IVES Technical Reviews
vinha & vinho

https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2020.3286

Origens da doçura decorrente do estágio dos vinhos secos: o papel dos triterpenoides do carvalho

>>> O estágio em barricas afeta as características organoléticas dos vinhos e modifica, em particular, o sabor adocicado. Com recurso a uma abordagem indutiva, foram identificados vários triterpenos, os QTT, no carvalho. A análise quantitativa demonstrou um efeito significativo da espécie: o carvalho-alvar liberta triterpenos mais adocicados, enquanto o carvalho-alvarinho é mais rico em triterpenos amargos. Tornou-se possível diferenciar as duas espécies com base na composição dos respetivos triterpenos. <<<

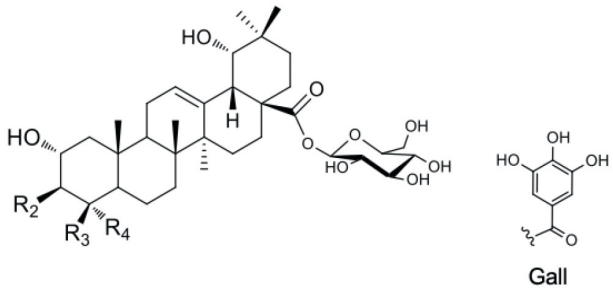
■ Introdução

Há quase dois mil anos, as pessoas têm usado recipientes de madeira para o transporte e a produção de vinhos e licores. Ao longo dos séculos, o tipo de madeira utilizado para fazer barricas, as respetivas técnicas de conceção e o uso dado às mesmas evoluíram com base na observação empírica e na experiência. Hoje em dia, as barricas são, quase na sua totalidade, feitas de carvalho; são reservadas para o estágio e, por vezes, a vinificação. A composição dos vinhos, a sua estabilidade e as suas características organoléticas sofrem alterações ao entrarem em contacto com o carvalho. Na prática, observam-se os contributos dos compostos que influenciam o aroma e o sabor. A origem molecular do contributo do contacto dos vinhos com o carvalho, para o seu aroma, é bem conhecida. A vanilina, lactona do whisky/carvalho (*whyski lactone*), os fenóis voláteis, como o eugenol ou o guaiacol, e o 2-furanometanotiol são os principais compostos voláteis.

Paralelamente a este contributo aromático, demonstrou-se que o sabor adocicado dos vinhos secos se acentua ao contactarem com o carvalho e que os compostos voláteis, como a vanilina, não são responsáveis por este fenómeno[1]. No entanto, o contributo do carvalho ao nível dos compostos que influenciam o sabor permanece, em larga medida, desconhecido.

■ Desenvolvimento de um protocolo de purificação orientado pelo sabor

De modo a caracterizar as moléculas presentes no carvalho responsáveis pela intensificação do sabor adocicado observada durante o estágio, adotou-se uma abordagem indutiva. Recorreu-se a várias técnicas de separação e, no final de cada etapa, provou-se as diferentes porções, de forma a manter apenas as mais adocicadas. Submeteu-se, deste modo, um macerado de carvalho não tostado a sucessivas extrações líquido-líquido e, em seguida, a cromatografia de partição centrífuga (CPC). Esta técnica, frequentemente utilizada na farmacognosia para a procura de moléculas bioativas, possibilitou o fracionamento do extrato. A sua junção à análise organolética, pela primeira vez, foi apelidada de CPC-Gustometria, por analogia com a Cromatografia-Olfactometria Gasosa utilizada na análise de aromas. A sua utilização permitiu isolar uma porção adocicada que continha quatro compostos, os quais, em seguida, foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sabor adocicado de dois destes compostos foi comprovado. A sua caracterização através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear revelou tratar-se de triterpenos glucosilados e galoilados. Estes compostos, nunca dantes identificados na natureza, foram designados por Quercotriterpenósido (QTT) I e II (Fig. 1)[2]. O estudo das respetivas propriedades organoléticas demonstrou que estes compostos de sabor adocicado reduzem a perceção de amargura. O limiar de deteção do QTT I comprovado no vinho é de 590 µg/L, mais de 6000 vezes inferior ao da glucose.



Composto	R_1	R_2	R_3	R_4
QTT I	OH	OH	CH_3	CH_2OGall
QTT II	OH	OGall	CH_2OH	CH_3
QTT III	OH	OGall	CH_3	CH_2OH
Glu AB	OH	OH	COOH	CH_3

Figura 1. Estruturas químicas de alguns triterpenos do carvalho.

■ A procura por novos triterpenos sápidos

A descoberta destes dois compostos adocicados trouxe a lume a família dos triterpenos, que tinha sido pouco estudada no carvalho. De forma a superar esta ausência de conhecimento, utilizou-se a espectrometria de massa com transformada de Fourier para aferir a presença de outros triterpenoides no carvalho, distintos dos QTT pela natureza da sua aglicona (a sua estrutura básica) ou pela posição, pelo número e pelo tipo dos seus grupos funcionais. Este rastreio revelou a existência de uma grande quantidade de compostos, na sua maioria passíveis de isolamento[3]. Foram purificados, no total, 39 compostos, dos quais 23 nunca tinham sido identificados e 12 outros nunca tinham sido observados no vinho (Fig. 1). Apenas quatro triterpenos, sem um grupo de galatos, já tinham sido identificados[4]. Um dos mesmos, o Glu-AB (derivado glucosilado do ácido bartogénico), adquire uma ligeira amargura, o mesmo se aplicando a diversos compostos com estruturas semelhantes. Os derivados dos QTT, no entanto, desenvolvem, essencialmente, um sabor adocicado.

■ Influência da espécie de carvalho sobre o teor de QTT

Desenvolveu-se e validou-se um método de rastreio do QTT I, II e III (todos adocicados), bem como do

A preparação e o lançamento de Revisões Técnicas da IVES (IVES Technical Reviews) são apoiados pelo LabEx COTE através dos seus concursos para projetos de Transferência e valorização.

Glu-AB (amargo), por cromatografia líquida aliada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS). Este método foi aplicado a extratos de carvalho para estudar a influência das respetivas espécies sobre a composição dos triterpenos. Com este objetivo, recolheram-se amostras de 46 árvores em 8 florestas francesas: uma amostra foliar, para determinar a espécie por análise genética, em colaboração com a UMR (Unidade Mista de Investigação) Biogeco do INRA e da Universidade de Bordéus[5], uma amostra de madeira, para quantificar os QTT I, II, III e o Glu-AB por LC-HRMS.

Em cada floresta, foram observadas amostras de ambas as espécies (27 de carvalho-alvar e 19 de carvalho-alvarinho). Foram detetados triterpenos em todas as amostras, em concentrações iguais ou inferiores a 1 mg/g de madeira. A realização de um teste estatístico evidenciou um teor de QTT nas amostras de carvalho-alvar significativamente superior ao das de carvalho-alvarinho[6]. Pelo contrário, o carvalho-alvarinho continha uma quantidade superior de Glu-AB. Esta tendência foi idêntica entre amostras da mesma floresta, sugerindo que a influência da origem botânica do carvalho sobre a composição dos triterpenos da madeira é superior à da origem geográfica. Em cada composto, observou-se uma acentuada variabilidade entre indivíduos da mesma espécie, reforçando a tendência já observada no caso da lactona do whisky/carvalho (*whisky lactone*), mais abundante no carvalho-alvar[7], ou dos elagitaninos, presentes em maior quantidade na madeira do carvalho-alvarinho[8].

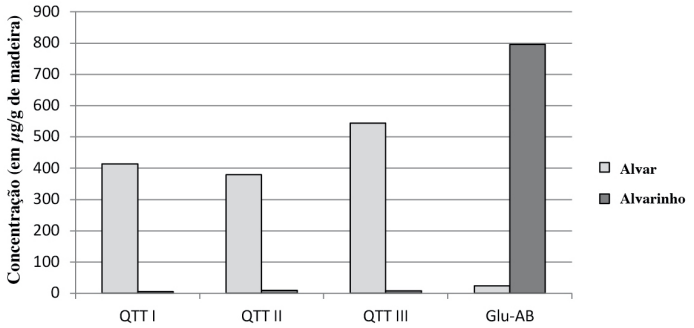


Figura 2. Concentrações médias de QTT I, II, III e Glu-AB medidas em amostras de madeira de carvalho-alvar e alvarinho.

Estes resultados comprovaram a vincada influência da espécie de carvalho sobre o teor de triterpenos e indiciam as respetivas consequências organoléticas. O carvalho-alvar é, de facto, mais rico em triterpenos adocicados (QTT), enquanto o carvalho-alvarinho apresenta uma maior quantidade de triterpenos amargos (Glu-AB). Dada a acentuada variabilidade observada entre indivíduos de cada espécie, nenhum destes compostos de triterpenos possibilita, por si só, uma identificação exata da origem botânica de uma amostra de madeira. O mesmo se aplica aos outros compostos passíveis de extração do carvalho conhecidos até à data, pelo que a identificação da espécie de uma amostra só é possível por meio das análises genéticas supramencionadas. No entanto, o exame dos cromatogramas obtidos durante a análise das 46 amostras evidenciou um certo grau de influência da espécie sobre o perfil dos triterpenos presentes no carvalho. De forma a converter o referido perfil num valor quantificável, definiu-se um índice de triterpenos (TI), do seguinte modo:

$$IT = \log \frac{[\text{QTT I}] + [\text{QTT II}] + [\text{QTT III}]}{[\text{Glu} - \text{AB}]}$$

O *TI* médio foi positivo, no caso do carvalho-alvar, e negativo, no do carvalho-alvarinho (1,9 e -1,5, respetivamente), tendo sido observadas diferenças significativas entre as duas espécies, de 0,1 %. Além disso, o desvio-padrão obtido, no caso de ambas as espécies, foi muito reduzido, refletindo uma diminuta diferença entre indivíduos. A medição do *TI* na madeira aparenta, assim, ser o primeiro método químico de identificação das espécies de carvalho utilizadas na tanoaria. Deu origem a uma patente, registada na Europa e nos Estados Unidos, cuja concretização está em curso.

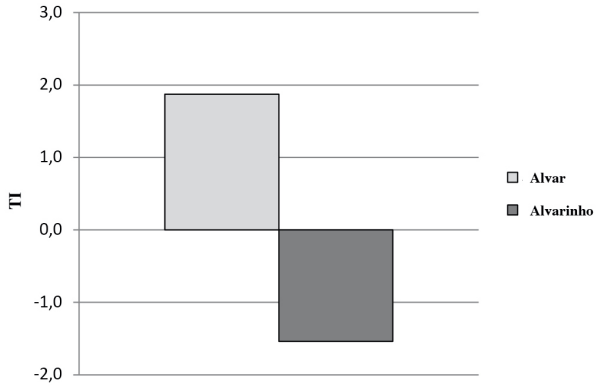


Figura 3. Valores médios do TI calculado para as 46 amostras de carvalho-alvar e alvarinho analisadas.

■ Conclusão

O trabalho empreendido para explicar os compostos responsáveis pelo aumento da perceção do sabor adocicado adquirido durante o estágio em barricas de carvalho conduziu à identificação de vários triterpenos presentes na árvore. Estes compostos dependem, em grande medida, da espécie de carvalho utilizada na tanoaria. Tornou-se possível distinguir o carvalho-alvar do alvarinho, através de uma simples análise química do carvalho envelhecido ou mesmo tostado. Este trabalho cria novas perspetivas para a seleção do carvalho a utilizar na tanoaria e a sua adaptação à identidade dos vinhos produzidos. ■

Axel Marchal[1], Pierre Waffo-Téguo[1], Marine Gammacurta[1], Andréi Prida[2], Denis Dubourdieu[1]

1 Univ. Bordeaux, Unité de Recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRAE, ISVV, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

2 Seguin-Moreau France, Z.I. Merpins, BP 94, F-16103 Cognac, France.

1 Marchal, A.; Pons, A.; Lavigne, V.; Dubourdieu, D. Contribution of Oak Wood Ageing to the Sweet Perception of Dry Wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2013, 19 (1), 11–19.

2 Marchal, A.; Waffo-Téguo, P.; Génin, E.; Mérillon, J. M.; Dubourdieu, D. Identification of New Natural Sweet Compounds in Wine Using Centrifugal Partition Chromatography-Gustatometry and Fourier Transform Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2011, 83 (24), 9629–9637.

3 Gammacurta, M.; Waffo-Teguo, P.; Winstel, D.; Cretin, B. N.; Sindt, L.; Dubourdieu, D.; Marchal, A. Triterpenoids from *Quercus Petraea*: Identification in Wines and Spirits and Sensory Assessment. *J. Nat. Prod.* 2019. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00682.

4 Arramon, G.; Saucier, C.; Colombani, D.; Glories, Y. Identification of Triterpene Saponins in *Quercus Robur L. Q. Petraea Liebl.* Heartwood by LC-ESI/MS and NMR. *Phytochem. Anal.* 2002, 13 (6), 305–310.

5 Guichoux, E.; Lagache, L.; Wagner, S.; Léger, P.; Petit, R. J. Two Highly Validated Multiplexes (12-Plex and 8-Plex) for Species Delimitation and Parentage Analysis in Oaks (*Quercus* Spp.). Mol. Ecol. Resour. 2011, 11 (3), 578–585. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02983.x.

6 Marchal, A.; Prida, A.; Dubourdieu, D. New Approach for Differentiating Sessile and Pedunculate Oak: Development of a LC-HRMS Method To Quantitate Triterpenoids in Wood. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64 (3), 618–626. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05056.

7 Prida, A.; Ducousso, A.; Petit, R. J.; Nepveu, G.; Puech, J. L. Variation in Wood Volatile Compounds in a Mixed Oak Stand: Strong Species and Spatial Differentiation in Whisky-Lactone Content. *Ann. For. Sci.* 2007, 64 (3), 313–320.

8 Prida, A.; Boulet, J. C.; Ducousso, A.; Nepveu, G.; Puech, J. L. Effect of Species and Ecological Conditions on Ellagitannin Content in Oak Wood from an Even-Aged and Mixed Stand of *Quercus Robur L.* and *Quercus Petraea Liebl. Ann. For. Sci.* 2006, 63 (4), 415–424.