

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DE FERMENTADOS  
DE BUTIÁ (*Butia odorata*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Gabrieli Bernardi**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2013**

# **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DE FERMENTADOS DE BUTIÁ (*Butia odorata*)**

**Gabrieli Bernardi**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Orientador: Prof. Dr. Roger Wagner**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2013**

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Rurais**  
**Programa de Pós-graduação em Ciência**  
**e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento e caracterização físico-química e sensorial de fermentados de butiá (*Butia odorata*)**

elaborada por

**Gabrieli Bernardi**

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Roger Wagner, Dr.**

**(Presidente/Orientador)**

---

**Aline Fogaça, Dr. (UNIFRA)**

---

**Renato Zanella, Dr. (UFSM)**

---

**Queiroz Zepka, Dr. (UFSM)**

**Leila**

**Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013.**

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico esse título aos meus pais e ao meu irmão.  
De vocês sempre tive amor, dedicação e paciência.  
Amo vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Raul e Ocirilde, pelo exemplo de dedicação que carrego comigo em todos os desafios da vida.

Ao meu irmão Guilherme, pela amizade e carinho.

Ao professor Roger, pela dedicação ao me orientar, pela paciência e compreensão presentes durante esses dois anos. Obrigada pelo exemplo de bom profissional e de ser humano. Ao Harry e Ivera, meu suporte mais próximo em todos os momentos, exemplos de carinho e dedicação, não teria conseguido sem vocês.

Aos colegas do NTA, vocês todos foram presença constante na minha vida durante esses dois anos por isso, obrigada pela ajuda, pelos momentos de distração e pela torcida. Tassi, Bruna, Carol, Dani, Jossie, Mari, Raquel, Laura, Duda e todos os que passaram pelo laboratório nesse período. Aos queridos Matheus e Carol (in memoriam). Muito obrigada, do fundo do coração. Aos meus amigos queridos, Fran, Everton, Luís e a Renata, pelos momentos de descontração e pela capacidade imensa que vocês têm de transformar qualquer assunto sério em brincadeiras. Vocês me fazem ver o mundo de uma maneira mais fácil.

A Dona Arlete Wagner pelo fornecimento das amostras de butiá e a todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho, colegas do mestrado e professores e funcionários do PPGCTA.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Centro de Ciências Rurais

Universidade Federal de Santa Maria

## DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DE FERMENTADOS DE BUTIÁ (*Butia odorata*)

AUTORA: GABRIELI BERNARDI

ORIENTADOR: ROGER WAGNER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013.

As frutas nativas de diferentes biomas vêm sendo estudadas como uma nova alternativa para o desenvolvimento de fermentados alcoólicos, além do tradicional vinho de uva. O Butiá é um exemplo típico da região sul do Brasil. Esta fruta possui coloração amarela e polpa fibrosa, além de características sensoriais de sabor que misturam acidez e doçura acentuada. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um fermentado de butiá e o estudo dos compostos responsáveis pelo aroma da bebida. Microfermentações foram realizadas às temperaturas de 10 e 20 °C com 7 e 2 dias de maceração. O fermentado apresentou graduação alcoólica média de 11 °GL, acidez total titulável variando entre 0,68% (M2T10) e 1,16% (M7T20) e acidez volátil entre 0,06% (D2T10) e 0,11% (M7T20). Com relação aos açúcares redutores e ao pH os valores variaram de 0,93 a 1,29 g/l e de 3,83 a 3,95 respectivamente. Foi utilizada a técnica de microextração em fase sólida no headspace para a extração dos compostos voláteis minoritários do fermentado de butiá, empregando a fibra DVB/CAR/PDMS. Dez mililitros de amostra foram extraídos à 35 °C por 45 minutos, sendo adicionados de 30% de NaCl e mantidos sob agitação. A fração volátil foi analisada em GC-FID e GC/MS, possibilitando a quantificação e identificação de 60 compostos entre ésteres (27), álcoois (15), ácidos (11), lactonas (2), aldeídos (1), cetonas (1), terpenos (1). Para os álcoois superiores e demais compostos, também majoritários, a extração foi realizada direto no *headspace* estático (HS) da amostra. O método foi validado de acordo com as seguintes figuras de mérito: linearidade (0,991-0,998), sensibilidade LD (0,01-0,5) e LQ (0,1-1), precisão, expressa como repetibilidade (6,5-10,9%) e precisão intermediária (7,210,3%) e exatidão (86-96%). O estudo do aroma da bebida, através da GC-O, mostrou que os compostos de maior contribuição positiva para o aroma foram os ésteres, (hexanoato de etila), seguido do álcool (3-metil-1-butanol). O ácido hexanóico foi identificado como um potencial *off flavor*, sendo que, nas fermentações a 20 °C esses compostos foram encontrados em maior concentração. O teste de aceitabilidade (escala hedônica estruturada de 9 pontos) mostrou que a aceitabilidade do fermentado foi maior para os tratamentos com menores concentração de ácido hexanóico, ou seja, os fermentado a temperatura de 10 °C e com 2 dias de maceração.

**Palavras chave:** Fermentados de frutas, butiá, *off flavor*, SPME, *headspace* estático.

### ABSTRACT

Master Dissertation

Graduate Program in Food Science and Technology

Federal University of Santa Maria

# DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY OF JELLY PALM WINE (*Butia odorata*).

AUTHOR: GABRIELI BERNARDI

ADVISOR: ROGER WAGNER

Date and Presentation Place: Santa Maria, February 27, 2013

Fruits from different biomes haven been studied as a new alternative to the development of alcoholic fermented beverages besides the traditional grape wine. Jelly palm (*butia odorata*) is a typical fruit from the southern region of Brazil. This fruit possess a yellow color, fibrous pulp and a sensorial characteristic that combines sweetness with acidity. The aim of this work was the development of a fermented beverage and the study of the compounds responsible for the aroma of the beverage. Microvinifications were conducted at temperatures and 10 and 20 °C with 7 and 2 days of maceration time. The fermented beverage showed an average value of 11 GL for alcoholic graduation. Total acidity ranged between 0.68% (D2T10) and 1.16% (M7T20) and volatile acidity ranged between 0.06% (D2T10) and 0.11% (M7T20). Residual sugar and pH ranged between 0.93 to 1.29 g/l and from 3.83 to 3.95, respectively. The minor volatile compounds of jelly palm wine were extracted using solid-phase microextraction technique employing a DVB/CAR/PDMS fiber. Ten milliliters of the wine were extracted at 35 °C for 45 minutes, added to 30% NaCl and kept under constant stirring. The volatile fraction was analyzed by GCFID and GC-MS allowing the identification and quantification of compounds from esters 60 (27), alcohols (15), acids (11), lactones (2), aldehydes (1), ketones (1), terpenes (1). For the higher alcohols and other major volatile compounds, the extraction was performed directly in the static headspace (HS) of the sample. The method used was validated with respect to lineariry (0.991-0.998), sensitivity LOD (0.01-0.5) and LOQ (0.1-1), precision as repeatability (6.5-10.9%) and intermediate precision (7.2-10.3%) and accuracy (86-96%). The evaluation of the jelly palm wine aroma by GC-O showed that the volatile compounds that most contributing to the aroma are, esters (ethyl hexanoate) and alcohols (3-methyl-1-butanol). The acid, hexanoic acid was described as a potential off flavor having a higher concentration in the fermentations at 20 °C. Sensory analysis showed that the acceptability of the beverages were higher for those fermented at 10 °C that possess the lower concentrations of the hexanoic acid.

**Keywords:** Wine fruits, jelly palm, off flavor, SPME, static headspace

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO 1

**TABLE 1** - General composition of jelly palm wine ..... 52

**TABLE 2** - Performance parameters of the HS-GC method for volatile compounds in model wine. .... 52

**TABLE 3** - Parameters analyzed in the extraction of volatile compounds of jelly palm wine expressed as total area of the peaks and number of peaks of the chromatograms. .... 53

**TABLE 4** - Odor active and non-active compounds in jelly palm wine detected by FID and

Olfactometry with retention index, odor descriptors and mean of concentration. .... 54

## MANUSCRITO 2

**TABLE 1** - Effect of maceration time and temperature on the general composition of jelly palm wine. .... 74

**TABLE 2** - Mean concentrations ( $\mu\text{l}$ ) of volatile compounds of jelly palm wine according to the applied treatments ..... 74

**TABLE 3** - Mean values assigned by consumers for the five samples of jelly palm wine, using a hedonic scale of nine points. .... 76

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**FIGURA 1** - Dispositivos empregados para extração por SPE, a) cartucho b) disco de extração. .... 18

**FIGURA 2** - Princípio do equilíbrio termodinâmico entre as fases para extração no *headspace* estático. .... 19

**FIGURA 3** - Ilustração do processo de extração por microextração em fase sólida (SPME) e dessorção da fibra em cromatógrafo gasoso. .... 20

## MANUSCRITO 1

**FIGURE 1** - Scheme of the gas chromatograph equipped with the olfactometric detector. ... 41

**FIGURE 2** - a) Chromatogram (FID) of the volatile compounds of jelly palm wine by HSSPME extraction. b) Consensus aromagram of jelly palm wine. Peaks labeled with small letters were not identified by FID..... 53

## MANUSCRITO 2

**FIGURE 1** - a) Score plot of principal component analysis of the volatile composition of jelly palm wine submitted to different treatments. b) Loading plots of principal component analysis of the volatile composition of jelly palm wine. .... 77

**FIGURE 2** - Consumer's preference with respect to the flavor of jelly palm wine. 9, like extremely; 8, like very much; 7, like moderately; 6, like slightly; 5, neither like not dislike; 4, dislike slightly; 3, dislike moderately; 2, dislike very much; 1, dislike extremely. .... 78

**FIGURE 3** - Consumer's preference with respect to aroma of jelly palm wine. 9, like extremely; 8, like very much; 7, like moderately; 6, like slightly; 5, neither like / not dislike; 4, dislike slightly; 3, dislike moderately; 2, dislike very much; 1, dislike extremely. .... 78

**FIGURE 4** - Consumer's preference with respect to general acceptability of jelly palm wine. 9, like extremely; 8, like very much; 7, like moderately; 6, like slightly; 5, neither like not dislike; 4, dislike slightly; 3, dislike moderately; 2, dislike very much; 1, dislike extremely. 79



**FIGURE 5** - Consumer purchasing intention for Jelly palm wine. 1 definitely would buy; 2 probably would buy; ..... 79

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATT – Acidez total titulável

CAR - Carboxen

CW - Carbowax

DVB - Divinilbenzeno

GC\_FID - Cromatografia a gás com detecção por ionização em chama do inglês *Gas Chromatography equipped with a Flame Ionization Detection*

GC-MS - Cromatografia a gás acoplado a um espectrômetro de massas do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

GC-O - Cromatografia em fase gasosa hifenada à olfatometria do inglês *Gas Chromatography olfactometry* m/z - Razão massa/carga PDMS - Polidimetilsiloxano

SDE - Extração e destilação simultânea do inglês, *Simultaneous distillation extraction*

SPE - Extração em fase sólida do inglês, *Solid phase extraction*

SPME - Microextração em fase sólida do inglês, *Solid phase microextraction*.

pH - Potencial hidrogeniônico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Butiá .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Fermentados de frutas .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Análise dos Compostos Voláteis .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4 Métodos de “Análise Total” .....</b>	<b>16</b>
2.4.1 Extração líquido-líquido .....	16
2.4.2 Extração em fase sólida – SPE .....	17
<b>2.5 Análises do <i>Headspace</i> .....</b>	<b>18</b>
2.5.1 <i>Headspace</i> Estático.....	19
2.5.2 <i>Headspace</i> Dinâmico .....	19
2.5.3 Microextração em fase sólida (SPME) .....	20
<b>2.6 Separação e Quantificação dos Compostos Voláteis .....</b>	<b>21</b>
<b>2.7 Análise do impacto odorífero dos compostos voláteis .....</b>	<b>23</b>
<b>2.8 Análise sensorial .....</b>	<b>25</b>
2.9 Análise de Componentes Principais.....	25
<b>3 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Manuscrito 1 - Analysis of volatile compounds of jelly palm wine .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Manuscrito 2 - Effect of temperature and maceration time on volatile composition and sensory acceptance of jelly palm wine.....</b>	<b>51</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>75</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil produz frutas tropicais, subtropicais e temperadas, graças a sua extensão territorial, posição geográfica, condições climáticas e de solo. É o 3º maior produtor de frutas com 42,6 milhões de toneladas produzidas em 2,2 milhões de hectares distribuídos pelo país. No primeiro semestre de 2009, a procura por frutas brasileiras cultivadas dentro das regras de sustentabilidade e preservação do meio ambiente, entre elas açaí e acerola, apresentou um crescimento de 59% nas exportações brasileiras destas frutas em relação ao ano anterior (FRANÇA, 2009). Avanços na economia e o aumento no poder aquisitivo dos brasileiros proporcionaram uma mudança de comportamento dos consumidores. Produtos diferenciados e que acrescentam qualidade de vida e bem estar são o principal foco desse público. Além dos avanços na economia, a agroindustrialização das frutas também ganha destaque como uma das causas para o aumento dessa demanda, sendo que, no Brasil existe uma abundância de frutas nativas com potencial para serem utilizadas na indústria alimentícia (DUARTE et al., 2010). O surgimento de produtos industrializados a partir destas frutas agrega valor à matéria-prima proporcionando a inserção e a popularização das mesmas no mercado. Adicionalmente, a agroindústria estimula a competitividade, sendo também uma maneira de expandir as exportações de produtos não perecíveis, atendendo demandas internacionais importantes. No Rio Grande do Sul, existem projetos de pesquisa e extensão, como é o caso da Embrapa com o “Projeto Sabor Nativo” o qual visa estimular o crescimento agroindustrial proporcionando o desenvolvimento de diversos produtos a partir de matérias-primas pouco exploradas como: araquá, pitanga, butiá, flor de feijoa e pequenas frutas de clima temperado como a amora e o mirtilo (EMBRAPA, 2011). Além disso, nota-se também a importância do cultivo de frutos nativos para o desenvolvimento socioeconômico regional, como pode ser caracterizado com o cultivo e processamento do Butiá na cidade de Giruá (região Noroeste do Rio Grande do Sul). A fruta inspira nessa cidade um evento típico “Festa do Butiá”, o qual conta com o incentivo municipal e beneficia pequenos agricultores familiares que buscam fontes econômicas alternativas (PORTAL MUNICIPAL, 2010).

Dentro deste contexto, o desenvolvimento de novos produtos apresenta-se também como uma maneira de diminuir as perdas nos períodos de safra e, em alguns casos, valorizar comercialmente as porções da fruta de menor valor agregado. Um bom exemplo pode ser atribuído ao fermentado de caju, o qual é produzido a partir do pedúnculo (pseudofruto) do fruto, onde a castanha é o produto alvo do cultivo (NETO et al., 2006). Segundo a legislação brasileira, o fermentado de fruta é definido como uma bebida com graduação alcoólica que varia

entre quatro e quatorze por cento em volume (20 °C) e deve ser obtido pela fermentação alcoólica do mosto da fruta sã, fresca e madura de uma única espécie, do respectivo suco integral ou concentrado, ou polpa, que poderá nestes casos, ser adicionado de água (BRASIL, 2009). O aroma é, sem dúvida, um dos principais parâmetros de qualidade não apenas de vinhos, mas de bebidas fermentadas em geral.

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual utiliza açúcares, como a glicose, frutose e sacarose, que são convertidos em energia celular com produção de etanol e dióxido de carbono como resíduos metabólicos. Durante esse processo, uma série de compostos com impacto odorífero é formada por diferentes vias metabólicas (OUGH, 1992). Em suma, o desenvolvimento de um novo produto, como o fermentado de butiá, envolve as etapas de otimização de processo de fabricação, e o produto obtido deve ser devidamente caracterizado em diversos parâmetros de qualidade entre eles, composição físico-química, bem como, composição de voláteis e a identificação dos voláteis de impacto odorífero. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um produto fermentado de butiá e o estudo de alguns parâmetros que possam influenciar na sua qualidade, principalmente no aroma.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Butiá

O Butiá, fruto da família arecaceae, é uma fruta de coloração amarela, polpa fibrosa e de composição interessante. A família arecaceae é uma das famílias de plantas mais utilizadas em todo o mundo, devido à notável importância econômica de suas espécies na produção de alimentos e produtos agroindustriais, destacando-se também a utilização do butiazeiro para ornamentação e artesanato (BÜTTOW et al., 2009). O gênero *Butia* apresenta diferentes espécies e subespécies que no Brasil ocorrem em Minas Gerais, Bahia, Paraná, Mato Grosso, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (HENDERSON, et al., 1995; LORENZI et al., 2004). Especificamente no estado do Rio Grande Sul ocorre cinco dessas espécies, sendo: *B. capitata* Becc., *B. eriospatha*, Becc., *B. odorata* Becc., *B. paraguayensis* e *B. yatay* Becc. (ROSSATO et al., 2007).

As palmeiras do gênero *butia* são plantas de altura moderada, com acaules de caule subterrâneo, curto e grosso. As folhas são arqueadas, com pecíolo e bainha indistintos. As inflorescências são interfolares, ramificadas com bráctea peduncular, lisa ou estriada

superficialmente (LORENZI et al., 2004). Os frutos do butiazeiro são providos de coloração que variam entre tons de amarelo e vermelho na maturidade, com diâmetro médio de 1,7 a 4,2 cm, mesocarpo carnoso, endocarpo contendo 1 a 3 lóculos e 3 poros próximos à sua porção mediana, e semente com abundante endosperma (HENDERSON et al., 1995; LORENZI et al., 2004). A maturação de frutos geralmente ocorre de novembro a maio, tendo seu pico no verão, no mês de fevereiro (ROSA et al., 1998). Sensorialmente os frutos são descritos como globosos, doce-acidulados, suculentos e com sabor e aroma intensos. Tais características tornam os frutos de butiá atrativos para o consumo tanto *in natura* ou como matéria-prima na produção de sucos, licores, geléias, sorvetes, bolos, entre outros produtos (BÜTTOW, 2009).

As características físico-químicas do butiá e a caracterização dos compostos voláteis presentes na fruta foram reportadas por Ferrão (2012). Os valores médios encontrados para sólidos solúveis totais (12,39 °Brix), acidez total (1,60 eq. g% de ác. cítrico) e pH (3,50) demonstram a viabilidade da utilização do butiá para o desenvolvimento de um fermentado. Além disso, a composição volátil da fruta apresentou compostos comumente encontrados em matérias-primas já utilizadas para produção de vinhos de frutas, como por exemplo, hexanoato de etila e (E)3-hexenoato de etila, encontrados também na composição volátil de abacaxi (ELSS et al., 2005) e de goiaba (NISHIMURA et al., 1989).

## 2.2 Fermentados de frutas

Tradicionalmente, os vinhos são preparados pela fermentação de mostos de uvas, que produzem etanol e outros produtos metabólicos, entre eles alguns compostos voláteis responsáveis pela composição do aroma final da bebida. No entanto, nos últimos anos, muitos autores tem reportado a utilização de outras frutas, que não a uva, para a produção de bebidas fermentadas, popularmente chamadas de vinhos de frutas. Comercialmente todos os produtos que não tenham tido a uva como matéria prima, não podem receber o nome de vinho. Para que isso ocorra o rótulo deve conter a designação específica da matéria prima usada, usando-se assim o nome da fruta associada à palavra vinho, por exemplo, vinho de laranja ou vinho de maçã. Segundo a legislação brasileira, o fermentado de fruta é definido como uma bebida com graduação alcoólica que varia entre quatro e quatorze por cento em volume (20 °C) e deve ser obtido pela fermentação alcoólica do mosto da fruta sã, fresca e madura de uma única espécie, do respectivo suco integral ou concentrado, ou polpa, que poderá nestes casos, ser adicionado de água (BRASIL, 2009).

A utilização de frutas para produção de vinhos de frutas já vem sendo estudada há bastante tempo, com Amerine, Berg e Cruess, em 1972, utilizando amora para produção de bebida fermentada e com With e Lodge, em 1982, na utilização de kiwi. Além do desenvolvimento das bebidas, normalmente costuma-se realizar a caracterização da bebida utilizando os parâmetros comumente associados à qualidade de vinhos. Sendo assim, na determinação dos parâmetros de qualidade dos fermentados de frutas, as análises físico-químicas como, pH, teor alcoólico, açúcar redutor, acidez total titulável e acidez volátil são as mais utilizadas. Entretanto, nos últimos anos, alguns autores tem explorado de maneira intensa a utilização de frutas exóticas brasileiras, normalmente desconhecidas do público em geral, para produção de bebidas fermentadas e utilizam a caracterização da fração volátil como um dos principais parâmetros de qualidade. Alguns dos mais recentes trabalhos publicados utilizam guabiroba, cupuaçu, cacau e umbu (DUARTE et al., 2010), cajá (DIAS et al., 2003) e caju (GARRUTI et al., 2006). Mais recentemente Pino e Queris reportaram a composição volátil de fermentado de abacaxi, manga e goiaba (PINO & QUERIS, 2010; PINO & QUERIS, 2011a; PINO & QUERIS, 2011b).

Dentre os principais compostos voláteis reportados nos trabalhos que utilizam as frutas para o desenvolvimento de fermentados estão os ésteres como, butirato de etila, hexanoato de etila e octanoato de etila seguidos pelos álcoois, álcool isoamílico, álcool feniletílico e 2,3butanodiol e os ácidos, acético, ácido butanóico e octanóico. A origem destes compostos, assim como nos vinhos de uva, varia de acordo com a matéria prima, o tipo de levedura utilizada e as reações que ocorrem no meio durante a fermentação (TAT et al., 2004; UBEDA et al., 2002). Além de servir de fonte para o estudo de diferentes técnicas de extração, caminhos metabólicos para formação de compostos voláteis e caracterização de compostos de aroma, as bebidas fermentadas de frutas constituem produtos promissores devido à tendência de aceitação em pesquisas de consumo, além de contribuírem para a redução de perdas pós-colheita de frutos perecíveis (MUNIZ et al., 2002). Apesar de muitas frutas terem sido exploradas neste sentido, na literatura não foram encontrados trabalhos reportando o desenvolvimento de fermentado de butíá, sua caracterização físico-química e sensorial.

### **2.3 Análise dos Compostos Voláteis**

A fermentação alcoólica leva a formação de uma série de produtos, além do etanol sendo que, a composição e a concentração desses compostos podem variar amplamente de maneira que alguns destes podem aparecer em altas concentrações, enquanto uma grande parte se

apresenta em níveis muito baixos, até mesmo abaixo de ng/l. Estes compostos, apesar de minoritários podem influenciar no aroma da bebida de forma muito significativa (WARDENCKI & PLUTOWSKA, 2008). Uma maneira de explorar essas informações é através da avaliação ou análise da fração volátil do fermentado.

A análise de compostos voláteis se inicia na etapa de isolamento da matriz de não voláteis, empregando técnicas que envolvem a análise total ou análise do *headspace* (espaço confinado sobre a amostra) a fim de eliminar interferentes e ajustar a concentração acima do limite detectável pelos instrumentos (FRANCO & JANZANTTI, 2004). Diversos trabalhos na literatura reportam o desenvolvimento de métodos para determinar a composição volátil de fermentados de frutas, juntamente com a identificação dos compostos relevantes para caracterização do aroma tais como: kiwi (SOUFLEROS et. al., 2001), cajá (DIAS, SCHWAN & LIMA, 2003), cacau (DIAS et al., 2007), laranja (SELLI et. al., 2008), cacau, cupuassu, gabiroba, jaboticaba e umbu (DUARTE et. al., 2010) e manga (PINO et. al., 2010). Independente do método utilizado, o extrato isolado deve ser representativo da amostra, sendo assim a escolha do método torna-se uma etapa determinante na análise. FRANCO & JANZANTTI (2004) reportaram a existência de duas abordagens para o isolamento dos compostos voláteis de um alimento. A primeira, denominada de Análise Total ou Métodos Tradicionais, compreende a análise de todos os componentes voláteis presentes na matriz alimentícia, enquanto a segunda, que é comumente conhecida como Análise do *Headspace* e envolve apenas a análise dos componentes voláteis presentes na fase gasosa em equilíbrio sobre a amostra (líquida ou sólida), assim representando mais fielmente o que é percebido pelo olfato.

## **2.4 Métodos de “Análise Total”**

Pertencentes ao grupo das “análises totais” ou métodos tradicionais estão às técnicas de extração líquido-líquido, extração em fase sólida – SPE, destilação por vapor, destilação seguida pela SPE e o sistema de extração\_destilação simultânea (SDE) entre outras. Apesar de sua ampla aplicação, essas técnicas apresentam uma desvantagem em comum, que é a destruição potencial dos componentes de aroma e ou produção de artefatos (ROBARDS et al., 2000; MAMEDE & PASTORE, 2004). Abaixo são descritas algumas das técnicas tradicionais para extração de compostos voláteis.

### **2.4.1 Extração líquido-líquido**

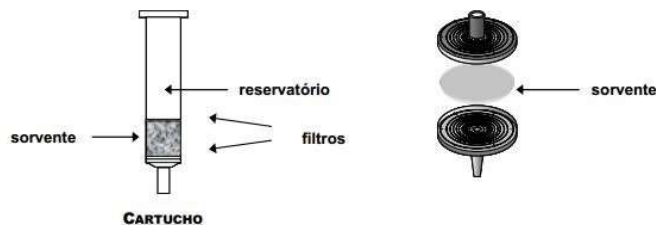
A extração líquido-líquido, também conhecida como extração por solvente, foi um dos primeiros métodos utilizados para recuperar compostos de aroma em alimentos, sendo usada também pelas indústrias de perfumaria e de cosméticos. A extração é feita pela adição e agitação de um solvente imiscível na matriz e a extração acontece pela passagem do analito para o solvente imiscível (QUEIROZ et al., 2001). Após a agitação são formadas duas fases líquidas que são então separadas. A fase contendo o analito pode ser evaporada, no caso de solventes orgânicos, ou ainda, ser analisada diretamente no sistema cromatográfico. Esta técnica utiliza tanto solventes puros, quanto misturas. Os solventes mais utilizados são diclorometano, éter etílico, éter de petróleo, pentano e o hexano (MARSILI, 1997). Diversos trabalhos reportam a utilização desta técnica para análise de compostos voláteis (PINO & VILLAREAL, 1994; LAMIKANRA et al, 1996; PINO et al., 2011a). A vantagem da técnica está no fato de que todos os compostos voláteis (baixa, média e alta volatilidade) podem ser analisados em uma única etapa de extração (MAMEDE & PASTORE, 2004). Entretanto, a técnica apresenta algumas limitações como a formação de emulsões, principalmente se compostos não voláteis estiverem presentes na amostra. Além disso, a técnica de extração líquido-líquido utiliza grande quantidade de solvente orgânico para a extração dos compostos voláteis dos alimentos, sendo necessária posterior concentração do extrato por calor, podendo acarretar mudanças na composição de voláteis, além da extração de compostos não voláteis. Apesar da sua simplicidade, a tendência moderna é substituir a extração líquido-líquido por outras técnicas, devido à alta pureza dos solventes que são requeridos para análise de traços, a necessidade de redução, no ambiente, de solventes orgânicos e o risco a saúde associado a sua manipulação, além de, não ser aplicada para análise de compostos voláteis em amostras vivas (AUGUSTO et al., 2003).

#### 2.4.2 Extração em fase sólida – SPE

A SPE consiste em uma técnica de separação líquido-sólido bastante empregada em matrizes complexas (QUEIROZ et al., 2001). A extração por meio desta técnica é baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão (POOLE et al., 2000; LANÇAS, 2004) e dependendo do adsorvente e do modo como é empregada, a SPE pode ser dividida em modo reverso, modo normal e troca iônica (ORLANDO et al., 2009). Vários são os dispositivos empregados para SPE, a instrumentação básica empregada é extremamente simples podendo, porém, ser sofisticada, dependendo do problema a ser resolvido e do grau de



automação desejado (LANÇAS, 2004). Dentre os dispositivos os mais utilizados são os cartuchos e os discos de extração (Fig. 1).



**Figura 1** - Dispositivos empregados para extração por SPE, a) cartucho b) disco de extração (Fonte: ORLANDO et al., 2009)

Em ambos os dispositivos, a amostra é forçada a passar pelo material extrator pela aplicação de pressão em uma das extremidades do cartucho ou disco. Para realizar a análise simultânea de várias amostras e extrações mais rápidas, geralmente são utilizados sistemas extratores com vácuo. As etapas da extração resumem-se na ativação do sorvente, percolação da amostra/sorção dos analitos no sorvente, eliminação dos interferentes da matriz (*clean up*), eluição dos analitos e posterior concentração do composto de interesse (LANÇAS, 2004; CALDAS et al., 2011). Apesar de bastante utilizada a SPE também agrega a maior desvantagem dentro das análises totais, que é o fato de as técnicas serem consideradas “suja” para a análise de aroma. Os compostos não voláteis podem ser eluídos ou extraídos junto com os compostos voláteis, contaminando ou degradando-se no injetor do cromatógrafo gasoso, o que pode causar danos ao equipamento e originar artefatos (FRANCO & JANZANTTI, 2004)

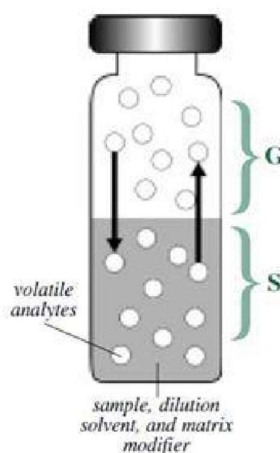
## 2.5 Análises do *Headspace*

As técnicas de amostragem de voláteis mais recentes utilizam pouco ou nenhum solvente orgânico. As técnicas de análise do *headspace* podem ser divididas em análises do *headspace* estático e análise do *headspace* dinâmico (KOLB, 1999). Em ambos os casos, o princípio fundamental é o mesmo: análise da fase gasosa em equilíbrio com a fase líquida ou sólida da amostra.

### 2.5.1 *Headspace* Estático

Na técnica que envolve a extração direta no *headspace* estático (*direct headspace*), a amostra é mantida em um recipiente fechado até que se atinja um equilíbrio termodinâmico dos

compostos voláteis entre a fase líquida ou sólida e a fase gasosa, a uma determinada temperatura (KOLB, 1999). Uma alíquota da fase gasosa é recolhida e injetada no cromatógrafo gasoso. Devido às pressões parciais significativamente menores do que a pressão parcial do vapor de água, os analitos de interesse estão em concentrações geralmente baixas, obtendo-se cromatogramas pobres e limitados a poucos compostos voláteis (THOMAZINI & FRANCO, 2000). No *headspace* estático podem ser realizadas as análises diretamente no *headspace* da matriz por injeção direta do ar confinado.



**Figura 2.** Princípio do equilíbrio termodinâmico entre as fases para extração no *headspace* estático.

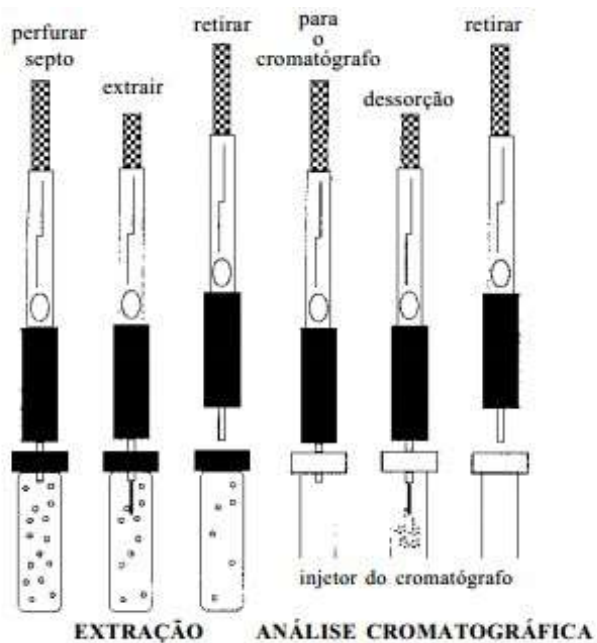
Fonte: Adaptado de Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC, Restek Corp. (2000)

### 2.5.2 *Headspace* Dinâmico

O *headspace* dinâmico é um método muito empregado para a análise de compostos voláteis em alimentos. Neste método, há uma coleta contínua dos compostos voláteis, realizada por um sistema a vácuo ou pela passagem de um gás inerte (FRANCO & RODRIGUEZAMAYA, 1983). Os compostos voláteis retidos no polímero podem ser eluídos com solvente ou dessorvidos diretamente no injetor do cromatógrafo. A técnica de *headspace* dinâmico, desde que padronizadas as condições de isolamento, permite a realização de análise qualitativa, quantitativa e sensorial dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma do alimento (BASTOS et al, 1998). Essa técnica foi bastante utilizada para a análise do aroma de alimentos como uva (SALINAS et al., 1999), suco de laranja (BYLAITE & MEYER, 2005) e mangaba (NOGUEIRA & SAMPAIO, 2006)

### 2.5.2 Microextração em fase sólida (HS-SPME)

A extração dos voláteis por SPME no *headspace* baseia-se na sorção dos analitos presentes no *headspace* da amostra, por uma fase extratora imobilizada na superfície de uma fibra de sílica fundida (PAWLISZYN, 1990). As fibras são recobertas com fase polimérica líquida ou com uma fase sólida porosa (mais exatamente, polímeros sólidos dispersos em uma matriz líquida). Para fases poliméricas líquidas, assim como polidimelsiloxano (PDMS) e o poliacrilato (PA), o mecanismo físico-químico responsável pela extração é a partição. Quando sólidos porosos recobrem a fase líquida, as fibras são chamadas mistas, assim como Divinilbenzeno-PDMS, Carboxen/PDMS, Carbowax-DVB e Carbowax-resina modelada (TR), e neste caso o processo também envolve, principalmente, a adsorção dos analitos (AUGUSTO & VALENTE, 2000). O processo de extração por SPME e posterior dessorção da fibra no cromatógrafo é ilustrado na Figura 2. Através da Figura 3, podemos visualizar que o processo de extração inicia-se quando a agulha do suporte de SPME (*holder*), com a fibra retraída, perfura o septo do frasco que contém a amostra. Posteriormente, a fibra é exposta no headspace da amostra para que ocorra a extração.



**Figura 3** – Ilustração do processo de extração por microextração em fase sólida (SPME) e dessorção da fibra em cromatógrafo gasoso. Fonte: Valente e Augusto (2000)

Numa extração por SPME as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas,

até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. A teoria da SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre as fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas (AUGUSTO & VALENTE, 2000).

Em relação às outras técnicas apresentadas, a técnica que envolve a microextração em fase sólida apresenta algumas vantagens, como a facilidade de extração de compostos voláteis, rapidez, dispensa o uso de solventes, utiliza pequeno volume de amostra, além de apresentar alta sensibilidade e baixo custo (PAWLISZYN et al., 1992; KATAOKA et al., 2000). O isolamento ou extração dos compostos voláteis utilizando a técnica conhecida por SPME, seguido da análise em sistemas de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) tem sido empregadas para caracterizar adequadamente os compostos voláteis presentes em diversos alimentos, inclusive em fermentados de frutas (AUGUSTO et al., 2000; JUNQUEIRA et al., 2004; BRAGA, 2007; PINO et al., 2010).

## **2.6 Separação e Quantificação dos Compostos Voláteis**

Independente do método de isolamento dos voláteis aplicado à matriz, a análise do isolado procede através da introdução do extrato em uma instrumentação analítica que realize a separação destes compostos, bem com a adequada detecção. O método analítico mais apropriado para a pesquisa de compostos voláteis é a cromatografia gasosa (GC), uma vez que, esta possui excelente capacidade de separação (resolução) e extrema sensibilidade (REINECCIUS, 2006). Na técnica cromatografia se faz necessário o ajuste criterioso das condições cromatográficas como a velocidade linear, rampa de temperatura e pressão e temperaturas do injetor e detector para que se tenha a seletividade apropriada no método. Além disso, o detector utilizado deve ser escolhido de acordo com a amostra a ser analisada e de acordo com o tipo de resultado (resposta) que se deseja obter (GARRUTI, 2001; WAGNER, 2008; REID, 2003). O cromatógrafo a gás de alta resolução, com coluna capilar e injetor do tipo *split-splitless*, acoplado à espectrometria de massas (GC/MS) são os instrumentos mais requeridos para esta análise por possuir alta resolução e eficiência, possibilitando obter informações qualitativas e quantitativas (FRANCO & JANZANTTI, 2003). Além disto, o espectrômetro de massas possui a opção de escolha entre o modo operacional de varredura (*SCAN*) que coleta espectros para todos os compostos eluídos da coluna, e o sistema operacional em modo (*SIM*) com monitoramento de íon selecionado, que possibilita o aumento da sensibilidade e especificidade da análise quando o composto a ser determinado já é conhecido

(REID, 2003). No caso de uma análise quantitativa dos compostos voláteis de uma matriz complexa, pode-se obter uma melhor resposta, para a maioria dos compostos orgânicos, através da utilização de detector FID (REID, 2003; REINECCIUS, 2006). Em ambos os casos, a identificação dos compostos pode ser feita com a utilização dos índices de retenção, para comparar a ordem de eluição experimental com a ordem de eluição descrita na literatura em uma mesma fase estacionária (ADAMS, 1995), além do uso de padrões analíticos, que auxiliam e eliminam possibilidades equivocadas, aumentando a confiabilidade da identificação (FRANCO & JANZANTTI, 2004). No caso da espectrometria de massa, as relações massa/carga ( $m/z$ ) obtidas nos espectros de massas por ionização por elétrons (EI) a 70 eV, são utilizadas como informação estrutural na identificação e confirmação dos constituintes voláteis de uma amostra. Obtendo-se o espectro do composto de interesse, pode-se realizar uma busca através da similaridade espectral deste, com os espectros armazenados em uma biblioteca de referência. Com o resultado desta etapa, tem-se o analito tentativamente identificado e com elevado grau de incerteza sobre a identificação (McLAFFERTY, 1993).

Definido o método, as condições cromatográficas e o detector ou detectores a serem utilizados é necessário estabelecer os critérios de quantificação que serão adotados. Na análise de compostos voláteis, muitas vezes se trabalha com um número muito grande de compostos, desta forma, validar um método de separação se torna uma alternativa que requer instrumentação adequada e disponibilidade de padrões analíticos de alta pureza para cada um dos compostos. Em alguns casos, a quantificação pode ser feita com a adição de um padrão interno de concentração conhecida à amostra. Assim, a quantificação se dá pela relação entre a área do padrão interno e a área do pico cromatográfico do composto de interesse e neste caso, assume-se o fator de resposta igual a um entre o padrão interno os analitos. Quando os padrões analíticos dos compostos de interesse estão disponíveis, a etapa de quantificação pode ser realizada através da validação externa individualmente a cada composto. Validação é uma avaliação a qual o método analítico é submetido para garantir que as informações geradas são confiáveis e reprodutíveis (RIBANI et al., 2004). Em um processo de validação alguns parâmetros, normalmente encontrados para validação de métodos de separação analíticos, devem ser considerados. Tais parâmetros são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (CHAN, 2008; RIBANI et al., 2004). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas (RIBANI et al., 2004). A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em

exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie deve ser linear. Para verificar essa correlação, estabelece-se uma relação matemática que pode ser expressa como uma equação da reta, também chamada curva analítica (LANÇAS, 2009; RIBANI et al., 2004). A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão, em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária e reprodutibilidade e os resultados podem ser expressos através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Para avaliar o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro faz-se avaliação da exatidão do método. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão. Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) representam, respectivamente, a menor concentração da substância que pode ser medida utilizando um determinado método experimental e a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (CHAN, 2008). De maneira geral, a validação é específica e é influenciada pelo procedimento analítico utilizado, pela natureza e concentração do composto de interesse e pela matriz.

## **2.7 Análise do impacto odorífero dos compostos voláteis**

É sabido que, na maioria dos alimentos, o aroma consiste na combinação de muitos compostos voláteis, sendo que, apenas umas pequenas parcelas destes compostos são sensorialmente relevantes (BLANK, 1996). Na pesquisa do sabor, a avaliação sensorial dos compostos voláteis, após a separação cromatográfica, é feita utilizando a técnica olfatométrica. A cromatografia gasosa hifenada a olfatometria (GC-O) é o termo usado para descrever as técnicas que utilizam julgadores para avaliar os compostos voláteis separados pela coluna cromatográfica. Na técnica cromatográfica é possível a detecção e a quantificação dos compostos presentes na amostra, entretanto, a quantificação, expressa em função da área do pico no cromatograma, não traduz a contribuição real da substância no aroma do produto (WARDENCKI & PLUTOWSKA, 2008). O ser humano tem a capacidade de detectar os compostos odoríferos que eluem do efluente cromatográfico, além de mensurar a duração (início ao fim) de cada odor, quantificar sua intensidade e descrever sua qualidade, uma vez que o nariz humano é muito mais sensível aos compostos odoríferos do que vários detectores

instrumentais (DELAHUNTY et al, 2006). Dentre vários métodos existentes para quantificar o impacto sensorial dos efluentes, pode-se dividir os mesmo em três grupos baseados no método de determinação. Métodos por Diluições Sucessivas, Métodos por Freqüência de Detecção, e Métodos de Tempo-Intensidade. No grupo dos métodos por diluição destacam-se as técnicas denominadas CHARM desenvolvida por Acree et al. (1984) e a AEDA desenvolvida por Ullrich & Grosch (1987). As técnicas de tempo-intensidade podem ser representadas pela técnica OSME, desenvolvida por Mc Daniel et al. (1990), e a FSCM por Étievant et al. (1999). Os métodos que utilizam a freqüência de detecção do odor como NIF/SNIF (*Nasal impact Frequency/Surface of Nasal Impact Frequency*) foram desenvolvidos por Pollien et al. (1997) e são métodos conhecidos pelo menor consumo de tempo e maior facilidade de aplicação uma vez que, os métodos de diluição são os que exigem mais tempo para aplicação enquanto os que utilizam tempo-intensidade apresentam maior dificuldade de aplicação (DELAHUNTY et al., 2006). É importante ressaltar que, para os métodos que utilizam a freqüência de detecção os julgadores requerem menos treinamento (VAN RUTH & O'CONNOR, 2001). Da Silva et al (1994) desenvolveram um programa nomeado de Sistema de Coleta de Dados TempoIntensidade (SCDTI), no qual o julgador utiliza um mouse para registrar em uma escala de 9 a 15 pontos, o tempo e a intensidade do odor percebido. As repetições de cada julgador são analisadas e integradas, formando um aromagrama individual médio para cada julgador, que são então analisados gerando um aromagrama consensual da equipe. Os compostos de maior importância odorífera são representados pelos picos mais altos (mais intensos) e/ou de maior área. O aromagrama consensual pode ser comparado ao cromatograma, permitindo assim, identificar os compostos importantes para a formação do aroma do alimento, mesmo que estes estejam em concentrações muito baixas no isolado (LOPEZ et al., 1992; GARRUTI, 2001). Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos utilizando GC-O como uma ferramenta no auxílio da correlação existente entre dados instrumentais e atributos sensoriais (ZHANG et al., 2011, SEFTON et al., 2011, SANCHEZ-PALOMO et al., 2011) auxiliando na identificação dos compostos típicos de aroma em vinhos e fermentados de frutas.

## **2.8 Análise sensorial**

A análise sensorial permite determinar diferenças, caracterizar e medir atributos sensoriais dos produtos ou até mesmo determinar se as diferenças nos produtos são detectadas e aceitas pelo consumidor. Os métodos sensoriais podem ser divididos em analíticos (discriminativos e descritivos) e afetivos. Os métodos discriminativos são aqueles que estabelecem diferenciação qualitativa e/ou quantitativa entre amostras. Nos testes

discriminativos, os provadores de uma equipe atuam como instrumentos para detectar pequenas diferenças. Os métodos descritivos descrevem qualitativa e quantitativamente as amostras e utilizam escalas de intervalo ou de proporção. Os métodos descritivos envolvem a detecção e a descrição dos aspectos sensoriais qualitativos e quantitativos de um produto por painel (grupo de pessoas que avaliam produtos) treinado. Com relação aos métodos afetivos, os mesmos acessam diretamente a opinião (preferência e/ou aceitabilidade) do consumidor já estabelecido ou do consumidor potencial de um produto, a respeito de características específicas desse produto, ou ideias que o consumidor tenha do produto a ser avaliado; por isso, são também chamados de testes de consumidor (MEILGAARD et al., 1987; STONE & SIDEL, 1993; DUTCOSKY, 1996).

Os testes afetivos têm demonstrado êxito no desenvolvimento, melhoria da qualidade e avaliação do mercado de produtos alimentícios (MEILGAARD et al., 1999). Dentro dos testes que buscam avaliar a satisfação do consumidor encontra-se a escala hedônica estruturada verbal de 9 pontos como um dos métodos mais utilizados (MEILGAARD et al., 1987) devido a simplicidade na sua aplicação. A importância dos dados obtidos na análise sensorial ganha maior proporção à medida que correlacionamos com outros provenientes de análises instrumentais (BASTOS et al., 2002; WAGNER, 2008,). As percepções sensoriais dos consumidores são critérios de relevância na definição da qualidade de um produto, não sendo o bastante apenas a excelente qualidade química, física e microbiológica deste (MININ, 2006).

## **2.9 Análise de Componentes Principais**

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma técnica de estatística multivariada que consiste em reescrever o conjunto de variáveis originais da amostra em um sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados, sendo esse chamado de componente principal. Cada componente principal é independente entre si, sendo uma combinação linear de todas as variáveis originais que relêem o máximo de informação da variação total contida nos dados (NETO & MOITA, 1998; MINGOTI, 2005). A técnica de PCA foi introduzida por Karl Pearson em 1901 e está fundamentada no artigo de Hotelling (1933 apud MINGOTI, 2005). Por ser uma análise antiga, ela é amplamente utilizada nas mais diversas áreas pesquisa, sendo uma fundamental ferramenta na análise de dados com um número grande de variáveis, como é o caso da determinação de compostos voláteis (REINECCIUS, 2006; LOSEKAN, 2012).

Em suma, a revisão da literatura mostrou a importância do aroma como parâmetro de qualidade de bebidas tais como o vinho de butiá. Consequentemente, a importância da



caracterização físico-química e da determinação da fração volátil. Não existem, na literatura, trabalhos que reportem o desenvolvimento bem como, a caracterização do ponto de vista físico químico e sensorial desta bebida.

### **3 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **3.1 Manuscrito 1 - Analysis of volatile compounds of jelly palm wine**

### **Analysis of volatile compounds of jelly palm wine**

**(Manuscrito formatado segundo as normas da Revista Food Analytical Methods)**

# **ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS OF JELLY PALM WINE**

**Gabrieli Bernardi; Raquel G. Vendruscolo; Tassiane S. Ferrão; Roger Wagner\***

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria  
(UFSM) - Av. Roraima, nº 1000 – Cidade Universitária, Cep 97105-900, Santa Maria, RS,  
Brazil.

e-mail: rogerwag@gmail.com

## **Analysis of volatile compounds of jelly palm wine**

### **Abstract**

Two analytical procedures based on headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and static headspace extraction (HS) were developed in this work for the characterization of minor and major volatile compounds of jelly palm wine. Volatile compounds were quantitatively evaluated with GC-FID and identified by GC/MS and GC-O. For the extraction of minor volatile compounds different sample preparation (SPME fiber type, addition of sodium chloride, extraction time and temperature) was evaluated to optimize the HS-SPME method. For the final method, 10 ml of jelly palm wine were placed in a 20 ml headspace vial with addition of 3 g of NaCl; a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane SPME fiber was used for extraction at 35 °C for 45 min with continuous stirring. A total of 57 volatiles compounds were identified; most esters, followed by alcohols and acids. The static headspace method, for major volatile compounds, was validated with respect to linearity (0.991-0.998), sensitivity LOQ (0.01-0.5) and LOD (0.1-1), precision, as repeatability (6.5-10.9%) and intermediate precision (7.2-10.3%) and for accuracy (86-96%). The method allows good determination for 7 compounds, propanol, isobutyl alcohol, butyl alcohol, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate and hexanoic acid. GC-O analysis showed that esters were the main contributors for the positive aroma of the jelly palm wine. Ethyl hexanoate was described as the natural aroma of jelly palm fruit while hexanoic acid was described as a potential off-flavor to the aroma of the beverage.

Keywords: Jelly palm, Static headspace, HS-SPME, GC-O

## Introduction

Jelly palm (*butia odorata*) is a native fruit very appreciate in the southern region of Brazil, mainly because of its taste that combines sweetness with acidity. The fruits are mostly consumed fresh, even though jelly palm has been used in food industry for the production of ice-cream, jam, and concentrated juice<sup>1,2</sup>. Ferrão<sup>3</sup> has described the physicochemical characteristics of the jelly palm fruit which confirms the viability its use for wine production. In the past few years, different authors have reported the use of fruits for wine production<sup>4-10</sup>, generally researching the general composition, sensory aspects and volatile compounds associated to the characteristic odour and flavour of these products. However, there is no information published to date on the composition and volatiles of jelly palm wine. Physicochemical characterizations of these beverages through classic methods are normally used for quality assessment and have a well-established methodology<sup>11</sup>. However, wine aroma is extremely complex due to the great number of compounds present which may have different polarities, volatilities and, moreover, may be found in a wide range of concentrations<sup>12</sup>. Therefore, a major task in flavour studies is to separate the strongly odour active compounds from the less odourous or odourless component present in wines<sup>7</sup> and furthermore, the compounds that influences the aroma in a negative way. Headspace analysis (both static and dynamic) has been widely used for volatile analysis in wine<sup>13</sup>. Static headspace (HS) is essentially a sampling method that permits analysts to take an aliquot of the gas phase in equilibrium with a liquid or solid phase<sup>14</sup>. However, static headspace analysis often shows poor sensitivity for analysis of minor and traces volatile compounds; it may be a powerful tool for major volatile compounds as the higher alcohols in wine matrices. Solid-phase microextraction (SPME) is a sample preparation technique using a fused-silica fiber that is coated on the outside with an appropriate stationary phase<sup>15</sup>. The method is solvent less, saves preparation time and shows good detection limits<sup>16</sup>. Solid-phase microextraction (SPME) is now widely used for analysis of aroma volatiles in many food and beverage matrices<sup>17</sup>. Though, besides the characterization of the volatile composition, in recent years, intensive studies have been carried out regarding the sensory activity of the individual components of food and alcoholic beverage odours<sup>18,19</sup>. The smell of an alcoholic beverage is the effect of a large number of chemical compounds. In this context, the combination of gas chromatography with olfactometric detection (GC-O) takes place. G-O is based on sensory evaluation of the eluate from the chromatographic column aimed at discovering the active odour compounds. Determination of the analyte's odour is possible thanks to the presence of an olfactometric port, connected in

parallel to conventional detectors, such as flame-ionization detector (FID) or mass spectrometer (MS)<sup>20</sup>.

The existents methods for sensory impact evaluation are generally divided into three groups, dilution analysis, detection frequency methods and time-intensity methods<sup>21,20</sup>. Among the methods, detection frequency has a fundamental benefit, their simplicity, owing to which qualified evaluators are not required. Detection frequency method is based on recording detected odors from a number of sniffers. The method calculates the peak detection frequencies from the odors perceived to improve the reliability of aromagrams that show the repeatable and reproducible abilities<sup>22</sup>. Thus, the aim of this work was the development of a fermented beverage from jelly palm fruit and the characterization of the wine through classical methods. Further that, the volatile composition analysis using two headspace methods, HS (majority compounds) and SPME (minority compounds) and the determination of the volatile compounds that play a significant role in the aroma of the beverage were determined using a GC-O technique.

## **Materials and Methods** Reagents

Chemical standards 1-propanol (99.5%), 2-methyl-1-propanol (99.0%), 1-butanol (99.4%), 3-methyl-1-butanol (98.5%), ethyl hexanoate (99.9%), ethyl octanoate (99.9%), hexanoic acid (99.9%) and internal standard 3-octanol (99.0%) were obtained from Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA). Absolute ethanol (99.0%) and anhydrous citric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

## Wine making

Fresh, healthy and ripe fruits of jelly palm, *var. Butia odorata* (20 kg), were obtained from the Tuparendi city, northwest of the state of Rio Grande do Sul, Brazil (27° 45' 21" S, 54° 28' 55" W). The harvest was between March and April of 2011. The fruits were peeled manually, cut in pieces and passed through a domestic grinder in order to obtain the must. The must were diluted (1:1 v/v) with a sucrose solution to adjust the sugar content to 24 °Brix. An enzyme solution with pectolytic enzyme-Laffort (Petaluma, CA, USA) was added to a concentration of 3 g/hl and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast Actiflore F33Laffort (Petaluma, CA, USA) in a concentration of 20 g/hl. Sulfur dioxide, in the form of potassium

metabisulfite, was added up to a concentration of 50 mg/l of free SO<sub>2</sub> to inhibit bacterial growth. Vinifications were carried out, in duplicate, in 5 liters flasks in a room temperature ( $\pm 20$  °C) and the fermentation was monitored by the daily measurement of Brix value, and temperature.

The fermentation was considered complete when the Brix level was stable. For the clarification step was used bentonite (300 mg/l) prepared according to Daudt and Durante<sup>23</sup> (1986), facilitating the sedimentation of non-fermentable solids. After the clarification step the wines were stored in glass bottles (237 ml) under the temperature of 6 °C until analysis.

#### General composition of jelly palm pulp and wine

Alcohol, pH, total acidity and volatile acid (such as acetic acid) were performed in the wine as described by Amerine and Ough<sup>11</sup>. Brix, total acidity and pH were determined in the jelly palm pulp according to standard methods AOAC<sup>24</sup>.

#### Analysis of major volatile compounds

For the determination of the major volatile compounds in jelly palm wine a static headspace extraction technique (HS-GC) was used<sup>25</sup>. Sample preparation was conducted using a 10 ml aliquot of wine transferred to a 20 ml glass vial containing 3 g of NaCl; 30  $\mu$ l of a 3-octanol internal standard solution (solution 822 mg/l in ethanol) were added to each vial. For the extraction headspace sampling temperature of 50 °C and headspace equilibrium time of 30 min were used with continuous stirring (500 rpm). The headspace injected volume was 1 ml; sampling was conducted manually using a gas-tight syringe-Hamilton (Reno, Nevada, USA). The method was validated with respect to linearity, sensitivity (LOQ) and (LOD), precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy. A model solution (hydroalcoholic solution) similar to the jelly palm wine was used, (2 g/l of anhydrous citric acid dissolved in 11% ethanol solution) prepared with MilliQ water (Millipore, Bedford, USA) and pH value was adjusted to 3.8.

Standard concentrations ranged from 0.1 to 50 mg/l (Table 3) were selected to bracket the concentrations of each individual compound in the wine. For linearity study, a calibration graph of five points was established for each compound using a pool of seven standard solutions (propanol, isobutyl alcohol, butyl alcohol, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate and hexanoic acid) in a model wine solution added to 30  $\mu$ l of the internal standard (3-octanol).

The limits of detections (LOD) were visually estimated as the concentration of the analyte that produce a signal 3 times the noise signal. The quantification limits (LOQ) were obtained injecting successive dilutions of standards and were calculated as the concentration which would result in a signal-to-noise ratio higher than or equal to 10. The spiked samples were injected six times in a single day for the repeatability assay and four times a day on three different days for the intermediate precision assay. The results were expressed as relative standard deviation (% RSD). The accuracy of the method was evaluated only in the case of wine since the calibration lines were built using hydroalcoholic solutions instead of a real matrix. For accuracy assay a sample of wine was spiked with standards at three levels of concentration and assessed through recovery studies defined as a percent recovered by the assay (using the proposed analytical procedure) of known added amount of analyte.

The analysis of the major volatile compounds was conducted using a Varian 3400 Star gas chromatograph equipped with a Split/Splitless injector in split mode (1:5) and a flame ionization detector (GC-FID). A ZB-WAX plus capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness) (Phenomenex, Palo Alto, CA, USA) was used. The temperature of the injector and detector was set to 230 and 250 °C respectively. The oven temperature was held at 35 °C for 2 min and raised from 35 °C to 80 °C at 4 °C/min, then programmed to run from 80 °C to 200 °C at 30 °C/min remaining at 200 °C/min for 5 min. Carrier gas was hydrogen at an initial flow rate of 2 ml/min (constant pressure of 15 psi).

#### Analysis of the minor volatile compounds

Experimental parameters were evaluated to determinate the optimal condition for the extraction of the volatile compounds of jelly palm wine by HS-SPME. First of all, three types of fibers were tested: (1) polydimethylsiloxane-PDMS (100 µm × 10 mm), (2) carboxen/polydimethylsiloxane-CAR/PDMS (75 µm × 10 mm) and (3) divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane-DVB/Car/PDMS (50/30 µm × 20 mm) under the following conditions (35 °C for 45 min with 30% of salt, NaCl). Fibers were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and were thermally conditioned in accordance with the manufacturer's recommendations, before first use. Secondly, an univariate study was conducted to optimize the parameters time and temperature of extraction and salt addition. Headspace temperatures of 35, 45 and 60 °C and extraction times of 25, 45 e 60 min were evaluated with continuous stirring (500 rpm). Finally, the influence of the ionic strength by the addition of



NaCl in the sample was observed in the ratio of 0, 15 e 30%. In all experiments a 10 ml aliquot of wine was transferred to a 20 ml glass vial and extract under constant stirring. The mixture was carefully shaken to dissolve the salt and then left to equilibrate 5 min before each analysis. Fibers were desorbed in a split/splitless injector at 230 °C for 10 min. After each complete procedure the extracts were submitted to a chromatographic analysis.

The analysis of the minor volatile compounds was conducted using a Varian 3400 Star gas chromatograph equipped with a split/splitless injector and a flame ionization detector (GC/FID). The injector operated in splitless mode for 2 min with a SPME liner (0.75 mm i.d.). The temperature of the injector and detector was set to 230 and 250 °C respectively. A ZB-WAX plus capillary column (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness) (Phenomenex, CA, USA) was used. The oven temperature was held at 35 °C for 2 min and raised to 80 °C at 2 °C/min, then programmed for raise until 150 °C at 4 °C/min, and then to 230 °C at 8 °C/min and held in this temperature for 5 min. Carrier gas was hydrogen at an initial flow rate of 2 ml/min (constant pressure of 30 psi). For optimization study the parameters analyzed were evaluated according to the profile of volatile compounds, number of peaks and especially the sum of the total area of the peaks. All analyses were replicated three times. For sample characterization the relative concentrations of the investigated compounds were calculated by relating the area of the internal standard (82.2 mg/l) to the area of the compound of interest. Response factor between internal standard and analytes was assumed as one.

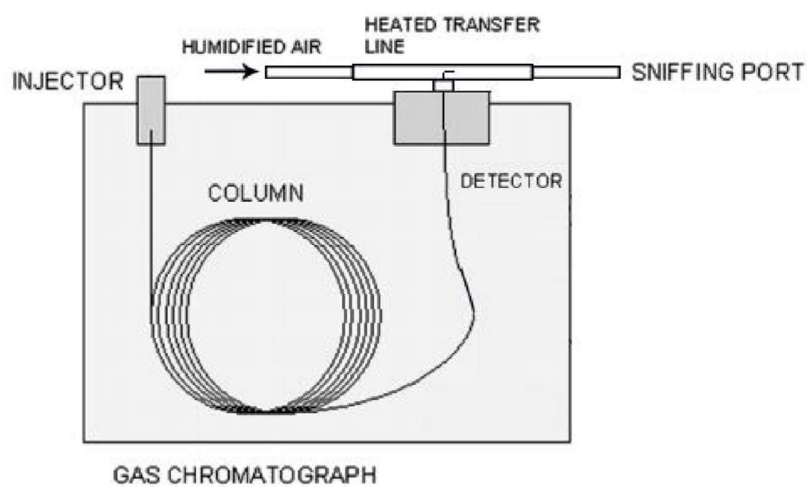
Volatile compounds were identified in a Shimadzu QP2010Plus gas chromatography coupled to a mass spectrometer GC/MS. GC conditions were the same as those used for the GC-FID chromatographic analysis with polar column. A non-polar RTX5-ms capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) (Restek, Bellefonte, PA) was used for aid the identification. Helium was the carrier gas at a flow rate of 2 ml/min. MS was operated in electron ionization mode (EI) at 70 eV, scanning from m/z 35 to 350. The volatile compounds were identified by comparing their mass spectra to those of commercial spectra databases (NIST05, Wiley) and by comparing experimental retention index (RI) with the literature. Some compounds were positively identified by the comparison to authentic standards into the GC-FID and GC/MS systems.

#### GC-Olfactometry analyses

For the sensory evaluation of the GC effluents, the Varian 3400 Star chromatograph was modified similar as described by Garruti, Franco, Da Silva, Janzanti, and Alves et al.<sup>26</sup> (Fig 1.)

Medicinal air (flow rate 3.5 l/min) was used to carry the analytes through the heated transfer line until the sniffing port. The air was previously humidified and kept at 28 °C. A detection frequency method was used for the evaluation of odours and their relative influence on the aroma of the sample.

Eight judges responded to the sensory stimulus by using a time recorder, which was manipulated by the mouse of a personal computer. Time values were registered and stored in a data collection software system named SCDTI (Sistema de Coleta de Dados TempoIntensidade) developed at Unicamp, Campinas, Brazil. At the same time that stimulus was perceived a verbal qualitative description of each odorant was collected. The sniffing time for each run was 57 min; was used two judges each run, 28 min each one. Judges were selected among students from the Food Science Technology Departments at UFSM, on the basis of availability, interest and ability in discriminating the intensity of jelly palm wine aroma.



**Figure 1.** Scheme of the gas chromatograph equipped with the olfactometric detector.

#### Statistical analysis

The experimental data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) using the JMP (SAS) software.

### 3. Results and Discussion

#### Characterization of Jelly palm wine

The values found for jelly palm wine characterization (Table 1) were considered normal in accordance to the values found by others authors for fruit wines. Total acidity, however,

was higher than in mango and pineapple wine<sup>9,7</sup>. The value for residual sugar shows that the fermentation was successful and classifies the wine as dry. Volatile acidity and pH attach to jelly pam wine durability based on Jackson<sup>27</sup>.

#### Validation Parameters for major volatile compounds

In general, the volatile compounds have shown a good linearity in the range of concentrations studied, as regression coefficients ( $R^2$ ) varying between 0.991 (hexanoic acid) and 0.998 (propanol) (Table 2), with a linear range between 0.1 to 50 mg/l. The precision was studied as repeatability ( $n = 6$  intra-day) and intermediate precision ( $n = 4$  inter-days) and expressed as relative standard deviation (%RSD) in the model wine. Percent RSD values range from 6.5% (propanol) to 10.9% (hexanoic acid) were found for repeatability and between 7.2 and 10.3% for intermediate precision. The LOD and LOQ were visually calculated from the ratio of the peak areas to the average noise and are given in Table 2.

The results for limit of quantitation and detection were dependent on the physicochemical characteristics of the volatile compounds, in this sense, ethyl hexanoate and possessed the lowest detection limit (0.01 mg/l) among the studied compounds. The slope of the calibration line is also showed in Table 2; according to Ferreira<sup>28</sup> the slope is a measure of method sensitivity and depends on both extraction efficiency and detector response for each compound. In this sense, ethyl hexanoate followed by isoamyl alcohol presented the higher sensitivity for the method; both compounds show a good response detector and also reached the highest percent of recovery. The recovery percentages obtained assigned to the method an acceptable accuracy at the three tested levels. The percentage recovery ranged between 86 and 96% for hexanoic acid and isoamyl alcohol, respectively.

#### Optimization of solid-phase microextraction conditions for minor volatile compounds

Typically SPME headspace sampling was selected for this study. HS-SPME is an equilibrium technique that requires a previous optimization step of the sampling conditions, in order to obtain high recoveries of volatiles compounds and a good precision of the method<sup>29,30</sup>. The main parameters for optimizing an extraction system were evaluated for jelly palm wine, fiber adsorbent phase, salt addition and extraction temperature and time. The results of the optimization performed in this study (Table 3) shows that, among the three fibers evaluated,

under the same conditions (35 °C for 45 min with 30% of salt, NaCl), the highest values for sum of areas and sum of peaks were corresponding to the mixed-polymer coating fiber, DVB/CAR/PDMS (50/30  $\mu\text{m} \times 20$  mm). CAR/PDMS fiber, which represents another mixed-polymer coating, extracted 123 volatile compounds and the sum of peak areas of these compounds was lower than DVB/CAR/PDMS value. Mixed-polymer coating fibers presented a high retention capacity due to the mutually potentiating effect of adsorption and distribution to the stationary phase<sup>15,31</sup>. The extraction with PDMS fiber, a non-polar coating, showed the lowest results for the evaluated parameters. Although DVB/Car/PDMS has the greatest surface area (fiber with 20 mm), which probably had an improvement in the extraction efficiency.

Additionally, the affinity of the fiber coating for an analyte is the most important factor in SPME according to Kataoka<sup>15</sup>. As will be shown further, the predominant compounds in jelly palm wine are esters followed by alcohols. Furthermore, previous studies showed that the combination of the three stationary phases, DVB/CAR/PDMS, is the most appropriate due to its extraction ability over an expanded range of compounds, including analyses of volatile compounds from wine samples<sup>32,33,34</sup>. Based on these results, further optimization of the method, including the SPME sampling time, temperature and salt addition were carried out with the DVB/CAR/PDMS fiber. The results of the effect of different sampling temperature and time (Table 3) showed that the optimal condition for these parameters were, 35 °C for extraction temperature and 45 min for extraction time, always preceded of 5 min of equilibrium. Raising the temperature from 25 °C to 35 °C a significant increase of total area was observed. However, when the temperature reach 45 °C no significant difference was observed compared to 35 °C ( $p > 0.05$ ), at this point, the total area showed a slight decrease, which means that, the compounds adsorbed on the fiber begun to perform the reverse process of desorption. According to Pellati<sup>35</sup> the increase in sampling temperature increased the headspace concentration of the volatile compounds, favoring the extraction. However, SPME involves an exothermic process and the extraction of compounds decreases as the temperature increases<sup>33</sup>. Though temperatures of 35 and 45 °C were not statistically different, 35 °C was the chosen one since 45 °C could lead to a sensory decharacterization of the jelly palm wine. Time extraction increases de total area with significant difference between 30 and 45 min ( $p > 0.05$ ).

However, between 45 and 60 min no significant difference was showed. These results are demonstrating that, extraction time influences the equilibrium between the analytes concentration in the aqueous phase and in the polymeric phase of the fiber<sup>29</sup>. Once the equilibrium has been reached, the analyte concentration in the fiber decreases. The same behavior has been observed in other samples such as, oregano and grape<sup>36,16</sup>. The results found

for the salt addition were the same found for other authors in similar matrices<sup>7,37,38</sup> and confirm that, the presence of an electrolyte in the adsorption process decrease the solubility of hydrophobic compounds in the aqueous phase increasing the sensitivity of the method<sup>39</sup>. In this way, the extraction of volatile compounds from jelly palm wine was conducted using a DVB/CAR/PDMS fiber, during 45 minutes at 35 °C with 3 g of NaCl.

Volatile composition of jelly palm wine.

Major volatile compounds

The major volatile compounds present in jelly palm wine were determined by static headspace method (described above) are showed in Table 4. Among the major volatile compounds, extracted by the HS procedure, isoamyl alcohol (28.5 mg/l) was the major volatile identified meanwhile; other higher alcohols n-propanol (10.2 mg/l), isobutyl (15.5 mg/l), and butyl alcohol (0.59 mg/l) were found in lower concentrations. The concentration found for isoamyl alcohol was similar to that found in cacao, cupuassu and gabirola wine reported by Duarte<sup>8</sup>. Higher alcohols can be formed by the metabolism of yeast and bacteria by decarboxylation of ketoacids, which are intermediates of biochemical changes of leucine, isoleucine, valine and threonine<sup>40</sup>. In 1911, Neubauer and Fromherz<sup>41</sup> proposed a modified metabolic scheme that constitutes the Ehrlich pathway as it is still viewed today. They elucidated the conversion of leucine to isoamyl alcohol through intermediaries such as  $\alpha$ -ketoisocaproic acid and isovaleraldehyde. Higher alcohols and their esters, have a significant impact on the flavor of alcoholic beverages in a mixture of these compounds, isoamyl alcohol has the largest share, and the smallest n-propanol<sup>42</sup>.

Ethyl hexanoate (15.4 mg/l), a straight-chain ester, was the second major volatile compound present in the beverage and has been described as a pleasant fruit-like odor compound<sup>5</sup>. The content found for ethyl hexanoate in the jelly palm wine was higher than those found by other authors in different fruit wines like, pineapple<sup>7</sup> (0.006 mg/l), mango<sup>9</sup> (0.13 mg/l), cacao (0.032 mg/l), cupuassu (0.048 mg/l), gabirola (0.073 mg/l), jaboticaba (0.010 mg/l), umbu<sup>8</sup> (0.024 mg/l) and guava<sup>10</sup> (0.273 mg/l). Its superiority in the present work may be attributed to the raw material in accordance to the data reported by Ferrão<sup>3</sup> that described ethyl hexanoate as the major volatile compound present in jelly palm fruits. Ethyl octanoate (0.74 mg/l) was found in higher concentration than found in gabirola wine (0.13 mg/l) and pineapple (0.09 mg/l) wine<sup>7,8</sup>. Hexanoic acid (10.7 mg/l) was the third major volatile compound identified

in the static headspace of jelly palm wine. Its formation in the jelly palm wine may be attributed to the hydrolysis of the main ester, ethyl hexanoate<sup>43</sup>. Although, in the same work cited above, Ferrão<sup>3</sup> also describe hexanoic acid in jelly palm pulp and made a correlation between its formation in the fruit and the  $\beta$ -oxidation of the linoleic acid. In this sense hexanoic acid may be originating from the raw material, as well. As will be showed further, hexanoic acid is also known as caproic acid and has an odor described as fatty, cheesy, waxy, and like that of goats (Merck, 1989). The unpleasant odor of this acid may cause a strong off flavor for the beverage.

#### Minor volatile compounds

The analytical method proposed allowed the identification of 56 compounds in the volatile fraction of jelly palm wine (Table 4). The volatile compounds were predominantly esters (27), followed by alcohols (15), acids (11), lactones (2), aldehyde, ketone and carbonyl compound (1). Aroma-active esters are formed intracellularly by fermenting yeast cells. Since they are lipid soluble, ethyl esters can diffuse through the cellular membrane into the fermenting medium. Although, small quantities of esters may be originate from the raw material<sup>12,44,45</sup> prior to fermentation, the amounts are negligible compared to those introduced enzymatically by the yeast<sup>46</sup>. In jelly palm fruit the most volatile compounds were identified as esters Ferrão<sup>3</sup>. Among the esters identified in the headspace of jelly palm wine by HS-SPME procedure, 6 of them were identified as hexanoate esters; methyl hexanoate (0.140 mg/l), 3-(E)-ethyl-hexenoate, isobutyl hexanoate, butyl hexanoate, isoamyl hexanoate and 3-methylbut-2-enyl hexanoate. Hexanoate esters could be a product of hexanoic acid reaction with different alcohols; in a similar mechanism of ethyl ester formation (in which the alcohol group is ethanol and the acid group is a medium-chain fatty acid). As was showed above, hexanoic acid is the major acid in the wine and was found in a high concentration. However, despite hexanoate esters quantities were expressive, the main ester (highest concentration) identified by HS-SPME in jelly palm wine was an acetate, 3-Buten-1-ol-3-methyl-1-acetate (0.320 mg/l). The same compound was not reported in different genotypes of jelly palm according to Ferrão<sup>3</sup>, however has been reported in the volatile composition of acerola<sup>47,48</sup>. No data was found about the formation of this compound in wine; although acetate ester are generally found in fermented beverage by the reaction between an acid group (acetate) and the alcohol group (ethanol or a complex alcohol derived from amino acid metabolism)<sup>49</sup>. As will be shown further, esters are desirable compounds in wine and are known for a fruity like aroma, typically described for this fruit<sup>3</sup>.

Among the alcohols, the major alcohols found in jelly palm wine were the higher alcohols, as already described above. However, a representative number of alcohols (11) were identified by HS-SPME extraction. Among them, phenylethyl alcohol (0.086 mg/l) and nhexanol (0.032 mg/l) showed the highest concentration. Monoterpene alcohols like, L-linalool (0.006 mg/l), *alpha*-terpineol (0.002 mg/l) and citronellol (0.002 mg/l) were found in this work and also described in mango wine<sup>9</sup> and cupuassu wine<sup>8</sup>. The importance of monoterpenes on varietal flavour of wines was reviewed by Mateo et al.,<sup>50</sup>. The mechanisms to liberate such compounds normally involve acidic and enzymatic hydrolysis of terpene glycosides. Among the acids (11), octanoic acid (0.112 mg/l), acetic acid (0.016 mg/l) and isobutyric acid (0.007 mg/l) were the most representative acid with respect to concentration. Lactones are formed from the corresponding hydroxy acids, according to Fan et al.<sup>51</sup>. As with other esters, lactones exist in equilibrium with their reactant. In jelly palm wine two lactones were identified as  $\gamma$ butyrolactone and  $\gamma$ -caprolactone also found in guava wine<sup>10</sup> and described as important compounds in terms of their contribution to the flavor aroma.

#### Identification of the main odorants compounds by GC-Olfactometry

Odor descriptor for major and minor (Table 4) volatile compounds was conducted with the aid of a GC-O. For identification, retention index was calculated for the odor descriptors and compared to the retention index of the previously identified compounds. Fig. 2a shows the consensus aromagram compared to the GC-FID chromatogram (Fig 2b) of the jelly palm wine obtained by SPME. A total of 34 odoriferous compounds were described by the judges and 25 were identified in the GC-FID chromatogram (Fig 2b). Seven flavor compounds were perceived by the panel, but not detected by FID and were labeled with small letters. Among the 34 compounds, the most frequently were ethyl acetate, isobutyl alcohol, 3-methyl-1-butanol, ethyl hexanoate, butyric acid, hexanoic acid and phenylethyl alcohol. These volatile compounds were described with a frequency detection higher or equal 4; among them ethyl hexanoate and hexanoic acid were the compounds with the higher frequency (8) representing the main contributors to the aroma. Among the acids, butyric acid and hexanoic acid were described as negative notes for the aroma being foot odor, cheese and rancidity, sheepskin, sour, respectively.

The second largest share of compounds with higher contribution to jelly palm wine aroma obtained a frequency detection equal 3. Among them, isoamyl acetate, methyl hexanoate, ethyl (E)-3-hexenoate, butyl hexanoate and ethyl cinnamate were described as flowery and

fruity like aromas, remembering jelly palm fruit in some cases. These compounds are playing an important role to the positively aroma of the wine. Ethyl hydrocinnamate was described as burnt sugar and coffee. Garruti et al.<sup>5</sup> have described the same compound in cashew apple wine as sweet, dried fruit, tea and tobacco. n- Hexanol, isobutyric acid and acetic acid were described as solvent, fermented fruit and vinegar; these volatiles are considered typical aromas of fermented beverage.

The volatile compounds that obtained frequency of odor detection above 2 were considered the less important compounds to jelly palm wine aroma. Among them are valeraldehyde, 3-buten-1-ol-1-acetate, ethyl octanoate, *cis*-3-hexen-1-ol, *alpha*-terpineol, citronellol and octanoic acid.

## Conclusions

This work reports for the first time the volatiles profile of jelly palm wine and also describes the most characteristic flavor in the beverage. The headspace procedures for major (GC-HS) and minor (SPME) volatile compounds were considered satisfactory. The principal volatile compounds identified in this work and that were responsible for the characteristic aroma of jelly palm wine are ethyl hexanoate and hexanoic acid. Sensory and instrumental data correlation significantly improved the knowledge of the role of several volatile compounds in the jelly palm wine, but further investigations are highly recommended, mainly to study the formation of the hexanoic acid that attributed a negative odor impact to the beverage.

## References

1. FARIA, J. V. et al. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). **Rev. Bras. Frutic.** v.30, n.3, p.827-829, 2008.
2. SGANZERLA, M.S. Caracterização físico-química e capacidade antioxidante do butiá. 2010. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas.
3. FERRÃO, T.S. Compostos voláteis e parâmetros de qualidade de diferentes genótipos de frutos de *Butia odorata*. 2012.92p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria.
4. SOUFLEROS, E. H.; PISSA, P.; PETRIDIS, D.; LYGERAKIS, M.; MERMELAS, K.; BOUKOUVALAS, G. Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine, sensory evaluation and optimization of its composition. **Food Chem.** v. 75, n.4, p.487500, 2001.



5. GARRUTI, D. S.; FRANCO, M. R. B.; Da SILVA, M. A. A. P.; JANZANTTI, N. S.; & ALVES, G. L. Assessment of aroma impact compounds in a cashew apple-based alcoholic beverage by GC-MS and GC-olfactometry. **LWT-Food Sci Technol.** v.83, p.1455-1462, 2006.
6. NETO, A.B.T.; da SILVA, M.E.; SILVA, W.B.; SWARNAKAR, R.; da SILVA, F.L.H. Cinética e caracterização físico química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.) **Quim. Nova.** v.29, n.3, p. 489-492, 2006.
7. PINO, J. A.; QUERIS, O. Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solidphase microextraction techniques. **Food Chem.** v.122, n.4, p.1241-1246, 2010.
8. DUARTE, R. F.; DIAS, R. D.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; ALMEIDA, J. B.; SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines made from: cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba e umbu. **Food Sci Tec.**v.43, p.1564-1572, 2010.
9. PINO, J.A.; QUERIS, O. Analysis of volatile compounds of mango wine. *Food Chem.* v.125, p.1141-1146, 2011.
10. PINO, J. A.; QUERIS, O. Characterization of Odor-Active Compounds in Guava Wine. *J. Agric. Food Chem.* v.59, p.4885–4890, 2011.
11. OUGH, C. S.; AMERINE, M. A. *Methods for analyses of musts and wines* (2nd ed.). New York: 1988 John Wiley and Sons.
12. BERGER, R. G. *Flavor and Fragrances. Chemistry bioprocessing and sustainability.* Springer Berlin 2007 Heidelberg New York.
13. CASTRO, M. N. R.; GARCÍA, M. V. & GARCÍA, C. Optimization of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine. **J. Chromatogr. A**, v.995, p.11–20, 2003.
14. ETTRE, L. S. The beginning of headspace. **LCGC North America.** v.20, n.12, p, 1120–1129, 2002
15. KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **J. Chromatogr. A.** v.880, n. (1-2), p.35–62, 2000.
16. Sánchez-Palomo, E. M.; Díaz-Maroto, C. ; Soledad Pérez-Coello, M. Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC-MS. (2005) **Talanta.** v.66 n.5, p.1152–1157, 2005.
17. RIU-AUMATEL, M., VARGAS, L., VICHÍ JOSEP, S et al. Characterisation of volatile composition of white salsify (*Tragopogon porrifolius* L.) by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation–extraction (SDE) coupled to GC–MS. **Food Chem.** v.129, n.2,p.557-564, 2011.

18. ESCUDERO, A.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: A gas chromatography-olfactometric study. **Eur. Food Res. Techno.**2000.
19. CULLERE, L.; ESCUDERO, A.; CACHO, J.; & FERREIRA, V. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. **J. Agric. Food Chem.**v.52, p.1653–1660, 2004.
20. WARDENCKI, W.; PLUTOWSKA, B. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. **Food Chem.** v.107, n.1, p.449–463, 2008.
21. van RUTH, S. M.; O'CONNOR, C.H. Evaluation of three gas-chromatographyolfactometry methods: Comparison of odor intensity-concentration relationships of eight volatile compounds with sensory headspace data. **Food Chem.** v.74, p.341-347, 2001.
22. van RUTH, S. M. Methods for gas chromatography-olfactometry: A review. **Biomolecular Engineering.** v.17, p.121–128, 2001.
23. DAUDT, C. E.; DURANTE, E. Adição de bentonite durante a vinificação de uvas brancas. 1 - Efeito sobre leveduras, clarificação, fermentação e sedimentos formados. **Ciênc. Tecno. Alime.** v.6, n.1,p.42-56, 1986.
24. AOAC (1997). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists (16th ed.). Arlington, VA: AOAC International
25. UBEDA, C.; CALLEJÓN, R.M.; HIDALGO, C.; TORIJA, M.J.; MASS, A.; TRONCOSO, A.M.; MORALES, M.L. Determination of major volatile compounds during the production of fruit vinegars by static headspace gas chromatography-mass spectrometry method. **Food Res Int.**v.44, p.259-268, 2011.
26. GARRUTI, D. S.; FRANCO, M. R. B.; DA SILVA, M. A. A. P.; JANZANTTI, N. S.; & ALVES, G. L. Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale*L) juice by the Osme gas chromatography/olfactometry technique. **J. Sci. Food Agric.**v.83, n.14, p.1455–1462, 2003.
27. JACKSON, R. Wine Science: Principles, Practice, Perception. San Diego: Academic Press. pp. 99–100. 2000
28. ORTEGA, C.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. (2001). **J Chromatogr A.** v.923, p.205-214, 2011.
29. TAT, L.; COMUZZO, P.; STOLFO, I.; BATTISTUTTA, F. Optimization of wine headspace analysis by solid-phase microextraction capillary gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. **Food Chem.** v.93, p.361-369, 2005.

30. HO, C. W.; AIDA, W.M.; MASKAT, M. Y.; OSMAN, H. Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compound in palm sugar (*Arenga pinnata*). **J. Food Compos. Anal.** v.19, p.822-830, 2006.
31. MANI, V.; in: J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 57, 1999.





























































































