



Análise de compostos voláteis responsáveis pelo “caráter Brett” do vinho e a sua incidência organolética

Jorge Miguel Simões Couto

Orientadores

Professora Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos

Professor Doutor Antonio Tomás Palacios García

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Biotecnologia Alimentar, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e do Professor Doutor Antonio Tomás Palacios García do Laboratório Excell Ibérica, S.L.

Julho de 2023

Agradecimentos

Um simples “obrigado” é sempre curto para mim na hora de expressar o agradecimento e gratidão que sinto quando chego ao final de grandes etapas da vida, mas esta é a minha tentativa de prestar homenagem a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos, pela orientação, conselhos, apoio e compreensão que sempre proporcionou de forma incansável.

Ao Professor Doutor Antonio Tomás Palacios García, do Laboratório Excell Ibérica S. L., pela oportunidade que me proporcionou de poder realizar este estágio num mundo completamente diferente do que conhecia e por todas as ajudas que deu ao longo deste percurso.

Ao Fernando Rodríguez Laurent, responsável pelo departamento de cromatografia que todos os dias trabalhou a meu lado e sempre proporcionou um ótimo ambiente de trabalho. Sem dúvida a pessoa que fez com que Espanha parecesse casa.

À minha guerreira sem armas, a minha mais que tudo, aquela que nunca me deixou ficar mal, minha mãe que nunca me deixou desistir mesmo quando as coisas não pareciam ter retorno. Tudo o que sou, a ti te devo Madalena Simões.

Aos meus avós “Zé da Boina” e Maria Domingas, por todos os esforços que fizeram e ainda fazem para poderem ver o vosso neto formado e bem encaminhado. É um orgulho poder dizer que sou vosso neto.

Ao meu pai, Francisco Couto por todos os conselhos e ajudas que me deu ao longo desta jornada da vida. As aprendizagens que tive e o “saber viver” que tanto falas, são a base da minha vida e isso agradeço-te a ti.

À minha irmã, Daniela Couto pelas “chatices” e “problemas” que me causou durante toda a vida, que sem elas de certeza não seria a pessoa que sou hoje.

Ao meu afilhado Guilherme Simões, a maior das minhas alegrias desde o dia que te vi pela primeira vez. És como um filho emprestado que me faz lutar todos os dias para que o futuro seja melhor. Tu és o futuro!

Aos meus tios Paulo e Stela Simões, pela confiança sempre depositada e por sempre acreditarem que seria possível alcançar esta meta.

À minha madrinha Cidália Lapão, que só não me dá o coração porque não pode.

A todos os meus verdadeiros amigos, os de sempre e os que conheci durante esta etapa, pelos momentos que vivemos, histórias que criámos e havemos de criar certamente. Foram e são a força que me faz seguir pela dura vida de forma mais leve.

Após todo o esforço e dedicação, espero ter orgulhado todo o investimento que fizeram em mim. Muito obrigado!

Este estudo foi realizado no laboratório Excell Ibérica S. L., em Logroño, La Rioja, Espanha, em contexto de estágio curricular da licenciatura em biotecnologia alimentar no âmbito do programa Erasmus+.

Análise de compostos voláteis responsáveis pelo “caráter *Brett*” do vinho e a sua incidência organolética

Jorge Miguel Simões Couto

Resumo

O presente estudo teve como base a quantificação de compostos fenólicos voláteis, 4-etilfenol (4-EF) e 4-etilguaiaicol (4-EG) e do ácido gordo volátil, ácido isovalérico através da técnica de cromatografia gasosa com detetor de massas.

O principal objetivo deste estudo foi perceber o papel destes compostos na alteração das características aromáticas dos vinhos tintos. Os referidos compostos são metabolitos da ação fermentativa da levedura *Brettanomyces*, alvo de vários estudos devido às suas características fisiológicas e à sua capacidade de produzir compostos que alteram organoleticamente os vinhos. Os aromas produzidos são denominados como “caráter *Brett*”. A quantificação dos compostos referidos foi realizada mediante extração líquido-líquido, com recurso a um cromatógrafo de gases acoplado a um detetor de massas.

Com base na análise sensorial, foi possível traçar o perfil organolético de 10 amostras consideradas interessantes para o estudo, bem como a sua apreciação global do ponto de vista do consumidor. Efetuou-se também uma análise em componentes principais com o propósito de ajudar a compreender a relação entre os resultados da análise sensorial e a concentração dos compostos voláteis analisados.

Também se concluiu que a análise de etilfenóis e de ácido isovalérico pode ser realizada nas mesmas condições cromatográficas. As concentrações de 4-EF e 4-EG e ácido isovalérico estão correlacionadas negativamente. Também foi possível concluir que os etilfenóis têm um grande impacto sensorial quando presentes em concentrações elevadas.

Palavras-chave

Etilfenóis; ácido isovalérico; caráter *Brett*; análise sensorial; cromatografia gasosa

Analysis of volatile compounds responsible for the "*Brett* character" in wine and its organoleptic impact

Jorge Miguel Simões Couto

Abstract

The present study was based on the quantification of volatile phenolic compounds, 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol and the volatile fatty acid, isovaleric acid, using the gas chromatography-mass spectrometry technique.

The main object of this study was to understand the role of these compounds in altering the aromatic characteristics of red wines. These mentioned compounds are metabolites of the fermentative action of the yeast *Brettanomyces*, which has been the subject of various studies due to its physiological characteristics and its ability to produce compounds that organoleptically change wines. The aromas produced are referred to as "*Brett* character." The quantification of the mentioned compounds was carried out through liquid-liquid extraction, using a gas chromatograph with a mass spectrometer.

Based on sensory analysis, it was possible to establish the organoleptic profile of 10 samples considered interesting for the study, as well as their overall consumer appreciation. A principal component analysis was also carried out to help to understand the relationship between the results of the sensory analysis and the concentration of the analysed volatile compounds.

It was also possible to conclude that the ethylphenols and isovaleric acid can be analysed under the same chromatographic conditions. The concentrations of 4-EP, 4-EG, and isovaleric acid are negatively correlated. It was also possible to conclude that ethylphenols have a significant sensory impact when present in high concentrations.

Keywords

Ethylphenols; isovaleric acid; *Brett* character; sensory analysis; gas chromatography

Índice

1. Introdução.....	1
2. Características aromáticas dos vinhos.....	2
2.1. Levedura <i>Brettanomyces</i>	3
2.2. Fenóis voláteis e ácido isovalérico como defeitos no vinho	4
3. Caráter <i>Brett</i>	5
3.1. Processo de conversão dos ácidos hidroxicinâmicos em fenóis voláteis.....	6
3.2. Formação de ácido isovalérico nos vinhos.....	7
4. Detecção de fenóis voláteis e ácido isovalérico em vinhos	8
5. Material e métodos	9
5.1. Amostragem	9
5.2. Preparação de soluções e solvente de extração	10
5.3. Processo de extração	12
5.4. Análise de fenóis voláteis.....	12
5.5. Análise de ácido isovalérico	15
5.6. Características analíticas e condições cromatográficas	16
5.7. Análise sensorial.....	17
6. Análise de dados.....	17
7. Resultados e discussão.....	18
7.1. Análise cromatográfica.....	18
7.2. Análise sensorial.....	22
7.3. Análise global	25
8. Conclusões	28
9. Referências bibliográficas.....	Erro! Marcador não definido.
ANEXOS.....	33

Índice de figuras

Figura 1 - Percepção sensorial de um vinho com elevada concentração de *Brett*

Figura 2 - Sequência de reações de transformação do aminoácido L-leucina em ácido isovalérico

Figura 3 - Amostras após centrifugação com as fases orgânica e inorgânica separadas

Figura 4 - Cromatógrafo de gases com detetor de massas utilizado na análise de quantificação dos compostos em estudo

Figura 5 - Reta de calibração utilizada na análise de 4-etilfenol efetuada pela equipa do laboratório

Figura 6 - Reta de calibração utilizada na análise de 4-etilguaiacol efetuada pela equipa do laboratório

Figura 7 - Cromatograma obtido em GC-MS correspondente ao ácido isovalérico

Figura 8 - Reta de calibração utilizada para quantificar a concentração de ácido isovalérico

Figura 9 - Espetro de massas do composto 4-etilfenol

Figura 10 - Espetro de massas do composto 4-etilguaiacol

Figura 11 - Espetro de massas do composto ácido isovalérico

Figura 12 - Variação dos valores da soma das concentrações dos compostos 4-EF e 4-EG em vinho tinto obtida por ordem de análise

Figura 13 - Variação da concentração de ácido isovalérico em vinho tinto obtida por ordem de análise

Figura 14 - Perfil sensorial das amostras de vinho tinto analisadas (identificadas de 1 a 10) ao nível do aroma

Figura 15 - Perfil sensorial das amostras de vinho tinto analisadas (identificadas de 1 a 10) ao nível do gosto ou textura

Figura 16 - Perfil sensorial das amostras de vinho tinto analisadas (identificadas de 1 a 10) ao nível retronasal

Figura 17 - Pontuação média relativa à apreciação global de cada amostra de vinho tinto analisada

Figura 18 - Projeção no plano dos descritores sensoriais e das amostras de vinho em relação aos três primeiros componentes principais: A) PC1 vs PC2 e B) PC1 vs PC3.

Figura 19 - Projeção no plano dos descritores sensoriais, compostos analisados e das amostras de vinho em relação aos três primeiros componentes principais: A) PC1 vs PC2 e B) PC1 vs PC3.