează unii cercetători [12].

Ținând cont de complexitatea aromelor din struguri și vin și faptul că se găsesc în cantități foarte mici, trebuie stabilite metode adecvate de extracție și de dozare a aromelor. Cele mai folosite sunt metodele de extracție cu solvenți organici.

Spre deosebire de metodele convenționale de analiză senzorială, persoana evaluatoare trebuie să se confrunte cu multe mirosuri diferite, care apar doar pentru câteva secunde la intervale de timp neregulate în timpul analizei cromatografice, care poate dura zeci de minute. În pofida acestui fapt, greșeli tipice de analiză senzorială pot apărea, de asemenea, referitoare la capacitatea unei persoane de a aminti profiluri de miros și de capacitatea de a prevedea sau asuma compoziția și conținutul de compuși aromați în probele precedente. Acest lucru este valabil mai ales atunci când probele individuale nu diferă în mod semnificativ calitativ sau cantitativ și sînt analizate în mod repetat. Probabilitatea de a face acest tip de eroare poate fi redusă prin analizarea probelor în ordine aleatorie și/sau de a exclude adăugarea probelor martor sau probe care sînt complet diferite de lotul dat.

În general, cromatografia gazoasă cuplată cu olfactometria, din punct de vedere cantitativ sau calitativ, nu poate să fie considerată suficientă pentru determinarea impactului unei molecule odorante asupra aromei globale a vinului. Ea nu poate fi considerată drept referință, ci doar un ghid în alegerea compușilor de impact pentru aroma vinului.

Utilizarea cromatografiei propriu-zise, nu permite aprecierea efectului de sinergie sau de mascare între compuși odoranți. Prin urmare, condițiile de olfacție în GC-O (timp redus, temperatură) sunt foarte diferite de cele ale olfacției clasice a unui produs.

Totodată, există unii compuși care sunt cunoscuți prin faptul că nu pot fi ușor analizați prin cromatografie gazoasă, fie că sunt termolabili sau sunt foarte reactivi. Faptul că ei nu pot fi detectați prin olfactometrie nu semnifică că nu contribuie la formarea aromei globale a vinului.

Mai mult decât atât, înainte de a efectua analiza olfactivă, ar trebui să fie verificate cât de reprezentative sunt extractele referitor la vinul inițial [13].

Tehnica de extracție a compusului volatil este deosebit de importantă, deoarece poate afecta evaluarea senzorială a eluentului izolat. Pentru a preveni auto-oxidarea, extracte de vin ar trebui să fie păstrate într-o atmosferă de dioxid de carbon la o temperatură scăzută. Divizarea extractului în părți mici, individuale, este recomandată pentru a evita schimbări în compoziția acestuia, cauzate de deschiderea repetată a recipientului în care se află proba. Din punct de vedere al evaluării calitative a aromei, calitatea separării cromatografice este importantă, prin urmare condițiile de separare trebuie să fie bine optimizate. În cele din urmă, nu poate fi evitat efectul de implicare al factorului uman în această tehnologie, precum și limitările legate de aceasta. Pentru a minimiza abaterile, ar trebui să se depună eforturi pentru asigurarea condițiilor constante de analiză pentru fiecare evaluator, cum ar fi un model de probe necesare pentru probele analizate sau o scară folosită pentru a evalua intensitatea mirosului [14].

Aceste argumente demonstrează necesitatea validării rezultatelor analizei olfactive de alte metode de analiză, inclusiv dozarea cantitativă exactă a compușilor identificați pentru a-i putea raporta la pragul de detectare într-un mediu cât mai asemănător cu matricea originală.

### 3. ANALIZA CANTITATIVĂ A COMPUȘILOR AROMATICI

#### 3.1. Extracția

Compușii aromatici din vin și alte produse alimentare sunt, în general, constituenți minori. Prin urmare, analiza lor necesită o etapă de extracție care ar permite separarea de la matricea hidroalcoolică și concentrarea simultană sau ulterioară, în dependență de metoda utilizată. Tehnicile cele mai des utilizate în domeniul aromelor vinului sunt:

- distilarea (în special pentru alcoolii superiori, acetaldehida și uii acetali);
- extracția directă cu un solvent;
- extracție pe fază solidă (SPE), care permite repartiția selectivă;
- metodele headspace (statică sau dinamică);
- tehnica de microextracție pe fază solidă (SPME).

Extracția aromelor cu solvenți organici poate fi utilizată pentru dozarea cantitativă a aromelor. Atunci când metoda este urmată de o concentrare a extractului, ceea ce se impune, apare inconvenientul formării artefactelor datorită impurităților prezente în solvenți. Riscul poate fi limitat prin distilarea solventului înainte de folosire [13].

Tendința actuală este de a privilegia metodele SPE sau SPME, deoarece sunt rapide, automatizabile și utilizează puțin solvent (sau chiar deloc). Totodată ele sunt relativ specifice și necesită ajustări considerabile în dependență analizele respective. De altfel, deseori este necesar (mai ales în cazul SPME) de a lua în considerație utilizarea unui standard intern adecvat, cele mai eficiente fiind utilizarea diluției izotopice.

#### 3.2. Analiza extractelor aromatice

Ulterior, după concentrarea eventuală, metoda analitică selectată este cromatografia cu fază gazoasă. Aceasta tehnică permite separarea unui număr mare de compuși pe o coloană capilară de siliciu topit și este bazată pe interacțiunea slabă dintre compuși aromatici și faza staționară lichidă. Compuși separați sunt eluați din coloană cu o fază mobilă gazoasă (hidrogen sau heliu).

Dezavantajele majore constau în faptul că este valabilă pentru compușii volatili ce nu sunt termolabili și nu se degradează în coloana cromatografică utilizată.

Astfel, analiza precursorilor de arome ne volatili (glicozidici sau ai cisteinei) este posibilă numai după hidroliza acidă sau enzimatică

În afară de detectarea olfactivă, sunt disponibile un spectru larg de detectori mai mult sau mai puțin specifici care permit sau nu identificarea structurală a compușilor detectați: cu ionizare în flacără, fotometrie cu flacără, spectrometrie de emisie atomică, spectrometrie de masă.

### CONCLUZII

Aroma vinurilor, provenind atât din struguri cât și în urma proceselor fizice, chimice și biochimice din timpul vinificării, este foarte complexă. Ea este compusă din molecule de natură chimică foarte diversă și la concentrații care variază de la câteva nanograme până la câteva miligrame.

Având în vedere acest fapt, nu există tehnici ideale pentru a analiza în mod satisfăcător ansamblul compușilor aromatici.

Deseori este preferabilă adaptarea tehnicilor de analiză la fiecare clasă de compuși considerați a fi prezenți și diversificarea analizelor decât încercarea de a realiza o analiză unică, care nu poate fi decât rezultatul unui compromis între metodele posibile de extracție, de concentrare și de analiză.

### Bibliografie

1. **Maarse, H., Visscher, C. A., Willemsens, L. C. and Boelens, M. H.** *Volatile compounds of Food: Qualitative and Quantitative Data.* Zeist, Netherlands, TNO Biotechnology and Chemistry Institute, 1992.
2. **Simpson, R.F., Miller, G.C.** *Aroma composition of Chardonnay wine.* *Vitis* 23:143-158, 1984.
3. **Țirdea C.** *Chimia și analiza vinului.* Editura „Ion Ionescu de la Brad”, Iași, 1398 p, 2007.
4. **Antoce Oana Arina.** *Oenologie, Chimie și analiză senzorială.* Editura Universitaria, Craiova, 808p, 2007.
5. **Callement, G., Bouchet, M., Langlois, D., Etievant, P. and Salles, C.** *Odor intensity measurements in gas chromatography-olfactometry using cross modality matching: evaluation of training effects.* *Gas chromatography-olfactometry. The state of the art.* A. C. Society. Washnigton, DC,

Leland, J.V., Schieberle, P., Buettner, A. and Acree, T.E.: 172-186, 2001.

6. **Grosch, W.**, Specificity of the human nose in perceiving food odorants, *Frontiers of flavour science, Proceedings of the Ninth Weurman Flavour Research Symposium*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, ed. Schieberle P. and Engel K. H., Garching, Germany, 213–219, 2000.

7. **Acree, T. E., Barnard, J., Cunningham, D. G.** A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chemistry* 14: 273-286, 1984.

8. **Ullrich, F. et Grosch, W.** Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 184: 277-282, 1987.

9. **van Ruth, S. M. et O'Connor, C. H.** Evaluation of three gas chromatography-olfactometry methods: comparison of odour intensity-concentration relationships of eight volatile compounds with sensory headspace data. *Food Chemistry* 7: 1-7, 2001.

10. **McDaniel, M. R., Miranda-Lopez, R., Watson, B. T., Micheals, N. J. et Libbey, L. M.** Pinot noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach. *Flavors and off-flavors, Proceedings of the 6th International Flavor Conference, Rethymmon, Crete (Greece), Elsevier Science, 1989.*

11. **Etiévant, P. X., Callement, G., Langlois, D., Issanchous, S. et Coquibus, N.** Odour intensity evaluation in gas chromatography-olfactometry by finger span method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 1673-1680, 1999.

12. **Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., Munoz-Box, R. and Chaintreau, A.** Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing technique: screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7): 2630-2637, 1997.

13. **Moio, L., Chambellent, E., Lesschaeve, I., Issanchou, S., Schlich, P. et Etiévant, P.** Production of representative wine extracts for chemical and olfactometry analysis. *Journal of Food Science*, 3, 265-278, 1995.

14. **Le Guen, S., Prost, C. and Demaimay, M.** Characterization of odorant compounds of mussels according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas

chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 896(1-2): 361-371, 2000.