

*Duplicado 53886*

*ANA MARIA FERREIRA DA SILVA COSTA FREITAS PESTANA DE VASCONCELOS*

*3.<sup>o</sup>*

**PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIVRES COMO PARÂMETRO ENO-  
LÓGICO PARA CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS ELEMENTARES  
ALENTEJANOS EM FUNÇÃO DA CASTA DE ORIGEM**



*170 121*

Dissertação apresentada à Universidade de Évora  
para obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Agrárias ( Biotecnologia Alimentar ).

ÉVORA

1988

À Mariana  
Ao Diogo  
Ao Tiago

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Higuinaldo Chaves das Neves desejo expressar o meu mais sincero agradecimento, não só por me ter aceite para trabalhar no seu grupo, tendo posto à minha disposição todo o equipamento do seu laboratório, sem quaisquer restrições, como também pela orientação estímulo e incentivo constantes durante todas as fases do trabalho, bem como a completa disponibilidade que sempre revelou sem o que este trabalho nunca teria sido realizado.

Ao Professor Doutor José Filipe Santos Oliveira pela forma interessada com que me recebeu no meu primeiro contacto na Universidade Nova e pelo empenho e encorajamento que sempre demonstrou durante todo o tempo em que decorreu o trabalho, bem como a disponibilidade que sempre demonstrou.

A Universidade de Évora e especialmente ao Orientador do Departamento de Fitotecnia por me ter possibilitado a estadia na Universidade Nova de Lisboa durante o tempo necessário para elaboração da presente dissertação e ao responsável pela adegas da Mitra pela cedência dos vinhos elementares utilizados neste trabalho.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, principalmente ao Responsável pelo Departamento de Química por ter permitido a minha permanência no departamento durante a realização da presente dissertação.

A Junta Nacional de Investigação Científica pela atribuição de duas Bolsas de especialização Técnica - BET 64 e BET 107 - cujo aproveitamento foi determinante para a obtenção de muitos dos conhecimentos adquiridos.

A Doutora Maria Lúcia do Laboratório Central da JNV pela cedência das estirpes de leveduras utilizadas e ao Dr. José Barroso da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pelas inoculações realizadas.

Aos Eng<sup>os</sup> António Arnaud e José Alegria do Departamento de Informática da Universidade Nova de Lisboa pela cedência do programa Statgraphics.

A todos os colegas e restante pessoal do Grupo de Química

Orgânica Fundamental da Universidade Nova de Lisboa, bem como os colegas e restante pessoal do departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora e os colegas do Departamento de Zootecnia da mesma Universidade por todo o empenho e amizade demonstrados.

Ao Eng<sup>o</sup> Carlos Silva Carvalho e aos funcionários do serviço de reprografia da Universidade de Évora, pela boa vontade e esforço com que se empenharam na execução reprográfica deste trabalho.

## RESUMO

A presente dissertação consiste essencialmente de uma caracterização de vinhos elementares alentejanos, em função da casta de origem, através da análise das concentrações relativas dos seus aminoácidos livres. É conhecido que os aminoácidos são importantes na caracterização de alimentos e no caso de vinhos eles têm influência manifesta, desde o início do desenvolvimento da uva, durante a fase de maturação até à vindima e, posteriormente, durante a fermentação e o envelhecimento. A maioria dos trabalhos, no entanto, não aprecia a influência dos aminoácidos de uma forma interligada pelo que neste trabalho é apresentada uma breve revisão a qual pretende, sem ser exaustiva, apresentar a problemática envolvida na influência dos aminoácidos para as características finais do vinho. Para a análise propriamente dita, foi escolhida a cromatografia gás-líquido de alta resolução tendo-se para tal trabalhado com os derivados isopropílicos N-heptafluorbutíricos dos aminoácidos. A análise de aminoácidos, por serem compostos de interesse inegável, em inúmeros campos da ciência, tem sido objecto de estudos detalhados, pelo que é, igualmente feita uma breve revisão dos métodos de análise, não só os mais antigos como, também, os mais recentes nomeadamente os métodos de HPLC. A escolha da cromatografia gás-líquido é justificada.

A parte inicial do trabalho de investigação diz respeito ao estabelecimento do método de trabalho por GC. Foram ensaiados dois tipos de derivados. Um dos tipos derivados ensaiados foi desenvolvido durante este trabalho e por isso, é desenvolvido todo o esquema metodológico de afinamento das condições de derivatização, e de estabelecimento das características dos derivados no que diz respeito a estabilidade, linearidade para o FID e factores de resposta. É pois descrito um estudo de condições de troca-iónica, condições de derivatização e condições mais favoráveis de cromatografia de gás. No que diz respeito à identificação de desconhecidos, problema de grande importância em GC, é feita uma identificação de todos os aminoácidos encontrados nos vinhos, por espectrometria de massa dos seus derivados isopropí-

licos N-heptafluorbutíricos, com consequente descrição dos aspectos principais da identificação dos espectros e sua importância no controlo do processo de derivatização;

Dada a importância dos aminoácidos, como factores de crescimento para leveduras e outros microorganismos, realizou-se um ensaio com algumas estirpes de leveduras, isoladas da mesma vinha de onde provêm os vinhos estudados, tendo-se feito a fermentação em meios não contendo aminoácidos. Procurou-se assim saber qual a importância do metabolismo da levedura nos quantitativos finais de aminoácidos no vinho já que é conhecido que esses quantitativos variam, grandemente durante a fermentação. Este estudo serviu não só para corroborar a opinião de que as leveduras produzem aminoácidos, como ainda permitiu concluir que elas os produzem diferentemente, consoante o meio ou substracto que têm à sua disposição. Além deste aspecto foi possível abrir uma pista para identificação de leveduras quimiotaxonomicamente, pelos quantitativos de aminoácidos excretados para o meio, já que as cinco estirpes estudadas foram classificadas de acordo com esses quantitativos. Os quantitativos de aminoácidos a que nos referimos dizem sempre respeito aos aminoácidos livres, já que se conduziu, igualmente um ensaio no sentido de se verificar quais seriam os quantitativos mais favoráveis para a caracterização dos vinhos e se concluiu que, no caso de se ter de recorrer à hidrólise ácida para assim estudar os aminoácidos totais, o processo de hidrólise iria provocar erros não susceptíveis de serem superados já que os vários aminoácidos possuem estabilidades hidrolíticas diversas.

A caracterização enológica propriamente dita foi realizada a partir das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos elementares estudados, tendo-se recolhido amostras durante as vindimas de 1977 a 1983. A escolha de vinhos elementares, implica que, para os vários vinhos no mesmo ano, apenas varia a casta, e para os vários vinhos em anos diferentes apenas varia o clima. Para a análise final dos resultados foram aplicadas técnicas estatísticas de análise de perfil, se bem que os resultados obtidos tenham igualmente sido sujeitos a análises menos sofisticadas, se bem que inconclusivas, no sentido de verificar qual o perfil característico. As técnicas de análise de perfil utiliza-

das foram, essencialmente, a árvore de expansão mínima, a análise de componente principal, a análise de agrupamento e a análise discriminante. Os resultados foram tratados quer casta a casta, quer o conjunto das castas brancas e tintas quer o conjunto definido por todos os vinhos quer brancos quer tintos.





## INDICE

### 1ª Parte

1 - INTRODUÇÃO	3
1.1 - Portugal e a Política Vínicola	8
2 - HIPÓTESE DE TRABALHO	13
2.1 - Desenvolvimento	13
2.2 - Metodologia	15
2.2.1 - Compilação dos Objectos de Estudo	15
2.2.2 - Escolha do Método e Obtenção dos Resultados	16
2.2.3 - Análise dos Dados	19
3 - ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS EM MISTURAS COMPLEXAS	21
3.1 - Métodos de Análise de Aminoácidos Totais	21
3.1.1 - Métodos Titulimétricos	21
3.1.2 - Métodos Gasométricos	23
3.1.3 - Métodos Colorimétricos	24
3.2 - Métodos de Separação de Aminoácidos	25
3.2.1 - Cromatografia em Coluna	28
3.2.1.1 - Cromatografia de Partilha e de Adsorção	28
3.2.1.2 - Cromatografia de Troca-Iónica	28
3.2.2 - Cromatografia de Papel	30
3.2.2.1 - Cromatografia de Papel Convencional	30
3.2.2.1.1 - O Sistema de Solventes	31
3.2.2.1.2 - O Papel	32
3.2.2.1.3 - A Amostra	33
3.2.2.1.4 - Técnica Bidimensional	33
3.2.2.1.5 - Sistemas de Detecção e Quantificação	34
3.2.2.2 - Cromatografia de Papel de Troca-Iónica	34
3.2.2.2.1 - Cromatografia Bidimensional	36
3.2.2.2.2 - Cuidados no Tratamento do Papel	36
3.2.3 - Cromatografia em Camada Delgada	36
3.2.3.1 - Problemas Específicos da Análise de Aminoácidos por CCD	38
3.2.4 - Métodos de Alta Resolução	38
3.2.4.1 - Cromatografia Gás-Líquido	40
3.2.4.1.1 - Derivatização de Aminoácidos	41
3.2.4.1.1.1 - Derivatização por Modificação do Esqueleto Carbonado	42

3.2.4.1.1.1.1 - Descarboxilação e Desaminação para Aldeídos ou Nitrilos com Menos um Átomo de Carbono	42
3.2.4.1.1.1.2 - Descarboxilação a Aminas com menos um Átomo de Carbono	44
3.2.4.1.1.1.3 - Decomposição por Pirólise e Análise de Diketopiperazinas	44
3.2.4.1.1.1.4 - Conversão em $\alpha$ -Hidroxiácidos (metilados)	45
3.2.4.1.1.1.5 - Conversão em $\alpha$ -Cloroácidos (metilados)	45
3.2.4.1.1.2 - Derivatização por Bloqueamento de Grupos Funcionais	46
3.2.4.1.1.2.1 - Bloqueamento do Grupo Carboxilo	46
3.2.4.1.1.2.2 - Bloqueamento dos Grupos Amina e Ácido Carboxílico em Reacções Separadas	47
3.2.4.1.1.2.3 - Bloqueamento dos Grupos Funcionais num só Passo de Derivatização	54
3.2.4.1.2 - O Tratamento da Amostra	56
3.2.4.1.3 - A Escolha do Padrão Interno	57
3.2.4.1.4 - A Detecção	58
3.2.4.1.4.1 - O Detector de Ionização de Chama - FID	58
3.2.4.1.4.2 - O Detector Termo-Iónico - NPD	59
3.2.4.1.4.3 - O Detector de Captura de Electrões - ECD	61
3.2.4.2 - Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução (capilar)	62
3.2.4.2.1 - O Sistema de Injecção	63
3.2.4.2.2 - A Separação Cromatográfica	67
3.2.4.3 - Técnicas-Hifenadas: acoplamento de cromatografia gás-líquido de alta resolução ao espectrómetro de massa - GCMS	68
3.2.4.3.1 - Princípios Gerais	69
3.2.4.3.2 - Interfaces	70
3.2.4.3.3 - Técnicas	72
3.2.4.3.3.1 - Ionização por Impacto de Electrão - EI	72
3.2.4.3.3.2 - Ionização Química - CI	74
3.2.4.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência HPLC	76
3.2.4.4.1 - Princípios	76
3.2.4.4.2 - Derivatização	77

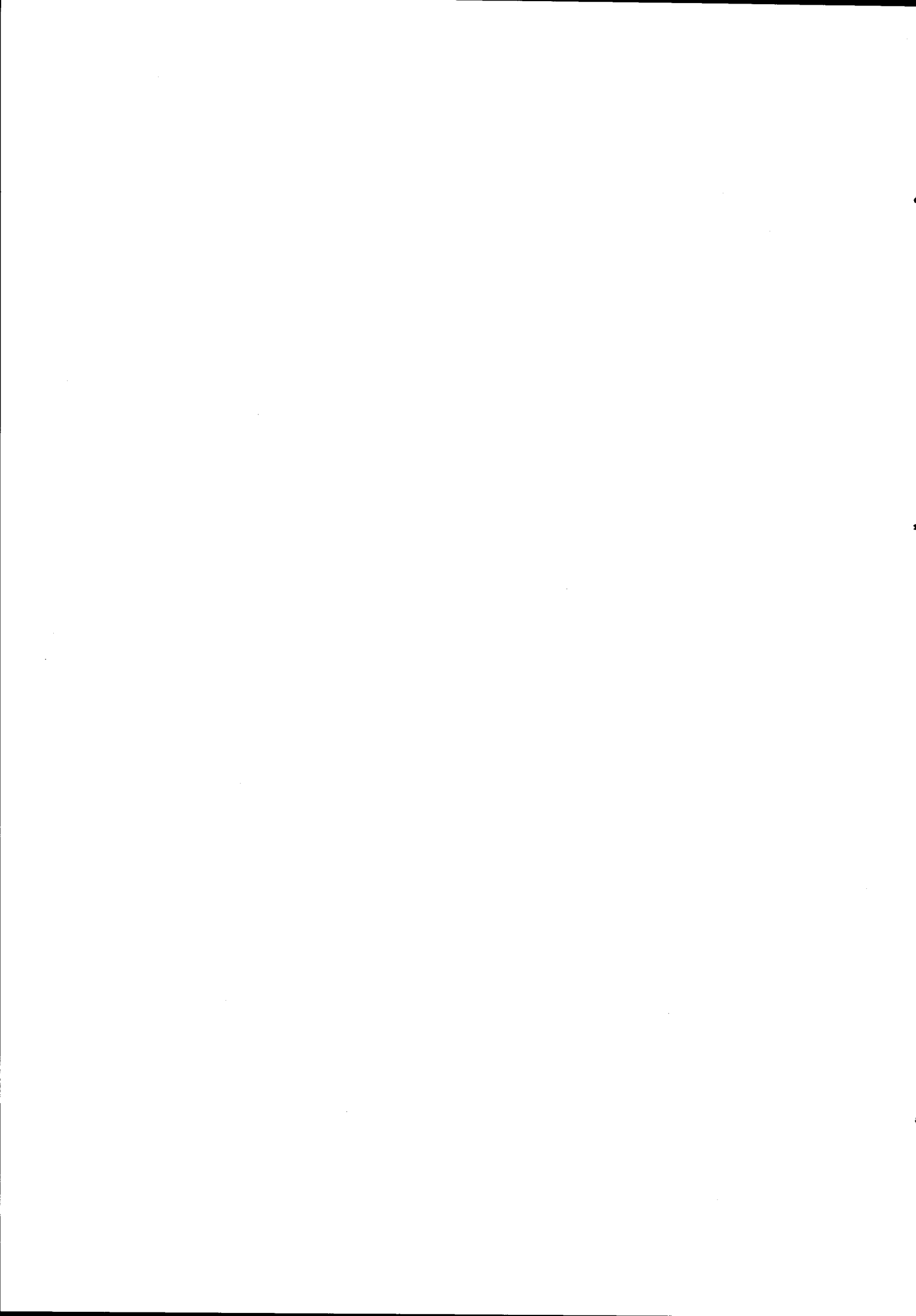
3.2.4.4.2.1 - Derivatização Pré-Coluna	77
3.2.4.4.2.2 - Derivatização Pós-Coluna	77
4 - OS AMINOÁCIDOS EM ENOLOGIA	79
4.1 - Influência do Solo e das Condições Ambientais no Nível de Aminoácidos do Solo	80
4.2 - Evolução dos Aminoácidos ao Longo da Fermentação Alcoólica: influência das condições ambientais e da levedura	85
4.3 - Os Aminoácidos como Elementos de Caracterização Organoléptica	89
4.4 - A Prolina nos Vinhos	97
4.5 - Os Aminoácidos nos Vinhos Portugueses	100
5 - CARACTERIZAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DOS VINHOS ELEMENTARES PELA ANÁLISE DOS PERFIS DOS AMINOÁCIDOS LIVRES. RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
5.1 - Análise de Aminoácidos. Estabelecimento do Método de Análise por CGL	103
5.1.1 - Cromatografia de Troca-Iônica	103
5.1.1.2 - Estabelecimento das Condições de isolamento	104
5.1.1.3 - Estudo de Recuperação dos Aminoácidos	106
5.1.2 - Derivatização	107
5.1.2.1 - Acilação. Obtenção dos Derivados N-Heptafluorbutíricos dos Ésteres Isopropílicos	108
5.1.2.2 - Esterificação. Obtenção dos Ésteres Isopropílicos	110
5.1.2.3 - Estabilidade dos Derivados	110
5.1.2.4 - Análise Qualitativa	112
5.1.2.5 - Identificação dos Ésteres Isopropílicos de N-Heptafluorbutiril Aminoácidos por GCMS	114
5.1.2.6 - Análise Quantitativa	132
5.1.2.6.1 - Optimização das Condições de Cromatografia	133
5.1.2.7 - Um Novo Método para o "Screening" de Aminoácidos Proteicos e Não Proteicos por Cromatografia Gás-Líquido: ésteres N-etoxicarbonil isopropílicos e N-etoxicarbonil-O(S)-trimetil sililisopropílicos	141

5.1.2.7.1 - Ésteres Isopropílicos de N-Etoxicarbonil-aminoácidos. Optimização da Acilação com Cloroformiato de Etilo	141
5.1.2.7.2 - Estabilidade dos derivados N-Etoxicarbonílicos dos Ésteres Isopropílicos de Aminoácidos	145
5.1.2.7.3 - Análise Qualitativa de Aminoácidos sob a forma de derivados Isopropílicos N-Etoxicarbonílicos	146
5.1.2.7.4 - Análise Quantitativa	147
5.1.2.7.4.1 - Linearidade de Resposta do FID	144
5.1.2.7.4.2 - Reproducibilidade e Aplicação a Amostras Reais	148
5.1.2.7.5 - Cromatografia	150
5.2 - Escolha dos Derivados	154
5.3 - Análise de Aminoácidos Livres de Vinhos Elementares	155
5.3.1 - Descrição dos Objectos de Estudo	155
5.3.2 - Castas Vínícolas Alentejanas. Caracterização Enológica e Morfológica	157
5.3.2.1 - Castas Tintas	157
5.3.2.1.1 - Moreto	157
5.3.2.1.2 - Trincadeira	158
5.3.2.1.3 - Periquita	158
5.3.2.1.4 - Aragonez	159
5.3.2.2 - Castas Brancas	159
5.3.2.2.1 - Roupeiro	159
5.3.2.2.2 - Manteúdo	159
5.3.2.2.3 - Tamarez	160
5.3.2.2.4 - Rabo de Ovelha	160
5.3.3 - Obtenção dos Vinhos Elementares	160
5.3.3.1 - Vindima	160
5.3.3.2 - Vinificação	161
5.3.4 - Caracterização	161
5.3.5 - Recolha das Amostras	162
6- ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS EM VINHOS	163
6.1 - Origem Microbiana dos AA nos Vinhos: caracteri-	

zação de algumas leveduras seleccionadas pelo perfil de aminoácidos exudados em meios deficientes em azoto orgânico	163
6.1.2 - Resultados	165
6.1.3 - Classificação das Leveduras	167
6.2 - Aminoácidos Livres <i>vs.</i> Aminoácidos de Origem Peptídica	168
6.3 - Resultados e Discussão da Análise de Aminoácidos em Vinhos Elementares por Cromatografia Gás-Líquido	175
6.3.1 - Vinhos Tintos	175
6.3.2 - Vinhos Brancos	182
6.3.3 - Análise Comparativa entre Vinhos Brancos e Vinhos Tintos	187
7 - MÉTODOS DE ANÁLISE DE PERFIL	191
7.1 - Exame Preliminar dos Dados	193
7.1.1 - Apresentação dos Dados na Forma de serem lidos pelo Computador	193
7.1.2 - Distribuição das Variáveis	194
7.1.3 - Técnicas Supervisionadas	195
7.1.4 - Técnicas Não Supervisionadas	195
7.1.4.1 - Análise de Agrupamento	196
7.1.4.1.1 - Árvores de Expansão Mínima	196
7.1.4.1.2 - Agrupamento Hierárquico	197
7.2 - Resultados e Discussão	199
7.2.1 - Recolha dos Dados	199
7.2.2 - Avaliação do Tipo de População	199
7.2.3 - Normalização dos Dados	200
7.2.4 - Análise de Componente Principal	201
7.2.4.1 - Análise dos Vinhos Brancos	202
7.2.4.1.1 - Aplicação da Análise de Componente Principal aos Resultados das Concentrações Relativas dos Aminoácidos Livres dos Vinhos Brancos durante os Anos de Estudo	202
7.2.4.1.2 - Aplicação do Método de Análise Discriminante aos Resultados dos Aminoácidos Livres dos Vinhos Brancos estudados	217

7.2.4.2 - Análise de Vinhos Tintos	225
7.2.4.2.1 - Aplicação da Análise de Componente Principal aos Resultados das Concentrações Relativas dos Aminoácidos Livres dos Vinhos Tintos durante os Anos de Estudo	225
7.2.4.2.2 - Aplicação do Método de Análise Discriminante aos Resultados dos Aminoácidos Livres dos Vinhos Tintos estudados	234
7.2.4.3 - Aplicação dos Métodos de Análise de Perfil aos Resultados das Concentrações Relativas dos Aminoácidos Livres do Conjunto dos Vinhos Brancos e Tintos	244
7.2.4.3.1 - Aplicação da Análise de Componente Principal	244
7.2.4.3.2 - Aplicação do Método de Análise Discriminante	251
7.2.4.4 - Aplicação do Método de Componente Principal como Técnica Supervisionada aos Resultados das Concentrações Relativas dos Aminoácidos Livres dos Vinhos Tintos e Brancos separadamente	256
7.2.4.5 - Aplicação do Método da Árvore de Expansão Mínima aos Vinhos Brancos e Tintos individualmente	264
7.2.4.6 - Aplicação da Análise por Agrupamento Hierárquico	268
7.2.4.7 - Reconhecimento do Perfil por Inspeção Visual de "Projecções em Estrela"	270
8 - CONCLUSÃO	271
<b>2ª Parte</b>	
1- MATERIAIS E MÉTODOS	279
1.1 - Reagentes	279
1.2 - Instrumentos	279
1.3 - Preparação dos Padrões para Cromatografia	280
1.3.1 - Cromatografia de Troca-Iônica	280
1.3.2 - Cromatografia em Camada Fina	281
2 - DERIVATIZAÇÃO	281
2.1 - Esterificação	281
2.2 - Acilação	282
2.2.1 - Obtenção dos Derivados N-Etoxicarbonilados	282

2.2.1.1 - Estudos de Acilação	282
2.2.1.2 - Sililação	282
2.2.1.3 - Cálculo dos Factores de Resposta	283
2.2.2 - Obtenção dos Derivados N-Heptafluorbutíricos	283
2.2.2.1 - Etoxicarbonilação do Azoto Imidazólico da Histidina	283
2.3 - Degradação dos Aminoácidos Livres nas Condições de Hidrólise	283
2.4 - Ensaio com Leveduras Seleccionadas	284
2.4.1 - Meio de Cultura e Incubação	284
2.6 - Análise de Vinhos	284
2.6.1- Hidrólise de Peptidos nos Vinhos	284
2.6.2 - Preparação das Amostras de Vinhos	280
3 - ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA - Materiais e Métodos	285
BIBLIOGRAFIA	287
ANEXO I	



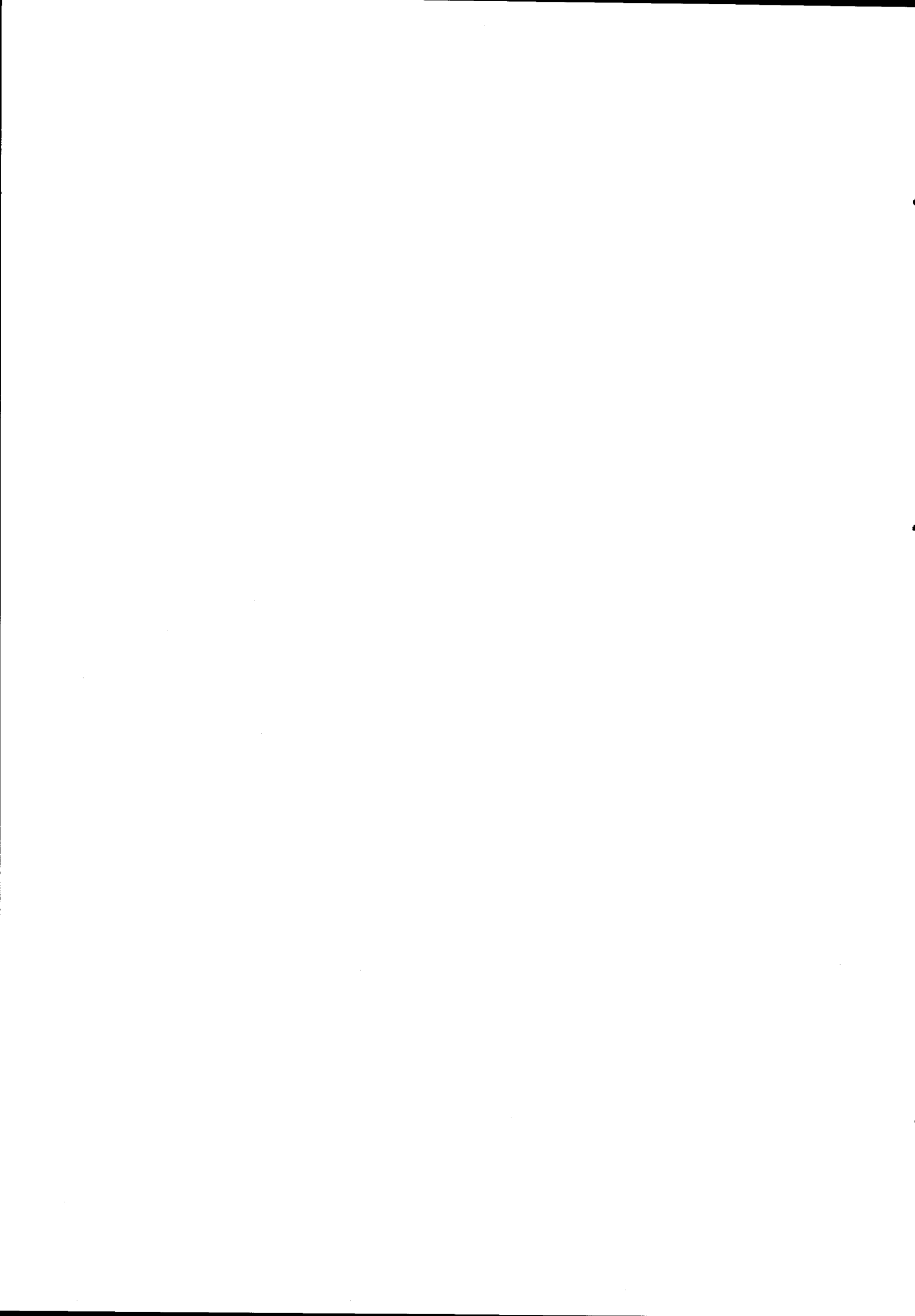


## Lista de Abreviaturas

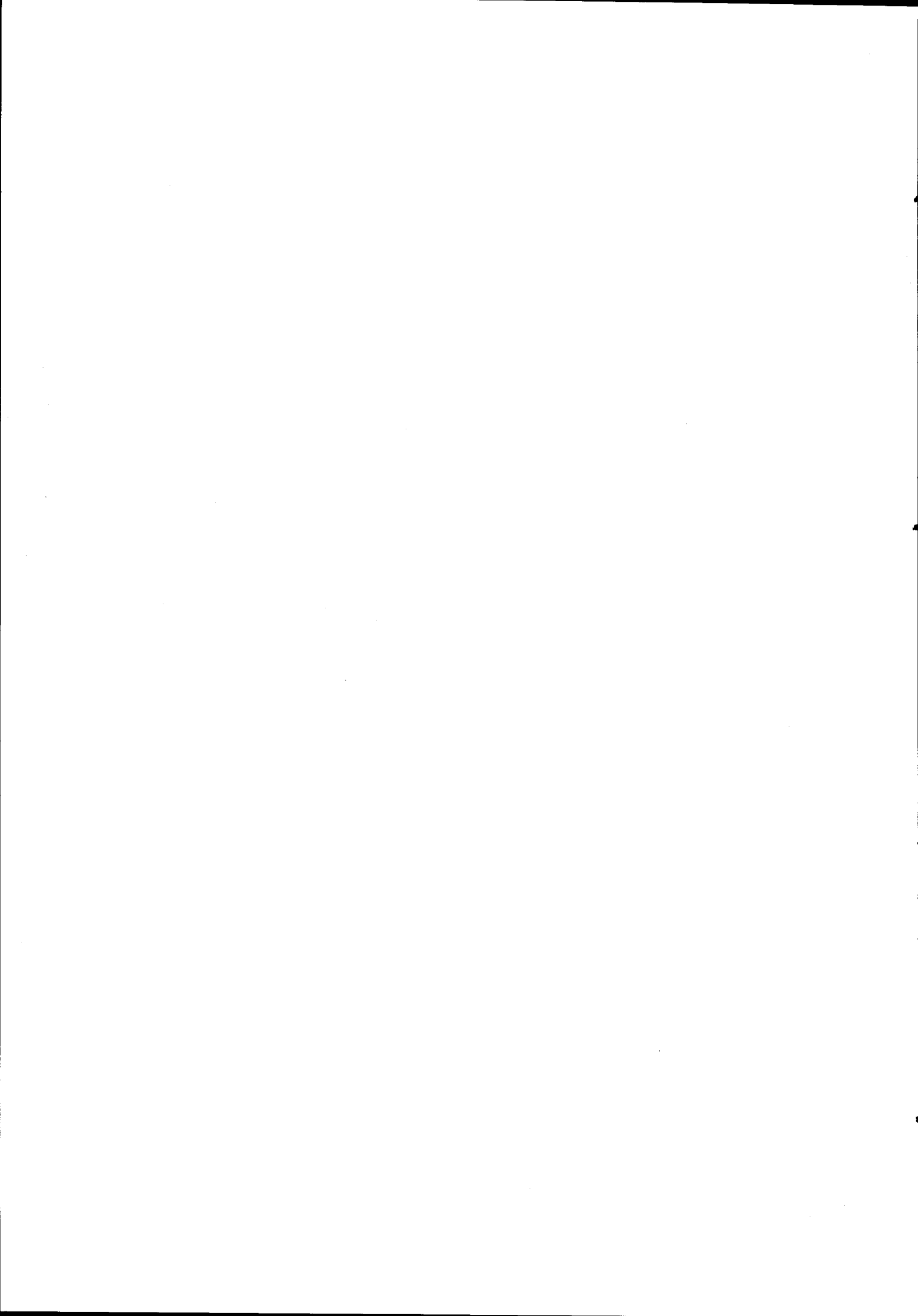
- VQPRD - Vinhos de Qualidade Produzidos em Região Demarcada  
CEE - Comunidade Económica Europeia  
FVD - Federação dos Vinicultores do Dão  
WCOT - Coluna de Tubo Aberto de Parede Revestida  
CCD - Cromatografia em Camada Delgada  
PC - Cromatografia de Papel  
HPTLC - Cromatografia em Camada Fina de "alta eficiência"  
HRC - Cromatografia de Alta Resolução  
CGL - Cromatografia Gás-Líquido  
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão  
PPG - Polipropileno glicol  
PEG - Polietileno Glicol  
BSA - N,O-bis(trimetilsililacetamida)  
DKP - Diketopiperazina  
TMS - Trimetilsilil ou trimetilsilmilo  
HMDS - Hexametidisilazano  
TFA - Trifluoracetilo  
TFAA- Anidrido Trifluoracético  
PFP - Pentafluorpropionilo  
PFPA- Anidrido Pentafluorpropiónico  
HFB - Heptafluobutirilo  
HFBA - Anidrido Heptafluorpropiónico  
ECD - Detector de Captura de Electrões  
DNP - Dinitrofenilmetilo  
NPD - Detector Termoiónico  
AA - Aminoácido  
TMCS - Trimetilclorosilano  
TMSDEA - Trimetilsilildietilamina  
TMSDMA - Trimetilsilildimetilamina  
MSA - N-metil-N-trimetilsililacetamida  
BSTFA - N,O-bis(trimetilsililtrifluoracetamida)  
MSTFA - N-metil-bis(trimetilsililtrifluoracetamida)  
MTBSTFA - N-(*tert*butildimetilsilil)-N-metil-trifluoracetamida  
GCMS- Cromatografia de Gás associada à Espectrometria de Massa

FID - Detector de Ionização de Chama  
CI - Ionização Química  
EI - Ionização por Impacto de Electrão  
FI - Fonte Iónica  
SIM - Detecção de Ião Simples ("Single Ion Monitoring")  
LC - Cromatografia Líquida  
UV-VIS - Ultra Violeta Vísivel  
Dns - Cloreto de Dansilo  
PTC - Fenilisotiocianato  
OPA - Aldeído *orto*-Ftálico  
FMOG - Cloroformato de 9-fluorenilmetilo  
PTH - Feniltiohidantoinas  
Var. - Variedade  
FML - Fermentação Maloláctica  
p.e. - Por Exemplo  
p.i. - Pressão Interna  
PI - Padrão Interno  
SD% - Desvio Padrão Relativo  
SCOT - Coluna de Tubo Aberto de Superfície Revestida  
At - Atenuação  
N-Etoc - N-etoxicarbonilo  
N-HFB - N-heptafluorbutirilo  
S/A - Açúcar/Acidez  
Qtd - Quantidade  
FR - Factor de Resposta  
eV - electrões/volt  
m/z - Relação massa/carga  
u.m. - Unidades de Massa  
d.i. - Diâmetro Interno  
Resp. Rel. - Resposta Relativa  
ni - Não Identificado  
DGA - Direcção Geral de Agricultura  
CC - Concentração  
iso - Isotérmico  
P - Vinho Periquita  
Tr - Vinho Trincadeira  
Mo - Vinho Moreto

A - Vinho Aragonez  
R - Vinho Roupeiro  
O - Vinho Rabo de Ovelha  
T - Vinho Tamarez  
M - Vinho Manteúdo  
X- Hidroxiprolina  
J -  $\gamma$  - aminobutírico  
S - sarcosina  
U -  $\alpha$ -aminobutírico  
O - Ornitina  
gts - Gotas  
CP - Componente Principal  
EM - Árvore de Expansão Mínima



**la Parte**



## 1- INTRODUÇÃO

A produção anual de vinho, em Portugal, alcançava nos últimos anos valores que, em regra, oscilavam entre os 8000 e 10 000 milhares de hl<sup>1</sup> números esses que, contudo, foram largamente excedidos em alguns anos; dessa produção anual, uma boa parte, cerca de 1500 a 2000 milhares de hl, foram exportados, recebendo os países da CEE cerca de metade dessa exportação.

A área cultivada que tem determinado aqueles volumes de exportação, é de cerca de 350 000 milhões de hectares, da qual só uma pequena parte, cerca de 15%, produz Vinhos de Qualidade Produzidos em Regiões Demarcadas (VQPRD). Dessas regiões demarcadas, as que têm produção de vinhos maduros ocupam ainda uma pequena área, o que quer dizer que a área de cultivo de vinha para vinho, não integrada em regiões demarcadas, é bastante maior que a área ocupada pelas regiões demarcadas.

Dos números referidos podem extrair-se algumas conclusões:

- Portugal é um importante produtor e exportador de vinho (na realidade é o 8º produtor mundial).
- Dos seus mercados de exportação a CEE ocupa lugar de relevo, recebendo cerca de metade dos quantitativos de exportação.
- A área correspondente a regiões demarcadas de vinhos maduros corresponde, apenas, a uma pequena parte da área plantada de vinha.

Por outro lado, os restantes países da CEE (excluindo a Espanha) produzem mais ou menos 152.600 milhares de hl dos quais 31.563 são de vinhos produzidos em regiões demarcadas (VQPRD); o volume de produção referido corresponde, aproximadamente, a 40% da produção mundial.

Do vinho produzido então, pela CEE dos nove, cerca de 83% destinavam-se a consumo interno próprio; 6% aproximadamente, a destilação, ao fabrico de vinagre ou a outros usos industriais; 5% correspondiam ao excedente médio. Como já foi referido a CEE importava também vinhos, designadamente de Portugal.

Dos números apontados parece importante notar que, enquanto a exportação de vinhos da CEE para "países terceiros" tem aumentado (Tabela 1), os volumes importados têm-se mantido (Tabela 2). A CEE debate-se, desde há alguns anos, com um problema de exce-

Tabela 1  
Exportações de vinhos da CEE dos nove para países terceiros  
(Ano de 1980)<sup>1</sup>

País destinatário	Quantidade (hl)	Valor (milhares de ECU)
Estados Unidos	3 141 194	382 927
URSS	1 324 187	12 851
Suiça	1 097 253	154 215
Canadá	722 969	82 216
Suécia	322 141	24 416
Costa do Marfim	321 435	9 475
Áustria	155 878	11 660
RD de Alemanha	148 358	4 835
Camarões	108 153	5 116
Japão	108 153	21 633
Guadalupe	93 444	9 739
Congo	64 174	1 378
Senegal	60 855	1 983
Noruega	57 750	6 660
Martinica	49 374	4 827
Austrália	46 493	12 308
Outros	693 876	107 562

Tabela 2  
Importações de vinho de países terceiros para a CEE dos nove  
(Ano de 1980)<sup>1</sup>

País de Origem	Quantidade (hl)	Valor (milhares de ECU)
Espanha	1 891 603	238 621
Portugal	764 868	135 305
Jugoslávia	510 556	29 131
Áustria	386 276	29 919
Hungria	367 883	23 431
Argélia	212 470	8 485
Tunísia	208 983	7 526
Grécia	177 934	10 250
Roménia	130 775	6 572
Bulgária	124 111	5 253
Chipre	105 761	10 412
Marrocos	73 814	2 827
África do Sul	56 922	7 397
URSS	53 662	10 874
Estados Unidos	30 615	5 519
Argentina	11 662	1 036
Outros	51 275	8 248
Total EUR 9	5 159 170	540 806



dentes de vinhos, o que obrigou a que fossem estabelecidas rígidas regras de produção e mercado no sector. Já em Abril de 1962 a Comunidade tomou importantes medidas neste campo ao aprovar o regulamento 24, o qual prevê:

- a) A criação do cadastro víticola, baseado no recenseamento geral dos vinhedos.
- b) A obrigatoriedade para os produtores, de declarar anualmente a produção de mostos e vinhos e para os produtores e comerciantes - com exclusão dos retalhistas -, os stocks;
- c) A elaboração, todos os anos, de um balanço previsional dos recursos e das necessidades;
- d) A implementação de uma regulamentação relativa aos "Vinhos de Qualidade Produzidos em Regiões Demarcadas" (VQPRD), baseada no respeito pelas tradições e, para cada vinho em particular, sobre os seguintes elementos: zona de produção delimitada, tipo de casta, cultura praticada, métodos de vinificação, graduação alcoométrica mínima natural, rendimento por hectare e características organolépticas;
- e) Criação de um Comité de Gestão encarregado de pôr em prática as medidas previstas, deliberando por maioria qualificada, isto é, por pelo menos 45 votos em 63 (proporção estabelecida pelo tratado de Roma para as deliberações de Conselho de Ministros).

O regulamento 24 foi, a primeira medida de relevo tomada, mas o problema continuou sempre a ser estudado e foram-se aperfeiçoando as soluções para o enfrentar, como o regulamento 816/70 de grande importância no sector vitivinícola.

Com este regulamento, fixaram-se os pontos fundamentais da organização comum do mercado vitivinícola, nomeadamente as seguintes regras:

"- Regras relativas à cultura de vinhedos - As variedades de vinha deviam ser classificadas em "variedades recomendadas", "variedades autorizadas" e "variedades autorizadas temporariamente" por cada unidade administrativa dos Estados Membros. Após uma certa data, os vinhos obtidos a partir de variedades não classificadas deviam ser excluídos da comercialização ou destinados à destilação. A plantação, replantação ou compra de vinhas deviam ser anualmente notificadas à administração competente dos estados

membros.

- Definição de produtos v nicolas - O "vinho de mesa" devia ter uma gradua o alcoólica mínima de 8,5% e uma gradua o alcoólica total não superior a 15%. Em consequência estabeleceu-se o limite de 9% para todo o território da Comunidade, com excep o de certas regiões do Norte da RFA e da França. Outras defini es foram aprovadas para as "vinhas aptas para a produ o de vinhos de mesa", os vinhos espumosos, os licorosos, os mostos, os subprodutos, o vinagre etc.. Estabeleceu-se, igualmente, a categoria de "Vinhos de Qualidade Produzidos em Regiões Demarcadas" (VQPRD) que compreendiam o vinho AOC e VDQS franceses, os vinhos DOC italianos e os "Qualitatsweine" ou "Qualitatsweine mit Pradikat" alemães, bem como os vinhos luxemburgueses com a marca nacional".

- Regras respeitantes   produ o de vinho - Em 19.., o território da Comunidade foi dividido em várias zonas (A, B; CII, CIII), tendo sido prescrita uma gradua o alcoólica natural mínima para cada uma delas, por ordem crescente, a saber, de 5% a 9% de Norte para Sul, permitindo -se um "enriquecimento" máximo de 5% até 2%, por ordem decrescente, de Norte para Sul. O enriquecimento por meio de açucar (sacarose) não era autorizado a não ser em zonas onde já era tradicionalmente prática. Além disso, a regulamentaa o previa uma destila o obrigatória de subprodutos, as "prestaa es v nicas", proporcional a uma percentagem do volume de alcool dos produtos obtidos.

- Regime de preços e das interven es - O regulamento definiu os preços de "orientaa o" e de " interven o", assim como as modalidades relativas ao apuramento semanal de preços do mercado de vinhos de mesa, para permitir a realiza o de interven es específicas destinadas a apoiar os preços correntes. Em caso de crise do mercado, deviam ser concedidos subsídios   "armazenagem particular" de curto prazo (cerca de três meses), ou de longo prazo (9 meses) e, em caso de persistência de excedentes, a destila o de "vinhos de mesa" podia ser subsidiada.

- Trocas comerciais com os países terceiros - Foi decidido nomeadamente introduzir um controlo estatístico de exporta o e

países terceiros não só eram sujeitos a direitos aduaneiros comunitários, como ainda deviam respeitar um "preço de referência" determinado. Instituiu-se, assim, um auxílio à exportação sob a forma de "restituição".

- Controlos - Para além da obrigação de declarar a colheita e os stocks, já introduzidos em 1962, a regulamentação previa um "documento acompanhante" obrigatório para os vinhos, preceitos comuns em matéria de rotulagem, instituição de práticas enológicas e métodos de análise comuns.

- Livre circulação - A introdução de regras comunitárias no mercado vitivínicola teve como consequência lógica o reconhecimento e a inteira liberdade de circulação dos vinhos da Comunidade, sendo proibida a aplicação de restrições qualitativas, de encargos ou medidas equivalentes às trocas comerciais, entre os Estados Membros."

Apesar de todos estes cuidados e regulamentações, manteve-se o risco de estalar a chamada "guerra do vinho" no seio da Comunidade, o que realmente veio a acontecer face ao excedente de vinho lançado no mercado, em consequência das vindimas de 1970 que lançaram no mercado quantidades de vinho superiores às habituais. O problema estabilizou já que então foi possível manter os níveis dos preços por terem as vindimas de 1971 sido normais e as de 1972 muito pequenas. O equilíbrio ruiu completamente em 1973, com a produção, nesse ano, de um excedente de 25 milhões de hl. Apesar das destilações e intervenções previstas, a comunidade viu-se obrigada a repensar toda a organização, revendo inteiramente todos os critérios estabelecidos em 1970, impedindo a plantação de novos vinhedos, excepto para os vinhos de região demarcada, além de diversas outras medidas.

Com o conjunto de medidas tomadas entre 1976 e 1980, a nova política comunitária de "estruturas vitivínicas" adquiriu a sua fisionomia actual, de que ressalta a protecção aos vinhedos de vinhos de qualidade e, ao mesmo tempo, a preocupação de limitar durante alguns anos o potencial de produção de vinhos de mesa, prevendo mesmo prémios para o abandono temporário ou definitivo da vitivinicultura.

Apesar de todas estas medidas, com as campanhas de 1979 e 1980, a Comunidade não conseguiu sair da crise em que se encontrava no sector do vinho. O Mercado Comum foi obrigado a realizar, em 1982, nova reforma que constituiu um passo importante na garantia de preços. Esta reforma ajudou a manter a paz neste sector. Actualmente, na CEE, o apoio comunitário não é geralmente dado para melhorias ou modernizações no sistema de vinificação, já que o vinho não é prioritário, por ser excedentário, sendo os apoios dados, no respeitante a vinhos de mesa, apenas para melhoria das linhas de engarrafamento e armazenamento. Este foi pois o panorama que Portugal foi encontrar na sua adesão em 1987.

Os excedentes de vinhos verificados em anos de colheitas abundantes têm causado à Comunidade graves problemas internos obrigando-a a tomar rígidas medidas de regulamentação destinadas principalmente a proteger os vinhos de qualidade desencorajando a produção de vinhos de mesa não incluídos nessa categoria.

O problema do vinho na CEE, agravou-se seguramente com a entrada de Portugal e Espanha (respectivamente 7º e 3º produtores mundiais), o que faz prever algumas dificuldades ao nosso próprio mercado de vinhos.

A realidade da existência de um problema, neste campo, resultante da adesão dos dois países ibéricos foi bem evidenciado pelas dificuldades tidas na discussão dos respectivos "dossiers" no decurso das negociações.

As conclusões que atrás ficaram apontadas, no que respeita ao mercado vinho, quer em Portugal quer na CEE, evidenciam desde logo uma grande contradição. Por um lado, a CEE encaminha-se para a produção de vinhos de qualidade (VQPRD), desencorajando a produção de outros. Por outro lado Portugal encontra-se francamente atrasado, representando a nossa produção total de vinhos protegidos apenas uma muito pequena percentagem da produção nacional.

### **1.1 - Portugal e a política vínica**

Os vinhos Portugueses são normalmente reconhecidos como vinhos de qualidade. Portugal possui uma tradição vínica impor-

tante. No entanto, possui poucas regiões demarcadas, e mais importante ainda, nem sempre nas nossas regiões demarcadas o comportamento dos produtores, e por vezes dos organismos responsáveis, se enquadram, realmente, na filosofia de "região demarcada". Apesar de haver legislação sobre o assunto - Portaria nº 421/79 de 11 de Abril - que dispõe sobre o exame organoléptico, sobre as características da vinificação, sobre o controlo analítico para os vinhos de região demarcada e, até, sobre as castas que devem ser implantadas para o caso de se virem a demarcar regiões para os vinhos "rosés", torna-se necessário e urgente saber se essa legislação, é ou não, rigorosamente aplicada e até, se é perfeitamente conhecida dos vitivinicultores e Adeegas Cooperativas.

Na verdade, é premente que, tanto os vitivinicultores como os sócios das Adeegas Cooperativas, sejam sensibilizados para os cuidados que merecem os vinhos Portugueses, principalmente os VQPRD, se os querem protegidos. O problema ganha ainda maior acuidade agora que o mercado oferecido aumentou significativamente, com um acréscimo paralelo da competitividade e das exigências de qualidade. Impõe-se a necessidade de responder positivamente ao desafio feito principalmente sabendo-se, como se sabe, que com os vinhos que produzimos podemos e devemos ser capazes de competir, em termos agressivos, com os vinhos Europeus, se lhes soubermos dedicar a atenção que merecem.

A legislação existente dá toda a importância ao uso da denominação de origem e não se duvida que também os organismos responsáveis (como por exemplo a Federação dos Vinicultores do Dão FVD) estejam conscientes dessa importância. Não se pode, porém, estar tão certo quanto à prática das adeegas cooperativas, que são responsáveis pela maior parte do vinho produzido em Portugal (em 1983 a área da Junta nacional do Vinho hoje Instituto Nacional da Vinha e do Vinho produziu 4.578 milhares de hl e o total do país é de 7.756)<sup>2</sup>.

Para se poder ter uma ideia geral mais correcta foi feito um inquérito, às Adeegas Cooperativas de Regiões Demarcadas e não demarcadas, bem como a um instituto responsável pelo controlo de

uma Região Demarcada, com o intuito de saber como são feitos os controlos analíticos e a prova, e ainda quais os cuidados para manter e assegurar uma qualidade que se pretende manter e fazer reconhecer (Quadro I).

Como se pode verificar por análise do Quadro I, o panorama não se apresenta de modo algum favorável, podendo-se pôr a dúvida sobre se os nossos vinhos poderão, nestas condições, apresentar qualidade de forma a poder competir num mercado tão exigente como o é o mercado Europeu.

A dúvida é de tal forma premente que se têm tentado definir e congregar esforços no sentido de se adaptar a nossa legislação e nomeadamente o controlo de qualidade - da vindima ao vinho acabado e posto no mercado - na direcção exigida pelo mercado Europeu. Considera-se, no entanto, que mais que uma nova legislação - se bem que seja evidente a sua necessidade - é necessária e urgente uma mentalização dos produtores e organismos responsáveis, no sentido de que a legislação em vigor, ou que venha a entrar em vigor, seja rigorosamente cumprida, para que Portugal evolua no mercado vitivínicola europeu.

Quadro I - Respostas ao inquérito feito às adegas cooperativas e a um organismo oficial (\*)

Pergunta	Resposta					
	A*	B	C	D	E	F
Qual a área de vinha plantada na região?	20.000	2.360	12.785	1.150	2.200	5.000
Aconselha castas nos aos vinicultores?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Como foram seleccionadas?	Por lei por tradição	ancestralmente as melhores	Brigada Técnica MAP	Vinificação elementar na região	Brigada Técnica MAP	Serviços Agrícolas Regionais
Qual a área ocupada por castas seleccionadas?	Toda	Toda	não sabem	aproximada/ 70%	2:100	Pequena-fornecimento de garfos desde Out84
Qual a idade média das vinhas?	+ de 45 anos-70-100% restantes variável	12-15 anos ou mais de 60	não sabem	15 anos	8 anos	há muito velhas e e muito novas
Podr ser incorporada uva de mesa?	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Qual o mercado em que os vinhos são colocados?	Todo o país CEE e USA	Todo o país USA Alemanha Suíça	Todo o país USA CEE Angola Cabo Verde Moçambique	Todo o país USA	Todo o país USA Luxemburgo Macau	Todo o país USA RFA Países Afr: Exp; Portuguesa
Como é feita a entrega das uvas para a vinificação?						
1-por castas	X	---	X	X	---	---
2-Indiscriminadamente	X	X	---	X	X	X
3-Outra especifique	Lotes escolhidos	---	selecção pelo grau	---	---	---
Há oscilações de qualidade anuais significativas?	Não	por vezes nos tintos	Não	Não	Não	Sim
Nos casos em que a o vinho não apresenta qualidade característica como é vendido?						
1- a granel	X	---	X	---	---	X
2- com a mesma marca	---	---	---	---	tem sempre tipicidade	---
3- de outra forma	---	X	---	X	---	---
Qual o controle analítico realizado?	análise sumária produtor directo outras exig. por imp.	análise sumária	análise sumária F. maloláctica (FC) ensaios de estabilidade	análise sumária	análise sumária	análise sumária ensaios de estabilidade
O controle é feito a todos os vinhos ou apenas aos de marca?	Todos	Todos	Todos	Todos	Todos	Todos
Como é feita a prova?						
1- por painel de produtores?	---	por dois técnicos produtores	---	X	---	---
2- por um organismo oficial?	X	---	---	---	---	---
3- de outra forma	---	---	Pelo enólogo	---	por técnicos da da cooperativa	X
Qual o método adoptado na prova?	Nunca é indicado um método específico					





## 2- HIPÓTESE DE TRABALHO

O trabalho realizado é um estudo fundamental, com vista a abrir caminho no sentido de serem definidos critérios e se estudarem fenómenos respeitantes à evolução dos aminoácidos e seu interesse no vinho acabado. Os resultados obtidos têm aplicação em alguns aspectos importantes em Enologia, tal como por exemplo: a repressão de fraudes e a caracterização vínica. A explanação do raciocínio que nos levou a considerar a elaboração deste trabalho para cobrir as áreas referidas será objecto dos parágrafos seguintes.

### 2.1 - Desenvolvimento

Muitas vezes a falsificação em vinhos é feita fazendo fermentar sacarose com mosto ou fermentando apenas sacarose, adicionando mosto de outros frutos, ou ainda, adicionando e misturando soluções de compostos diversos que, no final, vão permitir obter uma solução alcoólica barata, mas semelhante ao vinho. A venda de tais misturas vai permitir vender como vinhos, com uma razoável margem de lucro, produtos que de vinho apenas possuem o nome que lhes foi abusivamente atribuído.

Este problema põe-se, principalmente, por não se possuir nenhum método químico, eficiente e de fácil aplicação, susceptível de definir e detectar a existência da falsificação, ou seja, capaz de evitar a prática deste tipo de adulteração.

Em tempos foi sugerido o "teste de prolina"<sup>3</sup> como sendo capaz de definir vinho natural, distinguindo-o de vinho falsificado. O princípio deste método assenta no facto de a quantidade de prolina em vinhos de *Vitis vinifera* ser normalmente elevada e variável entre valores conhecidos, tornando-se, portanto, fácil reconhecer adulterações provenientes de fermentações com sacarose ou mesmo com mostos de outros frutos.

Apreciando este método num sentido mais lato, o que se passa é que, a prolina é um aminoácido presente no mosto em quantidades apreciáveis, e não sofre grandes alterações durante o processo

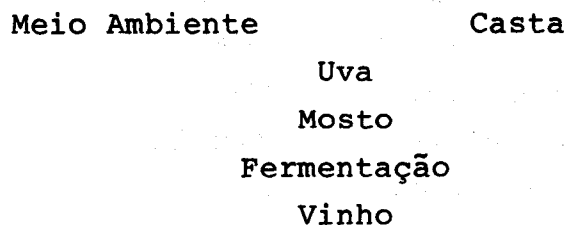
fermentativo, pois não é consumido pelas leveduras. No vinho, ela está presente em quantidade que se pode considerar característica da uva de *Vitis vinifera* e conseqüentemente do vinho dela proveniente.

No entanto, este método, se bem que de fácil aplicação, apresenta alguns inconvenientes. Aquele que salta de imediato à vista resulta do facto de, sendo conhecidos os intervalos em que variam os teores de prolina no vinho de *Vitis vinifera*, bastar ao falsificador adicionar mais uma solução, agora de prolina, nas quantidades exigidas. Por outro lado a constância dos valores elevados de prolina não se verifica em todos os tipos de vinho, mesmo de *Vitis vinifera*.

Os aminoácidos são produtos e agentes de uma actividade metabólica intensa, que começa na uva e apenas termina no final da fermentação, ou, para sermos mais exactos, na altura em que o vinho é consumido.

O vinho é um meio metabólico rico e activo. É de tal forma influenciado pelo meio ambiente que o rodeia que o balanço final pode ser considerado como o fruto de uma relação estreita entre vinho/casta de origem/região. Esta relação permite, normalmente ao enologista, ou melhor ao provador, reconhecer e distinguir os diversos vinhos de regiões diferentes e origens diferentes.

De uma forma geral pode-se considerar o seguinte esquema muito simplificado, como base para a definição de vinho :



Até à obtenção da uva para vinho, todos os factores que influenciam a formação e acumulação de aminoácidos na uva actuam igualmente numa mesma região e para uma mesma casta; aminoácidos na uva e no mosto estão, portanto, intrinsecamente ligados às características da casta numa dada região, num mesmo ano. Até que ponto estas interacções se reflectem no vinho, de modo a produzir

um padrão constante, é o objecto da presente investigação.

Na passagem do mosto a vinho, ou seja, durante a fermentação, o problema complica-se: actuam as leveduras e, durante todo o processo fermentativo, o nível de aminoácidos sofre numerosas alterações, principalmente devidas ao consumo pelas leveduras e à libertação por parte das mesmas, em consequência de fenómenos de autólise. A levedura é, ela própria, também característica de uma dada região<sup>4</sup> e mesmo de uma casta<sup>4</sup>, visto que cada estirpe necessita, regra geral, de um substracto específico para o desenvolvimento.

Como hipótese de trabalho pode considerar-se natural e plausível que haja um conjunto de aminoácidos que caracteriza um vinho de uma casta ou castas, sendo este, eventualmente, susceptível de ser definidor da região de que o vinho provém. Tal hipótese, a verificar-se poderá ser utilizada na repressão de fraudes, no reconhecimento da origem natural, no controlo de qualidade e caracterização de vinhos e na definição de regiões de marcadas, com a vantagem de possibilitar um trabalho mais preciso do que o obtido com o "teste de prolina", e ao mesmo tempo mais difícil de ser falsificado. O objectivo da presente dissertação é demonstrar, baseado nestes pressupostos, a validade dos princípios enunciados obtendo um espectro final de aminoácidos o qual será dependente da casta ou castas de que o vinho provém. Dado o papel importante que estes compostos desempenham, em todo o processo metabólico e energético, que conduz à formação do vinho, a sua eventual importância, na caracterização enológica, não pode ser ignorada.

## **2.2 - Metodologia**

### **2.2.1- Compilação dos objectos de estudo**

A escolha neste caso incidiu sobre a região do Alentejo por se considerar que ela possui uma boa aptidão vínica, se bem que não estejam ainda bem definidos, os parâmetros que caracterizam os seus vinhos.

Dentro da região do Alentejo, e por se considerar que ela

pode ser dividida em subregiões<sup>5</sup>, escolheu-se a subregião de Reguengos.

A escolha de uma região definida permite eliminar um factor de variação anual importante, o clima, o qual de outro modo teria de ser considerado.

A escolha de vinhos elementares, facilita a tarefa de relacionar os aminoácidos presentes no vinho com a casta de origem do mesmo, uma vez que a fermentação foi conduzida de modo uniforme. O uso de castas tradicionais grandemente implantadas na região permite considerar a amostra como representativa dos vinhos da região.

Os vinhos foram produzidos em condições controladas na adega experimental da herdade da Mitra e são provenientes de uma vinha implantada na região de Reguengos: a vinha do Esporão. Esta vinha possui um campo experimental onde se encontram implantadas a maioria das castas tradicionais do Alentejo, e destas castas foram escolhidas as castas brancas Roupeiro, Rabo de Ovelha, Manteúdo e Tamarez e as castas tintas Trincadeira, Periquita, Aragonez e Moreto. A escolha deste reduzido número de castas deveu-se ao facto de elas possuírem geralmente vinhos de características organolépticas excepcionais e serem castas largamente implantadas na região, ou seja os vinhos desta região, possuem percentagem elevada de uva destas castas.

### **2.2.2 - Escolha do método e obtenção dos resultados**

Ao método a utilizar para a análise de aminoácidos deve exigir-se que seja específico, reprodutível e altamente sensível.

Dentro dos vários métodos utilizáveis foi escolhida a cromatografia gás-líquido de alta resolução .

Sendo o vinho um meio complexo, no qual, estão presentes um grande número de compostos, alguns dos quais podem interferir com a análise cromatográfica, torna-se necessário o isolamento prévio dos aminoácidos. Este passo foi levado a cabo por cromatografia de troca-iónica.

O esquema metodológico adoptado pode ser resumido da

seguinte forma:

- 1- Purificação das amostras por cromatografia de troca-iónica
- 2- Derivatização
- 3- Cromatografia gás-líquido de alta resolução
- 4- Identificação e quantificação dos aminoácidos
- 5- Análise dos dados - aplicação de técnicas de análise de perfil ("pattern analysis")

É crucial para que a análise qualitativa e quantitativa de aminoácidos forneça resultados válidos, que o passo de isolamento, por troca-iónica, seja o mais preciso possível. A qualidade dos resultados depende fundamentalmente do volume de eluente, <sup>6</sup> e da velocidade a que é feita a eluição. A aferição cuidadosa do método é fundamental. Fizeram-se ensaios de recuperação utilizando soluções de quantidades conhecidas de aminoácidos e do padrão interno, o qual, adicionado nesta altura, vai servir não só para controlo do processo de eluição, como também para controlo posterior do processo conducente à obtenção dos derivados para cromatografia.

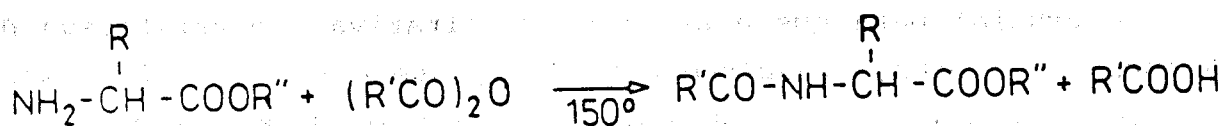
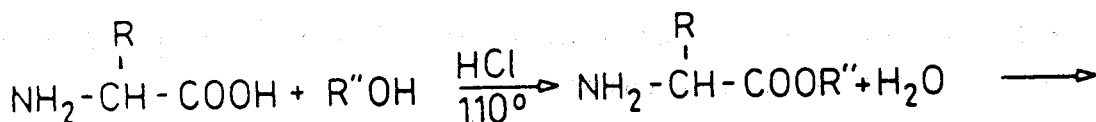
Para a determinação do volume de eluente necessário, foram recolhidas amostras de eluído após se aplicarem quantidades crescentes de eluente. Considerou-se óptimo o volume de eluente para o qual o eluído já não apresentava reacção positiva à ninidrina.

A alta sensibilidade, elevado poder de resolução e versatilidade da cromatografia gás-líquido capilar, tornam este método ideal para a análise de misturas complexas desde que o método de derivatização e a manipulação da instrumentação seja correcto.

Como método de derivatização escolhemos a esterificação seguida de acilação (Esquema 1). Este tipo de derivatização permite facilmente separar todos os aminoácidos proteicos e alguns não proteicos num tempo de análise relativamente curto, cerca de 50 min.

A quantificação exige a introdução na amostra de um padrão interno. Padrão interno é um composto conhecido que é adicionado à amostra, em concentração conhecida, com o objectivo de controlar as possíveis perdas durante os processos de isolamento, derivati-

zação e cromatografia. Como padrão interno deve ser escolhido um composto, quimicamente semelhante aos produtos a analisar, e que não interfira com a análise. Neste caso escolheu-se a cicloleucina, por ser um aminoácido não proteico, não existente no vinho, cuja análise não interfere com a dos restantes aminoácidos.



Esquema 1

Para assegurar a eluição completa dos aminoácidos e saber o rendimento da eluição e da derivatização foram feitos ensaios de recuperação, utilizando amostras do padrão interno.

Após escolha dos derivados e do padrão interno é necessário proceder a ensaios de calibração analítica, incluindo a determinação dos factores de resposta. Estes ensaios foram levados a cabo sobre quatro amostras replicadas, constituídas por quantidades conhecidas de padrões de aminoácidos, cromatograficamente puros. Determinaram-se os factores de resposta em relação à cicloleucina.

As condições de derivatização foram optimizadas. Fizeram-se ensaios a tempos diferentes de esterificação e a temperaturas e tempos diferentes de acilação. Escolheu-se o tempo de esterificação de 30 min a 110°C e a temperatura de acilação de 150°, por 15min.

A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna WCOT, revestida com fase estacionária OV-1. Alternativamente, em ensaios preliminares, usou-se uma coluna de SE-30, que se abandonou por possuir menor estabilidade térmica e obrigar, por isso, a tempos de análise demasiado elevados.

O acesso a colunas capilares de "fabrico próprio" permite uma escolha criteriosa da mesma, permitindo trabalhar nas melhores

condições possíveis. A análise de aminoácidos derivatizados da forma referida (Esquema 1) é, geralmente, efectuada em colunas revestidas com uma fase não polar do tipo metil silicone (OV-1, SE-30) possuindo um número de pratos teóricos entre 80.000 a 100.000. A maioria dos aminoácidos requer uma coluna com uma desactivação completa da parede e um comprimento médio entre 20 a 25 metros, com um diâmetro interno que permita boa eficiência. A coluna a considerar deve ter cerca de 25m x 0,25mm de diâmetro interno, aproximadamente 70.000 pratos teóricos, apenas ligeiramente ácida ou mesmo totalmente neutra, livre de iões metálicos e com uma espessura de filme com, aproximadamente, 0,1-0,3  $\mu\text{m}^7$ .

O processo cromatográfico é controlado, quanto à qualidade cromatográfica, por injeção da "mistura de GROB"<sup>8</sup>, quanto à qualidade dos resultados, por determinações frequentes dos factores de resposta. É assim possível, durante o decorrer do trabalho, ter confiança nos resultados qualitativos e quantitativos que se obtêm.

O extracto contendo os aminoácidos, obtido após a troca iónica, foi derivatizado nas condições padrão previamente estabelecidas, fazendo-se quatro amostras (de derivatização) replicadas. A média das quatro injeções foi considerada como o resultado da análise quantitativa para um dado vinho.

Para cada ano estudado, os resultados em cada vinho, são obtidos por média de quatro amostras e isto repetido para os sete anos de colheita analisados. As conclusões finais resultam do tratamento estatístico destes dados.

### 2.2.3 - Análise dos dados

Os resultados obtidos para cada vinho, nos vários anos, foram analisados comparativamente, tendo posteriormente sido considerados, num âmbito mais alargado, em que se fez então a comparação entre vinhos brancos, por um lado, e vinhos tintos por outro e, por fim, os vinhos foram considerados em globo- brancos e tintos. Os resultados foram avaliados de cinco formas principais:

- a) Dos resultados obtidos foram postos, sob forma tabelar ou,

alternativamente sob a forma gráfica (barras) de modo a obter uma visualização empírica das diferenças e semelhanças entre os vários passos de avaliação atrás enunciados.

b) Todos os dados obtidos foram submetidos a análise estatística sumária, por utilização da sub-rotina "Descriptive Methods - Summary Statistics" do programa STATGRAPHICS<sup>R</sup>.

c) Cada vinho foi submetido a uma análise do tipo "árvore de expansão mínima", com utilização de um programa elaborado no laboratório.

d) Cada vinho dos vários anos foi submetido a uma análise de "componente principal" também por utilização de uma subrotina do programa atrás referido, tendo neste caso sido considerado como variável caracterizante cada ano, e como variável observada cada aminoácido. Esta análise determinou quais os aminoácidos característicos ou susceptíveis de serem considerados como caracterizantes do vinho individualmente, do conjunto dos vinhos brancos e do dos vinhos tintos.

e) Como análise final os resultados foram submetidos a uma análise de agrupamento hierárquico ("cluster hierárquico") pela aplicação do programa CLUE<sup>R</sup>, a uma análise discriminante e a uma representação gráfica pelo método da projecção em estrela ("star symbol plot").



### 3- ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS EM MISTURAS COMPLEXAS

O interesse que a análise de aminoácidos tem em vários campos, como por exemplo, medicina, química de proteínas, alimentar e bioorgânica em geral, tem estimulado, ao longo dos anos, a atenção de vários autores. Os métodos de análise de aminoácidos têm sofrido, por isso, grande desenvolvimento, no sentido do aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas que permitam a detecção e quantificação de aminoácidos de formas cada vez mais precisas e mais reprodutíveis.

Os métodos de análise de aminoácidos podem ser divididos em dois grupos distintos:

1) -Métodos de análise, detecção e quantificação de aminoácidos totais.

2) -Métodos de separação de aminoácidos, detecção e quantificação de aminoácidos individuais.

#### 3.1- Métodos de análise de aminoácidos totais

Entre estes métodos, e sem querer de forma alguma ser exaustiva, há que fazer referência a três principais: os titulimétricos, os gasométricos e os colorimétricos.

##### 3.1.1- Métodos titulimétricos

O princípio destes métodos reside no facto de a maioria dos aminoácidos monoaminomonocarboxílicos, apresentarem curvas de titulação semelhantes. As curvas de titulação dos aminoácidos apresentam dois grupos tampão -  $pK_b$  2 e  $pK_a$  9,5 - correspondentes aos grupos amina e carboxilo<sup>9, 10</sup>. Estes valores de  $pK$ , tornam a titulação dos aminoácidos difícil. A curva de titulação, em solução aquosa, apresenta um ponto de viragem a valores de  $pH$  de 1,5 e 11, respectivamente, o que cai fora das gamas de viragem dos indicadores normalmente utilizados ( $pH$  2-11).

A adição de álcool<sup>11</sup>, acetona ou formaldeído a uma solução aquosa contendo aminoácidos vai fazer baixar os valores de  $pK$ , de pelo menos um dos grupos tampão, trazendo-o para valores entre 5

e 8, facilitando assim a titulação. A figura 1 exemplifica a aplicação do método à titulação da glicina em acetona<sup>11</sup>.

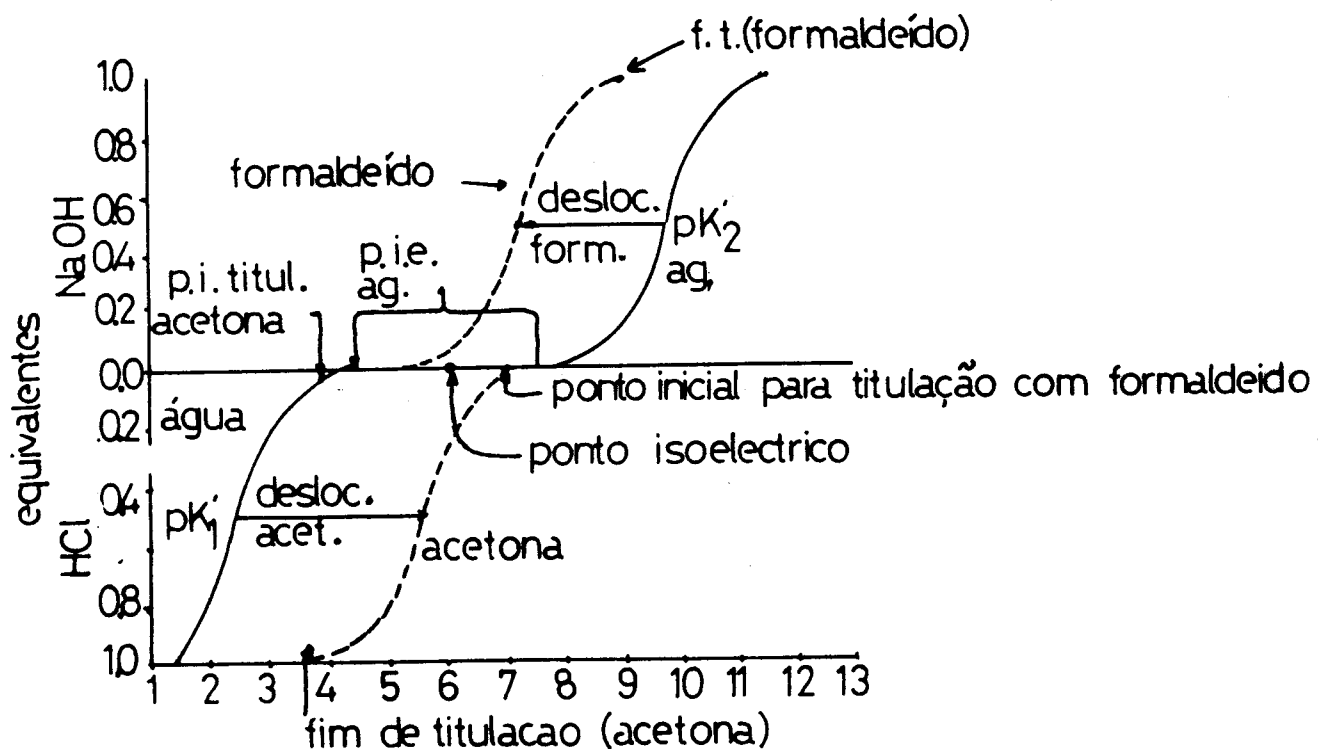
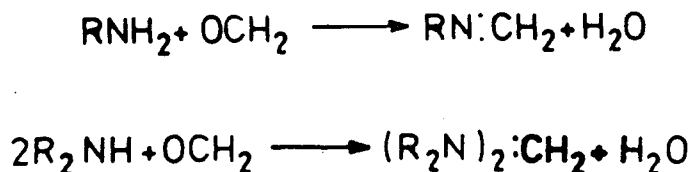


Figura 1: Curva de titulação da glicina<sup>11</sup>

Estas substâncias exercem a sua acção quer por modificação do meio em que os aminoácidos estão dissolvidos, quer por alteração da estrutura do aminoácido. O método mais desenvolvido e mais usado<sup>12</sup>, utiliza a adição de formaldeído. O formaldeído actua provocando um abaixamento do valor do pK mais elevado por modificação da estrutura do aminoácido (Esquema 2).



Esquema 2

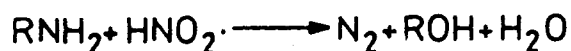
Os produtos destas reacções  $RN:CH_2$  e  $(R_2N)_2CH_2$ , são bases muito fracas, pelo que a curva de titulação é modificada por abaixamento do pK de 9.5 para um valor de pH de aproximadamente 7 podendo então ser facilmente titulada, com NaOH na presença de fenolftaleína (Figura 1).

O principal inconveniente deste método, para a análise de aminoácidos em misturas complexas, resulta do facto de ele não ser específico, tornando necessária a separação prévia de substâncias tituláveis interferentes, tais como, amoníaco e fosfatos<sup>13</sup>.

### 3.1.2- Métodos gasométricos

Em 1911 Van Slyke<sup>13</sup> desenvolveu um método de detecção de aminoácidos baseado na reacção destes compostos com ácido nítrico e conseqüente libertação de  $N_2$  (Esquema 3).

No esquema reaccional proposto, o  $N_2$  libertado é, posteriormente, medido manométricamente, permitindo assim a quantificação.



Esquema 3

O principal inconveniente reside no facto de, durante a reacção, outros compostos, tais como amoníaco e ureia, interferirem com a detecção dos aminoácidos. Para obviar a este inconveniente, desenvolveu-se um novo método analítico<sup>14</sup> cuja detecção envolve na mesma o aparelho usado anteriormente - *Van Slyke neill apparatus* - mas usando agora a medição do  $CO_2$  libertado pelo grupo carboxilo dos aminoácidos após reacção com a ninidrina (Esquema 4).

A maioria dos aminoácidos liberta um mole de  $CO_2$ , se bem que alguns tais como, cistina e ácido aspártico libertem dois moles<sup>14</sup>.



Esquema 4

Este método foi proposto por Van Slyke<sup>14</sup>, como complemento do anterior por ser específico para aminoácidos. As estruturas moleculares representadas no esquema 5, são as susceptíveis de fornecerem grupos carboxilo libertando CO<sub>2</sub> quantitativamente, nas condições de análise, após reacção com ninidrina.



Esquema 5

Nos casos em que o grupo NH<sub>2</sub> está na posição β ou γ a reactividade do grupo carboxilo diminui grandemente se bem que possa não desaparecer. As vantagens deste método, em relação ao anterior, residem no facto de ele distinguir aminoácidos de peptidos, aminas, amidas, glucosaminas, ácidos carboxílicos e cetoácidos, entre outros, tornando-se por isso comparativamente mais específico.

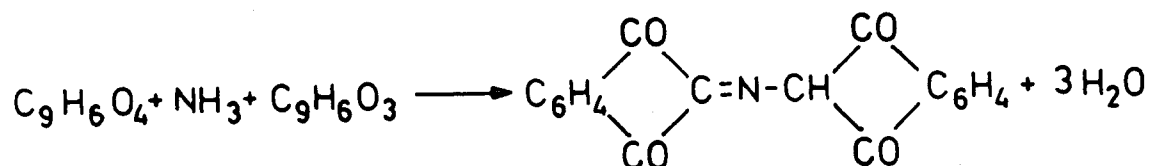
A reacção dos aminoácidos com ninidrina, pode ainda ser utilizada para detecção por outras formas quando se consideram os restantes produtos da reacção: amoníaco (NH<sub>3</sub>) e aldeído (RCHO).

A detecção por quantificação da amónia foi tentada por Mac Fayden<sup>15</sup> mas deve ser realizada com extrema precaução pelo que praticamente não foi desenvolvida. A detecção, tomando em consideração a formação do aldeído, foi também pouco utilizada por não ser suficientemente geral, visto nem todos os aminoácidos formarem aldeídos.

### 3.1.3 - Métodos colorimétricos

A reacção com ninidrina, foi ainda utilizada como reacção colorimétrica. Ao reagir com a prolina, a ninidrina forma uma substância corada violeta (esquema 6 A), enquanto que, ao reagir com os restantes aminoácidos provoca o aparecimento de uma cor azul, resultante da reacção do amoníaco com a ninidrina e a sua

forma reduzida (esquema 6 B).



Esquema 6

A detecção de aminoácidos por reacção colorimétrica tem no entanto o inconveniente de ser pouca precisa, quando se pretende fazer análise quantitativa. A formação da cor decresce<sup>15</sup> rapidamente com a diminuição da quantidade de aminoácido a detectar, fornecendo resultados pouco reproduzíveis.

A diminuição da cor deve-se principalmente à oxidação do composto por reacção com o oxigénio. A adição ao meio de um agente fortemente redutor, capaz de evitar a reacção de oxidação, actuará pois como estabilizante<sup>16</sup>. O aperfeiçoamento destas reacções colorimétricas permitiu a sua aplicação no desenvolvimento de técnicas, quer inespecíficas para a totalidade dos aminoácidos<sup>17</sup>, quer para grupos de aminoácidos com a mesma funcionalidade, quer ainda específicas para certos aminoácidos como por exemplo, a prolina e hidroxiprolina.

Outro problema que surge na aplicação deste tipo de reacções resulta do facto de elas serem válidas para qualquer composto que apresente um grupo amina livre - por exemplo peptidos, razão pela qual tem recebido maior atenção para a detecção de aminoácidos separados inicialmente por outro método cromatográfico.

### 3.2 - Métodos de separação de aminoácidos

Os métodos de separação são fundamentais, na maioria das áreas da química, quer se trabalhe em escala preparativa, quer se



trabalhe em escala analítica.

A procura de métodos capazes de separar misturas complexas de substâncias semelhantes, como por exemplo aminoácidos e peptídeos, entre outros, conduziu ao desenvolvimento de técnicas de separação entre as quais se encontra a cromatografia.

O princípio geral da cromatografia baseia-se nas diferenças de distribuição dos componentes de uma mistura entre a fase estacionária e a fase móvel. A exigência para que essa distribuição seja diferente é de que os diferentes constituintes da mistura tenham afinidades diferentes para ambas as fases, ou diferentes possibilidades de difusão entre elas (Figura 2).

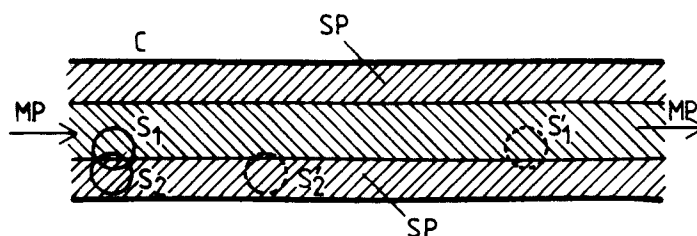


Figura 2: SP- fase estacionária; MP fase móvel. O componente  $S_1$  da mistura possui maior afinidade para a fase móvel, enquanto que o componente  $S_2$  prefere a fase estacionária.  $S'_1$  e  $S'_2$  representam as posições após ter decorrido um certo tempo.

Os métodos cromatográficos usados na separação de aminoácidos, podem ser classificados, de acordo com o princípio responsável pelo mecanismo de separação, de acordo com o Quadro II.

Quadro II

Método	Natureza do processo	Unidades que determinam a magnitude da afinidade das substâncias para as duas fases
Cromatografia de adsorção	Adsorção	Coefficiente de adsorção
Cromatografia de partilha	Partilha	Constante de distribuição
Cromatografia de troca-iónica	Interação electostáctica e difusão	Carga, constante de dissociação e diâmetro iónico efectivo

a)- Cromatografia de adsorção

A separação de uma mistura por cromatografia de adsorção baseia-se nas diferenças dos equilíbrios de partição dos componentes da mistura entre a fase estacionária (o adsorvente) e a fase móvel, líquida (o sistema de eluição).

b)-Cromatografia de partilha

O fundamento da separação por partilha reside nas diferenças de solubilidade dos componentes de uma mistura em dois líquidos imiscíveis. A distribuição dos componentes é determinada pela constante de partilha ou partição. A eficiência da separação é proporcional às diferenças entre os coeficientes de partilha entre as duas fases.

d)- Cromatografia de troca-iónica

A cromatografia de troca-iónica baseia-se no facto de certas substâncias (os trocadores-iónicos), serem capazes de, em meio aquoso, absorver água, numa quantidade que vai de metade a várias vezes o seu peso seco, libertando iões por dissociação electro-lítica.

Os iões libertados, podem ser substituídos por outros presentes na solução, que possuam maior afinidade para com o trocador-iónico. É a este processo, representado no Esquema 7, que se chama troca-iónica.



Esquema 7

Nesta equação, que é afectada apenas pela concentração dos iões, A e B representam iões do mesmo sinal; a separação é conseguida pela interacção electrostática entre os iões, pelas constantes de dissociação dos compostos e pelo pH do meio.

A cromatografia, sistema base utilizado para a separação da

maioria das substâncias biológicas, pode ainda ser classificada consoante a forma "física" em que a separação é efectuada.

### **3.2.1 - Cromatografia em coluna**

A análise de aminoácidos em colunas de cromatografia, foi ensaiada, utilizando todos os métodos de separação cromatográfica atrás descritos. O método que teve maior desenvolvimento e é ainda hoje mais utilizado, é o que utiliza a cromatografia de troca-iónica. Os restantes métodos, contudo, não podem deixar de ser referidos pela importância que desempenharam ao longo dos anos de evolução dos métodos analíticos.

#### **3.2.1.1 - Cromatografia de partilha e de adsorção**

O isolamento de aminoácidos de hidrolizados proteicos, após acetilação, foi conseguida recorrendo à cromatografia de adsorção<sup>18</sup>. A separação era efectuada em colunas de vidro cheias com sílica gel, sendo a fase móvel o clorofórmio. As misturas de aminoácidos acetilados, após introdução no topo da coluna eram separadas, de acordo com as suas constantes de distribuição, segundo o princípio básico da cromatografia de partilha. Posteriormente desenvolveu-se um outro método que não obrigava à acetilação prévia dos aminoácidos e que utilizou colunas cheias com amido<sup>19</sup>.

A velocidade a que decorria a eluição não correspondia à que seria de esperar se o processo decorresse segundo uma cromatografia de partilha<sup>19</sup>. O processo cromatográfico decorria, neste caso, por adsorção.

Após escolha do solvente adequado conseguiram-se cromatografar e quantificar misturas de aminoácidos por aplicação das técnicas cromatográficas já descritas com base nos volumes de retenção de amostras padrões.

#### **3.2.1.2 - Cromatografia de troca-iónica**

As vantagens da cromatografia de coluna de troca-iónica,



quando comparada com técnicas semelhantes usando outros meios<sup>20</sup>, residem principalmente no uso de sistemas de solventes aquosos, na possibilidade de cromatografar substâncias mais concentradas e menos puras, e na maior velocidade de eluição em colunas convenientemente preparadas<sup>21</sup>. Moore e Stein<sup>22</sup> resolveram uma amostra de 50 aminoácidos utilizando uma única coluna de Dowex 50.

A análise de aminoácidos por cromatografia de troca-iónica baseia-se no seu carácter anfotérico. Os aminoácidos existem em forma dissociada em solução aquosa exclusivamente na forma "zwitteriónica". Em meio ácido a dissociação do grupo carboxilo desaparece e, neste caso o aminoácido age como um catião. Em meio básico desaparece a dissociação do grupo amina agindo o aminoácido como um anião. O grau de dissociação é dependente dos pKa e pKb e logo, dependente do pH, já que o valor de pK corresponde ao valor de pH a que o respectivo grupo está 50% dissociado.

Os factores que determinam as velocidades de eluição dos aminoácidos em trocadores iónicos são complexos, podendo considerar-se como principais, as diferenças de carga, as diferenças do grau de ionização e ainda as diferenças de interações de Van der Waals com o trocador.

Para que o processo decorra em condições óptimas é necessária uma escolha criteriosa do trocador iónico. Os factores que determinam essa escolha são fundamentalmente a homogeneidade e tamanho das partículas de troca-iónica (quanto menores forem as partículas mais rapidamente o equilíbrio é atingido), e o grau de polimerização, o qual é escolhido de modo a que a substância possa penetrar na partícula do trocador<sup>23</sup>.

A cromatografia de troca-iónica é considerada fundamental na análise de aminoácidos principalmente após os trabalhos de Moore Stein e Spackman<sup>19, 16, 24</sup> que, melhorando o sistema anteriormente utilizado<sup>22</sup>, conseguiram a separação de aminoácidos de hidrolizados proteicos em 24h. Na realização desta análise foi utilizado um colector de fracções automático e a detecção feita por reacção com ninidrina. Nesta técnica que se pode considerar a base do analisador automático, a solução tampão era bombada a uma pressão constante e o eluente, após reacção com a ninidrina,

medido colorimetricamente a 570 e 440 nm, sendo os picos quantificados com elevada precisão por integração. Mais tarde<sup>25</sup> foi descrito um sistema de entrada das soluções tampão mais eficiente e finalmente em 1963<sup>26</sup> foi efectuada uma análise completa de aminoácidos em 6h.

Se bem que nos modernos analizadores, a análise consiga ser mais rápida, sobre eles pesa o facto de serem aparelhos muito caros e ao mesmo tempo específicos, envolvendo por isso um encargo inicial demasiado elevado para poderem ser utilizados, em rotina, para um único tipo de análise, sobretudo quando o número de amostras não é elevado. A procura de métodos alternativos, que sejam ao mesmo tempo mais sensíveis e que envolvam tempos de análise mais curtos, tem sido objecto de investigação intensa.

### **3.2.2 - Cromatografia de papel**

Podemos distinguir neste tipo de cromatografia, desenvolvido por Consden et al. em 1944<sup>27</sup>, duas formas principais, ambas aplicáveis à análise de aminoácidos: a cromatografia de papel convencional e a cromatografia de papel impregnado.

#### **3.2.2.1 - Cromatografia de papel convencional**

O princípio deste método assenta na reactividade química da celulose, a qual está associada aos seus grupos hidroxilo, que lhe permitem que sofra interações com moléculas polares, especialmente as susceptíveis de formar pontes de hidrogénio. A fase actuante como fase estacionária, pode ser considerada, sem grande erro, como sendo constituída pelas moléculas da celulose que concorrem de forma competitiva com as moléculas do solvente e da substância a ser separada<sup>21</sup>. A substância a separar sofre uma cromatografia do tipo da cromatografia de adsorção<sup>28</sup>.

A técnica primeiramente utilizada por Consden et al.<sup>27</sup> tem sofrido poucas alterações nos seus aspectos básicos, tendo a maioria das alterações visado o desenvolvimento do sistema de solventes e as características do papel.

Esta tem sido utilizada na análise de aminoácidos tendo sido

introduzidas modificações no sentido de melhorar o poder de resolução, não só pela aplicação de vários sistemas de solventes<sup>29</sup>, como, também, pelo estabelecimento de condições ideais<sup>21</sup>.

### 3.2.2.1:1 - O Sistema de solventes

No melhoramento do sistema de solventes, para cromatografia de papel, foi dado um passo importante com a introdução de sistemas de solventes miscíveis com a água, como substituição dos até então utilizados, apenas parcialmente miscíveis.

No caso dos aminoácidos o solvente orgânico escolhido está fortemente relacionado com a velocidade de eluição<sup>21</sup>. Pode-se fazer variar a velocidade do desenvolvimento por alteração do solvente orgânico e/ou da sua percentagem na mistura<sup>21</sup> (Figura 3).

Além deste aspecto, e devido às diferentes composições das cadeias laterais dos aminoácidos, desenvolveram-se sistemas de solventes específicos para diferentes grupos de aminoácidos. Os aminoácidos básicos e ácidos reagem fortemente às mudanças de pH do solvente de desenvolvimento pelo que adições de ácidos e bases podem provocar o deslocamento de certos grupos de aminoácidos, melhorando a separação<sup>21</sup>.

A escolha do solvente ótimo para o desenvolvimento de uma mistura complexa de aminoácidos é contudo limitada, visto o poder de desenvolvimento de determinado sistema de solventes, ser função do seu teor em água. O uso de efeitos especiais, com sistemas de solventes específicos, é limitado pela sua baixa polaridade e afinidade para a água, o que pode conduzir a baixas taxas de desenvolvimento, sendo possível exercer controlo sobre a velocidade e ordem de eluição duma mistura de aminoácidos, por modificação do sistema de solventes usado<sup>21</sup> (Figura 3).

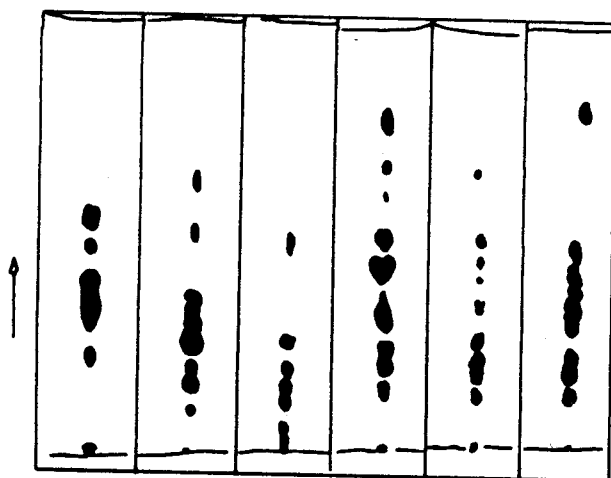


Figura 3 : Separação de aminoácidos em cromatografia de papel unidimensional usando concentrações diferentes do mesmo eluente (metil etil cetona:ac.propiônico:água)  
 1- 48:20:32; 2- 60:20:20; 3- 72:20:8; 4- 48:32:20;  
 5- 72:8:20; 6- 60:32:8 <sup>21</sup>

### 3.2.2.1.2 - O papel

O tipo de papel tem grande importância. É possível fazer variar o  $R_f$  de uma dada amostra consoante a estrutura do papel segundo a equação:

$$\frac{1}{R_f} = \left(1 + \alpha \frac{A_s}{A_l}\right)$$

em que  $\alpha$  - é o coeficiente de partilha, e  $A_s$  e  $A_l$  as áreas transversas da fase móvel e da fase estacionária respectivamente.

Quanto mais aberta for a textura do papel maiores serão os valores de  $R_f$ .

A resolução e separação obtidas na separação de misturas idênticas de aminoácidos podem ser modificadas, para um mesmo sistema de solventes, apenas modificando o tipo de papel<sup>21</sup>.

Outro aspecto importante a ter em atenção, na escolha e/ou no uso de papel de cromatografia, diz respeito ao seu grau de pureza. Quando se usa p.e. fenol como solvente de desenvolvimento, as impurezas do papel são facilmente detectadas pelo aparecimento de manchas castanhas na frente do solvente obtendo-se grande melhoria na eficiência do sistema quando as mesmas são retiradas (Figura 4).

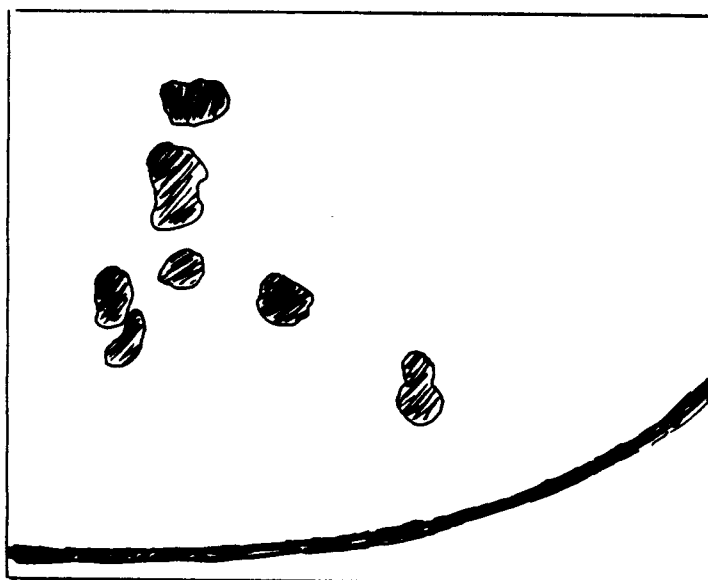


Figura 4: Cromatograma bidimensional mostrando o efeito das impurezas no papel (papel Whatman nº1 filter grade)<sup>21</sup>

#### 3.2.2.1.3 - A amostra

No respeitante à amostra a cromatografar, a qualidade e a quantidade são parâmetros fundamentais.

A quantidade de amostra depende da taxa de difusão, e consequentemente, da natureza do papel e do sistema de solventes usado.

No que respeita à qualidade, no caso dos aminoácidos, é fundamental que a amostra esteja livre de substâncias interferentes sendo por vezes referidas as vantagens de uma purificação prévia<sup>30</sup>, por exemplo por cromatografia de coluna. A purificação é necessária não só para evitar distorções na mancha<sup>21</sup>, o que em análise de misturas pode inclusivamente impedir a separação, como ainda para evitar interpretações erróneas na fase de revelação.

#### 3.2.2.1.4 - Técnica bidimensional

A cromatografia de papel convencional bidimensional, apresenta a vantagem de combinar dois cromatogramas separados num mesmo papel cromatográfico, permitindo assim a utilização das

vantagens combinadas de dois sistemas de solventes.

Este tipo de cromatografia é bastante utilizada na análise de misturas complexas de aminoácidos, conseguindo-se, por exemplo, separar em grupos distintos os aminoácidos básicos, os ácidos e a prolina,<sup>21</sup> utilizando dois solventes distintos, butanol:ác. acético:água e água saturada de fenol. O principal problema desta técnica resulta do facto de os restantes aminoácidos ficarem distribuídos em diagonal a partir da origem, tornando o processo de identificação, por comparação com padrões mais sujeito a equívocos, tornando indispensável uma purificação prévia da amostra.

### **3.2.2.1.5 - Sistemas de detecção e quantificação**

O sistema de detecção normalmente utilizado é baseado nas reacções colorimétricas já anteriormente referidas. A revelação é conseguida por aspersão<sup>13, 31, 32</sup> do papel com um agente revelador.

A quantificação, inicialmente conseguida recorrendo a um densitómetro<sup>32</sup> era considerada pouco reprodutiva, tem no entanto vindo a sofrer evolução podendo-se hoje em dia quantificar por métodos bastante mais precisos, inclusivamente por utilização do detector de ionização de chama.

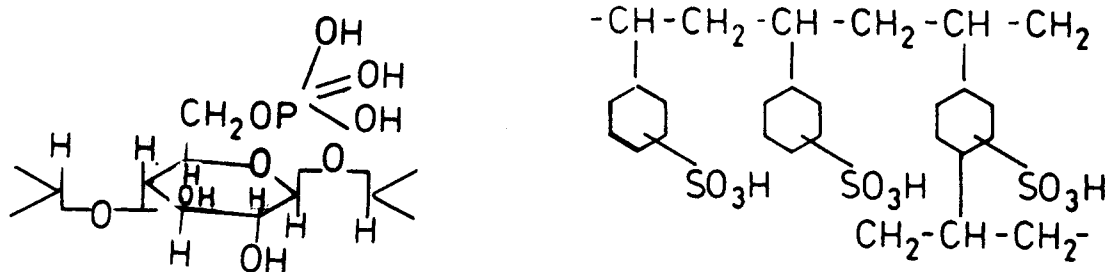
### **3.2.2.2 - Cromatografia de papel de troca-iónica**

A possibilidade de combinar as vantagens da cromatografia de papel convencional, com as vantagens anteriormente referidas da cromatografia de troca-iónica, foi a base do aparecimento deste tipo de cromatografia, a qual apresenta ainda, em relação à cromatografia de papel convencional, a vantagem de trabalhar com solventes aquosos.

A cromatografia de papel de troca-iónica, inclui dois tipos fundamentais, de acordo com a forma como a propriedade de troca-iónica é conferida ao papel utilizado. Na celulose troca-iónica, a característica de trocador-iónico é devida a grupos iónizáveis substituídos na molécula da celulose. Um dos tipos de papel mais

estudado foi o de celulose ligada a um grupo fosfato, já que se apresenta na forma dissociada na gama de pH da maioria das aplicações cromatográficas. É considerado um trocador-iônico forte sendo uma das estruturas possíveis a representada no Esquema 8 A.

Quando pelo contrário a característica de troca-iônica é conferida ao papel por incorporação de trocadores iônicos padrão, temos a cromatografia de troca-iônica em papel impregnado. Se se considerar o papel impregnado por uma resina de poliestireno, obtem-se um trocador iônico monofuncional (Esquema 8 B).



Esquema 8

O primeiro tipo de papel teve pouca aplicação na análise de aminoácidos, se bem que Wieland e Berg em 1952<sup>33</sup> tenham referido a sua aplicação, após aumento do teor carboxílico por oxidação.

O uso de papéis impregnados, pelo contrário, foi largamente utilizado principalmente depois da sua comercialização em 1959<sup>21</sup>.

A separação e quantificação de misturas de aminoácidos em papéis revestidos de Amberlite IRC<sup>34, 35</sup>, um fraco trocador-iônico, foi conseguida com algum sucesso utilizando como solvente butanol:ac. acético:água<sup>36</sup>, se bem que nestas condições seja discutível a vantagem de aplicação do papel de troca-iônica.

Considerando que o problema de falta de sistematização do método se devia principalmente à natureza heterogênea do meio, Knight<sup>21</sup> realiza, então um trabalho bastante completo, em que compara os dois tipos de papel de troca-iônica susceptíveis de ser utilizados, conseguindo estabelecer algumas condições conducentes a uma análise eficiente de aminoácidos por este método. Usando vários "tampões", como solventes de desenvolvimento conse-

que a separação de 16 aminoácidos diferentes, por cromatografia unidimensional.

Na análise de aminoácidos é fundamental a determinação do grau de polimerização. O poder de resolução e a eficiência do cromatograma são largamente afectados pelo grau de polimerização dada a sua influência na selectividade, no grau de penetração do electrólito no trocador e na taxa de difusão dos iões<sup>21</sup>. Cada um destes factores contribui para o aspecto final do padrão das manchas no cromatograma.

Contrariamente ao que sucede em cromatografia convencional, as impurezas da amostra têm pouca importância na eficiência de um sistema deste tipo, já que ele é pouco sensível às modificações externas do meio.

#### **3.2.2.2.1 - Cromatografia bidimensional**

Outra técnica usada com sucesso na análise de aminoácidos é a cromatografia bidimensional, utilizando papel de troca-iónica impregnado. Neste caso realizam-se dois tipos de cromatografia, a primeira é, fundamentalmente, do tipo troca-iónica, e a segunda será uma cromatografia de papel convencional. Na análise de aminoácidos isto é conseguido, já que a sensibilidade dos aminoácidos ao pH permite que as características de troca-iónica do papel sejam eliminadas, se se usarem condições em que os aminoácidos têm a mesma carga dos trocadores.

#### **3.2.2.2.2 - Cuidados no tratamento do papel**

De uma forma geral o papel trocador-iónico é tratado da mesma forma que as resinas de cromatografia utilizadas para cromatografia em coluna; a aplicação da amostra é, de um modo geral, idêntico à cromatografia de papel convencional.



mas devido ao carácter fortemente hidrofílico dos aminoácidos e sua conseqüente fraca solubilidade em solventes orgânicos. A cromatografia em camada delgada em sílica gel (CCD), foi inicialmente utilizada na separação de substâncias lipofílicas, e não se considerava apropriada para a cromatografia de substâncias hidrofílicas como o são os aminoácidos. No entanto, a sua utilização para a cromatografia de aminoácidos não se pode considerar surpreendente já que a sílica gel possui sempre uma percentagem de água embebida.

A técnica de cromatografia em camada delgada pode ser considerada como uma combinação entre a cromatografia em papel convencional (PC) e a cromatografia de adsorção em coluna. A semelhança com a cromatografia de papel resulta, básicamente de se tratar de uma cromatografia planar. De um modo geral pode-se considerar que a maioria das condições referidas para PC, no que diz respeito a aplicação de amostra e seu grau de pureza, escolha do solvente e detecção, são válidas para este tipo de cromatografia. Esta analogia verifica-se apenas quando nos referimos a CCD em sílica gel<sup>37</sup>. CCD apresenta, no entanto, algumas vantagens em relação a PC, nomeadamente menor espalhamento da mancha, quer na zona de aplicação quer durante a cromatografia e, ainda, menores tempos de análise.

A semelhança entre CCD e cromatografia em coluna de adsorção resulta da semelhança entre a fase estacionária - sílica gel - e a fase móvel. Existe, pois, uma identidade quanto ao tipo de cromatografia. Por outro lado, existe uma grande diferença já que em cromatografia de coluna se trabalha apenas em duas fases, uma líquida e outra sólida, e em CCD introduz-se uma terceira fase, gasosa, a atmosfera saturada existente na câmara de eluição.

A placa e a atmosfera da câmara são dos factores mais importantes para que a cromatografia seja reproduzível. O desenvolvimento da técnica de "cromatografia em camada delgada de alta resolução" (HPTLC) baseia-se neste conhecimento. Este tipo de cromatografia recorre a placas de alta resolução, que oferecem um padrão de fluxo de solvente e uma eficiência de separação pré-estabelecido desde que a aplicação da amostra seja adequada, e a câmaras de eluição circulares que permitem uma regularização da

atmosfera da mesma<sup>37</sup>.

### 3.2.3.1 - Problemas específicos da análise de aminoácidos por CCD

A obtenção de valores de Rf reprodutíveis é sempre desejável para que as cromatografias sejam comparáveis. Convém ter em atenção a quantidade de amostra aplicada, que tem sempre grande influência, bem como a presença de substâncias interferentes. Os aminoácidos ácidos, por exemplo, apresentam valores de Rf mais elevados na presença de outros aminoácidos. A cromatografia dos aminoácidos sulfurados põe problemas específicos por estes aminoácidos serem susceptíveis de produzir, por hidrólise, manchas intermédias interferentes sendo pois de aconselhar a hidrólise prévia<sup>39</sup>. A sua dependência destes factores aconselha, sempre que possível, que a cromatografia de uma amostra desconhecida (por exemplo material biológico) seja feita concomitantemente com a cromatografia de uma amostra de padrões.

### 3.2.4 - Métodos de alta resolução - HRC

A aplicação de métodos de alta resolução à análise de aminoácidos veio melhorar significativamente a análise de misturas complexas contendo aminoácidos, pelo aumento de sensibilidade e de resolução conferida por esses métodos.

Dentro dos métodos de alta resolução aplicáveis à análise de aminoácidos podem-se referir principalmente dois tipos, a análise por cromatografia gás-líquido (CGL), e a análise por cromatografia líquido-líquido de alta eficiência (HPLC).

Estas duas técnicas podem ser basicamente descritas do mesmo modo, ou seja, em ambos os casos se pode considerar um fluido, normalmente chamado fase móvel, percorrendo um tubo, a que se chama a coluna, a qual encerra um suporte granuloso, eventualmente impregnado de um líquido, o solvente ou fase estacionária. No início da cromatografia, a mistura a separar é injectada à entrada da coluna, diluída na fase móvel e arrastada ao longo da mesma.

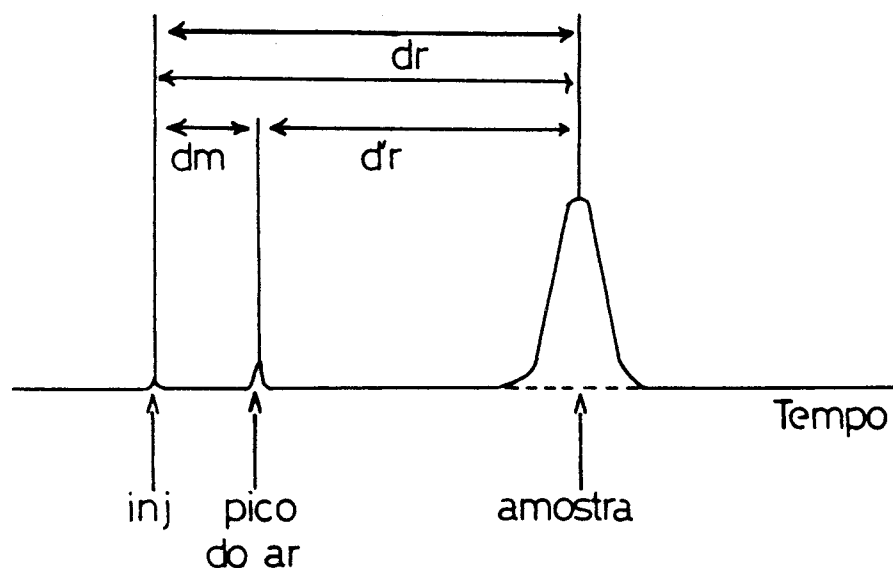


Figura 5: Exemplo de uma separação cromatográfica  
 $d_R$ -tempo de retenção;  $d'_R$ - tempo de retenção real;  $d_m$ -  
tempo morto; inj - ponto de injeção; Comp- amostra a  
cromatografar.

Os constituintes da mistura migram através da coluna a velocidades diferentes. Estas diferenças de velocidade de migração (retenção), são as responsáveis pelo facto de os vários constituintes da mistura saírem a tempos diferentes, conseguindo-se assim a separação.

Na saída da coluna situa-se o detector, que pode ser de vários tipos. O detector recebe um sinal contínuo durante a saída do fluido correspondente unicamente à fase móvel e, durante a saída dos componentes da mistura, vai recebendo um aumento de sinal até atingir um máximo, decrescendo à medida que o componente vai saindo, e assim sucessivamente, obtendo-se no final, em condições ideais, um gráfico, de curvas gaussianas, normalmente chamado cromatograma. No cromatograma, cada componente da mistura é representado por uma forma geométrica o chamado "pico" cromatográfico (Figura 5).

O tempo de saída de cada um dos componentes da mistura, ou de cada "pico", caracteriza qualitativamente cada substância. A área do pico corresponde à quantidade injectada, e detectada

nesse intervalo de tempo. Estes métodos são susceptíveis de fornecer informação qualitativa e quantitativa.

### 3.2.4.1 - Cromatografia gás-líquido

Logo após o advento da cromatografia gás-líquido, a sua aplicabilidade à análise de aminoácidos foi ensaiada e tentada. As vantagens de se conseguir a aplicação da cromatografia gás-líquido ao estudo de misturas complexas de aminoácidos residem na sua alta sensibilidade, velocidade de análise, grande poder de resolução, baixo preço e grande versatilidade, ainda acrescido pela possibilidade de se acoplar a um potente instrumento de análise: o espectrômetro de massa.

Apesar das vantagens enumeradas, a aplicação das técnicas de cromatografia gás-líquido à análise de aminoácidos apresenta problemas, quando comparada com as técnicas clássicas de cromatografia já descritas.

Na realidade, uma das exigências da cromatografia gás-líquido reside no facto de só se poderem analisar compostos que sejam voláteis, ou susceptíveis de ser volatilizados, nas condições de análise.

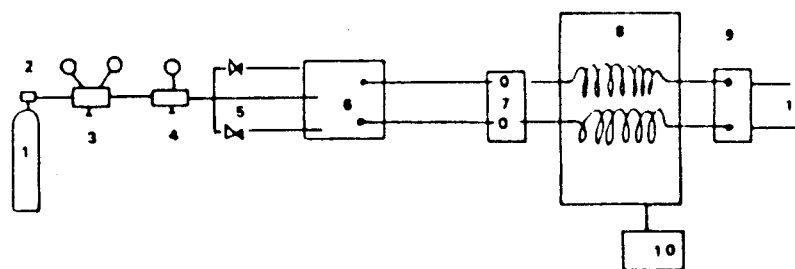


Figura 6: Esquema de um cromatógrafo de gás  
1- Tubo de gás de arrastamento; 2- Válvula;  
3- Manómetro; 4- Manómetro de controle fino;  
5- Controladores de fluxo; 6- fluxímetros;  
7- Injectores; 8- Forno e colunas; 9- Detectores;  
10- Programador linear da temperatura; 11- Saída de sinal para o registador.

Para que os compostos a analisar por cromatografia de gás façam o percurso, anteriormente descrito, no interior da coluna e

portanto a separação ocorra, torna-se necessário que a amostra seja inicialmente volatilizada, já que, neste caso, a fase móvel é um gás (Figura 6) e a amostra tem de ser transportada no seio desse gás. Para ser analisada por cromatografia gás-líquido, uma amostra tem que ser volatilizada nas condições de análise, podendo, pois, considerar-se esta condição como limitativa da aplicabilidade deste tipo de cromatografia.

Nos casos em que as substâncias a analisar, não obedecem a estas condições, caso dos aminoácidos, torna-se necessário recorrer a métodos químicos que os tornem voláteis, ou seja, aos métodos normalmente chamados de derivatização química; a derivatização (em CGL), consiste, pois, num processo de transformação de substâncias não voláteis em derivados voláteis, susceptíveis de serem então analisados por cromatografia de gás.

#### 3.2.4.1.1 - Derivatização de aminoácidos

Dado o seu carácter "zwitteriónico", os aminoácidos não são directamente cromatografáveis em fase gasosa, por não possuírem a necessária volatilidade. Torna-se, pois, necessário bloquear ou remover, por derivatização química, os grupos funcionais ionizáveis, sendo este artifício necessário para reduzir a coesão entre as moléculas, aumentar a volatilidade e estabilizar os aminoácidos contra a decomposição química.

Para que uma reacção de derivatização possa ser utilizada, tem de obedecer a certos requisitos que correspondem ao que se considera uma derivatização ideal<sup>7</sup>:

- Deve formar-se um só derivado por composto.
- É necessário conseguir derivados química e tèrmicamente estáveis.
- A derivatização deve ser completa e reprodutiva dentro de uma gama de concentrações conhecida, e não interferir com outras derivatizações.
- Os reagentes devem ser mais voláteis que os derivados e não devem ser tóxicos.
- Não deve haver interferência de impurezas e outras

substâncias acompanhantes.

- É necessário que os derivados formados tenham uma elevada resposta do detector escolhido, e a máxima volatilidade.

A derivatização química de aminoácidos, em condições ideais, não é, portanto, nem fácil nem linear. Se bem que para alguns aminoácidos seja apenas necessário o bloqueio dos grupos funcionais amina e ácido carboxílico, o problema de derivatização dos aminoácidos com funcionalidade na cadeia lateral, é bastante mais complicado. A dificuldade surge principalmente com os aminoácidos mais difíceis (arginina, com um grupo guanido, histidina, que possui um anel de imidazol, e triptofano, com o grupo indol), cuja derivatização deve ser conseguida sem destruir os restantes derivados dos aminoácidos mais simples.

Os métodos de derivatização analítica de aminoácidos podem ser divididos em dois grupos: métodos para modificação do esqueleto carbonado, e métodos de bloqueamento dos grupos funcionais.

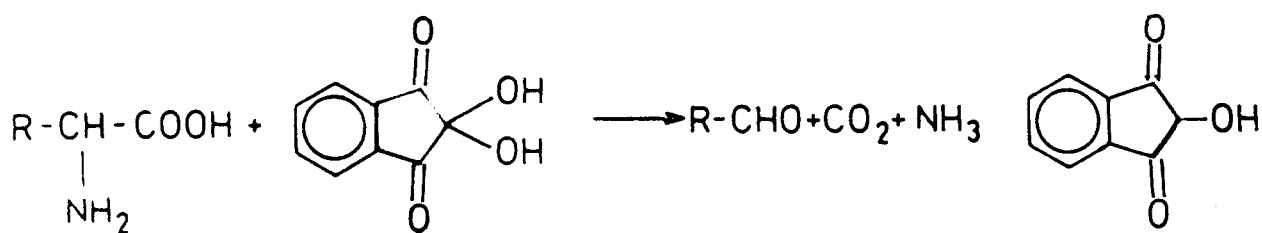
#### **3.2.4.1.1.1 - Derivatização por modificação do esqueleto carbonado**

Dentro desta linha de acção foram estudados diversos métodos para a conversão dos aminoácidos em derivados voláteis, sendo o primeiro método que se conhece, o que envolve a degradação de aminoácidos em aldeídos<sup>40</sup>. Outros métodos consistem na transformação dos aminoácidos em nitrilos<sup>41</sup>, alcoois<sup>42</sup>, hidroxiaácidos<sup>43</sup> e alcoois aminados<sup>44</sup>.

O maior inconveniente desta aproximação é o não serem aqueles métodos adequados à preparação de derivados voláteis de aminoácidos com funcionalidade na cadeia lateral, pelo que o seu uso prático nunca foi muito grande.

#### **3.2.4.1.1.1.1 - Descarboxilação e desaminação para aldeídos ou nitrilos com menos um átomo de carbono**

O primeiro trabalho que usa GC para a análise de aminoácidos sugere a sua transformação em aldeídos utilizando ninidrina<sup>45</sup> (Esquema 9).

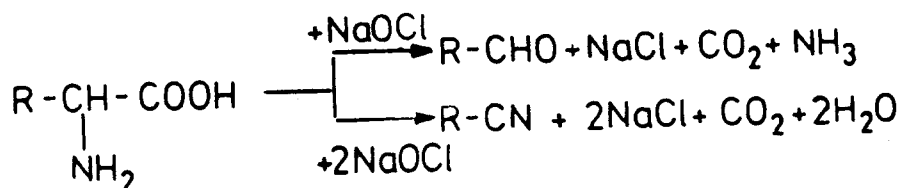


Esquema 9

Apesar do aperfeiçoamento introduzido, que permite a injeção dos aminoácidos directamente no cromatógrafo, ocorrendo a reacção com a ninidrina numa pré-coluna (125-140° C), apenas se conseguiram separar oito aminoácidos. A cromatografia era realizada a 65° C numa coluna de glicerina-silicone<sup>46</sup>.

Quando, após a reacção inicial com ninidrina, os aminoácidos sofriam nova oxidação a ácidos eram cromatografados em coluna de PPG a 150° C.

Além da reacção de oxidação com ninidrina, ensaiaram-se outros agentes de oxidação. O uso de uma solução de hipoclorito<sup>40</sup> como agente oxidativo mostrou-se útil apenas para aminoácidos alifáticos se bem que alguns deles dessem aldeídos idênticos. Mais tarde, foi referido que, se a reacção fosse levada a cabo a pH fixo (10,8), se formariam nitrilos em vez de aldeídos (Esquema 10). Os nitrilos eram igualmente susceptíveis de ser cromatografados. A análise foi efectuada em coluna de DC--550 a 60° C.



Esquema 10

Outros agentes oxidantes foram ainda ensaiadas, como por exemplo hipobromito de sódio<sup>47</sup> ou N-bromosuccinamida<sup>48</sup>. Os aminoácidos eram cromatografados, quer como aldeídos, quer como uma mistura de aldeídos e nitrilos, em concentrações conhecidas. A

cromatografia foi realizada em diversas fases estacionárias.

#### **3.2.4.1.1.1.2 - Descarboxilação a aminas com menos um átomo de carbono**

A descarboxilação enzimática de aminoácidos foi conseguida fazendo-os reagir com, p-dimetilaminobenzaldeído<sup>49</sup>. Os aminoácidos simples e a treonina, serina e lisina dão, por aquecimento, as aminas correspondentes, sendo a percentagem de conversão variável consoante o aminoácido. As dificuldades de quantificação bem como a dificuldade de se encontrar uma fase estacionária adequada tornou difícil a cromatografia destes derivados.

#### **3.2.4.1.1.1.3 - Decomposição por pirólise e análise de dicetopiperazinas**

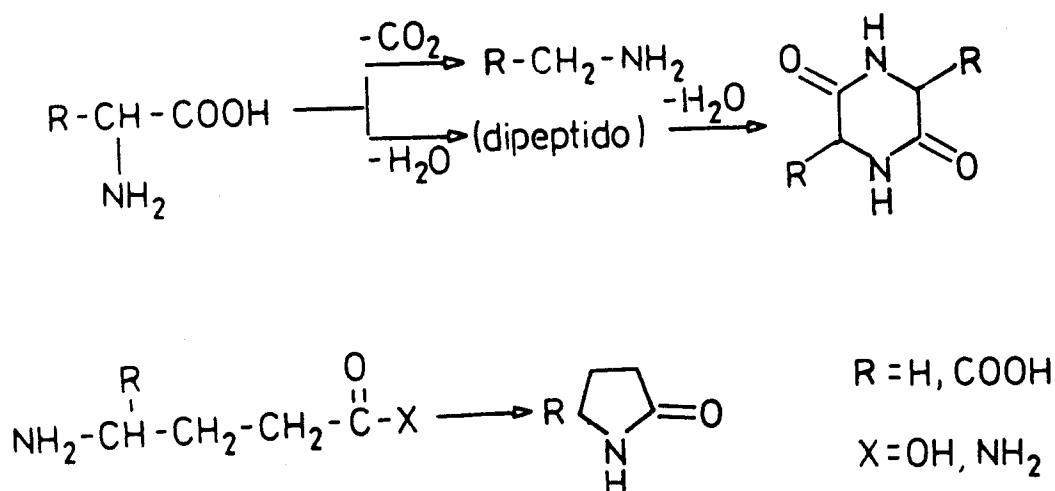
Cada aminoácido produz, por pirólise, um único fragmento volátil, o qual pode ser utilizado para a análise qualitativa e quantitativa. As possibilidades de acoplamento a um espectrómetro de massa foram utilizadas como método de identificação<sup>50, 51</sup>.

Os ensaios realizados tiveram como objectivo verificar se a pirólise era ou não afectada pela presença de mais do que um aminoácido, ou seja, se uma mistura mantém o mesmo comportamento que cada aminoácido separado. Concluiu-se que a presença de um segundo aminoácido influencia a percentagem de certos componentes do pirolisado. A pirólise de proteínas e de misturas de aminoácidos com a mesma composição<sup>52</sup>, deu porém os mesmos resultados.

Verificou-se que, durante a pirólise, aminoácidos proteicos e alifáticos se decompõem predominantemente para dar lugar às aminas correspondentes, ou a uma dicetopiperazina a 3,6 dialquilpiperazina-2,5-diona (Esquema 11 A) consoante sofrem reacção de descarboxilação ou de condensação, dando primeiro um dipeptido seguido de ciclização<sup>52a</sup>.

Por outro lado,  $\beta$  aminoácidos perdem amónia para dar ácidos insaturados enquanto que  $\gamma$  e  $\phi$  aminoácidos dão 2-pirrolidona e 2-piperidona respectivamente (Esquema 11 B)<sup>52a</sup>.





Esquema 11

Como produtos de pirólise, as dicetopiperazinas mostraram-se úteis para a análise por GC. No entanto, por serem moléculas relativamente grandes obrigando a temperaturas acima de 200° C, originavam, nas condições então usadas<sup>53</sup>, picos bastante assimétricos quando cromatografadas em colunas revestidas de silicones. A sililação com N,O-bis(trimetilsiliacetamida)(BSA) 80° C/10 min. produzindo dicetopiperazinas trimetilsililadas nos dois azotos (N,N'-bis(TMS)-DKP) reduz bastante as retenções e consequentemente as temperaturas de eluição melhorando significativamente a cromatografia.

### 3.2.4:1:1:1:4 - Conversão em α-hidroxiácidos (metilados)

A conversão de aminoácidos no correspondente α-hidroxiácido, após tratamento com uma solução de nitrito de sódio em ácido acético<sup>43</sup> ou nitrito de sódio em ácido sulfúrico<sup>54</sup>, seguido de metilação com diazometano, permitiu cromatografar os aminoácidos simples mais serina, aspártico, glutâmico (1º método) e arginina, histidina e lisina (2º processo). Utilizaram-se colunas de empacotamento empregando como fase líquida estacionária silicone DC-550.

### 3.2.4.1.1.1.5 - Conversão em $\alpha$ -cloroácidos (metilados)

O tratamento de aminoácidos com ácido clorídrico concentrado ou ácido nítrico durante 1 hora produz, quantitativamente, os correspondentes  $\alpha$ -cloroácidos que, após metilação, são cromatografados em coluna de empacotamento de polietileno glicol (PEG) a 130<sup>o</sup>55. Os aminoácidos básicos não são cromatografados por este método.

### 3.2.4.1.1.2 - Derivatização por bloqueamento de grupos funcionais

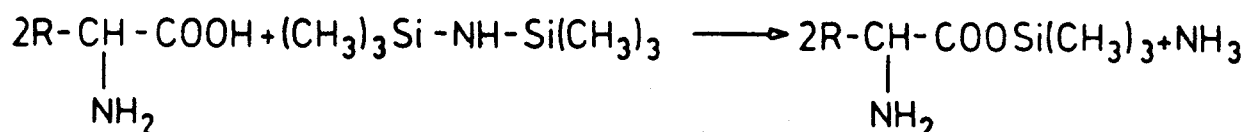
#### 3.2.4.1.1.2.1 - Bloqueamento do grupo carboxilo

A simples esterificação, que conduz ao bloqueio do grupo carboxilo, foi proposta por Bayer et al. em 1957<sup>56</sup>. Os derivados assim formados apresentam, alguns problemas como sejam o serem facilmente degradados por condensação formando-se dicetopiperazinas, e ainda o apresentarem, ao ser cromatografados, acentuado "tailing" devido à presença do grupo amina livre. Foram ainda tentados, além dos ésteres metílicos, ésteres de álcoois mais pesados. A principal diferença reside na diminuição da volatilidade aliada a uma pior solubilidade<sup>57</sup>. O "tailing" acentuado mantém-se nos vários tipos de ésteres ensaiados.

Outro método promissor para a derivatização, envolvendo apenas esterificação, foi proposto por Rulhman et al.,<sup>58, 59</sup> que recorreu à sililação. As condições de reacção têm de ser cuidadosamente controladas e é necessário recorrer a um agente sililante não muito forte, como por exemplo o hexametildisilazano (HMDS), a fim de que a reacção ocorra nas condições requeridas, sem que haja sililação do grupo amina. Estes ésteres foram preparados refluxando os aminoácidos com tolueno e HMDS. A amónia libertada ajuda a impedir a sililação do grupo amina (esquema 12). Nestas condições os grupos hidroxilo da serina, treonina e tirosina são sililados.

As vantagens destes derivados não são grandes, porque não é possível cromatografar os aminoácidos básicos e as condições de

reacção são demasiado rígidas, para evitar a formação de derivados mistos.



Esquema 12

### 3:2.4.1.1.2:2 - Bloqueamento dos grupos amina e ácido carboxílico em reacções separadas

A formação de derivados com os grupos polares totalmente boqueados foi conseguida por Bayer et al.<sup>40</sup>, ao desenvolverem os ésteres metílicos dos derivados trifluoracetilados no azoto. Estes derivados apresentam a vantagem de, além das suas boas características cromatográficas, serem tèrmicamente estáveis.

Os ésteres alquílicos de N-acilaminoácidos, têm sido considerados ideais para a cromatografia de gás tendo sido objecto de estudos detalhados no sentido de se conseguir maior eficiência, menor tempo de análise, com optimização no que respeita ao rendimento e pureza dos produtos. A técnica cromatográfica foi desenvolvida concomitantemente.

#### a) Esterificação

Vários tipos de compostos têm sido utilizados para esterificar o grupo carboxilo. A forma mais usual é a utilização de uma solução de ácido clorídrico em álcool preparada na concentração adequada (1-4 moles), fazendo borbulhar ácido clorídrico no álcool ou formando-o por adição de cloreto de acetilo. Foram ainda tentados outros métodos de esterificação usando ácido bromídrico<sup>60</sup> ou ácido sulfúrico<sup>61</sup> foram ainda tentados. O uso de ácido clorídrico como catalizador, foi normalmente preferido devido à facilidade com que ele é removido da mistura reaccional.

As concentrações de ácido clorídrico recomendadas cobrem normalmente gamas que vão de 1.25 N à saturação<sup>62</sup>. A concen-

tração do catalizador deve aumentar quando se utilizam álcoois mais pesados.

Os ésteres metílicos apresentam, por vezes, problemas de excessiva volatilidade, o que conduz facilmente à perda dos derivados mais voláteis. Álcoois do tipo n-butanol<sup>63</sup>, isopropanol<sup>64</sup>, isobutanol<sup>64, 65</sup>, e isoamílico<sup>66</sup>, permitem circular o problema do excesso de volatilidade mas apresentam, por outro lado, problemas de falta de solubilidade para alguns dos aminoácidos, particularmente lisina, histidina e cistina. A transesterificação, partindo do éster metílico para a obtenção de outros mais pesados, permite circular o problema de falta de solubilidade. A transesterificação põe ainda alguns problemas de afinação da temperatura, sendo, nesta reacção, a temperatura, mais do que o catalizador, o problema fundamental.

A transesterificação foi eliminada recorrendo à ultrasonicação durante 15 min, conseguindo-se assim que a cistina, inclusive, fosse esterificada<sup>67</sup>. Utilizou-se butanol a 100°C;

A derivatização recorrendo a diazometano, foi também ensaiada. A sua utilização como primeiro passo de derivatização não é aconselhável pois a simples evaporação da fracção éterea do diazometano, à temperatura ambiente, conduz à perda dos derivados mais voláteis da alanina, glicina, e valina.

## **b) Acilação**

A forma mais usual de eliminar a polaridade do grupo amina, bem como dos outros grupos funcionais da cadeia lateral, é a acilação.

As reacções de acilação são, geralmente, levadas a cabo com anidridos, excepcionalmente com outros dadores de acilo (tais como o ácido trifluoracético<sup>68</sup>).

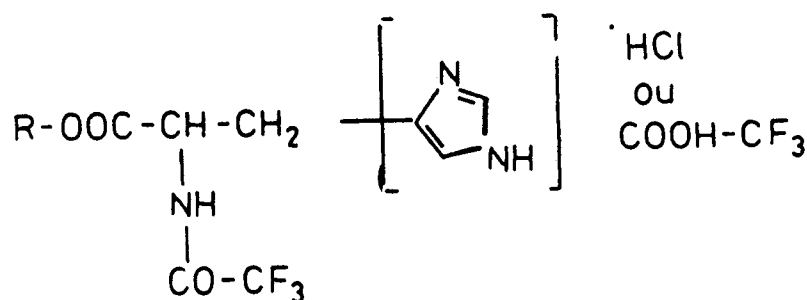
Os anidridos responsáveis por análises de rotina quantitativamente reprodutíveis, são o trifluoracético (TFAA)<sup>69</sup> pentafluorpropiónico (PFPA)<sup>70</sup> e heptafluorbutírico (HFBA)<sup>71</sup> e ainda, em alguns casos, o anidrido acético.

O anidrido trifluoracético, tem provado ser um potente agen-

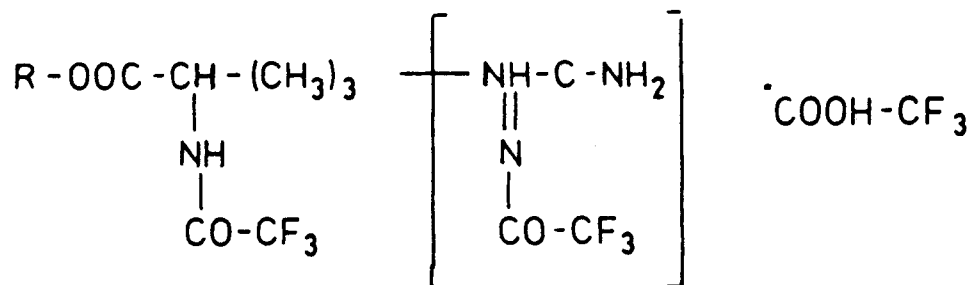
te acilante, para acilação de todos os grupos excepto carboxilo, podendo ser injectado directamente sem evaporação. Este tipo de injecção apresenta a vantagem de evitar a destruição da acilação de alguns grupos, nomeadamente hidroxilo e mercapto, evitando ainda as percas de alguns aminoácidos mais voláteis, o que se verifica principalmente quando se trabalha com ésteres metálicos. É conveniente o uso de álcoois mais pesados quando se usa TFAA como agente acilante<sup>72</sup>.

O anidrido heptafluorbutírico é o que tem dado melhores resultados. Tem provado ser um agente acilante forte e ao mesmo tempo capaz de formar derivados estáveis. É possível a evaporação antes da injecção sem que se verifiquem percas<sup>73</sup>.

Os derivados HFB são mais voláteis do que os TFA e permitem a análise numa só coluna cromatográfica<sup>73, 74</sup>. Possuem resposta elevada para ECD permitindo, quando se usa este detector, analisar quantidades da ordem dos subpicomoles<sup>75</sup>.



N<sup>ε</sup>-TFA-His alkyl ester (sal)

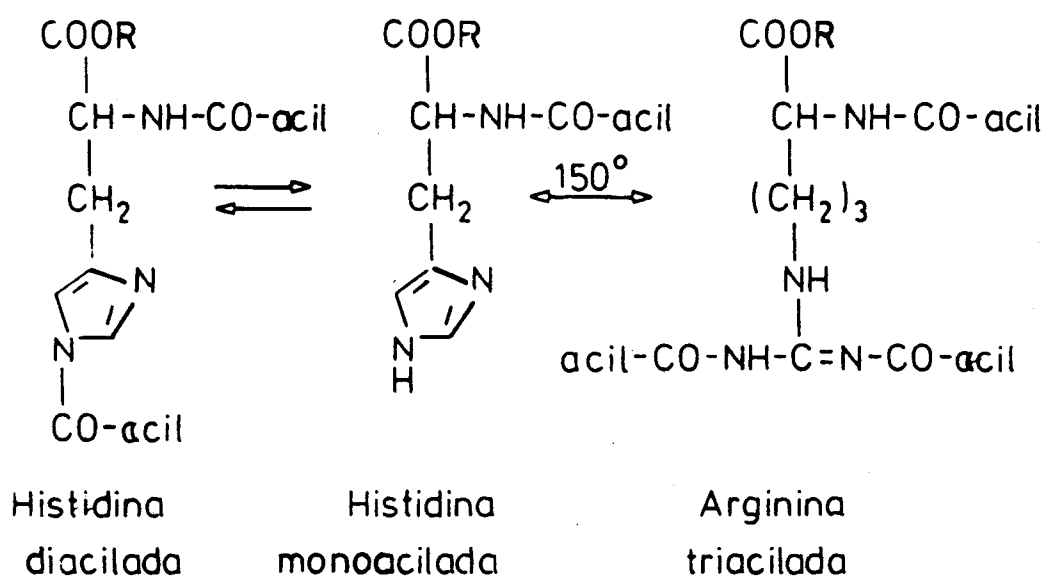


diacyl-Arg alkyl ester (sal)

Esquema 13

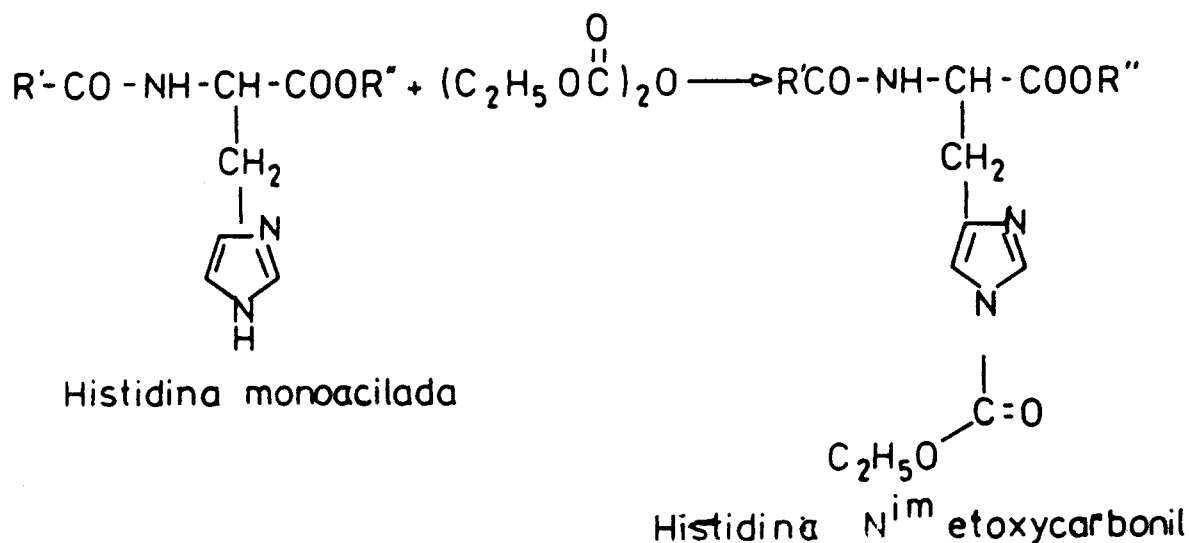
A acilação com qualquer destes anidridos pode decorrer à temperatura ambiente para a maioria dos aminoácidos, sendo no entanto necessário usar temperaturas de 150° durante pelo menos 5min. para acilar a arginina, e conseguir o derivado diacilado da histidina<sup>61</sup>. As dificuldades na acilação destes dois aminoácidos, resultam, da formação, durante a esterificação, dos respectivos cloridratos (do grupo guanidino e imidazol) (Esquema 13). A formação do sal reduz a volatilidade e impede a acilação completa<sup>61</sup>.

O aquecimento a 150° consegue, normalmente, provocar a formação do derivado triacilado da arginina e do diacilado da histidina, se bem que este último seja muito instável e, por vezes, acabe por ser convertido no monoacilado, por simples evaporação, dando origem a um pico mais retido e mal formado (Esquema 14). A coinjecção com excesso de anidrido, provocando uma acilação no injector, tem sido indicada como suficiente para evitar este problema<sup>73, 74</sup>. Esta prática não é recomendada em cromatografia de gás capilar por provocar um desgaste demasiado da coluna.



Esquema 14

As tentativas de resolver os problemas de acilação destes dois aminoácidos, histidina e arginina, os mais difíceis, têm sido várias. Como mais significativos podem referir-se os métodos que envolvem a produção de uma base livre, quer por troca-iónica quer por neutralização com carbonato alcalino<sup>76</sup>, a conversão enzimática da arginina a ornitina e a ozonólise de histidina a aspártico<sup>77</sup>. Mais recentemente a conversão da histidina no derivado derivatizado no azoto imidazólico, apesar de facilitar a obtenção do derivado totalmente bloqueado<sup>78</sup> (Esquema 15) apresenta como principal inconveniente a introdução de um passo adicional na derivatização. O uso de ésteres alquílicos de N-etoxicarbonil aminoácidos foi explorado no âmbito do presente trabalho, a fim de avaliar as suas potenciais vantagens<sup>79</sup>, tal como adiante se descreve.



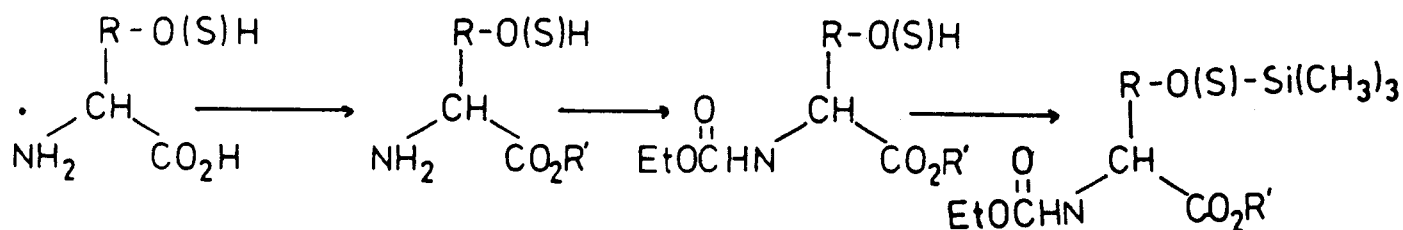
Esquema 15

### c) N-etoxicarbonilação

O grupo amina pode ainda ser bloqueado recorrendo ao uso de Isobutilcloroformiato (IsoBoc)<sup>80</sup>. Esta reacção converte todos os aminoácidos proteicos, excepto arginina, nos correspondentes N-isobutoxicloroformiatos. Após esterificação com diazometano são cromatografados recorrendo-se a um sistema de duas colunas uma de 0,65% Poly-A-101A e outra de 0,70% FFAP Poly-A-101A<sup>80</sup>. Argi-

nina só é cromatografada após conversão em ornitina por meio de arginase.

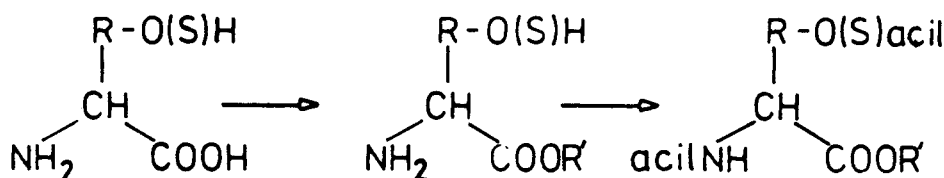
Apesar de o sistema ser bastante reprodutível e os derivados apresentarem bons factores de resposta o uso de duas colunas torna-o pouco prático. No decorrer do presente estudo, foi desenvolvido um método envolvendo esterificação do grupo carboxilo com álcool isopropílico e o bloqueamento do grupo amina com clorofor- miato de etilo (Esquema 16), sendo neste caso os derivados cromatografados numa só coluna de FFAP ou alternativamente em OV-101 após trimetilsililação dos grupos OH e SH das cadeias laterais<sup>79</sup>.



Esquema 16

Se bem que a derivatização completa da histidina e arginina se possa considerar problemática, a derivatização segundo o esquema esterificação/acilação, conducente à formação de ésteres alquílicos de aminoácidos N-acilados, é considerado como o método mais capaz de produzir derivados "ideais" para cromatografia gás-líquido de aminoácidos (Esquema 17).

Apesar das boas características cromatográficas dos ésteres N-HFB, têm sido referidos na literatura diversos tipos de derivados utilizando vários agentes capazes de bloquear os grupos amina e carboxilo:



Esquema 17



No Quadro III pretende-se, sem exaustão, referir os vários tipos de derivados já utilizados na cromatografia de gás de aminoácidos, e que visam a derivatização por bloqueamento dos grupos funcionais.

### Quadro III

Derivatização de aminoácidos por bloqueamento dos grupos funcionais em mais de um passo de derivatização

Processo	Refª	Comentário
ésteres N-formilmetilisobutílicos	81	Derivados com tempos de retenção muito longos e má resolução principalmente quando comparados com os correspondentes ésteres N-acetilados
ésteres N-dinitrofenilmetílicos	82 83	Os derivados N-DNP foram usados principalmente para se poder fazer uso de algumas características especiais de detecção como p.e. ECD ou NPD. Pelo seu alto peso molecular exigem temp. acima de 200°C. His Ser Thr bem como os básicos não foram detectados pois decompõe-se na coluna e/ou são pouco voláteis.
ésteres N-dietilfosforilmetílicos	84	Reacção à temperatura ambiente mas não quantitativa; grande sensibilidade quando se usa o NPD.
ésteres N-tiocarbonilpropílicos	85	Leu-Ile não separam; Arg não derivatiza; os restantes dão bons espectros de MS. His é derivatizada no imidazol; Trp não é no indol de forma reprodutível. Derivatização envolve quatro passos.
Formação de bases de Schiff, ésteres N,N-dimetilmetílicos	86	Derivados demasiado voláteis levando a percas dos AA mais voláteis, Ala, Gly, Val e Leu
ésteres N-isobutildieno N-neopentildieno N-benzildieno etílicos ou metílicos	87	Amajoria dos AA excepto His, Arg, Trp, Tyr e Hyp foram separados em Carbowax 1540. O rendimento da derivatização varia entre 50-90%

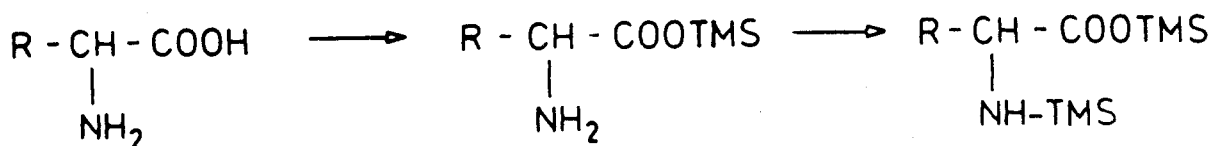
### 3.2.4:1.1:2.3 - Bloqueamento dos grupos funcionais num só passo de derivatização

O recurso a métodos que envolvam apenas um passo de derivatização é tentador, não só em termos de tempo de reacção como principalmente por se eliminarem passos intermédios de preparação. A sililação é capaz de bloquear, num só passo, os grupos amina e carboxilo, bem como os grupos funcionais da cadeia lateral.

O sucesso da sililação como método de derivatização num único passo, depende fortemente da potência do agente sililante, e da sua aptidão para sililar ou não o grupo amina.

As primeiras reacções de sililação tentadas para a derivatização de aminoácidos utilizaram como agentes sililantes hexametildisilazano (HMDS) e trimetilclorosilano (TMCS), cuja capacidade como dadores do grupo silil não é muito elevada. O aparecimento de dialquilaminas sililadas- trimetilsilildietilamina e (TMSDEA) trimetilsilildimetilamina (TMSDMA)- e amidas sililadas do ácido acético, - N,O- bis (trimetilsililacetamida) (BSA) e N-metil N-trimetilacetamida (MSA) bem como dos correspondentes derivados de trifluoracetamida - bis silil trifluoracetamida (BSTFA) e N-metil-bis(trifluoracetamida) (MSTFA) foi gradualmente facilitando a sililação total dos aminoácidos.

Após os primeiros trabalhos de Ruhlman et al.<sup>88, 89</sup> que usaram vários agentes sililantes, TMCS, HMDS e TMSDEA, concluiu-se que o mecanismo da sililação decorria normalmente em duas etapas, sendo o grupo carboxilo bloqueado primeiro que o grupo amina (Esquema 18).



Esquema 18

De acordo com o esquema de sililação descrito por Ruhlman, é facilmente compreendido que, se a reacção não decorrer em con-

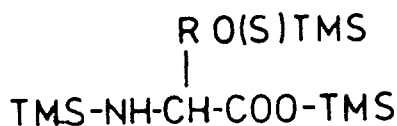
dições extremamente favoráveis, a formação de derivados mistos é muito fácil.

A sililação do grupo carboxilo com sililantes fracos tais como HMDS e TMCS decorre sem problemas, enquanto que os grupos OH e SH requerem sililantes mais fortes, sendo ainda os grupos amina e guanidino os mais difíceis de sililar. Os grupos sililados da molécula dos aminoácidos são diferentemente estáveis: o grupo N-TMS é considerado bastante instável, susceptível de ser hidrolizado facilmente, o grupo O-TMS é relativamente estável e os grupos COO-TMS apresentam estabilidade intermédia.

O uso de amidas sililadas como agentes de sililação consegue a sililação estável de todos os aminoácidos proteicos, à excepção de arginina, triptofano e cistina<sup>90</sup>. A introdução de BSA<sup>91</sup> e BSTFA<sup>92</sup>, dadores de sililo cerca de cinquenta vezes mais fortes que os anteriores, simplificou ainda mais a reacção.

Usando BSA como sililante foi possível preparar derivados de 22 aminoácidos por aquecimento quase à ebulição. Não se obtiveram derivados mistos. Esta reacção decompõe arginina. A glicina e a alanina ficam debaixo do pico correspondente a um dos produtos da reacção, a N-trimetilsilil acetamida. Quando se usou BSTFA em acetónitrilo, a cromatografia de alanina e glicina já foi possível<sup>92</sup>.

As reacções de sililação foram sujeitas a estudo detalhado<sup>93</sup>, e estabelecidas as condições exactas de reacção. Conseguiu-se a separação cromatográfica de 20 aminoácidos proteicos sob a forma de ésteres sililados N-trimetilsililados (Esquema 19), utilizando uma única coluna cromatográfica com enchimento do tipo silicone<sup>94, 95</sup>. A dificuldade da sililação de modo a obter um só derivado para cada aminoácido foi demonstrada. As condições de reacção e o solvente são extremamente importantes para a não obtenção de derivados mistos<sup>96</sup>.



Esquema 19

O número de picos correspondentes aos derivados trimetilsililados de glicina e arginina depende da polaridade do solvente. Estudaram-se solventes<sup>96</sup> de diferentes polaridades e concluiu-se que os solventes mais polares são os principais responsáveis pelo aparecimento de dois derivados para a glicina, correspondentes ao derivado monosililado (COO-TMS) e ao derivado disililado no átomo de azoto (TMS-N-TMS). Por outro lado, a arginina não derivatiza com quatro dos solventes menos polares estudados e apresenta apenas um derivado, correspondente ao derivado trisililado, com os solventes mais polares.

Estabeleceram-se o tempo e as condições de reacção mais favoráveis para a sililação de aminoácidos, considerando-se que seria de 150°C 15 min. com BSTFA:CH<sub>3</sub>CN (1:1) para 17 dos aminoácidos proteicos e 150°C 2.5 h para glicina, arginina e ácido glutâmico<sup>97</sup>.

Os aminoácidos persililados são considerados muito sensíveis à exposição ao ar e susceptíveis de sofrer decomposições na coluna dependendo fortemente do enchimento e da desactivação. O uso de colunas capilares implica uma forte desactivação da mesma. Dado o uso de capilares inertes e fortemente desactivados ser relativamente recente<sup>98</sup> estes derivados não foram usados para cromatografia capilar 1).

#### 3.2.4.1.2 - O tratamento da amostra

A cromatografia gás-líquido de aminoácidos em amostras de natureza biológica envolve, obrigatoriamente, um passo prévio de purificação da amostra, para eliminação de todos os componentes susceptíveis de interferir com a análise cromatográfica e/ou a derivatização. A purificação da amostra é normalmente feita por cromatografia de troca-iónica em resinas fortemente ácidas após desproteínização<sup>7</sup>.

1) Já depois de terminado este trabalho, introduzimos um novo tipo de derivados sililados usando um agente sililante mais potente N-(*tert*butildimetilsilil)-N-metil-trifluoracetamida (MTBSTFA)<sup>99</sup>. Os derivados formados provaram ser estáveis, possuir elevado factor de resposta além de possuírem espectros de massa característicos, sendo pois ideais para análise por GCMS. Não se observou a formação de derivados mistos.

Consideram-se dois pontos, em que as percas são mais fáceis de ocorrer, a purificação e a derivatização. Após a derivatização surge nova fonte de erro, já que os derivados, agora voláteis, podem facilmente sofrer perdas durante a evaporação dos solventes e reagentes de derivatização. Em ésteres metílicos as percas por evaporação são geralmente grandes. O recurso à interesterificação e mais tarde à esterificação com alcoois mais pesados<sup>63-67</sup>, permitiu circular este problema. As percas durante a evaporação aumentam ainda com a temperatura a que a evaporação é realizada. Foram feitos ensaios no sentido de se saber qual a relação óptima temperatura/tempo de evaporação<sup>97</sup>.

### 3.2.4:1.3 - A escolha do padrão interno

A escolha do padrão interno, bem como a altura do processo em que ele deve ser adicionado à amostra deve também obedecer a certos requisitos. O padrão interno vai principalmente servir para tornar fiável o processo de quantificação pelo que ele deve poder controlar as percas susceptíveis de ocorrer durante todo o processo de preparação da amostra. Numerosos compostos têm sido aconselhados para ser utilizados como padrão interno para a análise quantitativa de aminoácidos, sendo os aminoácidos não proteicos os mais utilizados. Dentre estes escolheu-se a ciclo-leucina e/ou a norleucina por não existirem nas amostras em estudo, serem quimicamente semelhantes aos compostos a dosear, e portanto susceptíveis de sofrer perdas semelhantes durante o processo de preparação e derivatização da amostra.

Ultimamente, e com o aparecimento de fases quirais de elevada estabilidade térmica, que permitem a separação enantiomérica de aminoácidos em tempos de análise relativamente curtos e com elevada reproducibilidade, tem tomado relevo o método proposto por Frank et al.<sup>100</sup>, que propõe o uso do enantiómero D de cada aminoácido como padrão. Este método, "enantiomeric labelling", tem a vantagem de ambos os enantiómeros sofrerem exactamente as mesmas perdas e quebras durante todo o processo físico e químico de preparação da amostra e mesmo durante o processo cromatográfico pròpriamente dito, tendo como única desvantagem o obrigar a

duas análises nos casos em que o enantiómero D está, ou possa estar, presente na amostra.

### 3:2:4.1:4 - A detecção

#### 3:2:4:1:4:1 - O detector de ionização de chama - FID

O detector normalmente utilizado para a análise de aminoácidos tem sido o detector de ionização de chama (FID) (Figura 7). A resposta do FID é proporcional ao número efectivo de átomos de carbono, com um desvio de aproximadamente 7%. Neste detector, o efluente da coluna é ionizado, e posteriormente colectado por dois electrodos sendo a corrente que daí resulta transformada em tensão pelo electrómetro.

O mecanismo da formação dos iões não é ainda totalmente conhecido. Admite-se que o processo se desenvolva em duas etapas, sendo num primeiro estado, os compostos orgânicos partidos numa zona aquecida formando radicais do tipo  $\text{CH}^\bullet$ ,  $\text{CH}_2^\bullet$ ,  $\text{CH}_3^\bullet$ . Esta reacção decorre ao abrigo do ar. Os iões são formados num passo seguinte por ionização química com o oxigénio. Os iões assim formados, reagem rapidamente numa atmosfera saturada (Esquema 20).

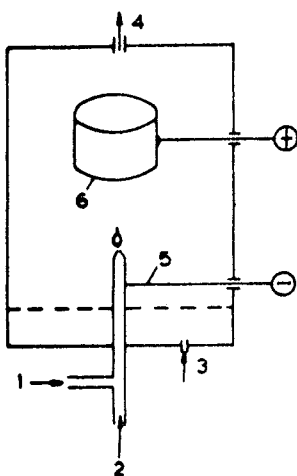
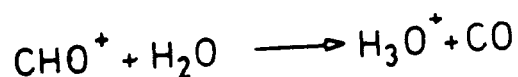
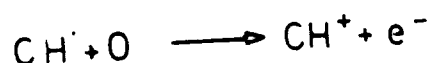


Figura 7: Detector de ionização de chama. 1- Entrada de hidrogénio; 2- entrada da coluna; 3- entrada de ar; 4- abertura para a atmosfera; 5 e 6- electrodos colectores.



#### Esquema 20

O problema principal do uso do FID na análise de produtos naturais, e consequentemente de aminoácidos, reside no facto de ele ser pouco selectivo ou seja, responder a todos os compostos que contenham carbono, pelo que, não só os aminoácidos são detectados, como também todos os restantes contaminantes orgânicos.

#### 3:2:4.1:4:2 - O detector termo-iónico - NPD

Muito útil na análise de aminoácidos seria ainda o detector termo-iónico (NPD) (fig. 8). Este detector possui grande sensibilidade e selectividade acrescida para compostos contendo azoto e/ou fósforo na molécula. A sua resposta depende, principalmente, do número de átomos de azoto ou fósforo presentes na molécula, se bem que ainda seja influenciada por outros factores tais como a estrutura química do composto, o desenho do detector e parâmetros operacionais.

O funcionamento deste detector diferencia-se do FID pela presença de um composto alcalino (sal ou silicato) na chama ou perto dela, havendo deste modo uma emissão de átomos ou de iões alcalinos que estão na base da selectividade do detector (Figura 8).

Alguns detectores deste tipo apresentam grandes flutuações de linha de base, por vezes uma queda contínua quando se trabalha em temperatura programada, com as variações de fluxo e velocidade do gás de arrastamento. O "tip" ou "pastilha" são bastante sensíveis ao envelhecimento e posição obrigando a determinações frequentes dos factores de resposta. Estes inconvenientes podem ser em parte controlados utilizando o controle de fluxo em vez do

usual controle de pressão<sup>101</sup>, ou trabalhando com fluxos de gás bastante mais elevados. Nestes casos, se bem que a estabilização seja muito facilitada, o NPD reage practicamente como um FID perdendo toda a sua especificidade.

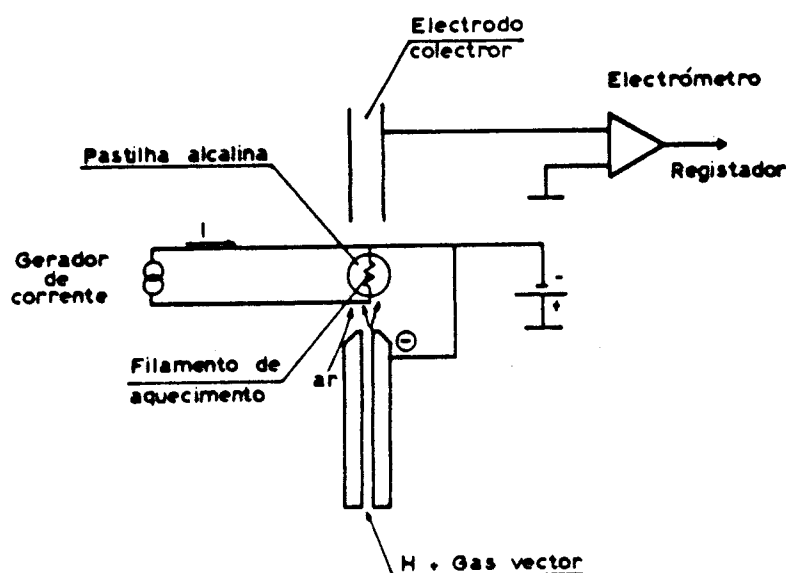


Figura 8: O detector termo-iônico

A resposta mais elevada do NPD, em relação ao FID na análise de aminoácidos, não é constante para todos eles. Foram referidos valores de aumento de resposta da ordem de 3.5 para a fenilalanina e valina e 21.9 para a glicina<sup>102</sup>. Estas diferenças de selectividade são devidas às diferentes afinidades do detector para os vários aminoácidos. Os valores elevados de glicina, comparativamente ao FID, são resultado da mais baixa resposta que este aminoácido tem do FID, visto que teóricamente as respostas molares de todos os aminoácidos simples deveriam ser de 1 pois só possuem um único átomo de azoto. A principal vantagem deste detector reside, sim, no facto de não se detectarem impurezas, não azotadas ou fosforadas<sup>103</sup> pelo que, os "usuais" picos contaminantes, por exemplo de resinas mal regeneradas ou mesmo de



agente esterificante velho, não aparecem na detecção facilitando deste modo quer a detecção quer a sua quantificação.

Operando em condições ligeiramente diferentes, o NPD pode tornar-se bastante selectivo para compostos contendo fósforo, tendo este aspecto sido testado na análise de aminoácidos, para a detecção de derivados N-dietil fosforados<sup>84</sup>.

### 3:2:3:1:4:3 - Detector de captura de electrões - ECD

Um outro detector também útil na análise de aminoácidos, quando derivatizados como ésteres HFB ou PFP<sup>104</sup> e oxazolidinonas<sup>105</sup> por exemplo, tem sido o detector de captura de electrões (ECD) (Figura 9). Este detector exhibe grande resposta para compostos contendo átomos electronegativos ou halogéneos.

No funcionamento deste tipo de detector, uma fonte radioactiva emitindo partículas  $\beta$  ioniza o gás vector, atravessando a célula onde estão contidos os eléctrodos, os quais criam um campo eléctrico. Se um composto, tendo grandes afinidades para os electrões, for eluído da coluna, ele vai captar o electrão à passagem o que faz diminuir a corrente: esta variação da corrente é registada.

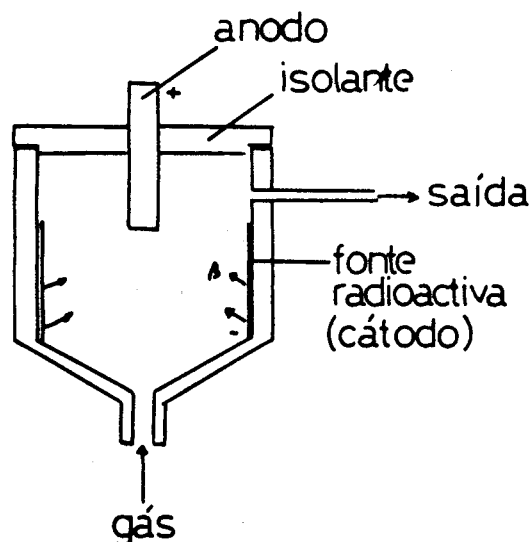


Figura 9: Detector de captura de electrões

Na análise de aminoácidos, o aumento de sensibilidade esperado com este tipo de detector, vai depender principalmente do aminoácido e do derivado. Quando se utilizam as oxazolidinonas, tem-se notado que os aminoácidos alifáticos histidina e triptofano, são menos sensíveis, enquanto que aminoácidos contendo enxofre são bastante sensíveis, bem como a fenilalanina pela presença do anel aromático<sup>105</sup>. Muito sensíveis são também os aminoácidos básicos e os diaminocarboxílicos devido à introdução na molécula de dois anéis de oxazolidinona. Resultados semelhantes se encontram com os N- O(S)-HFB isobutíricos<sup>104, 105</sup>.

A utilização deste detector apresenta alguns problemas de operação, como sejam o aumento do "drift" da linha de base, que dificulta a análise de alguns aminoácidos, principalmente os mais pesados, quando se trabalha com derivados pouco voláteis. A sensibilidade deste detector diminui bastante quando se usam colunas empacotadas, por haver percas por adsorção no suporte da coluna. A aplicação de capilares desactivados modifica e melhora o sistema sendo o único modo de obviar as percas por adsorção.

### **3:2:4:2 - Cromatografia gás-líquido de alta resolução (HRGC)**

A aplicação da cromatografia gás-líquido capilar à análise de aminoácidos veio melhorar significativamente a resolução e possibilidade de análise de aminoácidos usando uma só coluna. Para o sucesso da análise e quantificação de aminoácidos por cromatografia capilar, há que ter em atenção o cumprimento de alguns pontos, alguns comuns à cromatografia de empacotamento e outros inerentes à de cromatografia capilar:

Os cuidados comuns às duas técnicas são, a derivatização completa de todos os aminoácidos, com atenção especial para os mais difíceis: histidina, arginina e cistina, a eluição completa de todos os derivados, a utilização de sistemas em vidro para evitar percas por adsorção, a manipulação ao abrigo do ar, especialmente quando se utilizam derivados sensíveis e a escolha criteriosa do padrão interno bem como determinações frequentes dos factores de resposta.

No respeitante aos cuidados especiais respeitantes à técnica de cromatografia capilar há que ter especial atenção com o sistema de injeção e o tipo de coluna e sua actividade.

### 3.2.4.2.1 - O sistema de injeção

A técnica de injeção mais divulgada, dada a sua simplicidade, em cromatografia capilar é a chamada de repartição "splitting", na qual parte da amostra, após vaporização no injector, entra na coluna e outra parte (que depende da relação de repartição) é desprezada (Figura 10).

$$\text{Relação de Splitter} = \frac{\text{Débito do repartidor}}{\text{Débito na coluna} + \text{Débito no repartidor}}$$

Os principais problemas que se põem neste tipo de injeção são a discriminação dos compostos de menor volatilidade<sup>106</sup>, a vaporização da amostra na agulha da seringa de injeção e o fluxo reverso ("backflush") da amostra por aumento excessivo da pressão no injector provocado pela vaporização mais ou menos explosiva da amostra na câmara de injeção. Todos estes factores contribuem para a modificação das concentrações relativas dos componentes da amostra à entrada na coluna. A este conjunto de efeitos adiciona-se ainda a alteração da relação de repartição, no momento da injeção, em relação à previamente fixada<sup>107</sup>.

A necessidade de uma técnica de injeção especial resulta de, normalmente, se usarem amostras pouco concentradas e, principalmente, de as colunas capilares trabalharem com baixas velocidades de gás de arrastamento (0.5 - 4ml/min)<sup>108</sup>, e possuírem pequena capacidade.

Não sendo a injeção com repartidor ideal foram desenvolvidas formas alternativas de injeção. A injeção a temperatura programada, por exemplo, pretende evitar as perdas por vaporização da amostra na seringa (injectando a baixa temperatura). O aumento brusco de temperatura necessário para a vaporização subsequente da amostra no injector, conduz por vezes a outro tipo de

discriminação, desta vez dos componentes mais voláteis, devida à falta de homogeneidade do aquecimento do injektor<sup>106</sup>.

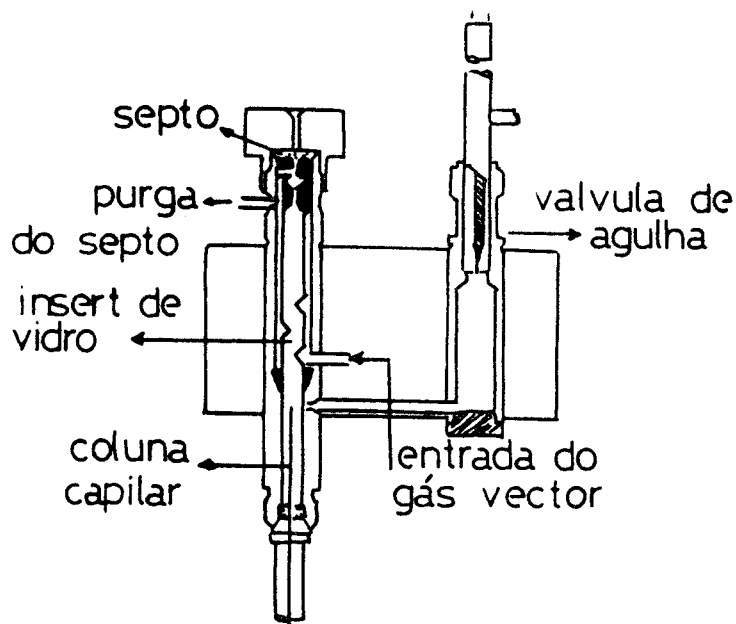


Figura 10: Injektor do tipo repartidor ("splitter")

Para obviar este inconveniente, foi proposta uma outra técnica de injeção - agulha fria - em que apenas a agulha é aquecida. Após a injeção, a amostra entra num injektor aquecido à temperatura requerida para a vaporização instantânea. Não há, neste caso, problemas de falta de homogeneidade do aquecimento já que ele é imediato.

Além destas duas formas de injeção, que podem ser utilizadas com ou sem repartidor, surgiu ainda outra forma de injeção sem repartidor ("splitless")<sup>107</sup>. A técnica de injeção sem repartidor, como o nome indica, não utiliza a relação de repartição, toda a amostra injectada entra na coluna. Esta técnica é hoje recomendada juntamente com a injeção com agulha fria para evitar vaporizações selectivas na agulha, que são no entanto inevitáveis<sup>109</sup>.

Antes da introdução dos sistemas de injeção na coluna ("on column") a injeção sem repartidor foi referida como sendo a forma mais aceitável para a injeção de amostras pouco concentra-

das, compostos eluindo muito perto da frente do solvente - muito voláteis - compostos termicamente estáveis e compostos muito polares<sup>110</sup>. Os sistemas de injeção na coluna (Figura 11) têm também sido referidos como adequados para a injeção de amostras pouco concentradas<sup>111</sup>, mas têm o inconveniente de a amostra vaporizar na coluna, havendo portanto um desgaste grande da parte inicial da coluna provocando desdobramento de pico ("peak splitting") e uma sobrecarga da coluna.

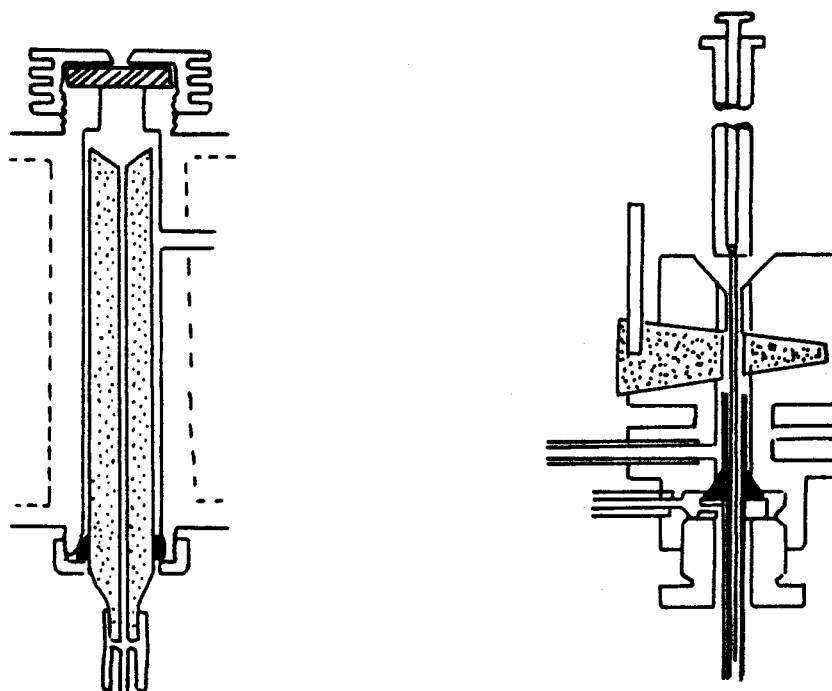


Figura 11: Esquema de injetores para injeção na coluna ("on column"). A- normal; B- injeção a frio

Outra técnica de injeção também utilizada em cromatografia capilar, é a técnica chamada de agulha móvel ("moving needle") (Figura 12).

Este tipo de injetores consiste numa agulha em vidro (desativada por sililação) na ponta da qual é colocada, com a ajuda de uma seringa normal de injeção, uma gota da amostra a cromatografar. O solvente é evaporado nesta altura (50°) e imediatamente após evaporação do solvente a agulha é deixada cair no injetores aquecido sendo introduzido imediatamente até à entrada da coluna evitando-se assim os volumes mortos<sup>111</sup>.

Esta técnica de injeção apresenta, tal como as outras,

algumas vantagens e alguns inconvenientes. Como vantagens podemos referir a concentração das amostras muito diluídas e a não injeção do solvente e de voláteis, conseqüentemente a não deterioração da extremidade da coluna (como acontece em "on column"). Não há também contaminação por aquecimento do septo a alta temperatura pois ele é mantido frio.

Como inconveniente há que referir a fragilidade do sistema (todo em vidro), a falta de automatização, a perda de voláteis e a dificuldade de conseguir o ponto de junção das duas agulhas.

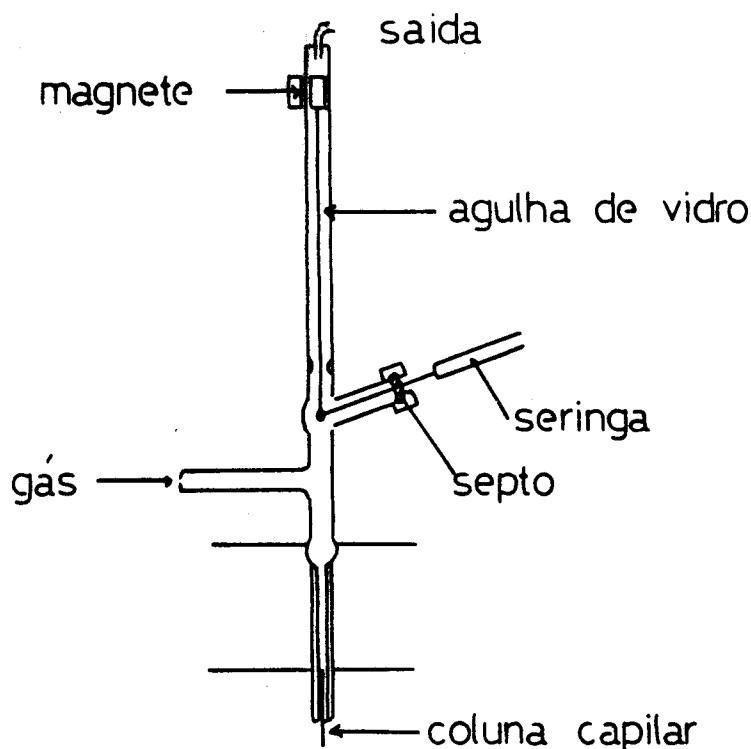


Figura 12: Esquema de um injetor do tipo "agulha móvel"

A procura de métodos alternativos de injeção, utilizáveis em cromatografia capilar, põe-se com bastante acuidade na análise de misturas biológicas complexas, pois nestes casos trabalha-se geralmente com amostras pouco concentradas e contendo compostos com temperaturas de volatilização muito diferentes, pondo-se por isso, com alguma intensidade, os problemas de discriminação por volatilização selectiva no injetor:

### 3:2:4:2:2 - A separação cromatográfica

A escolha da fase estacionária adequada põe-se principalmente quando se fala de cromatografia em colunas de empacotamento, em que a polaridade das fases e a sua selectividade é importante dadas as baixas eficiências destas colunas:

Neste tipo de cromatografia são normalmente utilizadas colunas com comprimentos entre 1 a 3 metros (2000 - 4000 pratos teóricos). Preferencialmente utilizam-se colunas de vidro de forma a evitar a destruição dos derivados por contacto com o metal, sendo ainda fundamental a escolha do suporte e da fase estacionária. Em cromatografia capilar, o uso de colunas com elevada eficiência minorou consideravelmente estes problemas, e a escolha da fase depende apenas do tipo de derivados.

Para aminoácidos N-acetilados as fases de polioxietileno (Carbowax) ou de cianopropilfenilsilicone dão os melhores resultados<sup>103</sup>. Nos derivados mais vulgarmente utilizados, os N-HFB, fases do tipo metilsilicone (OV-101 ou SE-30) dão bons resultados apresentando a totalidade dos aminoácidos proteicos bem resolvidos<sup>112</sup>.

Para a separação de enantiómeros de aminoácidos é necessário que a fase estacionária seja específica exibindo quiralidade. Neste aspecto Chirasil-Val<sup>®</sup><sup>113</sup> é considerada como apresentando excepcionais características, quando comparada com outras utilizadas para o mesmo fim<sup>114</sup>, já que possui uma estabilidade térmica bastante elevada, permitindo a separação de todos os enantiómeros de aminoácidos proteicos com elevada resolução e, consequentemente, a análise quantitativa.

Outro aspecto importante da análise de aminoácidos diz respeito às propriedades químicas da parede do capilar, ou seja da forma como o vidro foi tratado e desactivado antes da deposição da fase estacionária. Alguns aminoácidos requerem superfícies bastante desactivadas, principalmente os aminoácidos contendo grupos sensíveis e deslocamento nucleofílico, tais como ésteres perfluoracilados de serina treonina ou tirosina, perfluoraciltioésteres de cisteína, acilimidazois da histidina ou ainda o grupo guanido da arginina diacilada<sup>116</sup>, bem como a generalidade

dos derivados trimetilsililados.

De uma forma geral devem preferir-se capilares bem desactivados ou ligeiramente ácidos, em alguns casos, e sem iões metálicos possuindo um número de pratos teóricos entre os 80.000 e 100.000 para uma coluna de 25m x 0,25.

Outro aspecto importante, que pode ser considerado geral em cromatografia capilar diz respeito à avaliação regular da coluna: Os requisitos exigidos a uma coluna para determinado tipo de análise devem-se manter durante todo o tempo de uso dessa coluna, para assegurar que os resultados possam ser reproduzíveis.

A forma mais usual de avaliar uma coluna é o "teste de Grob"<sup>8</sup>. Este teste consiste na análise de uma mistura padrão, em condições bem definidas, contendo quantidades conhecidas de compostos possuindo grupos funcionais diferentes<sup>8</sup>, possuindo por isso afinidades diferentes para com a fase estacionária, e sensibilidades diferentes para as variações de composição da parede interna do capilar. A eluição completa e a forma do picos permite-nos avaliar a eficiência da coluna e a sua desactivação. O conhecimento destas características permite escolher a coluna adequada para a análise de diferentes compostos e, sobretudo, saber se as características iniciais se mantêm.

O conhecimento do estado da coluna durante todo o seu "tempo de vida" pode permitir corrigir, quando possível, as alterações que surgem pelo uso consecutivo<sup>117</sup>.

### **3.2.4.3 - Técnicas hifenadas: acoplamento da cromatografia gás-líquido de alta resolução ao espectrómetro de massa**

Além da grande sensibilidade e poder de resolução, a cromatografia de gás apresenta ainda as vantagens de acoplamento ao espectrómetro de massa.

O uso do espectrómetro de massa como "detector" numa análise por GC, resolve geralmente o problema de identificação pois o espectro de massa de uma substância fornece informação quase que inequívoca. O espectrómetro de massa quando opera com detecção de ião selectivo, SIM, pode ser considerado como um detector



muito específico e sensível, talvez um dos mais sensíveis, tornando possível a detecção de quantidades da ordem dos nanogramas e/ou fentogramas<sup>118-120, 99</sup>.

### 3:2:4.3.1 - Princípios Gerais

A análise por espectrometria de massa exige a ionização da amostra. Os campos magnéticos e eléctricos do espectrómetro interactivam com as moléculas carregadas, separando iões com diferentes relações de massa carga. As técnicas usadas para imprimir carga às moléculas são várias, sendo as mais utilizadas a ionização química e a ionização por impacto electrónico.

O acoplamento de um cromatógrafo a um espectrómetro de massa, hoje em dia uma técnica tão vulgar, não é, à primeira vista, uma técnica possível. Na realidade, enquanto que em GC se trabalha à pressão atmosférica na saída da coluna, as pressões normalmente utilizadas em MS, nomeadamente no seu analisador, são da ordem dos  $10^{-6}$  TORR, sendo estas pressões necessárias para evitar as colisões entre as moléculas de gás e os iões acelerados. O acoplamento GC/MS só é possível recorrendo a soluções técnicas que tenham em atenção a redução da pressão de saída do cromatógrafo. Usualmente recorre-se a sistemas de vácuo eficientes, de modo a permitir que os volumes de gás procedentes das colunas de cromatografia (2 ml para cromatografia capilar e 30 ml para cromatografia de empacotamento) sejam admitidos no analisador sem que haja um aumento de pressão acima dos  $10^{-5}$  TORR.

Quando se usam colunas capilares o acoplamento fica resolvido, apenas deitando mão de um bom sistema de vácuo. Os volumes de gás são relativamente pequenos. Quando se trabalha em cromatografia de empacotamento, torna-se necessário recorrer ao chamado "separador" de modo a, selectivamente, remover a maior parte do gás de arrastamento do efluente da coluna, e, ao mesmo tempo, concentrar a "amostra gás" para o reduzido volume a entrar na fonte iónica do espectrómetro.

### 3:2:4:3:2 - Interfaces

Os problemas de acoplamento são normalmente resolvidos utilizando os chamados separadores moleculares, os quais não são mais do que sistemas capazes de separar o gás de arrastamento das substâncias eluídas, permitindo apenas a estas últimas a entrada no analisador.

Dos modelos de separadores existentes, podem pois considerar-se três tipos principais se bem que com princípios de funcionamento semelhantes.

Separador Watson-Bieman - Este tipo de separador (Figura 13) usa o princípio da difusão molecular diferencial através de um repartidor poroso. O gás de arrastamento, difunde mais depressa do que as moléculas orgânicas através de uma parede de vidro poroso.

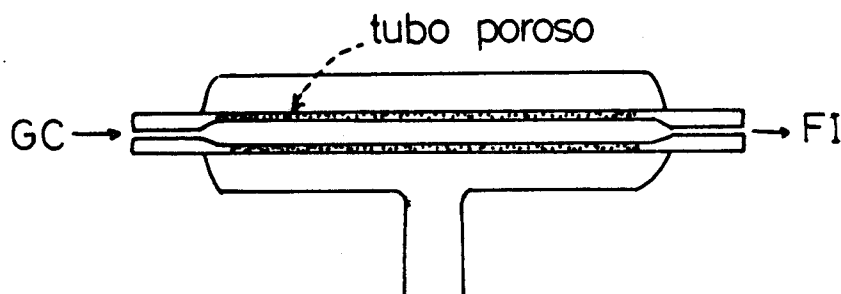


Figura 13: Separador de Watson-Bieman

Separador de Rhyage - Neste caso o gás de arrastamento e a amostra orgânica são passadas através de um pequeno "jet" para a zona de alto vácuo (Figura 14). O hélio (gás de arrastamento) difunde mais depressa da corrente de gás à saída do "jet".

Separador de Liewellyn - Este tipo de separador (Figura 15) baseia-se na separação com solução e difusão. Uma fina membrana de silicone é interposta entre o efluente do GC e a fonte iónica. À superfície da membrana as moléculas dissolvem-se e difundem-se através dela, enquanto que o hélio (gás de arrastamento), apenas pouco solúvel no silicone, atravessa a membrana apenas ligeira-

mente.

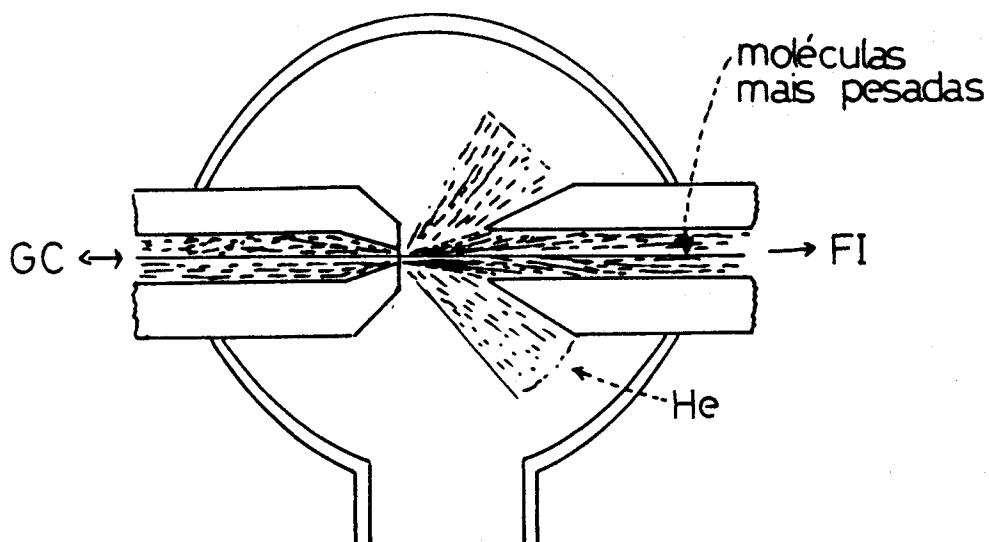


Figura 14: Separador de Rhyage

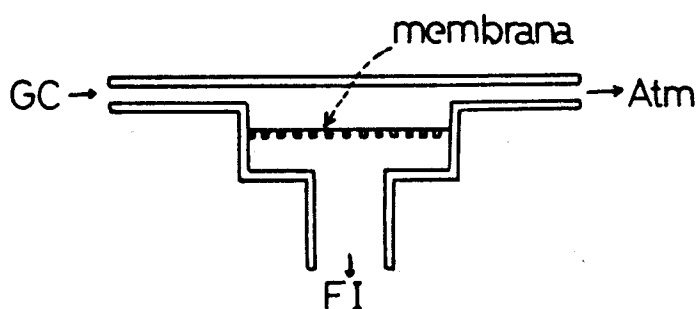


Figura 15: Separador de Liewellyn

Quando, por outro lado, se trabalha em cromatografia de gás capilar, estes problemas não se põe com a mesma acuidade, como foi referido e, normalmente, pode-se considerar o problema da interface resolvido acoplando, por meio de um conector de volume morto, a coluna de cromatografia a outro tubo capilar de sílica, o qual entra directamente na fonte iónica (Figura 16 A).

Quando em vez de ionização por impacto de electrão estamos a trabalhar com ionização química (CI) o problema da interface é diferente já que também é diferente toda a concepção da câmara de

ionização. Podem-se considerar neste caso, dois tipos principais de interface, o separador comum já descrito (Figura 16 B), e nos casos em que o gás de arrastamento é o mesmo que o gás utilizado como "plasma", o gás entra directamente na fonte iónica de CI sem qualquer tipo de interface (Figura 16 C).

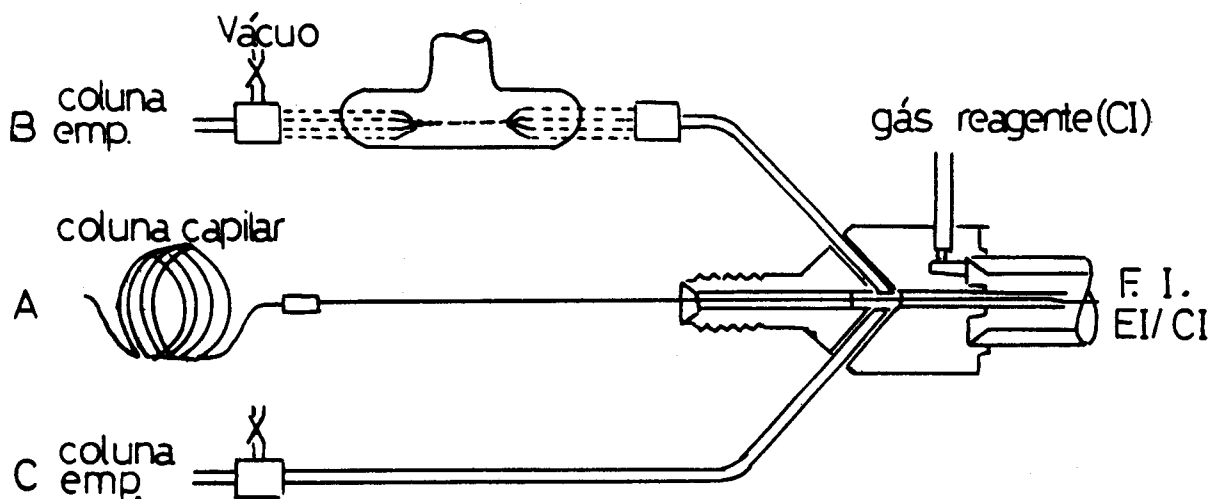


Figura 16: Interfaces GCMS - com separador B; sem separador C. Interface GC capilar/Fonte iónica CI/EI A.

### 3:2:4:3:3 - Técnicas

#### 3:2:4:3:3:1 - Ionização por impacto de electrão (EI)

Numa fonte de EI (Figura 17), os electrões de um filamento aquecido são acelerados através da câmara de ionização, ao mesmo tempo que o efluente do cromatógrafo passa também para a câmara de ionização. Os electrões interactuam com as moléculas de gás, transferindo energia para elas durante a colisão.

Se esta energia for suficiente, a molécula é significativamente excitada, e pode libertar um electrão, dando origem a um ião molecular. Em muitos casos, a energia é tal, que ela entra num estado de excitação fragmentando. Os fragmentos resultantes, podem também ser carregados electricamente.

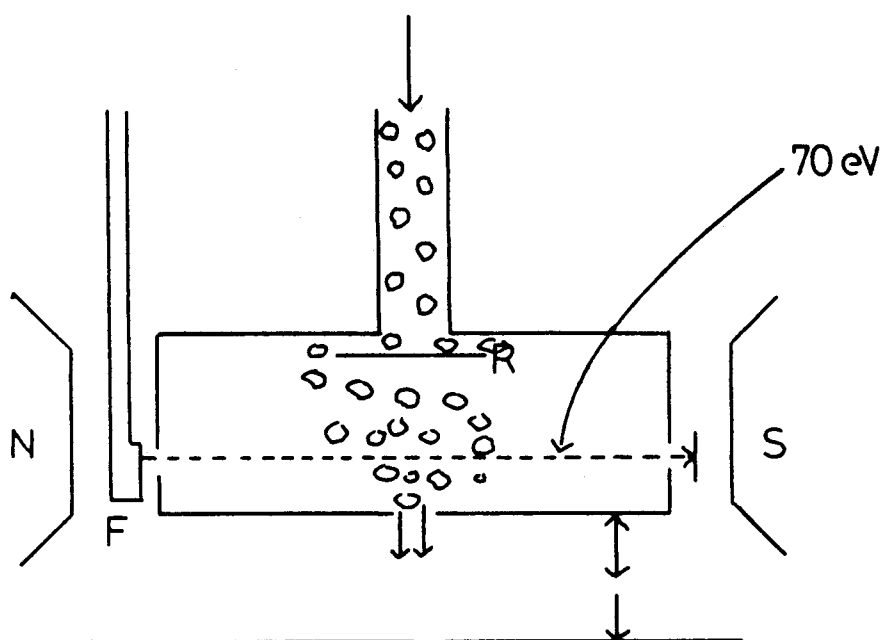


Figura 17: Esquema de uma fonte iônica do tipo EI; N e S- definem o campo magnético; F- Fonte Iônica; R filamento

Estes fragmentos carregados são levados, pelo campo magnético e/ou eléctrico, da fonte iônica para o analisador e aí são separados de acordo com as suas relações de massa carga.

Estas massas são apresentadas ao detector em tempos diferentes e com um nível de corrente muito baixo. Este sinal, é então ampliado por um multiplicador, dando um ganho de aproximadamente  $10^5$ , a seguir ao qual está o electrómetro que converte o sinal fornecendo o gráfico típico de GC/MS ao sistema.

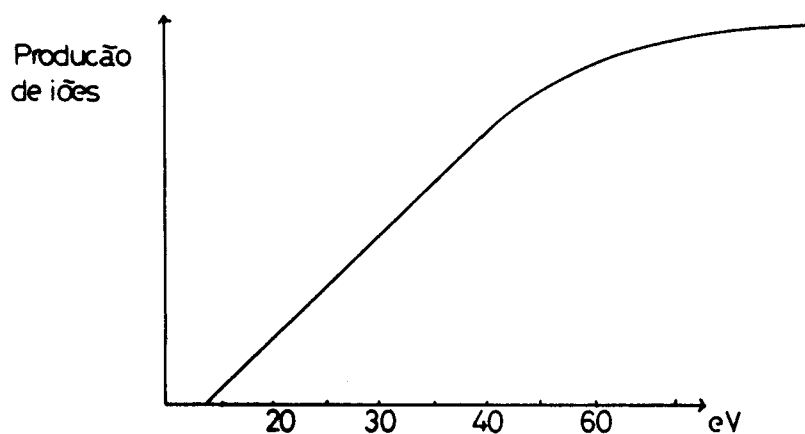


Figura 18: Influência da energia na produção de íons

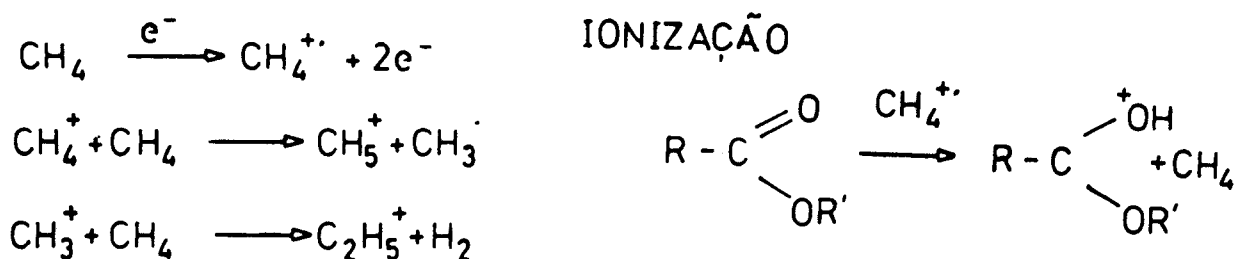
A eficiência da ionização depende directamente da energia dos electrões bombardeados (Figura 18). A energia electrónica de 15eV é normalmente eficiente para a ionização, a produção de electrões, porém, é máxima a 30-50eV. Usa-se normalmente uma energia de 70eV.

### 3:2:4:3:3:2 - Ionização química (CI)

A fragmentação de um composto é, por vezes, tão rápida e tão extensa que se torna difícil ou mesmo impossível a detecção do ião molecular. Nestes casos é conveniente dispormos de um método de ionização "suave". Este método, normalmente conhecido como ionização química, é baseado numa transferência de protão ou uma abstracção de electrão por reacção com uma fase gasosa.

O gás capaz de provocar este tipo de reacções, é bombardeado para a fonte iónica a uma pressão relativamente elevada e com uma alta energia de electrões. As reacções com o gás são exemplificadas no Esquema 21 para o caso do metano. Após o bombardeamento do gás com electrões de alta energia forma-se um plasma, contendo protões,  $\text{CH}_5^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5^+$ , e  $\text{C}_3\text{H}_5^+$  (catiões) e electrões livres de baixa energia, capaz de iniciar a reacção (Esquema 21). Os gases normalmente utilizados podem ser metano, isobutano e amónia.

#### PLASMA:



Esquema 21

A grande vantagem da ionização química é a estabilidade dos iões formados, muito mais estáveis do que os iões radicais formados por impacto de electrão, e por conseguinte a sua reduzida

tendência para a fragmentação. Muitos compostos que, em ionização por impacto de electrão, não produzem geralmente ião molecular, apresentam, por ionização química, iões quasi moleculares relativamente intensos.

Juntamente com a cromatografia de gás este tipo de ionização apresenta-se como um método ainda mais sensível do que a técnica que usa EI-MS. A corrente iónica total é concentrada sobre um reduzido número de iões não se dissipando entre tantos fragmentos como acontece com a ionização por impacto de electrão.

Outra importante consequência da fragmentação por ionização química resulta da formação de um número bastante elevado de iões negativos (cerca de 100 a 1000 vezes maior que em EI) o que permite a sua utilização em SIM. Os iões negativos são formados por tomada de um electrão sendo, consequentemente, os compostos com grande afinidade electrónica - por exemplo os detectáveis por ECD - os mais usados neste tipo de detecção.

Dadas as características deste tipo de ionização, que juntamente com o gás efluente da coluna ainda tem de utilizar o "plasma", os requisitos técnicos são ainda mais específicos para se conseguir manter a pressão requerida no analisador. A fonte iónica dum aparelho trabalhando em CI tem que ser extremamente "apertada", com apenas pequenas aberturas para entrada dos electrões de alta-energia e uma pequena fenda para entrada dos electrões que serão analisados (Figura 19).

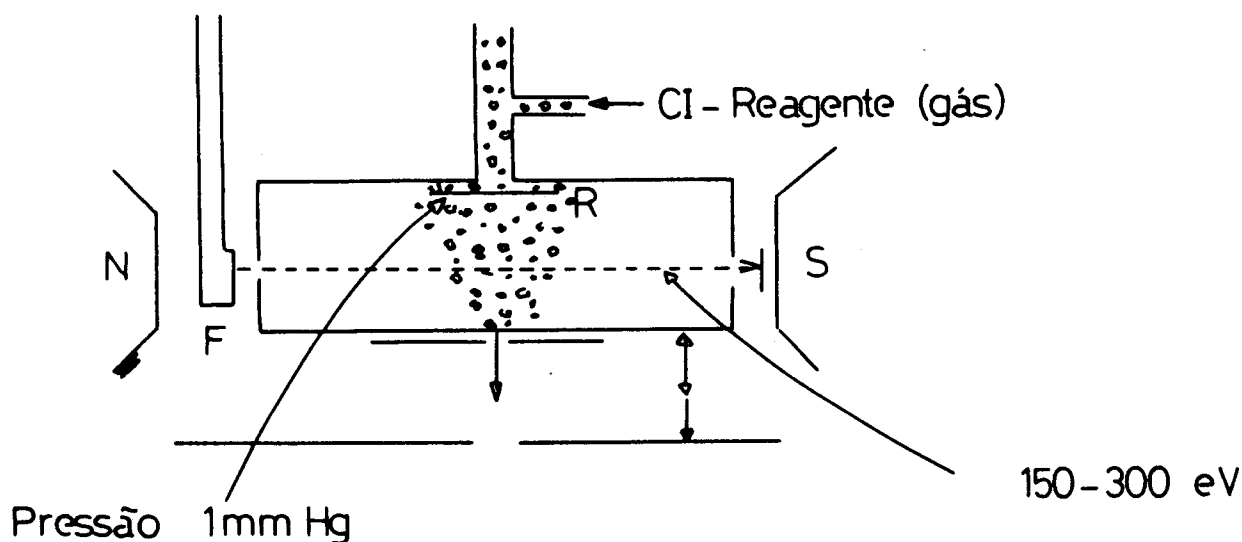


Figura 19: Esquema de uma fonte iónica do tipo CI; N, S, F e R conforme figura 17

O principal inconveniente deste tipo de ionização reside no facto de a fonte se sujar mais frequentemente ficando mais sujeita a descalibrações. A calibração tem o inconveniente de utilizar compostos perfluorados que "envelhecem" a fonte iónica mais depressa do que seria de desejar<sup>121</sup>.

### **3.2.4.4 - Cromatografia líquido-líquido de alta eficiência (HPLC)**

#### **3.2.4.4.1 - Princípios**

As técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência, para a análise de aminoácidos, podem ser consideradas como uma extensão da troca-iónica proposta por Moore e Stein<sup>122</sup>. Para conseguir a separação da totalidade dos aminoácidos proteicos em tempos de análise que modernamente são da ordem dos 60 min., a clássica cromatografia de troca-iónica lançou mão de bombas de alta pressão, resinas de micro-partícula e, com o uso ainda dos clássicos detectores de LC, iniciou-se aquilo a que se chama vulgarmente cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de aminoácidos.

O principal problema que se põe com a análise dos aminoácidos diz respeito à sua detecção com o detector de UV-VIS. A maioria dos aminoácidos, (excepção para a tirosina, fenilalanina e triptofano) não possuem fluorescência nativa e não são compostos cromóforos, ou são-no apenas muito fracamente. A aplicação dos detectores de UV-VIS à análise de aminoácidos implica derivatização no sentido de transformar o aminoácido num derivado com características cromóforas ou fluorescência.

A altura do processo cromatográfico em que tem lugar a formação do derivado tem determinado duas técnicas diferentes de análise de aminoácidos por HPLC. Na derivatização pré-coluna, o derivado é formado antes da separação cromatográfica, na derivatização pós-coluna o derivado é formado, após a separação cromatográfica, imediatamente antes da detecção.



### 3.2.4.4.2 - Derivatização

#### 3.2.4.4.2.1 - Derivatização pré-coluna

Neste caso, a escolha do reagente e das condições de derivatização é muito importante. A reacção deve ser completa e quantitativa, para todos os aminoácidos, desenrolando-se a temperaturas suaves de modo a evitar a destruição dos mesmos. Os derivados formados devem ser estáveis, e possuir grande absorção na zona do ultra-violeta ou serem altamente fluorescentes. Os subprodutos da reacção, bem como o excesso de reagente, devem eluir em zona que não interfira com a análise dos derivados. O sistema ideal deve ser automatizado.

Os reagentes que têm conduzido à formação de derivados com melhores características para a análise por HPLC, após derivatização pré-coluna, são o cloreto de dansilo (Dns), o fenilisotiocianato (PTC), o *orto*-ftalaldeído (OPA) e o cloroformato de 9-fluorenilmetilo (FMOC)-amino TAG.

A derivatização pré-coluna não é, porém, isenta de problemas. Em relação à técnica de derivatização pós-coluna pode-se referir como desvantagem as manipulações da amostra, que podem eventualmente conduzir a percas, e a formação de derivados menos sensíveis que os formados em pós-coluna.

Por outro lado esta técnica é muito sensível, apresentando limites de detecção da ordem dos 0.1-1 pmoles, e não exige aparelhagem de reacção especial. Utiliza colunas cromatográficas do tipo "fase inversa" (RP).

#### 3.2.4.4.2.2 - Derivatização pós-coluna

A derivatização pós-coluna envolve a separação dos aminoácidos numa coluna cromatográfica de troca-iónica. A saída da coluna estão as câmaras de reacção contendo o reagente necessário à formação do derivado adequado.

A derivatização "on line" pós-coluna é relativamente imune a problemas de interferência, tais como instabilidade e/ou formação de derivados múltiplos. Apesar de muito precisa é, contudo pouco

sensível.

Os reagentes normalmente utilizados para a reacção pós-coluna são praticamente os mesmos utilizados na análise clássica de troca-iónica, a ninidrina, a fluorsceína e o aldeído ftálico.

Quadro IV  
Derivados mais utilizados na análise de aminoácidos por HPLC

Derivado	ref <sup>a</sup>	Comentário
Feniltiohidantoinas PTH	123, 124, 125	Pouco estáveis. Não permitem a detecção de aminoácidos secundários
Aldeídos Ftálicos OPA	126, 127, 128 129, 130	Mais sensíveis e mais estáveis se bem que não se consiga a detecção dos aminoácidos secundários.
Dansilados Dns	131, 132, 133	Derivatizam e detectam aminoácidos secundários. O pico do Dns interfere com a análise do Dns-Asp e Dns-Glu. A sua remoção faz correr o risco de eliminar todos os derivados que eluam antes dele.
Feniltiocarbamatos PTC	134, 135	São sensíveis e rápidos. Capazes de detectar todos os aminoácidos secundários e primários por UV em 12min.

A maior desvantagem do uso de HPLC para análise de aminoácidos reside na sua falta de especificidade o que impede a sua utilização rotineira na análise de fluídos biológicos<sup>136</sup>.

#### 4 - OS AMINOÁCIDOS EM ENOLOGIA

Os resultados obtidos na análise tradicional de vinhos, a chamada análise sumária, fornecem geralmente um tipo de informação, que apenas permite dizer com segurança se o vinho está ou não em condições de ser consumido. É necessário recorrer à prova organoléptica sempre que se quer apreciar, em termos mais específicos, se bem que mais subjectivos, a qualidade do vinho.

A subjectividade da prova organoléptica, bem como a diversidade de métodos existentes, torna difícil, ou mesmo impossível, conseguir definir e comparar vinhos de diferentes regiões e/ou de diferentes países.

A tendência moderna em análise enológica, tem evoluído no sentido de se estudarem os compostos normalmente minoritários ou, por vezes, até desconhecidos. Estes compostos têm a vantagem de aliarem, ao seu inegável interesse científico, um interesse em termos qualitativos, que é substancialmente aumentado quando provam exercer influência do ponto de vista sensorial.

Dois vinhos indiferenciáveis pela sua análise tradicional, são facilmente reconhecidos pelo seu espectro de aminoácidos<sup>137</sup>. A exploração deste aspecto, e a sua aplicação a uma população alargada pode vir a demonstrar o interesse da análise de aminoácidos na diferenciação de vinhos. Os aminoácidos podem ser considerados, eventualmente, como tendo interesse do ponto de vista sensorial, já que são percursores de substâncias de inegável importância organoléptica, os alcoois superiores. A caracterização com base nos aminoácidos apresenta a vantagem de ser conferida, não por um composto, mas por um espectro de compostos, o que alia ao interesse caracterizante um interesse na repressão de fraudes, e avaliação da genuinidade.

Os aminoácidos são importantes desde a uva até ao vinho, podendo a sua análise fornecer informação preciosa durante todo o processo conducente à obtenção do vinho. A influência dos aminoácidos faz-se sentir desde o início da formação da uva, até à maturação e desde a obtenção do mosto à fermentação, sendo ainda dependente do tipo de levedura e das condições em que decorre a fermentação.

#### 4.1 - Influência do solo e das condições ambientais no nível de aminoácidos da uva

O nível de alguns aminoácidos - normalmente dos dominantes na altura da maturação - tem vindo a ser recomendado como possível indicador preventivo, do nível de azoto no solo<sup>138</sup>. É conhecido que muitas plantas lenhosas anuais, como por exemplo a vinha, armazenam azoto sob a forma de compostos de baixo peso molecular, como o são os aminoácidos, sendo sob esta forma que a vinha recebe azoto durante a fase de crescimento mais acelerado, na Primavera<sup>139</sup>.

Nas espécies em que a arginina é o aminoácido dominante à maturação<sup>138</sup>, o seu nível foi determinado como sendo cerca de 60% mais elevado em vinhas com fertilização azotada. Este valor é considerado como indicador preventivo do nível de azoto no solo, dando uma ideia do nível crítico deste nutriente (N) permitindo a correcção.

Nem todas as variedades possuem à maturação o mesmo aminoácido como dominante, pelo que os valores apresentados devem ser sempre calculados para as condições em estudo.

As variedades diferem entre si nos teores dos vários aminoácidos não havendo, porém, diferenças significativas quando estas variações são avaliadas sob o ponto de vista qualitativo<sup>140</sup>. Os níveis de aminoácidos das diferentes cultivares é considerado definidor da cultivar, ajudando à sua classificação taxonómica<sup>140</sup>.

Na variedade *vinifera* é dominante à maturação a prolina, seguida dos ácidos glutâmico e aspártico. Na variedade *muscadina*, os aminoácidos dominantes parecem ser a arginina, a alanina, a treonina e a serina. A *Vitis rotundifolia* por outro lado apresenta quantidades muito pequenas de glutâmico e aspártico, ao contrário do encontrado para a *vinifera* e *labrusca*<sup>141</sup>.

Durante todo o processo conducente à maturação, os aminoácidos sofrem mudanças de concentração apreciáveis, o que realça a importância que têm neste processo. As variações que ocorrem na uva - ao nível dos aminoácidos - tornam possível a divisão dos aminoácidos em três grupos definidos: aqueles cuja concentração

relativa de aminoácidos aumenta, aqueles em que essa concentração se mantém e aqueles em que diminui. O tipo de variação depende da parte da vinha considerada<sup>142</sup> (Figura 20 e 22).

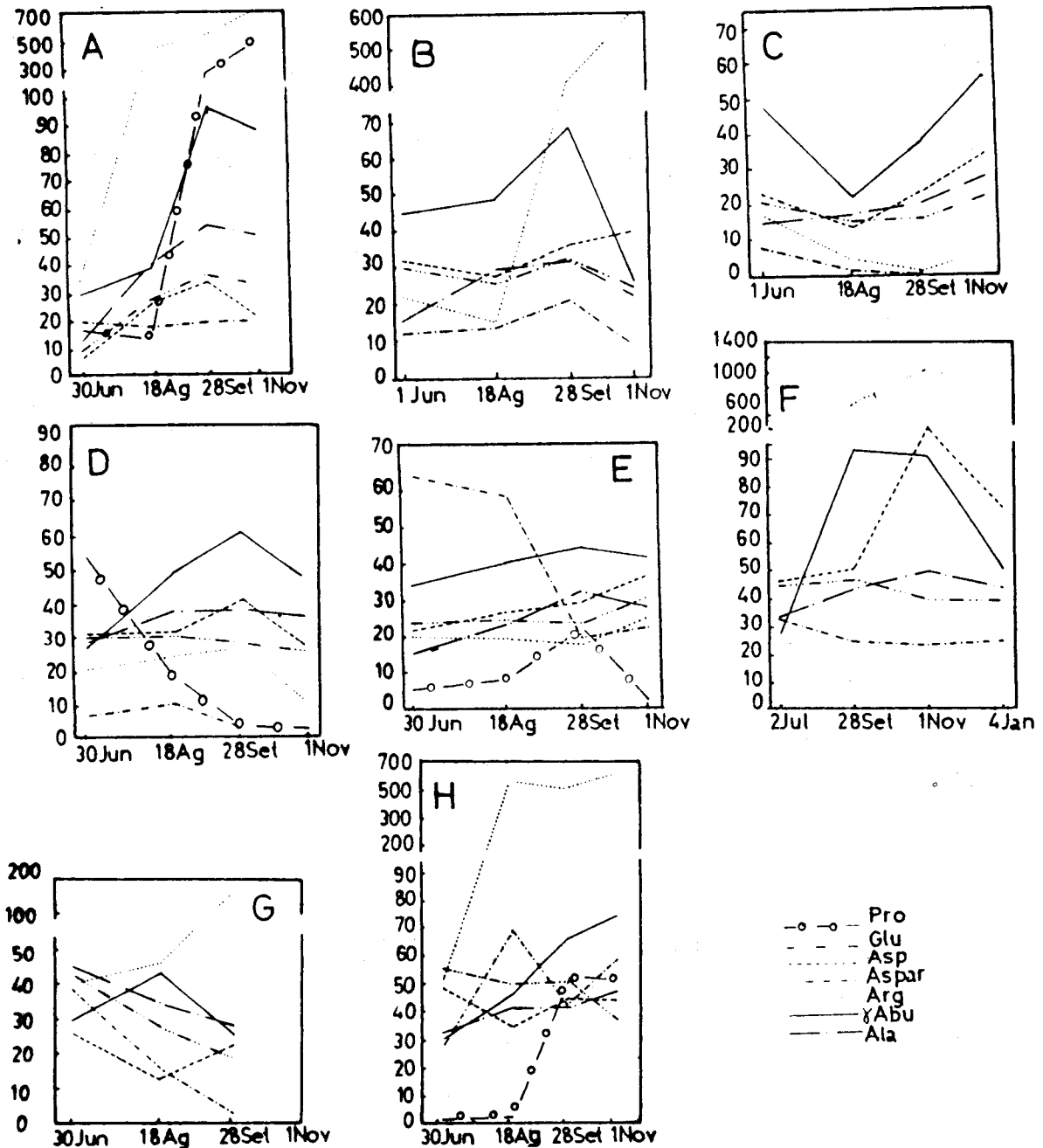


Figura 20: Variação dos aminoácidos em várias partes da vinha a vários estados de desenvolvimento<sup>142</sup> (μmoles/100g peso fresco) A-Bago; B- Lançamento de madeira; C- Lançamento verde; D- Limbo; E- Gomo; F- Raiz; G- Pedicelo; H- Pedúnculo.

A primeira zona de acumulação dos aminoácidos, parece ser a raiz. Daí, mais tarde, os aminoácidos são translocados para o fruto<sup>142</sup>. A arginina é considerada como a principal forma de armazenamento de azoto. O aumento de alguns aminoácidos na vinha precedendo a fase de dormência<sup>142</sup> está largamente relacionado com a acumulação de hidratos de carbono na raiz utilizados pela planta na fase de crescimento.

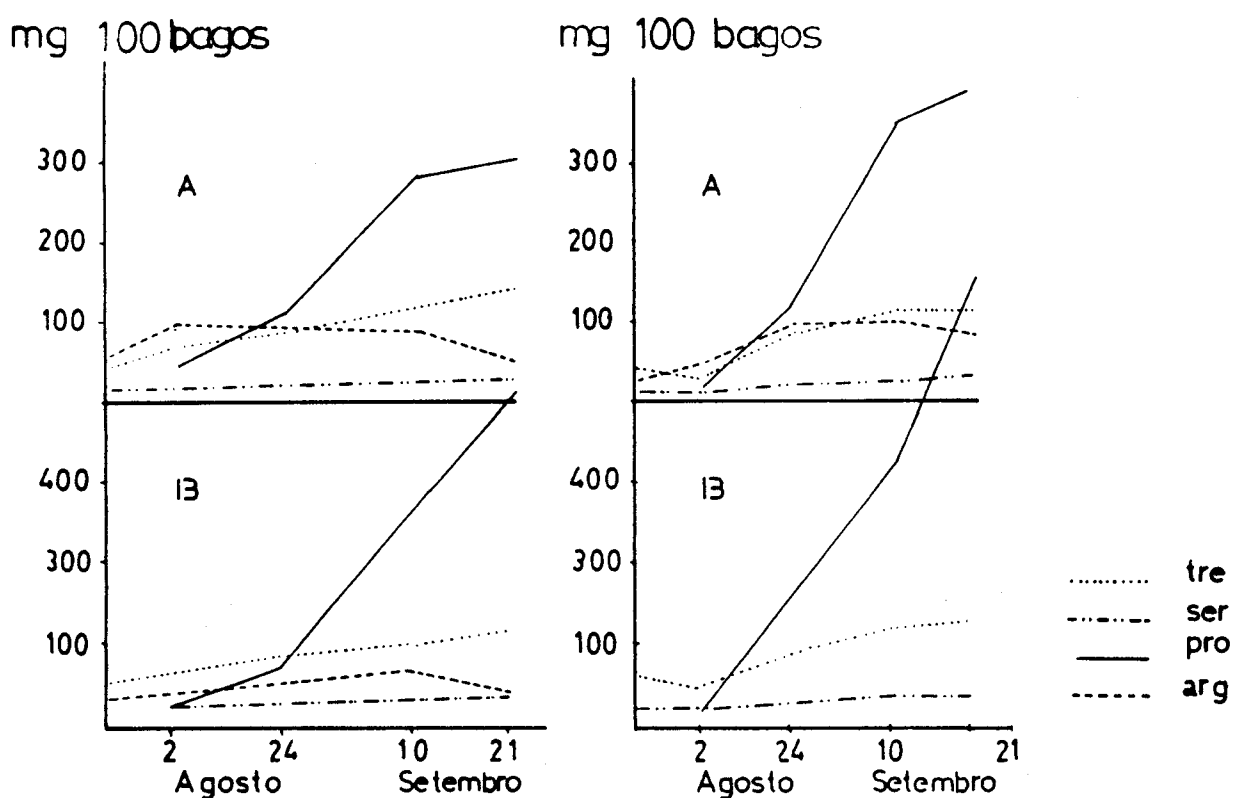


Figura 21: Variação comparativa de quatro aminoácidos, na uva ao longo da maturação. A e B correspondem a castas diferentes e 1 e 2 a regiões diferentes<sup>144</sup>.

Ao longo da maturação, a uva armazena azoto, o amoníaco diminui<sup>143</sup>. Os aminoácidos aumentam continuamente e os compostos azotados de alto peso molecular, aumentam também<sup>144</sup> (Figura 22). Esta evolução quantitativa dos aminoácidos no bago caracteriza-se sobretudo por um aumento considerável de prolina (Var. *vinifera*) e uma ligeira diminuição da arginina, (Figura 21 e 22)<sup>145</sup>. A prolina é a principal forma de armazenamento de azoto na uva madura de *Vitis vinifera* (Figura 21 e 22).

O azoto solúvel do fruto passa, pois, por formas cada vez menos assimiláveis pela levedura (a prolina é um exemplo) podendo mesmo as vindimas demasiado maduras apresentar problemas de fermentação (Figura. 21, 22, 23).

Pela análise dos aminoácidos totais, obtidos após hidrólise, verifica-se haver uma diminuição dos peptidos ao longo da maturação, enquanto que os teores em proteínas aumentam. No final da maturação <sup>143</sup> os compostos azotados parecem pois evoluir no sentido de se formarem moléculas mais volumosas. A concentração em compostos azotados na altura da maturação é, em parte, dependente do património genético <sup>143</sup>, podendo as castas ser distinguidas de acordo com o teor em azoto (Figura 24).

$\mu$  Mol/100 g peso fresco

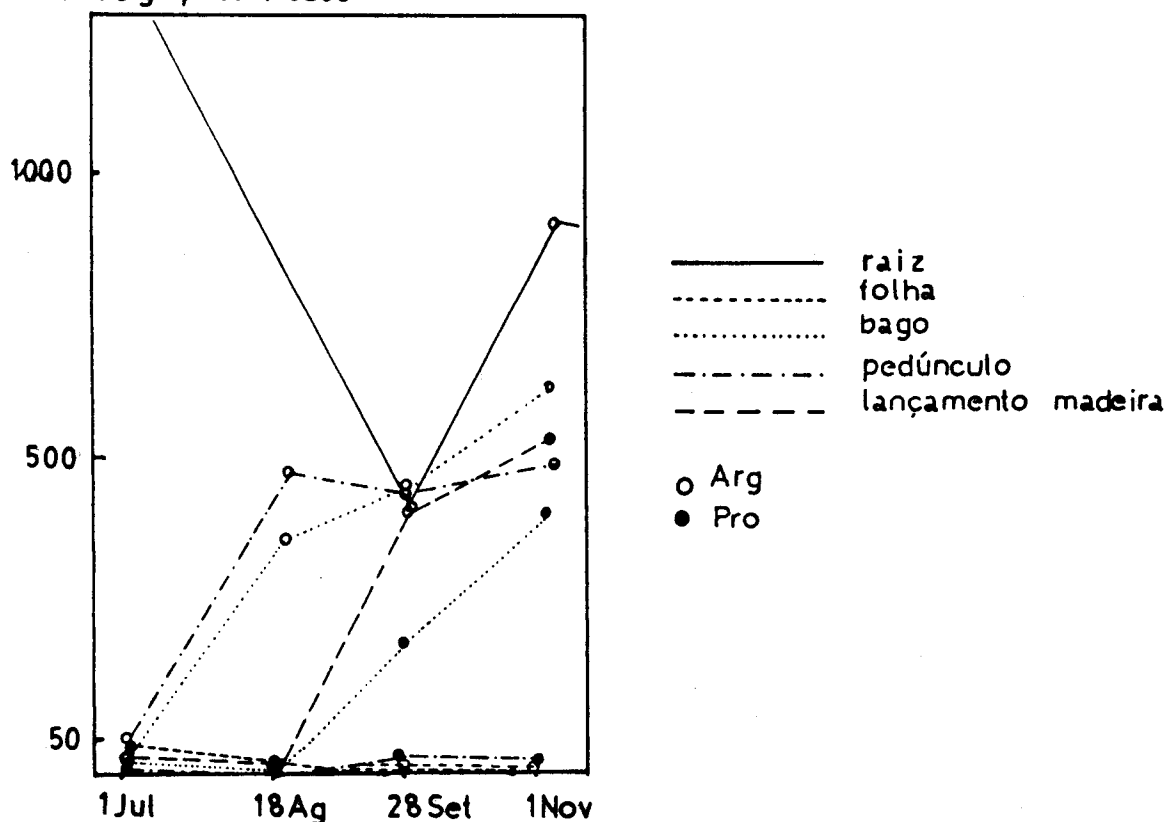


Figura 22: Evolução comparativa de arginina e prolina durante a maturação em partes diferentes da vinha <sup>142</sup>.

As condições climáticas do ano também influenciam o nível de aminoácidos da uva e, conseqüentemente, o nível de aminoácidos no vinho. Em trabalho realizado com mostos semeados com a mesma

estirpe de levedura, foi possível concluir que as condições do ano influenciam os níveis de aminoácidos do vinho, na medida em que influenciam os diferentes constituintes azotados da uva<sup>145</sup>.

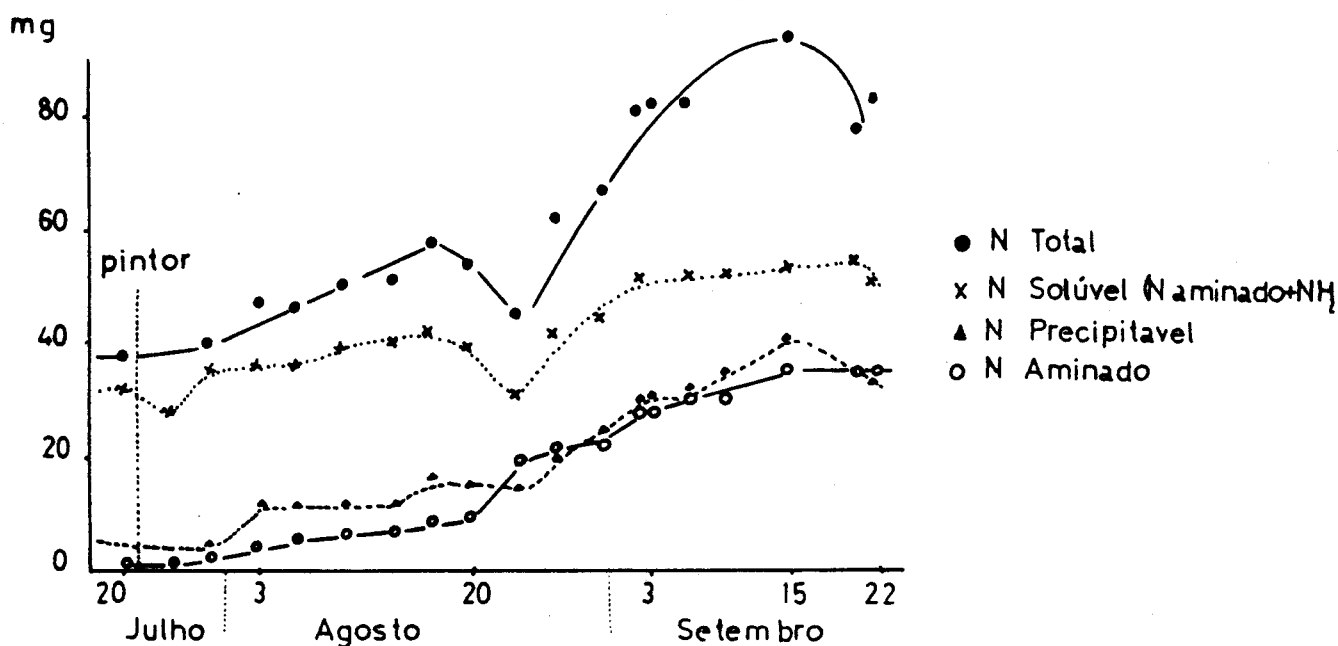


Figura 23: Evolução do teor em azoto, no bago, ao longo da maturação<sup>143</sup>.

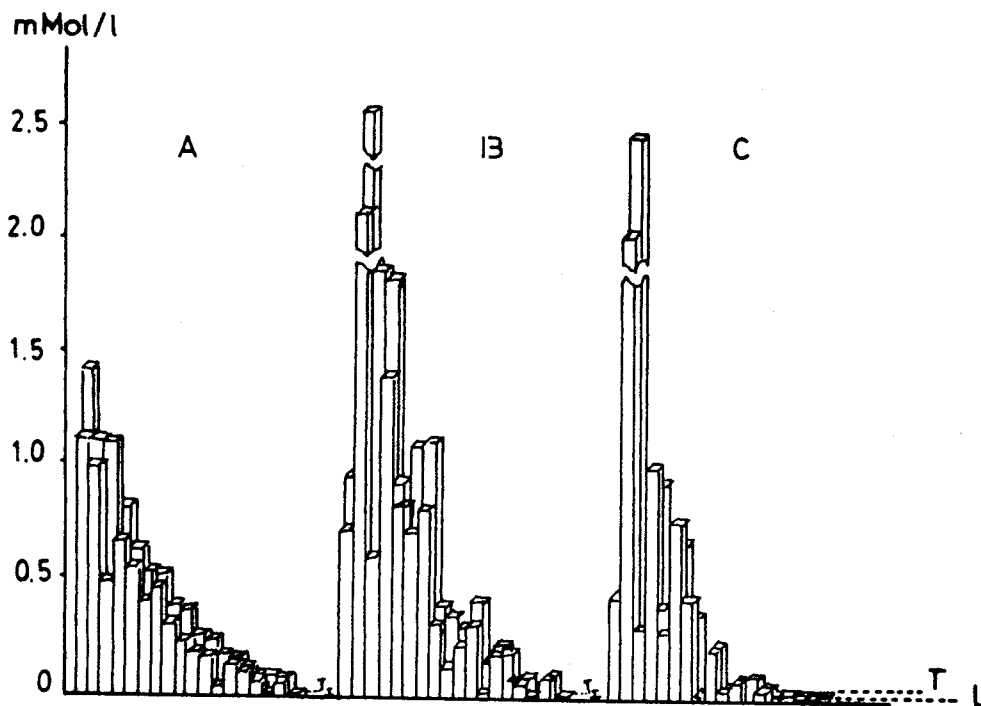


Figura 24: Comparação de castas pelos seus teores em aminoácidos livres e totais; A-Mauzac B-Pinot-Chardonnay C-Carignan<sup>143</sup>



## 4:2 - Evolução dos aminoácidos ao longo da fermentação alcoólica: influência das condições de fermentação e da levedura

O teor em aminoácidos de um vinho é fortemente dependente da variedade, da estirpe de levedura, e do tipo de fermentação <sup>146</sup>.

Durante todo o processo fermentativo, nomeadamente durante a fermentação tumultuosa, podem-se considerar dois fenómenos diferentes conducentes ao aumento e/ou variação dos aminoácidos, a assimilação dos diferentes aminoácidos pelas leveduras de vinificação e a libertação de aminoácidos por exorção e autólise das mesmas. Ambos os fenómenos dependem do tipo de levedura e da riqueza inicial do mosto em aminoácidos. <sup>147</sup>

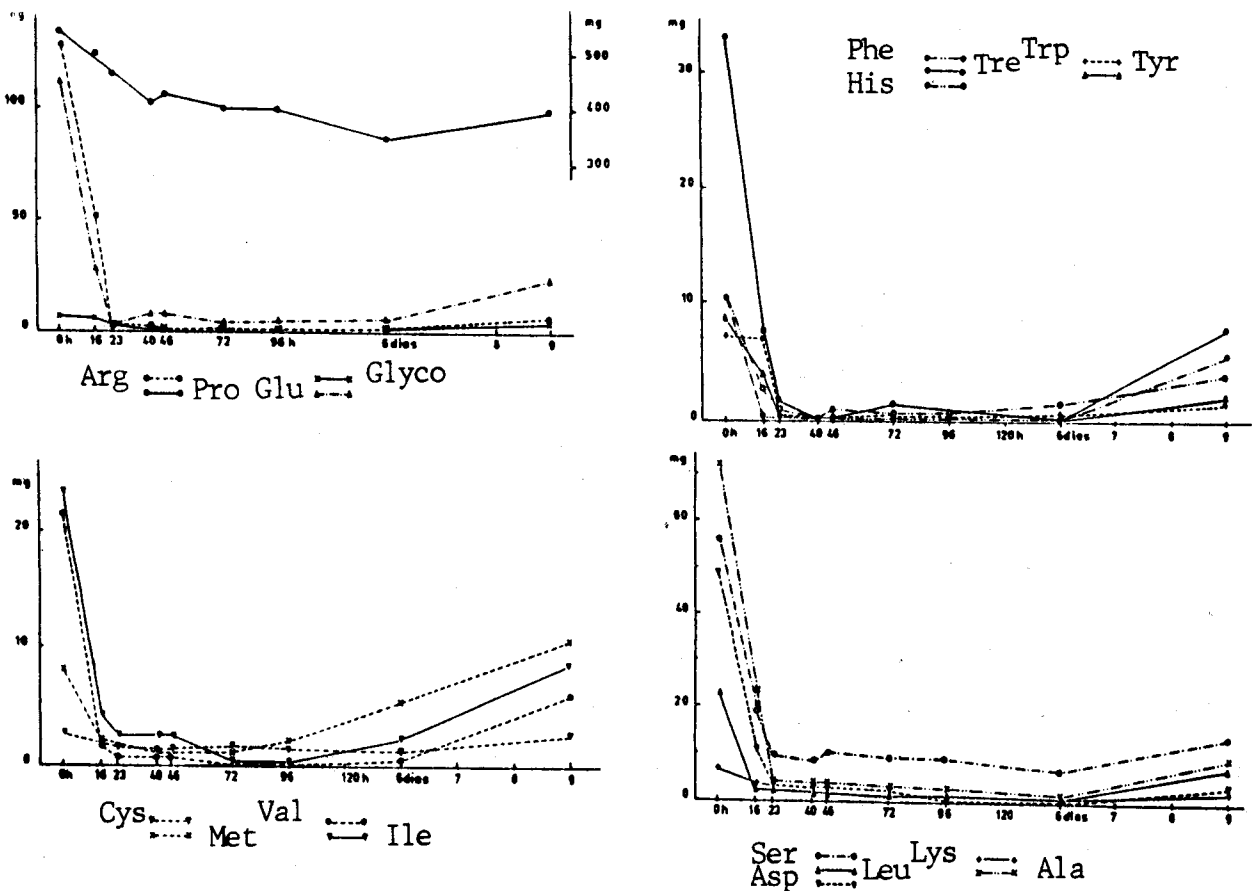


Figura 25: Variação dos aminoácidos ao longo da fermentação resultados/litro <sup>149</sup>.

Durante a fase inicial de assimilação, os aminoácidos são absorvidos do meio exterior para formarem uma reserva interna na célula, juntamente com os que são sintetizados pela levedura propriamente dita. A levedura vai absorvendo e utilizando os aminoácidos do meio, de modo a que a sua reserva fique constante; Este fenómeno, explica a quebra grande que se verifica na generalidade dos aminoácidos livres ao fim do sexto dia de fermentação<sup>148</sup>. Parece assim confirmar-se a ideia de a prolina ser o aminoácido mais dificilmente assimilado pela levedura pois é neste aminoácido que menos se nota a quebra<sup>149</sup> (Figura 25). Ressalta daqui que a fermentação alcoólica depende bastante da espécie de levedura e está, num primeiro estágio, condicionada pelos aminoácidos do meio<sup>150</sup>.

Na fase intermédia da fermentação nota-se que houve um consumo de aminoácidos mas, no final da fermentação, a concentração dos aminoácidos livres aumenta bastante pela autólise das leveduras e exorção de aminoácidos pela levedura propriamente dita, ou seja, da célula viva, e decorrente de um mecanismo perfeitamente normal<sup>144</sup> (Figura 25). A concentração dos aminoácidos aparece deste modo como dependente do tipo de levedura (se a levedura varia de região para região, por influência do clima, então o espectro de aminoácidos deverá reflectir essa origem).

O tipo de levedura e a concentração em aminoácidos/ou azoto do meio fermentativo é determinante para o mecanismo, já que a levedura liberta para o meio aminoácidos, quantitativa e em alguns casos qualitativamente, diferentes consoante o tipo de azoto que tem à disposição para o seu metabolismo<sup>151</sup> (Figura 26) podendo os aminoácidos ser classificados de acordo com a facilidade com que são assimilados pela levedura.

Além da importância pronunciada que o tipo de levedura tem sobre a concentração de aminoácidos no final de fermentação, também o método de fermentação parece ter influencia significativa. Os vinhos em que se nota concentração em aminoácidos mais elevada são os vinhos tintos, vinificados com maceração das partes sólidas e os vinhos brancos que ficaram mais tempo em contacto com as borras<sup>152</sup> (Figura 27);

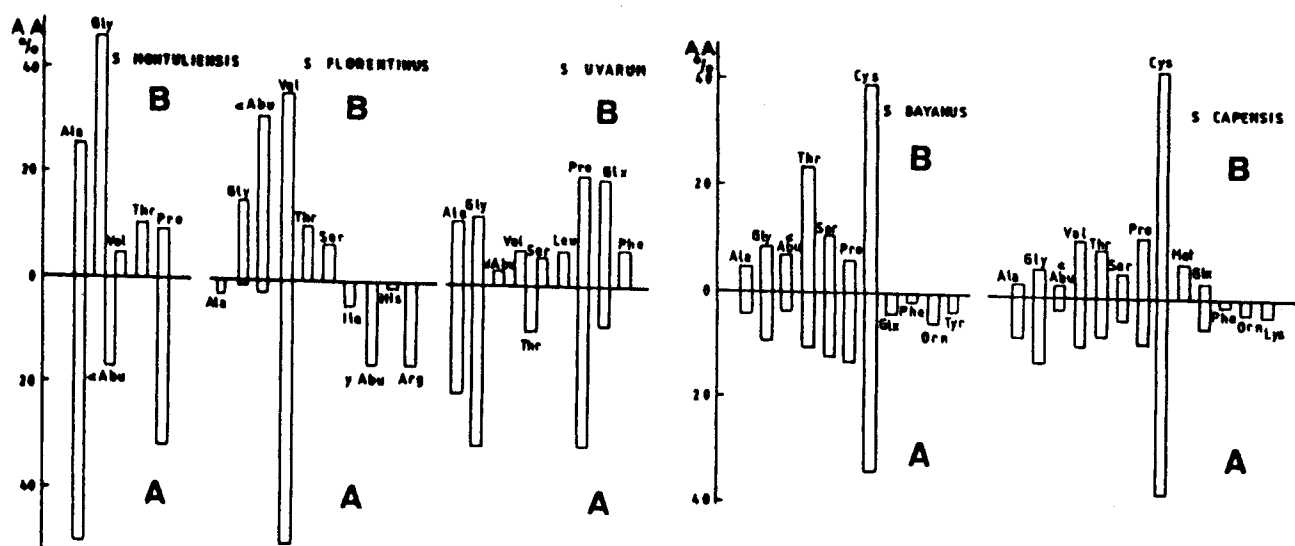


Figura 26: Percentagem normalizada das concentrações de aminoácidos excretados para o meio por leveduras da espécie *Sacharomyces* sp. cultivadas em condições de falta de azoto; A- sulfato de amónio; B- ureia<sup>151</sup>.

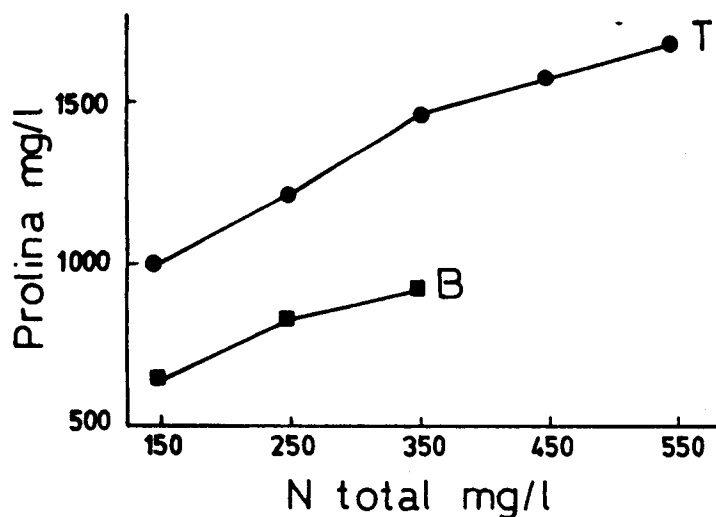


Figura 27: Comparação dos teores em prolina de vinhos brancos e tintos<sup>174</sup>.

Estes resultados devem-se principalmente ao facto de haver, nestes casos, maior tempo de contacto do vinho com as leveduras autolizadas, conseguindo-se assim um acréscimo em compostos azotados de grande importância com por exemplo: lisina, arginina e metionina <sup>152</sup>. As diferenças significativas notam-se, principal-

mente, num aumento das concentrações de alguns aminoácidos, que se pode traduzir por um aumento do valor biológico dos vinhos.

O mecanismo de utilização de azoto pela levedura pode seguir uma via de desaminação, dos aminoácidos sintetizados na célula, seguida de descarboxilação e libertação de amoníaco, por transaminação ou, simplesmente, a assimilação directa<sup>153</sup>.

Este último processo é o mais utilizado. A espécie de levedura é determinante do consumo de aminoácidos durante a fermentação, mas também é determinante dos teores no final da fermentação, o que as torna, conseqüentemente, determinantes da fermentação maloláctica (FML). As bactérias lácticas<sup>154</sup> vão utilizar como fontes de azoto, parte dos aminoácidos existentes no final da fermentação o que torna, conseqüentemente, a levedura determinante da fermentação maloláctica (FML) com todas as implicações que esta fermentação tem no produto final.

A fermentação maloláctica é conhecida como imprimindo ao vinho uma mudança de características resultantes do abaixamento da acidez e modificações sensoriais por actividade bacteriana. Sendo as bactérias lácticas organismos fermentativos, o seu mecanismo está fortemente associado aos níveis de azoto do meio, e, implicitamente, ao nível de aminoácidos deixados pela levedura. Algumas bactérias, consideradas como responsáveis pela fermentação maloláctica, nomeadamente *Leuconostoc oenos*, são capazes de converter arginina em ornitina, segundo um esquema reaccional associado ao ciclo da ureia<sup>154</sup> (Figura 28).

Esta transformação é importante, já que a ornitina é considerada como tendo efeitos interessantes sob o ponto de vista bioquímico: inibição da fermentação prejudicial provocada pela levedura *Hansenula* e inibição do crescimento da mesma. Esta transformação não deve no entanto ser generalizada a outras leveduras responsáveis pela FML, já que outras não se mostraram capazes de a realizar. O aumento da concentração de ornitina parece ter efeito na estabilidade dos vinhos, não se sabendo, no entanto, se tem importância para a modificação das características organolépticas do mesmo<sup>154</sup>.

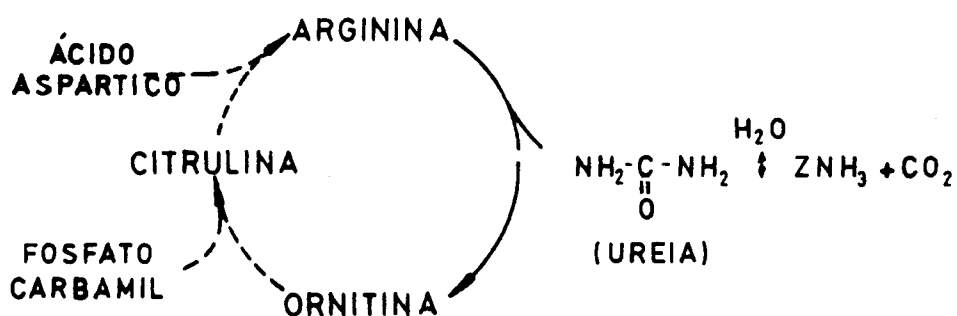


Figura 28: Transformação da arginina em ornitina pelo *Leuconostoc oenos*<sup>154</sup>.

#### 4.3 - Os aminoácidos como elementos de caracterização organoléptica

A maioria dos autores ao estudarem os níveis de aminoácidos nos mostos e nos vinhos costuma referir que o valor dos mesmos como elementos de caracterização sensorial continua por estudar. Contudo, não menos frequentemente, se alude ao facto de, em vários casos e/ou vários tipos de alimentos, os teores de aminoácidos serem, por vezes, não só importantes sob o ponto de vista de caracterização sensorial<sup>155, 156</sup> como também como elementos gustativos. Sumos de fruta, cacau, chá e mel<sup>157</sup> são exemplos em que o espectro de aminoácidos livres ou totais tem sido utilizado na caracterização.

Em enologia, pode considerar-se o interesse dos aminoácidos para a caracterização sensorial do produto final - vinho - tomando em atenção o seu papel como elementos de caracterização sensorial propriamente dita ou como precursores de álcoois superiores.

##### a) Aminoácidos como elementos de caracterização sensorial

Testes feitos com aminoácidos puros<sup>158</sup>, referem que, alguns aminoácidos não apresentam qualquer tipo de gosto, ou apenas um gosto pouco pronunciado, tal é o caso da D-alanina, D- e L-arginina, ácido D- e L-aspartico, ácido D-glutâmico, L-histidina, D- e

L-isoleucina, D- e L-lisina, D- e L-prolina, D- e L-serina D- e L-treonina e D- e L-valina. Outros apresentam um gosto doce tais como D-tirosina, D-histidina, D-fenilalanina, D-triptofano, D-leucina, L-alanina e glicina. Outros ainda, são caracterizados por um gosto amargo, L-triptofano, L-fenilalanina, L-tirosina e L-leucina, ainda outro grupo formado pelos aminoácidos sulfurados que possuem um gosto característico, D- e L-cisteína e D- e L-metionina. O ácido L-glutâmico apresenta, por seu lado, um gosto único e característico (Quadro V).

Quadro V - Gosto dos aminoácidos em solução aquosa (0.3%)<sup>a158</sup>

Aminoácido	Gosto	
	Forma L	Forma D
<b>Grupo 1- Sem gosto</b>		
Arginina	Chato	Ligeira/ doce (D,L)*
Ácido aspártico	Chato	Chato
Isoleucina	Chato	Chato
Prolina	Chato, ligeira/ doce	Chato (D,L)*
Serina	Chato	Chato
Treonina	Chato	Chato
Valina	Chato	Chato
Ácido glutâmico	:::	Chato
<b>Grupo 2- Com gostos variados</b>		
Cisteína (D,L)*	sulfuroso	sulfuroso
Ácido glutâmico	único "glutamato"	:::
Metionina	sulfuroso ligeira/ doce sabor a carne	sulfuroso, ligeira/ doce sabor a carne
<b>Grupo 3- aminoácido amargos ou doces</b> (quando comparados com soluções de cafeína ou sucrose)		
Alanina	doce, 0.54% sucrose	Chato
Histidina	Chato	doce, 2.23% sucrose
Leucina	amargo, 0.011% cafeína	doce, 1.30% sucrose
Fenilalanina	amargo, 0.069% cafeína	doce, 2.20% sucrose
Triptofano	amargo, 0.133% cafeína	doce, 11.0% sucrose
Tirosina <sup>b</sup>	amargo, 0.017% cafeína	doce, 1.65% sucrose
Glicina	doce, 0.45% sucrose	

<sup>a</sup> pH ajustado a 6.0 com Na OH ou HCl

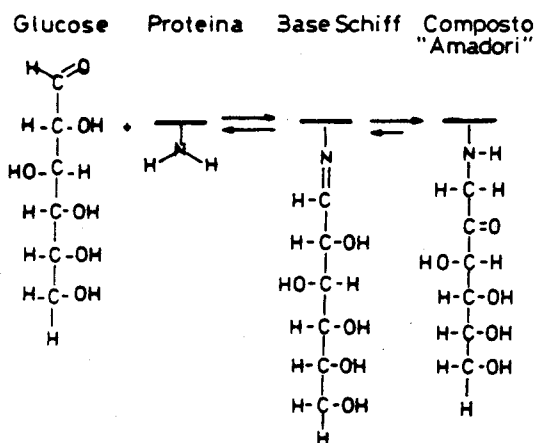
<sup>b</sup> devido à fraca solubilidade da tirosina, os testes foram conduzidos a temperaturas elevadas.

\* os aminoácidos marcados D,L não se conseguiram na forma pura do enantiómero D; usou-se por isso os racematos.

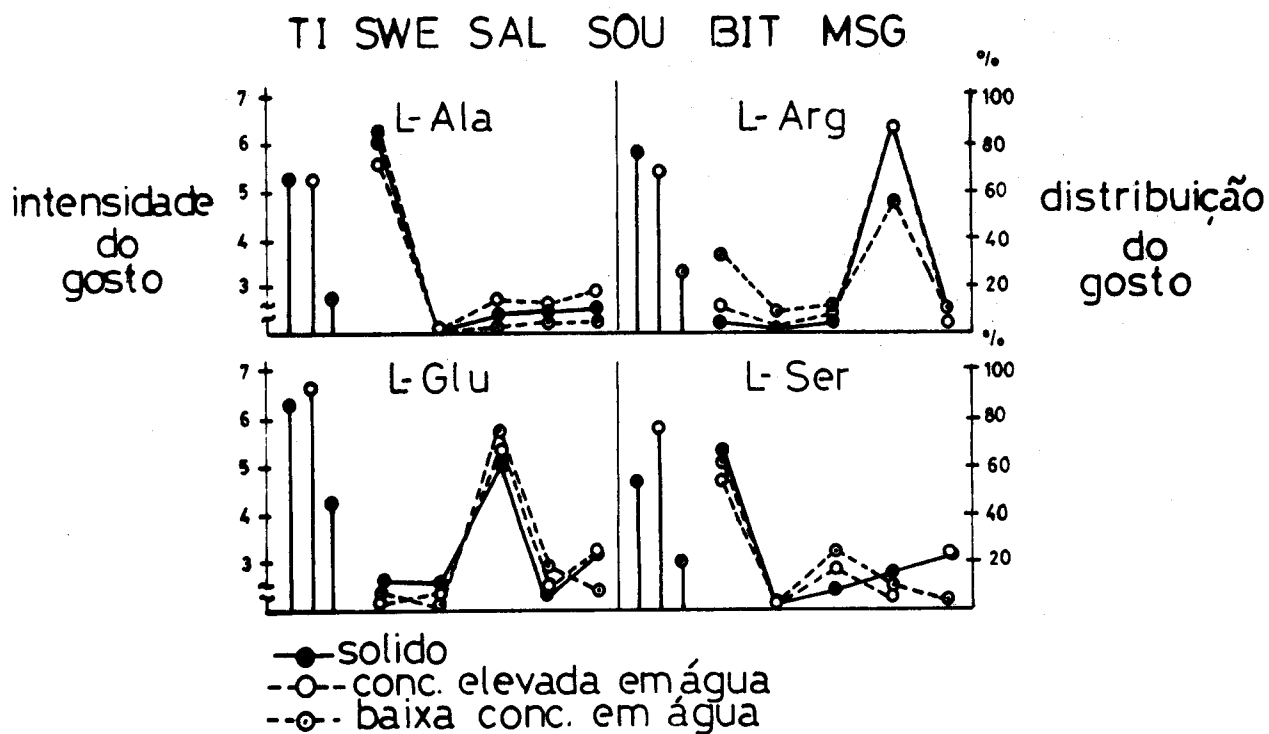
Da apreciação do Quadro V, conclui-se que, normalmente, os aminoácidos não por si sós, mas em conjunto, contribuem para o gosto final dos alimentos, comportando-se de forma diferente, inclusivamente no que diz respeito às características gustativas que comunicam ao produto, devendo-se isto a fenómenos de interacção de gostos e potenciação<sup>159</sup>.

Este aspecto já foi demonstrado com amostras de queijo suíço, chegando-se à conclusão que, não apenas o conjunto dos aminoácidos é importante, como também são as quantidades em que eles estão presentes em determinado alimento<sup>160</sup>. Esta opinião vai ao encontro da verificada por outros autores que consideram que o gosto não está relacionado com um simples composto, mas sim uma mistura de voláteis e involáteis, entre os quais se encontram os aminoácidos, que podem concorrer numa percentagem específica. Com o aumento das certezas respeitantes à inequívoca influencia dos aminoácidos no gosto dos alimentos, hoje em dia eles são, inclusivamente, adicionados a alguns alimentos para melhorar e realçar o gosto dos mesmos<sup>160</sup> (Figura 29).

Os aminoácidos são conhecidos como elementos importantes na caracterização dos alimentos, principalmente nos alimentos que estão sujeitos a um processo tecnológico, visto se considerar que são responsáveis e precursores dos chamados "compostos amadori", os quais resultam da reacção de aminoácidos com açucares (Esquema 22) e são responsáveis pelo gosto de alguns alimentos, como por exemplo o café, o amendoim e o pão<sup>161, 162, 163, 164</sup>.



Esquema 22



TI - intensidade de gosto em comparação c/ soluções de NaCl de 0.2 a 5.123%

SWE-doce SAL-salgado SOU-azedo BIT-acido

MSG- gosto a L: glutamato monósdico

Valores de concentração(g/dl) Ala 0.5 50; Arg 0.2 10

Glu 0.025 0.2 Ser 1.5 15.0

Figura 29: Intensidade e distribuição do gosto de alguns aminoácidos<sup>160</sup>.

#### b) Aminoácidos como precursores de álcoois superiores

Além do interesse directo que podem ter no gosto dos alimentos, quer em natureza quer após transformação, a influência dos aminoácidos na caracterização sensorial é sempre acrescida por eles serem precursores de álcoois superiores<sup>165</sup>. Os álcoois superiores são os tradicionais responsáveis pelo aroma da maioria dos alimentos e também dos vinhos. Os aminoácidos são precursores de parte dos álcoois superiores de um vinho<sup>165</sup> (Figura 30 31) formados segundo um mecanismo que passa por uma desaminação formando-se um cetoácido o qual é em seguida descarboxilado e reduzido para dar o respectivo álcool superior (Figura 31)<sup>167</sup>.



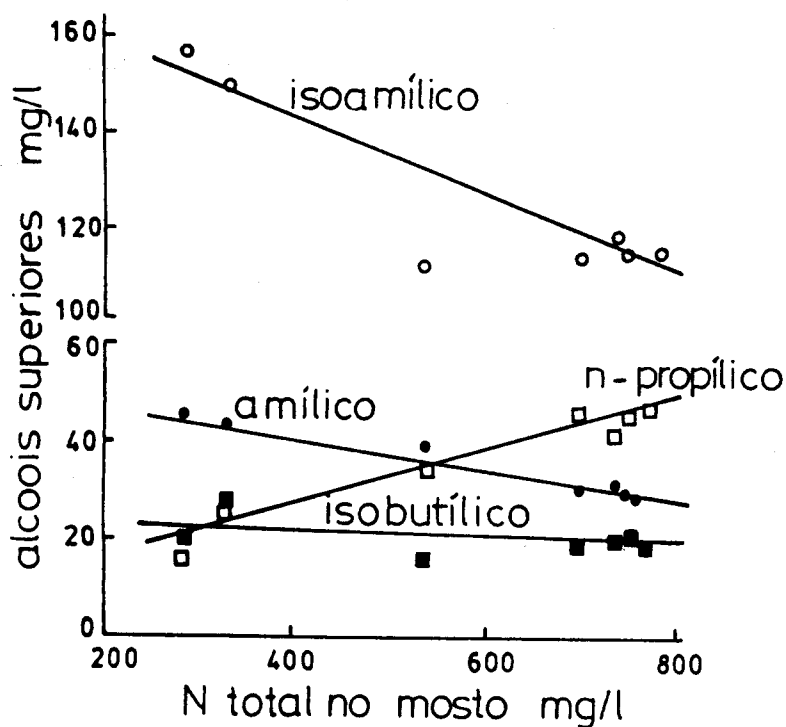


Figura 30: Concentração relativa álcoois superiores e azoto total

Nem todos os álcoois superiores formados provêm dos aminoácidos (Figura 30) A quantidade de aminoácidos normalmente presente nos vinhos, é pequena para explicar a totalidade dos álcoois superiores existentes nos mesmos, além disso, alguns dos álcoois superiores existentes não correspondem a nenhum dos aminoácidos ou seja, não podem ser formados a partir de nenhum deles;

Durante a fermentação alcoólica, alguns dos álcoois superiores formados provêm dos aminoácidos, mas a maior parte, cerca de 2/3 são formados a partir dos hidratos de carbono<sup>167</sup> (Figura 32).

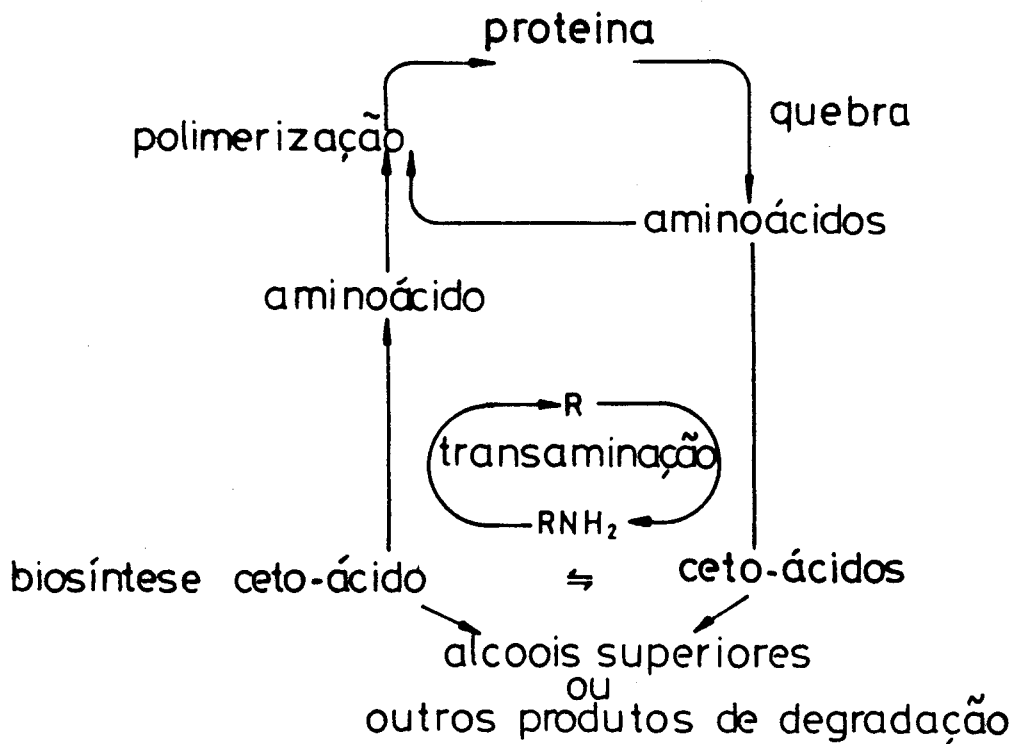


Figura 31: Formação de alcoois superiores a partir de aminoácidos<sup>168</sup>

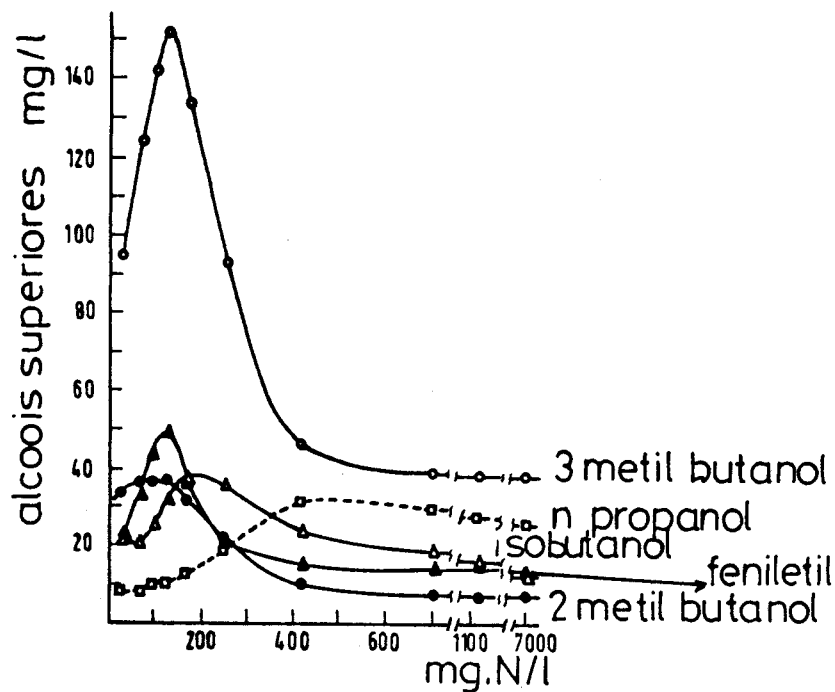


Figura 32: Formação dos alcoois superiores na fermentação de uma solução de 8% de glicose contendo sulfato de amônio como fonte de azoto (média de duas fermentações)<sup>169</sup>.

Os alcoois superiores formados a partir dos aminoácidos parecem seguir todos o mecanismo proposto para a formação do tirosol a partir da tirosina<sup>153</sup> (Esquema 23). Durante esta reacção, o grupo amina é retirado por transaminação (o 2-oxoglutarato é essencial a este processo), seguida de descarboxilação do cetoácido correspondente para dar o aldeído. O aldeído é reduzido no terceiro passo para dar o alcool<sup>153</sup>.

Tirosina + 2-oxoglutarato --- pHidroxifenilpiruvato + ác. glutâmico  
 pHidroxifenilpiruvato ----- pHidroxifenilacetaldeído + CO<sub>2</sub>  
 pHidroxifenilacetaldeído + DPN reduzido ----- pHidroxifeniletanol  
 (tirosol) + DPN oxidado

#### Esquema 23

Os álcoois superiores podem, no entanto, ser formados a partir de outros mecanismos e mesmo de outros compostos. Os mecanismos responsáveis pela transformação da matéria prima em álcoois superiores são dependentes de vários aspectos, sendo os mais importantes a natureza da matéria prima, as condições de fermentação (temperatura e arejamento etc.) e os tratamentos sofridos pelo mosto bem como a espécie de levedura.

As leveduras desempenham um papel importante, já que a maioria dos aminoácidos é assimilada pela levedura e apenas uma percentagem que varia entre 10-30%, é degradada em álcoois superiores. No início da fermentação, a maioria dos alcoois superiores derivam dos aminoácidos enquanto que, em seguida, inter-vêm principalmente os hidratos de carbono<sup>170</sup> (Figura 33).

Existe uma relação entre os alcoois superiores e o teor em aminoácidos. Se bem que não se possa estabelecer uma relação simples e quantitativa, verifica-se que, as castas mais ricas em aminoácidos, são também as mais ricas em alcoois superiores<sup>168</sup>.

O tipo de aminoácidos presentes no meio fermentativo, parece também ter importância, e julga-se haver uma relação entre os aminoácidos de cadeia ramificada e a produção de álcoois superiores. Considerando-se<sup>171</sup> que, a formação de álcoois superiores segue uma via anabólica e uma via catabólica, a produção pela

segunda via aumenta com o aumento da concentração em aminoácidos, enquanto que a via anabólica é suprimida nestas condições.

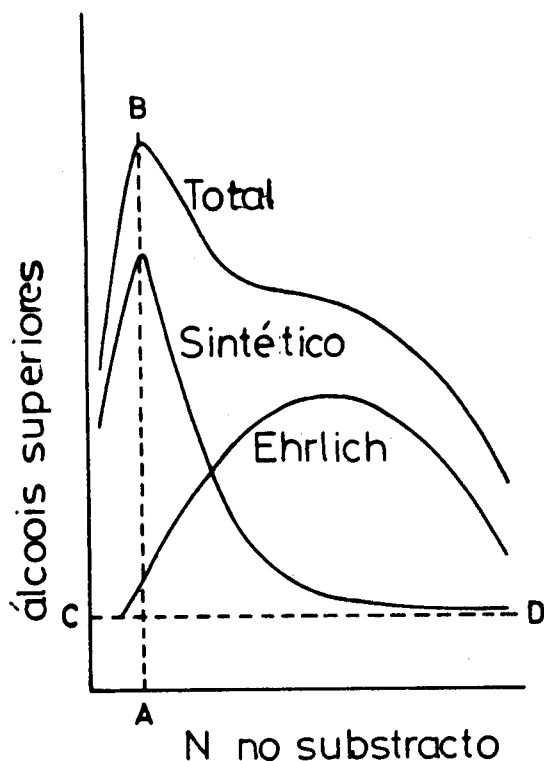


Figura 33: Esquema da formação de álcoois superiores tendo como fonte de azoto no substrato AA. A formação do álcool atinge um máximo a níveis baixos de azoto (AB), decrescendo rapidamente com o aumento dessa concentração atingindo um valor característico de cada álcool superior (CD)<sup>169</sup>.

A levedura tem um papel importante na formação de álcoois superiores. Foi demonstrado que<sup>172</sup>, em meios pobres em azoto directamente assimilável, a levedura utiliza exclusivamente as suas funções biosintéticas para a formação dos álcoois superiores. Os álcoois superiores formados não variam grandemente com o tipo de levedura mas, nos casos em que o meio foi suplementado com uma mistura de aminoácidos semelhantes aos normalmente encontrados no mosto ou meio fermentativo, a levedura já os usa na sua produção. Neste caso, os álcoois superiores formados são diferentes de levedura para levedura<sup>172</sup>.

Para a valina e leucina, que foram objecto de estudo específico<sup>172</sup> pode considerar-se que a fracção do aminoácido transformada em álcool superior é inversamente proporcional ao azoto

total do substracto. Quando há limitações de azoto, todos os aminoácidos se comportam da mesma maneira como dadores de azoto, sendo aproximadamente 50% transformados em álcoois superiores. Nos casos em que os níveis de azoto são altos, e os aminoácidos estão presentes em excesso, a leucina parece ser preferencialmente utilizada, a fenilalanina a seguir sendo a valina e a isoleucina pouco utilizados <sup>168</sup>.

Estas conclusões não devem, porém, ser generalizadas aos aminoácidos que não fizeram parte de estudos específicos sobre o assunto.

Pode-se concluir que, num meio fermentativo relativamente pobre em azoto directamente assimilável e em aminoácidos, os álcoois superiores são formados, nos primeiros estádios da fermentação, a partir dos aminoácidos mas, logo de seguida, eles são formados principalmente pela via anabólica, a partir dos hidratos de carbono do meio <sup>173</sup> (Figura 33).

#### 4.4 - A prolina nos vinhos

Sendo a prolina o aminoácido presente nos vinhos de *Vitis vinifera* em maior quantidade, ela tem merecido atenção especial por parte dos vários autores. A sua evolução durante a fermentação, e mesmo a sua importância como aminoácido caracterizante da genuinidade dos vinhos, tem sido tratada com especial cuidado.

A prolina é um aminoácido dificilmente assimilado pela levedura. A maturação encontra-se quase que exclusivamente no bago, e mantém o teor inicial durante o processo fermentativo <sup>174</sup> (Tabela 3).

A prolina está presente no vinho em quantidades que chegam a atingir 90% do total de aminoácidos livres. Este quantitativo pode ser explicado por haver uma acumulação de prolina em condições de excesso de azoto, e por ser dificilmente assimilada pela levedura, e dificilmente metabolizado durante a fermentação <sup>175</sup> (Figura 34).

As variedades de uva de mesa apresentam, normalmente, teores menores de prolina do que as variedades de vinho. A levedura só utiliza prolina em condições de falta de azoto. As diferenças na

concentração de prolina entre as várias variedades são significativas. Existe uma relação entre variedades/regiões, se bem que as condições que determinam a acumulação de prolina sejam inerentes à variedade e ao metabolismo da levedura<sup>175</sup>.

Tabela 3  
Evolução da Prolina durante a fermentação<sup>175</sup>

	Mosto desanionizado							
	Mosto		Controle		Amônia (1000 mg/l)		Ac. Glutâmico (1000 mg/l)	
	Sem Pro	Pro (500mg/l)	Sem Pro	Pro (500mg/l)	Sem Pro	Pro (500mg/l)	Sem Pro	Pro (500mg/l)
Ínicio de Ferment. (horas)	96	96	480	408	288	288	264	264
Ferment. a 0°Brix (horas)	204	240	a	b	648	744	744	648
Taxa de Ferment. °Brix/Hor. (18° a 5°)	0.27	0.32	0.006 <sup>c</sup>	0.018	0.070	0.070	0.054	0.067

- a- fermentação parou a 8.9 ° Brix após 2,5 meses  
b- fermentação parou a 1.8 ° Brix após 2 meses  
c- valor estimado

Havendo nas uvas uma percentagem de prolina ao nível das grainhas e peles<sup>174</sup>, o teor deste aminoácido é normalmente mais elevado nos vinhos tintos do que nos brancos (Figura 27), principalmente devido às diferenças no processo de fermentação que nos tintos é geralmente de curtimenta<sup>176</sup>.

Qualquer composto que se encontre presente no vinho em quantidades apreciáveis, merece ser estudado de modo a poder ser apreciado profundamente e o seu resultado interpretado da forma mais conveniente. A prolina foi considerada como útil na representação de fraudes, já que o seu teor elevado nos vinhos da variedade de *Vitis vinifera*, não se mantem quando se passa para vinhos e/ou

mostos de outras variedades, como p.e. *labrusca*<sup>176</sup>,

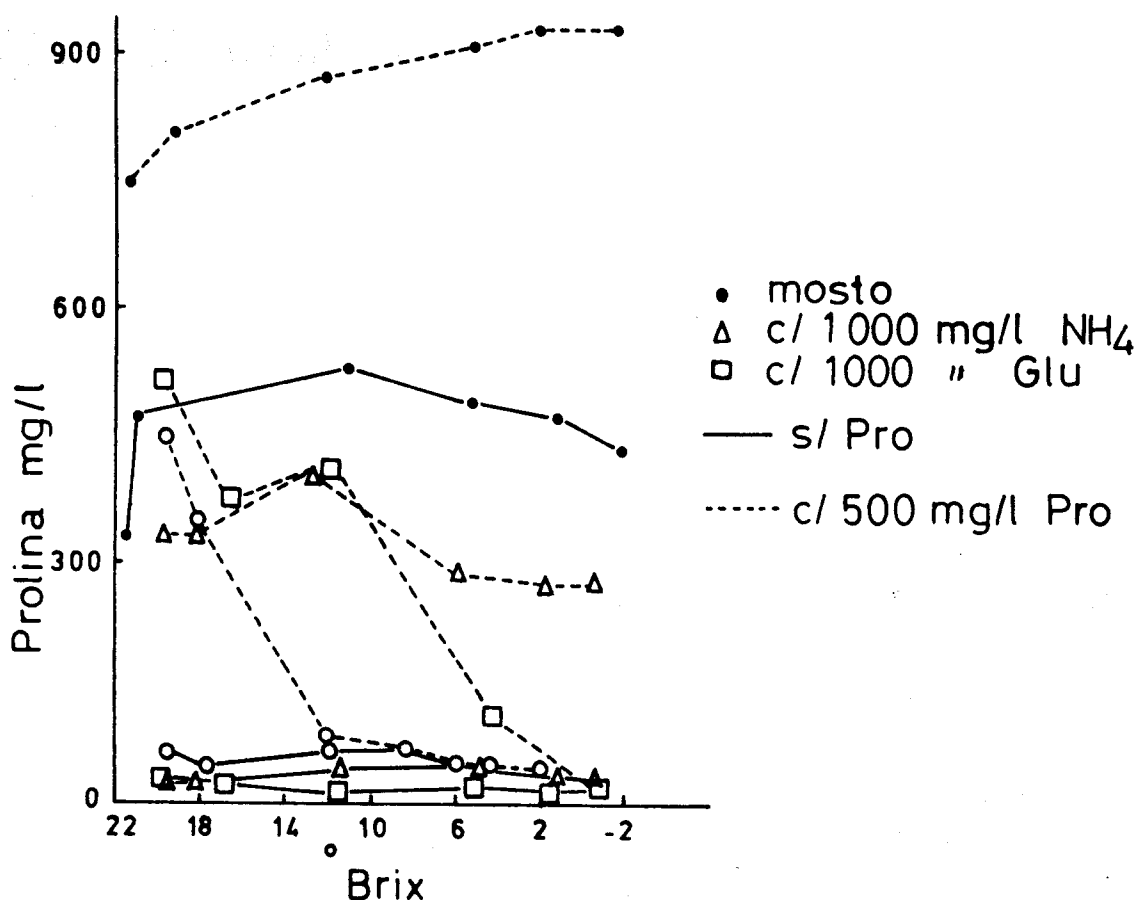


Figura 34: Efeito da remoção de aminoácidos, com adição de amônia e ácido glutâmico, no consumo ou libertação de prolina pela levedura durante o crescimento e fermentação<sup>175</sup>.

Estabeleceu-se um método expedito para a determinação das concentrações de prolina nos vinhos, o qual pretende, ao mesmo tempo, distinguir entre vinhos genuínos, e produtos resultantes da adição ao mosto de sacarose, ou mesmo produtos resultantes da fermentação de várias soluções capazes de permitir a obtenção, no final, de um produto alcoolizado capaz de ser confundido com o vinho<sup>3</sup>. Este método baseia-se no facto de se admitir que todos os vinhos de *Vitis vinifera* possuem prolina em concentrações superiores a 200mg/l. Os produtos de falsificação não possuiriam quantitativos tão elevados.

O método tem contudo sido sujeito a graves críticas. Não só

porque nem todos os vinhos genuínos possuem valores tão elevados como os citados, como ainda por o método dosear, juntamente com a prolina, a citrulina e a ornitina<sup>177</sup>. Além dos erros a que este método pode induzir, a sua falta de aceitação resulta ainda de ser extremamente fácil adicionar a um vinho, ou a um produto de falsificação, prolina, levando-o, por fraude, a ter os quantitativos exigidos por lei.

É prática comum, aos adulteradores de qualquer produto, incluindo os de vinho, a adição dos necessários produtos químicos que permitam obter no final os valores legais. É por isso útil, recorrer à caracterização por compostos individuais ou combinados, cuja adição seja tão onerosa que torne inviável a utilização de aditivos falsificantes<sup>178</sup>.

Nos sumos de frutas <sup>179</sup> considera-se que os aminoácidos obedecem a este requisito, havendo casos em que eles são utilizados individualmente - caso da prolina para os sumos de morango -, e casos em que se olha, não para um individualmente, mas sim para um perfil de aminoácidos<sup>178</sup>. Apenas nos casos em que se considera o perfil global de aminoácidos, a adulteração pode ser realmente detectada<sup>178</sup>.

Na indústria de sumos de frutas tornou-se evidente que a percentagem dos diferentes aminoácidos oposto ao total de aminoácidos presentes, bem como a relação dos diferentes aminoácidos entre si, é capaz de produzir uma espécie de impressão digital característica de cada tipo de sumo de variedades diferentes, ou ainda da mesma variedade provenientes de regiões diferentes<sup>179</sup>. A aplicação destes conceitos à caracterização de vinhos, oferece um promissor caminho de investigação enológica, para o qual o presente trabalho procura ser uma contribuição.

#### **4.5 - Os aminoácidos nos vinhos Portugueses**

No Quadro V resumem-se os trabalhos realizados em Portugal sobre aminoácidos nos vinhos. Como seria de esperar as variações nos teores de aminoácidos com o grau de maturação, o tipo de fermentação e armazenamento verificam-se igualmente. De realçar a influencia notada para os teores de aminoácidos nos vinhos espu-



mantes, como percursores de alcoois superiores<sup>182</sup>, referido como podendo ser utilizado na repressão de fraudes. A maioria dos trabalhos são realizados por cromatografia de papel ou de camada fina se bem que um dos trabalhos<sup>183</sup> use a cromatografia em fase gasosa em colunas de empacotamento, e compare os resultados obtidos por ambos os métodos. Nos trabalhos realizados podemos considera haver trabalhos em todos os aspectos mais importantes, mostos em fermentação<sup>149</sup>, uvas no período final de maturação<sup>184</sup>, ensaios de envelhecimento<sup>180</sup> e mostos de regiões diferentes<sup>181</sup>, parece poder inferir-se que também em Portugal a análise de aminoácidos tem despertado interesse.



Refª	Método	Meio	Conclusão
180	Cromatografia de papel após separação por troca-iónica. Separação por grupos: aromáticos, neutros e básicos	Vinho do Porto -no depósito após hidrólise -no vinho lívres	No depósito encontraram tirosina, fenilalanina, triptofano (vesti.) ác. aspártico, ác. glutâmico, alanina, prolina (mal def.), metionina, valina, leucina. No vinho dezoito AA identificados por grupos conforme se referiu
181	Cromatografia de papel bidimensional após separação por troca-iónica.	Mostos de castas da região do Oeste e do Dão	Não se notou variação acentuada de casta para casta no aspecto qualitativo. Encontraram dez aminoácidos comuns a todas as castas sendo os mais concentrados ác. glutâmico, alanina, arginina + histidina, ác. aspártico, ác. γ aminobutírico, glicina, leucina, lisina e metionina + valina, sendo a prolina, serina e treonina de concentração média e os restantes muito pouco conc. Não notam influência do portu-enerto. Os mostos de uvas mais maduras são menos ricos; Mostos de várzeas são mais ricos bem como os mostos mais tempo em contacto com as borras.
182	Cromatografia em papel ligada à electroforese	Vinhos espumantes	Consideram que sendo tão importante a transformação dos aa a alcoóis superiores no fabrico dos espumantes a quantificação seria susceptível de dar informação sobre o espumante ser natural ou gaseificado. Encontram valores mais elevados no natural que no gaseificado e consideram este facto importante no sentido de se definir a qualidade exigível ao vinho de base bem como as condições em que ele deve fermentar
183	Cromatografia em fase gasosa em colunas de empac. derivados ésteres butílicos N-TFA; experimentaram mais do que uma coluna e, após determinação dos factores de resposta os aminoácidos foram separados em duas colunas; é feita comparação com PC; separação preliminar por troca-iónica	Vinhos fornecidos pelo CNEV	Obtiveram cinco picos não identificados em GC; identificaram alguns aminoácidos normalmente não referidos tais como o 5-OH pipécólico, o pipécólico (em ambas as castas) e o 4-OH pipécólico numa das castas mas esta identificação foi só por PC. Alguns dos derivados separaram totalmente: A análise quantitativa de GC não está de acordo com a intensidade de coloração das manchas de PC
184	Cromatografia em camada fina após separação por resina de troca-iónica	Mostos de castas da região do Oeste. Evolução dos aminoácidos ao longo da maturação	Apresentam apenas resultados semi-quantitativos. Ao longo da maturação há aumento acentuado de alguns aminoácidos enquanto que outros não se alteram outros ainda alteram-se pouco. As castas Vital e Santarém apresentam geralmente concentração mais elevada AA. A 1ª colheita foi em Set;
149	Cromatografia em camada fina	Mostos em fermentação (Oest) Ensaio com adição de SO <sub>2</sub> sem adição de SO <sub>2</sub> e com adição de fosfato de amónio	No início há consumo elevado de aminoácidos ficando inalterada a prolina; Quando a fermentação tumultuosa começa a diminuir e se inicia a autólise das leveduras aparecem novamente aminoácidos. O ensaio com fosfato de amónio fermentou melhor e sem que se notasse o decréscimo inicial tão elevado. Concluem que as lev. preferem para o seu metabolismo de azoto mineral.

## 5 - CARACTERIZAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DE VINHOS ELEMENTARES PELA ANÁLISE DOS PERFIS DE AMINOÁCIDOS LIVRES. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Análise de aminoácidos. Estabelecimento do método de análise por CGL

A análise dos aminoácidos em vinhos, por CGL, obriga ao seu isolamento, e posterior derivatização química. O isolamento dos aminoácidos foi realizado por troca-iónica em resinas de Dowex 50W-X8 na forma ácida ( $H^+$ ). O afinamento das condições de troca-iónica foi realizado utilizando misturas de padrões de aminoácidos em concentrações semelhantes às normalmente existentes nos vinhos, e contendo igualmente o aminoácido escolhido para servir de padrão interno, a cicloleucina. O controle da cromatografia de troca-iónica foi feito por cromatografia de camada delgada (CCD). A derivatização química foi feita por bloqueamento dos grupos funcionais em dois passos de reacção. Ensaíram-se dois métodos; A identificação dos derivados foi feita por injeção de padrões e comparação dos tempos de retenção relativos e por GCMS. A análise quantitativa foi realizada recorrendo ao método do padrão interno. Como padrão interno utilizou-se a cicloleucina e alternativamente um hidrocarboneto ( $C_{14}$  ou  $C_{28}$  consoante o método de derivatização). Os resultados correspondem, sempre que não se faça referência em contrário, à média de quatro amostras replicadas.

#### 5.1.1 - Cromatografia de troca-iónica

O mecanismo da cromatografia de troca-iónica baseia-se no facto de os aminoácidos se comportarem, em soluções aquosas, como iões anfotéricos podendo a sua carga ser mudada consoante o pH do meio. Em meio ácido os aminoácidos comportam-se como catiões podendo ser adsorvidos em trocadores catiónicos dos quais são libertados se se escolher um eluente adequado, em concentração apropriada. No nosso caso foi utilizada a amónia 4M.

A quantidade de eluente capaz de fazer eluir a totalidade da

amostra a cromatografar é fundamental. Não sendo os aminoácidos substâncias cromóforas, e não lhes tendo essa propriedade sido conferida por derivatização, a forma mais acessível para avaliar se a eluição está ou não a ser completa é fazendo o seu controle por cromatografia em camada delgada seguida de revelação posterior com ninidrina.

As amostras de eluído são recolhidas a intervalos regulares, considerando-se a eluição completa quando o eluído já não apresenta reacção corada à ninidrina.

#### 5.1.1.2 - Estabelecimento das condições de isolamento

Uma mistura contendo cinco padrões de aminoácidos e três de açúcares, foi depositada na coluna e eluída primeiro com água para retirar a fracção dos açúcares, e de seguida com amónia 4M para retirar a fracção que contém os aminoácidos. Os eluídos (fracção aquosa e fracção amoniacal) foram cromatografados, separadamente, por placa, tendo o cuidado de se cromatografar conjuntamente uma amostra de padrões que não tivesse sido sujeita a troca-iónica.

A placa correspondente à fracção aquosa revela que os açúcares foram eluídos da coluna de troca-iónica no primeiro passo do tratamento (Figura 35 A).

A placa B (Figura 35 B)(correspondente à fracção amoniacal), apresenta problemas. A cromatografia da amostra de padrões sem passagem na resina apresenta dois dos aminoácidos, lisina e histidina, com Rfs muito próximos o que dificulta a separação e identificação. A pequena separação do ponto de aplicação levou a considerar a mudança do eluente para outro mais polar. A cromatografia correspondente á amostra de eluído não revela a presença de aminoácidos. Os aminoácidos ficaram retidos na resina.

A segunda placa (Figura 35 C), feita com um eluente mais polar, corresponde a uma fracção eluída com um volume de eluente de 20 ml. Apresenta uma separação melhorada. Não apresenta contudo qualquer mancha na amostra correspondente à fracção amoniacal eluída da coluna de troca-iónica (figura 35 C amostra 1 - 6).

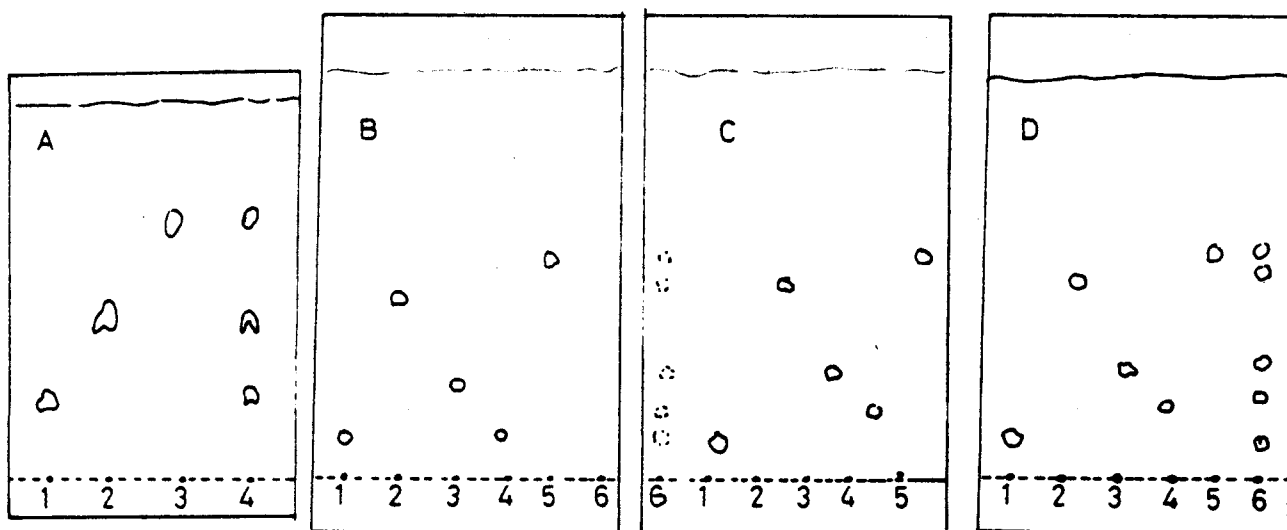


Figura 35: A- placa correspondente à fracção aquosa eluída da coluna de troca-iónica 6-aplicação do eluído; 1- Glucose; 2-Sacarose; 3-Ramnose. Eluente- clorofórmio:metanol (60:40). Revelador: anisaldeído. B C e D- placas correspondentes à fracção amoniaca eluída da coluna de troca iónica; 6- aplicação do eluído, 1- Lisina; 2-Metionina; 3-Glicina; 4-Histidina; 5-Fenilalanina. Eluente: n-butanol:ác. acético:água B-80:20:20; C e D-80:25:20. Volume- B-10ml; C-20ml; D-30ml; Revelador: ninidrina.

Após eluição com 30 ml de amónia 4M, já não foi possível detectar aminoácidos nas últimas fracções de eluído. Concluiu-se ter havido eluição completa dos aminoácidos (Figura 35 D).

Os mesmos volumes de eluente foram aplicados na separação por troca-iónica de uma amostra contendo a totalidade dos aminoácidos proteicos, utilizando-se para tal uma coluna de 17g de Dowex 50W-X8 na forma  $H^+$ . O eluído (fracção amoniaca) foi cromatografado por CCD nas condições previamente estabelecidas (Figura 36). Considerou-se a recuperação total quando já não puderam ser detectados aminoácidos no eluído (30 ml).

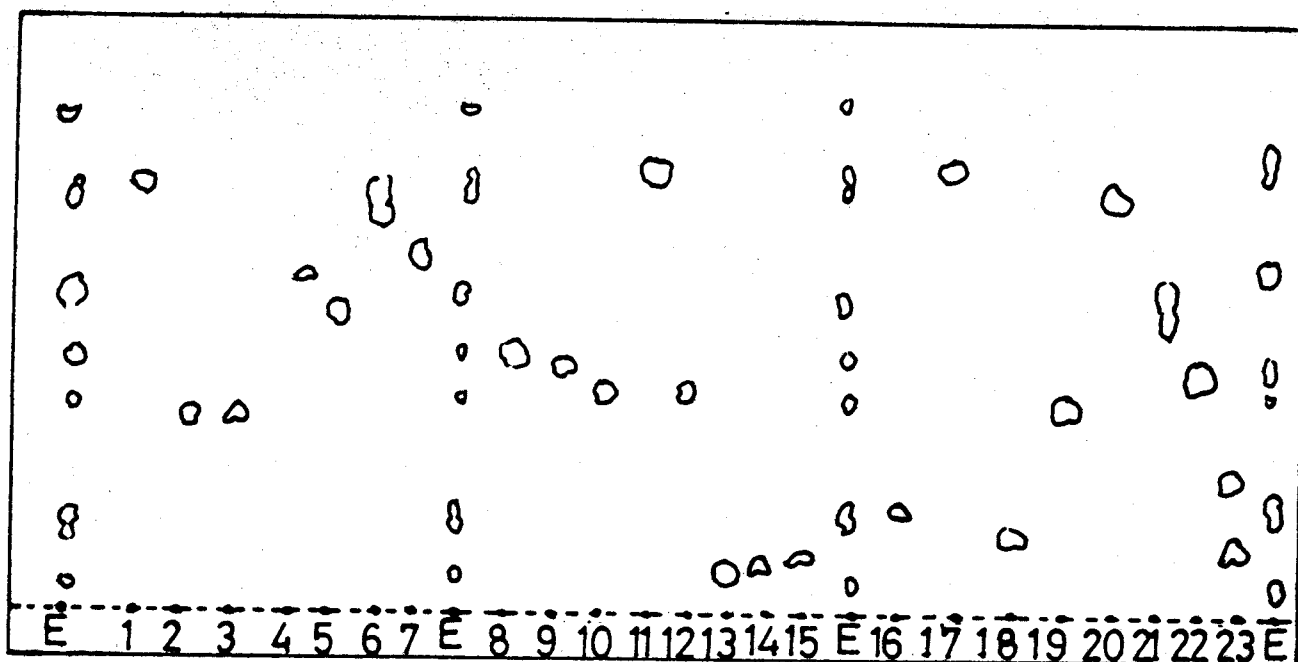


Figura 36: Placa correspondente à fracção amoniacal eluída de uma coluna de troca-iónica Dowex 50W-X8; E- fracções do eluído; 1- Triptofano; 2- Prolina; 3- Ác. Aspártico; 4- D-hidroxifenilalanina; 5-  $\alpha$ -aminobutírico; 6- Isoleucina; 7- Tirosina; 8- Treonina; 9- Ác. glutâmico; 10- Glicina; 11- Leucina; 12- Hidroxiprolina; 13- Lisina; 14- Ornitina; 15- Histidina; 16- Arginina; 17- Nor-leucina; 18- Cistina; 19- Serina; 20- Fenilalanina; 21- Metionina; 22- Alanina; 23- Cisteína. Eluente: n-butanol:ác. acético:água (80:25:20). Volume - 30 ml; Revelador: ninidrina.

### 5.1.1.3 - Estudo da recuperação dos aminoácidos

Estabelecido o processo de isolamento de aminoácidos por troca-iónica, torna-se necessário saber se a recuperação é feita com rendimento suficiente de modo a que a análise quantitativa seja reprodutível e correcta. Para tal utilizou-se como padrão de controle, a cicloleucina, adicionada previamente em concentração conhecida. Introduziu-se assim um elemento controlador da eficiência do isolamento de aminoácidos por troca-iónica. Porém, a cicloleucina é, também ela, um aminoácido e como tal não é directamente aplicável a cromatografia em fase gasosa sem derivatização prévia. Dependendo os resultados quantitativos da eficiência da derivatização, foi necessário a adição de um segundo composto de referência a fim de obter controlo sobre o decurso

deste passo fundamental.

Ao resíduo obtido por evaporação do eluído, torna-se necessário, antes de derivatizar, a adição de um composto de referência que não sofra qualquer reacção durante a derivatização, por exemplo um hidrocarboneto. Escolheu-se o tetradecano (C<sub>14</sub>). O factor de resposta do FID para a cicloleucina relativamente ao tetradecano foi previamente calculado. Na Tabela 4 mostra-se o rendimento de recuperação da cicloleucina quando derivatizada sob a forma de éster isopropílico N-heptafluorbutírico utilizando como padrão interno o tetradecano.

Tabela 4  
Cálculo do rendimento da derivatização para a cicloleucina  
Ester isopropílico da N-heptafluorbutirilcicloleucina

Quantidade de cicloleucina (mg) Peso Real	Rendimento Peso Calculado
0.079	100 %

Sabendo o rendimento da derivatização, e utilizando ainda a cicloleucina como padrão de referência adicionado em concentração conhecida, foi calculado o rendimento da eluição (Tabela 5).

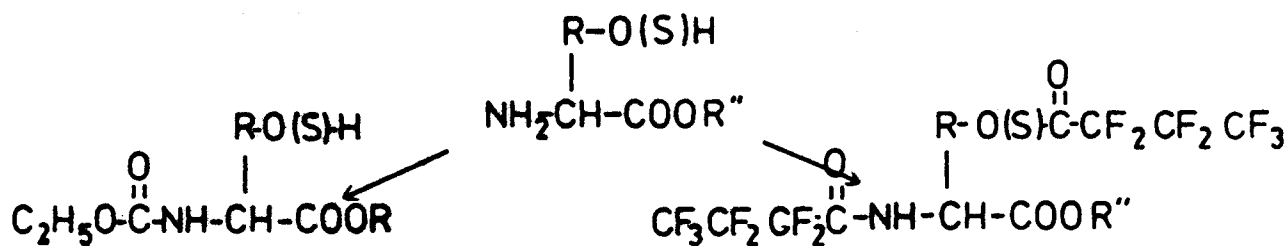
Tabela 5  
Cálculo do rendimento da troca-iónica

FR Cle/C <sub>14</sub>	SD%	Cicloleucina Qtd adicionada mg	Qtd calculada mg	Rendimento %
0.3	1.7	0.157	0.131	83.5

### 5.1.2 - Derivatização

Ensaíram-se dois métodos de derivatização, ambos envolvendo a esterificação do grupo carboxilo e diferindo na forma de bloquear o grupo amina, para o qual se experimentaram dois métodos: o bloqueamento do grupo NH<sub>2</sub> pelo grupo heptafluorbutirilo e pelo

grupo etoxicarbonilo (esquema 24). A introdução deste último nos nossos estudos teve como objectivo a busca de uma maior estabilidade das amostras derivatizadas, tirando partido de uma maior resistência à hidrólise. Os ensaios para afinamento das reacções de derivatização foram levados a cabo em amostras de padrões cromatograficamente puros.



Esquema 24

#### 5.1.2.1 - Acilação. Obtenção dos derivados N-heptafluorbutíricos dos ésteres isopropílicos

Como agente acilante usou-se o anidrido heptafluorbutírico (HFBA), por ser um agente acilante forte, e ao mesmo tempo capaz de fornecer derivados estáveis sendo ainda, dentro os agentes acilantes já utilizados, aquele que fornece derivados mais voláteis, susceptíveis de serem analisados em tempos de análise mais curtos<sup>73</sup>.

A acilação à temperatura ambiente é normalmente suficiente para acilar a maioria dos aminoácidos simples<sup>61</sup>. Os aminoácidos mais difíceis, como por exemplo a histidina e a arginina, necessitam contudo de tempos de aquecimento a 150<sup>o</sup>61 de pelo menos 5 minutos. A histidina pode ainda sofrer uma terceira reacção de derivatização, etoxicarbonilação, visando o bloqueio do azoto imidazólico<sup>78</sup> (Esquema 15). Esta reacção, que decorre a 150<sup>o</sup>C durante 15 minutos, facilita a obtenção do derivado diacilado.

Na derivatização química de aminoácidos, o compromisso é geralmente estabelecido entre a derivatização completa dos aminoácidos mais difíceis e a não destruição dos mais simples.

Foram ensaiados tempos de acilação de 150<sup>o</sup>C durante 5 15 e



25 minutos (Tabela 6).

Tabela 6  
Factores de resposta dos derivados N-heptafluorbutíricos em  
função do tempo de acilação a 150° C

Condições de esterificação 110°C-30 minutos  
Temperatura de Acilação 150°C

Aminoácido	Tempo (min.)					
	5		15		25	
	FR (Cle=1)	SD%	FR (Cle=1)	SD%	FR (Cle=1)	SD%
Ala	0.84	4.4	1.91	4.4	1.36	4.4
Gly	1.18	4.2	1.65	4.1	1.27	5.1
Abu	1.44	5.1	2.53	1.9	1.52	8.7
Val	0.68	5.5	1.39	0.0	0.70	9.4
Tre	1.04	3.5	1.46	2.5	0.83	19.0
Ser	1.26	1.5	1.46	1.8	0.83	10.6
Leu	1.61	0.6	1.75	1.1	1.64	2.0
Pro	1.61	3.9	1.60	0.8	1.47	13.5
Cys	0.16	8.3	0.47	0.0	0.28	4.0
Asx	1.30	4.0	1.40	0.0	1.25	7.5
Hyp	0.70	4.1	1.80	4.0	0.74	10.5
Met	1.39	2.7	1.26	0.0	1.19	4.6
Glx	1.72	5.7	1.51	0.0	1.36	8.9
Phe	1.49	2.5	1.49	0.8	1.36	8.1
Orn	0.77	4.8	0.89	1.9	0.58	9.5
Cys <sub>2</sub>	0.33	3.8	0.46	3.8	0.31	---*
Lys	1.49	1.0	0.95	1.3	0.58	11.4
Tyr	0.89	2.7	0.81	0.0	0.64	3.4
His**	0.32	4.0	0.75	1.6	0.39	28.2
Arg	0.32	5.5	0.33	14.8	0.13	---*
Trp	1.05	0.0	0.54	3.6	0.39	5.6

\* só uma das amostras deu pico detectável

\*\* etoxicarbonilada no azoto imidazólico

O exame da Tabela 6, permite-nos concluir que, se exceptuarmos os derivados da metionina, ácido glutâmico/glutamina, triptofano e lisina com resposta relativa mais elevada ao fim de 5 minutos, os restantes apresentam resposta mais elevada ao fim de 15 minutos decrescendo com o prolongamento do aquecimento de 15 para 25 minutos. Alguns aminoácidos ao fim de 25 minutos mostram claramente um início de degradação. De notar também que, o desvio padrão é normalmente mais baixo a 15 minutos do que a 5 ou a 25 o

que indica, no primeiro caso a derivatização incompleta, ocorrência de derivados mistos ou derivatizações não quantitativas, e no segundo caso o início claro da destruição com consequência idêntica de derivatização não quantitativa.

Adoptou-se o tempo de acilação de 15 minutos para um aquecimento de 150°. Estabelecidas as condições de acilação mais favoráveis, e sendo esta a reacção mais delicada e mais difícil de realizar de forma reprodutível, o período de aquecimento a 110°, durante a esterificação, só foi afinado para as condições óptimas de acilação.

#### 5.1.2.2 - Esterificação. Obtenção dos ésteres isopropílicos

A esterificação do grupo carboxilo dos aminoácidos foi levada a cabo por aquecimento a 110 ° por 30 min. com uma solução 4M de HCl em isopropanol. O tempo de reacção foi determinado para cada um dos aminoácidos, determinando os factores de resposta relativos à cicloleucina (Cle) após 30 e 60 minutos de reacção (Tabela 7). Adoptou-se o tempo de aquecimento a 110°C durante 30 minutos, por se considerar que ao fim deste tempo a esterificação estava completa (Tabela 7).

As variações da resposta relativa com o aumento do tempo de esterificação de 30 para 60 minutos não são significativas. Na maioria dos casos as variações dão-se no sentido de uma diminuição do factor de resposta com o aumento do tempo de aquecimento. Os derivados correspondentes ao triptofano, tirosina, ornitina e cisteína apresentam, ao fim de 60 minutos, desvio padrão elevado, atribuível a um início de decomposição dos derivados possivelmente no radical éster.

#### 5.1.2.3 - Estabilidade dos Derivados

Importante ainda para conhecimento dos derivados é a avaliação da sua estabilidade. A estabilidade dos derivados, quando conservados em frigorífico, foi ensaiada por um período de 60 gdias. Os factores de resposta em relação à cicloleucina foram determinados logo após a acilação e comparados com os obtidos por

análises periódicas da mesma amostra efectuadas durante aquele intervalo de tempo. Os resultados estão sumarizados na Tabela 8;

Tabela 7  
Factores de resposta dos derivados ésteres isopropílicos dos derivados N-heptafluorbutíricos em função do tempo de esterificação a 110° C mantendo a acilação a 150° C durante 15 minutos

Aminoácido	Condições de acilação 150°- 15 minutos Temperatura de esterificação 110°C			
	30 minutos		60 minutos	
	FR (Cle=1)	SD%	FR (Cle=1)	SD%
Ala	1.91	4.4	1.90	3.9
Gly	1.65	4.1	1.60	0.7
Abu	2.53	1.9	2.52	2.4
Val	1.39	0.0	1.41	4.3
Tre	1.46	2.5	1.46	4.2
Ser	1.46	1.8	1.37	9.8
Leu	1.75	1.1	1.78	0.6
Pro	1.60	0.8	0.80	1.5
Cys	0.47	0.0	0.20	22.3
Asx	1.40	0.0	1.31	4.4
Hyp	1.80	0.0	1.28	4.3
Met	1.26	0.0	1.12	4.4
Glx	1.51	0.0	1.23	4.8
Phe	1.49	0.8	1.31	3.9
Orn	0.89	1.9	0.67	9.4
Cys <sub>2</sub>	0.46	3.8	0.41	---
Lys	0.95	1.3	0.65	11.7
His	0.75	1.6	0.44	5.2
Arg	0.33	14.8	---	---
Trp	0.54	3.6	0.47	11.7

\* só uma das amostras deu pico detectável

\*\* etoxicarbonilada no azoto imidazólico

A maioria dos aminoácidos revela estabilidade elevada quando conservada em frigorífico durante 60 dias. Como excepções pode-se referir a serina que diminui quase 50% no final do período de armazenamento, bem como a arginina e o triptofano. A hidroxiprolina revela logo acentuado decréscimo ao fim dos 10 dias iniciais de armazenamento bem como a tirosina. A diminuição de aminoácidos como a serina, a hidroxiprolina e a tirosina faz supor a perda do radical acilo no grupo hidroxilo das respectivas cadeias late-

rais, atribuindo-se o decréscimo da resposta à diminuição do teor do derivado totalmente derivatizado. A treonina decresce em percentagem bastante inferior se bem que ao fim de 60 dias tenha tido um decréscimo global de 20%. O decréscimo do triptofano deve-se à perda do acilo no azoto indólico.

Tabela 8  
Estabilidade dos ésteres isopropílicos N-heptafluorbutíricos quando armazenados em frigorífico (4° C) durante dois meses

Aminoácido	FR - Cle=1 Data da análise		
	26/7	5/8	29/9
Ala	1.91	0.91	0.93
Gly	1.65	1.61	1.61
Abu	2.53	2.42	2.40
Val	1.39	1.33	1.30
Tre	1.46	1.42	1.20
Ser	1.46	1.31	0.80
Leu	1.75	1.75	1.75
Pro	1.60	1.58	1.55
Cys	0.47	0.47	0.42
Asx	1.40	1.38	1.16
Hyp	1.80	1.57	1.22
Met	1.26	1.24	1.04
Glx	1.51	1.44	1.14
Phe	1.49	1.44	1.10
Orn	0.89	0.77	0.56
Cys <sub>2</sub>	0.46	0.45	0.22
Lys	0.95	0.85	0.42
Tyr	0.81	0.65	---
His*	0.75	0.70	0.60
Arg	0.33	0.29	0.11
Trp	0.54	0.54	0.27

\* etoxicarbonilada no imidazol

#### 5.1.2.4 - Análise Qualitativa

Os derivados N-heptafluorbutíricos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção relativos com os tempos de retenção relativos encontrados para padrões individuais de aminoácidos cromatogãficamente puros derivatizados da mesma forma. Os tempos de retenção relativos foram calculados em relação à cicloleucina e ao tetradecano como padrões internos. Na Tabela 9 apresentam-se esses resultados.

Tabela 9

Tempos de retenção relativa dos ésteres isopropílicos de N-heptafluorbutíril aminoácidos em relação a dois padrões internos a cicloleucina e o tetradecano.  
 Temperatura de esterificação 110°C- 30 min;  
 Temperatura de acilação 150°C- 15 min

Aminoácido	Retenção Relativa	
	C <sub>1</sub> e=1	C <sub>14</sub> =1
Ala	0.371	0.291
Gly	0.399	0.313
Abu	0.525	0.408
Val	0.632	0.488
Tre	0.728	0.559
Ser	0.767	0.587
Leu	0.814	0.623
γ-Abu	0.908	0.732
Pro	1.073	0.816
Cys	1.216	0.921
Asx	1.437	1.083
Hyp	1.446	1.089
Met	1.554	1.170
Glx	1.842	1.381
Phe	1.922	1.441
Orn	2.044	1.528
Lys	2.424	1.808
Tyr	2.523	1.882
His*	2.882	2.147
Arg	3.632	2.705
Trp	3.708	2.755

\* etoxicarbonilada no imidazol

A identificação pelos tempos de retenção relativos só é válida se se considerar sempre a mesma coluna, visto que mudanças das características da fase estacionária ou mesmo mudanças das condições de desactivação da parede do capilar são susceptíveis de fazer alterar os tempos de retenção. A identificação de desconhecidos com base nas retenções relativas, só é possível se se fizer a análise em pelos menos duas colunas de polaridades diferentes visto que há uma imensidade de compostos de tempos retenção iguais para uma mesma fase estacionária. Informação mais inequívoca é a fornecida pelos espectros de massa. A associação das propriedades cromatográficas de retenção e a identificação de picos pelos espectros de massa correspondentes requer o recurso à

hifenação de ambas as técnicas. O método analítico resultante desta associação é designado correntemente por GCMS.

#### 5.1.2.5 - Identificação dos ésteres isopropílicos de N-heptafluorbutiril aminoácidos GCMS

A aplicação da técnica de cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa, fornece ao cromatografista uma maneira rápida e expedita para a identificação de desconhecidos.

Na verdade, sendo a identificação em cromatografia de gás, baseada nos tempos de retenção dos componentes de uma mistura a analisar, e na sua comparação com o tempos de retenção de padrões, isto provoca o resultado quase insólito de apenas ser possível a identificação de compostos já conhecidos, ficando a identificação de desconhecidos impossibilitada.

A associação dos dois métodos cromatografia de gás e espectrometria de massa (GCMS), torna viável uma identificação directa porque se obtem, com apenas uma injeção, não só o tempo de retenção e a separação dos componentes de uma mistura, como o espectro de massa de cada um. O espectro de massa fornece informação quase inequívoca quanto à estrutura do composto; Cada composto fragmenta, para um dado sistema de ionização, de uma forma característica a qual pode ser directamente relacionada, para o sistema utilizado, com a estrutura do composto. Os espectros de massa de impacto electrónico (EI) dos derivados N-HFB isopropílicos dos aminoácidos, foram estudados a 20 e 70 eV.

Como seria de esperar, a ionização a 20 eV fornece uma fragmentação bastante menor, obtendo-se espectros menos informativos, sendo as diferenças mais significativas a ausência dos iões correspondentes aos fragmentos de massas mais baixas, nomeadamente os correspondentes à perda radical acilo (Figura 37 A e B). Estas diferenças são de esperar, já que a eficiência da ionização depende directamente da energia dos electrões bombardeados.

A Tabela 10, fornece a lista dos fragmentos mais comuns, obtidos quando se utiliza a ionização a 70 eV. As fragmentações encontradas, estão de acordo com as já referidas por outros autores para os ésteres butílicos N-trifluoracetilados<sup>186</sup>, e para

os ésteres isoamílicos perfluorados<sup>186</sup>.

Tabela 10  
Fragmentos mais significativos dos espectros de massa dos  
ésteres isopropílicos de N-heptafluorbutiril aminoácidos  
(EI 70eV)

Ião	m/z	Ião	m/z
CF <sub>3</sub>	69	CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub>	119
CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>	100	CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>	169
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> C	131	CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CONHCNH	239
CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O	59		

Os fragmentos indicados na Tabela 10, comuns à maioria dos derivados correspondem, essencialmente, a fragmentações nos radicais alquiloxi e acilo.

Os espectros obtidos a 20 eV, caracterizam-se por terem quase sempre como ião mais significativo o correspondente ao fragmento |CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CONHCHR|<sup>\*</sup>, perda do fragmento correspondente ao isopropiloxicarbonil (CO<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) (Figura 37 A).

Nos aminoácidos mais complexos, o espectro (20 eV) é um pouco mais informativo mas, de qualquer modo, continuam, na maioria dos casos ausentes os fragmentos correspondentes ao acilo, os quais estão sempre presentes nos espectros dos mesmos derivados a 70 eV (Figura 38).

Nos espectros a 70 eV, verifica-se haver um esquema de fragmentação comum correspondente à perda preferencial de 87 u.m. correspondente ao fragmento (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCO<sub>2</sub>. Para os aminoácidos de cadeia lateral alifática |M-87|<sup>+</sup> é o fragmento de massa mais elevada (Figura 38 e 39). Os hidroxiaminoácidos apresentam normalmente um ião derivado do ião molecular por perda de 169 u.m. (CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub> CO) seguido da perda de 87 u.m. (ou vice-versa) conduzindo ao ião |M-87-169|<sup>+</sup> (Figura 40).

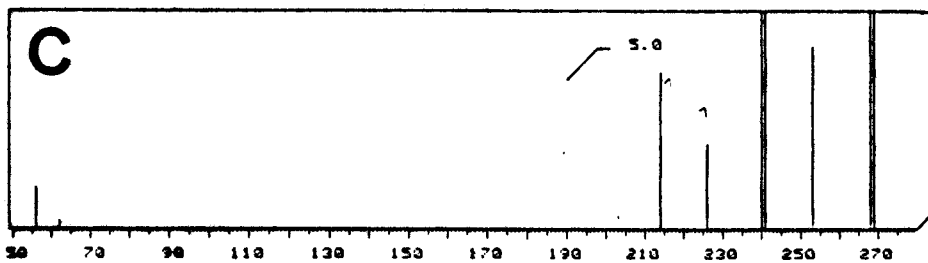
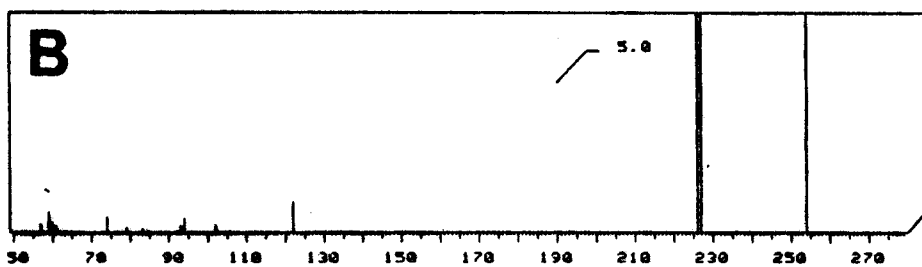
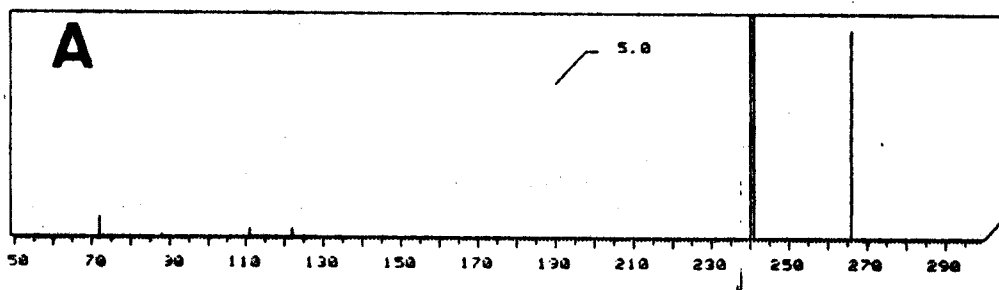


Figura 37: Espectros de massa a 20 eV dos derivados de: A- alanina; B-glicina; C-valina (EI).

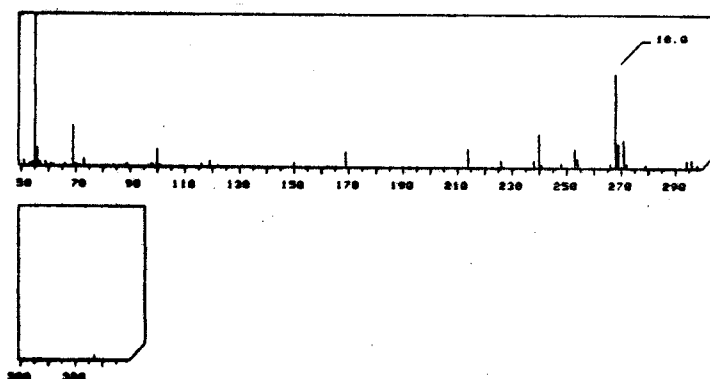


Figura 38: Espectro de massa do derivado de alanina a 70 eV (EI)



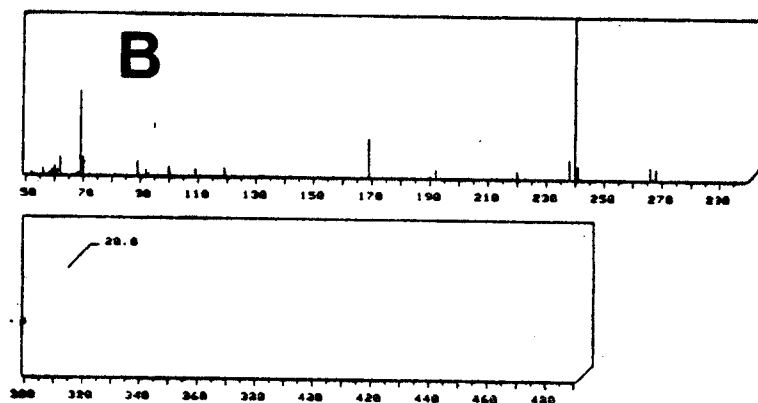
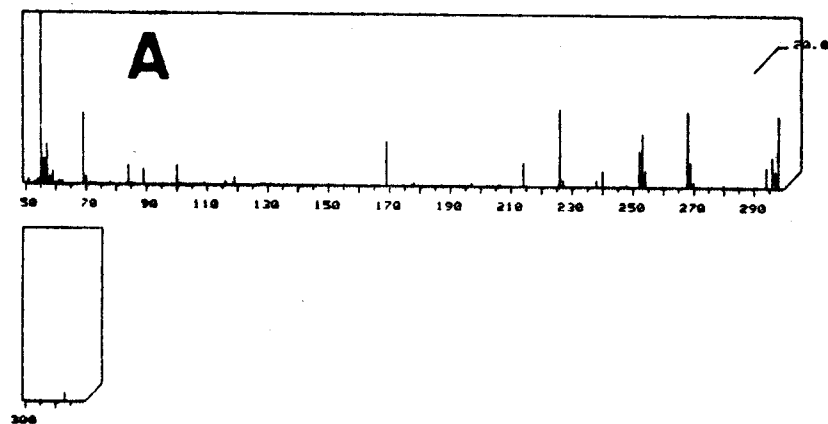


Figura 39: Espectro de massa a 70eV do derivado de: A- glicina; B- valina (EI).

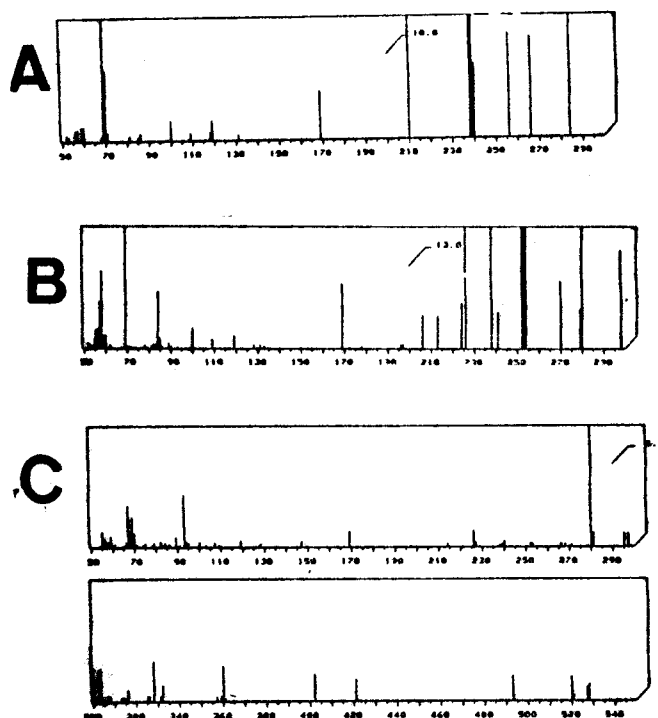


Figura 40: Espectro de massa a 70eV dos derivados de: A-serina; B-treonina; C- lisina (EI).

A leucina e a isoleucina, são facilmente identificados pelas diferenças de intensidade dos fragmentos correspondentes às percas na cadeia lateral. Na leucina aparece o fragmento correspondente a  $M^+ - 15 - 43$ , enquanto que na isoleucina está ausente; Na isoleucina é preferencial a clivagem por perca do ião 57 a partir de  $M^+ - 87$  (Figura 41). As diferenças vêm de diferentes estabilidades das cadeia laterais, para dar iões carbônio primários e secundários; a isoleucina cliva preferencialmente entre o carbono  $\alpha$  e  $\beta$ , enquanto que a leucina cliva entre o carbono  $\beta$  e  $\gamma$ <sup>186</sup>.

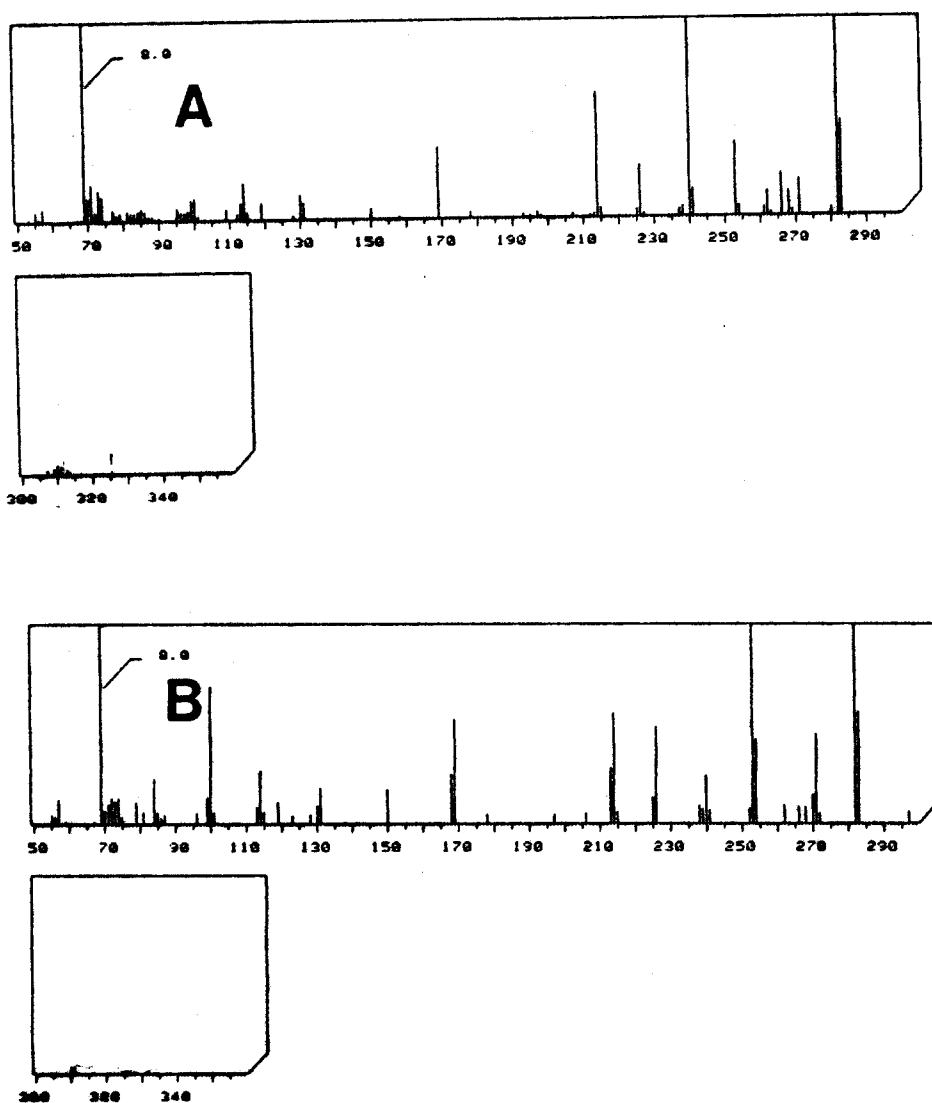


Figura 41: Espectros de massa a 70 eV dos derivados de: A- leucina; B- isoleucina (EI):

Os espectros correspondentes aos aminoácidos aromáticos, fenilalanina (Figura 42), tirosina (Figura 43) e triptofano (Figura 44), são muito característicos. Estes derivados apresentam sempre um fragmento intenso correspondente ao núcleo aromático, o qual é, no caso da fenilalanina, o  $m/z$  91 e no triptofano monoacilado  $m/z$  130 (Figura 44 A). A presença de  $m/z$  327 no derivado diacilado do triptofano, fornece-nos a informação complementar de derivatização completa do indol (Esquema 25). A tirosina apresenta um ião intenso a  $m/z$  303, correspondente ao anel acilado fornecendo por isso informação acerca da acilação do OH da cadeia lateral (Figura 43).

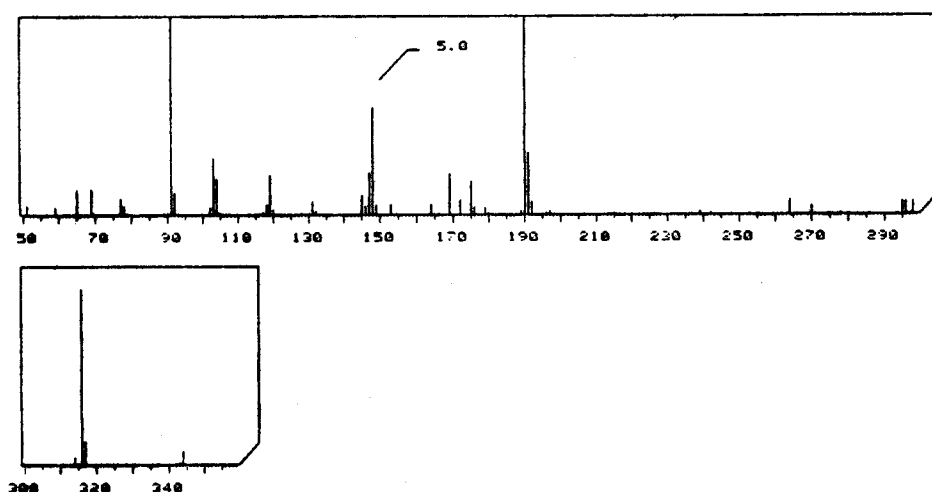


Figura 42: Espectro de massa correspondente ao derivado de fenilalanina (70 eV EI).

O facto do ião característico do anel aromático ser o mais intenso, tanto no espectro da fenilalanina, (Figura 42) como no espectro da tirosina (Figura 43), significa ser a retenção de carga preferencial no anel em ambos os espectros, nas condições usadas, contrariamente ao já descrito por outros<sup>186</sup> que apenas notam tal retenção preferencial para a fenilalanina.

No caso do triptofano o anel indólico é o ião mais intenso, estando no caso do derivado diacilado, o anel associado a um grupo perfluoracilado no azoto indólico (figura 44 B).

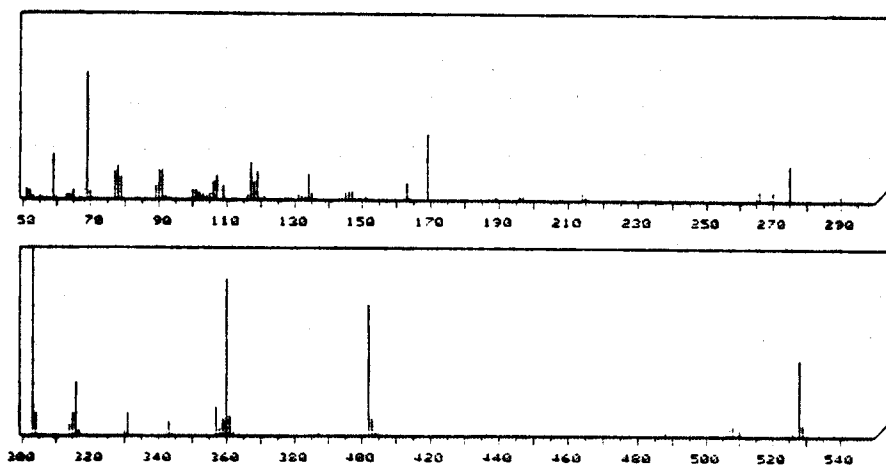


Figura 43: Espectro de massa a 70eV correspondente ao derivado de tirosina (EI).

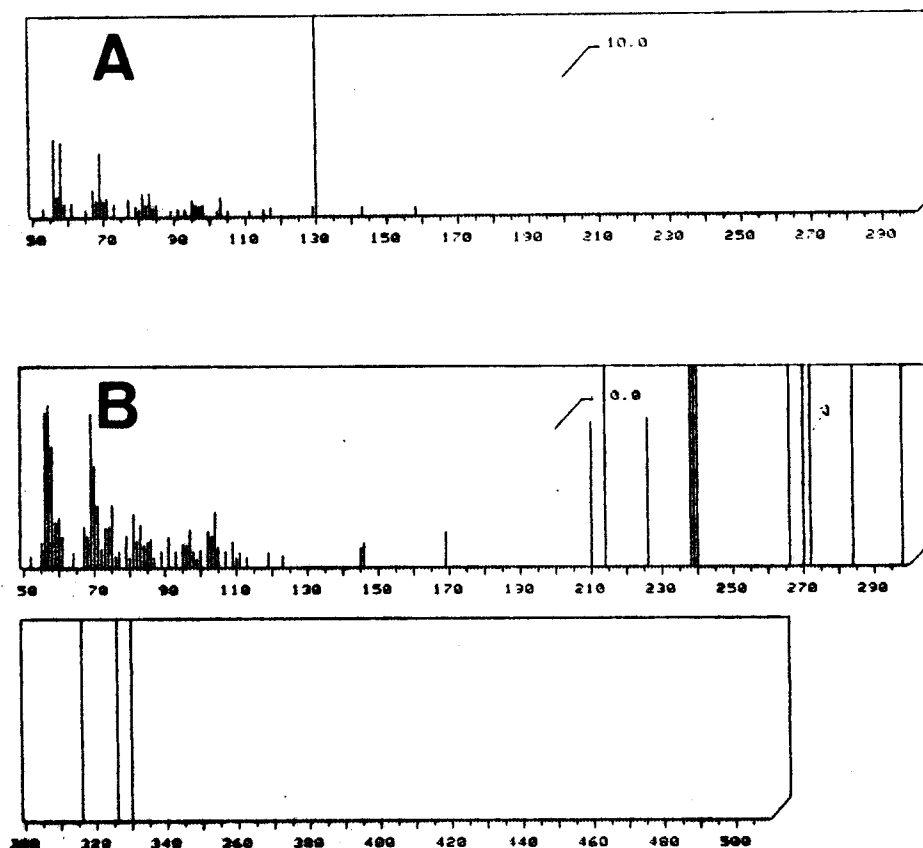
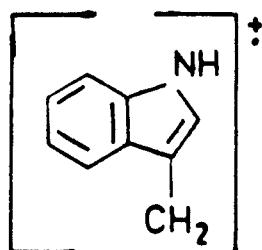


Figura 44: Espectro de massa correspondente ao derivado do triptofano A-monoacilado; B-diacilado (EI 70 eV).

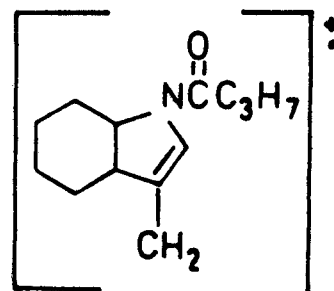
## Estruturas dos iões diagnóstico

Triptofano 1



m/z 130

Triptofano 2



m/z 327

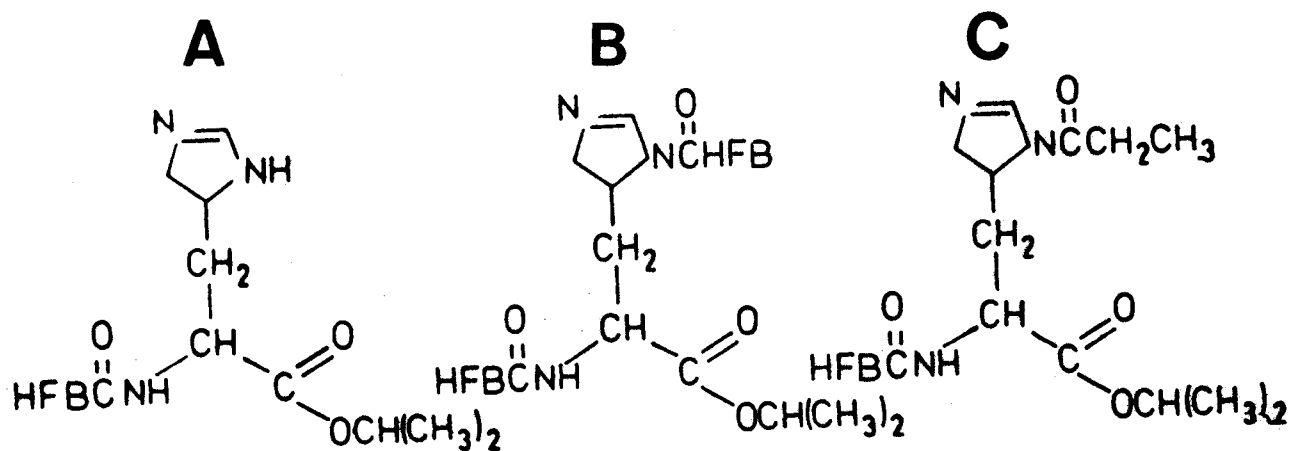
Esquema 25

No caso da histidina, os espectros são bastante informativos, e úteis. Sendo este aminoácido difícil de derivatizar, normalmente temos que recorrer a um passo adicional de derivatização para obtenção do correspondente derivado acilado no azoto imidazólico. O grupo normalmente utilizado para obtenção do derivado totalmente acilado no segundo passo da derivatização, é o cloroformiato de etoxicarbonilo.

Se derivatização ocorresse sempre em condições favoráveis seria de esperar, a obtenção de apenas um derivado, no entanto se houver condições adversas pode-se eventualmente obter picos correspondentes aos derivados monoacilados (Esquema 26 A) diacilados (Esquema 26 B) e ainda correspondentes ao derivado etoxicarbonilado (Esquema 26 C), nestas condições apenas a espectrometria de massa nos pode fornecer informação acerca da estrutura (Figura 45).

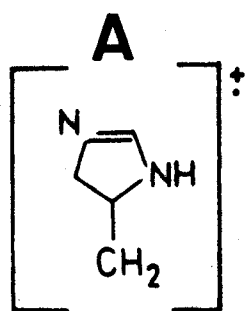
Na análise efectuada, obtiveram-se espectros correspondentes aos derivados mono e diacilados, os quais são diferenciáveis por se obter no primeiro caso os fragmentos correspondentes ao anel (m/z 81), e no segundo o fragmento correspondentes m/z 291 (esquema 27 A e B). Obteve-se ainda o derivado correspondente ao aminoácido etoxicarbonilado, o qual foi identificado por possuir,

além de outros fragmentos característicos, o fragmento correspondente à estrutura representada no esquema 27 C.

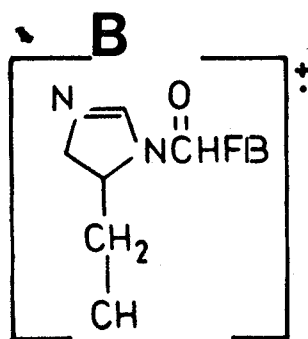


Esquema 26

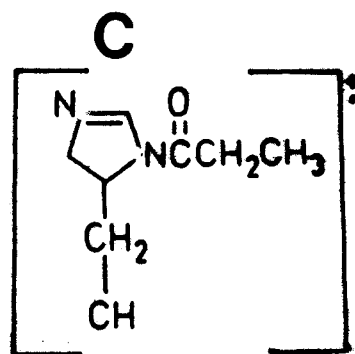
Estrutura



m/z 81



m/z 291



m/z 164

Esquema 27

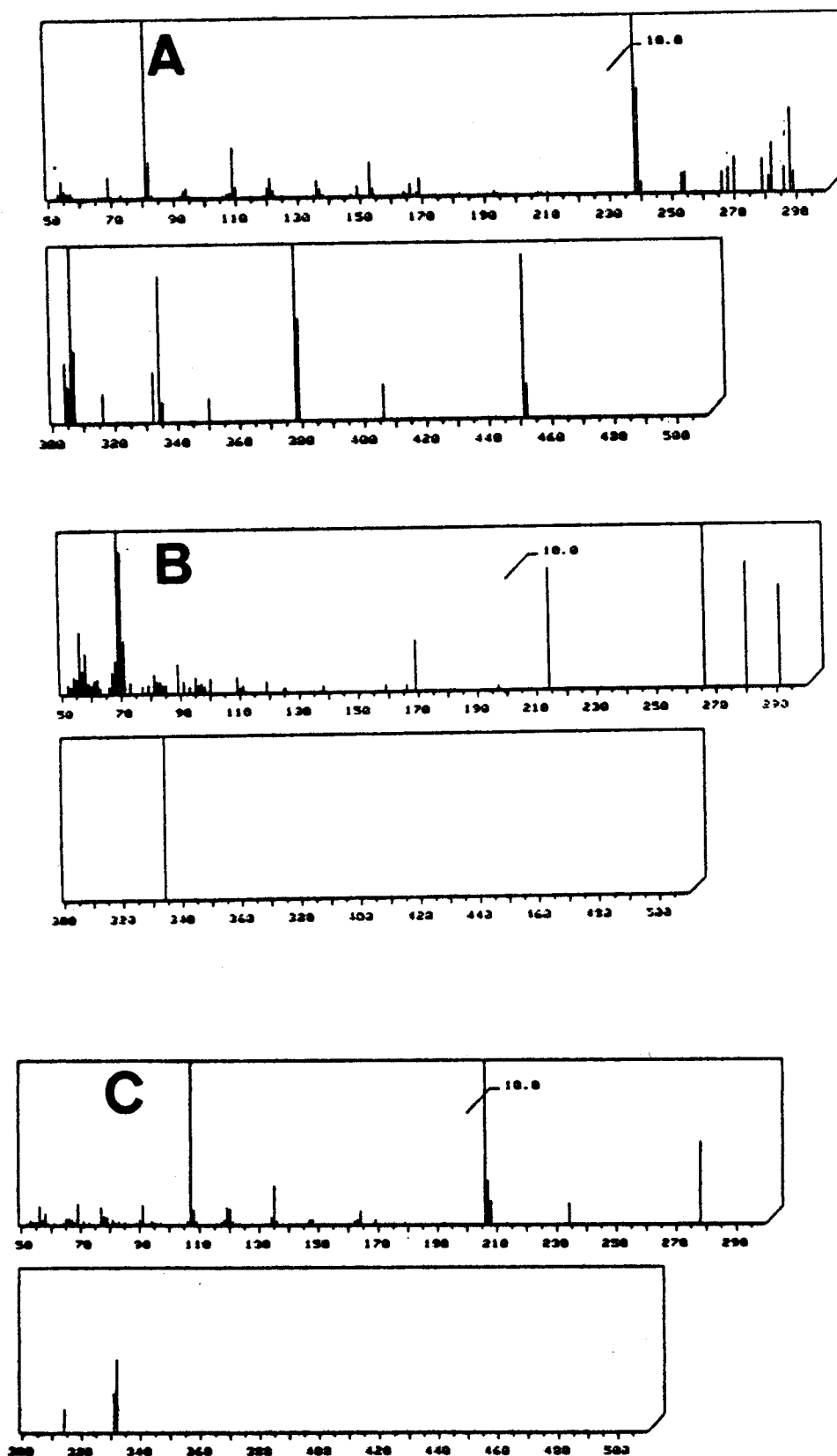


Figura 45: Espectro correspondente ao derivado da histidina  
 A- monoacilado; B- acilado; C- acilado e etoxcarboni-  
 lado (EI 70 eV).

A espectrometria de massa acoplada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS) é, assim, um método analítico fundamental para a obtenção de informação quanto à natureza química dos derivados obtidos e, conseqüentemente, no controle das condições de derivatização dos aminoácidos.

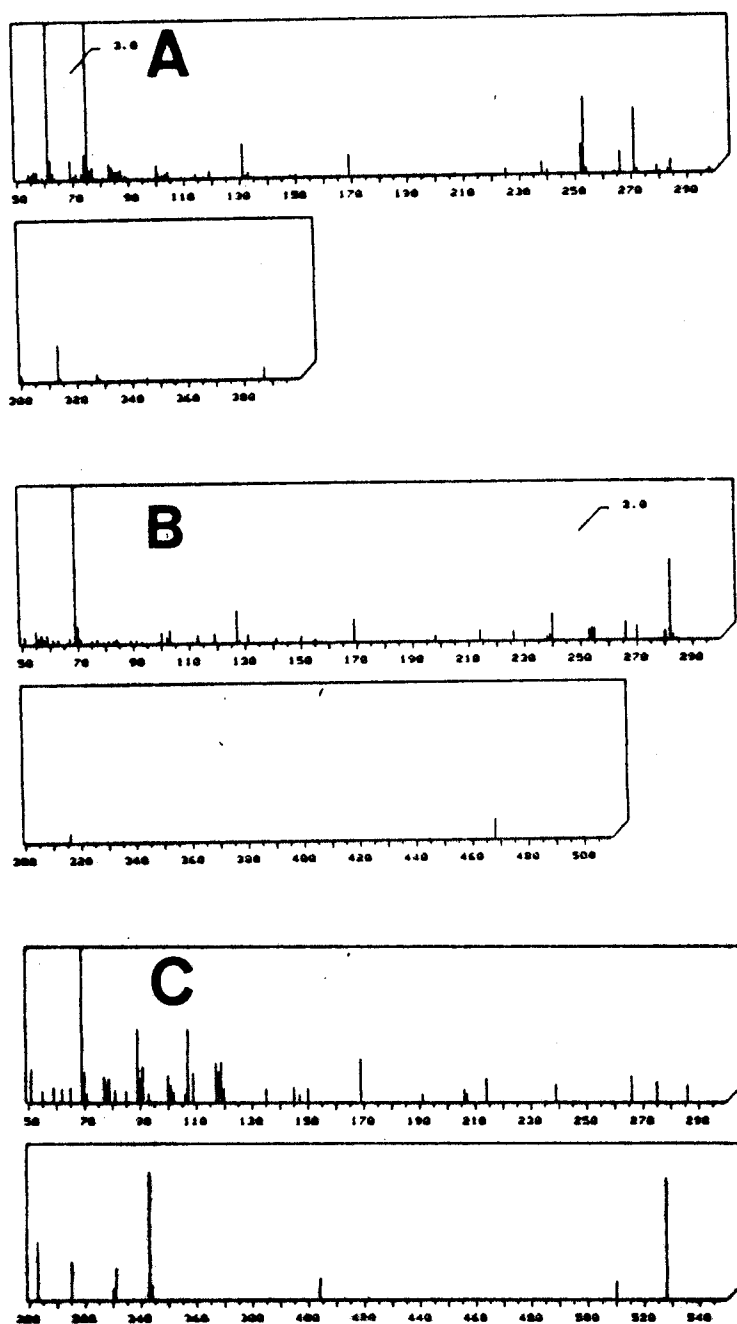


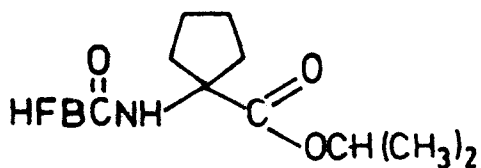
Figura 46: Espectros de massa correspondentes aos derivados de: A- metionina; B- cisteína; C-cistina (EI 70 eV).



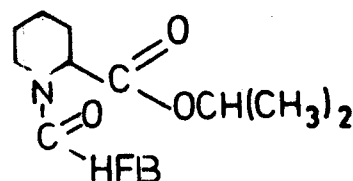
O espectro correspondente à metionina, é característico por apresentar um íon correspondente ao fragmento  $\text{CH}_3\text{SCH}_2$  ( $m/z$  75) estando, também presentes os fragmentos comuns a estes derivados (Figura 46 A). A cisteína forneceu um espectro totalmente informativo visto apresentar íon molecular,  $m/z$  468, correspondente à cisteína totalmente derivatizada (Figura 46 B). O espectro correspondente à cistina apresenta os íons característicos já definidos para este tipo de derivados (Figura 46 C).

Casos há, no entanto, em que a presença do íon molecular não é suficiente para a identificação do derivado. Tal são os casos já referidos da leucina e isoleucina, e também, da cicloleucina e do ácido piperídico, cujos derivados possuem o mesmo peso molecular.

Cicloleucina



Ácido piperídico



Esquema 28

Os derivados da cicloleucina e do ácido piperídico diferenciam-se pelas fragmentações que apresentam. A cicloleucina apresenta um fragmento intenso a  $m/z$  ( $M^+ - 87$ ) (Figura 47 A). O ácido piperídico apresenta um fragmento a  $m/z$  83 (Figura 47 B), correspondente ao anel de piperidina.

Nas figuras 48-52, apresentam-se ainda os espectros correspondentes à ornitina, (Figura 48), prolina (Figura 49), ácido aspártico/asparagina (Figura 50), ácido glutâmico/glutamina (Figura 51) e arginina (Figura 52) respectivamente. Cada um destes espectros apresenta os fragmentos típicos indicados na Tabela 10 e como fragmentos caracterizantes os correspondentes às respectivas cadeias laterais (Tabelas 18, 15, 17 e 19 respectivamente);

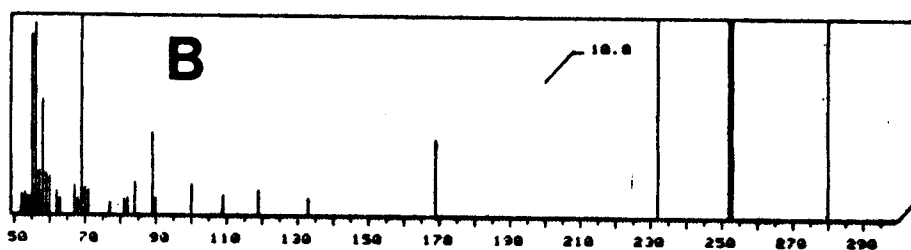
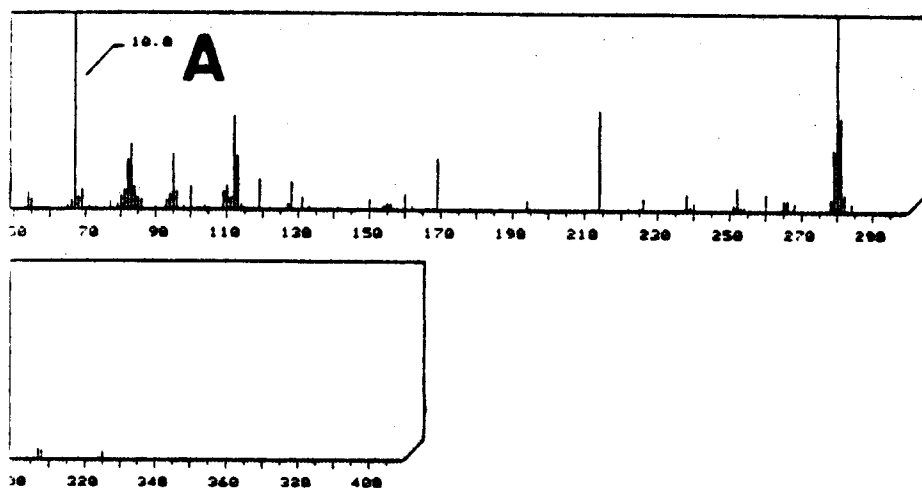


Figura 47: Espectro de massa correspondente ao derivado de A-cicloleucina; B- ácido piperólico (EI 70 eV).

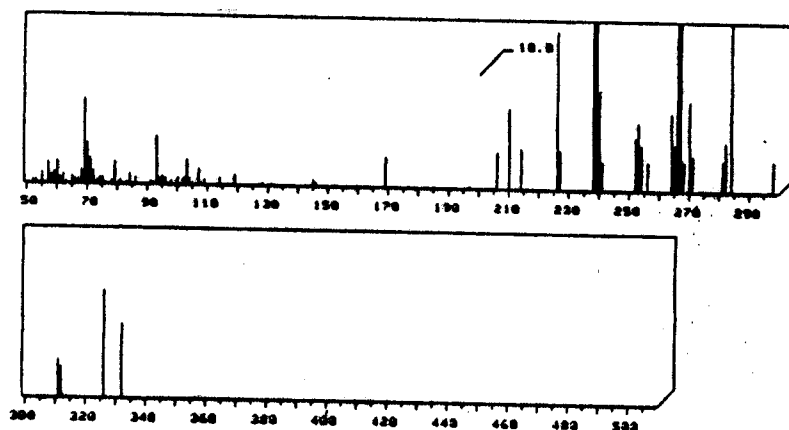


Figura 48: Espectro de massa correspondente ao derivado de Ornitina (EI70 eV).

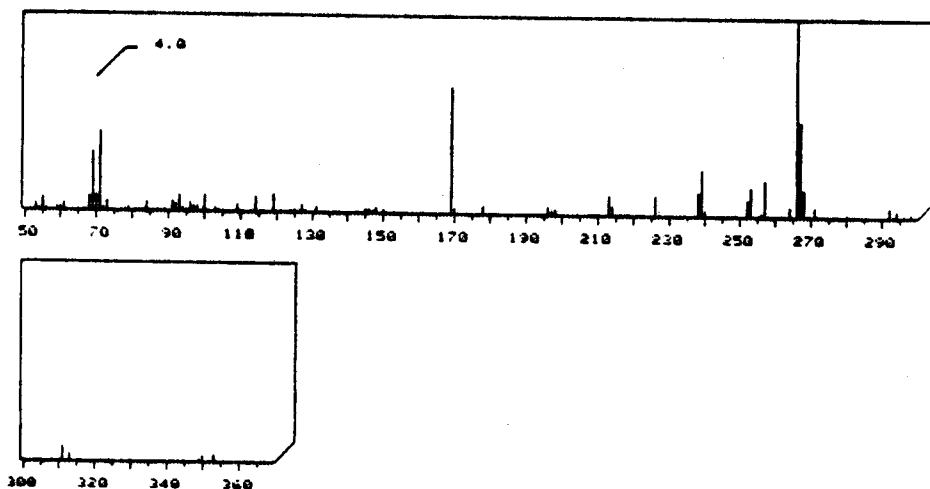


Figura 49: Espectro de massa correspondente ao derivado de prolina (EI 70 eV).

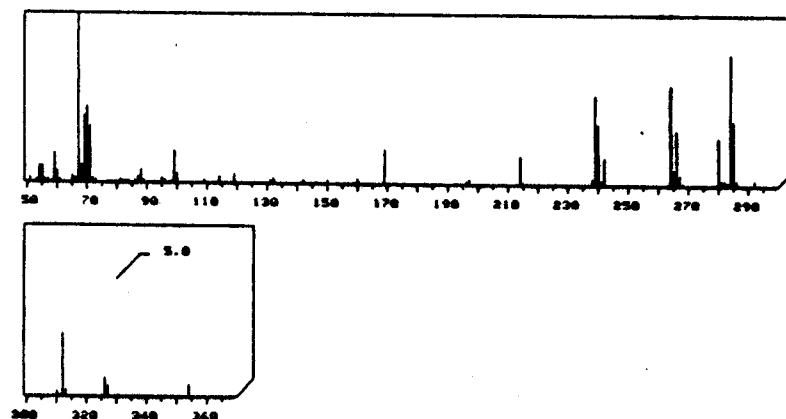


Figura 50: Espectro de massa correspondente ao derivado de ac. aspártico (EI 70 eV).

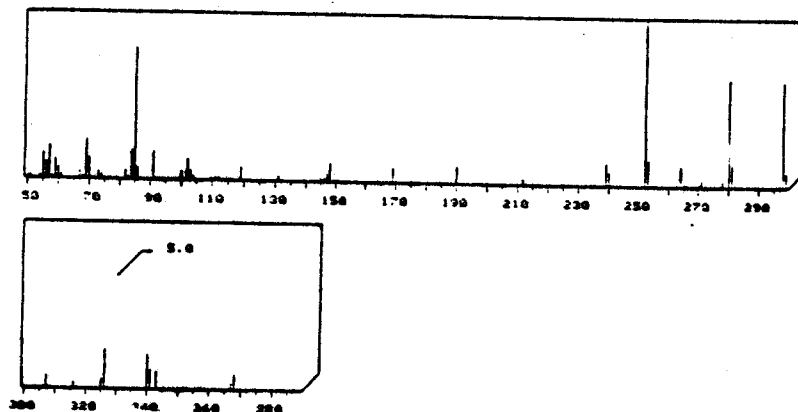


Figura 51: Espectro de massa correspondente ao derivado ác. glutâmico (EI 70 eV).

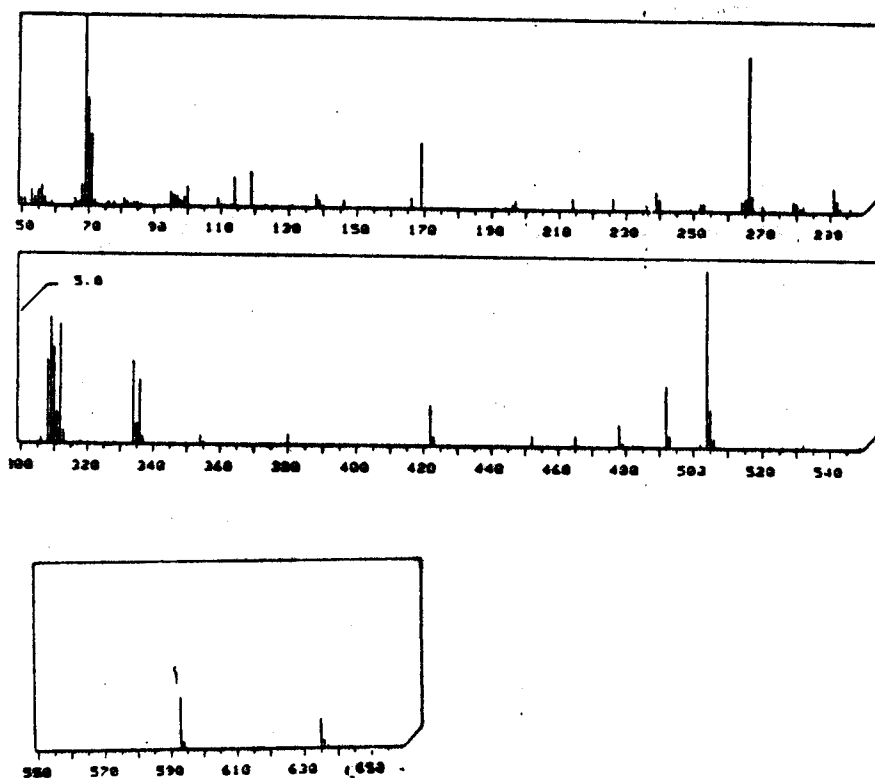


Figura 52: Espectro de massa correspondente ao derivado de arginina (EI 70 eV).

Nas tabelas 11-17 resumem-se os iões mais característicos, observados nos espectros de massa de cada um dos aminoácidos estudados quando derivatizados sob a forma de ésteres isopropílicos N-heptafluorbutíricos.

Tabela 11  
 Aminoácidos simples e hidroxiaminoácidos  
 (N(O)-HFB isopropílicos)  
 Padrões de fragmentação a 70 eV (Figura 38,39,40)

Ião	AA	Ala	Gly	Val	Thr	Ser
$M^+$		327	313	355	539	533
M-CH <sub>3</sub>		312	293			
M-COOCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		240	270	225		
M-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>				268		
M-C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> -COOCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>					298	283
M-C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> -CONHCH-COO				269		
M-C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> -CONHCHCO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>					241	

Tabela 11 (cont.)  
 Aminoácidos simples e hidroxiaminoácidos  
 (N(O)-HFB isopropílicos)  
 Padrões de fragmentação a 70 eV (Figura 38, 39, 40)

Ião	AA   Ala M <sup>+</sup>   327	Gly 313	Val 355	Thr 539	Ser 533
M-OCOC <sub>3</sub> F <sub>7</sub> -CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>				254	
M-OCOC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>				213	
OCOC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>				226	
CF <sub>3</sub>	69	69	69	69	69
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub>	119	119	119	119	119
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>	169	169	169	169	169
CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>	100	100	100	100	100

Tabela 12  
 Prolina  
 (N(O)-HFB isopropílicos)  
 Padrão de fragmentação a 70 eV (Figura 49)

Ião	Pro M <sup>+</sup> 353
M-CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	266
CF <sub>3</sub>	69
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>	169

Tabela 13  
 Aminoácidos alifáticos  
 (N(O)-HFB isopropílicos)  
 Padrões de fragmentação a 70 eV (Figura 41)

Ião	AA   Leu M <sup>+</sup>   369	Ile 369
M-CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	282	282
M-CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub>	213	213
M-CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	252	252
M-CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	239	239
CF <sub>3</sub>	69	69
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>	169	169
M <sup>+</sup> -CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	225	225

Tabela 14  
 Aminoácidos aromáticos  
 (N(O)-HFB isopropílicos)  
 Padrão de fragmentação a 70 eV (Figura 42, 43, 44)

Ião	AA M <sup>+</sup>	Phe 403	Tyr 615	Trp1 442
M-CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		316	528	
Ar		77		
Ar-CH <sub>2</sub>		91		130
Ar-CH <sub>2</sub> OCOC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>			303	
Ar-CH <sub>2</sub> CH				143
Ar-CH <sub>2</sub> CHNH				158
Ar-OCOC <sub>3</sub> F <sub>7</sub> -CH <sub>2</sub> CH			316	
Ar-OCOC <sub>3</sub> F <sub>7</sub> -CH <sub>2</sub> CHCO <sub>2</sub>			360	
M <sup>+</sup> -CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CONHCHCO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>			275	

Tabela 15  
 Aminoácidos dicarboxílicos  
 (N(O)-HFB isopropílicos)  
 Padrão de fragmentação a 70 eV (Figura 50 e 51)

Ião	AA M <sup>+</sup>	Glx 413	Asx 427
M-CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		326	340
C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> CONHCHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>		312	326
Cadeia lateral		101	115
M-C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> CO		216	230
CF <sub>3</sub>		69	69
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>		169	169
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub>		100	100

Tabela 16  
Ornitina  
(N(O)-HFB isopropílicos)  
Padrão de fragmentação a 70 eV (Figura 48)

Ião	AA M <sup>+</sup>	Orn 566
M-C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> CONHCHCO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		254
C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> CONHCHCO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		312
M-CH <sub>3</sub> F <sub>7</sub> CO-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		326
CH <sub>2</sub> NHCOC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>		240
M-C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> CONH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		311

Tabela 17  
Metionina e Cistefna  
(N(O)-HFB isopropílicos)  
Padrão de fragmentação a 70 eV (Figura 46)

Ião	AA M <sup>+</sup>	Met 387	Cys 468
M-CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		300	
M <sup>+</sup>		387	468
CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>		75	
M-SCH <sub>3</sub>		297	
M-CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -SCH <sub>3</sub>		253	
C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> CONHCHCO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		312	312
M-CO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -SOCOC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>			256
CF <sub>3</sub>		69	69
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>		169	169

Tabela 18  
Arginina  
Padrão de fragmentação a 70 eV (Figura 52)

Ião	AA M <sup>+</sup>	Arg (tri) 804
M <sup>+</sup> -CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>		635
M <sup>+</sup> -CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CON		593
M <sup>+</sup> -CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CONHCHCO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		492
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CONHCHCO <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		312
CF <sub>3</sub>		69
CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>		169

### 5.1.2.6 - Análise quantitativa

A análise quantitativa de aminoácidos nos vinhos estudados por CGL foi realizada pelo método do padrão interno. Este método consiste em adicionar a uma amostra uma quantidade rigorosamente calculada de um padrão interno. Conhecidos os factores de resposta o peso de cada composto da amostra desconhecida, é calculado através da área do pico correspondente e da área do pico do padrão interno.

$$FRR = \frac{\text{Área (aminoácido)} \times \text{Peso (padrão interno)}}{\text{Área (padrão interno)} \times \text{Peso (aminoácido)}}$$

A recuperação dos aminoácidos derivatizados sob a forma de ésteres isopropílicos dos derivados N-heptafluorbutíricos foi estudada (Tabela 19).

Tabela 19  
Cálculo do rendimento da derivatização. Ésteres isopropílicos de N-heptafluorbutiril aminoácidos. Esterificação 110°C/30 min; Acilação 150°C/15min.

Aminoácidos	Peso real mg	Peso calculado mg	Rendimento %
Ala	0.0192	0.0189	98
Abu	0.0132	0.0133	100
Arg	0.0710	0.0121	17
Asx	0.0540	0.0590	109
Cys	0.0540	0.0580	107
Glx	0.0264	0.0290	109
Gly	0.0336	0.0336	100
His*	0.0312	0.0201	64
Hyp	0.0960	0.0940	98
Leu	0.0516	0.0516	100
Lys	0.0144	0.0150	100
Met	0.0240	0.0240	100
Orn	0.0504	0.0720	100
Phe	0.0192	0.0181	94
Pro	0.0240	0.0250	104
Ser	0.0460	0.0348	76
Tre	0.0204	0.0202	99
Trp	0.0084	0.0130	15
Tyr	0.0216	0.0190	88
Val	0.0192	0.0120	63

\* etoxicarbonilada no azoto imidazólico.



A análise dos valores desta Tabela mostra que, para a maioria dos derivados, a recuperação se processa de forma quantitativa. Há contudo que salientar o baixo rendimento de derivados como a arginina e o triptofano conhecidos pelas dificuldades de derivatização que normalmente apresentam. A histidina derivatizada com um grupo etoxicarbonilo no azoto imidazólico não apresenta quaisquer problemas. Obviamente a utilização de factores de resposta permite nestes casos a introdução das correcções adequadas.

#### 5.1.2.6.1 - Optimização das condições de cromatografia

As condições de separação dependem fortemente do fluxo do gás de arrastamento. O compromisso ideal será trabalhar com condições de gás de arrastamento que correspondam ao número máximo de pratos teóricos.

A retenção e resolução dos componentes de uma msitura, numa coluna cromatográfica resulta da repartição dos mesmos entre a fase líquida estacionária, e a fase gasosa ou fase móvel. A retenção depende do coeficiente de partilha  $K$  o qual pode ser definido como a razão entre a concentração do soluto na fase estacionária e a concentração na fase móvel de acordo com a expressão seguinte.

$$K = \frac{\text{Concentração na fase estacionária}}{\text{Concentração na fase móvel}} \quad \text{ou} \quad K = \frac{V_R^0 - V_G}{V_L}$$

em que  $V_R^0$  representa o volume retenção corrigido  $V_G$  o volume de fase gasosa e  $V_L$  o volume de fase líquida.

Para um dado componente, quanto maior for o coeficiente de partilha maior será a sua solubilidade na fase líquida e portanto maior a sua retenção.

Se a distribuição do soluto entre as fases for expressa sob a forma de uma relação de quantidades, ou seja quantidade de soluto em cada uma das fases temos uma razão de distribuição de massa  $k'$  normalmente chamado em cromatografia com factor de capacidade.

$$k' = \frac{\text{Quantidade de soluto na fase estacionária}}{\text{Quantidade de soluto na fase móvel}} \quad k' = \frac{V_{R^0} - V_G}{V_G}$$

O factor de capacidade depende dos volumes das fases e pode ainda ser relacionado com o coeficiente de partilha pela razão do volume das fases de acordo com a expressão seguinte:

$$\beta = \frac{V_G}{V_L}$$

A velocidades de fluxo constantes os volumes podem ser substituídos pelos tempos de eluição ou tempos de retenção.

A separação cromatográfica não é apenas dependente da razão de fase ou do factor de capacidade. Ela é também dependente do alargamento da banda ou pico cromatográfico. Este alargamento está relacionado com o conceito de prato teórico. A separação é pois influenciada por dois fenómenos actuando em sentidos diferentes: positivamente actua a natureza química da substância e da fase estacionária, que provocam o valor de retenção, e negativamente actua o tempo de residência na coluna, contribuindo para o alargamento da banda ou pico, e dependendo da natureza física e físico-química do fenómeno de separação.

O comprimento da coluna necessário para estabelecer o equilíbrio entre substância/fase estacionária:substância/fase móvel é normalmente referido como altura correspondente a um prato teórico (HEPT), e é na realidade uma consequência dos somatórios dos factores que contribuem para o alargamento da largura do pico durante a migração da substância através da coluna, e depende dos coeficientes de difusão da mistura na fase móvel  $D_g$  e na fase estacionária  $D_e$  da espessura do filme  $df$  e da velocidade média do gás de arrastamento  $u$  de acordo com a expressão seguinte conhecida como a equação de Van Deemter.

$$H = 2\lambda dp + \frac{2\gamma D_g}{\mu} + \frac{8K}{\pi^2 (K+1)^2} \times \frac{df^2 \mu}{D_e}$$

Esta equação pode ser simplificada escrita  $H = A+B/u+C$  que representa uma hipérbole. Esta equação simplificada significa que existe um valor de velocidade de gás de arrastamento ao qual corresponde o valor mínimo para a altura correspondente a um prato teórico em função da velocidade linear do gás de arrastamento, dependendo aquela da natureza deste.

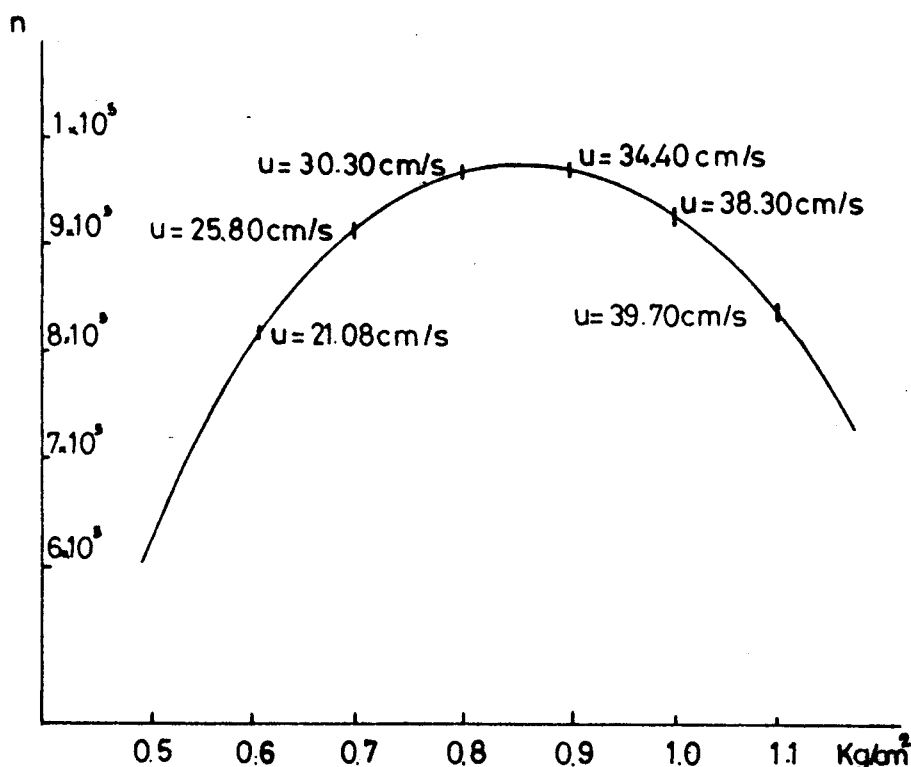


Figura 53: Cálculo do fluxo de gás de arrastamento mais favorável. Coluna de SE-30 com 25m WCOT. Gás de arraste H<sub>2</sub>

As condições de velocidade linear para uma análise cromatográfica mais eficiente foram definidas calculando o número de pratos teóricos n, para diversos fluxos de gás de arrastamento u já que o número de pratos teóricos está, por seu lado, relacionado com H de acordo com a expressão seguinte:

$$H = \frac{L}{n} \qquad n = 5.54 (tr / \omega)^2$$

em que L é o comprimento da coluna, n é o número de pratos

teóricos,  $t_r$  o tempo de retenção e  $w$  a largura do pico a meia altura.

A representação gráfica do número de pratos teóricos calculado para os vários valores de fluxo de gás de arrastamento (Figura 53) permitiu definir qual o valor mais ideal de fluxo.

A análise cromatográfica dos ésteres isopropílicos dos derivados N-heptafluorbutíricos dos aminoácidos foi realizada em colunas do tipo metil-silicone (SE-30 e OV-1).

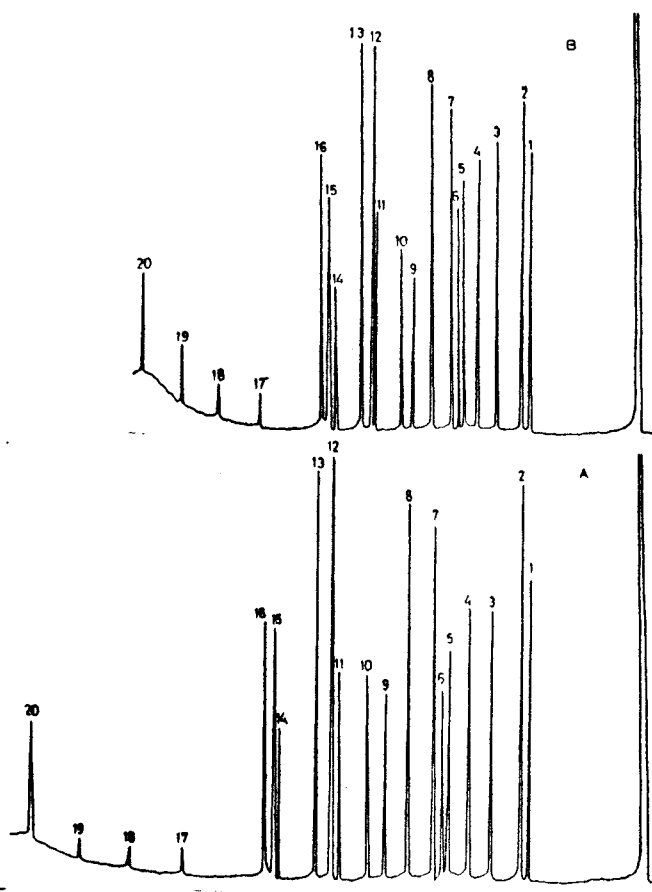


Figura 54: Cromatogramas de uma mistura de padrões de aminoácidos derivatizados sob a forma de ésteres isopropílicos N-heptafluorbutíricos, com dois programas de temperatura diferentes. Condições cromatográficas: Injetor e detector - 250°C; Coluna SE-30 25m x 0,2 di. 1-alanina; 2-glicina; 3-valina; 4-treonina; 5-serina; 6-isoleucina; 7-leucina; 8-cicloleucina; 9-prolina; 10-cisteína; 11-hidroxiprolina; 12-aspartico/asparagina; 13-metionina; 14-glutâmico/glutamina; 15-fenilalanina; 16-ornitina; 17-histidina; 18-arginina; 19-cistina; 20-triptofano. A- 80°C durante 5 min depois 3°C/min. B- 80°C durante 5 min depois 4°C/min

A escolha do programa de temperatura foi feita de modo a conseguir-se a separação completa de todos os aminoácidos no menor tempo de análise com a resolução adequada. Ensaíram-se quatro programas de temperatura (Figura 54 e 55). Nos programas ensaiados, com início a 80°C (Figura 54) há um tempo inicial, sem saída de derivados, de 10 minutos. Nestas condições é possível aumentar a temperatura inicial, sem que haja perigo de os derivados começarem a eluir demasiado próximo do solvente, trazendo problemas de quantificação. O aumento da temperatura inicial diminui o tempo de análise (Figura 55).

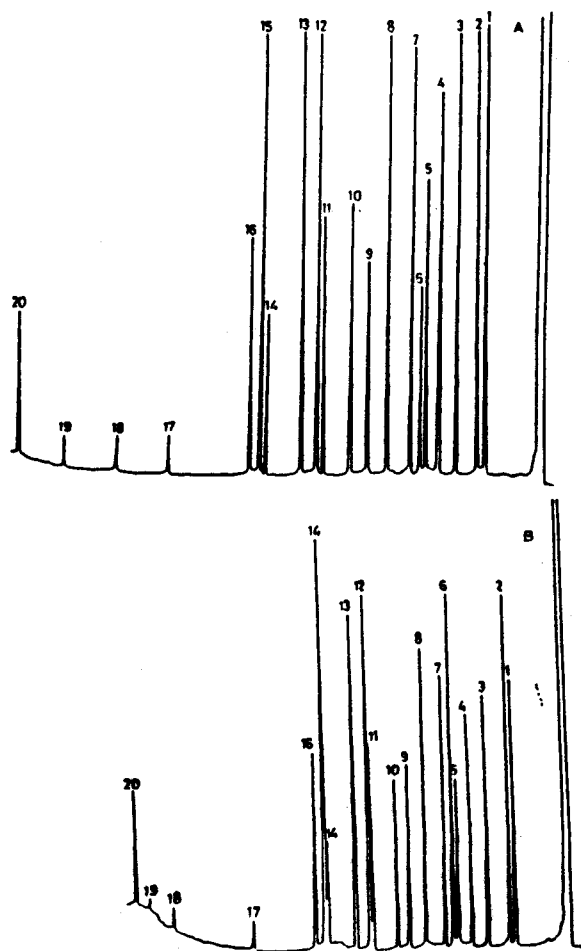


Figura 61: Cromatogramas de uma mistura de padrões de aminoácidos derivatizados sob a forma de ésteres isopropílicos N-heptafluorbutíricos, utilizando dois programas diferentes. Condições e identificação conforme Figura 54. A- 100° durante 5 min depois 3°/min; B- 100° durante 5 min depois 4°/min.

Optou-se pelo programa com início a 100° e incremento de 3°/min. Nestas condições há uma diminuição do tempo total de eluição com separação completa de todos os derivados. No programa com taxa de aquecimento de 4°/min, a separação do pico de ácido aspártico/asparagina, do pico correspondente ao derivado da hidroxiprolina, não é conseguida. Este tipo de ensaios foi repetido, sempre que as condições de operação da coluna cromatográfica tornavam aconselhável a sua substituição. O facto de se trabalhar com colunas de fabrico próprio, tem a vantagem de se poder ser extremamente exigente para com a coluna, e desprezá-la sempre que a sua "performance" não seja a ideal. As colunas com que se trabalhou são do tipo OV-101, OV-1 e possuíam todas características semelhantes às apresentadas na Tabela 20 para uma coluna de OV-101.

Tabela 20

Características de uma das colunas de vidro WCOT revestida com fase líquida de OV-101 e com o comprimento 31m x 0.2mm d.i., utilizada para a análise dos aminoácidos livres dos vinhos elementares

Data	Comp. do teste	TR	Neff	N	TZ	HEPT
27/11/85	GROB	C <sub>14</sub> 8.59	70 567	87	953 E <sub>10</sub> /E <sub>11</sub> -44.5	0.35mm

Após o fabrico e o condicionamento (24h 260°) a coluna é testada por injeção da mistura teste de Grob<sup>8</sup>. A mistura de Grob, é basicamente composta por compostos contendo grupos polares diferentes, e portanto, afinidades diferentes para com a fase estacionária e, conseqüentemente, a sua injeção permite avaliar a descativação e tratamento da parede do capilar. O teste feito após o primeiro condicionamento (Figura 56) avalia a coluna com que se vai trabalhar, sabendo se ela é ou não adequada para a análise de aminoácidos. Durante os meses de trabalho a mistura é injectada regularmente permitindo avaliar o "envelhecimento" da coluna e a necessidade ou não de a recuperar ou substituir.

FASE: OV-1  
revestimento estático  
di: 0.2 mm  
comprimento: 21m

gas arraste: H<sub>2</sub> 75 Kpa  
split 1/50  
tempo morto: 38s

efic revest - 89%  
TZ- 32 N - 95435 N/m.4500  
espessura do filme: 0.2 μm  
ol-93% al-93% P-67 %  
A-75% am-55%

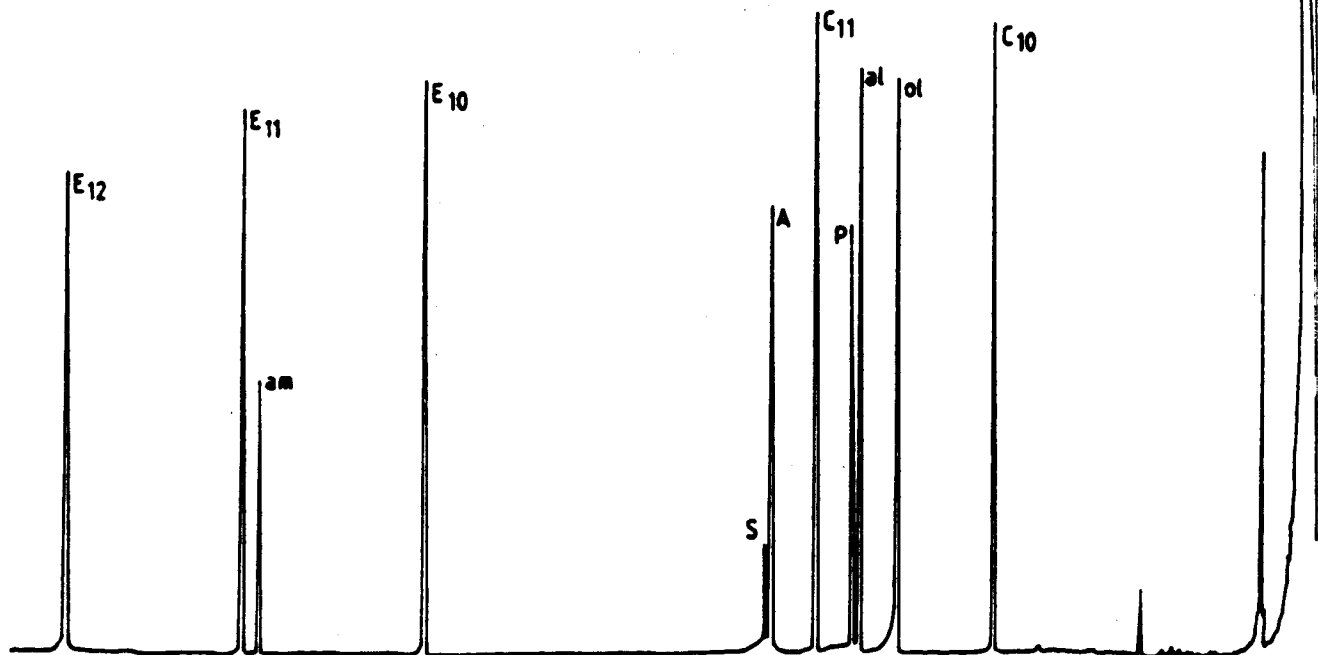


Figura 56: Cromatograma teste - Injecção da mistura de Grob  
Condições cromatográficas: detector/injector - 250°  
Temperatura do forno: Inicial - 40°; Taxa de aumento -  
3°/min; Comprimento da coluna: 31 m; Velocidade do gás:  
50 Kpa Razão de splitter: 1/50  
Picos: C<sub>10</sub> - decano; C<sub>11</sub> - undecano; ol - octanol;  
al - aldeído; P- dimetilfenol; A - dimetilnilina;  
S - ácido hexadecanoico; E<sub>10</sub>, E<sub>11</sub>, E<sub>12</sub> - ésteres  
metílicos dos respectivos ácidos gordos;  
am - dicitclohexilamina.

Sempre que durante os testes de controle a coluna apresentar modificação das suas características iniciais, nomeadamente acti-  
vidade acrescida e perda de eficiência, é feita uma tentativa de  
recuperação por injecção de uma mistura sililante (Figura 57) .  
Nos casos em que a coluna não é recuperável despreza-se.

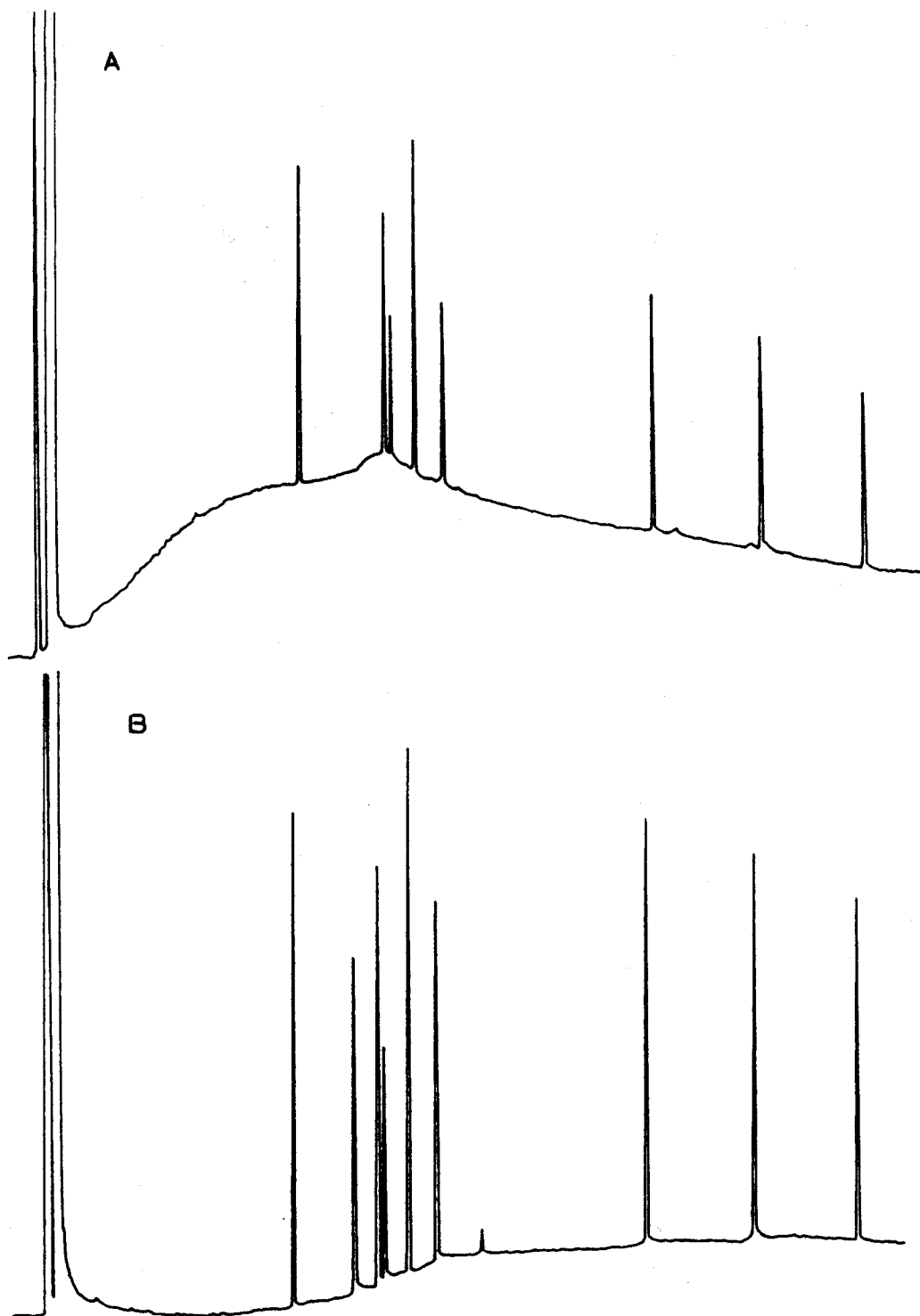


Figura 57: Cromatograma mostrando a deterioração da coluna com o uso (A); e cromatograma mostrando como a situação pode ser remediada por sililação de pontos activos na coluna (B). Mistura sililante 2 x 50  $\mu$ l TMCS:HMDS 1:1. Injecção a 200 $^{\circ}$ . Condições e identificação conforme figura anterior.



**5.1.2.7 - Um novo método para o "screening" de aminoácidos proteicos e não proteicos por cromatografia gás-líquido: ésteres N-etoxicarbonil isopropílicos e ésteres N-etoxicarbonil-O(S)-trimetilsilil isopropílicos**

Devido à extraordinária estabilidade à hidrólise do grupo etoxicarbonilo por um lado e ao facto de, no caso da histidina se recorrer frequentemente a um passo de etoxicarbonilação do azoto imidazólico, foram ensaiadas condições de preparação e introduzidos novos derivados, os ésteres isopropílicos N-etoxicarbonílicos para a análise por CGL de aminoácidos. Os novos derivados mostraram-se apropriados para a análise de aminoácidos por cromatografia gás-líquido em materiais de origem biológica mesmo quando aqueles se encontram presentes apenas em quantidades quase de vestígios. Quantidades da ordem dos 2 pmoles puderam ser analisados sem dificuldade em sistemas capilares com repartidor de fluxo, num único ensaio cromatográfico, tendo a elevada estabilidade que mostraram permitido a obtenção de resultados reprodutíveis de análise para análise durante um largo período de tempo (3 meses). Complementarmente foram preparados os ésteres isopropílicos de N-etoxicarbonil-O(S)-trimetilsililaminoácidos, capazes de ser separados, em tempos de análise mais curtos, em colunas pouco polares e possuindo ainda um elevado factor de separação.

As características dos derivados foram avaliadas, tendo em conta a afinação das condições de derivatização, a determinação dos factores de resposta, a estabilidade dos derivados e a linearidade do FID em relação aos mesmos bem com a reprodutibilidade e aplicação a amostras reais.

**5.1;2.7.1 - Ésteres isopropílicos de N-etoxicarbonil aminoácidos. Optimização da acilação com cloroformiato de etilo**

Os aminoácidos foram submetidos a uma série de reacções químicas para obtenção dos ésteres alquílicos de aminoácidos em que os grupos  $\text{NH}_2$  se encontram bloqueados por um grupo N-etoxi-

carbonílico. Os ésteres N-etoxicarbonílicos assim obtidos podem, eventualmente, sofrer trimetilsililação dos grupos OH ou SH das cadeias laterais, obtendo-se os ésteres N-etoxicarbonil-O(S)-trimetilsililados (esquema 16).

Sendo a obtenção de ésteres isopropílicos prática já estabelecida na derivatização de aminoácidos, foram estas condições utilizadas para a esterificação. O passo novo, de acilação com cloroformiato de etilo, foi afinado.

As condições de acilação foram estudadas a fim de determinar, para cada aminoácido, o factor de resposta mais favorável, em função do tempo de acilação e da temperatura. As temperaturas ensaiadas foram, ambiente, 80°, 120° e 150°. Os rendimentos relativos foram determinados para 5, 10, 20, 30, 60 e 120 min. de reacção e expressos sob a forma de respostas relativas. Como padrões internos utilizou-se um aminoácido não proteico, a cicloleucina e o octacosano.

A temperatura ambiente, os aminoácidos não apresentam pico detectável ao fim de 60 minutos, e a 80° mesmo ao fim de 60 minutos o rendimento é demasiado baixo. Quando o aquecimento a 120° é só por 30 minutos o rendimento é igualmente baixo. Ao fim de 60 minutos a 120°, a ornitina e a lisina são incompletamente derivatizados, e a histidina não fornece pico detectável (tabela 21).

Aquecimentos por períodos de 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a 150° foram também efectuados. Pelo exame da figura 58 pode concluir-se que, excepto no caso dos ésteres da lisina, ornitina, glicina e prolina, o rendimento em derivado não aumenta significativamente com o tempo de aquecimento de 15 para 20 minutos. Prolongamento do aquecimento para além deste tempo, porém, conduz a uma baixa de rendimento mais ou menos significativa, consoante o tipo de aminoácido. A acilação da histidina, sendo um aminoácido difícil de derivatizar, necessita, de aquecimento a 150° por 20 minutos para a formação de um único derivado; torna-se, necessário, quando se pretende a derivatização da histidina e o seu doseamento, utilizar tempos de reacção de 20 minutos a 150°, sendo suficiente nos casos contrários fazer a reacção em apenas 15 minutos.

Tabela 21

Factores de Resposta dos derivados N-etoxicarbonílicos dos ésteres isopropílicos dos AA em relação à cicloleucina como padrão interno mantendo fixas as condições de esterificação (110°C /30 min) e variando o tempo de aquecimento a 120°C durante a acilação.

Aminoácido	Temperatura de acilação 120°			
	30 min	SD%	60 min	SD%
Ala	0.673	12.8	1.017	23.1
Val	0.689	13.8	0.697	21.0
Abu	0.803	10.0	1.024	16.0
Leu	0.853	8.8	0.990	15.1
Gly	0.685	14.0	0.967	21.0
Pro	0.785	7.9	1.005	17.3
Asx	0.784	8.0	0.881	13.8
Tre	0.506	2.0	0.505	8.3
Ser	0.411	18.0	0.385	13.8
Met	0.442	6.8	0.440	20.0
Glx	0.671	10.0	0.821	17.7
Phe	0.844	2.8	0.973	9.1
Cys	0.123	27.6	---	---
Hyp	0.563	9.1	0.675	21.0
Orn	----		0.314	10.5
Lys	----		0.238	25.2

Considerou-se óptima a temperatura de acilação de 150° por 20 minutos para a derivatização completa da mistura de aminoácidos proteicos (Figura 58). Os factores de resposta foram determinados em relação ao octacosano e à cicloleucina. Na tabela 23 coluna 1 inscrevem-se os valores dos factores de resposta obtidos utilizando a cicloleucina como padrão interno. Os valores obtidos para os factores de resposta deste tipo de derivados, apresentam um desvio padrão médio inferior a 4% em quase todos, à excepção dos mais retidos.

A principal dificuldade encontrada foi a derivatização incompleta da arginina. Este aminoácido revelou-se como o mais difícil de derivatizar por este método, facto aliás que é comum aos restantes métodos de derivatização. A arginina pode, no entanto, ser quantitativamente transformado em ornitina pela acção da arginase<sup>80</sup>, sendo assim esta dificuldade circundada.

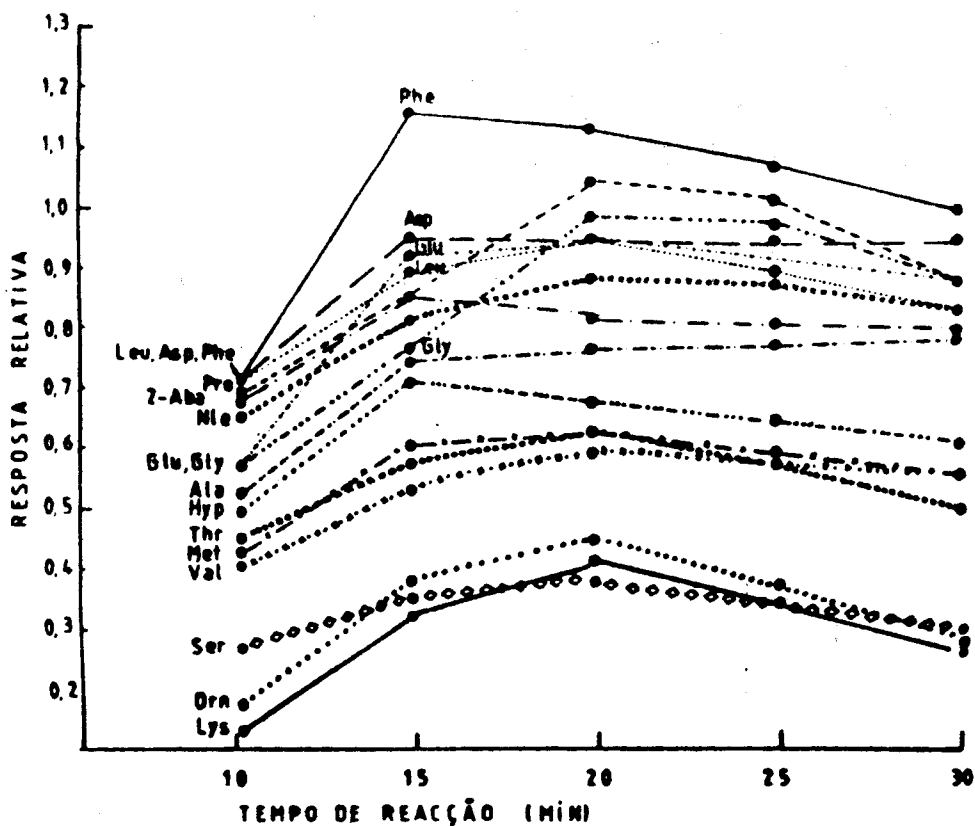


Figura 58: Rendimento em derivados N-etoxicarbonílicos dos ésteres isopropílicos em função do tempo de aquecimento a 150°C

Para os restantes aminoácidos, os factores de resposta (Tabela 23) variam entre os 0.24 para a serina, e 1.1 para a fenilalanina. Este facto deve-se à própria natureza qualitativa e quantitativa dos grupos funcionais contidos nos vários aminoácidos os quais são, conforme já se disse, determinantes para o rendimento dos processos de derivatização. Aminoácidos como a lisina e ornitina, com um segundo grupo amina na cadeia lateral, admitem dois grupos etoxicarbonilo, enquanto que aminoácidos dicarboxílicos, por exemplo, são duplamente esterificáveis. A massa adicional do grupo isopropilo nos aminoácidos dicarboxílicos, confere-lhes uma maior resposta do detector de ionização de chama, do que a obtida pela introdução adicional de grupos etoxicarbonilo na lisina e na ornitina, facto a que se deve o menor coeficiente de resposta relativa apresentada por cada um destes últimos.

5.1:2:7.2 - Estabilidade dos derivados N-etoxicarbonílicos dos ésteres isopropílicos de AA

Os ensaios de estabilidade foram efectuados sobre amostras contendo concentrações conhecidas de cada aminoácido - aproximadamente 0,04 mg. As amostras foram analisadas logo após a derivatização e o factor de resposta calculado para cada aminoácido.

Tabela 22

Factores de resposta e estabilidade dos ésteres isopropílicos de derivados N-etoxicarbonílicos de aminoácidos em função do tempo de armazenamento em frigorífico (4°C).

Aminoácido	1ª análise		Variação % do Factor de Resposta com o tempo após acilação (dias) (armazenamento em frigorífico)		
	Resp. Rel. Cle=1	SD%	30	Dias 60	90
Ala	0,756	1,7	70	65	50
Val	0,583	2,2	104	98	89
2-Abu	0,848	2,5	70	70	70
Ile	0,959	3,8	100	100	100
Ale	0,959	3,8	100	100	100
Leu	0,959	3,8	100	100	100
Gly	0,979	0,7	103	103	103
Nle	0,878	2,5	100	100	100
Pro	1,039	3,3	104	99	99
Asx	0,951	0,0	99	95	93
Thr	0,621	2,7	90	70	70
Met	0,618	0,5	103	95	92
Ser	0,247	1,1	100	77	76
Glx	0,928	1,6	98	83	82
Phe	1,123	1,4	103	98	95
Hyp	0,672	1,0	95	85	85
Cys	0,849	1,0	--	--	97
Orn	0,441	1,0	50	50	50
Lys	0,416	1,0	50	50	50
Tyr	0,320	1,0	87	--	--

As amostras foram conservadas em frigorífico durante três meses e cromatografadas regularmente, durante esse período. Em cada análise foi feita a determinação dos factores de resposta, os quais foram expressos como percentagem do valor inicial, tendo-se obtido os resultados inscritos na Tabela 22.

A observação desta tabela, permite concluir que os aminoácidos que mais sofrem com o tempo de armazenamento são a ornitina e a lisina os quais, ao fim de 30 dias, mostram já um decréscimo de 50%; a tirosina, se bem que ao fim de 30 dias apresente um decréscimo pouco pronunciado, já não é detectada ao fim de 60 dias. A cisteína não aguenta qualquer armazenamento devendo ser cromatografada logo a seguir à derivatização. Os restantes aminoácidos mostram pouca variação com o tempo de armazenamento, revelando grande estabilidade.

**5:1:2:7:3 - Análise qualitativa de aminoácidos sob a forma de derivados isopropílicos N-etoxicarbonílicos**

Os derivados foram identificados por comparação dos tempos de retenção relativos obtidos por injeção de uma mistura de padrões (Tabela 23).

**Tabela 23**  
Retenções relativas dos ésteres isopropílicos de N-etoxicarbonilaminoácidos em coluna WCOT revestida com FFAP.

Aminoácido	Retenção relativa	SD%
Ala	0.492	0.2
Val	0.545	0.1
Abu	0.553	0.1
Ile	0.662	0.1
Ale	0.688	0.1
Leu	0.693	0.1
Gly	0.732	0.1
Pro	0.841	0.1
Cle	1.000	0.0
Asx	1.296	0.0
Tre	1.342	0.1
Met	1.497	0.1
Ser	1.515	0.1
Glx	1.538	0.1
Phe	1.686	0.1
Cys	1.772	0.1
Hyp	1.969	0.1
His	2.231	0.2
Orn	2.591	0.2
Lys	2.877	0.2
Trp	3.398	0.1
Tyr	4.760	0.2

A identificação com base nos tempos de retenção é a forma mais simples de análise qualitativa em CGL, neste caso os baixos valores de desvios padrão dos vários derivados em relação ao padrão interno escolhido, são prova da reproductibilidade do sistema cromatográfico e portanto da identificação inequívoca. Como seria de esperar o desvio padrão aumenta com a distância dos aminoácidos ao padrão interno, facto aliás que é de esperar.

#### **5.1.2.7.4 - Análise Quantitativa**

A análise quantitativa foi, também aqui, realizada pelo método do padrão interno. O rendimento da derivatização foi calculado para todos os aminoácidos. Igualmente para todos os aminoácidos se determinou a linearidade de resposta do FID a várias relações de concentração AA/padrão.

##### **5.1.2.7.4.1 - Linearidade de resposta do FID**

A linearidade do FID para estes derivados, foi determinada analisando amostras contendo concentrações variáveis entre aminoácidos e padrão interno. As áreas relativas aminoácido/padrão interno foram determinadas para relações de concentração de 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 (Figura 59).

Na gama de concentrações estudada o detector mostrou resposta linear para a maioria dos aminoácidos. Encontraram-se desvios de linearidade do FID para a histidina, o triptofano e a tirosina. Estes desvios de linearidade a concentrações baixas de aminoácidos que apresentam retenções elevadas, podem dever-se a um elevado número de factores mas, entre eles, encontra-se seguramente o desvio da linha de base, a valores de atenuação baixa, os quais dificultam a integração e consequente determinação da área absoluta do pico correspondente. Os ensaios de linearidade foram efectuados em amostras contendo aproximadamente 1-4 pmoles.

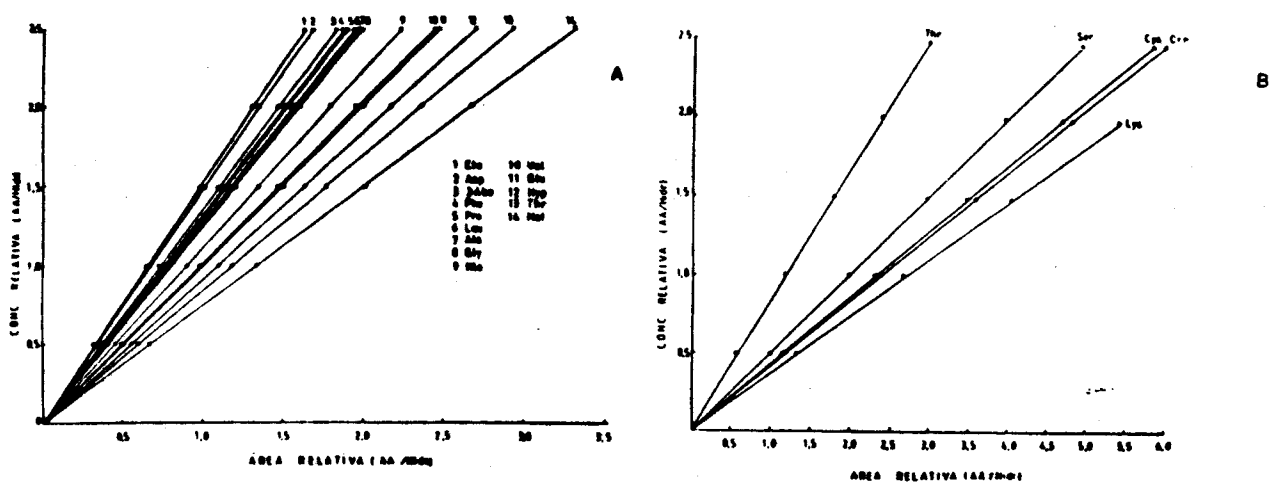


Figura 59 : Linearidade de resposta do detector de ionização de chama aos ésteres isopropílicos de N-etoxicarbonil-aminoácidos quando analisados em coluna WCOT de vidro revestida com FFAP.

#### 5.1.2.7.4.2 - Reprodutibilidade e aplicação a amostras reais

O método foi aplicado a misturas de aminoácidos de concentração conhecida, as quais foram tratadas como amostras desconhecidas, com o intuito de se avaliar o rendimento da derivatização e a recuperação da amostra. A composição da mistura analisada foi comparada com a composição determinada por cromatografia de gás e os valores desta expressos em percentagem de recuperação para cada aminoácido, conforme consta na Tabela 24. Os valores mais baixos foram os obtidos para a ornitina, a prolina e a alanina.

O método revelou-se bastante reprodutível decorrendo a recuperação com um rendimento médio de 95%.

A aplicação do método à determinação de aminoácidos em materiais biológicos, é ilustrada pela análise dos aminoácidos livres existentes num vinho elementar (fig. 60). Os resultados obtidos são coerentes com os obtidos por outros métodos e são referidos na Tabela 25.



Tabela 24

Recuperação de aminoácidos quando analisados sob a forma de ésteres isopropílicos N-etoxicarbonílicos em coluna de vidro revestida com FFAP.

Aminoácidos	Composição Mistura teórica %	Composição analisada %	Recuperação %
Ala	3.9	3.5	90
Val	7.6	7.5	99
2-Abu	3.9	3.6	94
Leu	3.9	3.9	100
Nle	4.1	4.1	100
Pro	6.3	5.1	81
Cle	9.1	9.1	100
Gly	4.9	4.5	91
Glx	4.9	4.5	91
Thr	4.0	3.9	98
Met	3.8	4.0	105
Ser	10.1	10.7	105
Asx	4.7	3.9	83
Phe	4.7	3.9	83
Hyp	4.6	4.5	98
Cys	9.3	9.1	98
Orn	5.2	4.9	94
Lys	5.0	5.0	100
Total	100.0	95.7	

Tabela 25

Composição de um vinho elementar em aminoácidos livres derivatizados sob a forma de ésteres isopropílicos N-etoxicarbonílicos

Aminoácido	conc. mg/l	Composição %
Ala	57.2	9.1
Val	42.0	6.7
Leu	49.6	7.9
Gly	26.0	4.1
Pro	214.8	34.1
Asx	31.4	5.0
Tre	20.2	3.2
Met	10.4	1.7
Ser	5.5	8.7
Glx	37.8	6.0
Phe	24.0	3.8
Hyp	9.6	1.6
Orn	21.0	3.3
Lys	30.4	4.8

### 5.1.2:3:5 - Cromatografia

Os aminoácidos derivatizados da forma descrita foram cromatografados com sucesso em colunas de FFAP (Figura 61). Os grupos hidroxilo não são acilados nas condições de derivatização já descritos. Igualmente o grupo sulfidrilo da cisteína se mantém livre. A derivatização ou não dos grupos OH das cadeias laterais da serina, treonina, tirosina e hidroxiprolina é, com esta derivatização, fácil de detectar. A cromatografia destes derivados feita com sucesso em fases revestidas de FFAP (fase polar) não é conseguida em coluna de OV-101 (fase apolar).

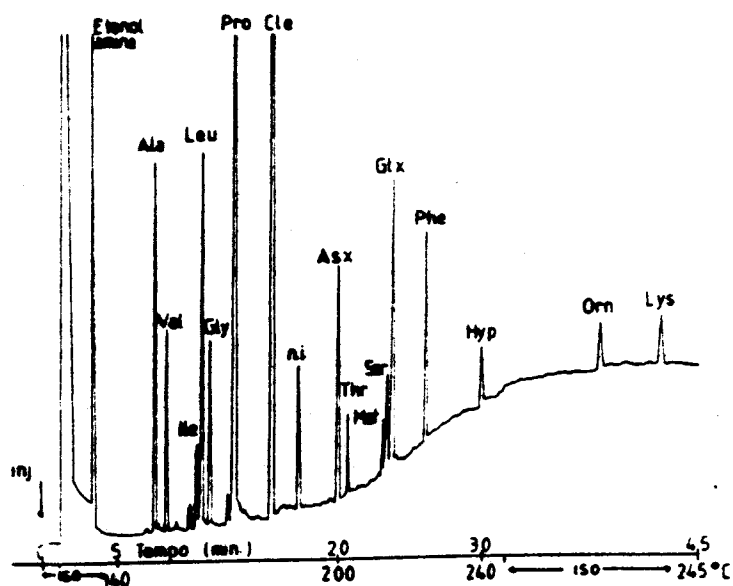


Figura 60 : Cromatograma dos aminoácidos livres de um vinho derivatizados sob a forma de ésteres isopropílicos N-etoxicarbônicos. ni = não identificado.

A Figura 62 A mostra o cromatograma obtido a partir da análise dos aminoácidos, após etoxicarbonilação dos ésteres isopropílicos, numa coluna de OV-101. Os derivados correspondentes à serina, treonina, hidroxiprolina e tirosina, não eluíram em tempo útil nesta coluna, tal como aliás seria de esperar neste tipo de coluna para derivados com um grupo hidroxilo livre. O cromatograma da figura 62 B corresponde à análise da mesma mistura após tratamento com BSTFA em acetonitrilo durante 20 minutos à tempe-

ratura ambiente. Os aminoácidos que não contêm grupos funcionais, ainda derivatizáveis, na cadeia lateral, mantêm, após sililação, tempos de retenção idênticos.

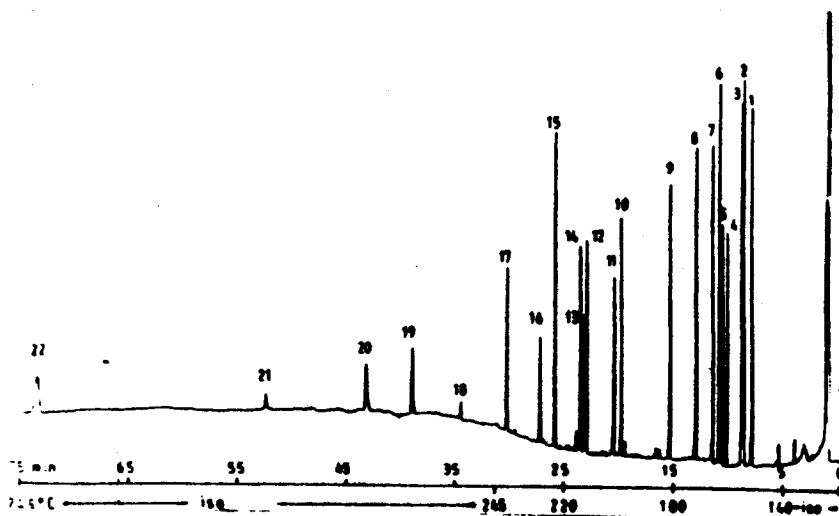


Figura 61: Cromatograma dos ésteres isopropílicos de N-etoxicarbonylaminoácidos: coluna capilar de vidro WCOT de FFAP 25m x 0.25mm d.i. Gás de arraste H<sub>2</sub>: p.i.= 50kpa; razão de splitter: 1/75; At 1x128; vol. inj.= 0.3 pmoles de cada aminoácido. 1-Ala, 2-Val, 3-Abu, 4-Ile, 5-Ale, 6-Leu, 7-Gly, 8-Pro, 9-Cle(PI), 10-Asx, 11-Tre, 12- Met, 13-Ser, 14-Glx, 15-Phe, 16-CysSH, 17-Hyp, 18-His(di), 19-Orn, 20-Lys, 21-Trp, 22-Tyr

A sililação dos grupos hidroxilo tem como consequência o aparecimento no cromatograma dos picos correspondentes aos derivados da serina, treonina, hidroxiprolina e tirosina. A cisteína, embora seja eluída sem sililação, após tratamento com BSTFA modifica a sua posição na ordem de eluição o que demonstra a disponibilidade do grupo sulfidrílo da cadeia lateral para a sililação. A introdução de um grupo trimetilsilílico adicional na cisteína, serina, treonina, tirosina e hidroxiprolina aumenta significativamente a resposta relativa do detector de ionização de chama a este tipo de derivados, além de permitir a análise de todos os derivados em tempos de análise significativamente mais curtos em colunas pouco polares. Estes derivados trimetilsililados, apresentam o inconveniente de serem pouco estáveis. A instabilidade deve-se principalmente à introdução do grupo trimetilsil-

lilo, o qual possui grande susceptibilidade hidrolítica, obrigando pois a evaporação cuidadosa das soluções durante eventuais concentrações.

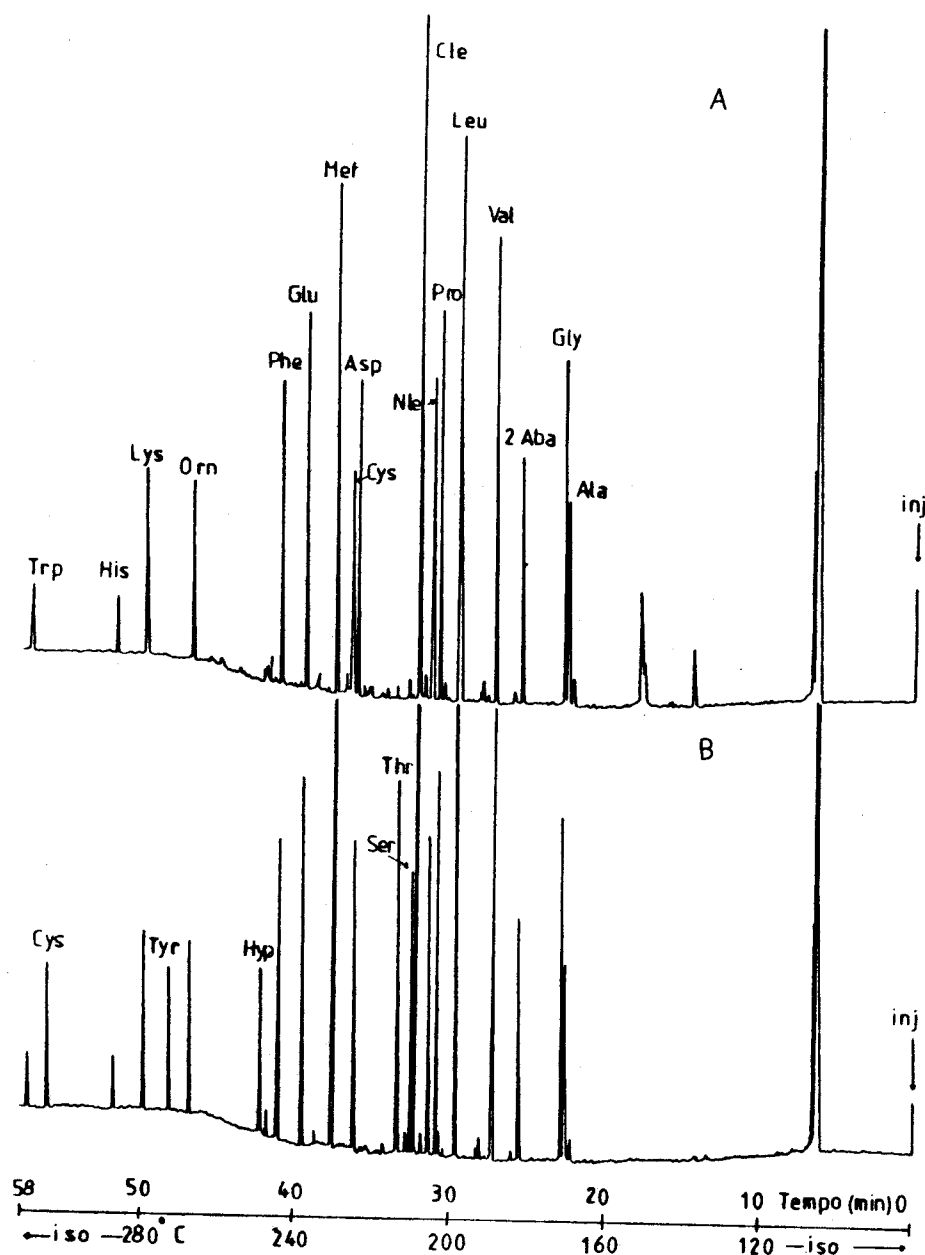


Figura 62 : Cromatograma dos ésteres isopropílicos de N-etoxicarbonilaminoácidos (A) e de ésteres isopropílicos de N-etoxicarbonil-O(S)-trimetilsililaminoácidos (B). Cromatograma B obtido a partir da mistura analisada em A após evaporação do solvente e trimetilsililação. Coluna de OV-101 50m x 0.25mm d.i. de sílica vítrea (SCOT). Gás de arrastamento  $H_2$ , p.i.=170 Kpa; razão de splitter 1/100; At 1 x 64.

A figura 63 exemplifica a aplicação destes derivados, com e sem trimetilsililação, a uma mistura natural.

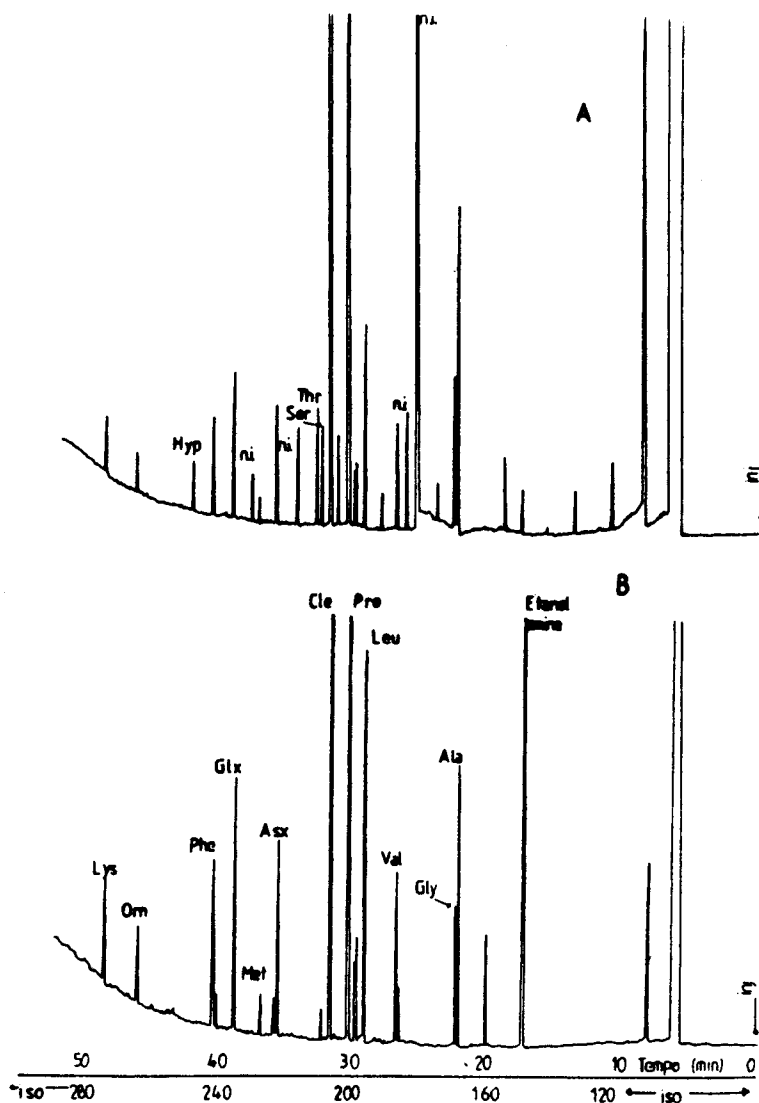


Figura 63: Cromatograma dos aminoácidos livres de um vinho após derivatização sob a forma de ésteres isopropílicos N-etoxicarbônicos - O(S) - trimetilsililados (A) e de derivados N-etoxicarbônicos (B). Condições como na Figura 62 ni=não identificado;

## 5:2 - Escolha dos derivados

Após estudo dos dois tipos de derivados, os N-HFB e os N-Etoc, optou-se pelos primeiros para a análise dos aminoácidos nos vinhos elementares. A escolha destes derivados deve-se ao facto de se ter conseguido, com elevada reprodutibilidade, derivatizar e quantificar em tempo de análise relativamente curtos a totalidade dos aminoácidos proteicos, incluindo os mais difíceis, e mesmo alguns não proteicos. Contrariamente, o método que conduz à obtenção dos derivados N-etoxicarbonilados e/ou N-O(S)-etoxicarboniltrimetilsililados, apesar de permitir a análise de quantidades da ordem dos picomoles, evitando o passo adicional de derivatização da histidina, não derivatiza a arginina. Este aminoácido só é cromatografado após conversão em ornitina por arginase<sup>80</sup>. Apesar de, nos vinhos estudados, não se ter detectado arginina, tal não era obviamente conhecido *a priori*. Na realidade a arginina é normalmente referida como podendo aparecer em quantidades elevadas<sup>142</sup>. Este aminoácido é a principal forma de acumulação de azoto na raiz donde é translocado para o fruto durante a fase de crescimento acelerado<sup>139</sup>. Se bem que nas variedades de *Vitis vinifera* ele diminua geralmente, no fruto, durante a maturação, em algumas variedades pelo contrário é o dominante no final de maturação. Considerou-se que o método escolhido deveria ser capaz de derivatizar e permitir analisar a totalidade dos aminoácidos normalmente referidos como existindo no género *Vitis* em quantidades apreciáveis, devendo ainda quantificá-los e detectá-los separadamente. A ornitina por outro lado foi encontrada em alguns destes vinhos, e parece inclusivamente possuir algumas características importantes na estabilidade dos vinhos, além de ser referida<sup>154</sup> como aparecendo nos vinhos após a FML, quando esta é realizada por algumas espécies de bactérias. Optou-se pelo uso dos derivados N-heptafluorbutíricos dos ésteres isopropílicos de aminoácidos para as análises nos vinhos elementares.

## 5.3 - Análise dos aminoácidos livres de vinhos elementares

### 5.3:1 - Descrição dos objectos de estudo

As principais regiões vícolas alentejanas, situam-se principalmente, na faixa ibero-mediterrânica, a qual se caracteriza por possuir um clima mediterrânico aliado a uma acentuada continentalidade, à qual se atribuem amplitudes térmicas bastante acentuadas.

A maioria das regiões vícolas situam-se ainda predominantemente numa faixa de terreno caracterizada por solos do tipo Pmg, Pg e Pm<sup>187</sup> os quais, não apresentam aptidão cerealífera, motivo por que resistiram à invasão pelos cereais, que ocorreu no Alentejo durante a década de 30.

As castas hoje cultivadas no Alentejo têm, na sua maioria, proveniências de outras partes do país, se bem que algumas delas se possam já considerar, pela tradição de cultivo que têm na região, como tradicionais.

Várias instituições se têm debruçado sobre o problema da vitivinicultura Alentejana, já que, em épocas remotas, os vinhos desta região foram considerados como vinhos de grande qualidade<sup>5</sup>, considerando-se que a região merece receber, por parte dos técnicos vitivinícolas nacionais, atenção correspondente.

No início da década de 70, a então chamada Comissão de Planeamento da Região do Sul, actual Comissão de Coordenação da Região do Alentejo, iniciou trabalhos sobre a estruturação actual e futura da vinha nas diferentes regiões do Alentejo<sup>188</sup>. Estes trabalhos, mais tarde, serviram de apoio ao projecto iniciado pela Universidade de Évora em colaboração com a Direcção Regional de Agricultura do Alentejo, Projecto da Vitivinicultura do Alentejo, -Prova- e visam a caracterização das castas, ampelográfica e enològicamente.

As castas que serviram de base ao projecto Prova, foram recolhidas entre as castas tradicionais da região. O campo de ensaio, estabelecido na vinha do Esporão em Reguengos de Monsaraz, é constituído por duas colecções de castas, uma de brancas e outra de tintas (Figura. 64), ocupando as duas colecções a mesma





parcela sensivelmente homogénea, sendo o solo do tipo Pm -70%- e Pmg -30%-. A vinha foi implantada em 1975 sob o compasso de 3 m x 1.5 m. A enxertia foi realizada na Primavera de 1976.

O elevado número de tratamentos e de recolhas que o projecto Prova se propunha fazer, a fim de realizar o estudo ampelográfico e enológico, determinou o esquema estatístico de seis videiras para cada talhão e seis repetições, considerando-se que o número elevado de recolhas a fazer anularia, de certo modo, o reduzido número de plantas por talhão.

A transposição das castas das regiões de origem, não produziu alterações sensíveis no seu aspecto morfológico, talvez pela homogeneidade entre as várias regiões de origem<sup>188</sup>.

Das sessenta castas implantadas na vinha do Esporão em Reguengos, apenas oito, serviram de base para o presente estudo, e dessas oito se fará um breve resumo sobre características morfológicas e enológicas: As castas escolhidas, Moreto, Trinca-deira, Periquita e Aragonez entre as tintas e Roupeiro, Rabo de Ovelha, Tamarez e Manteúdo entre as brancas, constituem a base da maioria dos vinhos alentejanos, e, concordantemente, os ensaios exploratórios realizados na adega da Universidade de Évora demonstraram as suas reais características enológicas (Tabelas 9 a 16 Anexo I).

### **5:3:2 - Castas vinícolas alentejanas: Características enológicas e morfológicas**

#### **5:3:2:1 - Castas Tintas**

#### **5:3:2:1:1 - Moreto**

Moreto é sem dúvida a casta tinta mais divulgada nas vinhas Alentejanas, datando a sua introdução<sup>189</sup>, dos fins do séc. XVIII. Esta casta é considerada pelos vinicultores como indispensável para a boa qualidade dos vinhos, apesar de produzir vinhos com baixo grau alcoólico (10.6 em média). É uma casta muito produtiva considerada como contribuindo, positivamente, para o envelhecimento dos vinhos.

Morfologicamente esta casta caracteriza-se por um fraco vigor<sup>188</sup>, aguentando-se, porém, os cachos na cepa até tarde. Apresenta um índice de fertilidade bastante elevado, sendo os cachos de maturação tardia (geralmente fins de Setembro e princípios de Outubro).

**5:3:2:1:2 - Trincadeira - Sinomínia: Castelão (Cabeção),  
Espadeiro (Redondo)**

Trincadeira é também uma das castas mais divulgadas no Alentejo, figurando já nas listas da DGA - Anno I nº5 - 1889. Destaca-se pelo seu elevado vigor e produtividade, embora esta última característica varie muito com os anos<sup>188</sup>.

Não é de abrolhamento muito precoce, mas amadurece cedo, possuindo os cachos fraca aptidão para se conservarem sãos na cepa. É a última a perder as folhas, as quais chegam a manter-se na cepa até Dezembro.

No respeitante à sua aptidão enológica, produz vinhos de graduação alcoólica bastante elevada - 14.3 - sendo, por vezes, utilizada em lotes juntamente com o Moreto p.e..

**5:3:2:1:3 - Periquita - Sinomínia: João de Santarém**

Esta casta constitui, junto com o "Moreto" e a "Trincadeira" o trio de castas tintas mais importantes nas vinhas do Alentejo. Pode já ser considerada como casta tradicional, visto já se encontrar referida, para a região de Reguengos, Redondo e Évora, no boletim da Direcção Regional de Agricultura de 1889.

A Periquita é uma casta de abrolhamento precoce, tendo como principal inconveniente o facto de possuir uma tendência acentuada para o desavinho e bagoinha o que lhe reduz, sensivelmente, a produção. Possui um índice de fertilidade relativamente elevado.

Apesar de ser medianamente produtiva, a Periquita é bastante utilizada, pois considera-se ser uma das castas responsável pela qualidade dos vinhos, contribuindo significativamente para o seu aroma e finura. Possui elevada graduação alcoólica - em média 13.4° -.

**5:3:2:1:4 - Aragonez - Sinomínia: Tinta Aragoneza e Aragoneza**

Esta casta foi encontrada em quase todas as vinhas velhas do Alentejo, sendo particularmente importante em Cabeção e Reguengos. Sendo uma casta de abrolhamento tardio, é no entanto de amadurecimento precoce, possuindo, contudo bagos, sensíveis à maturação. Nos aspectos de fertilidade esta casta apresenta um índice de fertilidade dos mais elevados.

No aspecto enológico é considerada, nas regiões em que está mais disseminada, como sendo uma casta de franca acção melhoradora e conferindo aos vinhos características muito especiais de finura. Estes resultados têm vindo a ser confirmados nas vinificações elementares efectuadas na adega da Herdade da Mitra. Apresenta um grau alcoólico relativamente baixo.

**5:3:2:2 - Castas Brancas**

**5:3:2:2:1 - Roupeiro - Sinomínia: Roupeiro Cachudo**

Esta casta é considerada a casta por excelência dos vinhos brancos alentejanos, encontrando-se disseminada em todas as sub-regiões, destacando-se pela tonalidade da folhagem, a qual é verde acinzentada. Não possui abrolhamento precoce, mas no entanto, é de maturação temporã. Possui um índice de fertilidade bastante baixo mas, dadas as suas especiais características enológicas, está bastante disseminada pela região. Apresenta um grau alcoólico médio de 12.5°.

**5:3:2:2:2 - Manteúdo - Sinomínia: Moreto Branco (Amareleja)**

Esta casta foi encontrada na região de Évora, Redondo, Reguengos, Portalegre e Amareleja, portanto bastante disseminada pelo Alentejo. Apresenta um índice de fertilidade de 1.01, sendo considerada como tendo boa aptidão enológica, com um grau alcoólico médio de 11 °.

### **5:3:2:2:3 - Tamarez**

É uma casta branca com grande representatividade na região alentejana, principalmente nas sub-regiões de Reguengos, Vidigueira e Cabeção.

Com o nome Tamarez<sup>188</sup>, existe outra casta possuindo características assaz diferentes das descritas para a casta utilizada. Esta casta apresenta abrolhamento muito precoce, (normalmente a primeira a abrolhar entre as brancas) bem como maturação, aguentando-se bem os cachos nas cepas. Possui vigor média e produz vinhos com um teor alcoólico médio de 11,8 °.

### **5:3:2:2:4 - Rabo de Ovelha**

É uma casta que, tal como as outras, possui tradição de cultivo no Alentejo há vários anos, encontrando-se distribuída por todas as sub-regiões, tanto em vinhas velhas como em vinhas novas. Possui elevado vigor vegetativo, com um índice de fertilidade mediano.

A graduação alcoólica média dos seus vinhos é de cerca de 11,3° considerando-se que imprime aos vinhos características qualitativas apreciáveis, sendo de recomendar em futuros encepamentos. Apresenta grande produtividade.

### **5:3:3 - Obtenção dos Vinhos Elementares**

As castas descritas serviram de base à obtenção dos vinhos elementares estudados. Vinho elementar é o vinho obtido por vinificação de castas individuais. Os vinhos elementares estudados foram todos obtidos, nas condições que a seguir sumariamente se descrevem, na Adega Experimental da Universidade de Évora durante as vindimas de 1977-1983.

#### **5:3:3:1 - Vindima**

A vindima foi realizada após terem decorrido anualmente os

respectivos ensaios de maturação, os quais tiveram início geralmente em fins de Agosto e se prolongaram até à obtenção de um índice de maturação, açúcar/acidez, (S/A) conveniente para se poder proceder à vindima e posterior vinificação. De uma forma geral eram colhidos aproximadamente 40 Kg de cada casta tendo-se o cuidado de fazer apanhas em cepas diferentes, e em regiões diferentes em cada cepa, nomeadamente com diferentes exposições. A marcação da data de vindima baseada no índice de maturação S/A, permitiu a vinificação anualmente de castas com graus de maturação idênticos e próximos dos ideais. As castas foram vindimadas, de uma maneira geral, na altura em que o açúcar atinge um máximo e os ácidos param de decrescer.

Os resultados dos ensaios de maturação forneceram os valores que se inscrevem nas Tabelas 1 a 8 (Anexo I) ordenadas por casta e por anos.

#### **5:3:3:2 - Vinificação**

Os vinhos brancos foram vinificados de "bica aberta", tendo sido feitos, durante a fermentação dois controlos diários de densidade e temperatura. A fermentação foi dada como terminada a um valor de densidade de aproximadamente 1000.

Os vinhos tintos foram vinificados de "curtimenta" após desengace manual. O controlo de fermentação foi idêntico ao dos vinhos brancos.

Para cada vinho foi construído o respectivo gráfico de fermentação (Figuras 1-8 Anexo I).

#### **5:3:4 - Caracterização**

Após a fermentação, e durante o armazenamento, os vinhos são sujeitos a uma análise sumária, durante a qual se fazem, a intervalos mais ou menos regulares, as determinações de anidrido sulfuroso livre e total, acidez volátil, fixa e total, pH, grau alcoólico e prova organoléptica, ao mesmo tempo que se verifica a ocorrência ou não da fermentação maloláctica (Tabela 9-16 Anexo I).

A prova organoléptica, que pode ser considerada como a análise de índole mais caracterizante, foi realizada principalmente de dois modos distintos: inicialmente os vinhos foram apenas classificados de Mau a Muito Bom. Posteriormente, e numa tentativa de obter classificações comparativas com provas realizadas por outros painéis de provadores, adoptou-se a caracterização de Budapeste a qual dá uma informação mais precisa ao mesmo tempo que exige uma avaliação mais complexa e exaustiva, além de fornecer resultados numéricos (Anexo I ficha 1);

#### **5:3:5 - Recolha das amostras**

Os vinhos estudados foram recolhidos durante os anos de 1983 a 1984. São amostras de vinhos engarrafados, sendo variável o tempo de armazenamento em garrafa bem como a idade, já que dizem respeito a vindimas de 1977-1983.

Para alguns vinhos, não se possuem amostras de todos os anos (1977-1983). Tal facto relaciona-se, principalmente, com condições climáticas desfavoráveis impeditivas da vindima, ou à chegada da uva à adega em estado de deterioração. A não realização da vindima é, normalmente, devida a condições adversas do clima responsáveis pelo apodrecimento dos cachos ainda na cepa, sendo mais afectadas as castas menos resistentes.

## **6- ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS EM VINHOS**

Os teores de aminoácidos nos vinhos têm interesse indiscutível. Eles dependem de vários aspectos, mas dependem fortemente do tipo de leveduras ou da sua espécie<sup>146</sup>, e do facto de se considerarem os aminoácidos livres ou os aminoácidos presentes nos peptidos e libertados para o meio após hidrólise<sup>157</sup>.

Põe-se pois algumas dúvidas pertinentes quando se pretendem estudar os teores em aminoácidos de vinhos de várias espécies e de uma região, visando a definição de um padrão caracterizante.

É necessário saber, em que medida o meio e o substracto afectam a taxa de aminoácidos produzidos pela levedura e, se será tão importante como tem sido referido, a quantidade de aminoácidos que a levedura produz, ou seja, se será tão importante a espécie de levedura.

Importante, também, é saber, se os teores mais constantes, ou mais susceptíveis de conduzir a um padrão, serão os que dizem respeito aos teores de aminoácidos livres, ou, pelo contrário, serão os respeitantes aos aminoácidos existentes nos peptidos.

### **6:1 - Origem microbiana dos aminoácidos nos vinhos: caracterização de algumas leveduras seleccionadas pelo perfil de aminoácidos exudados em meios deficientes em azoto orgânico**

Os aminoácidos presentes nos vinhos têm, como já ficou referido, diversas origens, sendo a levedura uma das causas das diferenças existentes entre os vários vinhos. A levedura pode influenciar os aminoácidos presentes no vinho, no final da fermentação, pois ela consome aminoácidos no início da sua actividade, liberta para o meio fermentativo alguns aminoácidos resultantes do seu próprio metabolismo, e ainda, ao cessar a sua actividade, liberta aminoácidos por autólise.

No meio constituído pelo mosto, rico em aminoácidos proteicos e em azoto directamente assimilável pela levedura, esta encontra o meio ideal para o seu desenvolvimento, agindo de uma forma quase matemática, desde que o substracto e o meio ambiente

não variem significativamente.

Foram postas a fermentar cinco espécies de leveduras vnicas -*Sacharomyces uvarum*, *montuliensis*, *bayanus*, *capensis* e *florentinus* - em meios deficientes em azoto e possuindo, como fonte de azoto, um ureia, e o outro sulfato de amónio. Utilizaram-se dois meios fermentativos diferentes, ambos contendo uma solução de glucose a 1% e diferindo na fonte de azoto que têm à disposição, tendo o meio A 0.05% de sulfato de amónio e o meio B 0.05% de ureia.

Nas condições de fermentação referidas, em que ambos os meios são altamente deficientes num dos princípios básicos de que a levedura necessita para se desenvolver, nomeadamente azoto directamente assimilável, a fermentação decorreu lentamente, como indicam na Figura 65 as curvas de fermentação em cada um dos meios, para o exemplo *S. uvarum*.

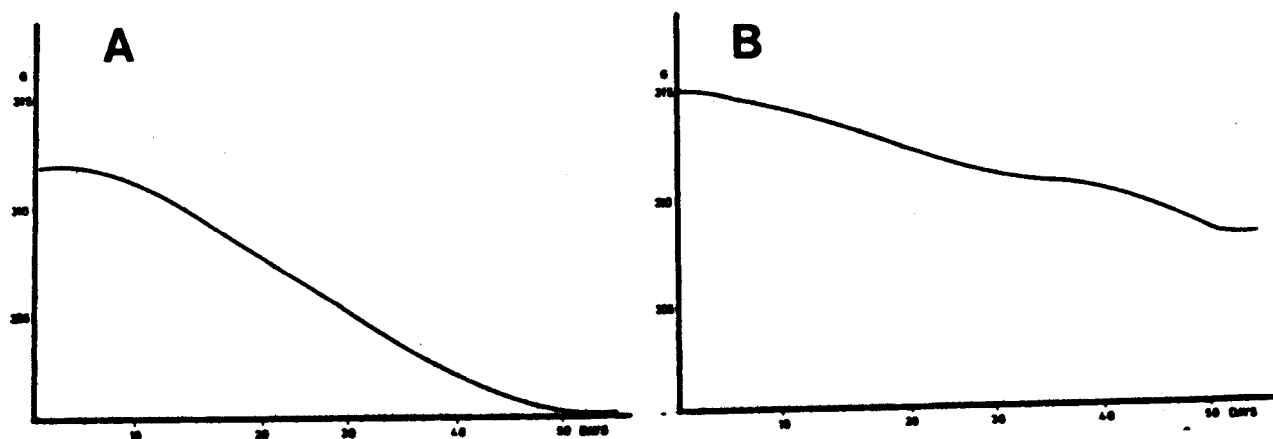


Figura 65: *S. uvarum* : Exemplo de duas curvas de fermentação em meio deficiente em azoto. A - meio A; B - meio B

O controlo de fermentação foi realizado por pesagens diárias, (libertação de  $\text{CO}_2$ ) tendo-se dado por concluída a peso constante. A fermentação decorreu a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ .



## 6.1.2 - Resultados

No final da fermentação o líquido foi filtrado por membrana de Milipore (0.22µm). Como padrão interno adicionou-se a 10 ml do filtrado 1 ml de uma solução aquosa de cicloleucina (37.4 mg/10 ml) e 10 µl de uma solução de tetracosano (13.1 mg/10 ml). Os aminoácidos foram isolados por troca-iônica<sup>6</sup> e o resíduo derivatizado de modo a se obterem os derivados N-heptafluorbutíricos dos ésteres isopropílicos (Esquema 1).

Tabela 26  
Aminoácidos (mg/dm<sup>3</sup>) libertados para o meio pelas leveduras *Sacharomyces* sp. em condições de deficiência de azoto  
A - NH<sub>4</sub>; B - Ureia

A.A	<i>Sacharomyces</i>									
	<i>uvarum</i>		<i>montuliensis</i>		<i>bayanus</i>		<i>capensis</i>		<i>florentinus</i>	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Ala	4.50	3.16	9.30	3.80	0.57	0.40	0.73	0.22	3.20	---
Gly	7.80	3.20	---	6.80	1.20	0.70	1.14	0.54	1.15	1.50
Abu	---	0.83	3.12	---	0.53	0.60	0.20	0.24	3.00	3.00
Val	---	1.84	---	0.80	---	---	0.81	0.95	55.00	3.50
Thr	1.80	---	---	1.70	1.20	2.00	0.65	0.77	---	1.00
Ser	---	1.53	---	---	1.33	0.80	0.40	0.48	---	0.68
Leu	---	1.80	---	---	---	---	---	---	---	---
Ile	---	---	---	---	---	---	---	---	5.25	---
Gaba	---	---	---	---	---	---	---	---	20.00	---
Pro	6.30	5.50	6.15	1.50	1.70	0.61	0.80	0.93	---	---
Cys	---	---	---	---	4.30	3.30	3.40	3.70	---	---
Met	---	---	---	---	---	---	---	0.64	---	---
Glx	1.50	5.10	---	---	0.50	---	0.50	0.31	---	---
Phe	---	1.90	---	---	0.27	---	0.13	---	---	---
Orn	---	---	---	---	0.65	---	0.26	---	---	---
Lys	---	---	---	---	---	---	0.24	---	---	---
Tyr	---	---	---	---	0.49	---	---	---	---	---
His	---	---	---	---	---	---	---	---	2.00	---
Arg	---	---	---	---	---	---	---	---	20.00	---
Tot.	21.90	24.90	18.57	14.60	12.74	8.41	9.26	8.78	109.60	9.70

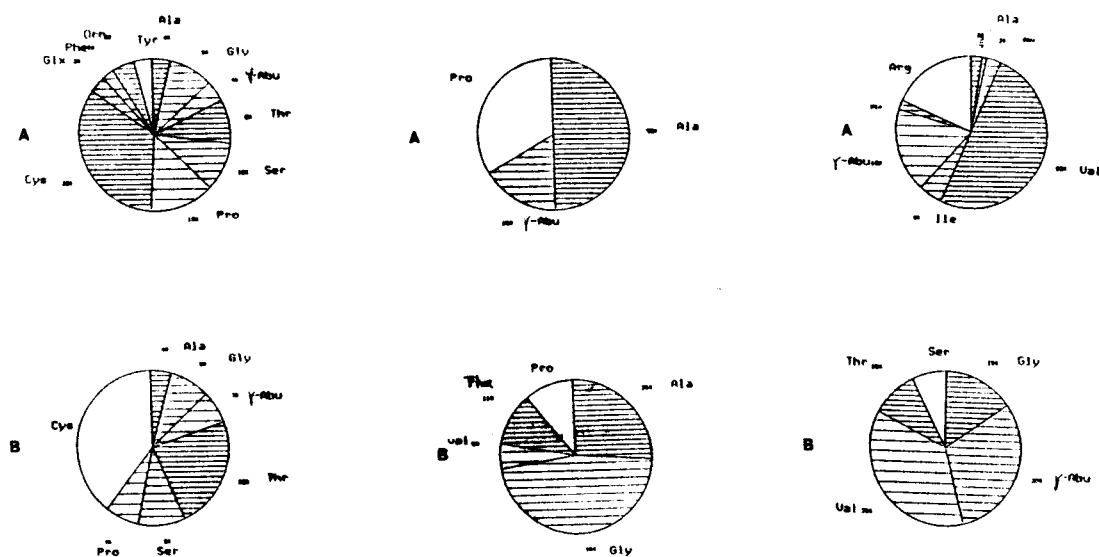
A Tabela 26 mostra os quantitativos em aminoácidos libertados para o meio por cada uma das espécies de leveduras ensaiadas. No meio A as leveduras produzem, de uma forma geral, uma quantidade de aminoácidos superior aos produzidos no meio B; os ami-

noácidos mais complexos são ainda produzidos preferencialmente no meio A, enquanto que os aminoácidos mais simples são produzidos preferencialmente no meio B (estes resultados encontram-se expressos de forma gráfica na Figura 66).

Saccharomyces bayanus

Saccharomyces montuliensis

Saccharomyces florentinus



Saccharomyces capensis

Saccharomyces uvarum

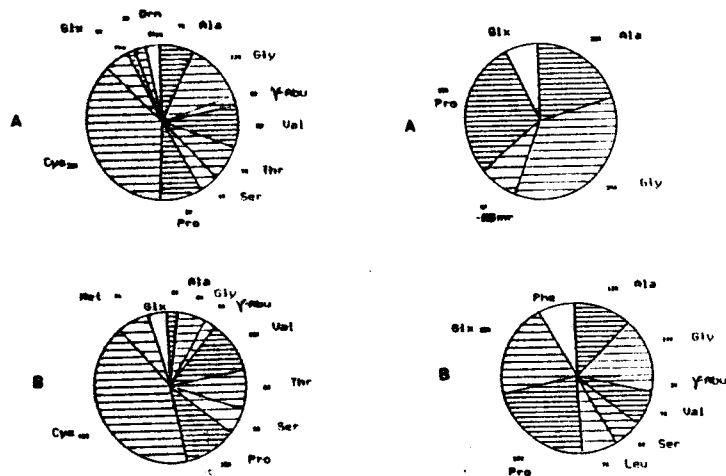


Figura 66: Representação gráfica dos quantitativos de aminoácidos libertados para o meio pelas diferentes espécies de leveduras ensaiadas; A-sulfato de amônio; B- ureia

Independentemente do facto de as condições de fermentação se afastarem drasticamente das condições de vinificação, pode concluir-se que as leveduras contribuem claramente para a composição final em aminoácidos, quer pela sua capacidade em os consumirem quer pela sua capacidade em exudá-los e mesmo produzi-los; Sendo as leveduras características de uma região vínicola, e conseqüentemente, directamente responsáveis pelo tipo de vinho produzido nessa região, o nível de aminoácidos do vinho, além de depender da casta, vai depender da região e da levedura, como conseqüência. A mudança de meio fermentativo tem influência no tipo de aminoácidos produzidos pela levedura já que, e de acordo com o que se passa na natureza, a mesma levedura não produz os mesmos aminoácidos independentemente do meio fermentativo em que está a actuar, mas, leveduras diferentes vão igualmente produzir aminoácidos diferentes, mesmo que disponham do mesmo meio fermentativo (Figura 66).

### 6.1.3 - Classificação das leveduras

O presente trabalho permitiu abrir novos horizontes na classificação quimiotaxonómica de leveduras já que, se se considerarem os resultados no meio de sulfato de amónio, se verifica que, se bem que todas as leveduras produzam alanina, elas podem ser classificadas com base no aminoácido mais abundante, como pertencendo a um dos quatro grupos seguintes: produtoras de cisteína (*S. bayanus* e *S. capensis*), produtoras de prolina (*S. montuliensis*), produtoras de glicina (*S. uvarum*) e produtoras de valina (*S. florentinus*).

Em função da presença ou ausência, de determinados aminoácidos, os resultados obtidos neste estudo permitiram a elaboração de uma chave utilizável na classificação quimiotaxonómica das espécies estudadas (Figura 67). As espécies são agrupadas de uma forma dicotómica, de acordo com os aminoácidos produzidos no meio A, sendo o agrupamento baseado nos aminoácidos dominantes. Os restantes vêm referidos no segundo membro da chave, e podem ser utilizados como subagrupamentos.

Espécies Produtoras de Alanina

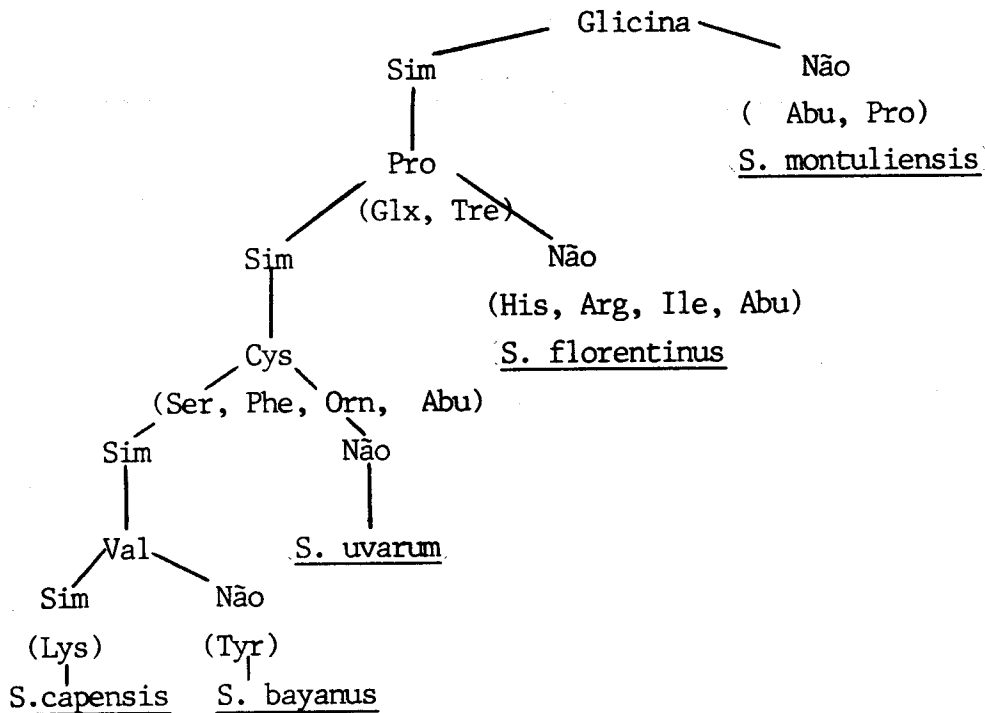


Figura 67 : Classificação quimiotaxonômica com base nos aminoácidos libertados para o meio:

Apesar dos resultados encontrados serem apenas para cinco espécies, parecem promissores para a utilização na classificação de leveduras. Demonstrou-se, deste modo, a influência, não só do tipo de levedura como do meio fermentativo, que nas condições reais equivale à casta, na composição final em aminoácidos de um vinho.

**6:2 - Aminoácidos livres versus aminoácidos de origem peptídica**

Os fenómenos bioquímicos que determinam a qualidade final do

vinho, movem-se dentro de um círculo, no que se refere à composição em aminoácidos. A composição final depende do balanço aminoácidos consumidos pela levedura aminoácidos sintetizados ou libertados por autólise, por cada espécie de levedura, para cada casta e/ou associação de castas. A maioria dos trabalhos que descrevem a evolução dos aminoácidos ao longo do processo vegetativo e fermentativo, preocupa-se, principalmente com os aminoácidos livres, mesmo quando considera importante o trabalho da levedura.

Os peptidos presentes num vinho, quando analisados após hidrólise total mostram, geralmente, comportamento semelhante ao dos aminoácidos livres, não sendo, no entanto, comum que todos os aminoácidos livres se encontrem também sob a forma peptídica. Alguns há, como por exemplo a prolina, que se encontram principalmente sob a forma livre,<sup>148</sup> enquanto que outros como o ac. glutâmico, o ac. aspártico, a lisina e a glicina, se encontram presentes em quantidades apreciáveis em pequenos peptidos dependendo estas relações, principalmente, da variedade,<sup>190</sup> bem como da levedura e/ou leveduras presentes ou responsáveis pela fermentação<sup>191</sup>.

As características de um vinho, quanto à sua riqueza em aminoácidos e peptidos e a relação que se pode tirar entre estas concentrações e a caracterização enológica de determinado vinho pode vir a revelar-se muito importante.

Foi sugerido que a composição final de um vinho em aminoácidos, após hidrólise dos peptidos, poderia ser utilizada na caracterização de vinhos, após tratamento estatístico adequado<sup>157</sup>. Esta hipótese implica uma constância da natureza química das ligações peptídicas, por um lado, e, por outro lado, um balanço aminoácidos livres/aminoácidos combinados, que tenha em conta as susceptibilidades de cada aminoácido às condições de hidrólise.

No sentido de estabelecer qual seria a relação mais significativa (mais constante), procedeu-se à comparação dos resultados obtidos quando se analisam, num mesmo vinho, os aminoácidos livres e totais após hidrólise. Para tal teve-se em consideração as susceptibilidades de cada aminoácido às condições de hidró-

lise.

A determinação da destruição dos aminoácidos nas condições de hidrólise foi avaliada submetendo misturas de padrões a hidrólise ácida por períodos de 6 16 e 24 horas (Figura 68). Os valores encontrados foram, posteriormente utilizados na correção das análises realizadas para determinação dos aminoácidos totais em vinhos sujeitos às mesmas condições de hidrólise.

Durante o tratamento hidrolítico, os aminoácidos livres sofrem degradação mais ou menos pronunciada. A extensão dessa degradação depende do aminoácido considerado, conforme se pode verificar na Figura 68. Aminoácidos como treonina, ac.  $\alpha$ -aminobutírico, glicina, alanina, valina e leucina, mantêm-se praticamente sem alterações durante as primeiras 6 horas do ataque hidrolítico. Entre as 6 e as 16 horas, porém, sofrem degradação mais ou menos pronunciada que, em alguns casos, atinge valores superiores a 50%, atingindo a estabilidade ao fim desse tempo. A serina e a tirosina sofrem degradação contínua durante todo o processo, mostrando-se fortemente sensíveis a tratamento ácido prolongado. Outro grupo de aminoácidos, constituído por ác. aspártico, prolina, ornitina, fenilalanina e ác. glutâmico parece ser mais resistente ao tratamento ácido, pelo menos durante as primeiras dezasseis horas, sofrendo a sua concentração uma queda brusca das dezasseis às vinte e quatro horas. Um terceiro grupo de aminoácidos em que se engloba a cisteína, o triptofano e a hidroxiprolina, sofrem destruição brusca logo nas primeiras seis horas de reacção, o que é natural dada a grande instabilidade que estes aminoácidos apresentam. A lisina e a metionina e, de certo modo, a própria histidina, mostram susceptibilidade em maior ou menor grau, sendo de todos estes a histidina que mais sofre durante as primeiras seis horas em que a queda de concentração atinge os 50%, para estabilizar seguidamente.

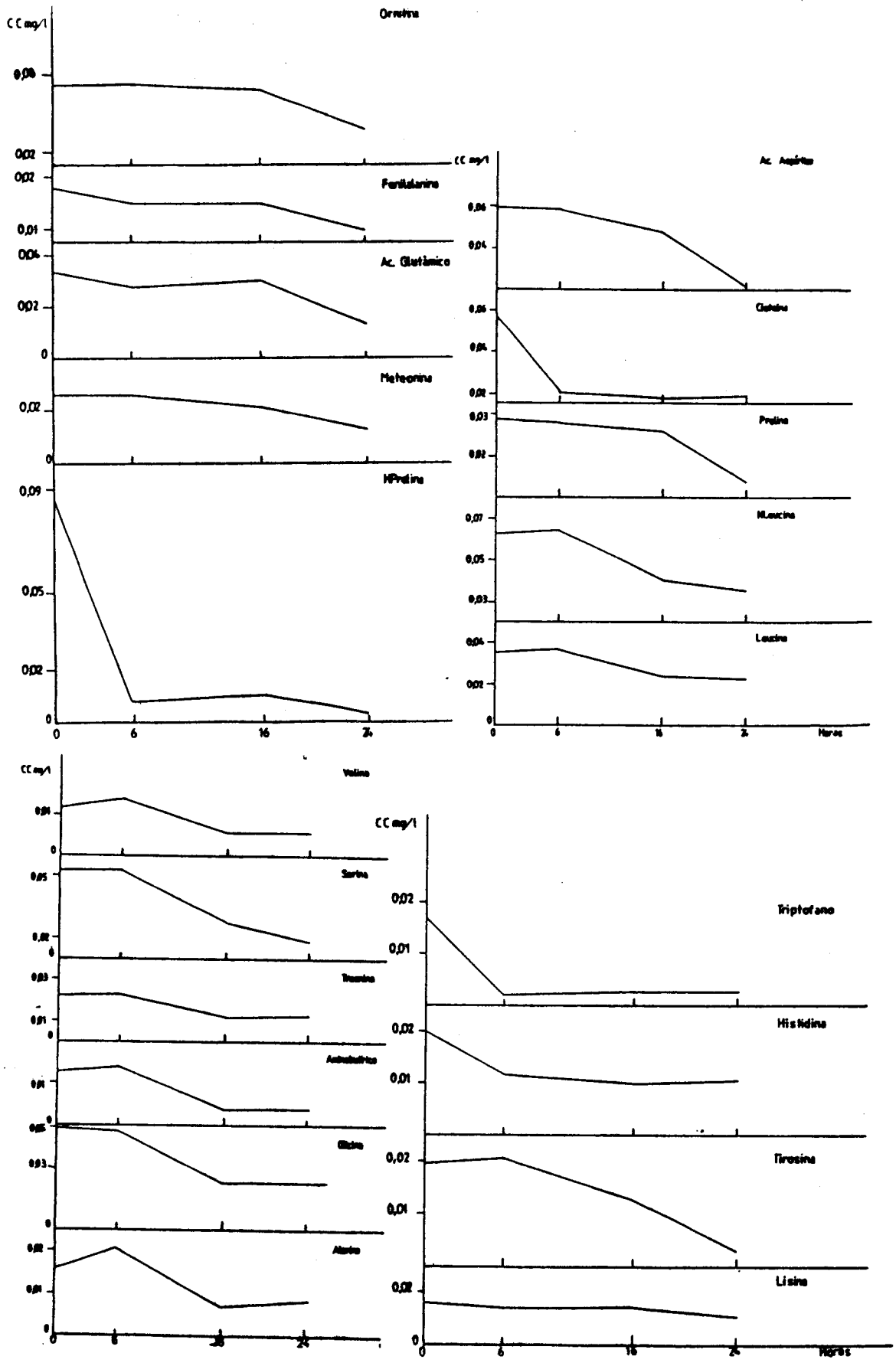


Figura 68: Degradação dos aminoácidos por tratamento com HCl 6M a 110° C em função do tempo de reacção

Tabela 27  
 Comparação das concentrações relativas dos aminoácidos  
 livres e totais do vinho Roupeiro dos anos de 1981 e 1982

	Concentrações relativas (%)			
	Livres		Totais após hidrólise(*)	
	Colheita	Colheita	Colheita	Colheita
	1981	1982	1981	1982
Alanina	6.9	7.3	7.5	3.4
Glicina	3.7	3.7	5.3	2.6
Valina	3.2	1.5	3.1	25.9
Treonina	2.9	2.2	3.1	3.4
Serina	4.4	4.6	5.1	1.7
Leucina	7.8	5.6	7.8	5.6
Prolina	37.0	48.4	32.2	16.4
Cisteína	6.4	7.4	10.8	2.6
Ac. Aspártico	4.4	4.2	6.2	9.5
Hydroxiprolina	1.3	1.8	2.0	0.4
Metionina	1.5	1.0	0.5	1.6
Ac. Glutâmico	6.2	6.3	7.2	8.6
Fenilalanina	4.7	2.3	5.9	4.3
Ornitina	3.6	-	2.8	-
Lisina	5.6	2.4	7.4	7.8
Tirosina	0.3	1.2	-	6.0

(\*) Valor calculado após correcção correspondente à destruição hidrolítica de cada um dos aminoácidos.

Estes resultados têm de ser tidos em conta na determinação da concentração de aminoácidos totais após hidrólise das ligações peptídicas. Os valores obtidos na coluna 2 da tabela 27 referem os valores obtidos para os aminoácidos totais após correcção para a destruição hidrolítica sofrida pelos mesmos. Esta correcção torna-se necessária devido à forte variação da concentração dos aminoácidos livres durante o processo de hidrólise.

Convém ainda notar que não só as variações são consideráveis, como também são diferentes, para os dois vinhos, os aminoácidos cuja concentração aumenta após a hidrólise. Assim, e tendo em consideração, novamente, os resultados da tabela 27, verifica-se que o vinho da colheita de 1981, após sofrer tratamento hidrolítico por 24 horas, apresenta aumentos de concentração de alanina, glicina, ac. aspártico (ou asparagina), hidroxiprolina, ac. glutâmico (ou glutamina), fenilalanina e lisina. Na colheita de 1982 os aminoácidos libertados mais signi-



ficativamente são, por outro lado, valina, treonina, ac. aspártico (ou asparagina), metionina, ac. glutâmico (ou glutamina), fenilalanina, lisina e tirosina, o que faz concluir que a composição em pequenos peptidos é mais variável de ano para ano do que a concentração em aminoácidos livres, podendo talvez considerar-se que os pequenos peptidos são comparativamente mais afectados pela variação sazonal do que o são os aminoácidos livres.

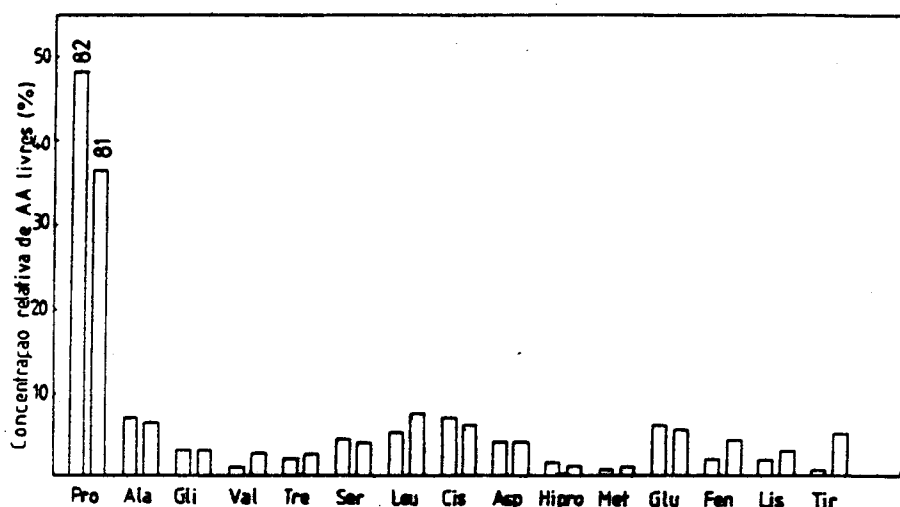


Figura 69: Comparação das concentrações relativas dos aminoácidos livres do vinho Roupeiro das colheitas de 1981 e 1982.

Na Figura 69 mostra-se de forma gráfica os resultados obtidos nos dois anos estudados. Se exceptuarmos a fenilalanina, a lisina e a tirosina em que as variações de concentração são significativas, parece poder afirmar-se que, pelo menos nos anos estudados, as concentrações de aminoácidos livres obedecem a um perfil comum. Quando se toma em consideração os resultados obtidos após hidrólise total dos pequenos peptidos, em que as variações são mais importantes, verifica-se o contrário.

Os resultados obtidos indicam que o perfil de aminoácidos livres mostra comportamento sazonal mais homogéneo. Tal afirmação, se bem que baseada apenas nos resultados de dois anos, está de acordo com o demonstrado quando se comparam vinhos de diferentes variedades pelo seu espectro de aminoácidos livres (Figura 70 e Tabelas 13 e 16 Anexo I).

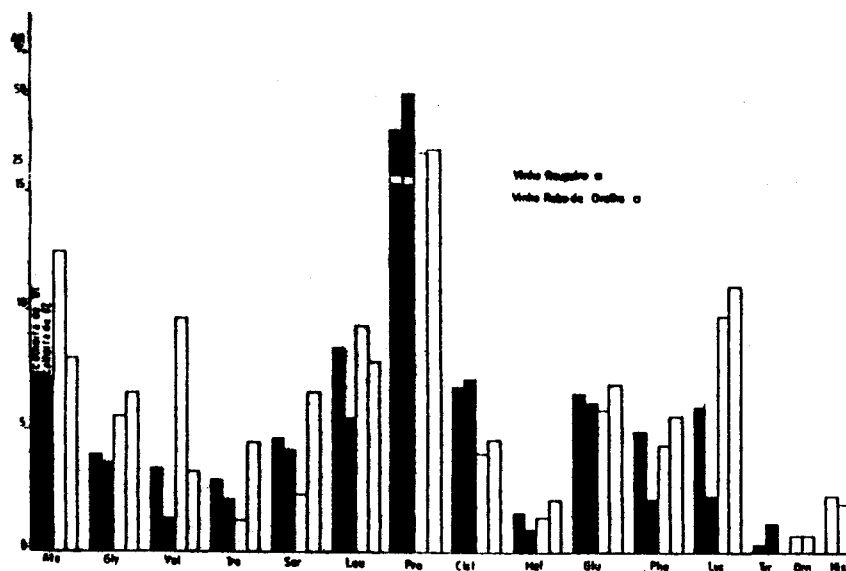


Figura 70: Comparação de dois vinhos, Roupeiro e Rabo de Ovelha de colheitas diferentes, pelas percentagens de aminoácidos livres.

Na Figura 71 apresentam-se os cromatogramas de aminoácidos típicos de cada um dos vinhos Roupeiro e Rabo de Ovelha.

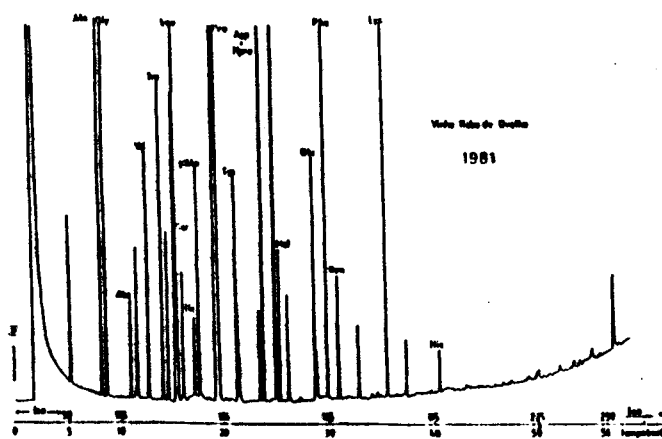
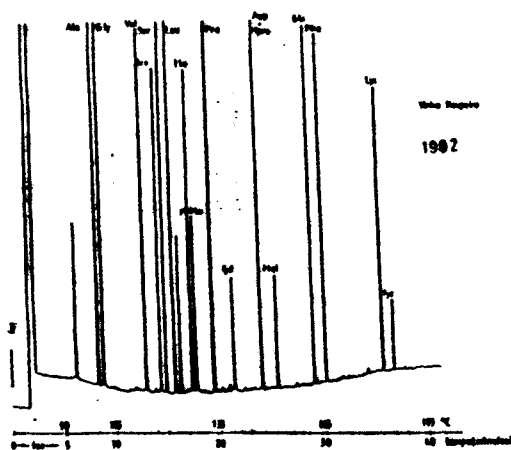


Figura 71: Cromatograma dos aminoácidos livres do vinho Roupeiro e Rabo de Ovelha cromatografados sob a forma de ésteres isopropílicos N-heptafluorbutíricos. Coluna de OV-1 25m SCOT; Detector FID; Gás de arrastamento  $H_2$  - p.i.60Kpa; razão de splitter 1/50; Detector e Injetor a  $250^\circ$ .

## 6:3 - Resultados e discussão da análise de aminoácidos em vinhos elementares por cromatografia gás-líquido

### 6:3:1 - Vinhos Tintos

As quantidades residuais de aminoácidos no vinho dependem essencialmente da quantidade do aminoácido no mosto original, das condições climáticas em que decorreu o ciclo vegetativo, da levedura utilizada, da temperatura de fermentação e do método de análise.

A prolina é, dentro os aminoácidos existentes, talvez o mais importante, podendo-se concluir que este aminoácido constitui a forma principal de acumulação de azoto na uva madura de *Vitis Vinifera* durante maturação. Esta acumulação é mais significativa em períodos certos do desenvolvimento nomeadamente a partir de meio de maturação até à maturação completa acelerando-se o processo o processo de acumulação ou a sua síntese continuamente até à maturação<sup>143</sup>. No entanto, as condições climáticas de ano afectam o teor em prolina no fruto maduro<sup>145</sup>, considerando-se ser ao abaixamento do teor deste aminoácido que se devem as diminuições de aminoácidos nos anos em que as condições climáticas se mostram adversas com humidades relativas e temperaturas baixas no período final de maturação. As variações de concentração respeitantes à prolina nos vários anos, não devem pois ser atribuídas exclusivamente à levedura, mas antes a variações ocorridas durante o período de maturação.

As condições climáticas do ano influem directamente no grau alcoólico e conseqüentemente, variando a Prolina directamente com o grau alcoólico, vão afectar os teores de prolina<sup>175</sup>.

Na região Alentejo, o clima apresenta geralmente chuvas primaveris não muito abundantes. Na região de Reguengos as alturas pluviométricas referentes ao período de Abril a Junho descem geralmente a valores de 50 mm (Tabela 17 Anexo I), mas convém não esquecer as chuvas precoces, as quais se verificaram no ano de 1978 e 1980 tendo nestes anos sido notadas alterações consequentes nos teores dos vários aminoácidos, nomeadamente por ocorrência de pluviosidade excessiva em períodos críticos de acumulação

de prolina, o final da maturação. A influencia climática não se faz sentir igualmente em todas as variedades no que diz respeito ao balanço final de aminoácidos:

Na Tabela 28 apresentam-se os resultados dos teores em aminoácidos dos vinhos estudados agrupados por anos e por castas nas Tabelas 18-21 do anexo I apresentam-se os mesmos resultados agrupados por castas e na Tabela 29 apresentam-se as médias anuais dos vários vinhos durante os anos estudados;

Da apreciação das Tabelas 28 e 29, verifica-se uma constância relativa em alguns dos aminoácidos sendo os desvios padrões das médias intervarietais (Tabela 29) menores do que os desvios padrões interanuais por variedades (Tabela 18-21 Anexo I);

Pela análise da Tabela 28 onde se apresentam os resultados anuais de cada vinho verificam-se logo algumas particularidades nomeadamente informação acerca da resistência das vários variedades às condições adversas de clima (Tabela 17 Anexo I) nomeadamente chuvas no período final da maturação e durante a vindima. As resistências diferentes dependem em parte da precocidade da casta (Tabela 1-4 Anexo I).

Nos vinhos tintos, no ano de 1978, só dois foram vinificados, a Periquita e a Trincadeira que apresentam valores de aminoácidos muito semelhantes. Os valores de precipitação ocorridos nos meses de Junho Julho e Setembro terão sido os responsáveis pelo apodrecimento de grande parte das vindimas, impedindo a vinificação. Outro ano também com problemas de vinificação foi o de 1980 em que a chuva no mês de Agosto impediu a maturação atempada da maioria das castas, tendo as chuvas posteriores agravado ainda mais o estado sanitário das vindimas que acabaram quase todas por apodrecer. As condições adversas ocorreram, em 1980, num período crítico da maturação no que respeita não só à acumulação de aminoácidos como ao estabelecimento das concentrações ideais de açúcares e conseqüente abaixamento de acidez.

Da apreciação da Tabela 28 ressaltam os valores de Ornitina em anos de chuva abundante tais como 1978 e 1980 podendo-se supor que o aparecimento de concentrações demasiado elevadas deste aminoácido poderão corresponder a uma resposta da levedura a

TABELA 28 - Concentrações relativa dos aminoácidos livres dos vinhos Tintos nos vários anos de estudo

ANO	1977			1978			1979			1980			1981			1982			1983								
	AA	Var.	P	A	Mo	Tr	P	A	Mo	Tr	P	A	Mo	Tr	P	A	Mo	Tr	P	A	Mo	Tr					
Ala	4.5	---	4.4	14.4	7.1	4.7	8.9	3.7	---	7.1	5.3	---	---	6.0	3.9	7.0	3.4	4.6	1.8	2.4	4.5	6.3	2.4	---	9.0	3.2	
Gly	3.2	---	1.4	4.0	2.1	1.6	2.1	1.9	---	2.3	2.2	---	---	1.1	1.5	2.3	2.2	1.4	1.2	1.8	1.6	4.5	4.8	---	6.8	1.9	
Val	1.1	---	1.5	2.9	1.8	2.8	2.7	1.7	---	6.1	2.4	---	---	2.9	2.2	3.7	2.7	1.2	0.4	1.6	2.5	5.8	0.8	---	4.8	1.6	
$\alpha$ -Abu	1.4	---	---	0.6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Thr	3.3	---	1.0	4.8	0.9	0.6	1.9	1.1	---	2.4	1.3	---	---	1.7	0.7	1.9	1.2	1.2	0.3	1.0	1.4	5.9	0.7	---	2.3	1.5	
Ser	0.9	---	1.2	1.8	1.4	0.7	1.7	1.1	---	2.4	1.1	---	---	1.7	0.9	2.8	1.2	0.9	0.3	1.2	1.8	0.4	0.5	---	2.6	0.5	
Leu	2.0	---	1.4	4.5	1.6	2.4	1.9	2.5	---	5.6	2.1	---	---	3.0	2.4	5.2	2.3	0.8	0.4	1.6	2.3	4.3	0.1	---	4.4	1.2	
Ile	1.1	---	0.9	0.9	1.2	1.8	1.2	0.4	---	3.8	2.0	---	---	1.5	0.5	2.7	1.1	0.6	0.1	1.0	1.2	4.6	0.1	---	2.3	0.7	
Pro	76.4	---	77.3	56.9	40.8	70.5	58.3	83.3	---	51.7	71.6	---	---	50.5	82.1	46.9	73.1	83.3	93.0	68.1	64.5	55.6	86.1	---	45.8	80.1	
Gaba	0.1	---	2.3	0.8	8.0	0.8	11.1	0.2	---	2.6	2.2	---	---	2.1	0.4	2.1	2.1	0.1	0.1	1.3	2.1	0.4	0.1	---	4.9	0.2	
Cys	---	---	---	0.3	0.9	3.0	---	0.3	---	2.6	---	---	---	1.6	0.1	2.4	5.1	0.2	0.2	1.6	3.5	0.8	0.4	---	2.5	0.3	
Hyp	---	---	---	---	0.04	0.3	---	0.4	---	---	---	---	---	0.9	0.8	0.2	0.1	1.2	0.1	0.6	0.6	0.2	0.3	---	0.2	0.2	
Asx	1.6	---	3.5	3.0	3.0	2.9	4.2	0.9	---	4.1	4.8	---	---	3.3	2.5	4.1	2.3	0.4	0.7	2.2	2.2	3.8	0.5	---	4.2	2.8	
Met	1.2	---	0.9	0.5	3.0	4.0	0.7	1.1	---	2.4	0.9	---	---	6.3	0.5	4.5	1.1	0.5	0.2	5.9	5.2	0.2	0.8	---	2.2	---	
Glx	1.3	---	2.5	3.0	3.2	1.8	4.3	0.4	---	2.5	1.8	---	---	3.4	1.2	3.4	0.7	1.2	0.5	1.6	2.6	1.9	1.0	---	3.8	0.7	
Phe	0.9	---	0.8	0.3	1.8	0.8	1.1	1.0	---	2.1	1.1	---	---	2.1	0.2	2.4	0.7	2.1	0.3	0.4	0.9	5.3	0.7	---	1.5	2.0	
Orn	---	---	---	1.0	14.4	---	---	---	---	---	---	---	---	5.1	---	1.0	---	---	0.2	1.7	1.7	---	---	---	---	---	
Lys	---	---	2.2	---	1.0	0.8	0.6	---	0.9	1.3	---	0.7	2.1	1.0	0.9	---	---	0.8	0.4	1.0	1.3	0.8	---	---	2.2	1.0	
Tyr	---	---	---	---	1.4	---	---	---	---	---	---	---	---	4.5	---	1.4	---	0.1	---	0.2	---	0.7	---	---	---	0.7	

condições adversas do clima, já que este aminoácido tem sido considerado como responsável pela estabilização biológica dos vinhos<sup>154</sup>.

Alguns aminoácidos parecem por outro lado depender fortemente das condições e temperaturas de fermentação, caso de ácido  $\gamma$  aminobutírico nos vinhos Trincadeira e Aragonez no ano de 1978 (Figura 6 e 7 Anexo I). Nas condições em que se verifica aumento inusitado da temperatura, durante a fermentação, há necessariamente uma modificação do substracto de fermentação que determinará um metabolismo diferente responsável pelo consumo e excreção de aminoácidos diferentes e/ou em teores diferentes. A modificação do metabolismo da levedura pode ainda ser devido a modificação das características iniciais do mosto nos anos em que as condições climáticas não são as ideais.

Tabela 29  
Média dos resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos tintos elementares estudados

AA	Periquita	Trincadeira	Aragonez	Moreto	X	DP%
Ala	5.1	5.5	5.5	5.7	5.5	4.6
Gly	2.8	2.1	2.1	2.9	2.5	17.5
Val	1.8	2.6	2.4	3.8	2.7	31.6
Tre	1.8	2.1	1.3	1.6	1.7	19.8
Ser	0.9	1.1	1.8	1.8	1.4	33.5
Leu	2.0	2.1	2.8	3.4	2.6	25.4
Ile	0.5	1.6	1.6	2.1	1.5	46.6
Pro	79.6	68.1	51.9	61.1	65.2	17.9
Gaba	0.3	2.6	3.8	2.5	2.3	63.4
Cys	---	---	1.6	3.3		
Hyp	---	---	0.3	0.3		
Asx	1.5	3.3	3.1	3.2	2.8	30.7
Met	0.7	1.6	4.5	3.4	2.6	67.3
Glx	1.2	1.9	2.7	2.3	2.0	31.5
Phe	0.6	2.0	1.5	1.2	1.4	52.6
Orn	---	---	5.7	---		
Lys	---	1.1	1.8	1.2		
Tyr	---	---	3.1	---		

Da apreciação da Tabela 29 e da Figura 74 onde se resumem as médias dos valores interanuais para cada variedade de vinho analisado, verifica-se que, apesar das diferenças entre os anos e entre as variedades, os vinhos não apresentam entre si variações

muito significativas. Alguns possuem aminoácidos não existentes nos restantes, tal como a lisina nos vinhos Trincadeira, Aragonez e Moreto, tirosina no vinho Aragonez e cisteína e hidroxiprolina nos vinhos Aragonez e Moreto, bem como o ácido  $\gamma$ -aminobutírico no vinho da casta Periquita se bem que neste caso apenas nos anos de 1977 e 1978. Estes aminoácidos, podem eventualmente ser considerados característicos das castas em questão se se considerar que não variaram as condições do solo e as variações climáticas são as mesmas para cada vinho em cada ano.

Em nenhum dos vinhos tintos estudados se detectou arginina. A arginina é um aminoácido que tem sido considerado como, a seguir à prolina, sendo dos mais significativos<sup>142</sup> na uva. A arginina contudo pode, ou ter sido consumida durante a fermentação maloláctica já que algumas espécies de bactérias lácticas a consomem, ou pode encontrar-se á vindima já em concentrações baixas, já que o seu teor decresce nos últimos estados da maturação, e acabar por ser totalmente consumida pelas leveduras. A excreção deste aminoácido não foi detectada em nenhuma das espécies regionais de leveduras ensaiadas.

A prolina é o aminoácido mais significativo seguida de alanina na maioria dos vinhos tintos estudados. Como excepção bastante gritante pode-se referir o vinho Aragonez de 1982 que apresenta um teor de alanina demasiado baixo o qual supomos se deve a problemas de integração. O vinho Aragonez possui uma cor forte com uma percentagem de bagaço da ordem dos 20-24% maior no ano de 1982 - 24.7%. A cromatografia de gás dos aminoácidos deste vinho apresentou sempre grande depósito de involáteis no injector (Figura 72) como se pode verificar pela sujidade depositada no "insert" entre cada amostra. As dificuldades de cromatografar sem alargamento da banda na altura da injeção eram evidentes por haver adsorções grandes no insert. Este depósito de involáteis revelava-se no arrastamento do pico de solvente com conseqüente má integração dos aminoácidos mais voláteis (Figura 73), normalmente eluídos perto da cauda do solvente. O baixo valor de alanina neste vinho é fundamentalmente devido a dificuldades surgidas na quantificação.

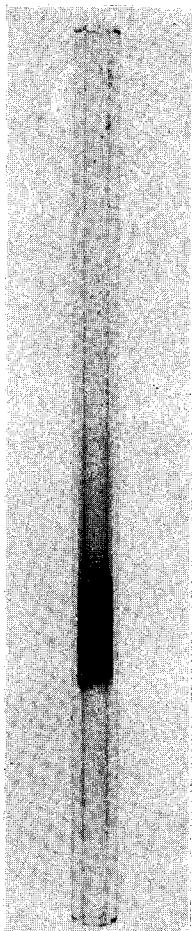


Figura 72: Depósito de involáteis depositada num "insert" de vidro após duas análises de um vinho Aragonéz

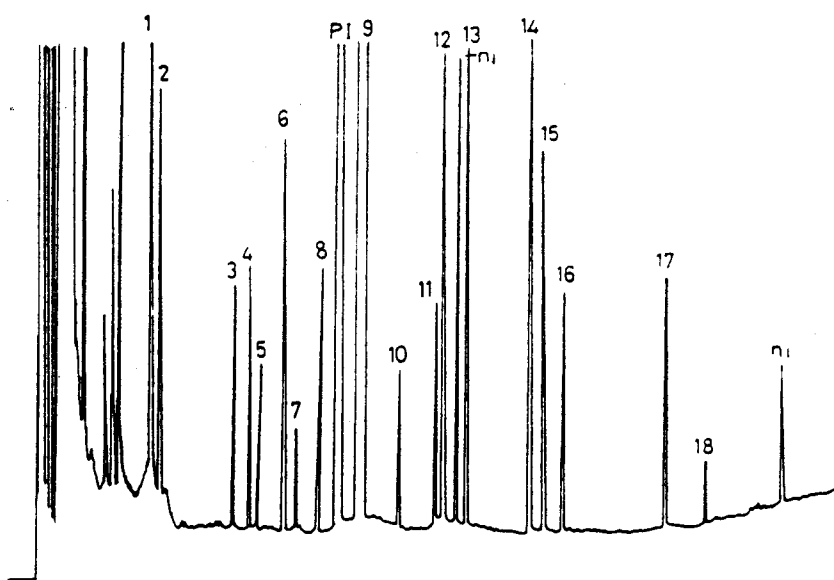


Figura 73: Cromatograma de um vinho Aragonéz do ano de 1982. 1-alanina; 2-glicina; 3-valina; 4-treonina; 5-serina; 6-leucina; 7-isoleucina; 8- $\gamma$ -aminobutírico; PI-ciclo-leucina; 9-prolina; 10-cisteína; 11-hidroxi-prolina; 12-aspartico/asparagina; 13-metionina; 14-fenilalanina; 15-glutâmico/glutamina; 16-ornitina; 17-lisina; 18-tirosina.



Os restantes aminoácidos apresentam concentrações de algum modo semelhantes situando-se em média entre os 2.7 - 1.4%.

Os teores determinados para a hidroxiprolina são, de uma forma geral, irregulares variando entre um máximo de 1.2 para o vinho Trincadeira de 1981 a 0 para a maioria dos restantes, apresentando um valor médio de 0.4. O valor baixo observado leva a considerar de acordo com outros autores, a sua absorção pelas partes sólidas, durante a fermentação que decorre com maceração<sup>193</sup>.

Os valores encontrados para a cisteína apresentam também variações significativas. A cisteína é um aminoácido muito sujeito a alterações após derivatização e consideramos que o erro do método não permite que se tirem conclusões concretas acerca da variação anual e intervarietal.

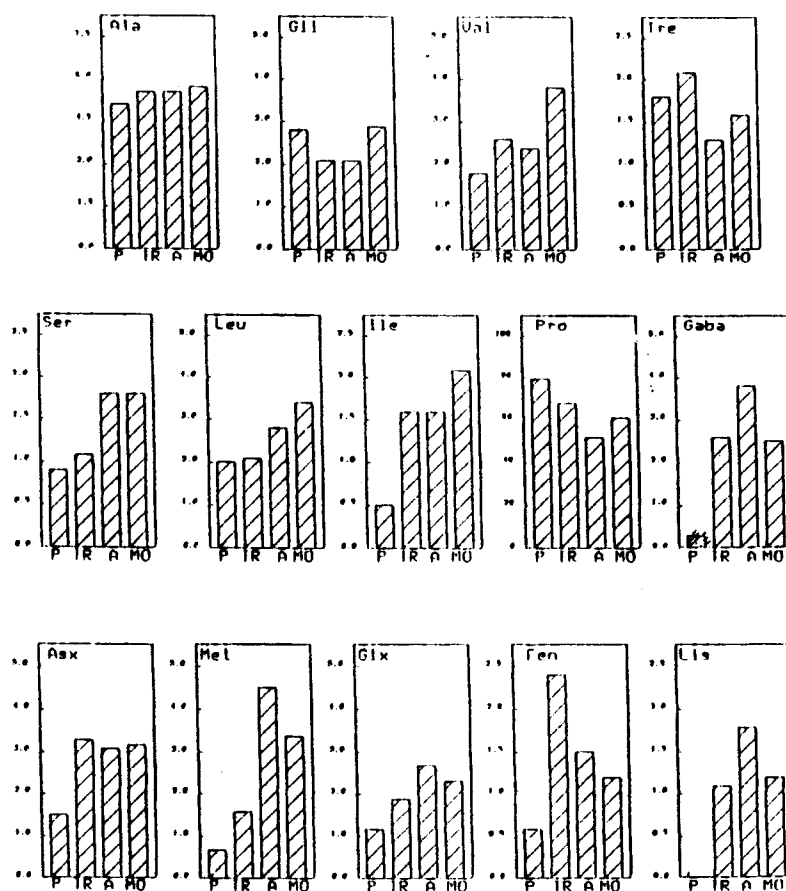


Figura 74: Médias em percentagem das concentrações relativas de aminoácidos dos vinhos tintos estudados durante os anos de estudo (1977-1983);

### 6.3.2 - Vinhos Brancos

Os resultados obtidos para cada um dos vinhos brancos durante os sete anos de estudo, demonstram claramente haver diferenças significativas entre os vinhos nos vários anos (Tabela 22-25 Anexo I).

Alguns vinhos apresentam aminoácidos que em alguns casos não se encontram presentes nos restantes (Tabela 30). Na casta Roupeiro por exemplo, (Tabela 22 Anexo I) alguns aminoácidos parecem aumentar com o tempo de armazenamento em garrafa, tal como histidina, arginina e isoleucina, enquanto que outros contrariamente diminuem percentualmente com o tempo de armazenamento, tais diferenças não se observam contudo para todos os tipos de vinhos, o que faz supor que a variedade, ou seja o substracto, é determinante para as alterações que se produzem durante o envelhecimento dos vinhos no que respeita a teores de aminoácidos. O tempo de armazenamento tem influencia nos teores de aminoácidos<sup>194, 195</sup> nomeadamente durante o armazenamento em casco<sup>195</sup>. O armazenamento em garrafa, caracterizado por fenómenos de redução, já que se não houver defeito nas rolhas o papel do oxigéneo é quase nulo, é responsável por fenómenos químicos de esterficação que obrigatoriamente influenciam as características do vinho. A influência do modo de armazenamento nos teores em aminoácidos tem sido referida nos vinhos conservados em madeira bem como nos vinhos espumantes referida<sup>196, 197</sup>. Igualmente, os vinhos armazenados em garrafa podem sofrer uma alteração dos teores em aminoácidos a qual poderá ser característica do tipo de vinho, bem como do tempo de conservação em garrafa. No vinho Roupeiro em que a colheita de 1983 foi analisada logo após a obtenção do vinho, os valores médios para os seis anos são iguais aos valores obtidos para o ano de 1983. Esta casta foi a primeira casta a ser analisada, e por isso foi a única em que o vinho de 1983 foi analisado logo após o engarrafamento ( data de engarrafamento: Novembro 1983; data de análise: Fevereiro de 1984) fazendo pois supor que há alterações com o armazenamento.

No vinho da variedade Rabo de Ovelha foram detectados alguns aminoácidos presentes exclusivamente em alguns anos deste vinho

TABELA 30 - Concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos Brancos nos vários anos de estudo

ANO	1977			1978			1979			1980			1981			1982			1983			
	AA	Var.	R	O	T	M	R	O	T	M	R	O	T	M	R	O	T	M	R	O	T	M
Ala	5.6	7.0	14.5	5.5	8.2	6.9	6.5	14.5	10.3	5.0	8.2	7.2	12.5	12.0	7.9	7.2	7.4	7.7	8.5	6.3	10.9	6.9
Gly	3.8	4.6	7.9	2.6	2.7	2.5	3.8	7.9	6.1	4.4	4.6	3.7	5.6	7.5	7.9	3.7	6.0	5.7	9.2	3.9	8.6	4.8
Val	2.3	4.5	3.5	3.0	4.7	4.7	2.3	3.5	4.6	4.2	6.3	1.4	9.7	6.7	7.8	1.4	2.0	2.2	4.1	2.7	5.9	3.1
Thr	2.8	3.7	5.6	2.6	2.6	2.0	2.8	5.6	4.8	4.6	3.6	2.2	1.3	1.5	5.4	2.2	4.0	2.8	4.9	3.0	4.2	3.5
Ser	3.8	4.2	6.1	3.6	3.0	0.7	4.0	6.1	7.5	6.2	4.5	4.2	2.5	2.4	7.2	4.2	6.0	6.5	10.7	4.6	4.6	6.3
Leu	5.1	6.1	8.4	4.2	5.7	5.9	7.8	8.4	8.6	10.3	7.1	5.5	9.4	12.6	9.5	5.5	7.0	5.2	7.4	7.4	8.1	7.8
Ile	5.1	1.2	1.7	2.0	2.7	2.8	0.2	1.7	3.1	3.1	3.5	1.2	3.7	1.2	3.7	4.5	1.6	3.5	1.7	3.9	1.7	3.9
Gaba	0.4	0.9	3.8	3.8	2.2	2.3	0.2	2.3	2.2	2.2	2.2	1.5	3.4	1.5	3.4	1.5	1.5	3.6	3.6	3.6	3.6	3.3
Pro	51.2	43.5	18.2	42.1	36.8	31.2	32.5	18.2	5.0	28.3	28.6	47.7	31.3	36.0	2.4	47.7	29.0	30.0	1.9	39.8	14.9	31.5
Cys	1.5	5.0	3.0	4.3	2.6	3.0	0.8	3.0	5.3	2.4	4.3	7.3	4.1	0.4	5.2	7.3	4.2	3.0	3.6	3.8	4.8	3.1
Asx	7.5	5.6	6.1	4.1	5.5	0.8	7.6	6.1	8.5	9.5	6.7	4.1	5.6	6.0	5.6	4.1	5.7	4.7	6.9	7.5	6.7	6.5
Hyp	1.9	0.8	1.5	1.6	0.4	0.3	2.0	1.5	2.4	2.2	0.9	1.8	0.8	1.8	15.2	1.8	1.1	2.6	3.4	1.9	2.3	1.0
Met	2.8	0.9	2.6	2.9	1.6	3.1	1.1	2.6	3.6	2.2	1.6	1.0	1.5	0.9	3.1	1.0	2.1	4.1	5.9	1.7	3.7	4.1
Glx	5.9	5.0	2.9	4.6	3.3	3.5	4.8	2.9	5.5	9.7	5.9	6.2	5.9	1.7	5.7	6.2	6.4	3.0	5.1	6.6	4.4	6.1
Phe	3.1	3.6	3.2	2.2	2.1	2.7	4.0	3.2	4.1	6.8	3.5	2.3	4.4	7.2	5.0	2.3	5.6	2.2	4.6	4.2	4.1	3.9
Lys	5.1	4.0	3.9	3.1	5.0	0.6	4.8	3.9	7.5	0.5	5.9	2.4	10.9	2.3	2.4	8.7	13.8	5.7	3.8	3.8	6.0	5.9
Tyr	3.5	4.2	3.5	4.2	0.4	15.8	1.3	3.5	8.6	1.1	1.1	1.2	2.3	1.5	1.2	1.8	6.9	1.8	6.9	1.8	6.9	9.0
His	0.5	0.5	0.5	0.5	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Arg	0.6	0.6	0.6	0.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Orn	2.4	2.4	2.4	2.4	11.1	8.2	8.2	1.1	1.1	1.1	1.1	0.7	0.7	6.9	0.7	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
α-Abu	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sar	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6

(Tabela 23 Anexo I). Estes aminoácidos, sarcosina, e  $\alpha$ -aminobutírico não são normalmente referidos como estando presentes em vinhos e a sua influência nas características organolépticas destes vinhos é pois de considerar tanto mais que nestes dois anos (Tabela 14 Anexo I) a classificação à prova destes vinhos foi excepcional respectivamente 16.6 e 15.8, contrariamente aos outros dois anos que tiveram uma prova classificada com R e 10.4. Embora sem poder afirmar com segurança, é de supor que os teores de sarcosina e  $\alpha$ -aminobutírico em 1977 e 1982, e de histidina em 1978 e 1981, tenham algo a "dizer" no que diz respeito às alterações das características organolépticas verificadas. A histidina pertence ao grupo dos aminoácidos amargos (Quadro V).

Tabela 31

Média das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos Brancos elementares nos vários anos de estudo

AA	Roupeiro	Rabo de Ovelha	Manteúdo	Tamarez	X	DP%
Ala	6.3	8.8	7.7	10.7	8.4	22.2
Gly	3.9	4.7	5.5	6.9	5.3	24.3
Val	2.7	5.2	4.6	4.9	4.4	25.9
Tre	3.1	2.9	3.9	3.5	3.4	13.2
Ser	4.6	3.9	6.0	4.8	4.8	18.1
Leu	7.4	7.1	7.2	8.3	7.5	7.3
Pro	39.8	35.2	19.0	25.9	30.0	31.1
Cys	3.8	3.9	4.1	3.1	3.7	11.7
Asp	7.3	5.6	5.4	6.0	6.1	14.1
Hyp	1.9	0.8	1.7*	1.8	1.6	32.7
Met	1.7	1.5	3.8	3.5	2.6	45.4
Glu	6.6	5.2	5.1	3.6	5.1	23.9
Phe	4.2	3.9	3.8	4.0	4.0	4.3
Lys	3.8	7.2	4.2	7.4**	5.7	33.9
Tyr	---	---	7.7	---	---	---
Ile	---	---	3.2	1.9	---	---
Gaba	---	---	3.8	---	---	---
Sar	---	---	---	---	---	---
Abu	---	---	---	---	---	---

\* excluindo o ano de 1981 - hyp-15.2; x- 4.0

\*\* média de três anos

A seguir à prolina a alanina e a leucina são os aminoácidos com teores mais elevados (Tabela 30 e 31), se bem que as diferenças não sejam tão evidentes como no caso dos vinhos tintos. Nas castas brancas apenas se detectou arginina em dois vinhos da

casta Roupeiro e atribui-se ao tempo em garrafa (Tabela 30). Excepção a esta regra apresenta contudo o vinho Manteúdo que apresenta teores de prolina, em três anos, demasiado baixos (Tabela 30 e Figura 75).

Os níveis de prolina estão normalmente relacionados com os teores em azoto total dos vinhos<sup>152</sup>. As quebras no valor de prolina, um aminoácido que geralmente não é consumido pela levedura, pode ser devido a um abaixamento do total de azoto. Os aminoácidos livres contribuem para uma larga proporção do azoto total em vinhos com baixa quantidade de N total, se bem que contribuam em proporções menores em vinhos com grande quantidade de N total<sup>174</sup>. A levedura geralmente não utiliza prolina para o seu metabolismo. Em condições de falta de azoto, e essas condições geralmente verificam-se quando o teor em prolina é baixo, a levedura pode eventualmente utilizar prolina e consumi-la.

Nos anos em que os teores em prolina são tão baixos, pode ter ocorrido uma ou as duas seguintes condições, ou o teor em prolina é baixo porque é baixo o teor de azoto, ou a levedura consumiu prolina (porque estava em condições de falta de azoto).

O facto do teor em azoto neste anos ser baixo, é facilmente verificado tomando em consideração os teores absolutos em aminoácidos livres, para os vários anos (Tabela 32). Os aminoácidos livres correspondem a cerca de 70-90% do N total<sup>152</sup>.

Tabela 32  
Concentração total dos aminoácidos do vinho Manteúdo expressos em mg/l, ao longo dos anos em que decorreu o estudo (1977-1983)

1977	1978	1979	1981	1982	1983
1976.2	4364.0	760.0	1016.8	447.0	2029.2

O teor de aminoácidos livres totais, e elevado nos anos em que a prolina tem os teores mais baixos (Tabela 30 e Tabela 24 Anexo I) o que está de acordo com a noção de que a quantidade de prolina está relacionada com o total de azoto<sup>174</sup>.

Os valores baixos de prolina não estão, neste vinho, direc-

tamente relacionados com valores mais elevados para os restantes aminoácidos, o que vem reforçar a ideia de ser mais baixo o teor em azoto total.

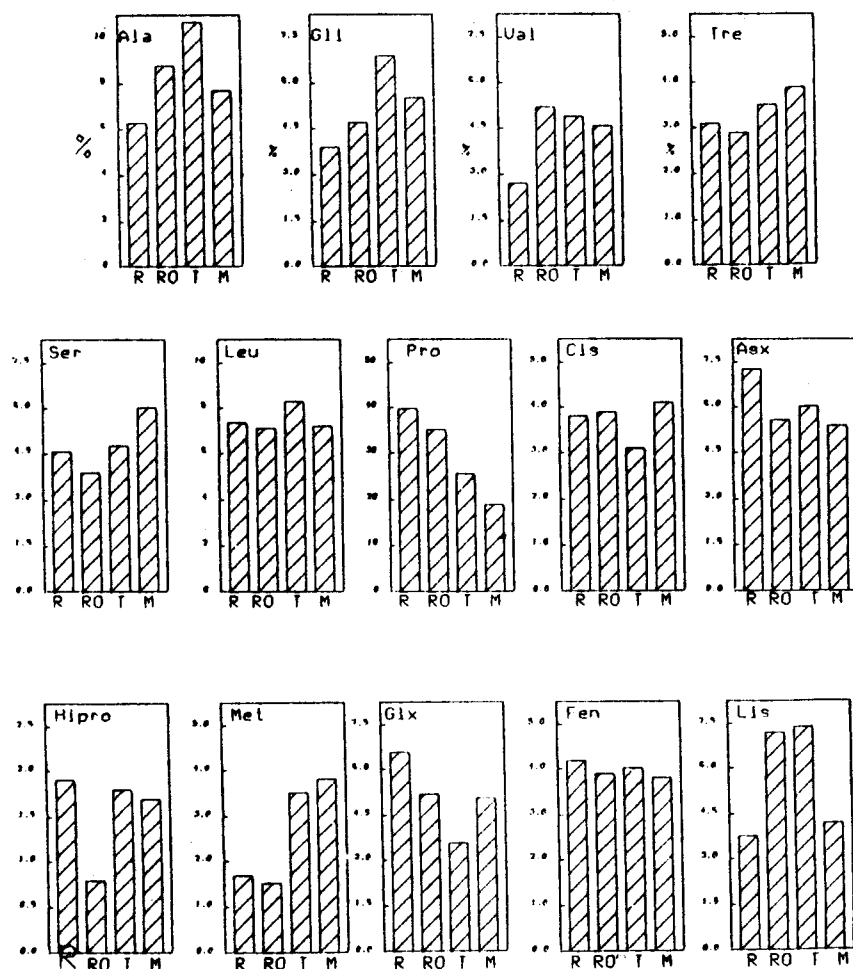


Figura 75: Médias das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos brancos elementares durante os anos de estudo (1977-1983).

O vinho da casta Tamarez parece ser o menos afectado pelas variações climáticas anuais, pois os teores em aminoácidos não apresentam variações significativas de ano para ano. Há contudo um aumento excessivo dos teores de lisina no ano de 1982 e o aparecimento de ornitina no ano de 1980. A presença deste aminoácido neste ano considerado mau do ponto de vista climático vem reforçar a ideia já exposta de este aminoácido poder ser considerado como estabilizante da actividade biológica dos vinhos<sup>154</sup>,

podendo pois resultar da resposta de levedura num ano em que as condições do meio não foram favoráveis.

### 6:3:3 - Análise comparativa entre vinhos brancos e vinhos tintos

Os teores de prolina são mais elevados nos vinhos tintos do que nos vinhos brancos (Tabela 33 e Figura 76). O tipo de fermentação está relacionada com estas diferenças. Nos vinhos brancos a fermentação decorre de "bica aberta" e nos vinhos tintos de "curtimenta". O maior tempo de contacto do mosto com as partes sólidas nomeadamente pelas grainhas e polpa explica os teores mais elevados de prolina por haver uma maior extracção para o mosto/vinho<sup>175</sup>. Nos vinhos brancos há uma presença constante de hidroxiprolina o que leva a supor o contrário, ou seja, a hidroxiprolina é adsorvida pelas partes sólidas e por tal, ela tem maior concentração quanto menor é o tempo de contacto do vinho com elas<sup>193</sup>.

O vinho tinto apresenta sempre quantidades mais ou menos elevadas de ácido  $\gamma$ -aminobutírico bem como de isoleucina, enquanto que nos vinhos brancos estes aminoácidos se encontram geralmente ausentes (Tabela 33 e Figura 76).

Em termos de apreciação global, os vinhos brancos, apresentam concentrações de aminoácidos em percentagens bastante mais elevadas estando, por exemplo, os valores de alanina, glicina, leucina aspártico ou asparagina e lisina compreendidos entre 5 e 9% (são estes os mais elevados) seguidos dos restantes em percentagens da ordem dos 3,5%, à excepção da hidroxiprolina a qual se encontra na concentração mais baixa, cerca de 1,8%. Nos vinhos tintos apenas a alanina se encontra em concentração relativamente elevada, cerca de 5,5%, enquanto que os restantes aminoácidos estão presentes em concentrações que variam apenas entre os 1-3%.

As variações de concentrações entre vinhos brancos e tintos devem ser atribuídas, em larga escala ao tipo de fermentação, já que para alguns aminoácidos o tempo de maceração é determinante para o seu valor final no vinho<sup>198, 173</sup>.

Tabela 33

Resultados comparativos das médias das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos brancos e dos vinhos Tintos durante os anos de estudo (1977-1983)

Comparação de Médias globais Brancos/Tintos		
AA	Brancos	Tintos
Ala	8.4	5.5
Gly	6.9	2.5
Val	4.9	2.7
Tre	3.5	1.7
Ser	4.8	1.4
Leu	8.3	2.6
Pro	25.9	65.2
Cys	3.1	---**
Asp	6.0	2.8
Hyp	1.8	---**
Met	3.5	2.6
Glu	3.6	2.0
Phe	4.0	1.4
Lys	5.7	1.3*
Ile	---	2.1
Gaba	---	2.5

\*\* apenas nos vinhos Aragonéz e Moreto

\* excluindo o vinho Periquita

As diferenças dos teores de aminoácidos entre vinhos brancos e tintos é conclusivo para distinguir entre estes dois vinhos. Entre vinhos diferentes brancos ou tintos, o caso, à luz apenas deste resultados, deve ser apreciado de outro modo. O clima tem influência, como se pode apreciar pelas variações anuais para cada uma das variedades, mas principalmente a região é determinante.

Em termos de análise visual directa (Tabelas 29 e 31 e Figura 74 e 75) podemos apenas concluir que o solo (região) influencia grandemente os teores de aminoácidos presentes nos vinhos atenuando as diferenças atribuíveis quer à variedade quer ao clima; Os resultados obtidos permitem concluir (Tabela 28 e 30) não ser possível estabelecer diferenças entre os teores de aminoácidos das várias variedades estudadas, visto que, quando se comparam os valores dos diferentes vinhos nos mesmos anos, varia a variedade mas mantem-se o clima, a importância da varie-



dade parece vir atenuada , por outro, lado quando se comparam as médias finais globais, ou seja a média de todos os anos de cada variedade, caso em que a influencia do clima se dilui, parece nestas condições que será o solo que terá maior influência diluindo-se outra vez a importância do património genético da casta.

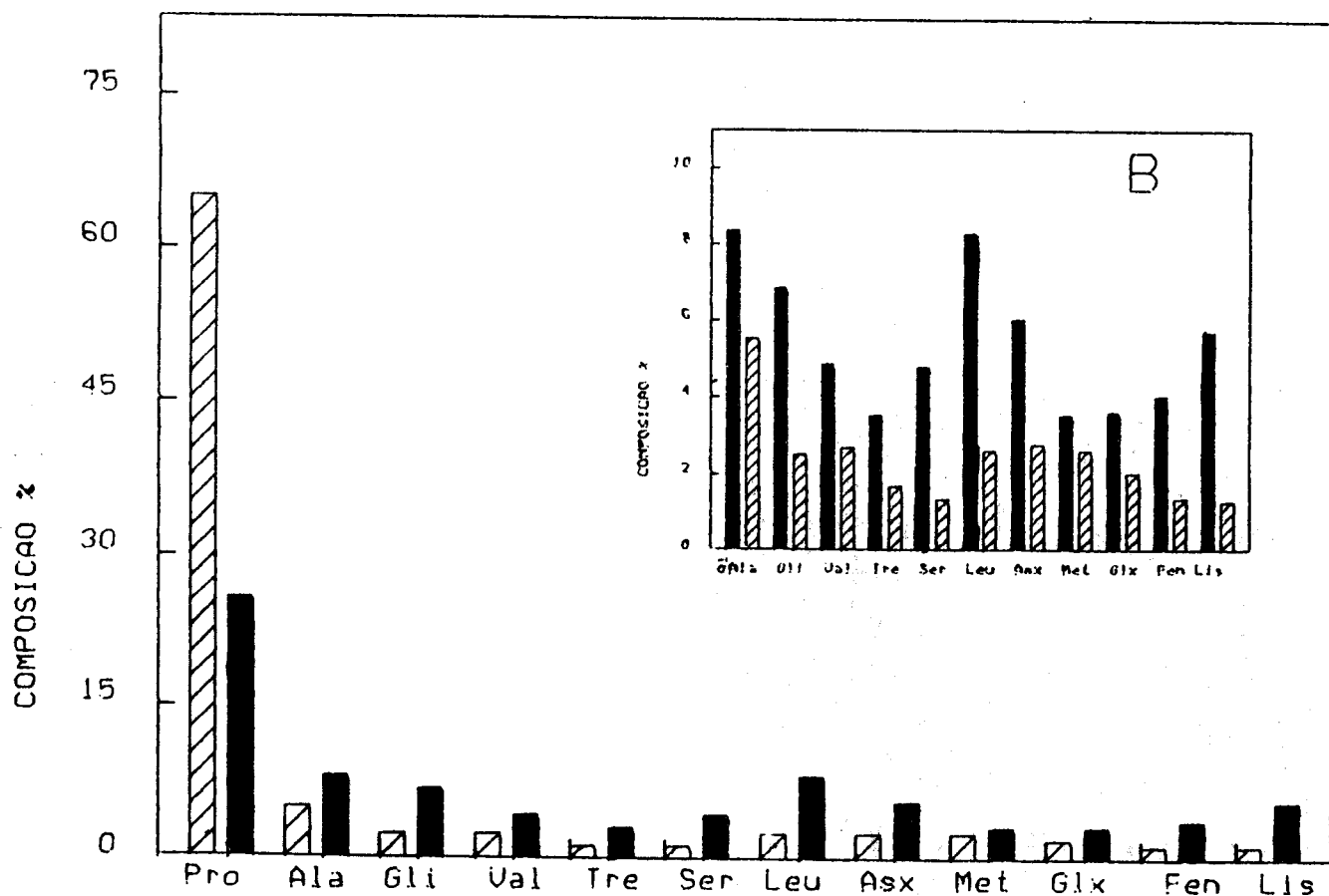


Figura 76: Comparação das médias das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos brancos e tintos durante os anos de estudo (1977-1983). B-médias sem os resultados obtidos para a prolina.

Como seria de esperar, num meio metabólico rico e activo como é o vinho, o meio exerce influencia significativa. É de considerar que o substracto, neste caso não só a casta de origem como o vinho acabado, tenham influencia decisiva na caracterização do produto final. As tendências gerais de padrões de cada

um dos vinhos quer brancos quer tintos, mantem-se em todos os anos para todas as varieades, para se encontrar o padrão caracterizante bem como as variáveis discriminantes susceptíveis de permitir a identificação dos vários vinhos, diferenciando-os, a análise de perfil computurizada é uma ajuda indispensável , senão o único meio possível.

## 7 - MÉTODOS DE ANÁLISE DE PERFIL

Na apresentação dos resultados dos aminoácidos livres dos vários vinhos analisados, apenas se pode concluir haver variações significativas entre os teores de aminoácidos dos vinhos brancos e tintos, mas a identificação dos vários tipos de vinhos não é conseguida de forma directa. A observação dos resultados (Tabelas 29 e 31) demonstra claramente que a variação do desvio padrão das médias intervarietais, é menor do que a variação do desvio padrão na mesma variedade interanualmente (Tabela 18-25 Anexo I). A constatação destes resultados não é contudo de admirar já que os métodos clássicos de análise estatística não se adaptam geralmente a casos em que se possuem amostras aleatórias, caso dos vinhos, em que o número de amostras seria reduzido para ser representativo e poder portanto ser analisado com base nos métodos de estatística clássica. Os métodos clássicos possuem ainda um grave problema que é o facto de não ser possível tratar de forma adequada o problema dos valores em defeito ("missing values") os quais são geralmente de prever que apareçam quando as amostras envolvem parâmetros incontroláveis como são por exemplo o clima, o solo e suas interacções com o património genético das castas de vinho, bem como a acção conjunta destes parâmetros nos processos fermentativos que levam à obtenção do vinho.

A necessidade de encontrar parâmetros susceptíveis de definir perfis característicos em amostras com as características referidas fez nascer uma nova ciência, a quimiometria, a qual pode ser definida como a "disciplina química que usa a matemática, a estatística e outros métodos da lógica formal para desenhar ou seleccionar dados óptimos maximizando assim a informação química obtida através pelos processos analíticos"<sup>199</sup>.

A finalidade dos métodos geralmente conhecidos como de análise de perfil, reside na tentativa de encontrar e identificar padrões nos dados experimentais obtidos por uma qualquer análise e, ao mesmo tempo, tirar conclusões inteligentes desses mesmos dados<sup>200</sup>.

O primeiro aspecto a ter em conta é a necessidade de se conhecer inteiramente o problema que se pretende resolver, bem

como o fim que se tem em vista com a análise que se vai efectuar.

Na obtenção orientada para tratamento por computador cada dado obtido é considerado como uma variável, matematicamente cada variável pode ser considerada como uma dimensão no espaço. A maioria dos problemas lidam com várias variáveis, produzindo uma análise multivariada, num espaço a  $n$  dimensões e, é nestes casos, os mais comuns, que o computador se torna um instrumento imprescindível já que a dificuldade em visualizar num espaço com mais de três dimensões é bem conhecida.

A análise de perfil baseia-se pois na assumption de que existe um padrão nos dados a examinar. A aplicação de técnicas de análise de padrão vai, não só ajudar a reconhecer esse padrão, como ainda determinar quais as variáveis mais críticas para a compreensão do problema.

Em análise de perfil, pode-se considerar um objecto, que não é mais do que uma lista de parâmetros caracterizantes, os quais são normalmente conhecidos como vectores de dados para o objecto em questão. Cada parâmetro é chamado uma variável. Os objectos podem ser agrupados de acordo com critérios definidos e agrupados em categorias ou grupos. Nos casos em que as categorias são conhecidas lidamos com problemas de "técnica supervisionada"; quando a finalidade da análise é, pelo contrário definir os agrupamentos, lidamos com a chamada "técnica não supervisionada".

Quer se esteja a lidar com análise supervisionada ou não supervisionada, é sempre necessário levar a cabo análises preliminares as quais estão incluídas na chamada "fase de treino". Esta fase preliminar pode anteceder as duas técnicas já referidas, p.e. para averiguar dentro de um objecto que possui duas categorias o que determina a separação ou o agrupamento nessa categoria aplicar-se-iam técnicas supervisionadas, se pelo contrário se quizer saber se existem outros agrupamentos dentro dos já existentes, utilizar-se-iam técnicas não supervisionadas. Quando se quer verificar se novos objectos entram dentro das categorias ou agrupamentos existentes, consideram-se esses novos objectos como um "set de teste" e faz-se a chamada "fase de teste".

Após recolha dos dados é necessário torná-los compatíveis com o computador, ou seja, têm de se tornar compreensíveis para serem lidos pelos programas a utilizar.

Muitas das técnicas de estatística utilizadas pelos computadores em análise de padrão são afectadas pelos níveis de medida utilizadas na recolha dos dados. As análises estatísticas utilizadas pressupõe por vezes que o tipo de distribuição das variáveis é conhecido e, mais ainda, pressupõe que as variáveis apresentam uma distribuição normal, são as análises paramétricas. Nos casos em que os dados não seguem uma distribuição normal ou, não são representativos de uma população finita, deve-se considerar o uso de técnicas não paramétricas, em que os dados da análise não seguem as regras matemáticas normais. A definição deste passo deve ser tomada com cuidado já que o computador não o considera por si só, é tarefa exclusiva do operador.

### **7.1 - Exame preliminar dos dados**

Neste passo determina-se qual a distribuição característica das variáveis obtidas. As características das variáveis são analisadas para determinação da sua simetria e avaliação da validade ou não de se considerar uma distribuição normal dos dados - avaliar se se usarão métodos paramétricos ou não paramétricos;

#### **7.1.1 - Apresentação dos dados na forma de serem lidos pelo computador**

Este passo diz respeito apenas ao aspecto gráfico que os dados devem obedecer de modo a poderem ser correctamente interpretados e lidos pelo computador, e depende de algum modo da forma como o computador faz a leitura dos dados. De uma forma geral pode-se considerar que as variáveis serão colocada em colunas e os objectos em filas (dependendo sempre do programa). A ter em conta é a questão dos "valores em defeito" caso em que é necessário determinar se o computador reconhece espaços em branco p.e. ou se os valores que faltam têm que ser omitidos ou codifi-

dados de forma a serem interpretados.

### 7.1.2.- Distribuição das variáveis

O passo que se segue é a verificação do tipo de distribuição das variáveis, se elas seguem ou não uma distribuição normal (Figura 77) - tipo curva de Gauss - ou se, contrariamente seguem outro tipo de distribuição.

A maioria dos dados seguem uma distribuição normal, no entanto, é necessário avaliar o tipo de distribuição. Esta fase de avaliação do tipo de distribuição é feita, normalmente, recorrendo à determinação de alguns parâmetros que dão ideia da forma da curva de distribuição e, implicitamente do tipo de distribuição.

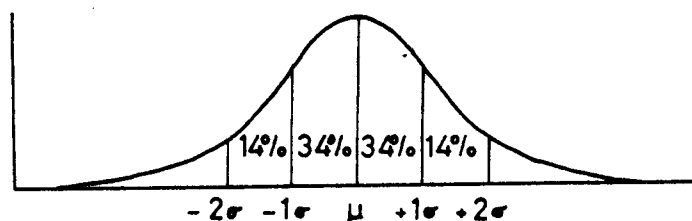


Figura 77 : Exemplo de uma curva correspondente a uma população com uma distribuição normal

Os parâmetros geralmente utilizados são, o desvio padrão, a média, a variância e os coeficientes de "Skewness" e de "Kurtosis". O coeficiente de "Skewness" mede a forma da distribuição ou da curva. Para uma curva de Gauss o coef. de "Skewness" terá um valor de 0. Valores positivos indicam que a curva tem mais pontos para a esquerda do valor médio, e valores negativos o contrário. O coeficiente de "Kurtosis" dá ideia da largura do pico ou da curva, uma curva do tipo "Gauss" terá valor de três, valores mais elevados indicam curvas mais estreitas e mais agudas.

Quando os valores de "skewness" e de "kurtosis" são divididos pelo erro padrão, obtêm-se os chamados testes para a normalidade.

Feita a análise preliminar dos dados, cujo objectivo fundamental é "simplificar" o problema para que o segundo passo seja

também simplificado, faz-se a análise pròprimente dita. A análise pode utilizar "técnicas supervisionadas" ou "não supervisionadas" consoante se saiba o tipo de agrupamento que se pretende obter, ou seja, a classificação dos objectos, ou se pretenda saber essa mesma classificação, avaliando as medidas de similaridade entre os objectos. As medidas de similaridade são utilizadas na definição dos agrupamentos ("clusters"). O agrupamento pode ser definido como um grupo de pontos no espaço a três dimensões, que reflecte a possível existência de correlações de interesse entre as amostras.

### **7:1:3 - Técnica supervisionadas**

Uma das exigências, quando se trabalha no espaço a  $n$ - dimensões, cuja visualização não é possível, e cuja representação gráfica também não, é reduzir as variáveis de modo a torná-las representadas no espaço do papel, um espaço a duas dimensões.

A análise do "componente principal" é uma das técnicas que pode ser utilizada para redução de dados, ou ainda como análise em técnica "supervisionada".

A análise do "componente principal" pode ter como objectivo eliminar informação redundante obtendo um número pequeno de variáveis "úteis", que torne possível a aplicação de outro método de análise de padrão, ou ainda obter um conjunto de variáveis não correlacionadas que representem a estrutura inicial de uma forma óptima.

O primeiro passo da análise de "componente principal" é escolher as variáveis que se irão utilizar e determinar as medidas de associação entre elas; A primeira associação deve conter a máxima variância presente na amostra. Obtem-se informação acerca de quais as variáveis responsáveis pela variação e, ao mesmo tempo, reduzem-se as variáveis obtendo as mais características.

### **7:1:4 - Técnicas não supervisionadas**

Tendo todos os dados referentes a uma determinada amostra,

muitas vezes o que se pretende é estudar, simultaneamente, todos esses dados de modo a obter agrupamentos entre eles.

#### **7:1:4.1 - Análise de agrupamento**

Os estudos referentes à regularidade entre os objectos são muitas vezes referidos como análise de agrupamento. Basicamente, se se considerar que os dados consistem em duas variáveis apenas, pode-se facilmente visualizar ou mesmo representar graficamente, usando o eixo dos  $X$  para uma das variáveis, e o eixo dos  $y$  para a segunda variável. São então graficamente representados os pontos, que serão tantos quantos os objectos para os quais essas duas variáveis foram medidas. Mentalmente ou mesmo por análise da representação gráfica, determinam-se as medidas de similaridade e os grupos.

Quando se têm mais variáveis, a questão principal é determinar as medidas de similaridade. Normalmente utiliza-se a distância "Euclideana". Neste caso os pontos (objectos) mais perto (que têm entre si medidas mais pequenas) são considerados como um grupo, ou "cluster". O número de grupos é mais ou menos arbitrário.

Se se considerarem  $n$  variáveis medidas para  $m$  objectos, pode-se representar como  $m$  pontos num espaço a  $n$ -dimensões. Se bem que este espaço não possa ser manualmente representado as noções de medida e distância são válidas como medidas de semelhança e de aproximação. É aconselhável a aplicação de técnicas não supervisionadas como forma de determinar os grupos existentes neste espaço  $n$ -dimensional.

#### **7:1:4.1:1 - Árvores de expansão mínima**

Neste caso os dados são considerados como  $m$  pontos num espaço a  $n$  dimensões. As noções de proximidade e similaridade são necessárias e normalmente é usada a distância Euclideana. As medidas entre um ponto e todos os outros são determinadas e a árvore é traçada ligando entre si os vários pontos começando pelos mais próximos e desprezando aqueles que obrigam a linha a formar um círculo, ou seja não se passa por nenhum ponto duas vezes.



Sendo as distâncias entre os pontos medidas de similaridade entre os mesmos, os grupos podem ser definidos. O número de agrupamentos é estabelecido arbitrariamente pelo utilizador consoante o tipo de análise que se propõe fazer.

Não sendo o critério de agrupamento definido pode-se considerar a existência de dois casos extremos, um em que cada caso é um agrupamento, e outro em que todos os casos estão no mesmo agrupamento. A solução intermédia, seja qual for o critério a que obedeça, é sempre mais razoável.

É sempre aconselhável experimentar vários critérios de agrupamento experimentando "podar" a árvore em pontos diferentes e avaliando os resultados obtidos caso a caso.

Muitas vezes a "árvore" é utilizada para definir tendências. O método de agrupamento hierárquico usa-se então para definir realmente os grupos, respondendo às questões sobre o tipo de agrupamento de um modo definitivo.

#### **7:1:4:1:2:- Agrupamento hierárquico**

Este método, necessita igualmente que se avaliem as distâncias entre os pontos, de modo a definir a similaridade; este passo é feito da mesma forma que na análise de árvore de expansão mínima.

Basicamente o agrupamento hierárquico difere da árvore de expansão mínima na forma de representação gráfica no espaço a duas dimensões. Os pontos e as suas distâncias vão sendo calculados e a representação gráfica termina quando todos os pontos estão agrupados.

A representação final, normalmente conhecida por dendograma, e que fornece um gráfico semelhante ao representado na Figura 78, pode ser obtida seguindo o processo aglomerativo, ou o divisivo. O método aglomerativo começa por considerar cada caso um único grupo e aumenta, a partir daí, o número de casos em cada grupo. No método divisivo, os dados iniciais são divididos em dois grandes grupos os quais se vão subdividindo até se ter cada caso isolado.

O dendograma obtido (Figura 78) apresenta na horizontal as medidas de similaridade, sendo o valor de 1.0 representativo da identidade dos padrões; À medida que se caminha para a direita a similaridade vai diminuindo. As linhas verticais indicam que dois "clusters" estão a ser agrupados com a semelhança indicada pela linha horizontal. Os padrões são indicados na linha vertical da esquerda. Padrões próximos indicam pontos semelhantes. Esta forma de representação gráfica tem ainda alguns inconvenientes, nomeadamente o facto de cada ponto só poder ter dois vizinhos, o que no espaço a  $n$ - dimensões pode não se verificar. Este critério é necessário na representação bidimensional. Contrariamente a representação utilizada no método da árvore de expansão mínima dá geralmente uma ideia mais real se bem que, por outro lado, não mostre similaridades ou distâncias.

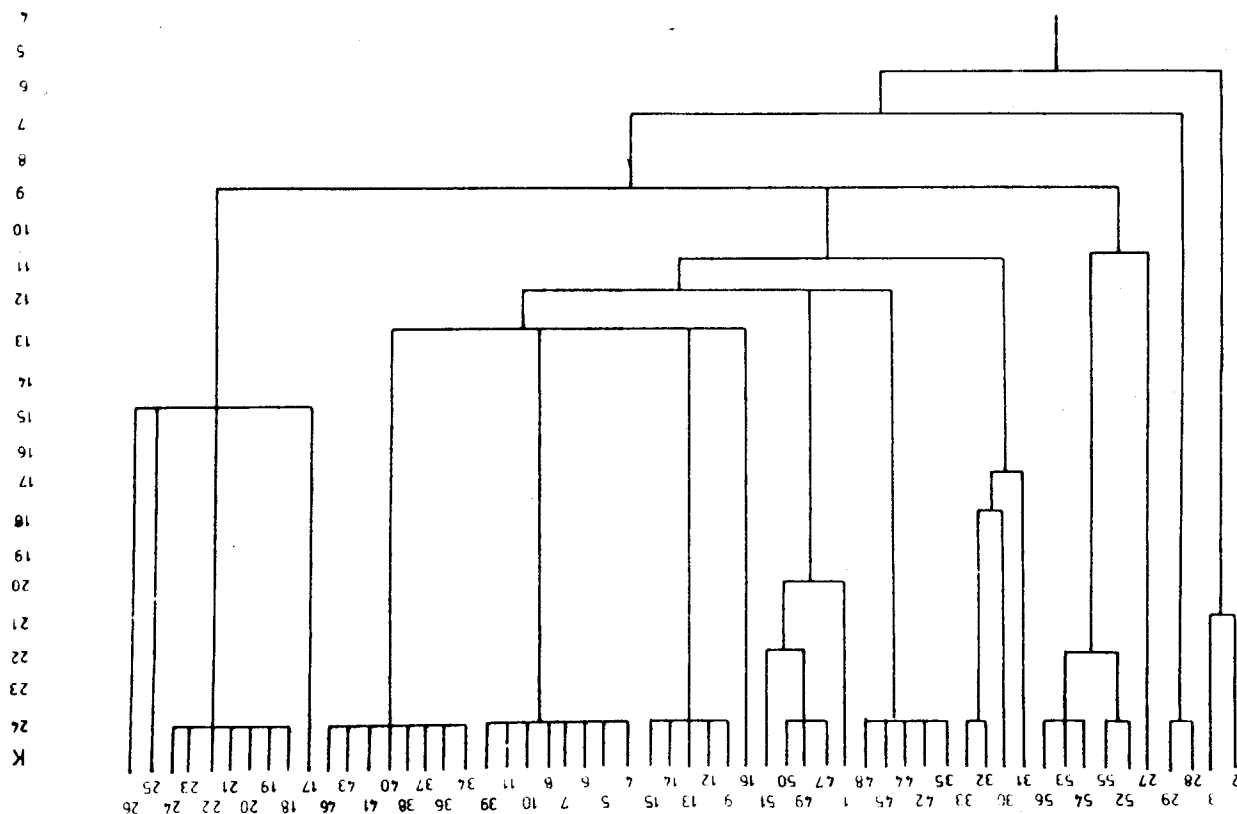


Figura 78: Exemplo de uma dendograma; Ordenadas similaridade entre os padrões; Abcissas similaridade entre agrupamentos.

## 7.2 - Resultados e Discussão

Foram aplicados métodos quimiométricos na análise dos resultados obtidos pela análise quantitativa dos aminoácidos livres nas amostras de vinhos elementares dos vários anos estudados (1077-1983), numa tentativa de verificar a existência ou não de factores agrupativos nos aminoácidos, susceptíveis de serem utilizados na distinção entre vinhos, brancos e tintos, provenientes de castas diferentes ou mesmo de lotes diferentes independentemente da região ou ano de colheita.

### 7.2.1 - Recolha de dados

As amostras analisadas são as respeitantes às concentrações em percentagem dos aminoácidos livres existentes em vinhos elementares de quatro castas brancas e quatro castas tintas da região Alentejo. Estes resultados apresentam-se nas Tabelas 28 e 30. A matriz  $X_{m \times n}$ , consiste de  $m \times n$  ( $m = n^{\circ}$  de aminoácidos;  $n = n^{\circ}$  de anos) valores  $x_{ij}$  ( $i=1, n^{\circ}$  de aminoácidos;  $j=1, n^{\circ}$  de anos). Os aminoácidos foram considerados as variáveis  $m$  sendo os objectos os vinhos. O vector constituído pelos aminoácidos de cada vinho em cada ano caracteriza os objectos.

### 7.2.2 - Avaliação do tipo de população

Para avaliação do tipo de população determinaram-se alguns parâmetros tais como o desvio padrão, a média, a variância, o coeficiente de "Kurtosis" e o de de "Skewness" e seus respectivos valores normalizados.

Os testes foram conduzidos a uma população composta por cada amostra de vinho, analisada durante os anos em que decorreu o estudo.

A análise dos vários valores encontrados para os testes para a normalidade (Tabelas 26-33 Anexo I), indicam-nos que a forma da curva representativa desta população se afasta ligeiramente dos valores que se obteriam para uma população normal. Na realidade em todos os vinhos se observa haver desvios pequenos em relação à

normalidade (Tabela 34), já que os dados do coeficiente de Skewness se situam entre 0.06 e 0.96, e o coeficiente de Kurtosis entre 1.5 e 3.5. Na maioria dos casos a tendencia da curva é para ser deslocada para a esquerda do valor médio (skewness acima de 0.0) e achatada (Kurtosis abaixo de 3.0).

Tabela 34

Média dos valores de Skewness e Kurtosis encontrados nos testes para a normalidade aplicados aos resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos estudados

	Coeficiente de Skewness	Coeficiente de Kurtosis
Moreto	0.49	1.9
Trincadeira	0.96	3.5
Periquita	0.46	2.2
Aragonez	0.28	1.5
Roupeiro	0.4	2.4
Rabo de Ovelha	0.06	1.9
Manteúdo	0.08	2.1
Tamarez	0.06	2.2

### 7.2.3 - Normalização dos dados

A necessidade de se proceder à normalização dos dados deve-se, principalmente, ao facto de não se querer que, amostras que apresentam valores mais elevados, ou variações mais acentuadas tenham maior influência para o resultado final.

No caso apresentado de análise dos vinhos elementares, o facto de não se proceder à normalização prévia dos resultados poderia vir a fornecer resultados finais erróneos já que, p.e. a prolina apresenta um limite de variação entre os 85-35% enquanto que p.e. a glicina varia entre os 3.5-6.0% e a hidroxiprolina não atinge valores superiores a 1.2%. O efeito esperado com a normalização dos resultados é igualizar a influencia da caracteres com pequena e com grande variação. Geralmente dá-se um peso maior para o valor absoluto da variação do caracter que apresenta menor variação. São excluidas as variáveis sem variação ou sem variação significativa. Obtem-se uma população mais próxima da normalidade.

A normalização é feita sobre os dados que se encontram nas linhas ou nas colunas, consoante a análise a efectuar.

A transformação escolhida foi a transformação  $Z$ , a qual tem o interesse de a matriz de covariâncias obtida ser igual à matriz de correlações dos valores  $x_{ij}$ 's.

$$z_{ij} = \frac{\bar{x}_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad \text{em que } \bar{x}_j = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m x_{ij} \quad \text{e } s_j^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$$

Após a normalização dos dados definiu-se a medida de similaridade. Neste caso escolheu-se a distância Euclideana. A necessidade de se determinar a medida de similaridade resulta de, em análise de padrão se pretender, usualmente, comparar cada objecto com todos os outros.

A aplicação da distância Euclideana só leva a resultados satisfatórios quando as variáveis não são correlacionadas, caso contrário a imagem da sua representação gráfica apresenta-se distorcida. As variáveis usadas foram as encontradas pela análise de componente principal, portanto não correlacionadas.

#### 7.2.4 - Análise do Componente Principal

Os resultados obtidos para cada vinho ao longo dos sete anos de estudo submeteram-se à análise de componente principal. Nas matrizes individuais, cada ano funcionou como um objecto, e cada aminoácido como variável. Os aminoácidos com pesos mais elevados nos dois primeiros componentes (Tabelas 81 e 82) foram os considerados como fornecendo o perfil característico para determinado vinho e representam o grupo de combinações lineares que o caracterizam. A matriz produzida indica os pesos das combinações lineares que formam cada componente principal.

A representação gráfica dos pesos dos dois primeiros componentes principais, ortogonais um em relação ao outro, indica-nos a distribuição dos dados.

A análise de componente principal aplicada a cada variedade de vinho foi utilizada no sentido de encontrar o perfil característico de cada vinho e, ao mesmo tempo, eliminar informação



redundante já que se obtém um pequeno número de variáveis não correlacionadas que representam de forma óptima a estrutura inicial.

O método foi ainda aplicado aos resultados das concentrações relativas de aminoácidos livres dos vinhos brancos e dos vinhos tintos separadamente. Nestas condições foram extraídos os dois componentes principais que correspondem ao grupo de combinações lineares que agrupam os vinhos por similaridades entre eles. O peso dos dois primeiros componentes principais são responsáveis pelas variâncias definidas, indica quais os aminoácidos capazes de fornecer a estrutura ideal desse grupo de objectos. O representação gráfica final agrupa os vinhos por variedades informando acerca da sua separação ou não e quais os aminoácidos responsáveis por essa distribuição.

#### **7:2.4 - Análise dos vinhos brancos**

##### **7:2:4:1 - Aplicação da análise de componente principal aos resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos brancos durante os anos de estudo**

Na análise de componente principal aplicada aos resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos brancos, começou-se por introduzir uma matriz inicial que contém os resultados da Tabela 30 e à qual se chama matriz VNBR.

O cálculo da percentagem de variância (Tabela 35) revela que a variabilidade contida nos dois primeiros componentes corresponde a 24%  $|1^{\circ}|$  + 14%  $|2^{\circ}|$  valores que, não sendo totalmente significativos, permitem contudo, nesta primeira análise, saber quais os aminoácidos que mais contribuem para a variabilidade.

No primeiro componente, os aminoácidos que apresentam pesos mais elevados são a lisina -Y-, a alanina -A-, a leucina -L-, a isoleucina -I-, a hidroxiprolina -X-, o ácido aspártico/asparagina -B-, a fenilalanina -F-, a serina -S-, a treonina -T-, a glicina -G-, a metionina -M-, e o ácido  $\gamma$ -aminobutírico -J-, os

quais apresentam pesos entre 0.1 e 0.4 , enquanto que no segundo componente principal a maioria da variabilidade é justificada quase que exclusivamente por três aminoácidos: o ácido glutâmico/glutamina -Z-, o ácido aspártico/asparagina -B- e a fenilalanina -F-, os quais apresentam pesos nitidamente mais elevados do que todos os restantes (Figura 79).

Tabela 35  
 Percentagem de variância contida nos vários componentes principais - Método de componente principal - matriz VNBR -

Nº do Componente	% de Variância
1	24.48
2	14.27
3	13.29
4	10.01
5	8.23
6	7.44
7	5.80
8	4.56
9	2.95
10	2.80
11	1.81
12	1.39
13	0.99
14	0.68
15	0.64
16 a 22	1.45

A perspectiva dos pesos do primeiro versus o segundo componente principal é dada na Figura 79. A projecção bidimensional do primeiro componente principal versus o segundo, mostra que os vinhos, quando agrupados de acordo com a casta de origem, se agrupam inicialmente em dois grupos distintos, um contendo os vinhos das castas Roupeiro e Rabo de Ovelha (Figura 80) e outro contendo os vinhos das castas Manteúdo e Tamarez. Os vinhos Roupeiro e Rabo de Ovelha, não apresentam qualquer individualização estando o vinho Roupeiro de 1980, bastante mais afastado dos restantes o que está de acordo com o facto de 1980 ter sido um ano de condições climáticas adversas havendo só três vinhos vinificados nesse ano. Esta análise revela que, apesar deste vinho ter sido vinificado, e de as análises tradicionais não terem revelado qualquer deficiência (Tabela 4 e 13 Anexo I),

parece realmente que as características do vinho são diferentes.

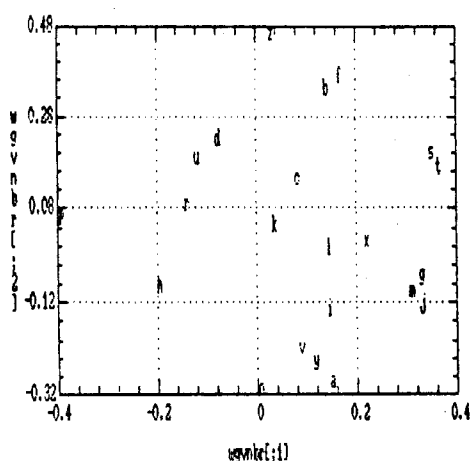


Figura 79: Projecção bidimensional dos pesos dos dois primeiros componentes da matriz VNBR. As letras minúsculas correspondem às letras maiúsculas definidas pela IUPAC para os aminoácidos proteicos, para os restantes é seguida a mesma regra estando as letras identificativas definidas na lista de abreviaturas.

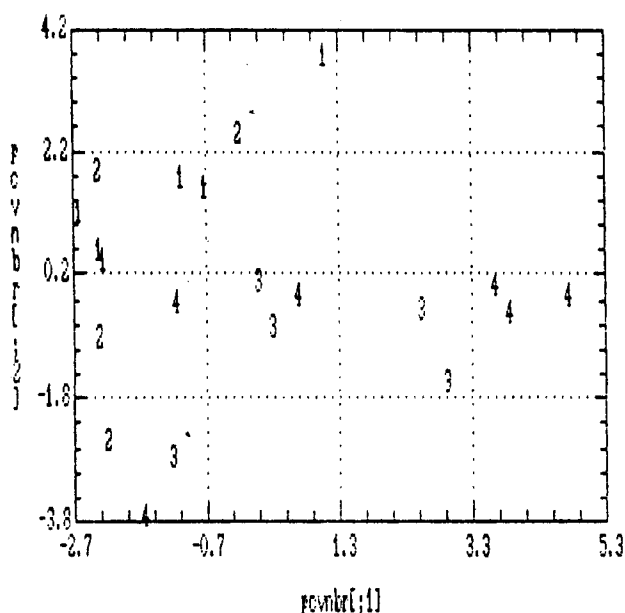


Figura 80: Projecção bidimensional do primeiro versus o segundo componentes principais - matriz VNBR, 1-Roupeiro; 2-Rabo de Ovelha; 3- Tamarez; 4- Manteúdo

Os vinhos Rabo de Ovelha estão agrupados de acordo com os resultados da prova (Tabela 16 Anexo I), e com a existência ou não dos aminoácidos já referidos sarcosina e  $\alpha$ -aminobutírico e pos-



sivelmente histidina, ou seja estão agrupados os vinhos de 1977 e 1982 nos quais dominam os aminoácidos do segundo componente, e os vinhos de 1978 e 1981 são pouco caracterizados por quaisquer dos aminoácidos que caracterizam os dois componentes principais mas encontram-se agrupados. Estes vinhos Roupeiro e Rabo de Ovelha são caracterizados principalmente pelos aminoácidos do segundo componente principal já que se apresentam com uma distribuição ao longo do eixo dos Y (vertical).

Os vinhos das castas Manteúdo e Tamarez distribuem-se mais horizontalmente revelando que são caracterizados, quase que igualmente pelos aminoácidos que compõem o segundo componente principal sendo a variabilidade explicada principalmente pelos aminoácidos que constituem o primeiro componente principal. Nos vinhos da casta Manteúdo a separação dá-se principalmente pelos vinhos que possuem valores mais baixos de prolina, encontram-se esses em agrupamento muito aglomerado e os restantes relativamente pouco agrupados, o vinho Tamarez é o que se apresenta menos individualizado, não se notando aqui a influência do ano de 1980 o que faz supor que, a influência do ano não se fará sentir quando os vinhos são caracterizado por um leque tão alargado de aminoácidos.

Após esta análise, e para efectuar um primeiro "screening" dos dados, escolheram-se as seguintes variáveis: Z, B, F, G, M e J (abreviaturas IUPAC, para os aminoácidos em que não existem estas abreviaturas só com um letra as mesmas estão definidas na lista de abreviaturas). Estas variáveis são altamente responsáveis pela variabilidade tanto no primeiro (G M J) como no segundo componente principal (Z B F) (Figura 79). A matriz assim organizada (VNBR1), apenas com os resultados destes aminoácidos, quando sujeita à análise de componente principal apresenta um percentagem de variância nos dois primeiros componentes de 68% sendo o primeiros responsável por 36% da variabilidade e o segundo por 32% (Tabela 36).

Tabela 36  
 Percentagem de variância nos vários componentes principais  
 matriz VNBRL

Nº do Componente	% de Variância
1	36.61
2	32.94
3	13.97
4	8.34
5	5.56
6	2.57

Os dois componentes são responsáveis por percentagens semelhantes de variância, e apresentam além disso pesos semelhantes no estabelecimento dessa variabilidade (Figura 81).

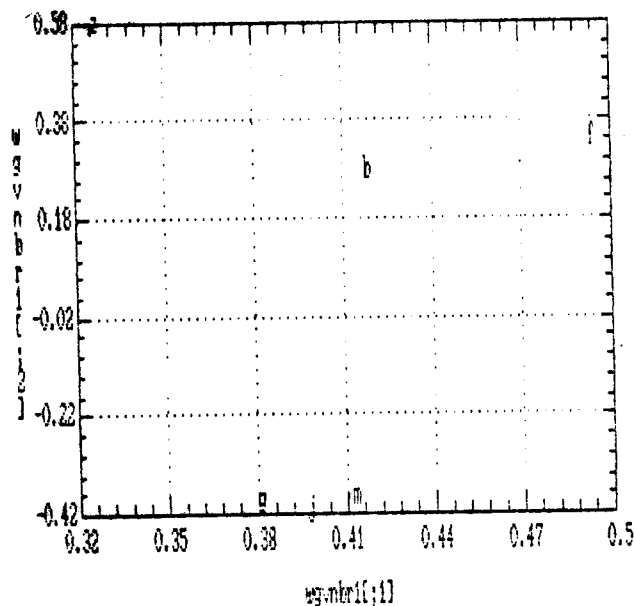


Figura 81: Projecção bidimensional dos pesos dos componentes nos dois primeiros componentes principais da matriz VNBRL. Identificação conforme Figura 79.

Em cada um dos componentes principais a variabilidade é explicada praticamente por apenas um aminoácido, no primeiro a fenilalanina -F-, se bem que todos tenham peso elevado já que o intervalo dos pesos é de 0.32 - 0.49, e no segundo, a variabilidade é quase que exclusivamente atribuída ao ácido glutâmico/ glutamina -Z- seguido do ácido aspártico/asparagina -B- e da fenilalanina -F-. Neste segundo componente os restantes amino-

ácidos - M, G e J - apresentam peso significativamente menor. O intervalo dos pesos é, neste componente de 0.42 a 0.58. O ácido glutâmico tem um peso de 0.58.

O agrupamento dos vinhos quando se introduzem apenas estas variáveis mantém a tendência anterior da existência de dois grupos. (Figura 82). O vinho Manteúdo é o mais individualizado, e o vinho Tamarez apresenta aqui uma maior dispersão. Por outro lado os vinhos do 1º agrupamento (Roupeiro e Rabo de Ovelha) apresentam-se mais coesos.

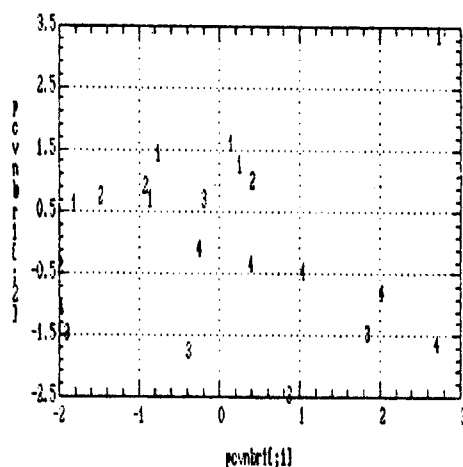


Figura 82: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componentes principais -matriz VNBR1. Identificação conforme Figura 80.

Desta tendência de agrupamento parece poder inferir-se que os dois grupos são caracterizados por agrupamentos diferentes de variáveis. Continuando a tentar que a separação dos grupos seja mais representativa e dado que se trata neste caso de uma análise supervisionada, foi construída uma nova matriz a partir da inicial (VNBR2) a qual contem apenas cinco aminoácidos, precisamente aqueles que apresentam maior peso na análise de componente principal da matriz VNBR (Figura 79), os quais são Z, B, F, C, S e T.

Neste caso, o primeiro componente apresenta 49% da percentagem total de variância e o segundo apenas 19% (Tabela 37). No total representam uma variabilidade semelhante à verificada com a análise anterior (matriz VNBR1), com uma diferença fundamental

que reside no facto de a variabilidade não se distribuir igualmente pelos dois componentes concentrando-se essencialmente no primeiro.

Tabela 37  
 Percentagem de variância nos vários componentes principais  
 matriz VNBR2

Nº do Componente	% de Variância
1	49.28
2	19.42
3	17.07
4	8.24
5	3.58
6	2.41

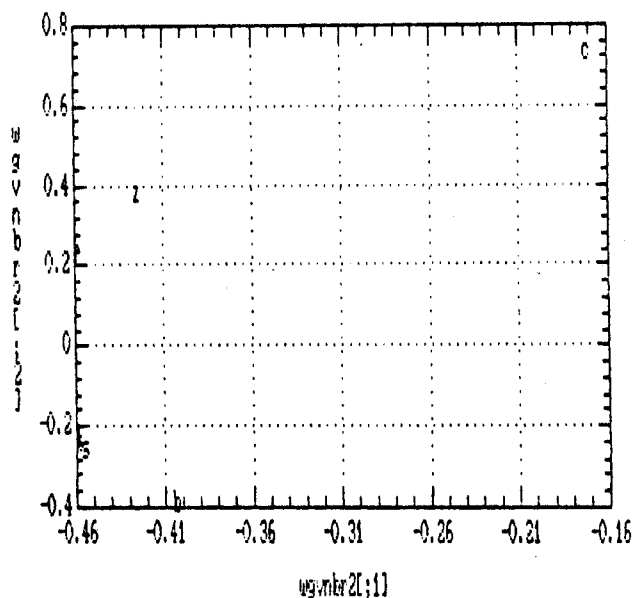


Figura 83: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos dos dois primeiros componentes principais - Matriz VNBR2. Identificação conforme Figura 79.

No plot que representa os pesos destes dois primeiros componentes (Figura 83), verifica-se que, tanto o primeiro como o segundo componente são caracterizados quase que exclusivamente por cisteína. Este aminoácido apresenta um peso de -0.17 no primeiro componente (o mais elevado) e um peso de 0.73 no segundo

sendo o responsável pela quase totalidade da variância tanto no primeiro como no segundo componente. O agrupamento dos vinhos quando caracterizados por este pequeno número de cinco variáveis (Figura 84), revela uma total ausência de aglomeração e mesmo de tendência aglomerativa. A cisteína é responsável por grande parte da variabilidade nestes vinhos, mas não é característica de nenhum dos tipos estudados apresentando valores aleatórios, não sendo pois susceptível de, por si só, caracterizar estes vinhos. Deve contudo ser introduzida na escolha do perfil final.

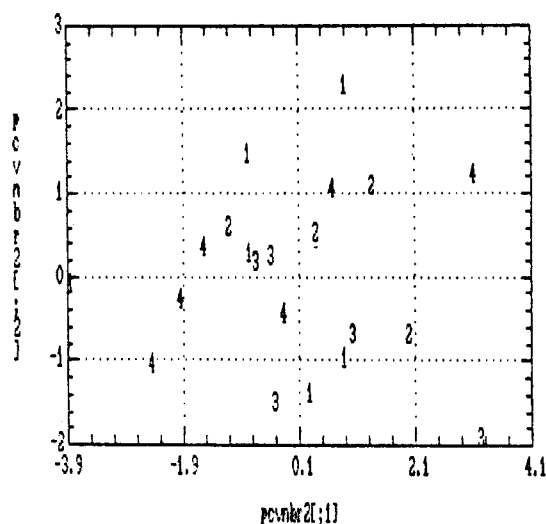


Figura 84: Projecção bidimensional dos dois primeiros componentes principais - VNBR2. Identificação conforme Figura 80.

Considerando de novo a análise inicial (matriz VNBR), verificou-se que os dois primeiros componentes nessa análise apenas representam 38% da variabilidade. Foram ao mesmo tempo verificados os pesos dos aminoácidos nos 3º e 4º componentes principais (Figura 85) dessa análise inicial os quais representam ainda 23% da variabilidade (Tabela 35). Dado que os aminoácidos característicos do 3º e 4º componentes principais são em grande parte os que têm maior peso no primeiro (Figura 79) foi elaborada outra matriz VNBR3 que contém todos os aminoácidos que contêm peso elevado no primeiro componente da matriz inicial (Figura 79) desprezando os pesos que essas mesmas variáveis possuem, na mesma

análise , no segundo componente principal. A matriz VNBR3 contém pois os seguintes aminoácidos: metionina -M-, aspártico/asparagina -B-, glutâmico/glutamina -Z-, fenilalanina -F-,  $\gamma$ -aminobutírico, serina -S-, treonina -T-, hidroxiprolina -X- e glicina -G-. Nesta aproximação o primeiro e o segundo componente são responsáveis por 67% da percentagem total de variância (Tabela 38).

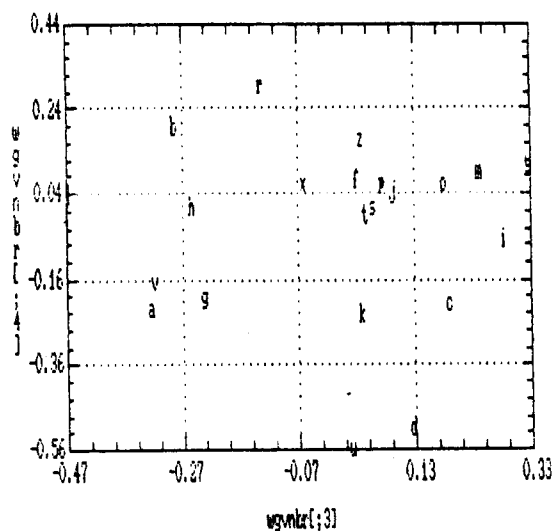


Figura 85: Projecção bidimensional dos pesos do terceiro e quarto componentes principais - matriz VNBR. Identificação conforme Figura 79.

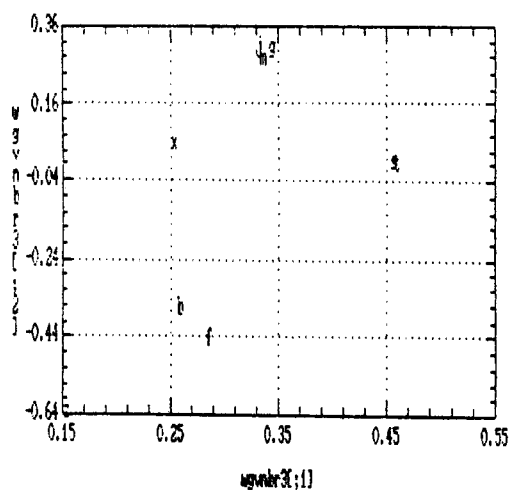


Figura 86: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos no primeiro e segundo componentes principais - matriz VNBR3. Identificação conforme Figura 79.

No primeiro componente a serina e a treonina são os responsáveis pela maioria da variabilidade com pesos bastante mais elevados que os restantes (Figura 86) e o segundo componente é caracterizado quase que exclusivamente por glicina, metionina e  $\gamma$ -aminobutírico, apresentando os restantes pesos intermédios.

Tabela 38  
 Percentagem de variância nos vários componentes principais  
 matriz VNBR3

Nº do Componente	% de Variância
1	43.62
2	22.12
3	10.17
4	9.38
5	5.91
6	4.00
7	2.37
8	1.49
9	0.94

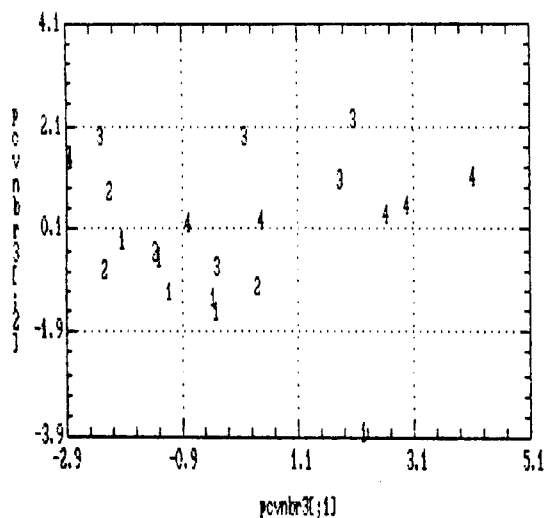


Figura 87: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componentes principais - matriz VNBR3. Identificação conforme Figura 80.

As variáveis escolhidas parecem apresentar peso semelhante na explicação da variabilidade de 43% atribuída ao primeiro componente principal já que o intervalo de variação dos pesos se

situa entre 0.15 e 0.55 (Figura 86). No agrupamento dos vinhos nota-se de novo a tendência separativa em dois grupos (Figura 87). O grupo que contem os vinhos Roupeiro e Rabo de Ovelha apresenta-se agora mais coeso. O vinho Manteúdo é o menos uniforme, distribuindo-se horizontalmente em relação ao eixo dos X que representa o primeiro componente principal, e onde se encontra 43.62% da percentagem total de variância. O vinho Roupeiro de 1980 apresenta-se totalmente isolado, e neste caso também o vinho Tamarez de 1980 se encontra mais afastado do agrupamento formado pelos vinhos Tamarez e Manteúdo, principalmente se se reparar que os restantes vinhos Tamarez são quase que igualmente influenciados pelas variáveis que formam o segundo componente principal, e este apresenta comportamento manifestamente diferente. Os vinhos Manteúdo apesar de estarem bastante mais aglomerados mantêm contudo uma separação estando os três dos anos pobres em prolina (1978, 1979 e 1981) mais afastados. A influência do teor em prolina nas percentagens finais é pois de realçar pois que individualmente este aminoácido não faz parte das variáveis escolhidas.

A partir desta matriz (VNBR3) que apresenta no primeiro componente uma grande percentagem de variabilidade, foi-se fazendo uma análise sistemática introduzindo uma a uma as variáveis com maior peso no primeiro componente na análise inicial (VNBR), começando pela cisteína a qual na análise anterior (VNBR2) mostrou ter grande influência.

Tabela 39  
 Percentagem de variância nos vários componentes principais  
 matriz VNBR4

Nº do Componente	% de Variância
1	39.75
2	20.09
3	12.25
4	9.13
5	7.25
6	4.54
7	3.55
8	1.96
9	0.98
10	0.50



Com a introdução da cisteína à matriz VNBR3 obteve-se a matriz VNBR4. Os dois primeiros componentes representam agora 60% da variabilidade (Tabela 39).

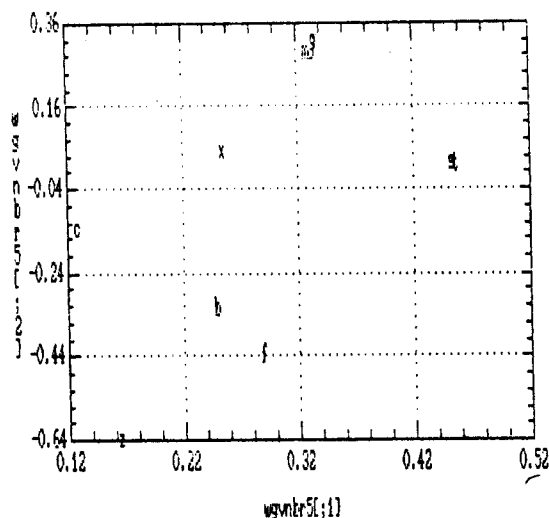


Figura 88: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos no primeiro e segundo componentes principais -matriz VNBR4. Identificação conforme Figura 79.

As variáveis vão-se tornando cada vez mais significativas. A distribuição dos pesos das variáveis nos componentes principais é semelhante à verificada na matriz VNBR3 (Figura 86).

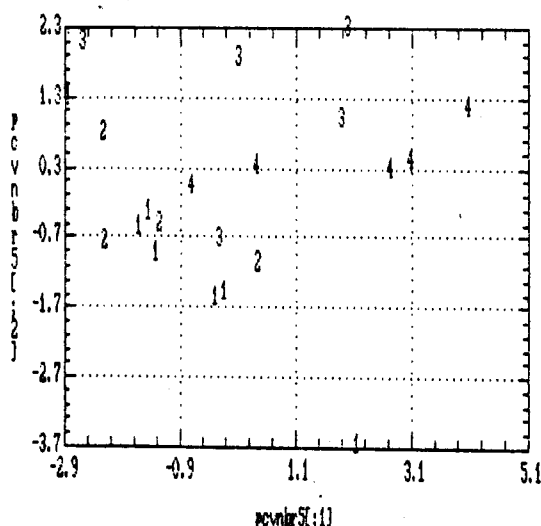


Figura 89: Projecção bidimensional dos dois primeiros componentes principais -matriz VNBR4. Identificação conforme Figura 80.

A cisteína apresenta agora um peso quase nulo na variabilidade do primeiro componente (Figura 88), mas no segundo apresenta peso intermédio (- 0.13 sendo o intervalo dos pesos de -0.64 a 0.36).

A distribuição dos vinhos mantém o mesmo aspecto, i.e. dois grupos principais (Figura 89). O vinho Tamarez começa a apresentar maior individualização havendo contudo dois vinhos fora do agrupamento, o de 1982 e o de 1983. O Roupeiro de 1980 continua afastado e o vinho Tamarez do mesmo ano apresenta-se mais perto do agrupamento dos vinhos Rabo de Ovelha e Roupeiro.

De seguida foi introduzida a lisina -K- (matriz VNBR5). Os dois primeiros componentes principais passaram agora a ser responsáveis por 55% da percentagem total de variância, havendo portanto um decréscimo (Tabela 40).

Tabela 40  
Percentagem de variância nos vários componentes principais  
matriz VNBR5

Nº do Componente	% de Variância
1	36.3
2	18.55
3	11.13
4	10.93
5	7.50
6	6.53
7	3.23
8	2.89
9	1.76
10	0.72
11	0.43

A variável introduzida tem peso elevado no segundo componente principal sendo o decréscimo da percentagem total da variabilidade dos dois primeiros componentes devida ao baixo peso que esta variável tem no primeiro componente (Figura 90).

O primeiro componente continua relativamente homogêneo com intervalos de pesos reduzidos entre os vários componentes (Figura 91), a nova variável introduzida é a que apresenta menor peso. Na individualização dos vinhos a introdução desta variável não trouxe grandes alterações se bem que tenha aumentado a distância

(melhorando a individualização) entre os grupos.

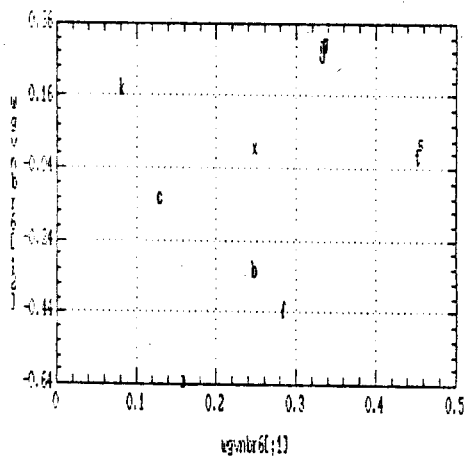


Figura 90: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos no primeiro e segundo componentes principais - Matriz VNBR5. Identificação conforme Figura 79.

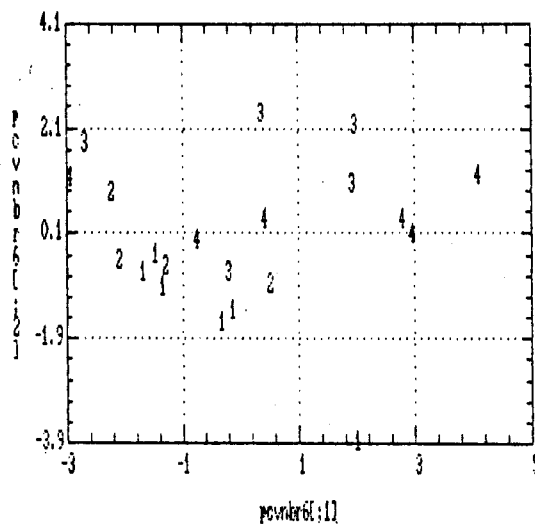


Figura 91: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componente principal - Matriz VNBR5. Identificação conforme Figura 80.

Na matriz anterior (VNBR4 Figura 89), a maioria dos vinhos distribuía-se regularmente ao longo do eixo dos X, apresentando-se agora distribuída ao longo do eixo dos Y num intervalo de -1,7 a 2,3. Nesta nova matriz (VNBR5), dado que a variável introduzida exerce a sua influência principalmente ao nível do segundo componente principal, o seu peso no primeiro é quase nulo, aumenta a

variabilidade a este nível. Este aumento da variabilidade reflete-se por uma distribuição mais homogênea ao longo do eixo dos Y sendo agora o intervalo de variação situado entre -1.9 e 2.4 (Figura 90). O vinho Roupeiro de 1980 mantém a separação e distanciamento do agrupamento dos restantes, e o vinho Tamarez de 1980 mantém a sua posição junto dos vinhos Roupeiro e Rabo de Ovelha (Figura 91).

Após estas análises foram sendo introduzidas uma a uma as variáveis seguintes: leucina -L- (VNBR6), isoleucina -I- (VNBR7), alanina -A- (VNBR8), e finalmente valina -V-, ornitina -O- e tirosina -Y- (VNBR9). Na Tabela 41 mostra-se as variações da percentagem de variância à medida que se vão introduzindo as variáveis referidas.

Tabela 41  
Percentagem de variância nos vários componentes principais  
matrizes VNBR6, VNBR7, VNBR8, VNBR9.

Nº do Componente	% de Variância			
	VNBR6	VNBR7	VNBR8	VNBR9
1	33.93	31.84	29.92	29.90
2	17.20	17.79	18.59	17.31
3	14.91	13.84	15.30	16.10
4	10.10	9.33	8.98	10.36
5	6.90	8.14	8.65	7.37
6 a final	16.95	19.04	18.53	23.95

A introdução destas variáveis, se bem que provoque sempre um abaixamento da variabilidade nos dois primeiros componentes principais, e que esse abaixamento se dê à custa de uma diminuição da percentagem de variância no primeiro componente, provoca também o aparecimento de um delineamento cada vez mais acentuado de quatro grupos (Figura 92).

A este conjunto da variáveis cuja análise apresenta uma tendência mais elevada para a separação dos vinhos de acordo com as castas de origem, foi aplicada a análise discriminante.

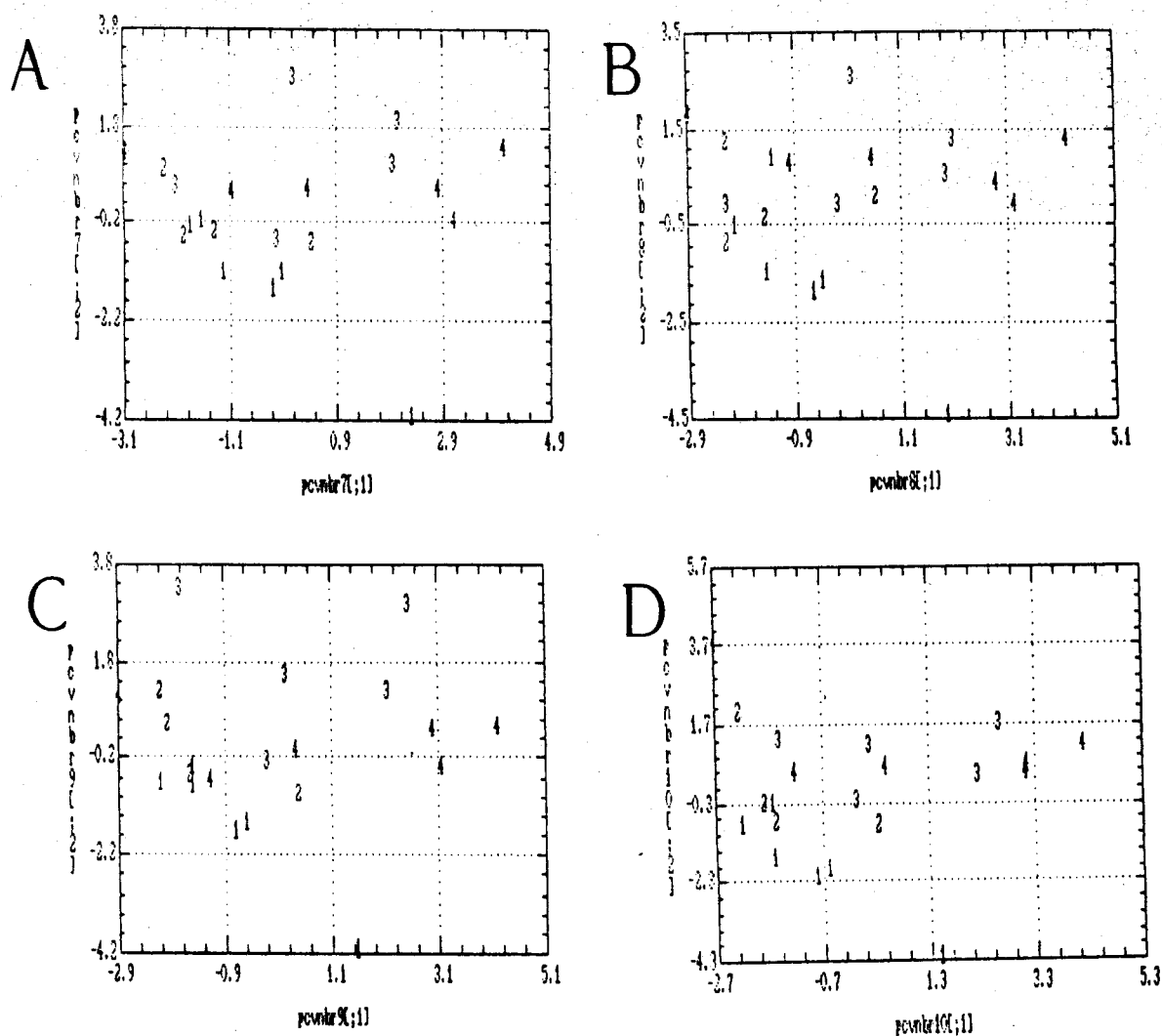


Figura 92: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componente principal A- Matriz VNBR6; B- Matriz VNBR7; C- Matriz VNBR8; D- Matriz VNBR9. Identificação conforme Figura 80.

#### 7.2.4.1.2 - Aplicação do método de análise discriminante aos resultados dos aminoácidos livres dos vinhos brancos estudados.

Tendo sido obtido um conjunto de variáveis que representam de forma mais ideal a separação entre os grupos, a essas variáveis foi aplicada a análise discriminante. As matrizes que contem essas variáveis são as matrizes VNBR7, VNBR8 e VNBR9, o conjunto de variáveis definido em cada uma dessas matrizes está representado nas Tabelas 43, 46 e 49.

O primeiro grupo de variáveis ensaiado é o que corresponde à

matriz VNBR 7. Obtiveram-se três funções discriminantes tendo as duas primeiras 91% da percentagem de decriminação (Tabela 42).

Tabela 42

Aplicação do método de análise discriminante ao conjunto dos aminoácidos livres definidos na matriz VNBR7

Função Discriminante	Eigenvalue	% Relativa	Correlação Canónica	
1	6.56	59.96	0.93	
2	3.60	32.91	0.88	
3	0.78	7.13	0.66	

Funções Derivadas	Wilks Lambda	Qui-quadrado	DF	Nível de Sinal
0	0.1617	47.429	39	0.166
1	0.1222	24.171	24	0.451
2	0.5621	6.625	11	0.829

A primeira função discriminante é essencialmente treonina com um valor de 1.48 e glicina, esta segunda com um valor de 1.40 tendo ainda valor significtaivo o ácido glutâmico/glutamina com um valor de 0.44 , o ácido aspártico/asparagina que apresenta 0.38 e a lisina com 0.96 (Tabela 43).

Tabela 43

Coeficientes de Descriminação Normalizados - Matriz VNBR7

Variável			
1- Z	0.4364	-0.5862	-1.0586
2- B	0.3862	-0.8983	-0.5103
3- F	-0.4070	0.0498	0.9210
4- S	-1.2634	-0.6816	0.6692
5- T	1.4898	1.0452	0.7706
6- G	1.4078	0.6979	-1.2422
7- M	-1.2675	-0.3078	0.0124
8- J	-0.9122	0.0507	-1.1358
9- X	-0.7136	-0.5916	-0.4571
10- C	-0.3371	0.0530	1.0220
11- K	0.9660	0.9748	0.2219
12- L	-1.0106	0.7786	1.0204
13- I	-0.5754	0.4841	0.7160

A segunda função discriminante com uma percentagem de apenas 32.9% (Tabela 42) cerca de metade do valor discriminante da primeira tem como variáveis mais discriminantes as mesmas, o que reforça a acção destas, tendo no entanto a treonina um valor de 1.04 a glicina 0.69 e a lisina leucina e isoleucina respectivamente 0.97, 0.77 e 0.48 (Tabela 43). O valor discriminante da treonina mantem-se ainda nos 7% da terceira função discriminante; A leucina, a isoleucina, cisteína e fenilalanina aumentam o valor discriminante da primeira para a terceira função; A glicina perde na terceira função o seu valor discriminante.

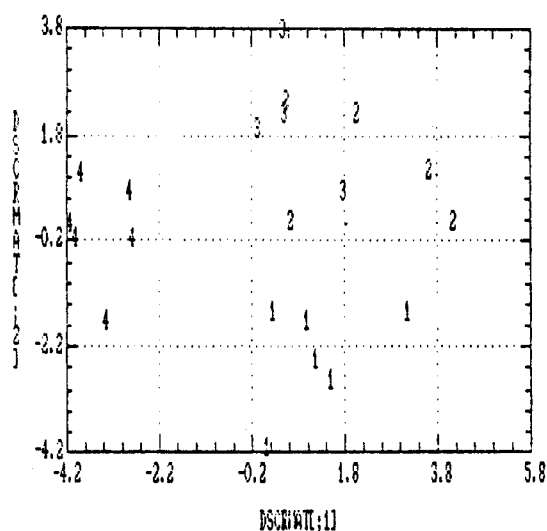


Figura 93: Projecção bidimensional da primeira função discriminante *versus* a segunda - Matriz VNBR7.

O agrupamento dos vinhos de acordo com esta análise é bastante bom (Figura 93). O vinho Roupeiro de 1980 continua muito afastado dos restantes, os quais se agrupam de forma mais ou menos coesa e regular. O vinho Manteúdo é o mais aglomerado e mais individualizado. O vinho Tamarez apresenta fora do agrupamento o vinho de 1980 assim como acontece com o Roupeiro de 1980; Os vinhos da casta Rabo de Ovelha apesar de bastante bem agrupados mantêm ainda a tendência já referida de agrupar de acordo com os resultados da prova (1977- 1981 e 1978-1982). A separação dos grupos é feita em três passos (Tabela 44) sendo o primeiro centróide responsável pela separação dos vinhos Roupeiro e Rabo de

Ovelha dos outros dois, ao mesmo tempo que o vinho Manteúdo é logo colocado em agrupamento separado. O segundo centróide separa os vinhos Roupeiro e Rabo de Ovelha colocando o Tamarez noutra agrupamento. Na formação desta descricinate há de início a separação em três grupos e só com a progressão da análise os grupos se vão individualizando. A separação do Rabo de Ovelha e Roupeiro é claramente esboçada no segundo centroide (Tabela 44).

Tabela 44

Definição do agrupamento na aplicação da análise discriminante à matriz VNBR7

Grupos	Centróides		
1	1.2008	-2.3878	-0.4135
2	2.6262	0.9073	1.2972
3	0.6471	2.1758	-0.9713
4	-3.4909	-0.3024	0.3583

Quando se ensaia o tipo de discriminação utilizando as variáveis definidas na matriz VNBR8, verifica-se que a discriminação está mais distribuída pelas três funções as quais apresentam percentagens respectivamente de 49%, 27.3% e 10.3% (Tabela 45). Na primeira função as variáveis discriminantes são a glicina e a treonina (Tabela 46) se bem que com peso contrário ao da discriminação anterior (Tabela 43), sendo ainda de considerar a lisina, o ácido aspártico/asparagina e o ácido glutâmico/glutamina. Na segunda função a leucina aparece a seguir com peso elevado (0.88) seguida da lisina ( 1.12) . A isoleucina, possui seguidamente o maior valor discriminante. Na terceira função discriminante (Tabela 46) que possui um valor discriminante de 13% (Tabela 45) é a glicina que possui essencialmente todo o valor discriminante (3.12) tendo o ácido  $\gamma$ -aminobutírico e o ácido glutâmico/glutamina o restante com respectivamente valores de 2.5 e 1.7.



Tabela 45

Aplicação do método de análise discriminante ao conjunto dos aminoácidos livres definidos na matriz VNBR8

Função Discriminante	Eigenvalue	% Relativa	Correlação Canônica	
1	6.19	54.16	0.93	
2	3.69	32.31	0.88	
3	1.55	13.53	0.77	

Funções Derivadas	Wilks Lambda	Qui-quadrado	DF	Nível de Sinal
0	0.1162	49.008	42	0.2125
1	0.0836	27.300	26	0.3937
2	0.3925	10.287	12	0.5908

Tabela 46

Coefficientes de Discriminação Normalizados - Matriz VNBR8

Variável			
1- Z	0.6246	-0.5259	1.7213
2- B	0.3011	-0.9599	-0.1533
3- F	-0.4604	-0.1626	-1.7652
4- S	-1.2032	-0.9107	-1.3232
5- T	1.1789	1.0993	-1.0170
6- G	1.6599	1.0937	3.1365
7- M	-1.3988	-0.4234	-0.7826
8- J	-0.5946	0.3084	2.5625
9- X	-0.6614	-0.6681	0.2098
10- C	-0.5436	-0.0358	-1.6882
11- K	0.9596	1.1207	0.3981
12- L	-1.1152	0.8820	-0.7654
13- I	-0.6066	0.3802	-1.0211
14- A	-0.1452	-0.4269	-1.9581

O agrupamento dos vinhos discriminados com estas variáveis (matriz VNBR8) é semelhante ao verificado anteriormente se bem que os quatro grupos se agrupem de forma mais definida (Figura 94).

No primeiro centroide ficam imediata e claramente definidos três grupos (Tabela 47), Roupeiro e Rabo de Ovelha (grupo 1) Tamarez e Manteúdo nos restantes, no segundo centroide separa-se claramente os vinhos Roupeiro e Rabo de Ovelha, e o vinho Tamarez

afasta-se ainda mais dos restantes. Finalmente no terceiro centroide todos os quatro grupos são claramente separados. A separação por grupos se bem que siga um caminho semelhante ao anterior apresenta um resultado final mais conclusivo.

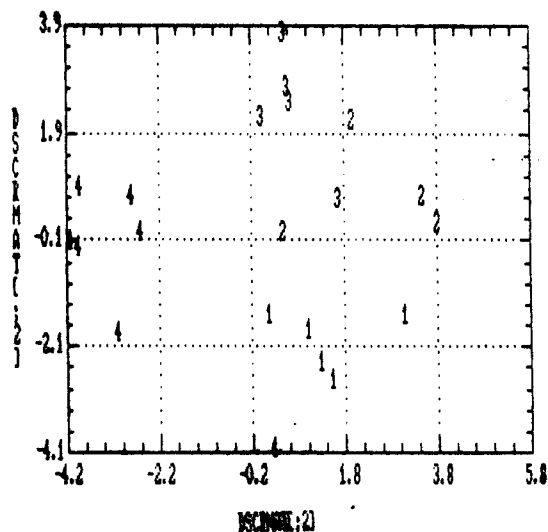


Figura 94: Projecção bidimensional primeira função discriminante *versus* a segunda - matriz VNBR8. Identificação conforme Figura 80.

Tabela 47

Definição do agrupamento na aplicação da análise discriminante à matriz VNBR8

Grupos	Centróides		
1	1.2433	-2.3494	0.6592
2	2.4301	0.7688	-1.8971
3	0.6685	2.3356	1.2701
4	-3.4204	-0.1095	-0.4524

Quando se utilizou a matriz VNBR9, há discriminação essencialmente nas duas primeiras funções (Tabela 48) as quais possuem 73% e 25.8% da variância, enquanto que a terceira é praticamente desprezável já que apenas possui 0.88%.

As variáveis discriminantes são inequivocamente a glicina (8.8), o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (11.1) a valina (10.3) e a serina (7.8) (Tabela 49) e podem ser considerados como fornecendo infor-

mação mais concludente para a separação entre os grupos.

Tabela 48  
Aplicação do método de análise discriminante ao conjunto dos aminoácidos livres definidos na matriz VNBR9

Função Discriminante	Eigenvalue	% Relativa	Correlação Canônica	
1	143.225	73.30	0.99	
2	50.470	25.83	0.99	
3	1.71	0.88	0.79	

Funções Derivadas	Wilks Lambda	Qui-quadrado	DF	Nível de Sinal
0	0.0005	94.150	51	0.002
1	0.0716	46.922	32	0.043
2	0.3685	9.483	15	0.851

Tabela 49  
Coeficientes de Discriminação Normalizados - Matriz VNBR9

Variável			
1- Z	-1.8739	1.0493	0.3285
2- B	-8.7621	-4.0706	-0.3944
3- F	-1.1442	-2.0653	-1.5211
4- S	7.8242	-3.0562	-1.6425
5- T	-3.3945	5.8553	0.5777
6- G	8.8188	2.4315	0.6976
7- M	-7.8734	-1.1844	0.8694
8- J	11.9715	-0.2299	1.0796
9- X	-4.9469	-4.7901	0.1883
10- C	-6.2338	-0.7963	-0.5651
11- K	2.7742	3.8419	0.1564
12- L	-2.0060	2.8536	0.8369
13- I	0.8855	-0.4847	-0.6180
14- A	-10.9023	-1.6561	-0.8730
15- V	10.3345	0.3753	-0.3647
16- Y	0.3771	-3.4154	-0.5127
17- O	-1.4772	1.5620	-0.5935

Na segunda função as variáveis discriminantes são a treonina a lisina e a leucina seguidas da glicina (Tabela 49). Na sepa-

ração dos grupos logo no primeiro centroide se nota já uma nítida separação entre o vinho Roupeiro e o Rabo de Ovelha, ao contrário do que sucedia em qualquer das outras análises realizadas. Neste primeiro centroide mantêm-se juntos ainda os vinhos Tamarez e Manteúdo, os quais são de seguida claramente separados no segundo centróide (Tabela 50). O terceiro centróide mostra um conjunto de grupos totalmente separados (Tabela 50 e Figura 95).

O primeiro conjunto de variáveis define e discrimina os vinhos Roupeiro e Rabo de Ovelha. Os vinhos Tamarez e Manteúdo apenas são discriminados na segunda função. As variáveis da terceira função vêm apenas reforçar a separação (Tabela 50).

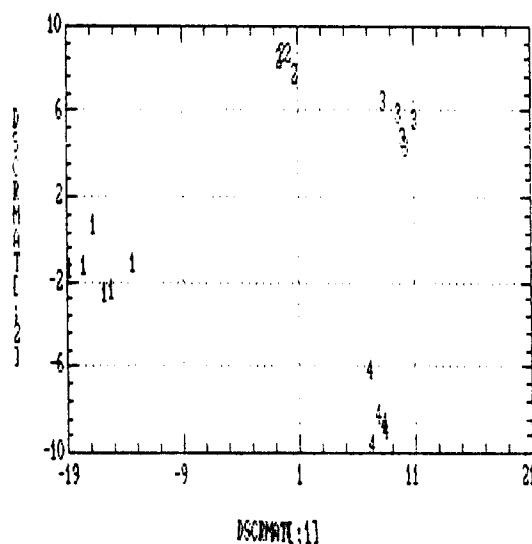


Figura 95: Projecção bidimensional da primeira função discriminante *versus* a segunda - matriz VNBR9. Identificação conforme Figura 80.

Tabela 50  
Definição do agrupamento na aplicação da análise discriminante à matriz VNBR9

Grupos	Centróides		
1	-16.16780	-1.43244	0.52042
2	1.08488E-4	8.23011	-1.89611
3	9.91241	5.32720	1.51643
4	7.90748	-8.49363	-0.52004

## 7.2.4.2- Análise de Vinhos Tintos

### 7.2.4.2.1 - Aplicação da análise de componente principal aos resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos tintos estudados

Na análise de vinhos tintos, a exemplo do que foi feito para os vinhos brancos, foi introduzida primeiro a matriz completa, que corresponde à Tabela 28 e à qual chamaremos VNTN. A análise de componente principal apresenta 57% da variância total distribuída nos dois primeiros componentes principais (Tabela 51).

Tabela 51  
Percentagem de variância contida nos vários componentes principais - matriz VNTN

Nº do Componente	% de Variância
1	42.3
2	16.20
3	11.58
4	7.68
5	5.50
6	4.73
7	3.87
8	3.13
9	1.93
10	1.49
11	0.96
12	0.71
13	0.39
14 a final	0.50

O primeiro componente principal contém um grande número de variáveis com pesos elevados, variando entre 0.05 e 0.45, não tendo expressão significativa apenas a prolina -P- e a hidroxiprolina -X- (Figura 96).

Os vinhos apresentam-se contudo mal diferenciados (Figura 97) esboçando-se uma separação entre os vinhos Trincadeira e Periquita e os vinhos Moreto e Aragonez. No vinho Moreto os anos de 1979 e 1983 apresentam-se bastante separados dos restantes sendo caracterizados essencialmente no primeiro componente principal ou seja possuindo um elevado número de aminoácidos caracte-

rizantes: O vinho Trincadeira bem como o Periquita são mais coesos se bem que entre os dois tipos de vinhos não se note separação acentuada. O vinho Trincadeira tem fora do agrupamento os anos de 1978, 1980 e 1982. A separação dos vinhos dos anos de 1978 e de 1980 já ocorreu nos vinhos brancos;

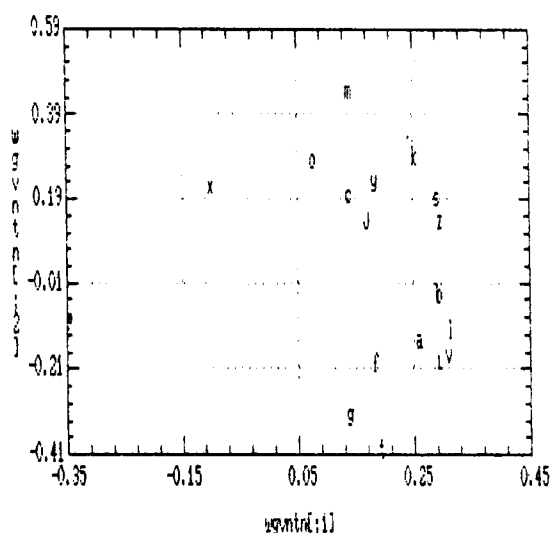


Figura 96: Projeção bidimensional dos pesos dos aminoácidos do primeiro e segundo componentes principais -matriz VNTN. Identificação conforme Figura 79.

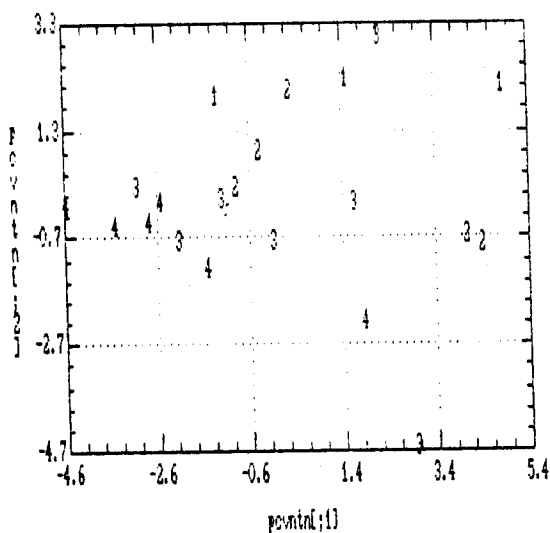


Figura 97: Projeção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componente principal - matriz VNTN. 1-Aragonez; 2-Moreto; 3-Trincadeira; 4- Periquita.

Para a segunda matriz VNTN1, foram escolhidas as variáveis que contêm pesos elevados tanto no primeiro como no segundo componente principal. A matriz assim definida (VNTN1) é constituída pelos seguintes aminoácidos: metionina -M-, Lisina -K-, serina -S-, ácido glutâmico/glutamina -Z-, tirosina -Y- cisteína -C- e ácido  $\gamma$ -aminobutírico e apresenta um aumento significativo de variância, para 72 %, nos dois primeiros componentes principais (Tabela 52).

Tabela 52  
 Percentagem de variância contida nos vários componentes principais - matriz VNTN1

Nº do Componente	% de Variância
1	52.57
2	20.16
3	12.45
4	6.62
5	4.51
6	2.17
7	1.52

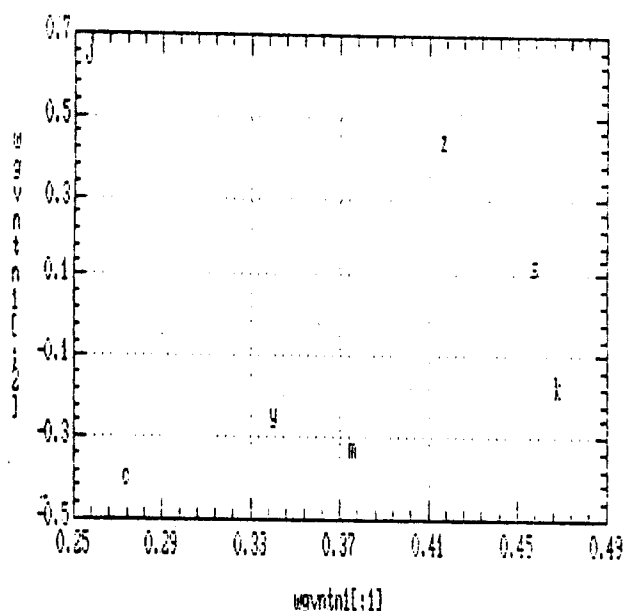


Figura 98: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos no primeiro e segundo componentes principais - matriz VNTN1. Identificação conforme Figura 79.

As variáveis apresentam-se todas com peso elevado no primeiro componente principal (Figura 98) com intervalos entre 0.25 e 0.49 sendo a cisteína e o ácido  $\gamma$ -aminobutírico os menos significativos, este último porém caracteriza quase que exclusivamente o segundo componente principal.

Os vinhos, definidos por estas variáveis agrupam-se claramente em dois grupos (Figura 99), Moreto e Aragonez, e Trincadeira e Periquita. Fora do agrupamento estão os vinhos Trincadeira de 1980 e o de 1978 se bem que este se situe ainda do mesmo lado do corte diagonal em que se separam os dois grupos. Os vinhos Aragonez por serem apenas três tornam-se um pouco inconclusivos. O vinho Moreto começa a revelar tendência para agrupamento individual. No cluster que define os vinhos Trincadeira e Periquita nota-se também a tendência para a formação de sub-agrupamentos. No vinho Periquita o único que se encontra mais afastado dos restantes é o de 1978.

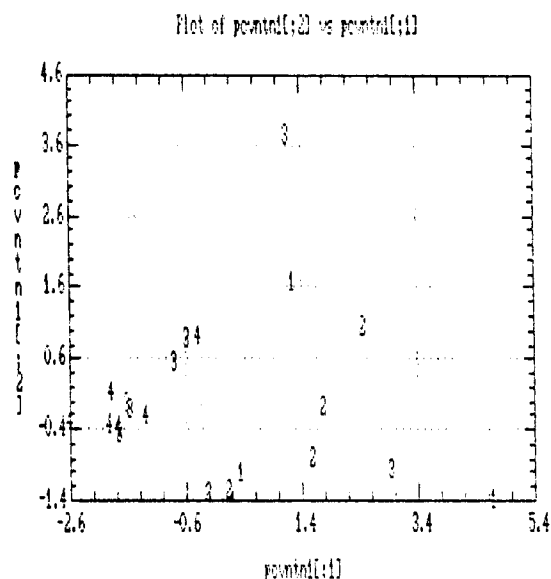


Figura 99: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componentes principais - matriz VNTN1. Identificação conforme Figura 97.

Mantem-se sempre a tendência para separação dos vinhos dos anos em que as condições climáticas foram de algum modo alteradas podendo ter sido prejudicada a maturação e conseqüentemente a fermentação. Na matriz seguinte (VNTN2) foram introduzidas as variáveis alanina -A- e ácido aspártico/asparagina -B-, ambas com

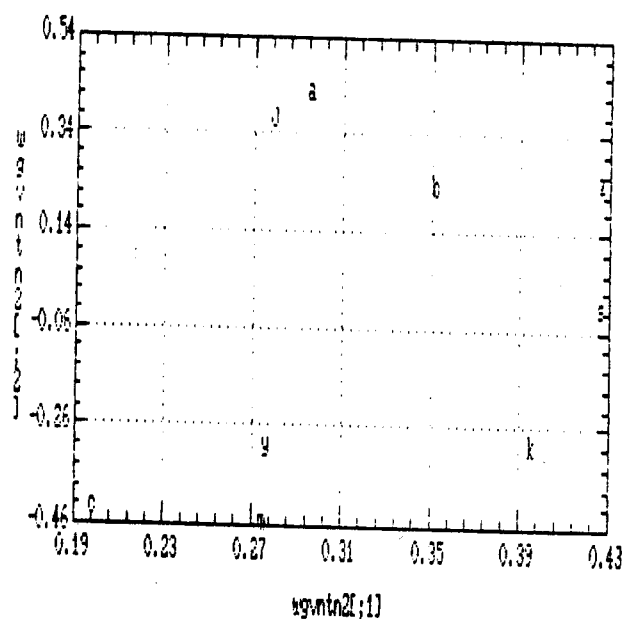


peso elevado no primeiro componente da análise inicial (Figura 96).

**Tabela 53**  
 Percentagem de variância contida nos vários componentes principais - matriz VNTN2

Nº do Componente	% de Variância
1	49.00
2	20.58
3	9.75
4	6.95
5	5.41
6	3.76
7	2.92
8	1.10
9	0.51

Nesta matriz a percentagem de variância nos dois primeiros componentes baixou para 69 % (Tabela 53). As variáveis encontram-se distribuídas irregularmente, (Figura 100) sendo a cisteína a menos significativa.



**Figura 100:** Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos do primeiro e segundo componentes principais - matriz VNTN2. Identificação conforme Figura 79.

Os vinhos mantêm a mesma tendência agrupativa (Figura 101), apresentando os vinhos, já referidos como estando fora do agrupamento, ainda mais acentuadamente afastados. O vinho Moreto apresenta-se bem individualizado.

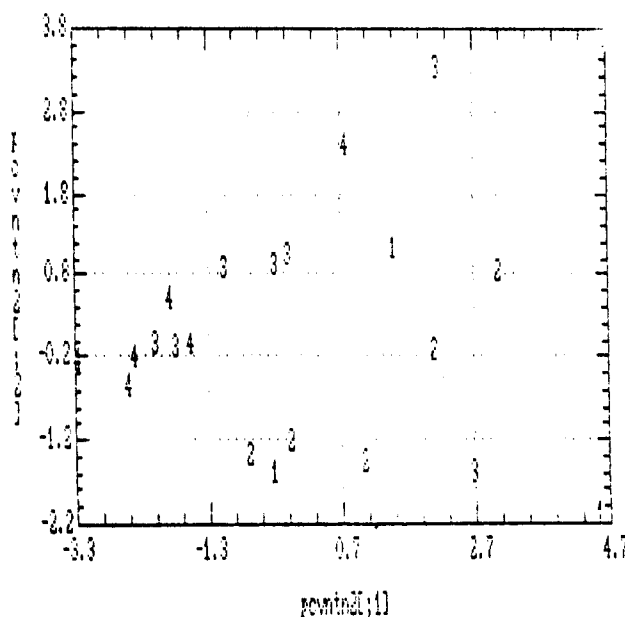


Figura 101: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componentes principais - matriz VNTN2. Identificação conforme Figura 97.

A partir desta matriz as variáveis que a seguir se utilizaram na análise foram introduzidas em matrizes separadas de modo a se verificar realmente qual a influência de cada uma para o agrupamento dos vinhos. As variáveis introduzidas foram leucina -L- (matriz VNTN3), isoleucina -I- e valina -V- (matriz VNTN4) e ornitina -O- (matriz VNTN5). A escolha foi feita por ordem de peso decrescente para o segundo componente principal da matriz inicial (Figura 96). A variância contida nos dois primeiros componentes principais decresce mais ou menos dois pontos percentuais por cada variável introduzida (Tabela 54).

Os vinhos, quando representadas pelos conjuntos de variáveis que compõe as matrizes VNTN3, VNTN4 e VNTN5, cujos primeiros dois componentes principais apresentam os aminoácidos distribuídos com os pesos representados na Figura 102, mantêm a mesma tendência anterior de agrupamento, definindo-se dois grupos um que contem o

vinho Periquita e Trincadeira outro com o Moreto e Aragonéz, apesar de apresentarem já uma tendência de separação.

Tabela 54  
 Percentagem de variância contida nos vários componentes principais - matrizes VNTN3, VNTN4 e VNTN5

Nº do Componente	% de Variância		
	VNTN3	VNTN4	VNTN5
1	49,30	49,58	46,04
2	18,53	15,59	15,09
3	10,11	12,90	14,21
4	8,63	7,51	6,94
5	4,89	5,49	5,77
6	3,46	3,04	4,56
7	2,65	2,27	2,61
8	1,44	1,73	1,60
9 a final	0,99	0,77	6,24

Com a introdução de este maior número de variáveis, aumenta o afastamento dos vinhos de anos de condições climáticas adversas (1978 e 1980) podendo-se desta forma inferir, com alguma segurança, das susceptibilidades dos vários aminoácidos às condições climáticas com conseqüente influencia no perfil característico de cada vinho. A introdução de variáveis com peso pequeno no segundo componente da matriz inicial (Figura 96) faz diminuir a percentagem de variância no segundo componente principal das análises respectivas (Tabela 54). A matriz VNTN4 separa bastante bem os vinhos Trincadeira e Periquita. O vinho Periquita forma já um agrupamento bastante nítido tendo como valor dissidente apenas o vinho de 1978, o vinho Trincadeira tem nestas condições o vinho de 1980 fora do agrupamento. No vinho Moreto, que está bastante diferenciado dos restantes, os vinhos dos anos de 1979 e 1983 apresentam-se contudo mais separados. Ao introduzirmos ornitina, os vinhos perdem aglomeração ou tendência para tal (Figura 101 C) podendo-se concluir que são principalmente os aminoácidos que exercem influência ao nível do primeiro componente principal da matriz inicial (VNTN) que têm maior acção na separação dos grupos.

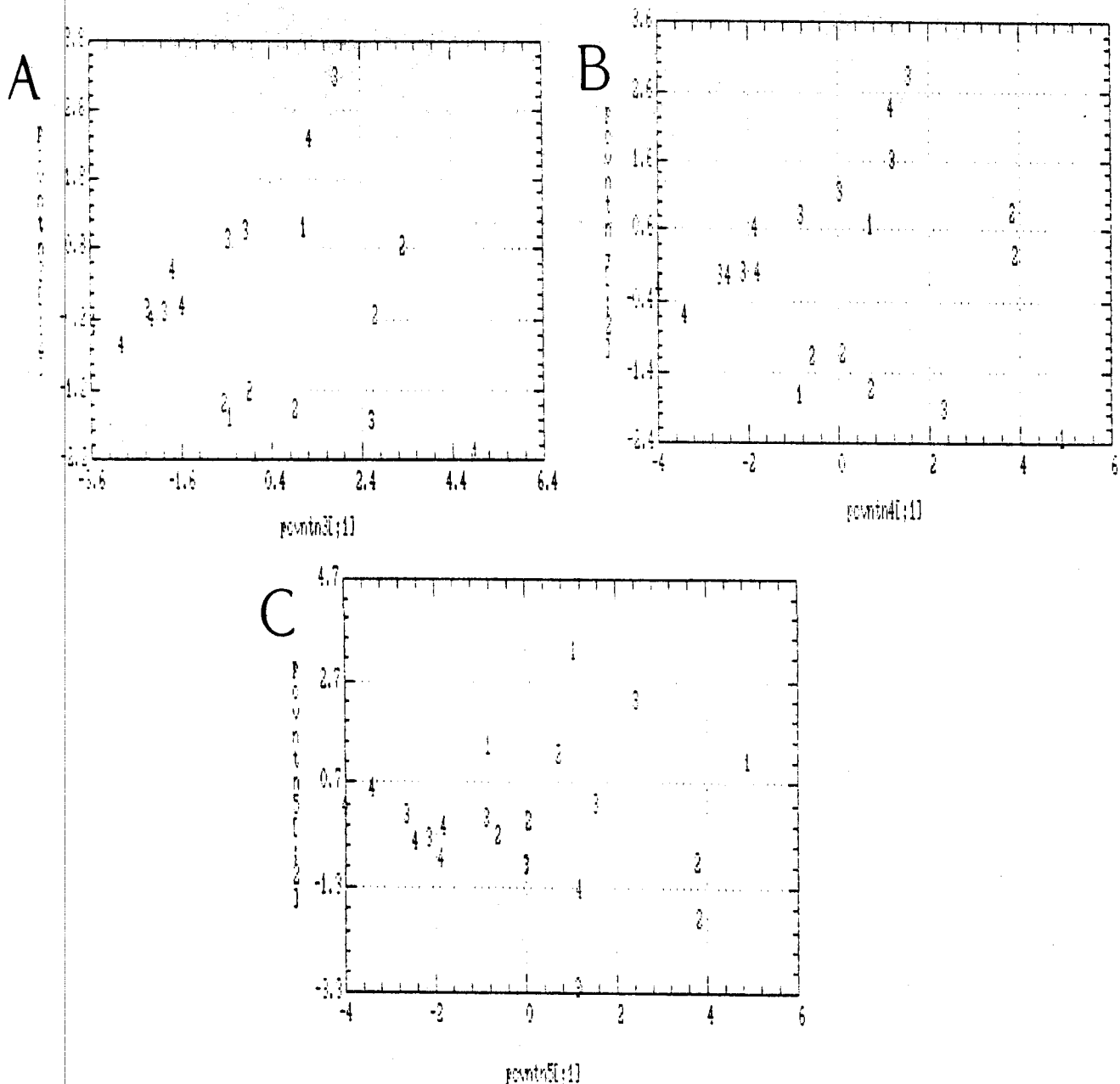


Figura 101: Plot do primeiro versus o segundo componente principal - A- Matriz VNTN3; B- Matriz VNTN4; C- Matriz VNTN5. Identificação conforme Figura 89.

Foi então feita uma matriz VNTN6 que contém apenas os aminoácidos com maior peso no primeiro componente principal, e na qual apenas não se utilizou a ornitina -O-, a prolina -P- e a hidroxiprolina -X-. Na matriz assim constituída, a percentagem de variância nos dois primeiros componentes é de 60,8 % (Tabela 55) podendo-se considerar que este conjunto de aminoácidos representam bastante bem a matriz inicial.

Na Figura 102 representa-se os pesos dos aminoácidos nos dois primeiros componentes desta matriz. A maioria dos aminoáci-

dos apresenta pesos semelhantes sendo de prever que a separação não seja muito característica.

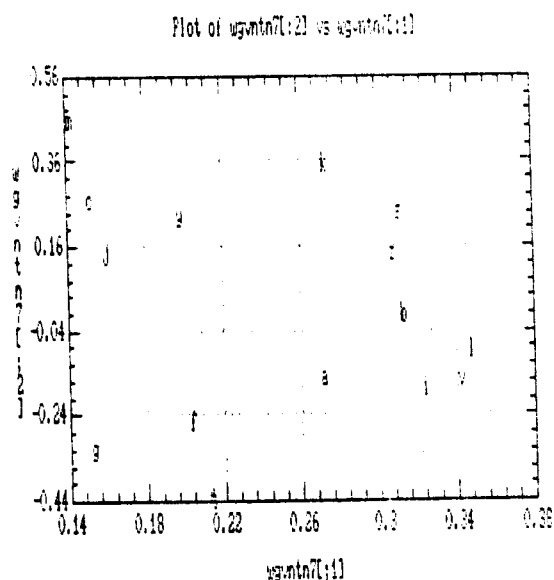


Figura 102: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos no primeiro e segundo componentes principais - matriz VNTN6. Identificação conforme Figura 79

Tabela 55  
 Percentagem de variância nos vários componentes principais  
 matriz VNTN6

Nº do Componente	% de Variância
1	43.26
2	17.57
3	12.20
4	7.51
5	5.99
6	4.13
7	3.20
8	2.28
9	1.50
10	0.88
11	0.64
12	0.34
13	0.29
14	0.17
15	0.04

Os vinhos agrupados pelo método do componente principal encontram-se contudo menos diferenciados (Figura 103) do que em

tentativas anteriores mantendo como seria de esperar agrupamento identico ao encontrado quando se utilizaram os aminoácidos todos o que não é de estranhar visto se terem tirado os menos significativos.

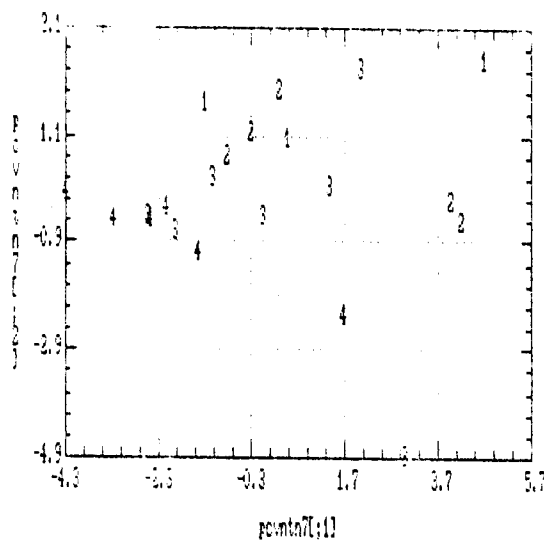


Figura 103: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componente principal - matriz VNTN6. Identificação conforme Figura 89.

#### 7.2.4.2.2 - Aplicação da análise discriminante ao conjunto dos vinhos Tintos

A análise discriminante foi feita utilizando as matrizes VNTN1, VNTN2, e VNTN3 as quais foram já definidas.

Na matriz VNTN1 que contem os aminoácidos mais significativos do primeiro e segundo componente principal da análise inicial (VNTN) a percentagem de variância nas duas primeiras funções é de 97,6% (Tabela 56).

Estas variáveis representam bem a matriz inicial, e são significativas na caracterização dos vinhos. As várias funções definidas realçam a importância de algumas das variáveis na caracterização (Tabela 57).

Tabela 56

Aplicação da análise discriminante aos resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos tintos definidos na matriz VNTN1

Função Discriminante	Eigenvalue	% Relativa	Correlação Canônica	
1	17.9727	90.85	0.97329	
2	1.3580	6.86	0.75889	
3	0.4525	2.29	0.5582	

Funções Derivadas	Wilks Lambda	Qui-quadrado	DF	Nível de Sinal
0	0.01539	60.5251	21	0.0001
1	0.29196	17.8515	12	0.1203
2	0.68844	5.4131	5	0.3676

A primeira função discriminante (Tabela 57) tem como variável principal a tirosina -Y- (2.07) seguida de metionina, serina e  $\gamma$ -aminobutírico se bem que estas com valores discriminantes muito inferiores. Na segunda função a tirosina mantém o valor discriminante mas o  $\gamma$ -aminobutírico é agora a variável com maior valor discriminante. Também a metionina aumenta muito o seu valor discriminante. Na última função é a serina que tem quase todo o valor discriminante.

Tabela 57

Coeficientes de Discriminação Normalizados - Matriz VNTN1

Variável			
1-M	0.3053	0.7838	0.5692
2-K	-1.5283	-0.0539	-1.0667
3-S	0.3535	0.1371	1.7453
4-Z	-0.8075	-0.9464	-1.4926
5-Y	2.0735	0.8220	0.2136
6-C	-1.6012	-0.1443	-0.1102
7-J	0.2596	1.1681	0.0502

Quando agrupados de acordo com o valor discriminante destas

variáveis os vinhos apresentam-se separados em três grupos (Figura 104).

Um dos grupos contém os vinhos Aragonez, outro bem individualizado engloba apenas os vinhos da casta Moreto, finalmente noutro agrupamento estão os vinhos da casta Trincadeira e Periquita (Figura 104). O vinho Trincadeira apresenta contudo alguns pontos "dissidentes" que são precisamente os vinhos dos anos de 1978 e 1980, também o vinho Periquita mais afastado do agrupamento é o de 1978.

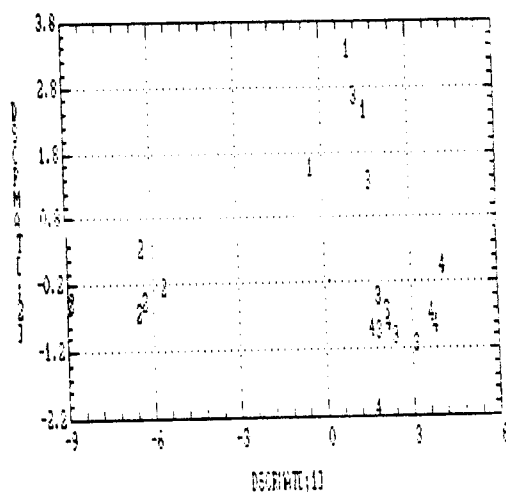


Figura 104: Projecção bidimensional da primeira função discriminante *versus* a segunda - matriz VNTN1. Identificação conforme Figura 97.

A separação dos grupos fica definida no primeiro centróide, que divide nitidamente os dados agrupando-os em três grupos distintos (Tabela 58). No segundo centróide torna-se mais marcada a separação do primeiro grupo (Aragonez) e no quarto é o segundo grupo constituído pelos vinhos da casta Moreto que fica mais separado, ao mesmo tempo que há um começo de separação do terceiro e quarto grupo. Este início de separação dos vinhos das castas Trincadeira e Periquita demonstra a necessidade de aumentar o número de variáveis discriminantes de forma a conseguir a separação destes dois vinhos.



Tabela 58

Definição dos centroides responsáveis pela separação dos grupos na análise discriminante da matriz VNTN1

Grupos	Centróides		
1	0.7219	2.4299	0.4661
2	-6.7187	-0.3216	0.0348
3	2.0286	2.8712	-0.8984
4	2.8712	-0.8984	0.6628

Tabela 59

Aplicação da análise discriminante ao conjunto das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos tintos definidos na matriz VNTN2

Função Discriminante	Eigenvalue	% Relativa	Correlação Canónica	
1	18.7973	89.02	0.9744	
2	1.5600	7.39	0.7806	
3	0.7578	3.59	0.6565	

Funções Derivadas	Wilks Lambda	Qui-quadrado	DF	Nível de Sinal
0	0.01122	60.6099	27	0.0002
1	0.22222	20.3050	16	0.2068
2	0.56890	7.6146	7	0.3677

Foi ensaída a análise discriminante com base nas variáveis definidas na matriz VNTN2 a qual engloba além das variáveis da matriz anterior, também as variáveis alanina e ácido aspártico/asparagina. A percentagem de discriminação das três funções é mais distribuída descendo no entanto a percentagem na primeira função (Tabela 59).

As variáveis com grande valor discriminante na matriz anterior (Tabela 57) mantêm-se nesta matriz sendo contudo as duas variáveis introduzidas relativamente importantes principalmente para o valor discriminante da segunda função (Tabela 60).

Tabela 60  
Coeficientes de Discriminação Normalizados - matriz VNTN2

Variável			
1-M	0.3458	0.9132	-0.7269
2-K	-1.4217	4.1157E <sup>-3</sup>	0.3961
3-S	0.2901	-0.1086	-1.1291
4-Z	-1.0034	-1.3372	1.9046
5-Y	2.0972	0.8074	-0.2815
6-C	-1.6284	-0.1909	0.0914
7-J	0.3608	1.2594	-0.6071
8-B	-0.2518	0.4947	0.6785
9-A	0.3282	0.1967	-0.9494

Na Tabela 60, verifica-se realmente que, a tirosina mantém o seu valor discriminante na primeira função enquanto que o ácido aspártico (também introduzida nesta matriz), se bem que logo na primeira função apresente algum valor discriminante, é na segunda função que apresenta valor discriminante mais significativo (0.495), apresentando metade do valor discriminante da variável principal desta função, o ácido  $\gamma$ -aminobutírico. A alanina apresenta nesta segunda função algum valor discriminante (0.197). As restantes variáveis mantêm praticamente a influência que tinham na matriz anterior.

Quando agrupados com base no valor discriminante destas variáveis os vinhos revelam a mesma tendência de separação anterior se bem que haja maior separação dos vinhos das castas Trincadeira e Periquita e o Moreto se encontre bastante mais aglomerado (Figura 105).

Na Tabela 61 fica bem patente que já no primeiro centroide há uma separação em quatro grupos, se bem que os dois últimos não aumentem o seu valor de separação nos restantes centróides e portanto se fiquem pela separação definida na primeira função discriminante. A separação entre os vinhos da mesma castas mantém os mesmos anos como valores mais afastados do aglomerado central. O vinho Trincadeira, que nesta análise se começa a separar do vinho Periquita, apresenta-se mais desagregado.

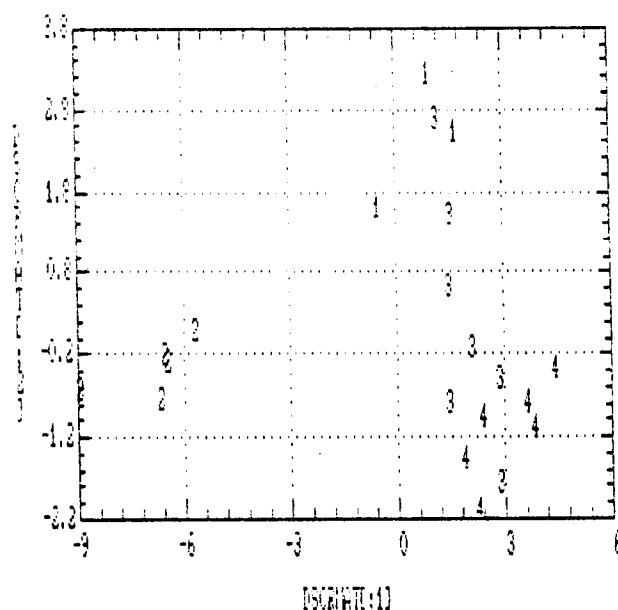


Figura 105: Projecção bidimensional da primeira função discriminante *versus* a segunda - matriz VNTN2. Identificação conforme Figura 97.

Tabela 62  
Definição do agrupamento na aplicação da análise discriminante à matriz VNTN2

Grupos	Centróides		
1	0.7216	2.4251	-0.8961
2	-6.8470	-0.3832	-0.0414
3	1.9242	0.2133	1.0274
4	3.1001	-1.1420	-0.7160

A introdução da leucina -L- (VNTN3) como nova variável discriminante aumentou significativamente a percentagem de discriminação na primeira função (91,22 %) (Tabela 62).

A introdução da nova variável vem aumentar o nível de sinal e de percentagem de discriminação diminuindo agora significativamente o valor discriminante da terceira função. A nova variável introduzida não apresenta contudo grande valor discriminante (Tabela 63) pelo que não seria de esperar grande aumento da separação entre os vinhos.

Tabela 62

Aplicação da análise discriminante aos resultados das concentrações relativas de aminoácidos livres dos vinhos tintos definidas na matriz VNTN3

Função Discriminante	Eigenvalue	% Relativa	Correlação Canônica	
1	25.847	91.22	0.981	
2	1.671	5.90	0.790	
3	0.818	2.89	0.671	

Funções Derivadas	Wilks Lambda	Qui-quadrado	DF	Nível de Sinal
0	0.0077	63.315	30	0.0004
1	0.2059	20.543	18	0.3031
2	0.5500	7.771	8	0.4562

Tabela 63

Coefficientes de discriminação Normalizados -matriz VNTN3

Variável			
1-M	0.4137	0.8203	-0.8245
2-K	-1.9881	-0.0930	0.2518
3-S	1.0740	0.1412	-0.7689
4-Z	-1.4918	-1.2653	1.8943
5-Y	2.7916	0.8685	-0.2589
6-C	-1.7342	-0.0799	0.1951
7-J	-0.0762	0.9381	-0.9660
8-B	0.4850	0.8544	0.8962
9-A	1.0033	0.3797	-0.6895
10-L	-1.5564	-0.6707	-0.6304

O valor discriminante da alanina e do ácido  $\gamma$ -aminobutírico é bastante mais elevado nesta matriz (Tabela 63). A tirosina mantém-se como variável mais discriminante se bem que a serina agora apresente também valor discriminante mais elevado. Na segunda função ácido  $\gamma$ -aminobutírico é o que apresenta maior valor discriminante seguido do ácido aspártico/asparagina e da tirosina e metionina. Os vinhos mostram um agrupamento semelhante mantendo-se a tendência para a separação dos vinhos Trincadeira e Periquita exactamente como na matriz anterior (fig. 106).

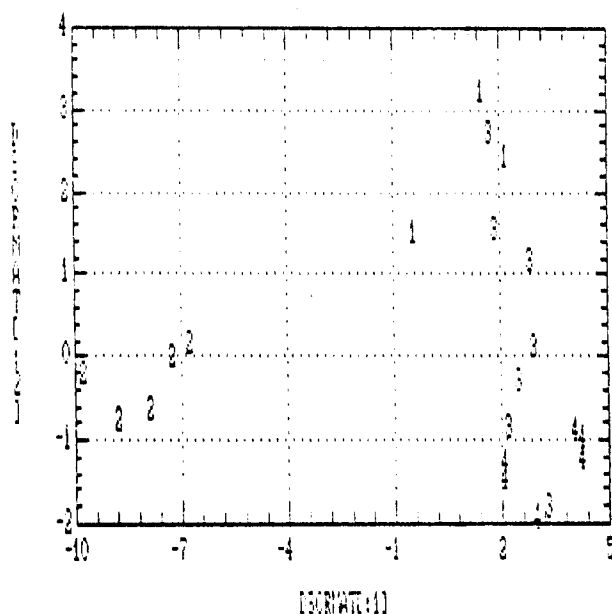


Figura 106: Projecção bidimensional da primeira função discriminante *versus* a segunda - matriz VNTN3. Identificação conforme Figura 97.

A introdução de variáveis que na análise de componente principal da matriz inicial VNTN apresentam maior peso no primeiro componente parece aumentar a tendência para a discriminação. Ensaiou-se uma outra matriz (VNTN7), que contém a totalidade dos aminoácidos mais pesados no primeiro componente principal (Figura 97), a qual, em relação à matriz inicial, apenas difere por não se ter introduzido a ornitina -O-, a prolina -P- e a hidroxiprolina -X.

Neste caso, o valor discriminante das duas primeiras funções é de 86.49 % (Tabela 64) sendo a soma dos valores discriminantes da primeira e segunda funções de 97.6 %.

As variáveis que contribuem para a discriminação verificada são na primeira função tirosina -Y-, valina -V-, treonina -T-, serina -S- e ainda metionina -M-  $\gamma$ -aminobutírico -J- e alanina -A-. Na segunda função a tirosina perde totalmente o seu valor discriminante, mas, em contrapartida a fenilalanina -F- e o ácido aspártico/asparagina -B- apresentam grande valor discriminante.

Tabela 66  
Definição do agrupamento na aplicação da análise discriminante à matriz VNTN7

Grupos	Centróides		
1	1.5294	1.1877	3.5790
2	-15.5545	-1.4591	-0.3353
3	3.1325	3.9823	-0.9217
4	8.5427	-4.0239	-0.4347

**7.2.4.3 - Aplicação dos métodos de análise de perfil aos resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres do conjunto dos vinhos brancos e tintos**

**7.2.4.3.1 - Aplicação da análise de componente principal**

A matriz introduzida para realizar esta análise, a que se chamará TNBR, corresponde à totalidade dos dados obtidos para os vinhos brancos e tintos de acordo com as Tabelas 28 e 30. A percentagem de variância contida nos dois primeiros componentes ao aplicarmos à matriz a análise de componente principal, é de 48.6 % sendo no primeiro 37.1 % (Tabela 67).

Os aminoácidos com maior peso no primeiro componente principal, responsáveis pelos referidos 37.1 % de variabilidade, são I, X, A, C, V, T, S, G, Z, B, L, K e F, sendo excluídos apenas os aminoácidos que não estão presentes em todos os vinhos, e ainda a prolina (Figura 108).

O agrupamento dos vinhos mostra claramente a separação entre brancos e tintos (Figura 109). Nos brancos, o Roupeiro está bem agrupado apresentando apenas de fora o ano de 79. O Manteúdo agrupa de acordo com os valores baixos de prolina o Rabo de Ovelha é o mais desagregado o Tamarez apresenta-se bem agrupado, sendo o vinho de 1982 aquele que está mais afastado. Nos vinhos tintos, o vinho da casta Periquita tem mais afastado o de 1978, na Trincadeira os vinhos menos agrupados são os de 1978 e o de 1980 estando estes dois vinhos, Periquita e Trincadeira pouco

separados. O vinho Aragonéz mantém-se disperso. O Moreto está mais separado dos restantes vinhos tintos mas apresenta os vinhos de 1979 e 1983 mais juntos ao agrupamento dos vinhos brancos.

Tabela 67  
 Percentagem de variância em cada um dos componentes principais dos vinhos estudados - matriz TNBR

Nº do componente	% de Variância
1	37.11
2	11.50
3	8.54
4	6.80
5	6.21
6	5.04
7	4.59
8	4.06
9	3.72
10	2.73
11	2.16
12	1.83
13	1.57
14	1.29
15	0.83
16	0.64
17	0.54
18	0.38
19	0.22
20	0.14
21	0.12

Parece poder-se inferir que a influência do clima se faz sentir mais nos vinhos tintos do que nos vinhos brancos e o vinho Moreto, precisamente o mais semelhante aos brancos em termos de caracterização por perfil de aminoácidos, é o vinho tinto em que essa influência menos se faz sentir (Figura 109).

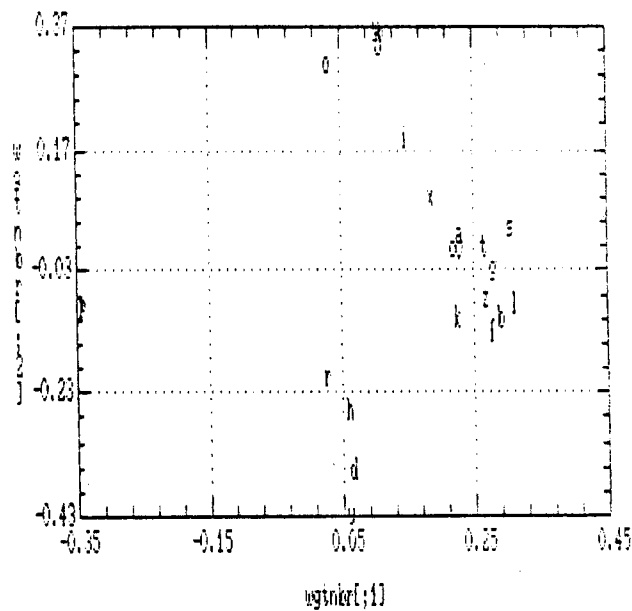


Figura 108: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos do primeiro e segundo componentes principais - matriz TNBR . Identificação conforme Figura 79.

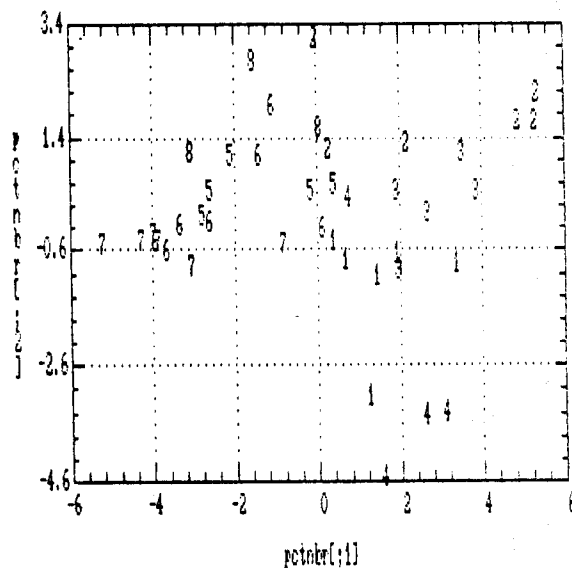


Figura 109: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componentes principais - matriz TNBR . Identificação 1- Roupeiro; 2- Manteúdo; 3- Tamarez; 4-Rabo de Ovelha; 5- Moreto; 6-Trincadeira 7- Periquita; 8- Aragonez.

Na matriz seguinte TNBR1 foram utilizadas apenas as variáveis consideradas principais na análise anterior (Figura 108). A



percentagem de variância no primeiro componente aumentou bastante sendo agora o total nos dois primeiros componentes principais de 62.7 % (Tabela 68). Estas variáveis estão agora bastante distribuídas ao longo dos dois eixos tendo menos peso a isoleucina, como aliás era de esperar visto não ser comum a todos os vinhos (Figura 110).

Tabela 68  
 Percentagem de variância em cada um dos componentes principais dos vinhos estudados - Matriz TNBR1

Nº Componente	% de Variância
1	53.12
2	9.61
3	7.69
4	6.97
5	5.84
6	5.59
7	3.76
8	2.58
9	1.48
10	1.20
11	1.13
12	0.66
13	0.37

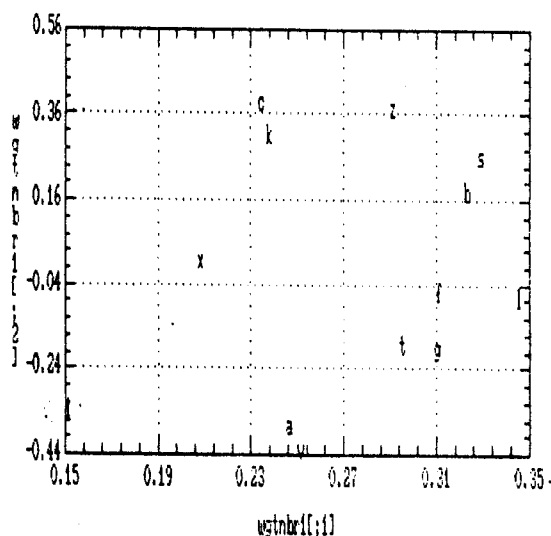


Figura 110: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos do primeiro e segundo componentes principais - matriz TNBR1. Identificação conforme Figura 79.

No agrupamento dos vinhos mantem-se a distinção nítida entre brancos e tintos (Figura 111), formando os tintos um agrupamento mais coeso do que os brancos. O vinho Manteúdo de 1978 é o único fora do agrupamento correspondente aos vinhos brancos. Mais afastado dentro do agrupamento está o vinho Tamarez de 1981, o qual é quase que exclusivamente definido pelos aminoácidos característicos do primeiro componente principal (Figura 111). No vinho Manteúdo, e apesar de já se terem retirado os valores de prolina, por não ser aminoácido característico, os vinhos mantêm-se agrupados de acordo com esse tipo de característica fazendo supor que a baixa nos teores de prolina influenciou também, se bem que de modo pouco perceptível directamente, o padrão de aminoácidos característico deste vinho. Os vinho Roupeiro e Rabo de Ovelha são os mais bem agrupados. Nos vinhos tintos é o Moreto o menos agrupado, como aliás já tinha acontecido na análise anterior, no vinho Periquita é o de 1978 o mais afastado e no Trincadeira é o de 1979.

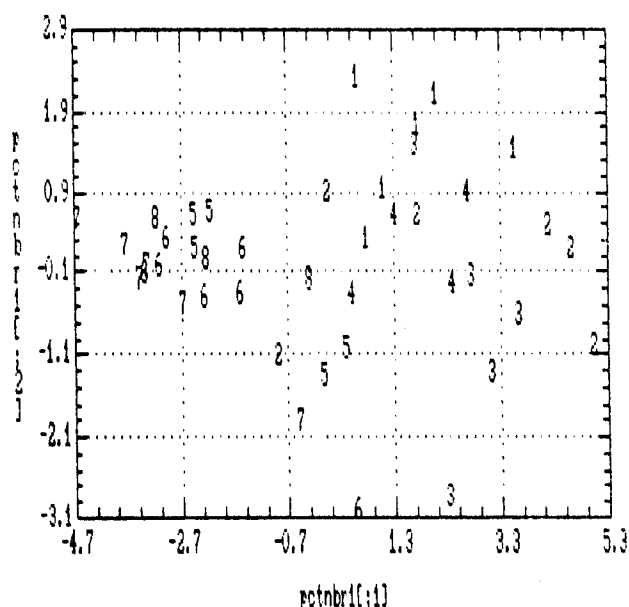


Figura 111: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componentes principais - matriz TNBR1. Identificação conforme Figura 109.

Na nova matriz utilizada - TNBR2 - usaram-se apenas os aminoácidos A, C, V, T, G, Z, B, F e L, por serem estes as variá-

veis mais significativas na primeira análise (Figura 108) e as que têm pesos mais semelhantes. A percentagem de variância nos dois primeiros componentes aumentou significativamente para 72,5 % (Tabela 69 e Figura 112).

Tabela 69  
 Percentagem de variância em cada um dos componentes principais dos vinhos estudados - Matriz TNBR2

Nº Componente	% de Variância
1	60.79
2	11.82
3	7.72
4	6.87
5	4.84
6	3.57
7	2.01
8	1.68
9	0.69

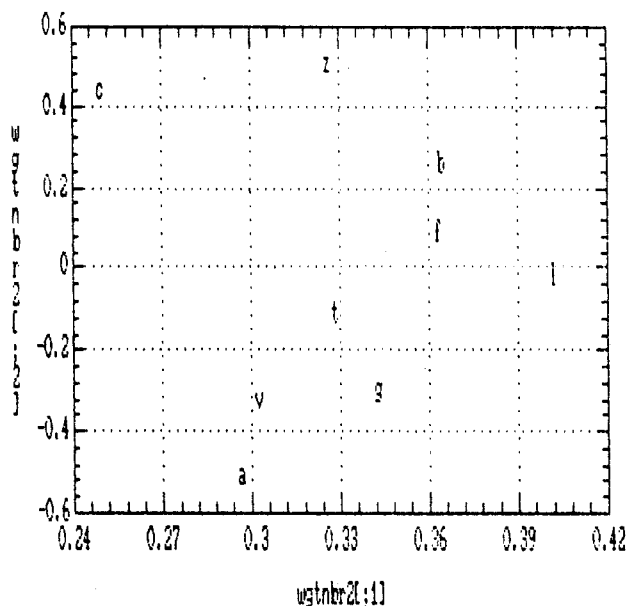


Figura 112: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos do primeiro e segundo componentes principais - matriz TNBR2. Identificação conforme Figura 79.

A separação dos vinhos não melhora significativamente parecendo que para separar os grupos e/ou os vinhos é necessário um número de aminoácidos mais elevado (Figura 11.). Contrariamente ao verificado quando se analisaram os vinhos brancos separadamente ou mesmo os vinhos brancos em grupo (o mesmo para os tintos), não se nota tanto a influencia clara que se notava de separação dos vinhos correspondentes a anos de clima deficiente. Os vinhos Roupeiro parecem agrupar por idades. No Rabo de Ovelha, o de 1978 está junto aos vinhos tintos e o de 1977 e 1983 junto ao vinho Roupeiro agrupando como já se notara anteriormente, da acordo com os resultados de prova |1978, 1981| e |1977, 1982| (Tabela 16 Anexo I). No Tamarez estão mais separados os de 1980 e 1982. Nos vinhos tintos, Trincadeira e Moreto estão relativamente bem agrupados tendo mais afastados os de 1983 (Moreto) e o de 1982 (Trincadeira) (Figura 113).

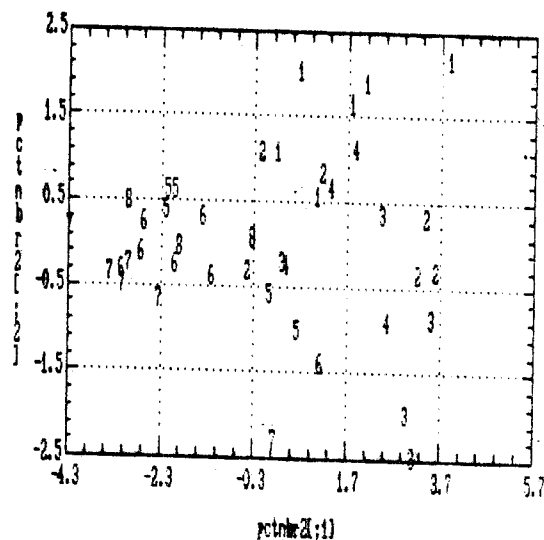


Figura 113: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componentes principais - matriz TNBR2. Identificação conforme Figura 109.

Estes resultados são menos concludentes do que os obtidos até aqui. A análise discriminante é, pois, mais susceptível de fornecer resultados mais significativos. A análise discriminante foi aplicada às matrizes TNBR1 e TNBR2.

### 7.2.4:3:2 - Aplicação do método de análise discriminante

O valor discriminante das várias funções discriminantes apresenta-se na Tabela 70 para as duas matrizes introduzidas:

Tabela 70

Aplicação do método de análise discriminante aos resultados das concentrações relativas de aminoácidos livres nos vinhos brancos e tintos - matrizes TNBR1 e TNBR2 análise

Função Discriminante	Eigenvalue		% Relativa		Correlação Canónica	
	TNBR1	TNBR2	TNBR1	TNBR2	TNBR1	TNBR2
1	8.742	7.044	55.86	63.07	0.947	0.936
2	3.237	2.156	20.68	19.21	0.874	0.826
3	1.698	1.156	10.85	10.35	0.793	0.732
4	1.064	0.542	6.80	4.85	0.718	0.593
5	0.599	0.221	3.83	1.98	0.612	0.425
6	0.250	0.060	1.60	0.54	0.447	0.238
7	0.061	0.001	0.39	0.01	0.239	0.033

Funções Derivadas	Wilks Lambda		Qui-Quadrado		DF		Nível de Sinal	
	TNBR1	TNBR2	TNBR1	TNBR2	TNBR1	TNBR2	TNBR1	TNBR2
0	.0020	.0091	188.76	152.46	91	63	.0000	.0000
1	.0200	.0739	119.33	84.69	72	48	.0004	.0009
2	.0847	.2322	75.29	47.45	55	35	.0359	.0780
3	.2286	.5006	45.02	22.48	40	24	.2700	.5502
4	.4718	.7717	22.91	8.42	27	15	.6898	.9058
5	.7543	.9420	8.60	1.94	16	8	.9289	.9828
6	.9427	.9989	1.80	0.04	7	3	.9700	.9982

Os valores discriminantes das variáveis da matriz TNBR1 e TNBR2 estão sumarizados na Tabela 71 e 73. Na matriz TNBR1, leucina -L- é a variável mais discriminante na primeira função, seguida de cisteína -C-, aspártico/asparagina -Z-, e lisina -K-, tendo ainda a glicina -G- um valor positivo. Na segunda função responsável por uma variância ainda de 20.6 % a leucina -L- mantém elevado valor discriminante, mas a serina -S- apresenta agora o valor discriminante mais elevado seguida da valina -V-,

as restantes variáveis têm valores discriminantes muito baixos; Finalmente na terceira função a qual representa ainda 10.85 % da variância, a fenilalanina -F- apresenta o valor discriminante mais elevado (1.740) seguido da alanina -A- (1.209) além destas ainda a cisteína e o aspártico/asparagina -B- apresentam valores elevados. As variáveis discriminantes nas três primeiras funções, e que representam no conjunto 87.4 % da variância total são pois: leucina -L-, lisina -K-, glutâmico/glutamina -Z-, glicina -G- e cisteína -C-, na primeira função, leucina -L- (mantém), serina -S-, valina -V- e cisteína -C- (mantém), na segunda função, e finalmente na terceira alanina -A-, cisteína -C- fenilalanina -F- e aspártico/asparagina -B-na terceira.

Tabela 71  
Coeficientes de Descriminação Normalizados - Matriz TNBR1

Variável								
1- I	0.3322	0.4931	0.4045	-0.4566	3.65E <sup>-3</sup>	0.1848	0.3586	
2- X	0.0940	-0.5281	0.0733	-0.0620	-0.4502	0.3090	0.0345	
3- A	-0.5340	-0.3629	1.2096	0.3990	-0.3303	0.5220	0.7130	
4- C	0.5292	0.1275	0.4218	-0.2195	0.6111	0.2716	0.7131	
5- V	-0.9354	0.8981	0.8394	-0.1358	0.0423	-0.4648	0.5939	
6- T	-0.3176	-0.2795	-0.8223	0.3248	-0.3344	-0.4030	-1.1405	
7- G	0.3880	0.4930	-0.8446	0.3580	0.4489	0.1539	-0.1964	
8- S	-0.5333	1.1082	0.6126	-0.7838	-0.7805	0.1396	0.4027	
9- Z	0.4622	-0.4768	-0.3552	-0.4011	-0.1385	-0.6902	0.1321	
10- K	0.4236	-0.1790	-0.0200	0.8328	-0.1215	-0.6968	-0.0161	
11- F	-0.5680	-1.0846	1.7404	0.4076	-0.5938	0.1899	0.1345	
12- B	0.0440	-0.9816	0.5578	0.2305	0.7406	0.9676	-0.2739	
13- L	1.9635	0.8634	-2.1234	-0.1013	0.2551	-0.2854	0.2648	

Nesta matriz os vinhos apresentam-se claramente separados em brancos e tintos (Figura 114), estando os tintos muito bem agrupados em clusters bem separados e individualizados, apenas os vinhos da casta Aragonez se encontram muito dispersos; Os vinhos brancos estão mais dispersos, se bem que se note perfeitamente o afastamento do agrupamento correspondente ao vinho Roupeiro e ao vinho Tamarez. O vinho Manteúdo mantém a separação dos vinhos em dois sub-clusters de acordo com o resultado dos anos com valores anormais de prolina; O vinho Rabo de Ovelha apresenta-se regular-

mente distribuído se bem que em cluster mais desagregado.

Na Tabela 72 em que se representa a formação dos centróides podemos verificar a forma como os agrupamentos foram feitos.

Tabela 72  
Definição do agrupamento na aplicação da análise discriminante à matriz TNBR1

Grupos	Centroides						
1	3.476	-2.925	-0.791	-0.446	0.330	0.141	-0.029
2	2.148	1.635	0.247	-1.204	-1.106	0.011	-0.059
3	2.243	1.361	-0.017	1.849	-0.048	0.62	0.064
4	1.944	0.176	1.135	0.934	0.254	-1.175	-0.038
5	-0.928	1.772	0.428	-0.883	1.458	0.196	-0.151
6	-3.596	-1.527	1.324	0.228	-0.412	0.196	-0.141
7	-2.990	0.438	-2.389	0.252	-0.173	-0.268	-0.029
8	-1.662	-0.192	0.581	-0.593	0.165	-0.024	0.764

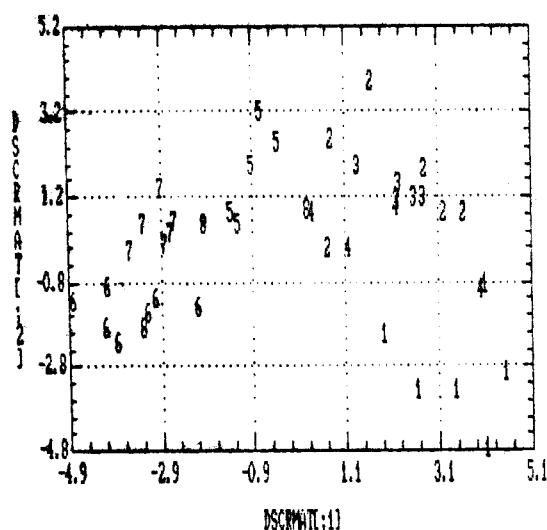


Figura 114: Projecção bidimensional da primeira *versus* a segunda função discriminante - matriz TNBR1. Identificação conforme Figura 109.

O agrupamento dos vinhos foi pois definido no primeiro centróide claramente entre brancos e tintos, no segundo centroide é separado o vinho Roupeiro dos restantes brancos, e nos tintos os vinhos Moreto e Periquita. No terceiro centroide ficam practi-

camente separados todos os vinhos se bem que o Aragonês e o Moreto se reaproximem, enquanto que no quarto o Periquita e o Trincadeira sofrem agora reaproximação. Esta tendência vai-se desfazendo nos centroides seguintes enquanto que se vai notando uma maior reaproximação dos vinhos brancos tirando o Roupeiro. Os vinhos encontram-se todos no entanto bem individualizados (Figura 114).

Tabela 73  
Coeficientes de Discriminação Normalizados - Matriz TNBR2

Variável							
1- A	0.5134	-0.7898	-0.8791	0.6105	0.2259	-0.6314	-0.3335
2- C	-0.5478	0.0889	-0.5888	-0.4225	0.1768	0.1817	-0.5019
3- V	0.6587	0.0187	-0.8150	-0.6439	-0.4913	0.0381	0.5925
4- T	0.2753	0.3512	0.5174	0.0181	-0.7757	0.7400	0.2102
5- G	-0.2386	0.9319	-7.76E <sup>-3</sup>	0.2165	-0.0883	-0.0645	0.0433
6- Z	-0.4021	-0.2284	0.6851	-0.2557	-0.4716	-0.6615	0.0434
7- F	0.4794	-1.7402	-0.8799	0.5626	-0.3399	-0.2056	-0.6956
8- B	-0.0630	-0.8041	-0.6775	0.1168	0.7157	0.7904	0.2055
9- L	-1.6239	1.7661	1.3110	-0.0144	0.3625	-0.1004	0.7016

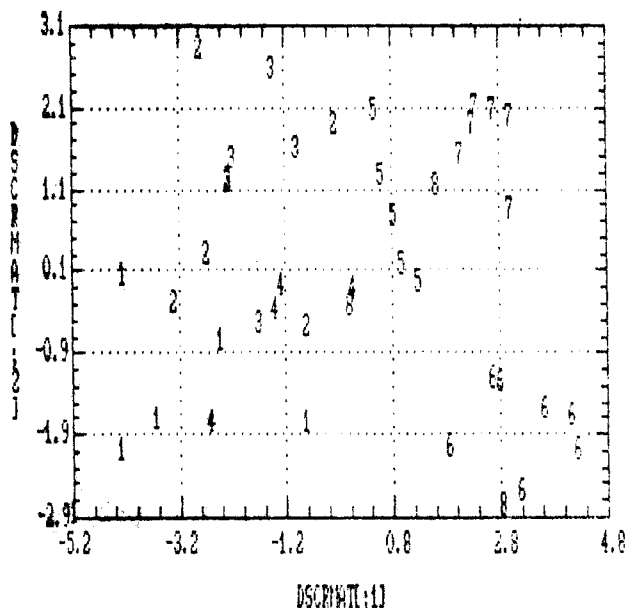


Figura 115: Projecção bidimensional da primeira função discriminante versus a segunda - matriz TNBR2. Identificação conforme Figura 109.



Na matriz TNBR2 em que as três primeiras funções discriminantes são responsáveis por 92,8 % da variância (Tabela 70), as variáveis mais significativas são, na primeira função valina -V-, alanina -A- e fenilalanina -F-, na segunda glicina -G-, treonina -T- e leucina -L- e finalmente na terceira apenas a mais o ácido glutâmico/glutamina -Z-, mantendo-se a treonina e a leucina (Tabela 73).

Tabela 74  
Definição do agrupamento na aplicação da análise discriminante à matriz VNTN2

Grupos	Centroides						
1	-3.433	-1.530	1.203	0.027	0.360	0.097	0.010
2	-2.028	0.871	0.196	-0.310	-0.787	0.110	-0.028
3	-1.720	1.259	-1.309	1.232	0.319	0.054	-6.08E <sup>-3</sup>
4	-1.310	-0.593	-0.963	-0.327	-0.303	-0.488	0.046
5	0.831	0.837	-0.900	-1.279	0.453	0.220	0.019
6	3.221	-1.788	-0.382	0.367	-0.254	0.156	2.79E <sup>-3</sup>
7	2.573	1.722	1.471	0.261	0.051	-0.091	0.029
8	1.487	-0.657	0.118	-0.299	0.459	-0.404	-0.082

Na Figura 115 em que se apresenta a separação dos vinhos de acordo com esta análise, verifica-se haver uma separação muito boa dos vinhos tintos, com todos os vinhos ainda em clusters mais nítidos do que na análise anterior. Aos vinhos tintos este número reduzido de variáveis discriminantes é suficiente para a separação. Nos vinhos brancos o Roupeiro de 1980 está nitidamente afastado dos restantes e parece nem sequer sofrer qualquer influência das variáveis características das duas primeiras funções discriminantes (Figura 115), os restantes vinhos desta casta estão também mais dispersos do que na análise anterior (Figura 115). O vinho Rabo de Ovelha está mais bem aglomerado estando o vinho de 1982 mais afastado. No Tamarez é também o de 1980 que se afasta do cluster que contém todos os restantes e o Manteúdo é o mais disperso. Destes resultados podemos concluir que os vinhos Tintos são discriminados por um menor número de variáveis do que os brancos. Dentre os brancos o vinho Manteúdo necessita de maior número de variáveis do que as contidas nesta função, o que aliás

está de acordo com o padrão individual deste vinho; O número de variáveis utilizadas nesta análise é suficiente para atenuar a influencia do clima nos vinhos tintos, para os vinhos brancos essa influencia ainda é acentuada.

As separações ficam definidas, igualmente como na matriz anterior, entre brancos e tintos logo no primeiro centroide, e logo aqui se separa um pouco o vinho Moreto. No segundo centroide separam-se praticamente todos os restantes vinhos (Tabela 74).

**7:2:4:4 - Aplicação do método de componente principal como técnica supervisionada aos resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres dos vinhos tintos e brancos separadamente**

A análise de componente principal foi também aplicada aos vinhos tintos e brancos individualmente de forma a tentar encontrar um conjunto de variáveis que caracterizassem de forma inequívoca cada tipo de vinho de modo a que cada vinho pudesse ser independentemente identificado. Nas tabelas 75 e 76 indicam-se as percentagens de variância contidas nos componentes principais de cada um dos vinhos estudados.

Tabela 75  
Percentagem de variância em cada um dos componentes principais dos vinhos tintos estudados

Nº comp.	Periquita	Aragonez	Trincadeira	Moreto
1	55.37	64.27	38.03	67.32
2	20.48	35.73	32.93	17.52
3	11.59	0.00	6.59	9.56
4	8.18	0.00	0.99	5.60
5	4.37	0.00	0.58	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00

Da apreciação da tabela 75, correspondente aos vinhos tintos, verifica-se que o vinho da casta Periquita é aquele que tem a percentagem de variância mais distribuída ao longo dos componentes principais, se bem que a percentagem de 75,7 % nos dois

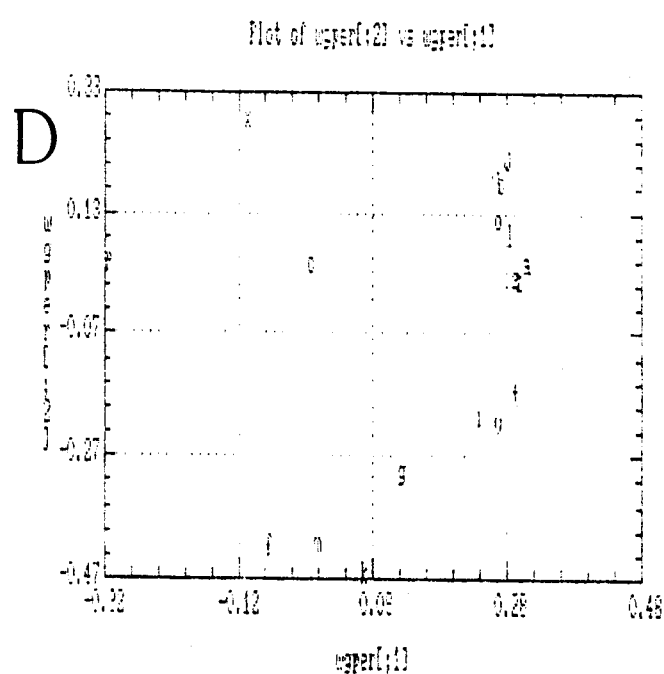
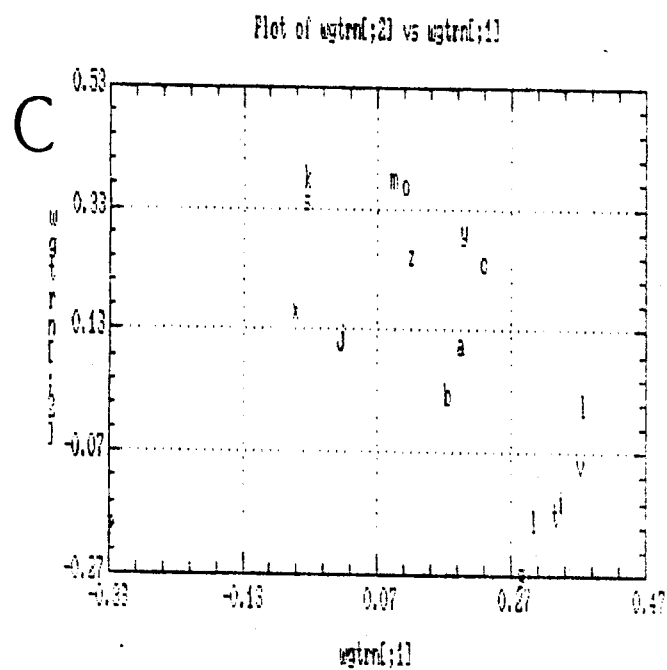
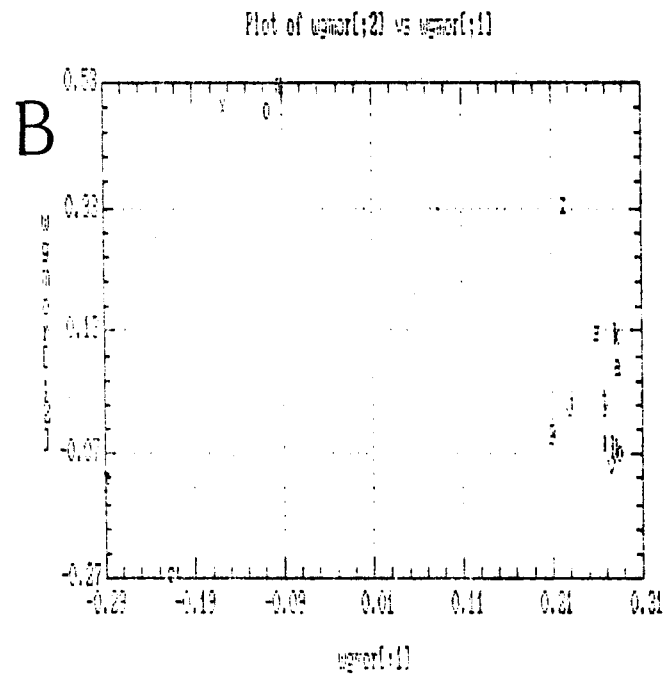
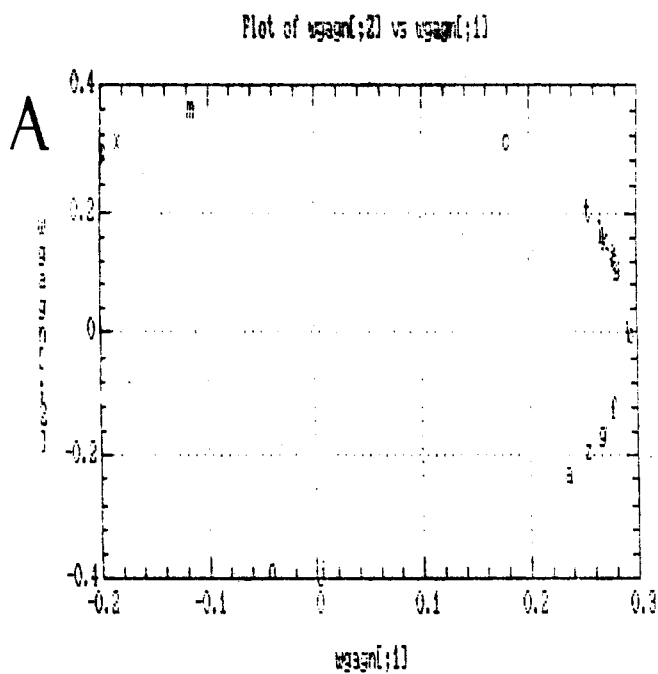


Figura 116: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos dos dois primeiros componentes, A- Aragonés; B- Moreto; C- Trincadeira; D- Periquita. Identificação conforme Figura 79.

primeiros seja suficiente para definir o vinho. O vinho Aragonês fica completamente caracterizado pelos aminoácidos mais pesados dos dois primeiros componentes e o vinho Moreto é semelhante ao Periquita. O vinho Trincadeira é o que está mais definido pelos dois primeiros componentes já que a percentagem de variância nestes dois componentes é muito semelhante (38,0 % e 32,9 %), devendo ser considerados na definição do padrão os aminoácidos mais pesados dos dois primeiros componentes. Na figura 115 representa-se graficamente a distribuição dos pesos dos aminoácidos nos vários vinhos para os dois primeiros componentes.

Tabela 76  
 Percentagem de variância em cada um dos componentes principais dos vinhos brancos estudados

Nº comp.	Roupeiro	R. Ovelha	Tamarez	Manteúdo
1	50.82	48.58	38.97	53.11
2	23.71	31.35	27.74	20.48
3	13.39	20.07	10.60	12.77
4	9.03	0.00	0.00	8.01
5	3.05	0.00	0.00	5.63
6	0.00	0.00	0.00	0.00

Na tabela 76, referente aos vinhos brancos, verifica-se que o vinho Roupeiro Rabo de Ovelha e Manteúdo são preferencialmente caracterizados pelos aminoácidos mais pesados no primeiro componente enquanto que o vinho Tamarez é quase que igualmente caracterizado pelos aminoácidos do primeiro e segundo componente principal. No conjunto os dois primeiros componentes são responsáveis por 74,5 % da variância total no Roupeiro, 73,5 % no Manteúdo, 79,8 % no Rabo de Ovelha e 66,6 % no Tamarez.

Na figura 117 estão as representações gráficas dos pesos dos dois primeiros componentes principais dos vários vinhos brancos. Da análise das figuras 116 e 117 foi possível elaborar a tabela que contém os aminoácidos característicos de cada um dos vinhos (brancos e tintos) estudados.

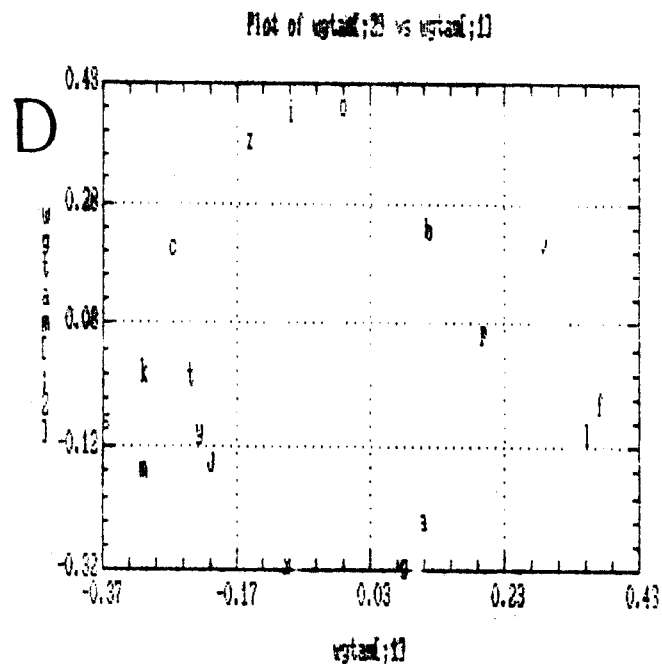
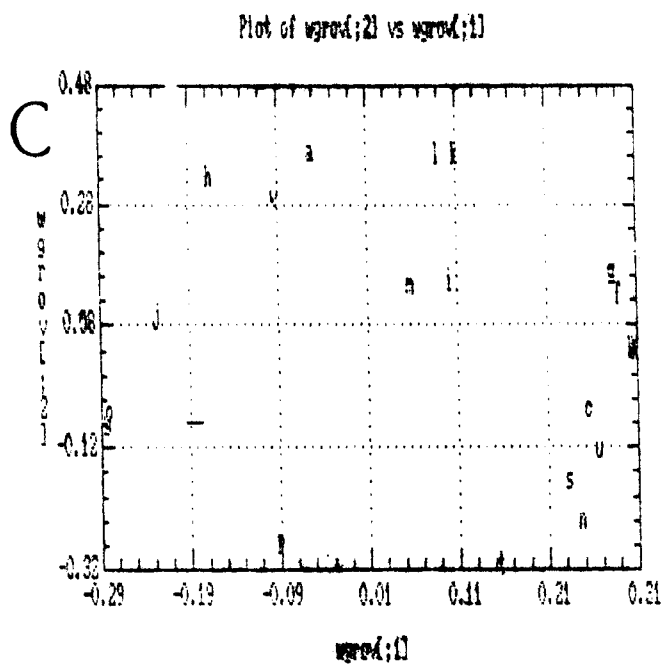
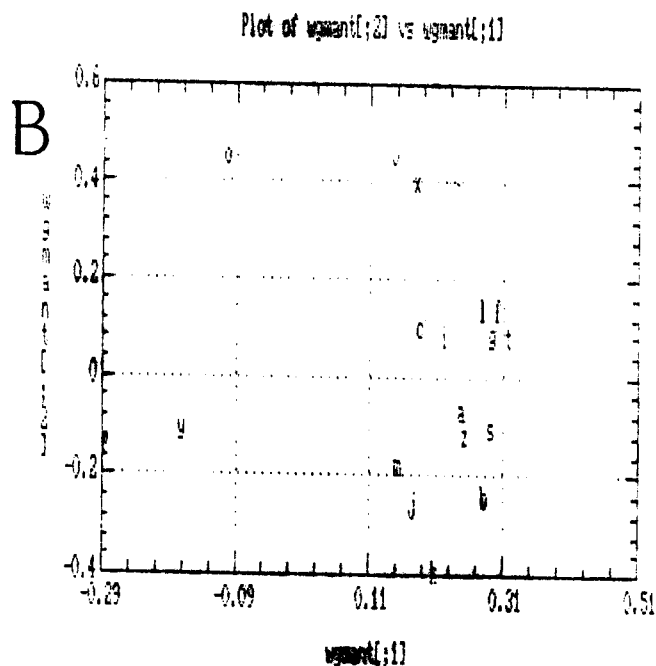
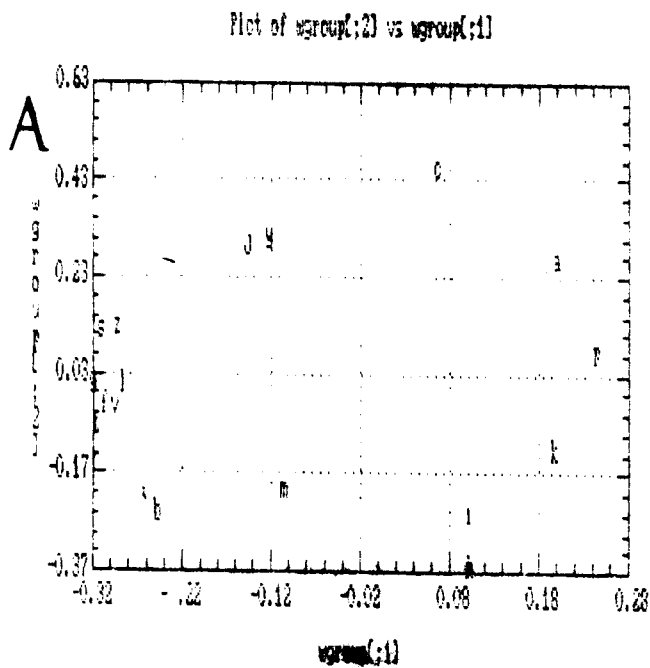


Figura 117: Projecção bidimensional dos pesos dos aminoácidos dos primeiros componentes principais. A- Roupeiro; B- Manteúdo; C- Rabo de Ovelha; D- Tamarez. Identificação conforme Figura 79.

Tabela 77  
 Aminoácidos definidores do perfil característico dos vinhos tintos. Aplicação do método de componente principal aos resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres

AA	Vinho			
	Moreto	Trincadeira	Periquita	Aragonez
Ala-A	X	X	X	X
Gly-G	X	---	---	X
Ser-S	X	X	X	X
Tre-T	X	---	X	X
Val-V	X	---	X	---
Cys-C	---	X	---	---
Gaba-J	X	X	X	---
Leu-L	X	---	X	X
Ile-I	X	---	---	X
Pro-P	---	---	---	---
Met-M	---	X	---	---
Hyp-X	---	X	---	---
Asx-B	X	X	X	X
Glx-Z	---	X	X	X
Lys-K	X	X	---	X
Tyr-Y	---	X	---	X
Orn-O	---	X	X	---
Phe-F	X	---	---	X

As figuras 118 e 119 representam o plot dos vinhos de cada casta para os vários anos. Pode-se realçar a importância que cada ano climático tem na caracterização do vinho. O vinho Trincadeira (fig. 118 C) apresenta como mais distante o vinho do ano de 1980 e de seguida o vinho do ano de 1978, o vinho da casta Aragonez (fig. 118 A) apresenta os três anos muito ortogonais em relação uns aos outros se bem que o ano 1981 e 1982 sejam caracterizados quase que igualmente pelos aminoácidos do primeiro componente, o ano de 1982 é contudo também muito influenciado pelos aminoácidos do segundo componente. O vinho do ano de 1978 está muito distante dos dois. O vinho da casta Periquita (fig. 118 D) apresenta também com valores mais afastado o vinho do ano de 1978 se bem que também o vinho de 1977 seja relativamente diferente dos restantes. O Moreto (fig. 118 B) é o único em que a maioria dos anos se encontra dispersa e, se bem que o vinho de 1978 esteja isolado, o facto é que também está o vinho de 1982 e 1981.

Tabela 78  
 Aminoácidos definidores do perfil característico dos vinhos  
 brancos. Aplicação do método de componente principal aos  
 resultados das concentrações relativas dos aminoácidos livres

AA	Vinho			
	Roupeiro	Rabo de Ovelha	Manteúdo	Tamarez
Ala	X	---	X	X
Gly-G	---	X	X	X
Ser-S	---	X	X	---
Tre-T	---	X	X	---
Val-V	---	---	---	X
Cys-C	X	X	X	---
Gaba-J	---	---	---	---
Leu-L	---	---	X	X
Ile-I	X	---	X	---
Pro-P	X	---	---	X
Abu-U	X	---	---	---
Met-M	---	---	X	---
Hyp-X	X	---	---	---
Asx-B	X	---	X	X
Glx-Z	X	---	X	---
Lys-K	---	x	---	---
Tyr-Y	---	---	---	---
Arg-R	---	---	---	---
His-H	---	---	---	---
Orn-O	---	---	---	---
Phe-F	X	---	X	X
Sar-N	X	---	---	---

Para os vinhos brancos verifica-se que no caso do vinho Tamarez é o de 1980 o mais distante, e principalmente é este vinho que é mais caracterizado pelos aminoácidos do segundo componente enquanto que os restantes se distribuem ao longo do eixo que representa o primeiro componente (fig. 119 D). O vinho Manteúdo tem o ano de 1978 muito distante dos restantes e igualmente mais caracterizado pelos aminoácidos do segundo componente. Neste vinho o ano de 1981 aparece também afastado (fig. 119 B). No Roupeiro está igualmente mais afastado o vinho relativo ao ano de 1980 (fig. 119 A). O vinho da casta Rabo de Ovelha, com apenas quatro anos, a distribuição é bastante grande podendo-se no entanto dizer que o ano de 1978 é também o menos caracterizado pelo conjunto de aminoácidos definidos nestes dois componentes (fig. 119 C).

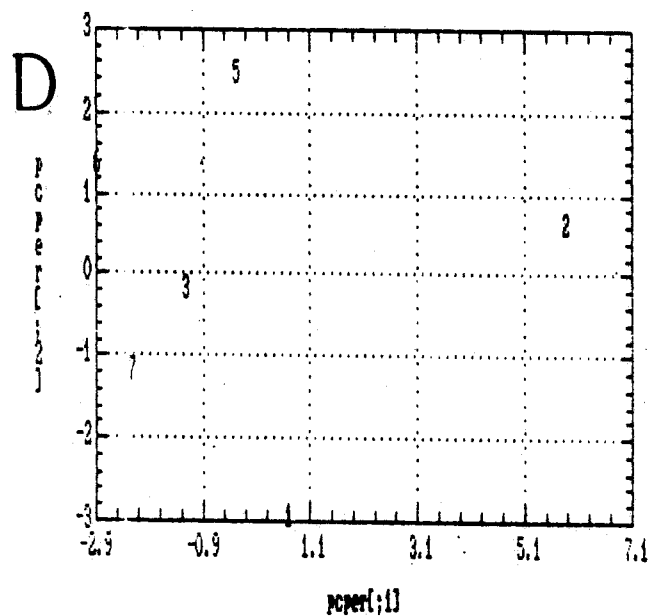
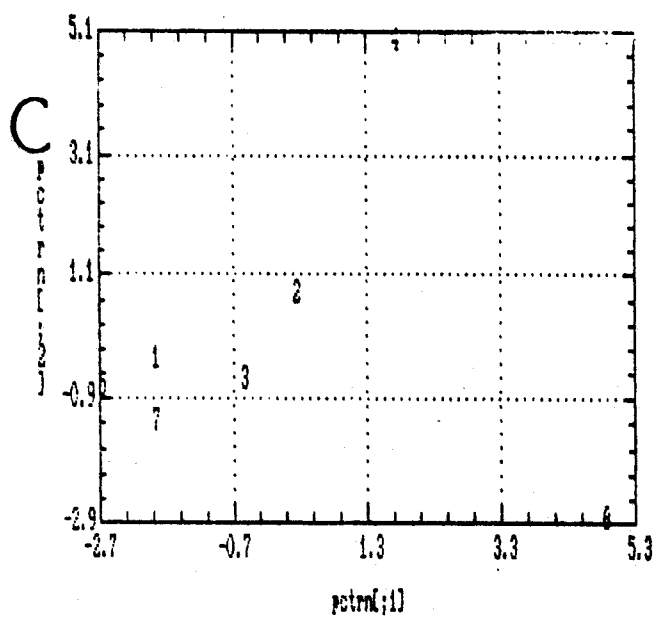
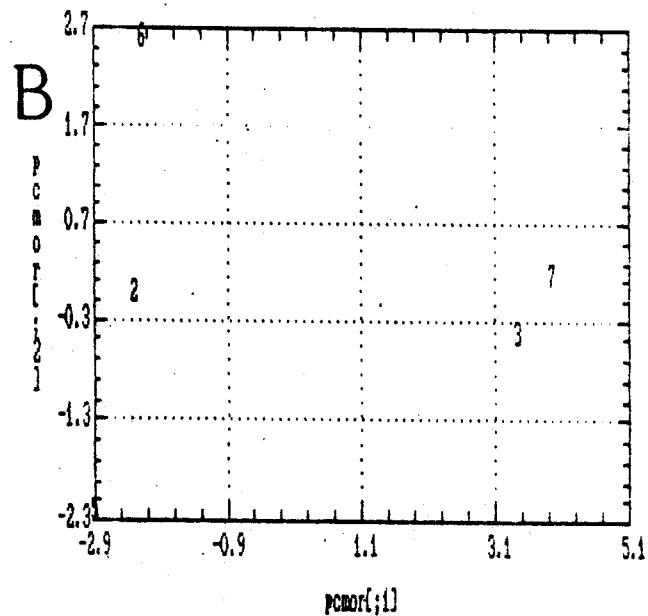
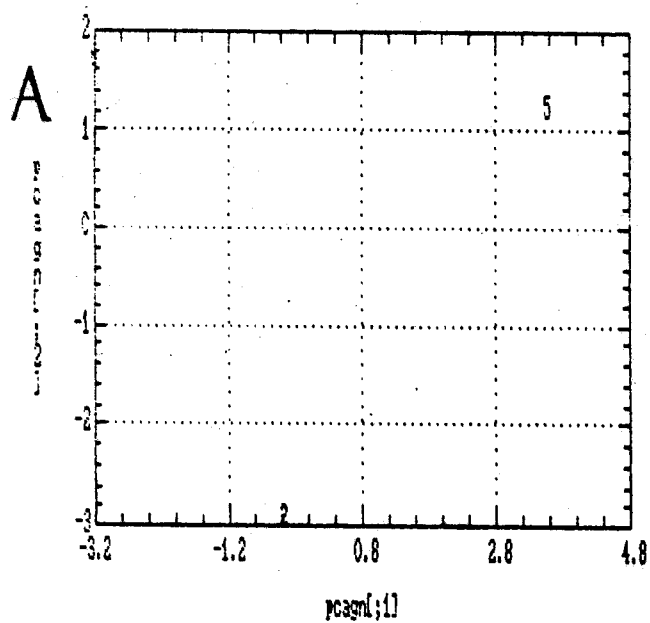


Figura 118: Projecção bidimensional primeiro *versus* o segundo componentes principais. A- Aragonéz; B- Moreto; C- Trincadeira; D- Periquita. 1-1977; 2-1978; 3-1979; 4-1980; 5-1981; 6-1982; 7-1983;



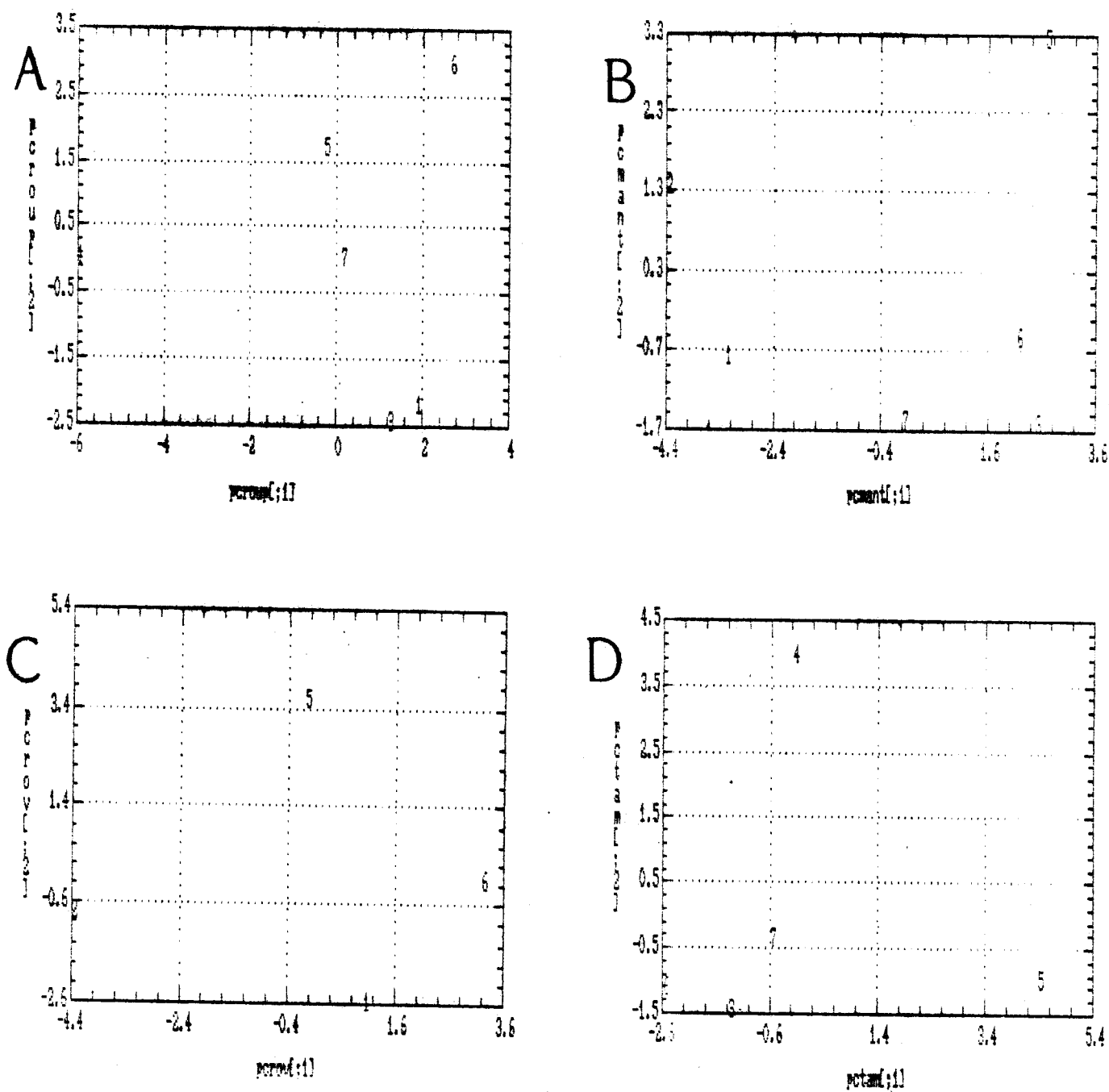


Figura 119: Projecção bidimensional do primeiro *versus* o segundo componentes principais. A- Roupeiro; B- Manteúdo; C- Rabo de Ovelha; D- Tamarez. 1-1977; 2-1978; 3-1979; 4-1980; 5-1981; 6-1982; 7-1983.

Estes resultados, com exceção talvez para o vinho Moreto, estão de acordo com os resultados climáticos e ainda com a análise discriminante e de componente principal quando aplicadas à totalidade dos vinhos, no que respeita a individualizar ou apresentar padrões diferentes para os vinhos de anos climaticamente deficientes realçando a utilidade da análise de perfil na caracterização enológica.

#### **7:2:4:5 - Aplicação do método da árvore de expansão mínima aos vinhos brancos e tintos individualmente**

Este método foi aplicado basicamente com o mesmo fim da análise anterior de componente principal, quando aplicada às castas individualmente. Os dados de cada vinho foram introduzidos de acordo com as tabelas 28 e 30, considerando como variáveis os aminoácidos, e como casos os anos. A análise foi a cada casta (quer branca quer tinta) individualmente. A maioria dos cálculos foi manual tendo como fim uma análise meramente exploratória. Por computador foi calculada apenas a matriz de correlações, para o que se utilizou a distância Euclideana.

As distâncias foram colocadas por ordem crescente. Tanto o traçado da árvore, como a "poda" foram manuais.

Na figura 120 apresentam-se as árvores correspondentes aos vinhos tintos, e na figura 121 as correspondentes aos vinhos brancos.

Nas tabelas 79 e 80 estabelece-se o perfil característico de cada vinho de acordo com os resultados obtidos por este método. As tabelas 81 e 82 comparam os perfis obtidos pelos dois métodos, componente principal (tabelas 77 e 78) e expansão mínima (tabelas 79 e 80).

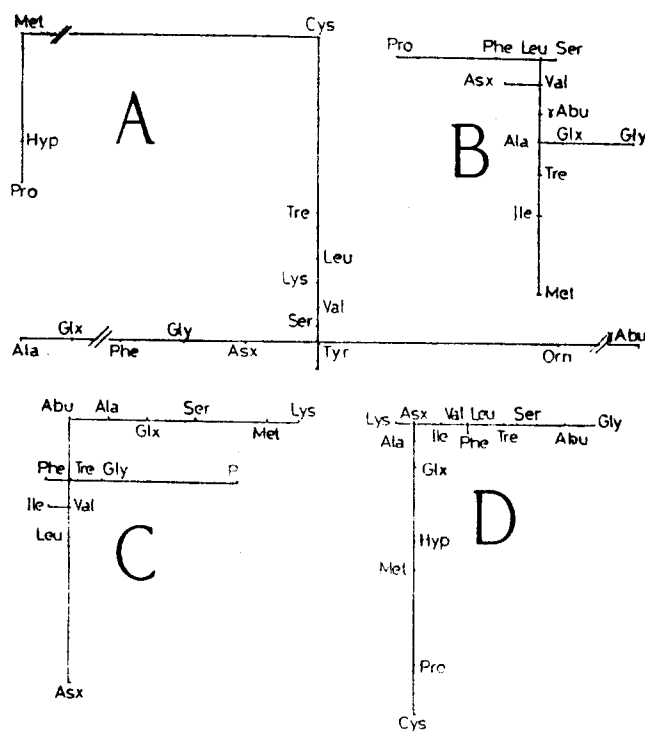


Figura 1.20: Árvores de expansão mínima. A- Aragonez; B- Moreto; C- Trincadeira; D-Periquita

Tabela 79

Aminoácidos definidores do perfil característico dos vinhos Tintos definidos pela aplicação do método da árvores de expansão mínima às concentrações relativas de aminoácidos livres

AA	Vinho			
	Moreto	Trincadeira	Periquita	Aragonez
Ala	X	---	X	---
Gly-G	---	X	---	---
Ser-S	X	---	X	X
Tre-T	X	X	X	X
Val-V	X	X	X	X
Cys-C	---	---	---	---
Gaba-J	---	---	X	---
Leu-L	X	X	X	X
Ile-I	X	X	X	X
Pro-P	---	---	---	---
Met-M	---	---	---	---
Hyp-X	---	---	---	---
Asx-B	X	---	X	---
Glx-B	---	---	X	---
Lys-K	X	---	---	X
Orn-O	---	---	---	---
Phe-F	X	X	---	---

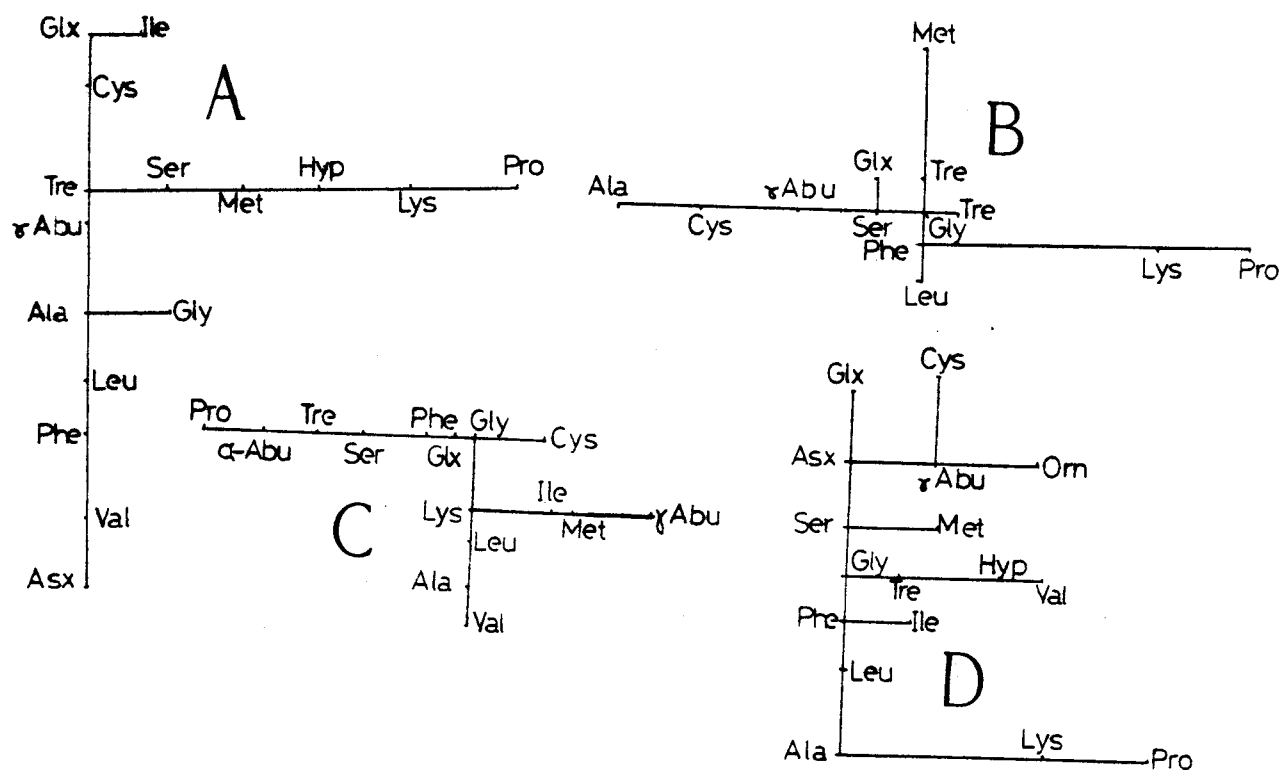


Figura 121:Árvores de expansão mínima. A- Roupeiro;B- Manteúdo; C- Rabo de Ovelha; D- Tamarez

Tabela 80

Aminoácidos definidores do perfil característico dos vinhos Brancos definidos pela aplicação do método da árvores de expansão mínima às concentrações relativas de aminoácidos livres

AA	Vinho			
	Roupeiro	Rabo de Ovelha	Manteúdo	Tamarez
Ala-A	---	---	---	---
Gly-G	X	X	X	---
Val-V	X	---	---	---
Tre-T	X	X	X	X
Ser-S	X	X	X	X
Leu-L	X	---	X	---
Ile-I	---	---	X	X
Gaba-J	---	---	---	X
Pro-P	---	---	---	---
Cys-C	---	X	---	X
Met-M	---	---	---	X
Glx-Z	X	X	X	X
Asx-B	---	---	X	---
Hyp-X	---	---	X	X
Phe-F	---	X	X	---
Lys-K	---	---	---	---
Orn-O	---	---	---	---
Sar-N	---	---	---	---
Abu-U	---	---	---	---

De acordo com as tabelas 79 e 80 verifica-se que há um número relativamente elevado (entre 6 a 9) de aminoácidos que define o perfil de cada um dos vinhos estudados e que difere de vinho para vinho, como se esperava e era de desejar. O vinho Manteúdo (tabela 80) é, nos brancos, aquele que necessita de maior número de aminoácidos para estabelecer o perfil característico, enquanto que nos tintos são o Moreto e o Periquita. Como aminoácidos caracterizantes comuns a todos os vinhos temos a treonina-T, a serina -S e a isoleucina -I para os vinhos tintos, e para os brancos, a serina -S, treonina -T e ainda o glutâmico/-glutamina -Z.

Tabela 81

Comparação dos perfis característicos dos vinhos tintos, definidos pela aplicação dos métodos de componente principal (CP) e árvore de expansão mínima (EM), às concentrações relativas dos aminoácidos livres.

AA	Periquita		Aragonez		Moreto		Trincadeira	
	CP	EM	CP	EM	CP	EM	CP	EM
Ala	X	X	X	---	X	X	X	X
Gly	---	---	X	---	X	---	---	---
Val	X	X	---	X	X	X	---	---
Tre	X	X	X	X	X	X	---	X
Ser	X	X	X	X	X	X	X	X
Leu	X	X	X	X	X	X	---	---
Ile	---	X	X	X	X	X	---	---
Gaba	X	X	---	---	X	---	X	X
Pro	---	---	---	---	---	---	---	---
Cys	---	---	---	---	---	---	X	---
Hyp	---	---	---	---	---	---	X	---
Asx	X	X	X	---	X	X	X	---
Met	---	---	---	---	---	---	X	X
Glx	X	X	X	---	---	---	x	X
Pae	---	---	X	---	X	X	---	---
Orn	X	---	---	---	---	---	X	---
Lys	---	---	X	X	X	X	X	---
Tyr	---	---	X	X	---	---	X	---
Hyp	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabela 82

Comparação dos perfis característicos dos vinhos brancos, definidos pela aplicação dos métodos de componente principal (CP) e árvore de expansão mínima (EM), às concentrações relativas dos aminoácidos livres.

AA	Roupeiro		Rabo de Ovelha		Manteúdo		Tamarez	
	CP	EM	CP	EM	CP	EM	CP	EM
Ala-A	X	X	---	---	X	---	X	X
Gly-G	---	X	X	X	X	X	X	X
Ser-S	---	X	X	X	X	X	---	---
Tre-T	---	---	X	X	---	X	X	X
Val-V	---	---	---	---	---	---	X	X
Cys-C	X	X	X	X	X	---	---	---
Gaba-J	---	X	---	---	---	---	---	X
Leu-L	---	---	---	---	X	X	X	X
Ile-I	X	---	---	---	X	X	---	---
Pro-P	X	---	---	---	---	---	X	---
Abu-U			X	---				
Met-M	---	---	---	---	X	---	---	---
Hyp-X	X	---	---		---	X	---	---
Asx-B	X	---	X	---	X	X	X	X
Glx-Z	X	X	X	X	X	X	---	---
Lys-L	---	---	X	---	---	---	---	---
Tyr-Y	---		---		---		---	
Arg-R	X		---		---		---	
His-H	X		---		---		---	
Orn-O	---		---		---	---	---	
Phe-F	X	X	X	X	X	X	X	X
Sar-N			X	---				

A comparação dos perfis (Tabelas 81 e 82), não dá resultados muito diferentes, apesar de haver diferenças significativas quanto à exactidão esperada de cada um dos métodos, visto que o método da árvore de expansão mínima ser bastante mais empírico por ter sido feito manualmente e além disso as "podas", ou seja a definição dos agrupamentos, ser também manual. Por este motivo, consideraram-se os resultados obtidos pelo método do componente principal como os definidores do perfil para cada um dos vinhos. A aplicação do método de agrupamento cluster hierárquico foi feita baseada nos resultados sumarizados nas tabelas 77 e 78.

#### 7.2.4.6 - Aplicação da análise por "agrupamento hierárquico"

Os resultados obtidos pela análise de "árvore de expansão

mínima" e " componente principal" quando aplicadas a cada casta individualmente, fornecem um perfil característico de cada um dos vinhos estudados. A certeza de que esse perfil é identificativo de cada vinho foi conseguida aplicando o método de "agrupamento hierárquico". Os número de variáveis considerado como caracterizando o perfil para cada vinho (tabela 77 e 79) foi introduzido com os correspondentes valores numéricos. O dendograma obtido, representa-se na figura 122.

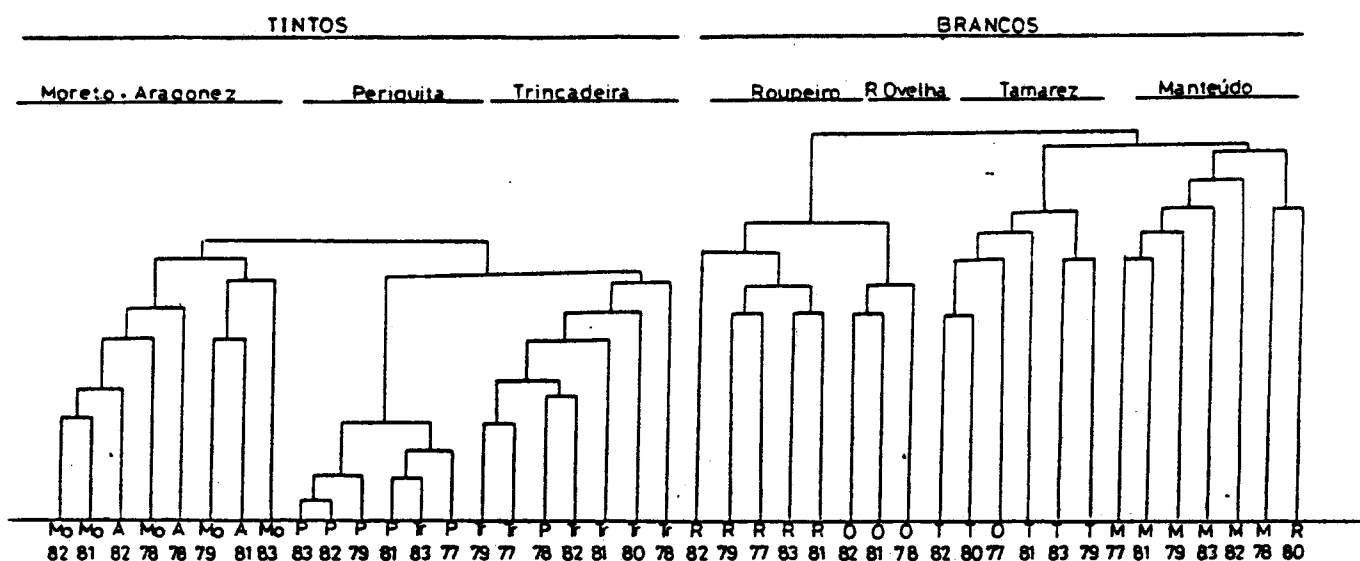


Figura 122: Dendograma de Caracterização de Vinhos Elementares Alentejanos pela Análise do Perfil De Aminoácidos Livres - padrões obtidos pela análise de componente principal, e com introdução de prolina para todos os vinhos excepto o Manteúdo.

Na figura 122 vinhos brancos e vinhos tintos encontram-se em agrupamento separado e dentro de cada agrupamento os vinhos de casta casta estão bem separados e mesmo em agrupamentos individuais, à excepção do vinho Moreto que aparece misturado com o vinho Aragonez, os quais por serem só três se consideram com pouco significado.

Muito fora do agrupamento está o vinho Roupeiro de 1980 que se encontra junto dos Manteúdos. Os vinhos Trincadeira de 1983 e Periquita de 1978 encontram-se um pouco fora dos agrupamentos respectivos mas não muito distantes, revelando que a similaridade

com o agrupamento a que realmente pertencem ainda é grande, o mesmo sucede com o vinho Rabo de Ovelha de 1977.

A utilização do perfil característico individualiza completamente os vinhos por castas de origem retirando praticamente a influencia climática, e fornecendo uma análise praticamente inequívoca.

#### 7.2.4.7 - Reconhecimento de perfil por inspecção visual de "projeções em estrela" ("Star Symbol Plot")

Este método foi aplicado apenas para reforçar o anterior, e por se obter uma imagem directa da possibilidade de caracterização fornecida pelos perfis de aminoácido livres. Foi aplicado igualmente aos padrões obtidos pela análise de componente principal. Cada variável é representado por um eixo da estrela começando pela horizontal (3 horas) e continuando no sentido contrário aos ponteiros do relógio (Figura 123).

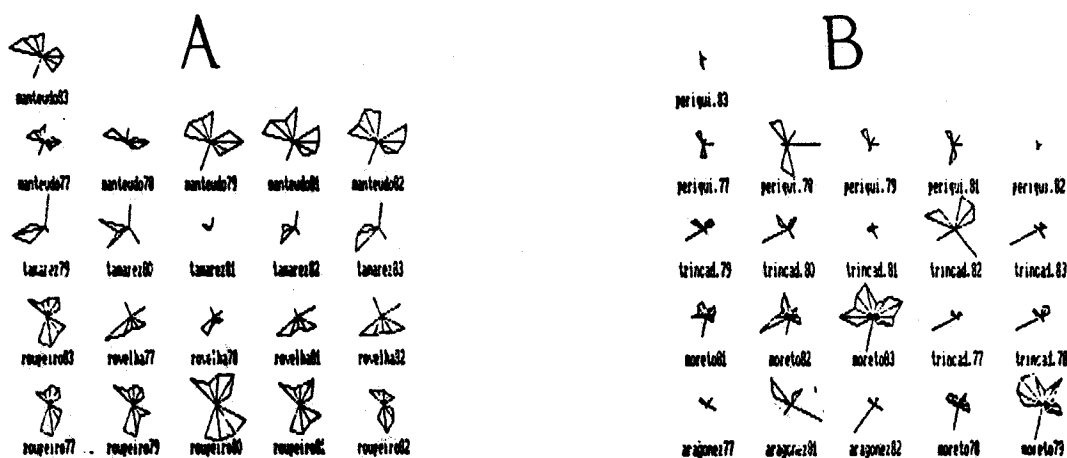


Figura 123: Representação gráfica da projecção em estrela A- Vinhos Brancos; B- Vinhos Tintos- padrões obtidos pela análise de componente principal

Cada vinho é claramente representado por símbolos diferentes (estrelas), e vinhos da mesma variedade são representados por estrelas iguais ou muito semelhantes. Esta análise reforça e confirma a utilidade da análise dos perfis de aminoácidos livres



tamente capaz de distinguir entre vinhos diferentes, mesmo provindo a uva da mesma região, é pois bastante promissor para satisfazer as propostas iniciais. Cada vinho possui um padrão característico, o que torna a análise de aminoácidos útil na repressão de fraudes. Os padrões encontrados são capazes de distinguir entre vinhos diferentes.

## 8 - CONCLUSÃO

O trabalho realizado pode ser dividido em duas partes principais: a primeira diz respeito ao estabelecimento do método, e a segundo à análise dos vinhos elementares e tratamento posterior dos resultados obtidos, utilizando métodos quimiométricos de análise de padrão.

O estabelecimento do método de análise, nomeadamente a escolha dos derivados, é pedra basilar do presente estudo. De facto, a derivatização química e análise de aminoácidos, por cromatografia gás-líquido, permanece um campo controverso. Os métodos desenvolvidos e descritos na literatura são numerosos. Por outro lado, exigem conhecimento profundo das técnicas de cromatografia, não só para levar a cabo uma análise qualitativa em condições inequívocas, mas, também, para a obtenção de resultados fiáveis e reproduzíveis. O problema fundamental da análise destes compostos decorre do facto de, para além de possuírem uma estrutura comum, conterem uma diversidade de grupos funcionais diferentes, que compõe as várias cadeias laterais. Desta diversidade de grupos funcionais, resulta ter de se lidar, ao mesmo tempo, com compostos fácil e dificilmente derivatizáveis, compostos com altos e baixos pesos moleculares, e consequentemente com estabilidades térmicas diferentes e um largo leque de temperaturas de volatilização. As realidades expostas levam a que seja necessário um conhecimento profundo dos problemas envolvidos numa análise por cromatografia gás-líquido capilar, nomeadamente nos seus pontos fundamentais: a coluna capilar, o sistema de injeção, o sistema de detecção, bem como da estrutura final dos derivados obtidos. Todos estes parâmetros têm que ser rigorosamente conhecidos, de

modo a poderem ser otimizados;

O esforço realizado, no sentido de utilizar conscientemente um técnica tão delicada, está descrito no capítulo 5. Foram ensaiados dois tipos de derivados: os ésteres isopropílicos de N-heptafluorbutiril aminoácidos, e os derivados N-etoxicarbonílicos dos mesmos ésteres.

No estudo dos derivados N-etoxicarbonilados, como estes foram totalmente desenvolvidos no decorrer do trabalho, foram avaliadas as características cromatográficas. A determinação das características cromatográficas de derivados, para serem utilizados em cromatografia gás-líquido, passa pela avaliação da resposta relativa para o FID (detector de ionização de chama). Determinaram-se ainda as condições mais favoráveis de derivatização, jogando, principalmente, com a temperatura a que decorre a reacção de acilação, por ser esta a reacção que mais influi no rendimento global. As condições óptimas de derivatização foram determinadas calculando os factores de resposta, para vários tempos e temperaturas de acilação e esterificação, escolhendo o conjunto temperatura/tempo que fornece os factores de resposta mais favoráveis para a maioria dos aminoácidos. Nestas condições, e já que a resposta relativa do detector depende, também, da forma como é feita a injeção (discriminação), controlou-se igualmente a técnica de injeção e a sua reprodutibilidade. Para estes derivados determinou-se ainda a estabilidade nas condições de armazenamento em frigorífico. A qualidade da coluna capilar, o "coração" do método, foi sempre controlada por injeção da mistura teste de GROB, sendo substituída sempre que as suas características de eficiência e/ou separação se mostravam degradadas;

Os derivados N-etoxicarbonílicos não são, porém, capazes de derivatizar a arginina, sem recorrer a um passo adicional de derivatização, a transformação da arginina em ornitina. Este aminoácido, não proteico, é um dos possíveis constituintes de alguns vinhos.

Nesta fase da investigação optou-se pelo método já estabelecido de formação dos derivados N-heptafluorbutíricos dos ésteres isopropílicos. Ao escolher estes derivados, já descritos, apenas

houve necessidade de afinar as condições de derivatização, visto que, a sua resposta para o FID, já é conhecida como sendo linear.

O controlo das condições de derivatização foi realizado, igualmente por determinação dos factores de resposta, mas foi também realizado por espectrometria de massa. A espectrometria de massa pode ser aplicada ao controlo de afinamento das condições de derivatização. Permite avaliar quantos derivados se formam por composto, no caso eventual de se formar de se formar mais do que um, e quais as condições em que se consegue a formação de apenas um derivado por composto, de modo a que a quantificação seja reprodutível e decorra, sempre, com taxas iguais de rendimento. Obtiveram-se, concomitantemente, os padrões de fragmentação dos derivados N-heptafluorbutíricos dos ésteres isopropílicos da totalidade dos aminoácidos proteicos e de alguns não proteicos. Manipulando os conceitos e as técnicas de cromatografia, em função destes estudos preliminares, pôde, por fim, passar-se para a análise dos vinhos elementares, com segurança nos resultados quantitativos e qualitativos que se obtiveram.

Os vinhos elementares forma analisados de modo a obter as percentagens relativas dos seus aminoácidos livres, para cada ano de estudo, o que no total equivale a terem-se analisado oito vinhos, durante um período de sete anos. A escolha do tipo de variável a utilizar para obtenção do padrão característico de cada vinho elementar (aminoácidos livres ou aminoácidos após hidrólise), foi decidido pelo estudo das susceptibilidades hidrolíticas de uma mistura de padrões de aminoácidos. A degradação dos vários aminoácidos é diferente nas condições de hidrólise, sendo, portanto, o perfil caracterizado pelos resultados obtidos para as percentagens relativas dos aminoácidos totais menos susceptível de apresentar um padrão característico. Isto foi demonstrado por comparação dos perfis obtidos para o vinho Roupeiro, num e noutro caso. A possível influência do tipo de leveduras e, conseqüentemente, a influência da casta e da região, foi estudada. Determinaram-se os aminoácidos livres produzidos por cinco estirpes de leveduras, isoladas da mesma vinha de que provêm os vinhos estudados. Este estudo foi realizado fazendo fermentar as leveduras em meios não contendo aminoácidos e con-

tendo, como fonte de azoto, fosfato de amónio ou ureia. Os resultados obtidos demonstraram que o tipo de aminoácidos exudados para o meio, varia, de acordo com a estirpe de levedura utilizada, em função do meio de fermentação.

Estes resultados reforçaram o pressuposto de que o património genético da casta (substrato), e o meio ambiente em que ela se desenvolve, tem influência no perfil final de aminoácidos. Com os ensaios realizados com estas cinco estirpes foi possível realizar a chave que permite a classificação quimiotaxonómica das estirpes estudadas, de acordo com os aminoácidos produzidos em cada um dos meios. Este trabalho, se bem que diga respeito apenas às cinco estirpes ensaiadas, parece ser promissor para a caracterização de estirpes de leveduras.

Tendo sido estabelecido qual o parâmetro com mais interesse para a caracterização enológica, *via* aminoácidos, foram calculadas as suas concentrações relativas e aos resultados obtidos aplicaram-se as técnicas de análise de perfil.

As técnicas utilizadas foram a análise de componente principal, a análise discriminante, a análise de árvore de expansão mínima, o agrupamento hierárquico e a inspecção visual de projecções em estrela.

A análise de perfil aplicada a dados enológicos tem sido utilizada com sucesso por outros autores, recorrendo aos resultados de análises elementares<sup>202, 203, 204</sup>, aos aminoácidos totais<sup>157</sup> e, ainda, aos resultados da análise de voláteis<sup>205, 206</sup>. Os resultados obtidos têm, na maioria dos casos, servido para a caracterização de vinhos, de acordo com as suas zonas de origem<sup>204, 157</sup>, para diferenciar vinhos da mesma casta provenientes de zonas diferentes do Globo<sup>205</sup>, e, ainda, para dividir regiões vícolas em subzonas de aptidão vícola<sup>204 207</sup>.

A aplicação de técnicas de análise de perfil aos resultados obtidos pela análise dos voláteis, tem sido, inclusivamente, acompanhada de testes sensoriais<sup>206</sup>. Este tipo de aproximação, se bem que de grande interesse, obriga a vários pressupostos, os quais, por possuírem componentes subjectivos estão sujeitos a dificuldades de avaliação. Os pressupostos que atrás referimos

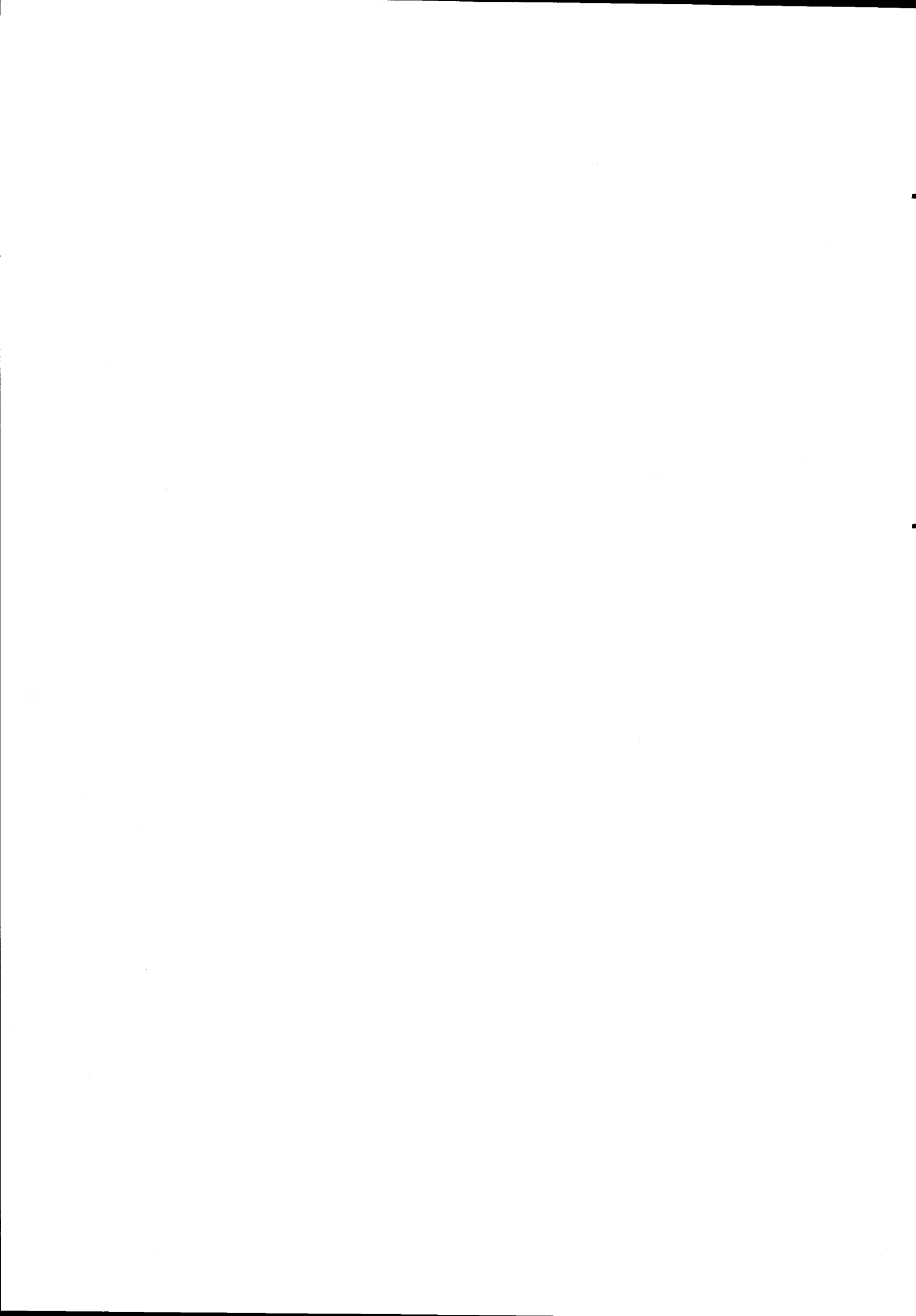
são: a obtenção de painéis de provadores com antecedentes conhecidos (idade, sexo, fumador ou não fumador, altura e peso, dieta alimentar etc.), provadores de várias zonas do país, de modo a fornecerem resultados imprevistos, e, principalmente, provadores que forneçam resultados utilizando, sempre, a mesma escala de valores e de acordo com o mesmo método de prova, de modo a puderem ser feitas provas interlaboratoriais ou inter painéis correlacionáveis<sup>208</sup>. Tais pressupostos, tornam a aplicação dos resultados dos testes sensoriais difícil, correndo-se o risco de, caso não se obedeça a eles, se obter uma série de resultados dispares e de interpretação equívoca. Optou-se por não recorrer aos testes sensoriais.

Dos resultados obtidos pôde concluir-se, no caso dos vinhos elementares estudados, que o teor de aminoácidos livres, quando expressos de acordo com as suas percentagens relativas, é susceptível de definir, para cada vinho, um perfil característico, ou pelo menos caracterizante, da casta de origem. A aplicação de métodos estatísticos não paramétricos é inevitável, visto se estar a trabalhar com uma população não "normal". Quando apreciados em termos de médias relativas interanuais e médias intervarietais, o perfil característico da casta não é realçado, facto que é de esperar ao trabalharmos com uma população deste tipo. A influência do clima, principalmente a influência negativa do clima, é notória, mesmo quando se aplicam os métodos por nós utilizados, embora, nestas condições, essa influência venha atenuada e não chegue a perturbar o perfil final. Pela aplicação de métodos de análise de "componente principal" foi escolhido um reduzido número de aminoácidos capaz de distinguir entre os vários vinhos, como se mostrou pela realização da análise por agrupamento hierárquico.

A análise de perfil, aplicada ao espectro de aminoácidos livres nos vinhos estudados, foi capaz de fornecer uma "impressão digital" característica de cada vinho, reconhecendo-o no meio de outros pela análise de componente principal e análise discriminante. O método mostrou ser capaz, dentro do âmbito dos estudos efectuados, de reconhecer parentesco de grupo, isto é, torna possível a comparação de perfis de objectos-problema com os

perfis já conhecidos para outros vinhos de referência, pelas análises de agrupamento e projecção em estrela.

**2ª PARTE**





## 1- MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 - Reagentes

Os padrões de aminoácidos foram obtidos junto da firma BDH e são cromatograficamente puros. A cicloleucina foi adquirida à firma Aldrich Europe. Os hidrocarbonetos utilizados como padrão interno foram adquiridos à Polyscience Corporation. As soluções alcoólicas de HCl foram obtidas por adição lenta de cloreto de acetilo Merck (Darmstadt), recentemente destilado, à quantidade mínima do correspondente álcool, a baixa temperatura e o volume completado em balão volumétrico até se atingir a concentração final desejada. O cloroformiato de etilo, anidrido heptafluorbutírico, o n-hexano, o n-butanol e o diclorometano foram fornecidos pela firma Merck (Darmstadt) e utilizados após destilação prévia. Etanotiol foi fornecido pela firma Pierce Chemical Co. (Rockford IL.) e utilizou-se sem destilação prévia. As soluções de NaOH 1N e HCl 1N foram preparadas a partir produtos Merck (Darmstadt). A resina utilizada na cromatografia de troca-iônica foi do tipo Dowex 50W-X8 na forma  $H^+$  e foi fornecida pela firma BDH, as placas de cromatografia foram pela Merck (Darmstadt). A ninidrina usada como revelador foi fornecida pela firma M&B.

Os frascos de derivatização foram fornecidos pela Pierce Chemical Co. (Illinois), e são frascos de paredes espessa fechadas com tampa de aperto e septo de teflon (Reacti Vials), a mesma firma forneceu o acetonitrilo para cromatografia e a bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA). A firma Alltech forneceu as fases estacionárias utilizadas na preparação dos capilares.

### 1.2 - Instrumentos

Utilizou-se um cromatógrafo capilar Pye Unicam, modelo PU 4500, equipado com um detector de ionização de chama, um repartidor de fluxo e uma coluna capilar de vidro de parede revestida com fase estacionária do tipo metil silicone (OV-1, OV-101 ou SE-30), de 25m x 0.25 mm d.i. ou alternativamente revestida de FFAP, no caso dos derivados etoxicarbonilados. Como gás de arrastamento

utilizou-se o hidrogênio; pressão de entrada de 50Kpa, quando outra não for referida. As análises foram feitas com temperatura programada, os programas utilizados estão na legenda de cada figura. Os resultados quantitativos foram obtidos por um computador integrador Shimadzu CR3 A com discos flexíveis. Os espectros de massa foram obtidos num aparelho Shimadzu QP 1000. As derivatizações decorreram em Reacti-Therm (Pierce Chemical Co. Ill.).

### **1.3 - Preparação dos padrões para cromatografia**

As amostras para os ensaios cromatográficos foram obtidas a partir de uma solução mãe previamente preparada, obtida por dissolução de cerca de 4 mg de cada aminoácido num mínimo de HCl 0.5 M, completando-se o volume final de 10 ml com água destilada. Desta solução foi, por sua vez, retirado 1 ml que se diluiu com água destilada para um volume final de 25 ml. Deste modo obteve-se uma solução mãe contendo todos os aminoácidos numa concentração de cerca de 1.6 mg/100 ml. De cada um dos padrões individuais foi preparada uma solução individual da mesma concentração. Foi ainda preparada uma solução mãe contendo, nas mesmas concentrações, glucose, sacarose, ramnose, lisina, metionina, glicina, histidina e fenilalanina.

#### **1.3.1- Cromatografia de troca iônica**

5 ml da solução contendo aminoácidos e açúcares foram cromatografados por troca-iônica. A primeira eluição utilizou água destilada à velocidade de aproximadamente 5 gts/ min., como eluente. Utilizaram-se 25 ml de água. Do eluído fez-se cromatografia de placa. Seguidamente eluiu-se com amônia 4M. O eluído foi recolhido após utilização de 10 ml, 20 ml e 30 ml de amônia. De cada uma das fracções foi feita cromatografia em camada fina. Finalmente, 5ml da solução -mãe contendo todos os aminoácidos foi cromatografada por troca-iônica utilizando 25 ml de água destilada como eluente seguido de 30 ml de amônia 4M. Utilizaram-se cerca de 5 g de resina. A solução amoniaca obtida foi evaporada à secura em evaporador rotativo, refeito o volume de 10 ml em

balão aferido por adição de água destilada; 250 µl desta solução foram transferidos para um frasco de derivatização, secos sob corrente de azoto e o resíduo, após secagem sob vácuo, foi derivatizado.

### 1.3.2 - Cromatografia em camada fina

Foi feita cromatografia em camada fina da mistura de aminoácidos e açúcares após eluição. Numa placa de cromatografia de 5 x 20 depositaram-se 4 x 4 gotas do eluído e 1 x 4 gotas da solução-mãe directamente. Após completada a eluição a placa foi revelada com anisaldeído. Como eluente utilizou-se clorofórmio:metanol (60:40). Da solução amoniacal recolheram-se fracções após utilização de 10, 20 e 30 ml de solução de amónia 4 M. de todas as fracções recolhidas se fez cromatografia. Como eluente utilizou-se n-butanol:ác. acético:água nas concentrações de 80:20:20 para a fracção de 10 ml e 80:25:20 para as restantes fracções. A quantidade depositada foi idêntica à utilizada para a cromatografia da solução aquosa. Quando se fez c.c.d. da solução-mãe contendo todos os aminoácidos a quantidade de amostra utilizada foi a mesma (aproximadamente 4 gts do eluído, e de cada um dos padrões individuais). A placa usada neste caso foi uma placa de 20 x 20. Como revelador usou-se ninidrina.

## 2 - DERIVATIZAÇÃO

Ao resíduo do frasco de derivatização foram adicionados o padrão interno de hidrocarboneto numa concentração de 0.018 mg. Ao resíduo adicionou-se por três vezes 200 µl de diclorometano para secagem azeotrópica. Após a terceira evaporação as amostras foram então derivatizadas.

### 2.1 - Esterificação

O resíduo seco foi dissolvido em 100 µl de 4M HCl em isopropanol. O frasco de derivatização foi fechado e aquecido em Reac-

ti-Therm (Pierce Chemical Co., Illinois) a 110° C durante 30 minutos, excepto quando se conduziram os ensaios de optimização de condições em que se utilizaram tempos de 30 e 60 minutos, à mesma temperatura. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado sob corrente de azoto.

## **2:2 - Acilação**

### **2:2:1 - Obtenção de derivados N-etoxicarbonilados**

Ao resíduo da esterificação foram adicionados 250 µl de acetonitrilo 50 µl de cloroformiato de etilo e 10 µl de etanotiol como antioxidante. A mistura foi aquecida a 150° C durante 20 minutos, excepto quando se efectuaram os estudos das condições de acilação. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado sob corrente de azoto. O resíduo foi dissolvido em 5µl de diclorometano, 0.3-0.5 µl desta solução foram injectados no cromatógrafo.

#### **2:2.1.1 - Estudos de acilação**

As condições de acilação foram estudadas a fim de determinar para cada aminoácido o factor de resposta em função do tempo de acilação e da temperatura. As temperaturas ensaiadas foram de 80 120 e 150°. Os rendimentos relativos foram determinados para 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos de tempos de reacção e expressos sob a forma de respostas relativas em relação ao padrão interno.

#### **2:2:1:2 - Sililação**

A sililação de grupos hidroxilo e/ou sulfidriilo cadeia lateral dos aminoácidos que os possuem foi levada a cabo por tratamento do resíduo da acilação com uma solução de BSTFA em acetonitrilo 3:1, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. A solução obtida foi utilizada directamente para cromatografia.

### **2.2.1.3 - Cálculo dos factores de resposta relativos**

O padrão interno utilizado para controle da derivatização foi, neste caso, o octacosano. A cicloleucina foi igualmente utilizada no cálculo dos factores de resposta e encontrava-se desde o início na solução-mãe.

### **2.2.2 - Obtenção dos derivados N-heptafluorbutíricos**

No caso da derivatização visar a obtenção dos derivados N-heptafluorbutíricos, ao resíduo obtido na esterificação adicionou-se 100 µl de diclorometano, 50 µl de HFBA e 10 µl de etanotiol como antioxidante. A mistura foi aquecida 150 ° durante 15 minutos, excepto quando se ensaiaram as condições de acilação em que se usaram tempos de 5 15 e 25 minutos para a mesma temperatura. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente foi evaporado sob corrente de azoto. Quando a derivatização da histidina não era pretendida, o resíduo foi dissolvido em 5µl de diclorometano e 0,2-0,3 µl desta solução injectados no crómato-grafo.

### **2.3 - Etoxicarbonilação do azoto imidazólico da histidina**

O resíduo da derivatização anterior era dissolvido em 250 µl de bezeno e 50 µl de cloroformiato de etilo aquecido a temperatura 250 ° C durante 20 minutos. Após arrefecimento e evaporação sob corrente de azoto o resíduo é dissolvido em 5µl de diclorometano e uma alíquota desta solução injectada no cromatógrafo.

### **2.4 - Degradação dos aminoácidos nas condições de hidrólise**

200 µl da solução mãe de aminoácidos foram colocados num frasco de derivatização ao qual se adicionou igual volume de HCl 6M. A solução foi aquecida a 110° C. Os ensaios foram efectuados com tempos de reacção de 6, 16 e 24 horas. Em cada caso, após arrefecimento, o solvente foi evaporado sob corrente de azoto e o

resíduo derivatizado como descrito.

## **2:5 - Ensaio com leveduras seleccionadas**

As leveduras utilizadas foram fornecidas pela Junta Nacional dos Vinhos e são leveduras isoladas da uva da vinha do Esporão em Reguengos.

### **2:5.1 - Meio de cultura e incubação**

A uma solução de glucose a 1 % foi adicionado 0,05 % de sulfato de amónio (meio A) e 0,05 % de ureia (meio B). A inoculação e o crescimento das leveduras foi realizado no departamento de Biologia da Faculdade de Ciências de Lisboa. Após inoculação as culturas foram incubadas a 37 °C. O controle da fermentação foi realizado por pesagens diárias e interrompeu-se a peso constante. Eram feitas duas pesagens diárias. O líquido foi imediatamente filtrado por membrana (0,22 µm) e 10 ml de uma solução de 2 mg/l de uma solução de cicloleucina foram adicionados. O líquido foi passado por uma resina de Dowex 50 W-X8 de acordo com o já descrito para as soluções de aminoácidos. A fracção eluída foi evaporada à secura em evaporador rotativo e dissolvido numa quantidade mínima de HCl 0,5 M e o volume completado a 10 ml em balão aferido por adição de água. 50 µl desta solução foram transferidos para um frasco de derivatização e derivatizados para obtenção dos ésteres isopropílicos N-heptafluorbutíricos de acordo com a técnica já descrita.

## **2:6 - Análise de Vinhos**

### **2:6.1 - Hidrólise de peptidos dos vinhos**

250 µl da solução contendo os aminoácidos e os peptidos do vinho, foram transferidos para um frasco de derivatização e o solvente evaporado à secura sob corrente de azoto. Ao resíduo adicionaram-se 250 µl de uma solução de HCl 6M, o frasco foi fechado e aquecido a 110 °C. Foram estudados ensaios com 6, 16 e

24 horas. Em cada caso após arrefecimento, o solvente foi evaporado sob corrente de azoto e o resíduo derivatizado como descrito.

### 2.6.2 - Preparação das amostras de vinhos

As amostras de vinhos (5 ml) foram desproteinizadas com álcool 1:4 durante 15 min. a  $-10^{\circ}$  C e, após centrifugação, o excesso alcoólico foi eliminado por evaporação à secura em evaporador rotativo. O resíduo foi retomado com água destilada em balão volumétrico, e adicionaram-se cerca de 1 mg de ciclocleucina de padrão interno. A solução foi tratada com resina catiónica do tipo Dowex na forma ácida. Após passagem do vinho na resina esta foi lavada com 25 ml de água e 30 ml de amónia 4 M. A solução amoniacal foi concentrada em vácuo até um volume de aproximadamente 1 ml. 500  $\mu$ l desta solução foram transferidos para um frasco de derivatização, o solvente evaporado sob corrente de azoto e o resíduo, após tratamento com diclorometano para secagem azeotrópica foram derivatizados consoante os casos para obtenção dos derivados N-heptafluorbutíricos ou N-etoxicarbonilados.

### 3 - ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA - Materiais e Métodos

Na análise de "cluster" foi utilizado o programa CLUE fornecido pela Elsevier Science Corporation, as análises foram efectuadas utilizando a distância Euclideana e a transformação de Z. Utilizou-se um microprocessador Apple IIe. Os objectos eram os vinhos as variáveis os aminoácidos. Os objectos foram standartizados. Na análise de componente principal e na determinação do tipo de população utilizou-se o programa STATGRAPHICS, Statistical Graphics Corporation, e um microprocessador Amstrad PC.

No cálculo das árvores de expansão mínima apenas as distâncias Euclideanas foram calculadas por computador os restantes cálculos foram manuais.

A análise discriminante e as análises de aplicação do método da "projecção em estrela" ("star symbol plot"), foram igualmente realizadas utilizando o programa STATGRAPHICS, e um microprocessador Amstrad PC1512.

Os dados introduzidos são os que constam nas tabelas 28 e 30 da 1ª parte.



## BIBLIOGRAFIA

- 1- *Le vin dans la Communauté Européenne*, Série Documentation Européenne, 1983 Ed. Office des Publ. Off. des Comm. Europ. Luxemburgo Cadernos CEE.
- 2- *Inauguração do Complexo do Catujal - bases numéricas de exposição* - Edição JNV 1984.
- 3- Lachkhi A. D., Tsiskarichvili T. P., *Vignes et Vin* 211 (1972) 5.
- 4- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. e Ribéreau-Gayon P., *Sciences et Techniques du Vin* Tome I e II. Dunod Paris.
- 5- Colaço do Rosário F. A., *Caracterização dos Vinhos das Cooperativas Alentejanas. Contribuição para o seu estudo*. E. R. Agric. - Évora 1974
- 6- Kaiser F. E., Gehrke C. W., Zumwalt R. W. e Kuo K. C., *J. Chromatogr.* 94 (1974) 113.
- 7- Frank H. e H. Jaeger, in H. Jaeger (Editor), *Glass capillary Chromatography in Clinical Medicine and Pharmacology*, Marcel Dekker, Basle, New York, 1985, p.79
- 8- Grob Jr. K., K. Grob and G. Grob, *J. Chromatogr.*, 156 (1978) 1
- 9- Harris L. J., *Proc. Roy. Soc. London Series B* 95 (1923-24) 440
- 10- Schmidt E. G., *Arch. Int. Med.* 44 (1929) 351
- 11- Foreman F. W., *Biochem. J.* 14 (1920) 451
- 12- Sorensen S. P., *L. Biochem. Z.* 7 (1908) 45
- 13- Van Slyke D. D. and Kirk E., *J. of Biol. Chem.* 102 (1933) 651
- 14- Van Slyke D. D., Dillon R. T., MacFayden D. A., e Hamilton P., *J. Biol. Chem.* 141 (1941) 627
- 15- MacFayden D. A. citado por Van Slyke et al. *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 627.
- 16- Moore S. e Stein W. H., *J. Biol. Chem.* 176 (1948) 367
- 17- Fisher E., *Akad. Wiss. Berlin* (1900) 1602
- 18- Novak J., in O. Mikes (ed.) *Chromatographic and Allied Methods* : J. Wiley and Sons. New York. (1941) Ch. 2 pp. 46.
- 19- Stein W. H. e Moore S., *J. Biolog. Chem.* 176 (1948) 337
- 20- Martin A. J. P. e Synge R. L. M., *Biochem. J.* 35 (1941) 1358
- 21- Knight C. S., *Chromatogr. rev.* 4 (1962 a e b) 49.

- 22- Moore S. e Stein W. H., *J. Biolog. Chem.* **192** (1951) 663
- 23- Mikes O. , Stamberg J. Hejtmanek M. e Sebesta K., in O. Mikes (ed.) *Chromatographic and Allied Methods* J. Wiley and Sons. New York. (1941) Ch. 5 pp. 218.
- 24- Moore S. e Stein W. H., *J. Biolg. Chem.* **211** (1954) 907
- 25- Piez K. e Morris L., *Anal. Biochem.* **1** (1960) 187
- 26- Spackman D. H., *Fed. Proc. Am. Soc. Expt. Biol.* **22** (1963) 244
- 27- Consden R., Gordon A. H. e Martin A. S. P., *Biochem. J.* **38** (1944) 224
- 28- Hanes C. S. e Isherwood F. A., *Nature* **164** (1949) 1107
- 29- Hais I. M. e Macek P., *Handbuch der Papier Chromatography Aminosauern* (Hais, I. M.) 1:503 veb Gustav Fischer Verlag Jena.
- 30- Hanes C. S., Harris C. K., Moscarello M. A. e Tigane E., *Canadian J. Biochem. Physiol.* **39** (1961) 163
- 31- Clayton C. C. e Steele B. F., *Clin. Chem.* **13** (1967) 49
- 32- Yemm E. W. e Cocking E., *Analyst* **80** (1955) 209
- 33- Wieland T. e Berg A., *Angew Chem.* **64** (1952)
- 34- Tuckerman M. M., *Anal. Chem.* **30** (1958) 211
- 35- Roberts H. R. e Kolor M. G., *Anal. Chem.* **31** (1959) 565
- 36- Mhyre D. V. e Smith F., *J. Org. Chem.* **23** (1958) 1229
- 37- Kaiser R. E. in Zlatkis A. e Kaiser R. E. (ed.) in *HPTLC high performance thin-layer chromatography*. Elsevier Scientific Publishing. J. Chromatogr. Library Vol.9.
- 38- Jost W. and Hanck H. E., *Proc. 3rd International Symposium on Instrumental HPTLC*. Wurzburg 1985.
- 39- Mikes O. e Novotny L. in O. Mikes (ed.) *Chromatographic and Allied Methods* . J. Wiley and Sons. New York. (1941) Ch. 9; pp. 462.
- 40- Bayer E., in D. H. Desty (Editor) *Gas Chromatography* Butterworths Scientific Publ. London 1958 p.333
- 41- Severin M. e Renard M., *Riv. Italiane Sostanza Grassa* **40** (1963) 649
- 42- Bier M. e Teitelbaum P., *Am. N. Y. Acad. Sci.* **72** (1959) 641
- 43- Liberti A., in D. H. Desty (Editor), *Gas Chromatography* Butterworths Scientific Publ. London 1958 p:3341
- 44- Weinstein B. e Fenslau A. H., *J. Chromatogr.* **15** (1964) 149

- 45- Hunter I. R., Dim K. P. e Corse J. W., *Chem. Ind. (London)* **16** (1959) 294
- 46- Zlatkis A., Oró J. F. e Kimball P., *Anal. Chem.* **30** (1958) 1156
- 47- Mc Gregor W. H. e Carpenter F. H., *Biochemistry* **1** (1962) 53
- 48- Stevenson G. W. e Luck J. M., *J. Biol. Chem.* **236** (1961) 715
- 49- Bier M. e Teitelbaum P., *Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol.* **17** (1958) 191
- 50- Meritt C. Jr. e Robertson D. H., *J. Gas Chrom.* **5** (1967) 96
- 51- Simmonds P. G., Shuman G. P. e Stenbridge C. H., *J. Chrom. Sci.* **7** (1969) 36
- 52- Smith W. T. Jr., Harris T. B. e Patterson J. M., *J. Agr. Food Chem.* **22** (1974) 480
- 52A- Johnson W. R. e Kang J. C., *J. Org. Chem.* **36** (1971) 129
- 53- Weygand F., Prox A., Jorgensen A. C., Axen R. e Kirchner P., *Z. Naturforsch b* (1963) 93
- 54- Wagner J. e Winkler G., *Z. Anal. Chem.* **183** (1961)
- 55- Melamed N e Renard M., *J. Chrom.* **41** (1960) 339
- 56- Bayer E., Reuther K. H. e Born F., *Angew Chem.* **69** (1957) 640
- 57- Makisumi S., Nicholls C. H. e Saroff H. A., *J. Chrom.* **12** (1963) 106
- 58- Ruhlman K. e Michael G., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47** (1965) 1467
- 59- Ruhlman K., Hills J. e Graubaus H. J., *J. Prakt. Chemie* **32** (1966) 225
- 60- Johnson D. E., Scott S. J. e Meister A., *Anal. Chem.* **33** (1961) 669
- 61- Makisumi S. e Saroff H. A., *J. Gas Chromatogr.* **3** (1965) 21
- 62- Frank H., Bimboes D. e Nicholson G. J., *Chromatographia* **12** n°3 (1979) 168
- 63- Gehrke C. W., Kuo K. e Zumwalt R. W., *J. Chromatogr.* **57** (1971) 209
- 64- Siezen R. J. e Mague T. H., *J. Chromatogr.* **130** (1977) 151
- 65- MacKenzie S. L. e Tenaschuk D., *J. Chromatogr.* **97** (1974) 19
- 66- Zanetta J. P. e Vincendon G., *J. Chromatogr.* **76** (1973) 91
- 67- Metz J., Ebert W. e Weicker H., *Chromatographia* **4** (1971) 259
- 68- Saroff H. A. e Karmen A., *Anal. Biochem.* **1** (1960) 344

- 69- Appelquist L. A. e Nair B. M., *J. Chromatogr.* **124** (1976) 239
- 70- Koenig W. A., Rahn W. e Eyem J., *J. Chromatogr.* **133** (1977) 141
- 71- Jonsson J., Eyem J. e Sjoquist J., *Anal. Biochem.* **51** (1973) 204
- 72- Lamkin W. M. e Gehrke C. W., *Anal. Chem.* **37** (1965) 383
- 73- Moss C. W., Lambert M. A. e Diaz F. J., *J. Chromatogr.* **60** (1971) 134
- 74- Gehrke C. W., Zummwalt R. W. e Wall L. L., *J. Chromatogr.* **37** (1968) 398
- 75- Zummwalt R. W., Kuo K. e Gehrke C. W., *J. Chromatogr.* **57** (1971) 193.
- 76- Coulter J. R. e Hann C. S., in Niederwiesser and G. Pataki (ed.) *New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis*, Am. Arbor. Sci. Publ. Am. Arbor. Mich. 1971 pp-75.
- 77- Coulter J. R. and Hann C. S., *J. Chromatogr.* **36** (1968) 42
- 78- Abdalla S. *Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der naturwissenschaften*, Tuebingen Universitaet (1981).
- 79- Chaves das Neves H. J. e Vasconcelos A. M. P., *Rev. Port. Quim.* **25** (1983) 184
- 80- Makita M., Yamamoto S. e Kuno M., *J. Chromatogr.* **120** (1976) 129.
- 81- Shlyaprikov S. V. and Karpeiskii M. Ya, *Biokhimiya* **29** (1964) 1076.
- 82- Pisano J. J., Vanden Heuvel W. J. A. e Horning E. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7** (1962) 82
- 83- Ikekawa N., Hoshino O. e Watanuki R., *Anal. Biochem.* **17** (1966) 16.
- 84- Ertinghausen G., Gehrke C. W. e Aue W. A., *Separ. Sci.* **2** (1967) 681.
- 85- Halpern B., Close V. A., Wegmann A. e Westley J. W., *Tetrahedron Lett.* (1968) 3119.
- 86- Blau K. e Darbe A., *Biochem. J.* **88** (1963) 8.
- 87- Dawis Jr. J. W. e Furst A., *Anal. Chem.* **40** (1968) 1910
- 88- Ruhlman K. e Giesecke W., *Angew Chem.* **73** (1965) 211
- 89- Ruhlman K. e Michael G., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47** (1965)

1467.

- 90- Birkofer L. e Donike M., *J. Chromatogr.* 26 (1967) 270
- 91- Klebe J. F., Finkbeiner H. e White D. M., *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 3390.
- 92- Stahling D. L., Gehrke C. W. e Zummwalt R. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31 (1968) 616.
- 93- Gehrke C. W. e Leimer K., *J. Chromatogr.* 57 (1971) 219.
- 94- Gehrke C. W. e Leimer K., *J. Chromatogr.* 53 (1970) 201.
- 95- Gehrke C. W., Nakamoto H. e Zummwalt R., *J. Chromatogr.* 45 (1969) 24.
- 96- Stalling D. L., Gille G. e Gehrke C. W., *Anal. Biochem.* 18 (1967) 118.
- 97- Zummwalt R. W., Roach D. e Gehrke C. W., *J. Chromatogr.* 53 (1970) 171.
- 98- K. Grob in *Making and Manipulating Capillary Columns for Gas Chromatography*. Heidelberg. Huethig 1986.
- 99- Chaves das Neves H. J. e Vasconcelos A. M. P., *J. Chromatogr.* 392 (1987) 249.
- 100- Frank H., Nicholson G. J. e Bayer E., *J. Chromatogr.* 167 (1978) 187.
- 101- Frank H., Vujtovic-Ockenga N. e Rettenmeier A., *J. Chromatogr.* 279 (1983) 507.
- 102- Butler M. e Darbe A., *J. Chromatogr.* 101 (1974) 51.
- 103- Adams R. F., Vandermark F. L. e Schmidt G. J., *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 63.
- 104- Caugham J. e Darbe A., *J. Chromatogr.* 236 (1982) 151.
- 105- Husek P. e Felt V., *J. Chromatogr.* 305 (1984) 442.
- 106- Schomburg G. e Haeusig U., *Proc. 6<sup>th</sup> International symposium on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, Maio 1985 pp. 270.
- 107- K. Grob, *J. Chromatogr.* 178 (1979) 584.
- 108- Schomburg G. et al., *J. Chromatogr.* 142 (1977) 87.
- 109- K. Grob Jr., *J. Chromatogr.* 178 (1979) 387.
- 110- Yang F. J., Brown A. C. e Cram S. P., *J. Chromatogr.* 158 (1978) 91.
- 111- Ettre L. S., in P. Sandra (ed.) *Sample Introduction in capillary Gas Chromatography* Volume I. Huethig Verlag, Heidelberg

- (1985) pp.
- 112- Desgrés J., Boisson D. e Padieu P., *J. Chromatogr.* **162** (1969) 133.
- 113- Frank H., Nicholson G. J. e Bayer E., *J. Chrom. Sci.* **15** (1977) 174.
- 114- Gil-Av E., Feibush B. e Sigler R. C., *Tetrahedron Lett.* (1966) 1009.
- 115- Koenig W. A., Parr W., Lichtenstein H. A., Bayer E. e Oro J., *J. Chrom. Sci.* **8** (1970) 183.
- 116- Nicholson G. J., Frank H. e Bayer E., *J. High Resol. Chromatogr. Commun.* **2** (1979) 411.
- 117- Cheves das Neves H. J. e Vasconcelos A. M. P. enviado para publicação *Rev. Port. Quim.* 1986.
- 118- Liardon R., Lederman S. e Ott V., *J. Chromatogr.* **203** (1981) 385.
- 119- Peterson B. A. e Vouros P., *Anal. Chem.* **49** (1977) 1304.
- 120- Chaves das Neves H. J., Vasconcelos A. M. P., Rueff Tavares J. e Ramos P. N. *J. High Res. Chrom. & Chrom. Commun.* **11** (1988) 12.
- 121- Message G. M., *Practical Aspects of Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Willey Interscience, J. Willey and Sons (Editor).
- 122- Tristram G. R. e Rattenbury J. M., in *Aminoacid Analysis* Wiley, New-York 198 (1981) pp 16-36.
- 123- Fater S. e Mincsovics E., *J. Chromatogr.* **298** (1984) 534.
- 124- Cunico R. L., Simpson R., Correia L. e Wehr C. T., *J. Chromatogr.* **336** (1984) 105.
- 125- DiMari, Samuel J., Robinson J. P. Hash J. H. *J. Chromatogr.* **213** (1981) 91.
- 126- Buck R. H. e Krummen K., *J. Chromatogr.* **303** (1984) 238.
- 127- N. Vonk e R. Hageman, *Chromapack News* **10** (1983) nº2.
- 128- Vonk N., *Chromapack News* **10** (1983) nº3
- 129- Ali Qureshi G., Fohlin L. e Bergstroem J., *J. Chromatogr.* **297** (1984) 91-100.
- 130- Godel H., Graser T., Foldi P., Pfaender P. e Furst P., *J. Chromatogr.* **297** (1984) 49.
- 131- Levina N. B. e Nazimov I. V., *J. Chromatogr.* **286** (1984) 207.

- 132- Weinstein S. e Weiner S., *J. Chromatogr.* **303** (1984) 244.
- 133- Lam S. e Karmen A., *J. Chromatogr.* **289** (1984) 339.
- 134- Bidlingmeyer B. A., Cohen S. A. e Tarvin T. L., *J. Chromatogr.* **336** (1984) 93.
- 135- Koop D. R., Morgan E. T., Tan G. E. e Coon M. J., *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 8472.
- 136- Hill D. W., Walters F. H., Wilson T. D. e Stuart J. D., *Anal. Chem.* **51** (1979) 1338.
- 137- Vasconcelos A. M. P. e Chaves das Neves H. J., *Proc. 2º Encontro Nacional de Biotecnologia Porto, Fevereiro 1984.* pp. 203
- 138- Kliever W. M. e Cook J. A., *Am. J. Enol. Vitic.* **25** (1974) 111.
- 139- Kliever W. M., *Am. J. Enol. Vitic.* **18** (1967) 126.
- 140- Kliever W. M., Nassar A. R. e Olmo H. P., *Am. J. Enol. Vitic.*, **17** (1966) 112.
- 141- Marcy J. E., Carroll D. E. e Young C. T., *J. Food Sci.* **46** (1981) 543.
- 142- Nassar A. R. e Kliever W. M., *Am. Soc. Hort. Sci.* **89** (1971) 281.
- 143- Poux C., *Rev. Fr. Oenol.* **38** (1970) 5.
- 144- Lafon-Lafourcade S. e Guimberteau G., *Vitis* **3** (1962) 130.
- 145- Flanzly C. e Poux C., *Ann. Techn. Agric.* **14** (1) (1965) 87.
- 146- Sanders E. M. e Ough C. S., *Am. J. Enol. Vitic.* **36** nº1 (1985)
- 147- Anelli G., Lotti G. e Lepedi A. A., *Indian Agric.* **10** (1972) 205.
- 148- Kluba R. M., Mattick L. R. e Hackler L. R., *Am. J. Enol. Vitic.* **29** nº3 (1978) 181.
- 149- San Romão M. V., *De Vinea et Vino Portug. Doc.* Jan 77 nº7.
- 150- Lhuguenot J. C., Ude L., Dymarski E. e Baron C., *Ann. fals. Exp. Chim.* **72** nº 775 (1979) 275.
- 151- Vasconcelos A. M. P. e Chaves das Neves H. J., *J. High res. Chrom. Chromatogr. Commun.* **8** (1985) 547.
- 152- Bourdet A. e Herard J., *Ann. Techn.* **II** (1958) 177.
- 153- Sentheshanmuganathan S., *Biochem. J.* **74** (1960) 568.
- 154- Kvensch V., temperli A. e Mayer K., *Am. J. Enol. Vitic.* **25** (1974) 191.

- 155- Yoshida M., et al. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* 40 (1966) 295.
- 156- Amerine M. A., Pangborn R. M. e Roessler E. B., *Principles of Sensory Evaluation of Food*. Academic Press, N. York, 1965.
- 157- Ooghe W., Kastelij n H., Waele A. de, *Ann. Fals. Exp. Chim.* 74 n° 798 (1981) 381.
- 158- Solms J., *J. Agric. Food Chem.* 17 n° 4 (1969) 686.
- 159- Amerine M. A. e Roessler E. B., "Wines: Their Sensory Evaluation", W. H. Freeman & Co. San Francisco, 1976.
- 160- Kirumura J. et al., *J. Agric. Food Chem.* 17 n°4 (1969) 689.
- 161- Johnson J. A. e El-Dash A.A. *J. Agric. Food Chem.* 17 (1969) 740.
- 162- Feldman J. R., Ryder W. S. e King J. T. *J. Agric. Food Chem.* 17 (1969) 733.
- 163- Mason m. E., Newell J. A., Johnson B. R., Koehler P. E. e Waller G. R. *J. Agric. Food Chem.* 17 (1969) 728.
- 164- Mills F. D., Baker B. G. e Hodge J. E. *J. Agric. Food Chem.* 17 (1969) 723.
- 165- Lafon-Lafourcade S. e Peynaud E., *Vitis* 2 (1959) 45.
- 166- Ough C. S. e Bell A. A., *Am. J. Enol. Vitic.* 31 (1980) 122.
- 167- Inghraham J. L. e Guymon J. F., *Arch. Biochem. Biophys.* 88 (1960) 157.
- 168- Ayrapaa T., *J. Inst. Brew.* 73 (1967) 30.
- 169- Ayrapaa T., *J. Inst. Brew.* 73 (1967) 17.
- 170- Harvalia A., *Bull. O.I.V.* 536 (1975)
- 171- Schulthess D. e Ettlinger L. *J. Inst. Brew.* 84 (1978) 240
- 172- Ayrapaa T., *J. Inst. Brew.* 74 (1968) 169.
- 173- Leone A. M., La Motte E. e Santoro M., *Vini d'Italia* 128 (1980) 231.
- 174- Ough C. S., *Vitis* 7 (1968) 321.
- 175- Ough C. S. e Stashak R. M., *Am. J. Enol. Vitic.* 25 n°1 (1974) 7.
- 176- Etliraj S. e Surash E. R., *Am. J. Enol. Vitic.* 33 (1982) 231.
- 177- Giaccio M.; *Riv. Vitic. Enol.* 34 (1981) 34.
- 178- Wallrauch S.; *Flussiges Obst Heft* 7 (1985) 380.

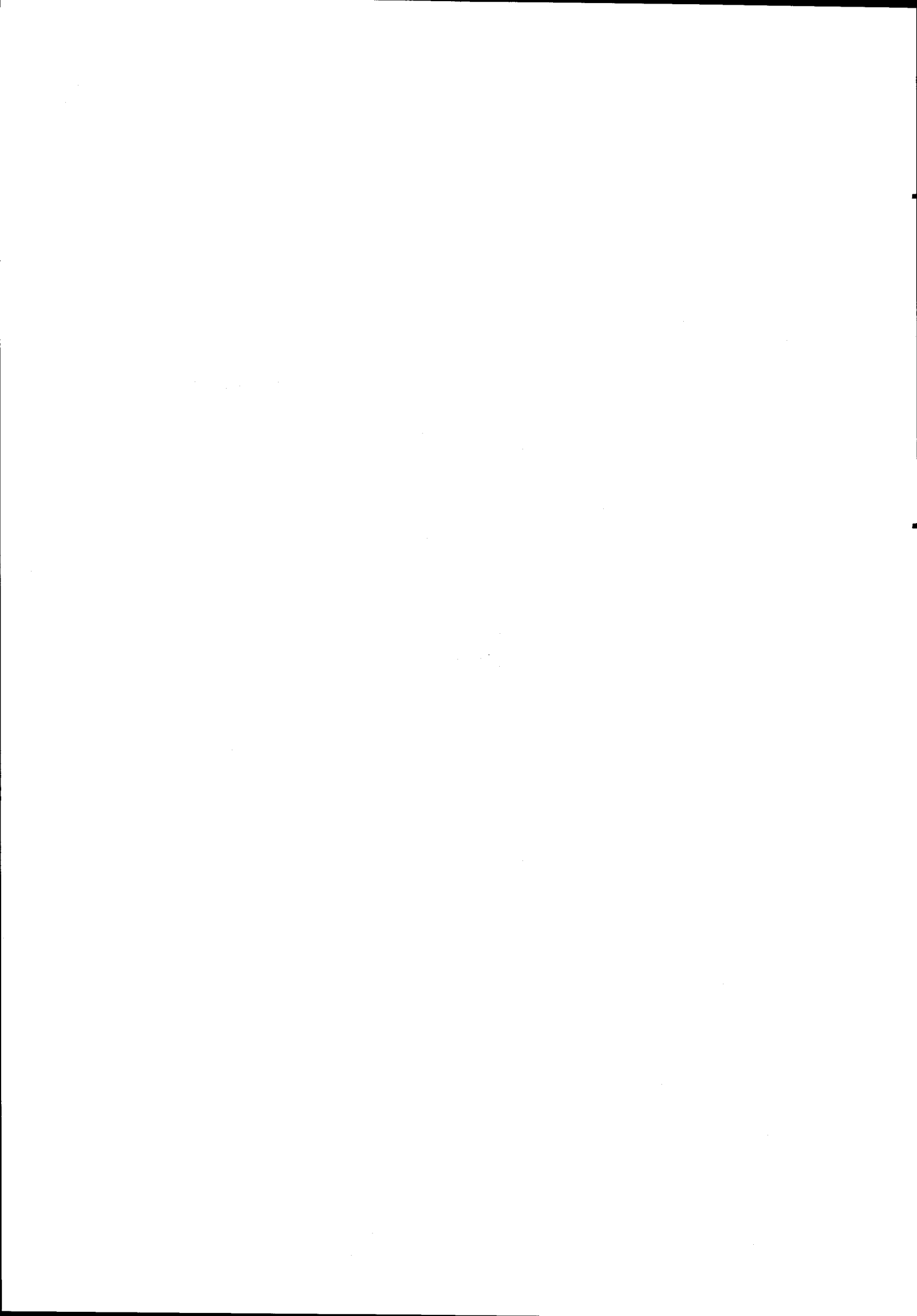


- 179- Vandercook C. E. e Price R. L., *J. Food Sci.* **37** (1982) 384.
- 180- Almeida H., *Anais do Inst. Vinho Porto* **15** (1954) 45.
- 181- Figueiredo e Silva F. P. e Sales Petinga O., *AGROS* **45** (1962) 195.
- 182- Margarido Correia E. e Cunha Parro A., *Bull. O.I.V.* **40** (1967) 607.
- 183- Campos L. e Severin M., *De Vinea et Vino Port. Doc.* **5** nº 2 (1970) 1.
- 184- San Romão M. V., *De Vinea et Vino Port. Doc.* **7** nº 2 (1976) 1.
- 185- Gelphi E., Koenig W. A. Gibert J. e Oro J., *J. Chromatogr. Sci.* **7** (1969) 604.
- 186- Felker P. e Bandurski R. S., *Anal. Biochem.* **67** (1975) 245.
- 187- Carvalho Cardoso J. V. J., *Os Solos de Portugal sua Classificação, Caracterização e Gênese. 1. a Sul do Rio Tejo* ed. Sec. Estado Agric. Dir. Geral Serv. Agric. Lisboa (1975).
- 188- Araújo J. A., *Contribuição para o estudo ampelográfico das principais castas da região do Alentejo*. Dissertação apresentada à Universidade de Évora. Évora 1984.
- 189- Girão A. L. B. F. T., *Tratado Theórico e Prático de Agricultura das Vinhas*. Ed. Imprensa Nacional. Lisboa 1822
- 190- Kozub G. I., Furtrune L. A. e Koreisha M. A., *Sadovodstvo, Vinogradarstvo i vinodelii Moldavii* **35** (1980) 41.
- 191- Poux C. e Ournac A., *Ann. Technol. Agric.* **19** (1970) 217.
- 192- Sanders E. M. e Ough C. S., *Am. J. Enol. Vitic.* **36** (1985) 43.
- 193- Rougereau A., *rev. Fr. Oenol.* **55** (1974) 27.
- 194- Sachde A. G., El-Zalaki E. M., El-Tabay A. M. e Abo-Donia S. A., *Am. J. Enol. Vitic.* **30** (1979) 272.
- 195- Bergner K. G. e Haller H. E., *Mitt Rabe u. Wein, Obstbau u. Fruchtverwert (Klosterneuburg)* **19** (1969) 264.
- 196- Nilov V. I. e Ogorodnik S. T., *Vinodelie e vinogradarstvo URSS* **1** (1967) 8.
- 197- Rodoupoulo A. K., *Vinod. Vinogr. URSS* **1** (1964) 6.
- 198- Bertrand A., Medina B. e Chevallier J. P., *Am. J. Enol. Vitic.* **16** (1982) 111.
- 199- Bertsch W., Brill J. H. e Mar T., *Proc 6<sup>th</sup> International*

*Symposium on Capillary Chromatography* Maio-1986 Gifu Japão  
pp. 44.

- 200- Brill J. H., Mayfield H. T., Mar T. e Bertsch W., *Proc. 6<sup>th</sup> International Symposium on Capillary Chromatography* Maio-1986. Gifu, Japão, pp: 208.
- 201- Wolff D. D. e Parsons M. L., *Pattern Recognition Approach to Data Interpretation*. 1983 Plenum Press, New York.
- 202- Siegmund H. e Bachmann K., *Z. Lebensm. Unters-Forsch.* 166 (1978) 298.
- 203- Kwan W. O., Kowalski B. R. e Skogerboe R. K., *J. Agric. Food Chem.* 27 (1979) 1321.
- 204- Lima M. B., in *Numerical Taxonomy* ed. J. Felsenstein. Springer Verlag. Berlin Heidelberg.
- 205- Kwan W. O., Kowalski B. R., *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980) 356.
- 206- Noble A. C., Fleth R. A. e Forrey R. R., *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980) 346.
- 207- Kwan W. O. e Kowalski B. R., *J. Food Sci.* 43 (1978) 1320.
- 208- Pangborn R. M., *Lecture-Factors Influencing Taste Perception*. University of California (Davis) Dep. Food Sci. & Techn. Winter (1981).

**ANEXO I**







**INQUÉRITO**

NOME DO ORGANISMO \_\_\_\_\_

1- Qual a área de vinha abrangida por essa região? \_\_\_\_\_

2- São aconselhadas castas aos vinicultores? \_\_\_\_\_

3- Em caso afirmativo como foi feita a selecção? \_\_\_\_\_

4- Qual a área de vinha de castas aconselhadas? \_\_\_\_\_

5- Qual a idade média das vinhas? \_\_\_\_\_

6- Em algum caso pode ser incorporada uva de mesa? \_\_\_\_\_

7- Qual o mercado em que esses vinhos são colocados?

Nacional	Regional	_____
	Lisboa	_____
	Porto	_____
	Norte	_____
	Centro	_____
	Sul	_____
Estrangeiros	Quais	_____

8- Na altura da Vindima a entrada de uvas é feita

Por castas	_____
Lotes escolhidos	_____
Indiscriminadamente	_____

9- Verificam oscilações qualitativas anuais em relação a um padrão de qualidade, mais ou menos fixo, para um determinado tipo de vinho? \_\_\_\_\_





10-Caso o vinho não apresente uma qualidade característica da marca ele é vendido como?

A granel \_\_\_\_\_  
Com a mesma marca \_\_\_\_\_  
Com outra marca \_\_\_\_\_  
De outra forma \_\_\_\_\_

11-Qual o controle analítico feito aos vinhos? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

12-Esse controle é feito a todos os vinhos ou apenas a vinhos de marca? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

13-Como é feita a prova?

Por painel de provadores \_\_\_\_\_  
Por um organismo oficial \_\_\_\_\_  
De outra forma \_\_\_\_\_

14-Qual o método utilizado na prova? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 1985

Assinatura

Enviar para : Ana Maria Pestana de Vasconcelos  
Laboratório de Química Orgânica Fundamental  
Faculdade de Ciências e Tecnologia U.N.L.  
2825 Monte da Caparica





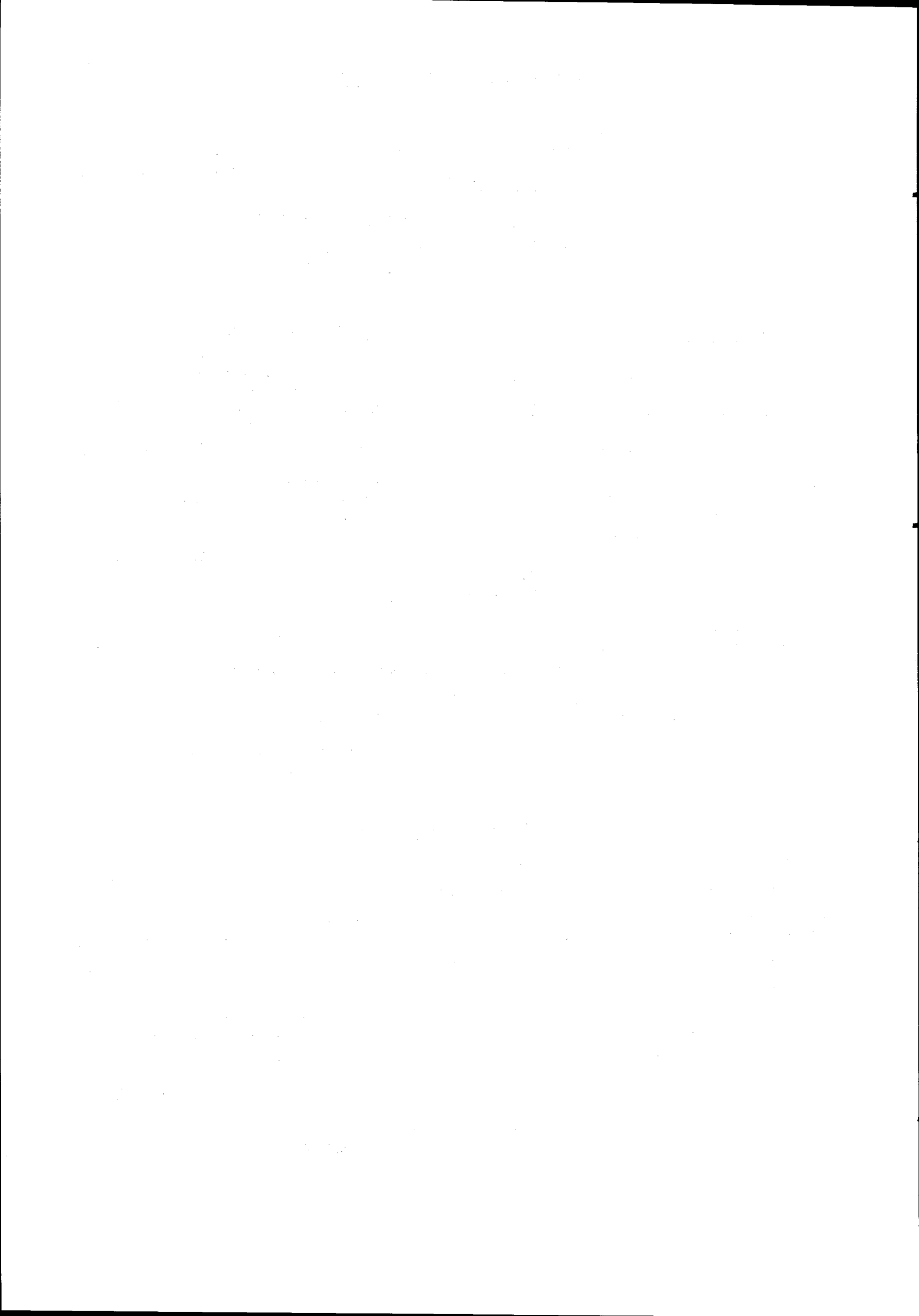


Tabela 1  
Cálculo do Índice de Maturação - Vinho Rabo de Ovelha

Ano	Data	Açúcar g/l	Alc. prov.	Ac. Tot.	S/A
1977	8/9	202	11.9	4.8	42.08
	15/9	224	13.2	4.5	49.78
	19/9	234	13.7	4.6	50.87
	28/9	209	12.3	4.6	45.43
1978	4/9	172	10.1	5.9	29.40
	11/9	191	11.2	5.8	33.04
	18/9	195	11.5	5.1	38.24
	4/10	209	12.3	4.1	50.61
1981	4/9	149	8.8	8.7	17.13
	11/9	162	9.5	6.7	24.25
	17/9	158	9.3	5.9	26.64
	23/9	182	10.7	5.3	34.15
	6/10	186	10.9	4.7	40.0
1982	26/8	211	12.4	4.6	45.97
	1/9	193	11.4	4.5	42.89
	6/9	210	12.4	4.5	46.67
	9/9	211	12.4	4.5	46.89
	10/9	215	12.6	4.4	49.42

Tabela 2  
Cálculo do Índice de Maturação - Vinho Manteúdo

Ano	Data	Açúcar g/l	Alc. prov.	Ac. Tot.	S/A
1977	8/9	149	8.8	2.9	51.38
	15/9	159	9.4	4.1	38.78
	19/9	166	9.8	3.2	51.88
	10/10	176	10.4	3.6	48.89
1978	4/9	153	9.0	4.7	32.90
	11/9	166	9.8	4.1	40.99
	20/9	182	10.7	3.6	50.56
	3/10	182	10.7	3.53	51.56
1979	4/9	153	9.0	4.4	35.17
	10/9	147	8.6	3.9	37.69
	17/9	157	9.2	4.2	37.38
	24/9	179	10.5	3.6	49.72
	27/9	166	9.8	4.0	41.71
1981	4/9	188	11.1	3.9	48.21
	11/9	177	10.4	3.8	46.21
	17/9	191	11.2	3.3	57.88
	23/9	177	10.4	3.0	59.00
	6/10	194	11.4	2.9	68.07
1982	26/8	200	11.7	4.0	50.25
	1/9	173	10.2	3.6	48.06
	6/9	191	11.6	3.8	50.93
	10/9	176	10.3	3.9	45.13
	16/9	185	10.9	3.3	56.06
1983	2/9	168	9.9	3.5	47.59
	6/9	193	11.4	4.6	42.14
	9/9	211	12.4	4.1	52.10

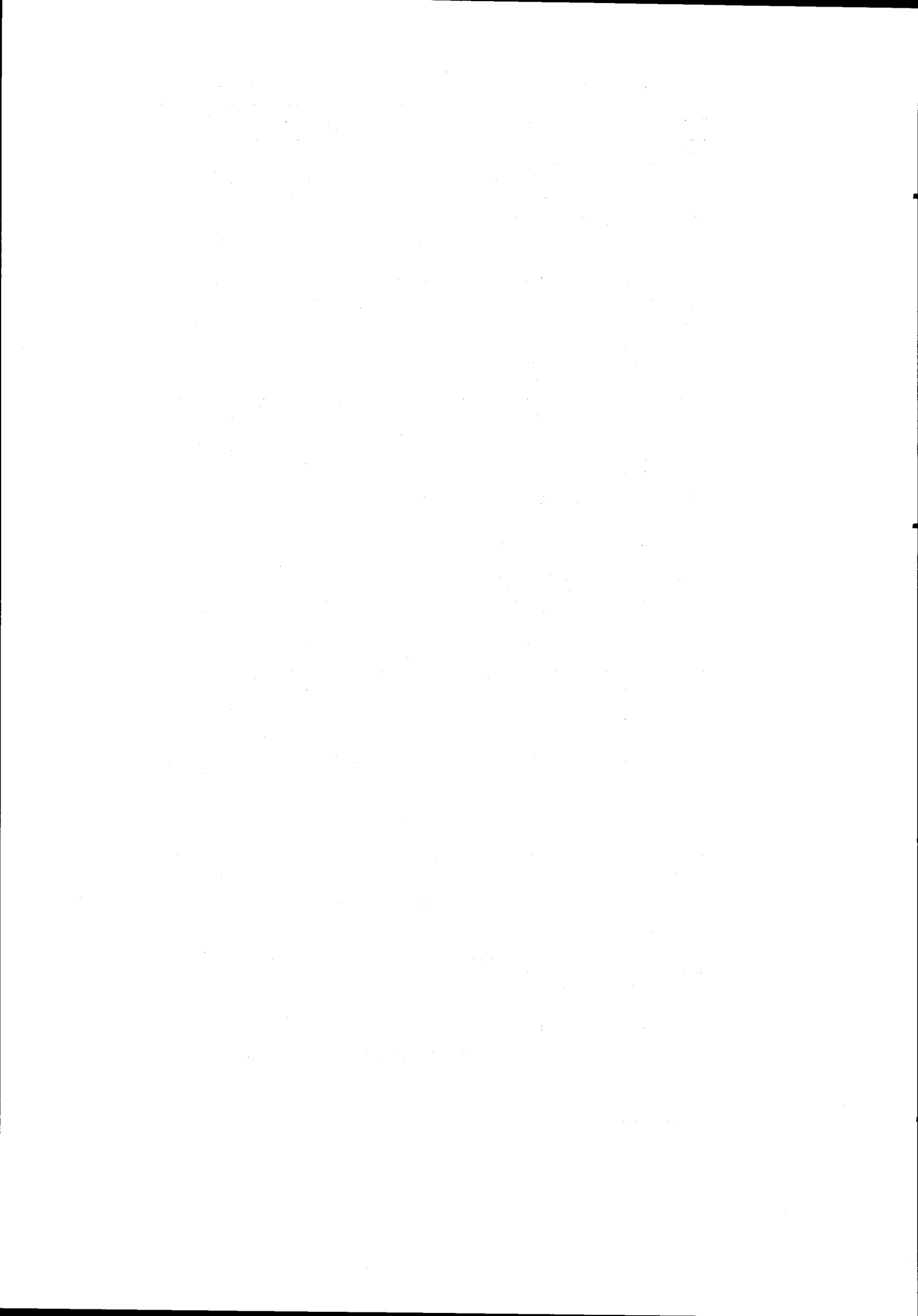


Tabela 3  
Cálculo do Índice de Maturação - Vinho Tamarez

Ano	Data	Açúcar g/l	Alc. prov.	Ac. Tot.	S/A
1979	4/9	179	10.5	4.5	39.78
	10/9	184	10.8	4.3	42.99
	17/9	168	9.9	3.8	43.86
	24/9	162	9.5	3.5	46.96
	1/10	193	11.3	4.2	45.95
1980	8/9	196	11.6	3.8	51.18
	11/9	193	11.3	4.4	44.37
	16/9	184	10.8	3.7	50.00
	19/9	192	11.3	3.8	50.13
1981	4/9	191	11.2	3.9	48.97
	11/9	166	9.8	4.5	48.12
	17/9	175	10.3	3.1	56.82
	23/9	192	11.3	3.2	60.95
	28/9	202	11.9	4.1	49.88
1982	26/8	179	10.5	4.7	37.84
	1/9	184	10.8	3.7	50.00
	6/9	181	10.6	3.6	50.28
	10/9	177	10.4	3.6	40.17
	13/9	209	12.3	3.8	54.57
1983	2/9	197	11.6	3.8	51.44
	6/9	198	11.6	4.1	48.89
	9/9	208	12.2	4.0	52.26

Tabela 4  
Cálculo do Índice de Maturação - Vinho Roupeiro

Ano	Data	Açúcar g/l	Alc. prov.	Ac. Tot.	S/A
1977	8/9	168	9.9	3.9	43.08
	15/9	220	12.9	3.6	61.11
	19/9	194	11.4	4.7	42.28
	10/10	209	12.3	4.4	47.50
1978	4/9	184	10.8	4.7	39.57
	11/9	200	11.7	4.5	44.44
	18/9	197	11.6	3.8	52.53
	21/9	228	13.4	4.7	48.20
1979	4/9	160	9.4	5.9	26.98
	10/9	166	9.8	5.9	28.38
	17/9	167	9.9	4.7	35.31
	24/9	177	10.4	4.5	39.33
	1/10	196	11.5	4.7	41.44
1980	8/9	206	12.1	4.9	42.21
	11/9	210	12.3	4.7	45.16
	16/9	215	12.7	4.4	48.53
1981	4/9	179	10.5	6.1	29.44
	11/9	200	11.7	6.1	32.90
	17/9	210	12.4	5.2	40.54
	23/9	215	12.7	4.8	44.79
1982	26/8	206	12.1	4.9	42.21
	1/9	202	11.9	4.1	48.91
	6/9	209	12.2	4.4	47.18
	9/9	208	12.2	4.4	47.82
	10/9	233	13.7	4.4	53.56
1983	2/9	213	12.5	5.3	40.57

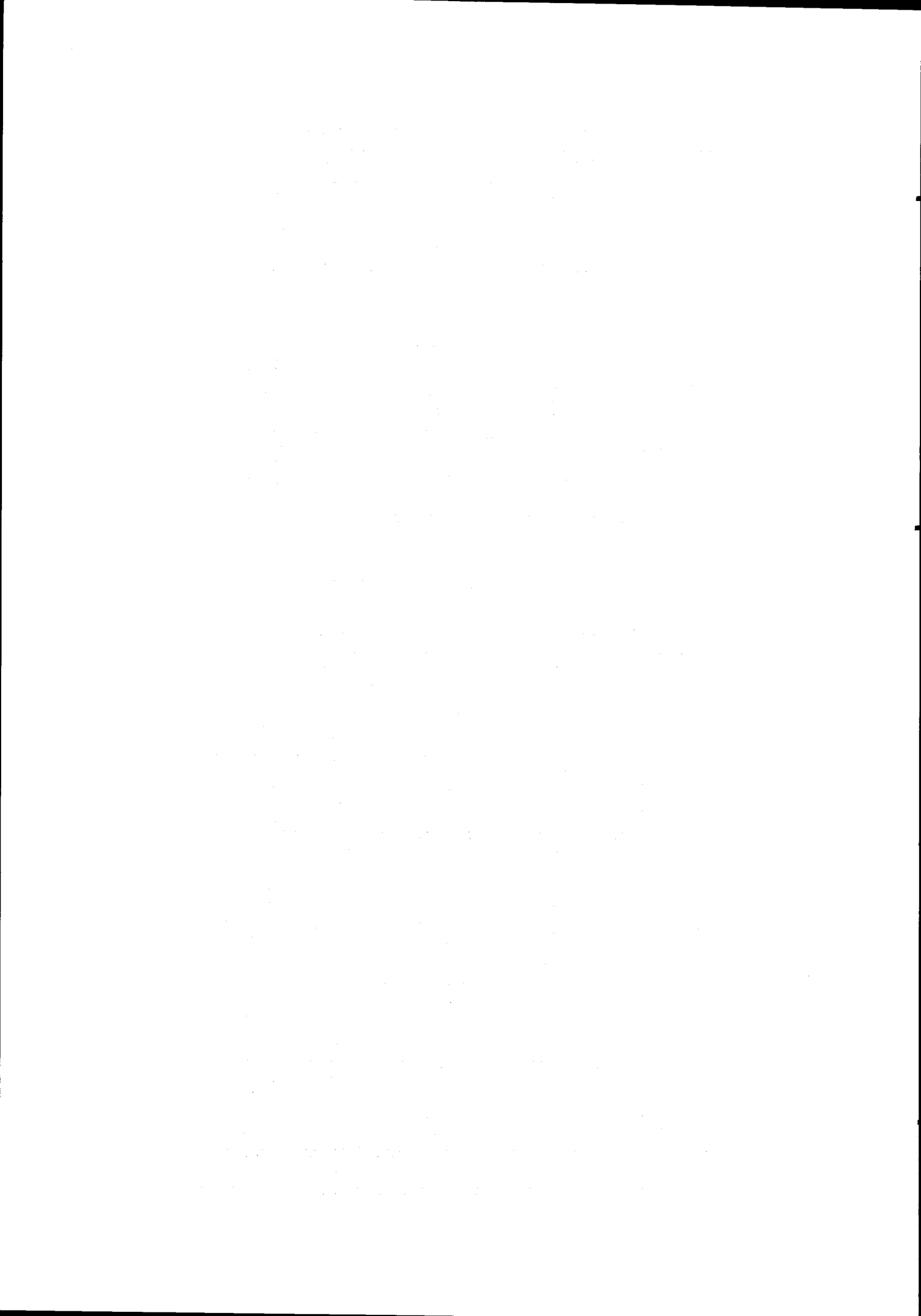




Tabela 5  
Cálculo do Índice de Maturação - Vinho Moreto

Ano	Data	Açúcar g/l	Álc. prov.	Ac. Tot.	S/A
1977	22/8	161	9.5	5.8	27.76
	8/9	151	8.9	4.6	32.83
	15/9	184	10.8	3.6	51.11
	19/9	206	12.1	3.4	60.59
	12/10	204	12.0	4.0	51.00
1978	6/9	183	10.8	4.6	39.96
	11/9	200	11.7	4.5	44.44
	20/9	199	11.7	3.5	56.37
	13/10	193	11.3	3.2	59.75
1979	4/9	177	10.4	4.5	39.33
	10/9	174	10.3	4.9	35.66
	17/9	179	10.5	4.0	44.98
	24/9	182	10.7	3.9	46.67
	3/10	182	10.7	5.8	31.38
1981	17/9	155	9.1	4.9	31.76
	23/9	155	9.1	4.6	33.84
	8/10	231	13.6	4.6	50.44
1982	26/8	187	11.0	3.8	49.87
	1/9	190	11.2	3.5	53.82
	6/9	202	11.9	3.5	57.22
	10/9	209	12.3	3.3	63.33
	13/9	204	12.0	3.9	52.30
1983	2/9	158	9.3	4.9	32.38
	6/9	179	10.9	4.7	37.84
	12/9	171	10.0	4.1	42.22
	15/9	187	11.0	4.4	42.99
	19/9	184	10.8	3.9	46.23

Tabela 6  
Cálculo do Índice de Maturação - Vinho Aragonez

Ano	Data	Açúcar g/l	Álc. prov.	Ac. Tot.	S/A
1977	22/9	165	9.7	5.4	30.56
	8/9	184	10.8	4.6	40.00
	15/9	191	11.2	4.5	42.44
	19/9	184	10.8	4.0	46.00
	12/10	240	14.1	3.9	61.54
1978	6/9	210	12.4	5.3	40.00
	11/9	250	14.7	5.2	48.26
	15/9	253	14.9	4.7	53.48
1979	4/9	164	9.6	5.6	29.13
	10/9	177	10.4	4.7	37.42
	17/9	157	9.2	5.0	31.72
	24/9	166	9.8	4.5	36.89
	9/10	188	11.0	3.8	49.09
1981	4/9	247	14.5	4.0	62.06
	9/9	255	15.0	4.1	73.91
	11/9	238	14.0	4.1	57.63
1982	26/8	206	12.1	3.9	52.02
	1/9	197	11.6	3.3	59.70
	6/9	214	12.6	3.6	59.44
	9/9	234	13.7	3.4	69.23
	10/9	234	13.7	3.6	65.00
1983	2/9	184	10.8	4.3	42.99
	6/9	204	12.0	4.3	47.66

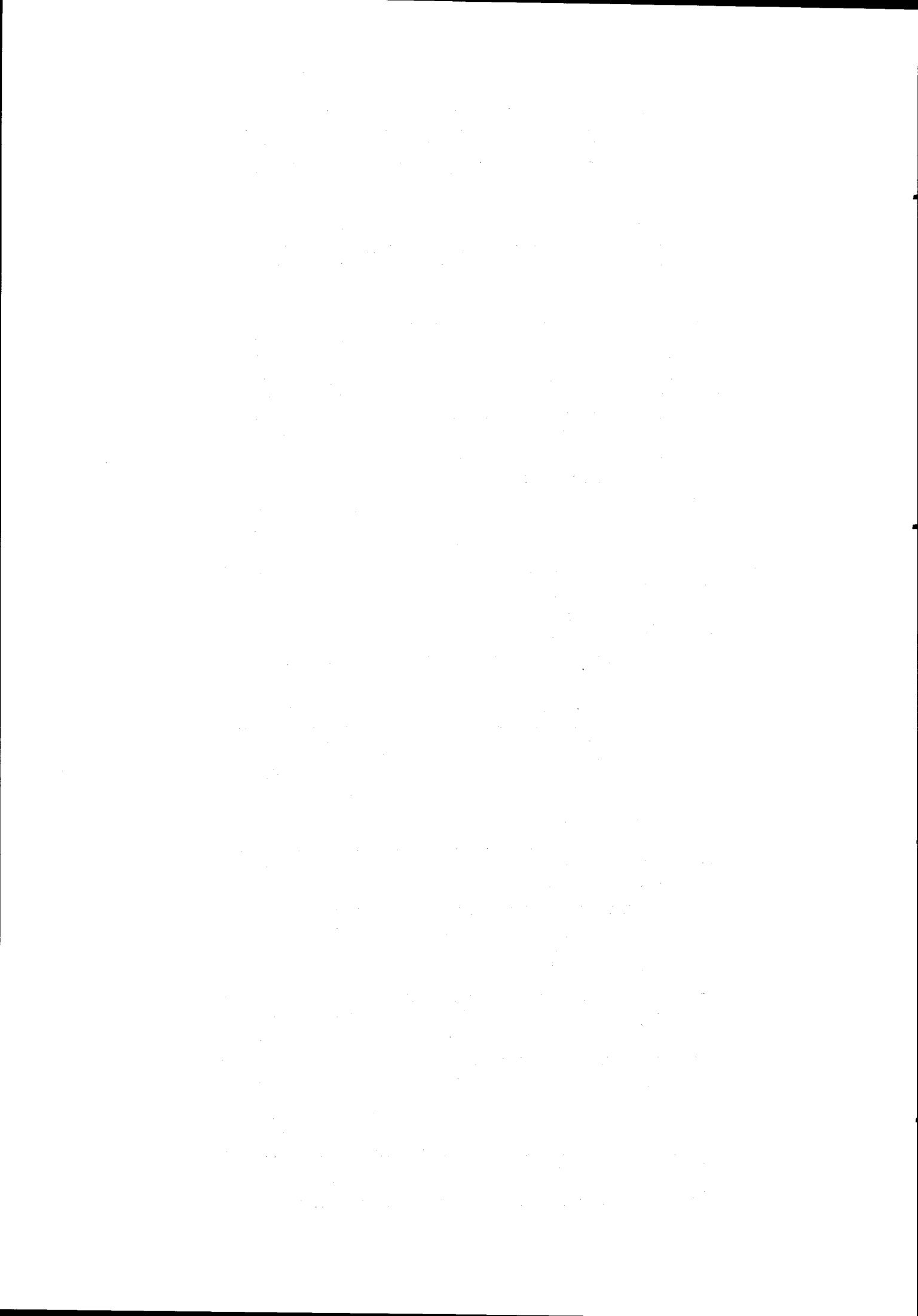


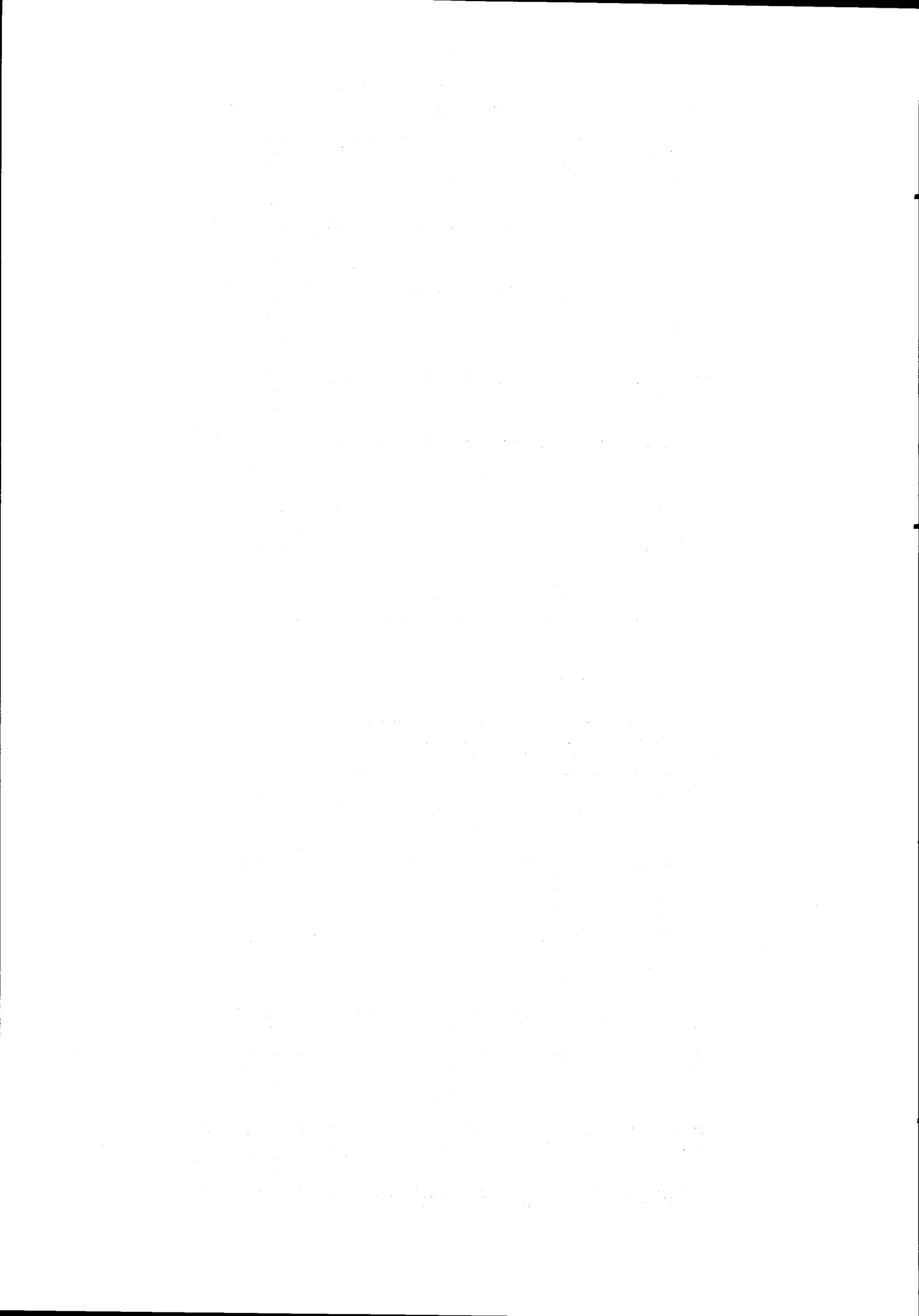
Tabela 7  
Cálculo do Índice de Maturação - Vinho Trincadeira

Ano	Data	Açúcar g/l	Alc. prov.	Ac. Tot.	S/A
1977	22/8	188	11.1	5.6	33.57
	8/9	251	14.8	3.2	78.44
	15/9	227	13.3	3.8	59.74
	19/9	250	14.7	4.1	60.98
	22/9	216	12.8	4.5	48.00
1978	6/9	187	11.0	6.6	28.33
	11/9	250	14.7	9.9	25.25
	15/9	239	14.1	5.6	42.45
1979	4/9	202	11.9	5.9	34.53
	10/9	183	10.8	5.7	32.11
	17/9	186	10.9	5.0	37.58
	24/9	209	12.3	5.1	40.98
	26/9	227	13.3	4.7	47.99
1980	8/9	229	13.5	6.2	36.76
	11/9	212	12.5	5.7	37.19
	16/9	253	14.9	6.0	42.17
1981	4/9	193	11.4	6.2	31.38
	11/9	193	11.4	4.8	40.21
	17/9	199	11.7	4.3	46.50
	23/9	195	11.5	4.4	44.02
	28/9	220	12.9	5.4	40.74
1982	26/8	209	12.3	5.6	37.12
	1/9	215	12.7	4.5	47.78
	6/9	221	13.0	4.3	51.64
	9/9	247	14.5	4.6	53.93
	10/9	303	17.9	5.0	61.21
1983	2/9	173	10.2	4.8	36.04
	6/9	215	12.7	5.3	40.95

Tabela 8  
Cálculo do Índice de Maturação - Vinho Periquita

Ano	Data	Açúcar g/l	Alc. prov.	Ac. Tot.	S/A
1977	22/8	184	10.8	6.9	26.67
	8/9	262	15.5	3.1	84.52
	15/9	+ de 270	+ de 16.0	3.1	---
	19/9	+ de 270	+ de 16.0	3.8	---
	22/9	234	13.7	4.2	55.71
1978	6/9	191	11.2	6.7	25.59
	11/9	213	12.5	6.1	35.03
	18/9	229	13.5	5.9	39.14
	26/9	251	14.8	5.0	50.70
1979	4/9	177	10.4	6.2	28.78
	10/9	197	11.6	6.6	29.85
	17/9	185	10.9	5.1	36.28
	20/9	200	11.7	4.9	40.98
1981*	13/10	297	12.2	7.3	28.43
1982	26/8	175	10.3	4.7	37.63
	1/9	222	13.1	5.2	42.86
	6/9	226	13.3	4.8	47.08
	9/9	259	15.2	4.8	53.96
1983	2/9	231	13.6	5.6	41.62
	6/9	160	9.4	6.1	26.31
	12/9	266	15.6	5.6	47.25

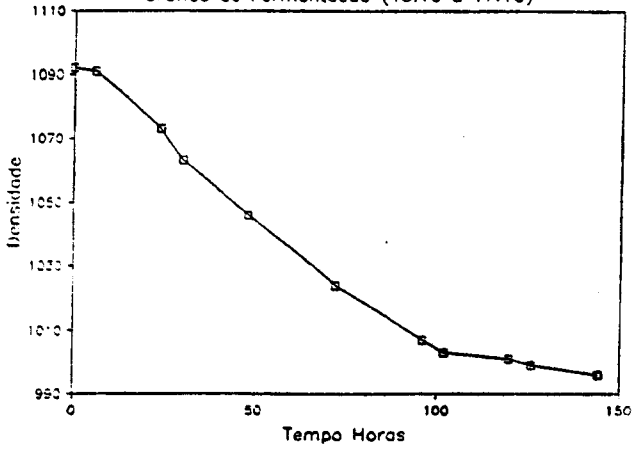
\* demasiado verde nas datas anteriores



# Roupeiro

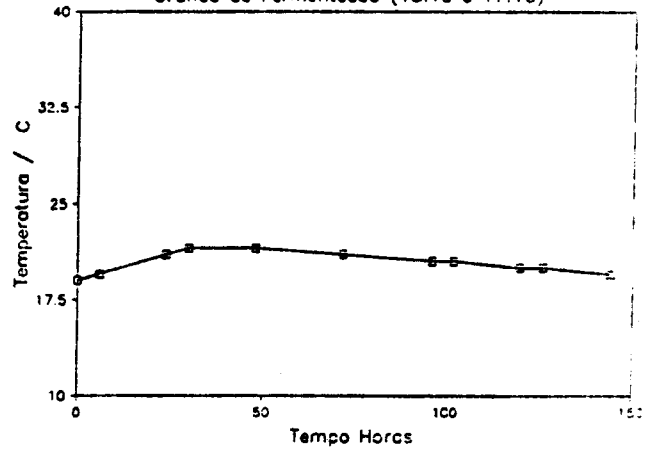
Roupeiro 77

Grafico de Fermentacao (13.10 a 17.10)



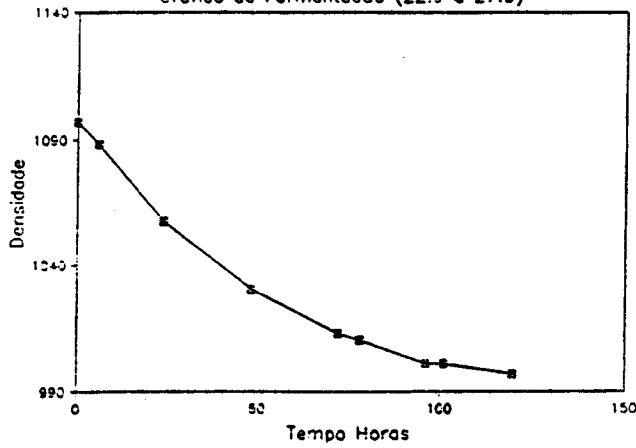
Roupeiro 77

Grafico de Fermentacao (13.10 a 17.10)



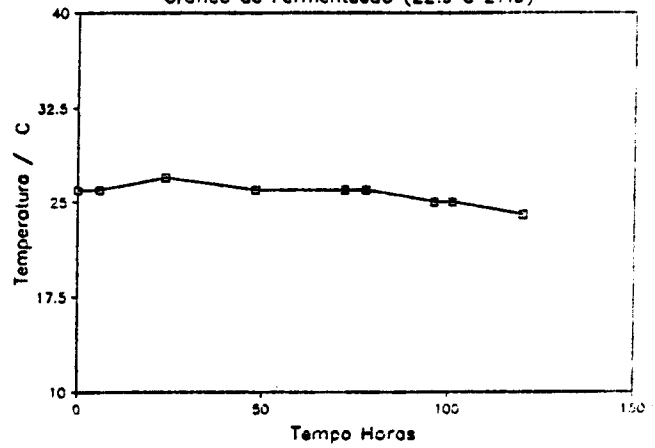
Roupeiro 78

Grafico de Fermentacao (22.9 a 27.9)



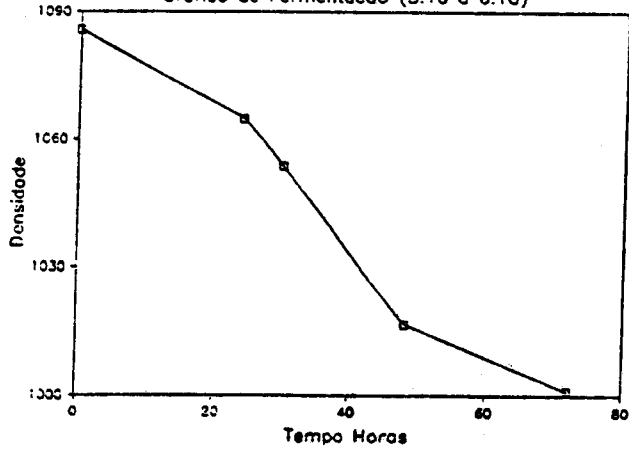
Roupeiro 78

Grafico de Fermentacao (22.9 a 27.9)



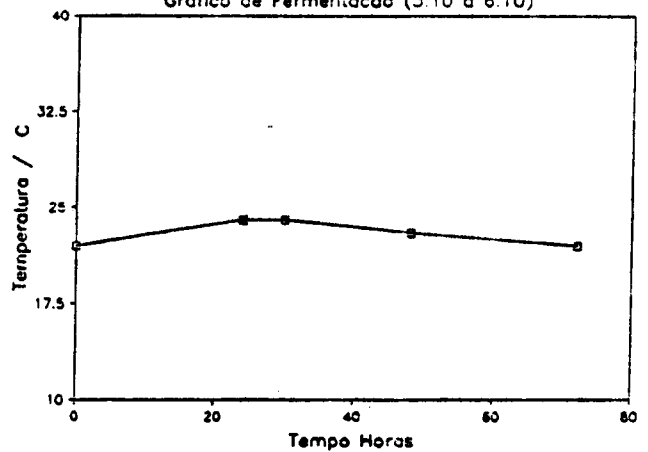
Roupeiro 79

Grafico de Fermentacao (3.10 a 6.10)



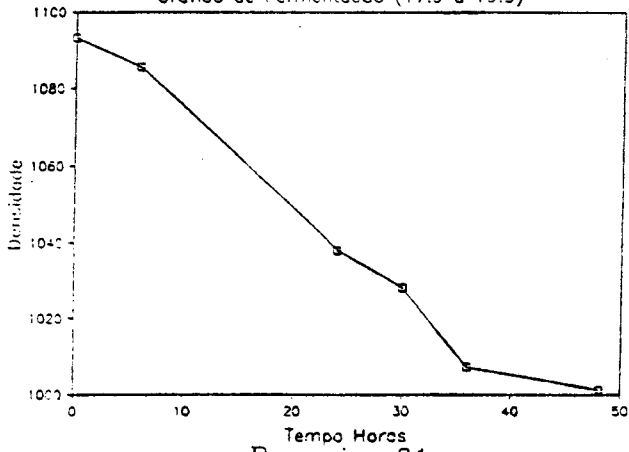
Roupeiro 79

Grafico de Fermentacao (3.10 a 6.10)



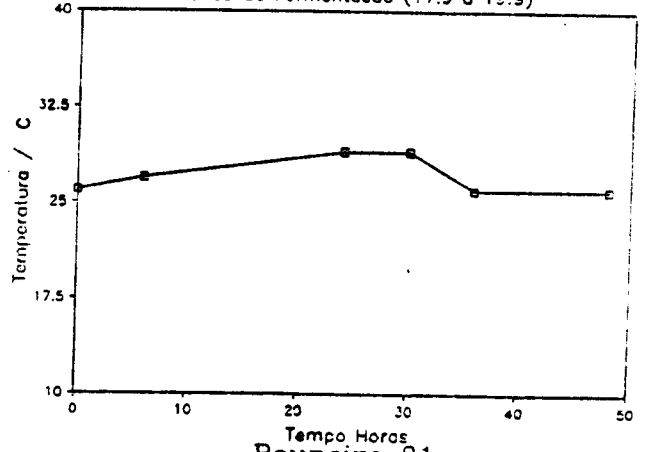
### Roupeiro 80

Grafico de Fermentacao (17.9 a 19.9)



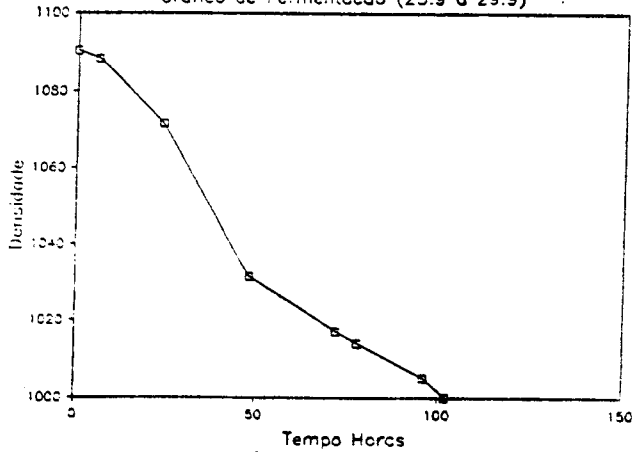
### Roupeiro 80

Grafico de Fermentacao (17.9 a 19.9)



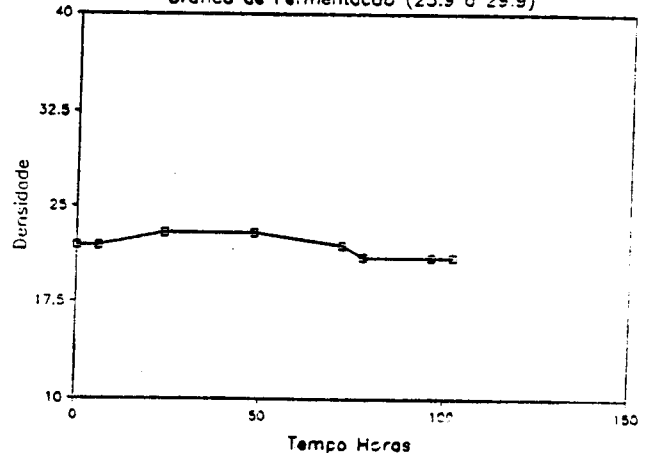
### Roupeiro 81

Grafico de Fermentacao (25.9 a 29.9)



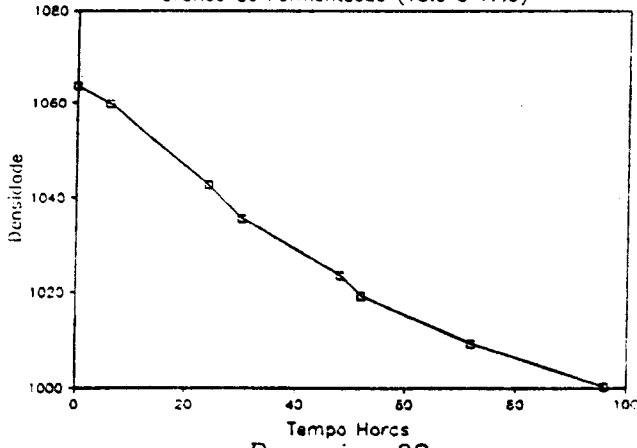
### Roupeiro 81

Grafico de Fermentacao (25.9 a 29.9)



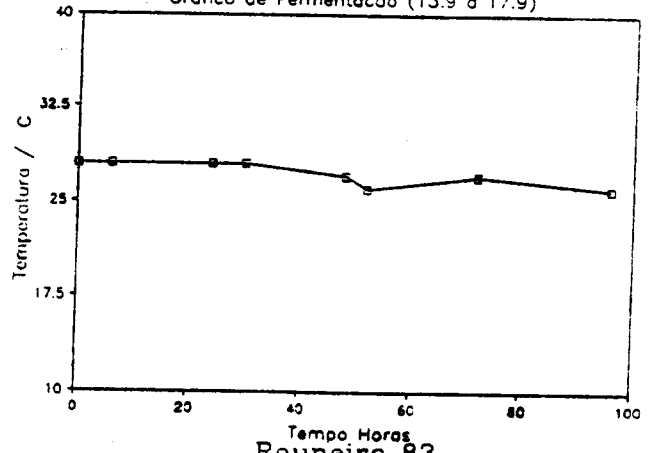
### Roupeiro 82

Grafico de Fermentacao (13.9 a 17.9)



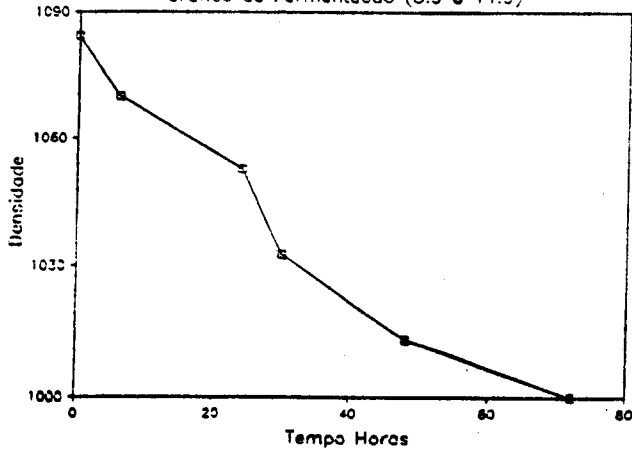
### Roupeiro 82

Grafico de Fermentacao (13.9 a 17.9)



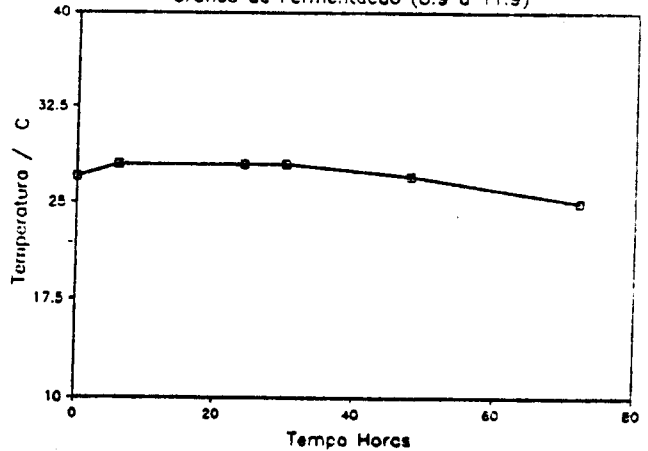
### Roupeiro 83

Grafico de Fermentacao (8.9 a 11.9)



### Roupeiro 83

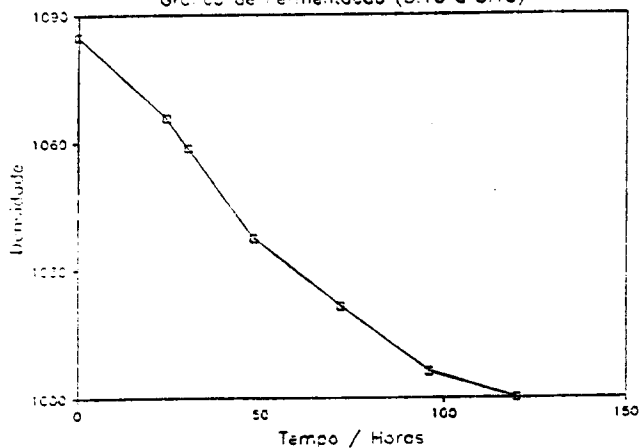
Grafico de Fermentacao (8.9 a 11.9)



# Tamarez

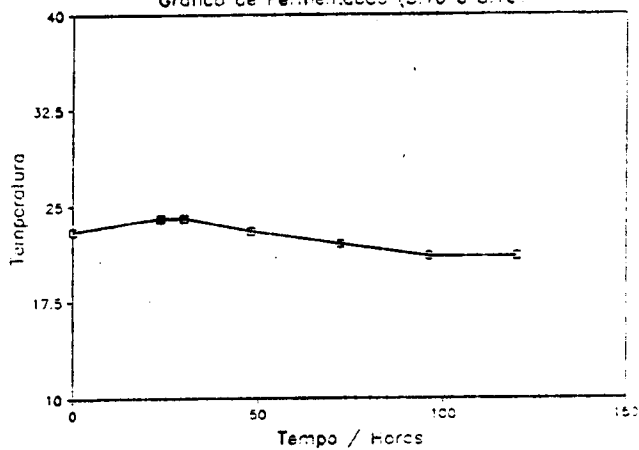
Tamarez 79

Gráfico de Fermentação (3.10 e 8.10)



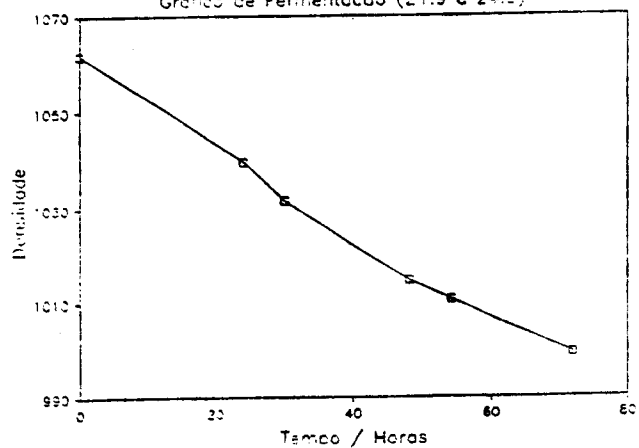
Tamarez 79

Gráfico de Fermentação (3.10 e 8.10)



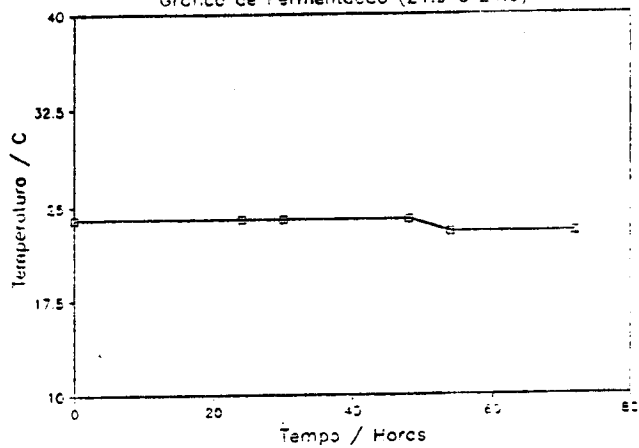
Tamarez 80

Gráfico de Fermentação (21.9 e 24.9)



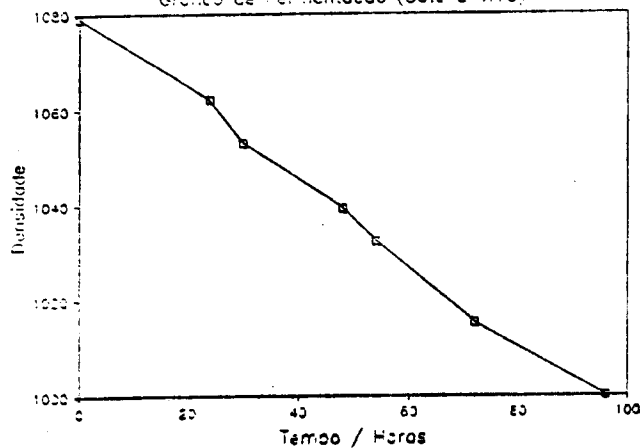
Tamarez 80

Gráfico de Fermentação (21.9 e 24.9)



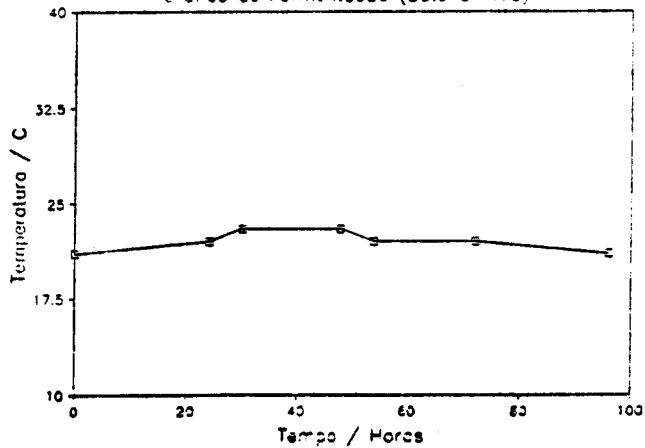
Tamarez 81

Gráfico de Fermentação (30.9 e 4.10)



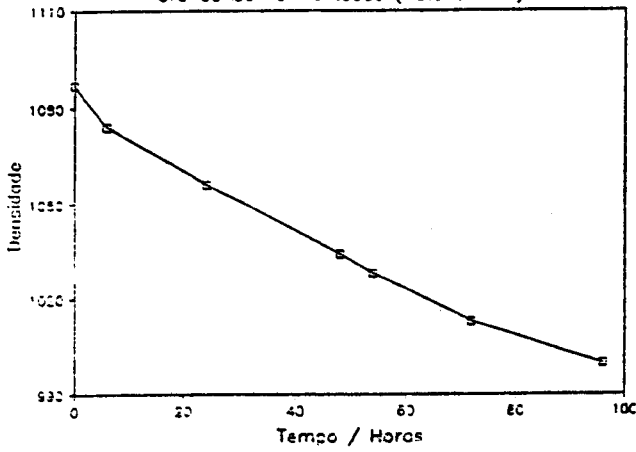
Tamarez 81

Gráfico de Fermentação (30.9 e 4.10)



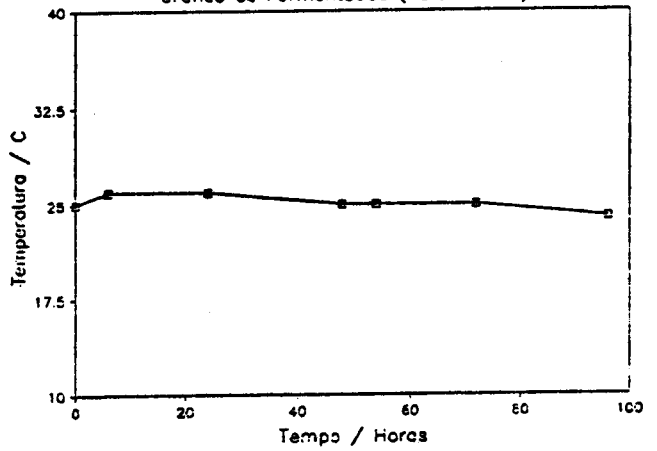
Tamarez 82

Grafico de Fermentacao (15.9 a 19.9)



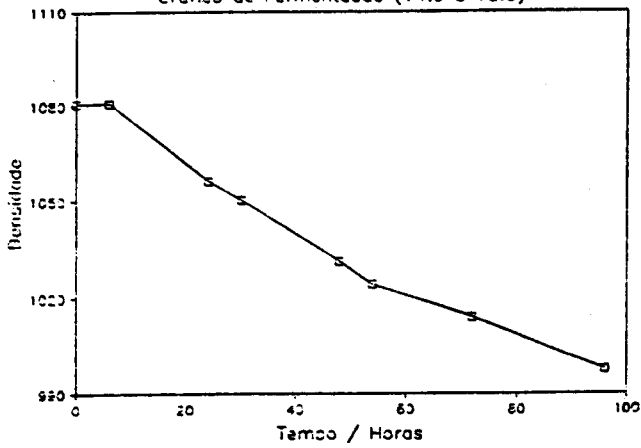
Tamarez 82

Grafico de Fermentacao (15.9 a 19.9)



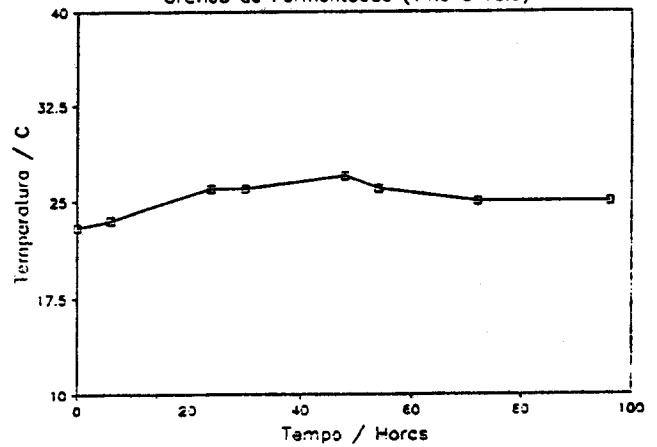
Tamarez 83

Grafico de Fermentacao (14.9 a 18.9)



Tamarez 83

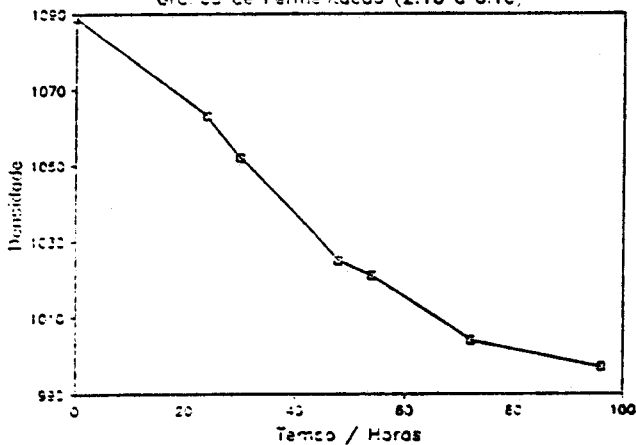
Grafico de Fermentacao (14.9 a 18.9)



R. Ovelha

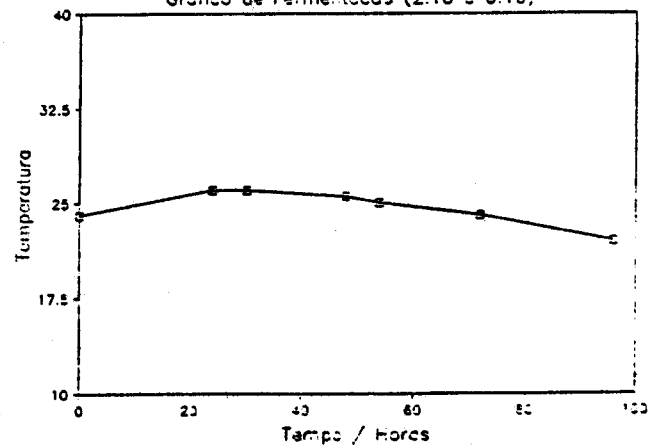
R. Ovelha 77

Grafico de Fermentacao (2.10 a 6.10)



R. Ovelha 77

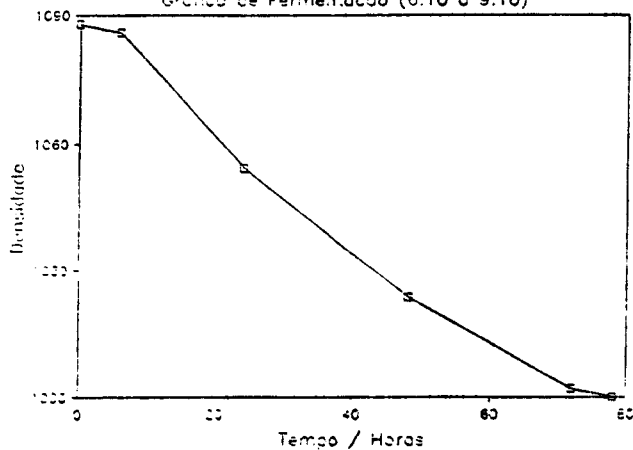
Grafico de Fermentacao (2.10 a 6.10)





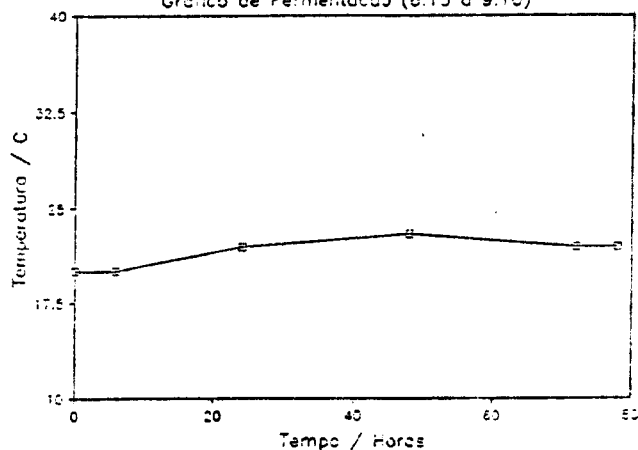
### R. Ovelha 78

Gráfico de Fermentação (6.10 a 9.10)



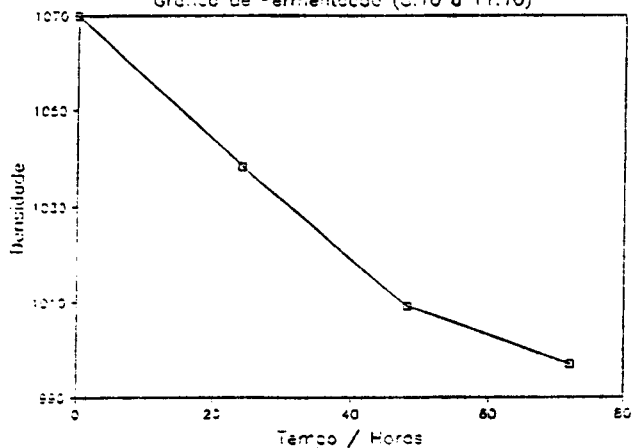
### R. Ovelha 78

Gráfico de Fermentação (6.10 a 9.10)



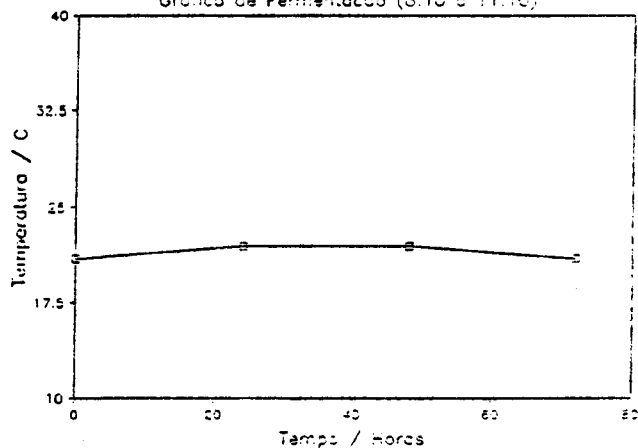
### R. Ovelha 81

Gráfico de Fermentação (8.10 a 11.10)



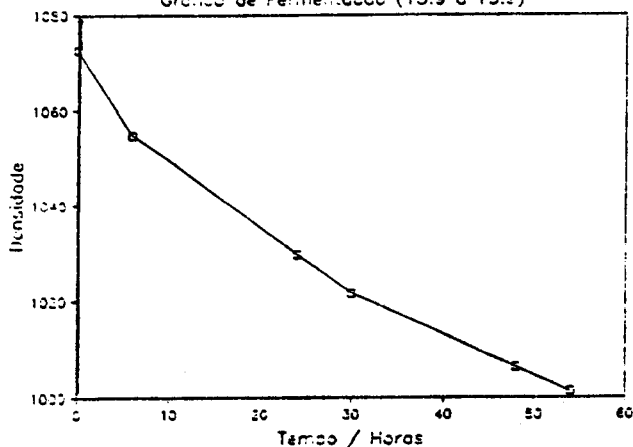
### R. Ovelha 81

Gráfico de Fermentação (8.10 a 11.10)



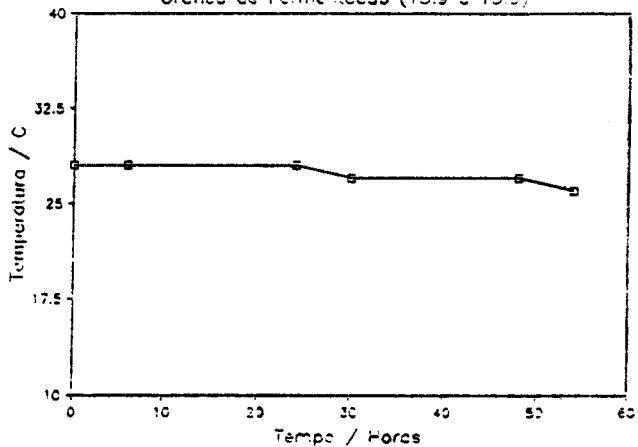
### R. Ovelha 82

Gráfico de Fermentação (13.9 a 15.9)



### R. Ovelha 82

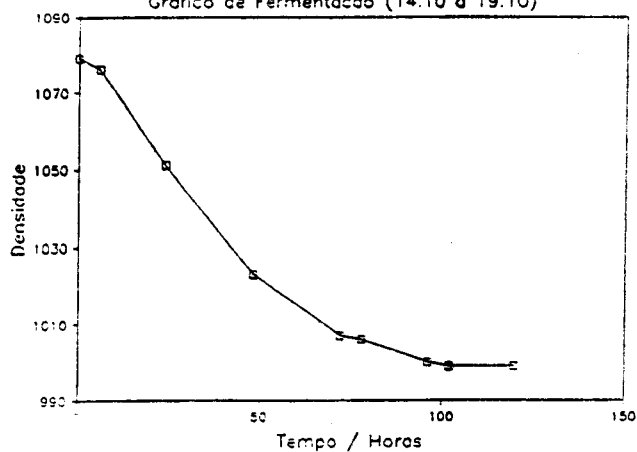
Gráfico de Fermentação (13.9 a 15.9)



# Manteudo

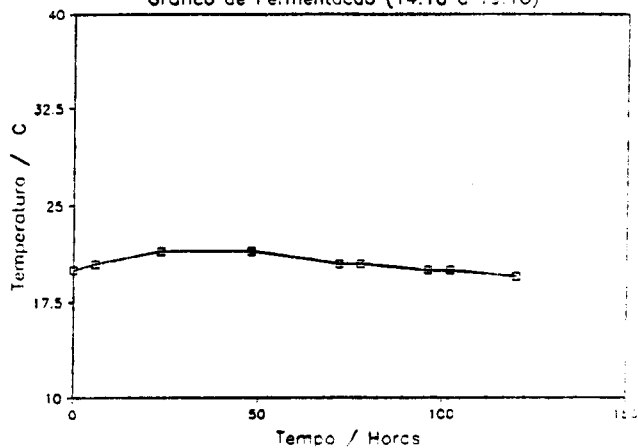
Manteudo 77

Grafico de Fermentacao (14.10 a 19.10)



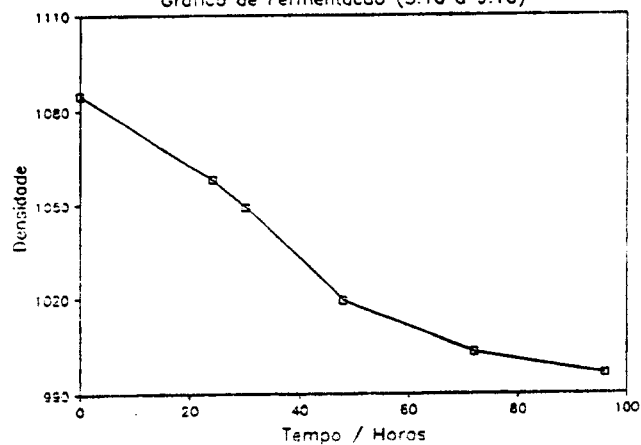
Manteudo 77

Grafico de Fermentacao (14.10 a 19.10)



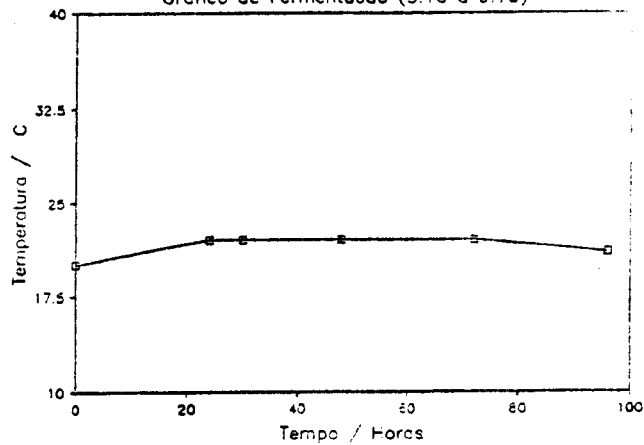
Manteudo 78

Grafico de Fermentacao (5.10 a 9.10)



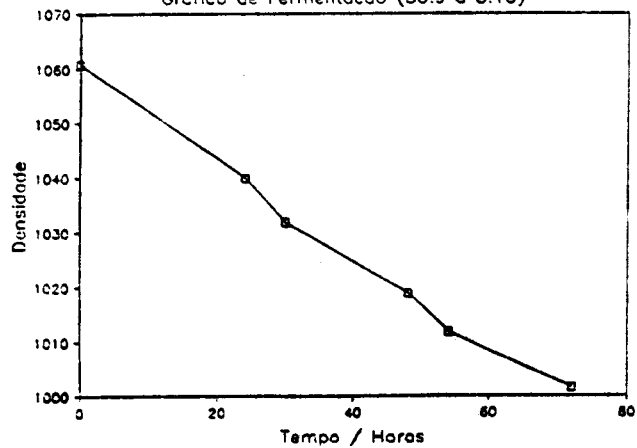
Manteudo 78

Grafico de Fermentacao (5.10 a 9.10)



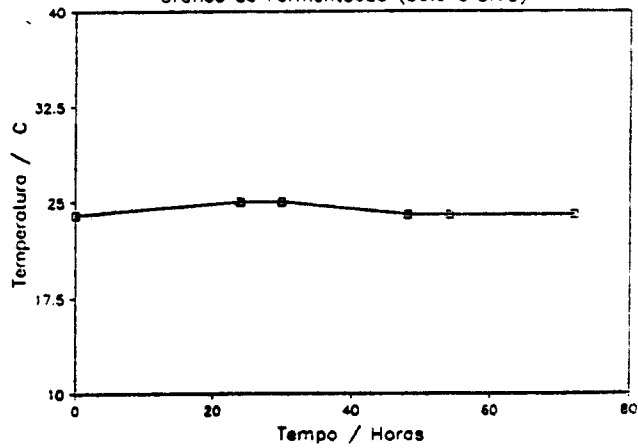
Manteudo 79

Grafico de Fermentacao (30.9 a 3.10)



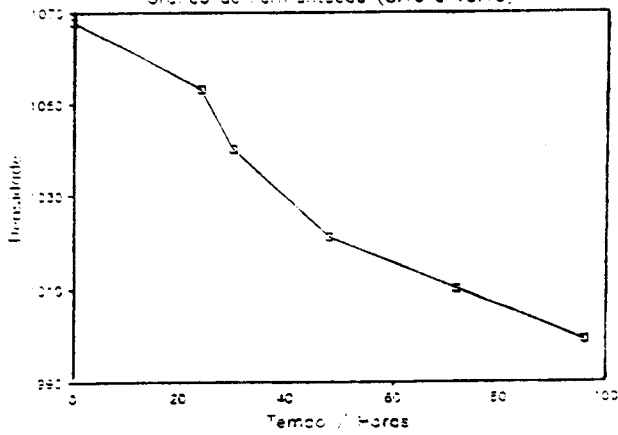
Manteudo 79

Grafico de Fermentacao (30.9 a 3.10)



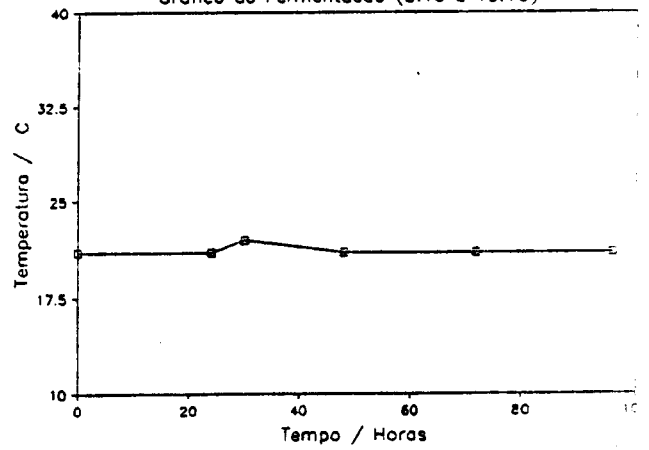
### Manteudo 81

Grafico de Fermentacao (8.10 a 13.10)



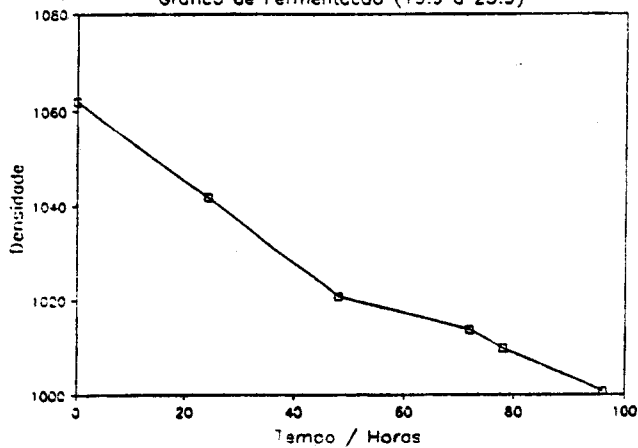
### Manteudo 81

Grafico de Fermentacao (8.10 a 13.10)



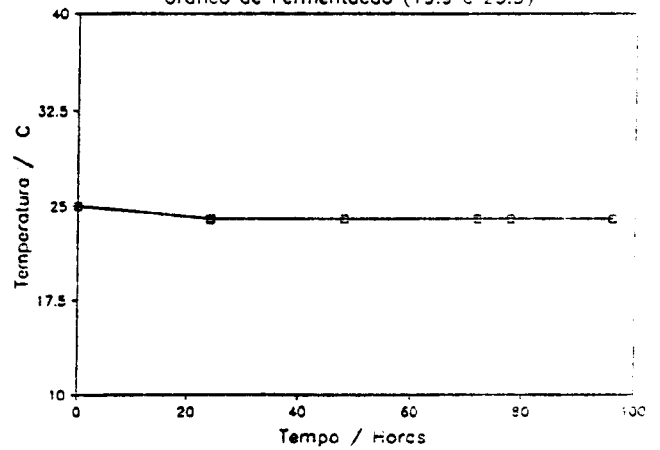
### Manteudo 82

Grafico de Fermentacao (19.9 a 23.9)



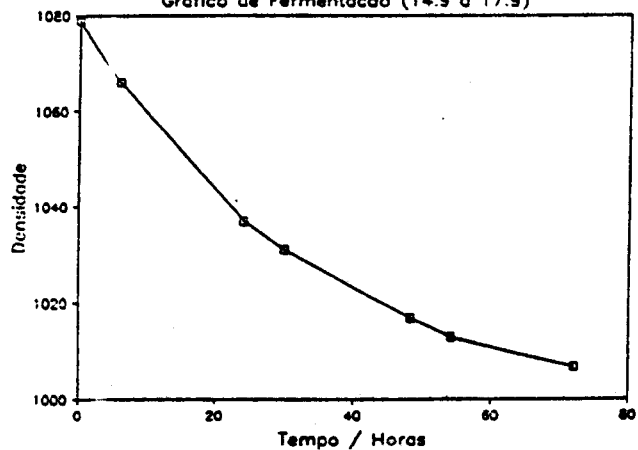
### Manteudo 82

Grafico de Fermentacao (19.9 a 23.9)



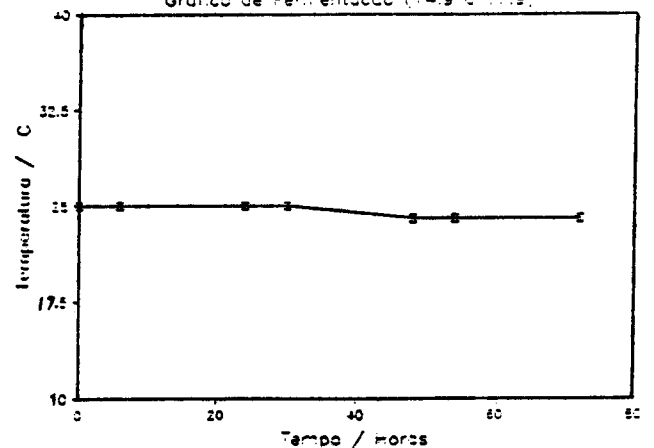
### Manteudo 83

Grafico de Fermentacao (14.9 a 17.9)



### Manteudo 83

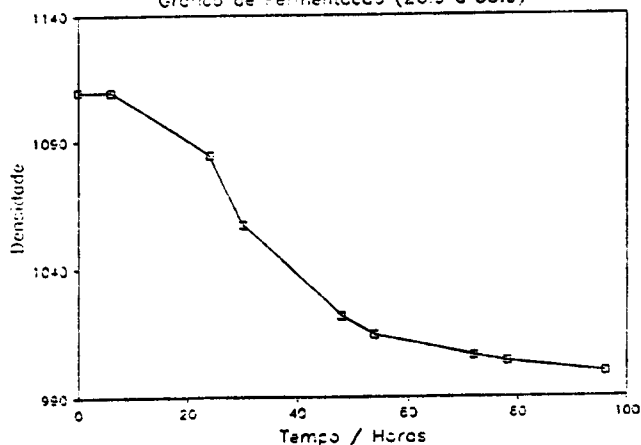
Grafico de Fermentacao (14.9 a 17.9)



# Trincadeira

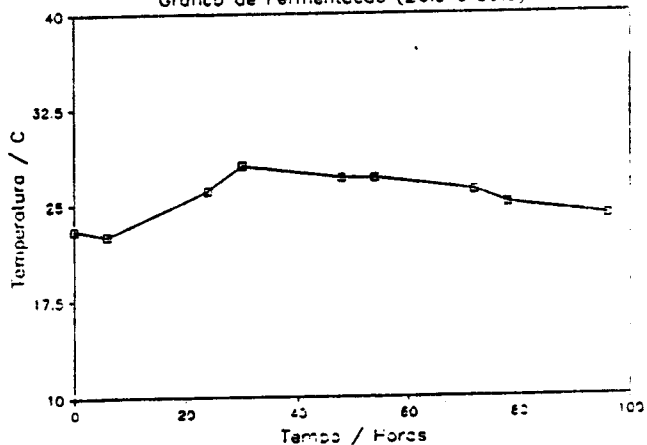
Trincadeira 77

Grafico de Fermentacao (26.9 e 30.9)



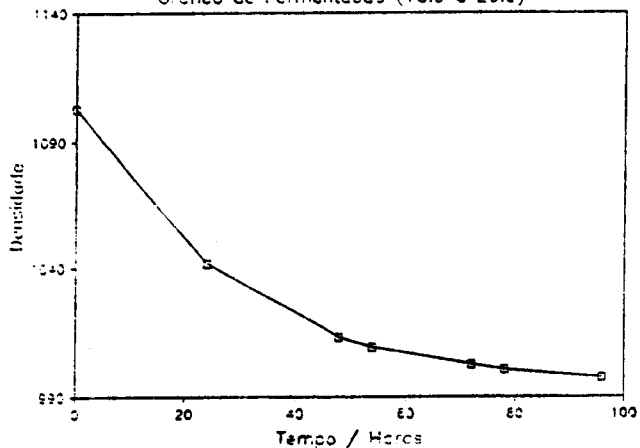
Trincadeira 77

Grafico de Fermentacao (26.9 e 30.9)



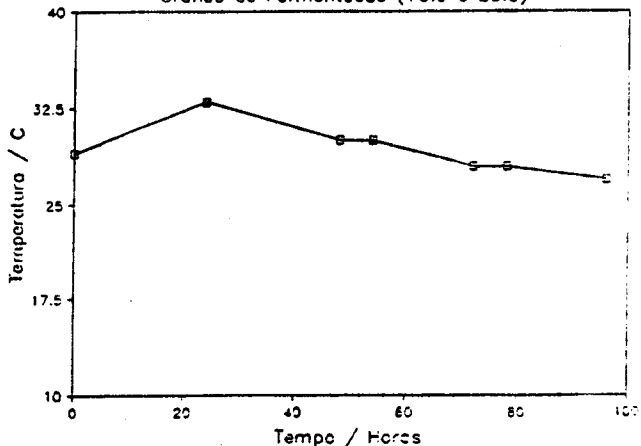
Trincadeira 78

Grafico de Fermentacao (16.9 e 20.9)



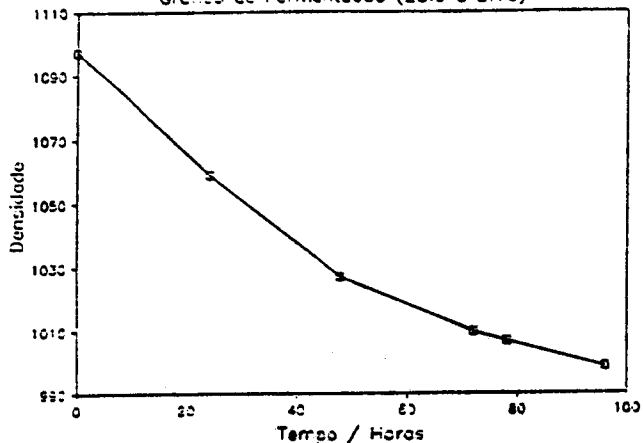
Trincadeira 78

Grafico de Fermentacao (16.9 e 20.9)



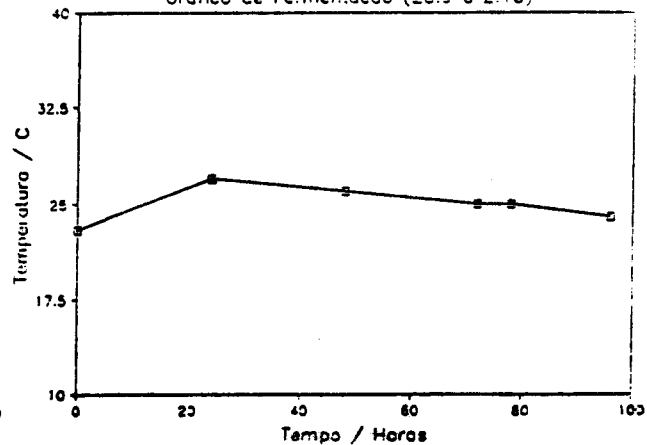
Trincadeira 79

Grafico de Fermentacao (28.9 e 2.10)



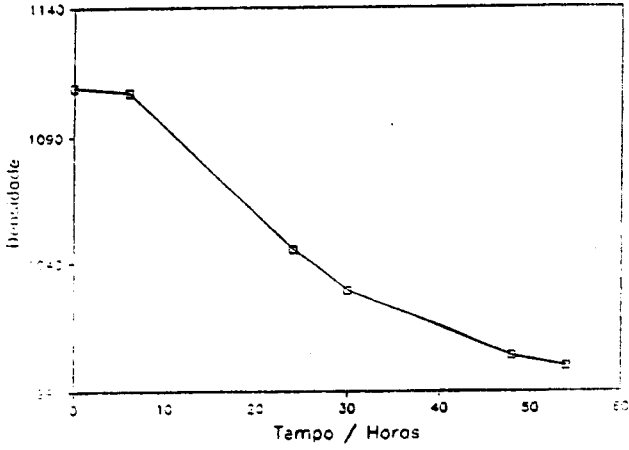
Trincadeira 79

Grafico de Fermentacao (28.9 e 2.10)



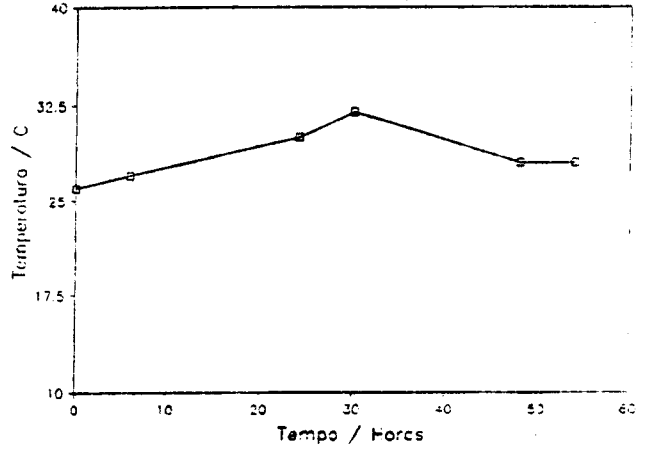
### Trincadeira 80

Gráfico de Fermentação (17.9 a 19.9)



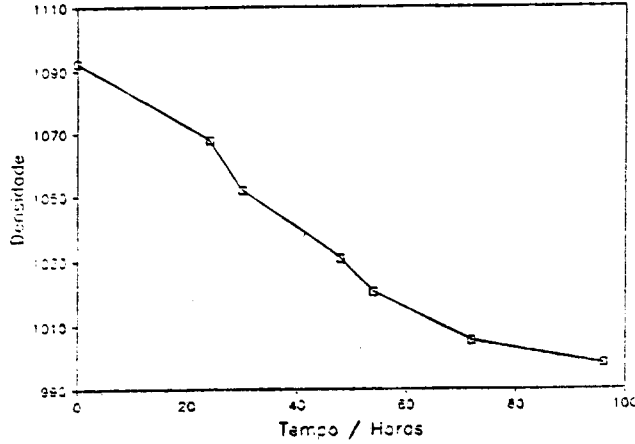
### Trincadeira 80

Gráfico de Fermentação (17.9 a 19.9)



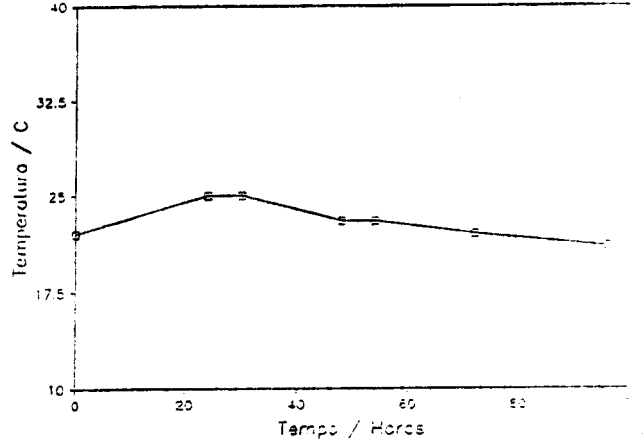
### Trincadeira 81

Gráfico de Fermentação (30.9 a 4.10)



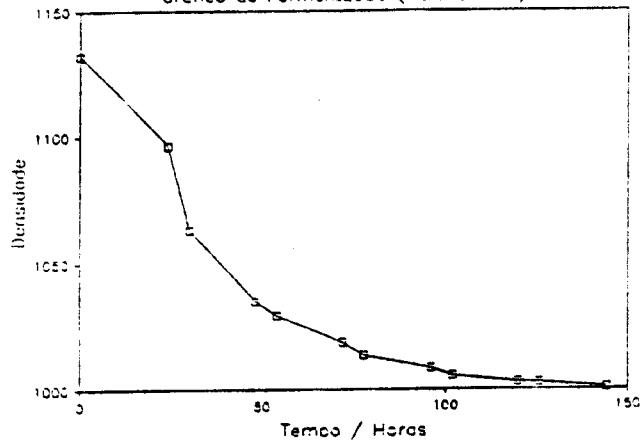
### Trincadeira 81

Gráfico de Fermentação (30.9 a 4.10)



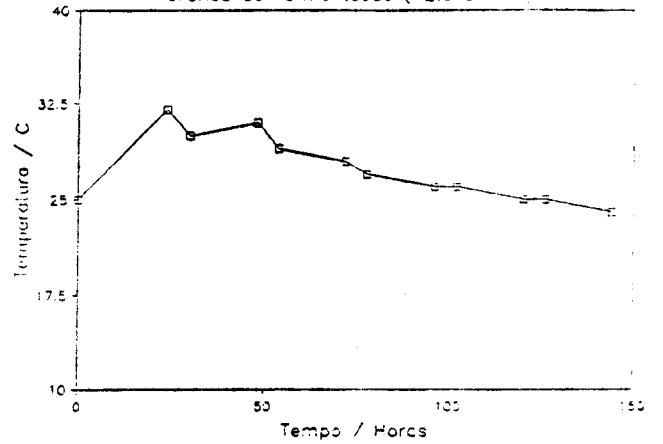
### Trincadeira 82

Gráfico de Fermentação (12.9 a 19.9)



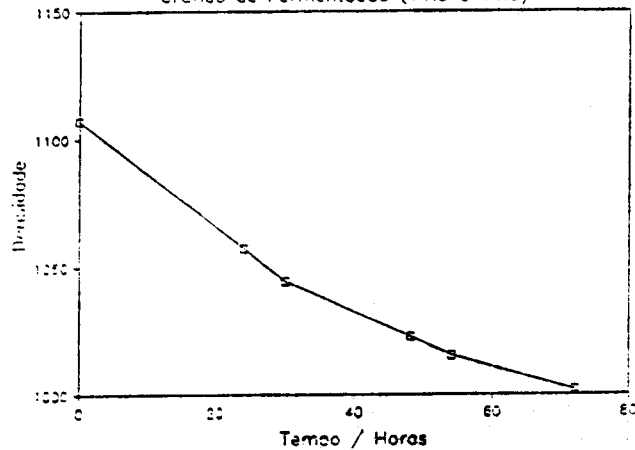
### Trincadeira 82

Gráfico de Fermentação (12.9 a 19.9)



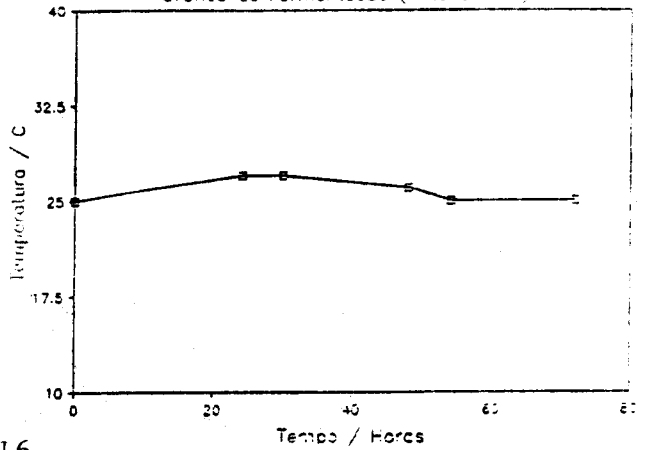
### Trincadeira 83

Gráfico de Fermentação (11.9 a 14.9)



### Trincadeira 83

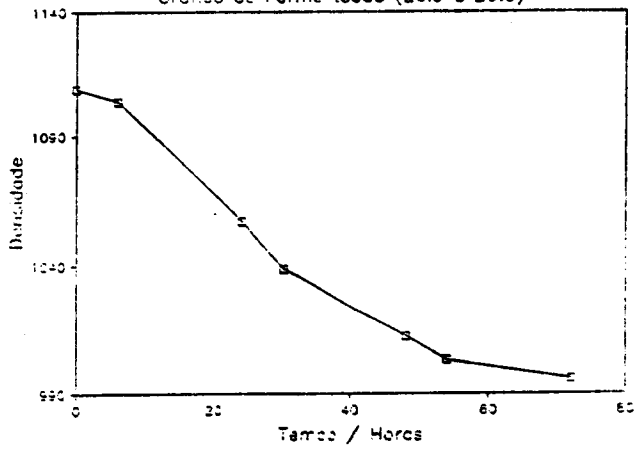
Gráfico de Fermentação (11.9 a 14.9)



# Periquita

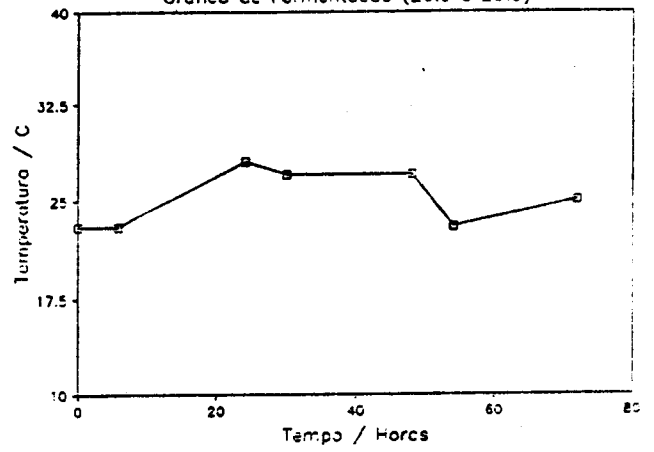
Periquita 77

Grafico de Fermentacao (26.9 a 29.9)



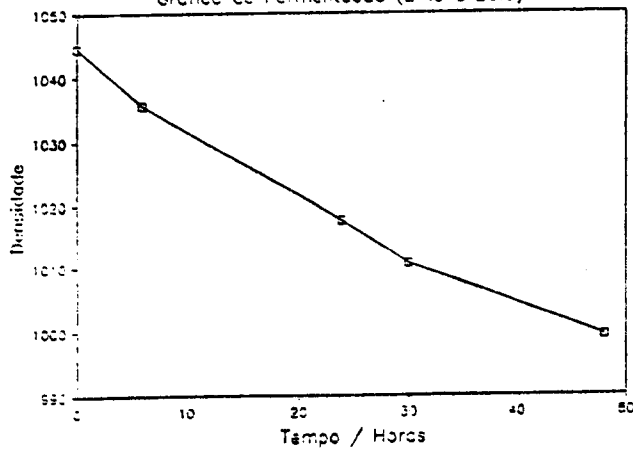
Periquita 77

Grafico de Fermentacao (26.9 a 29.9)



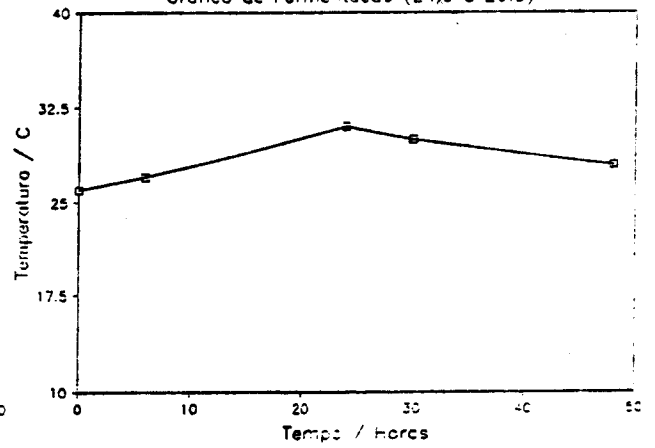
Periquita 79

Grafico de Fermentacao (24.9 a 26.9)



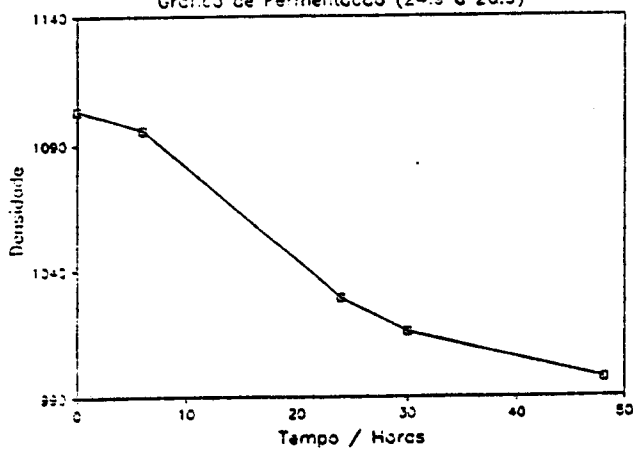
Periquita 78

Grafico de Fermentacao (24.9 a 26.9)



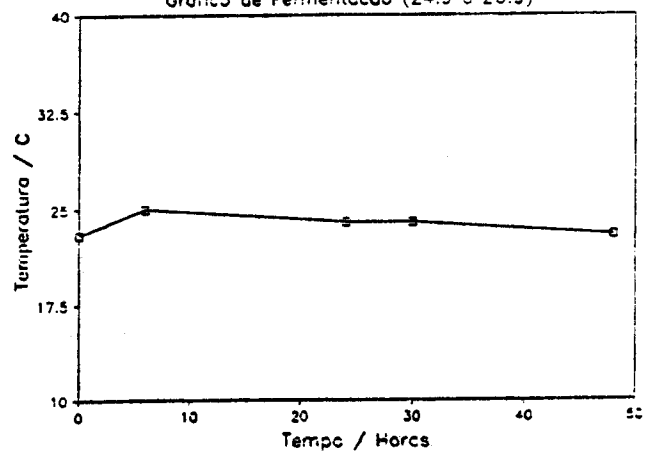
Periquita 78

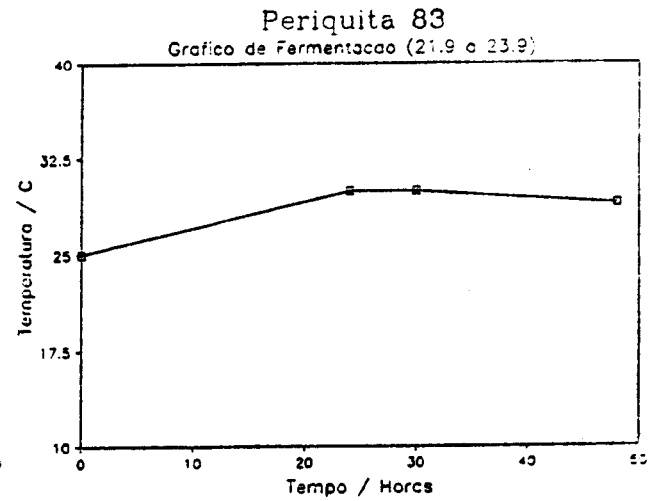
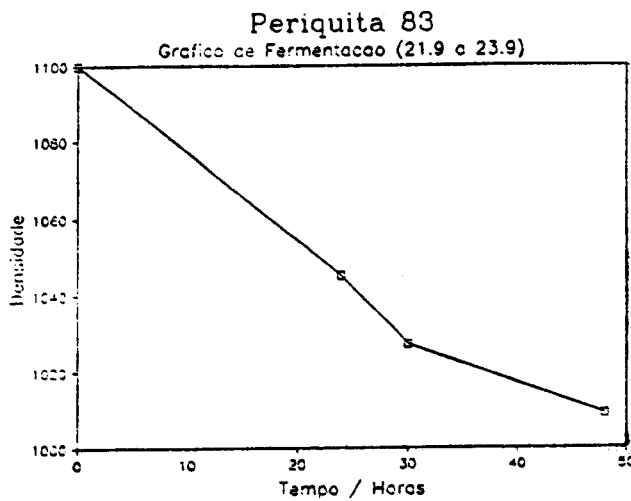
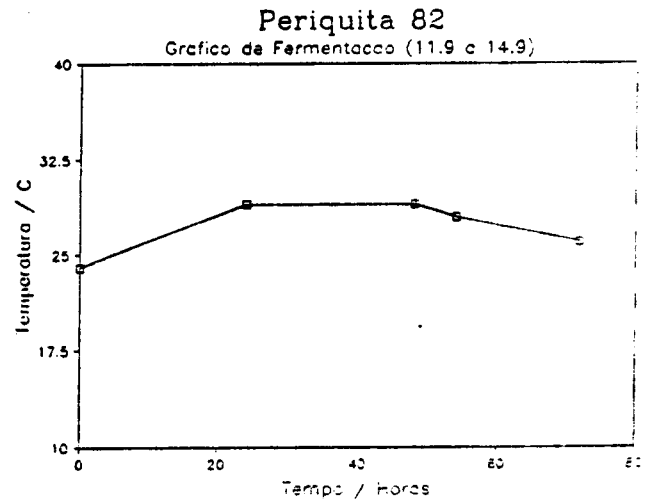
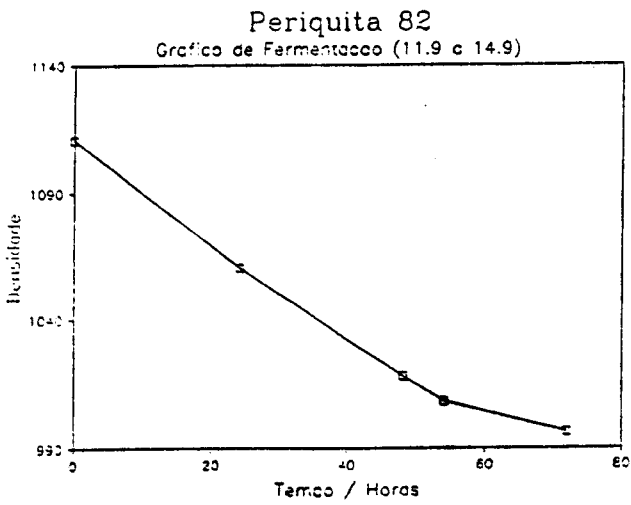
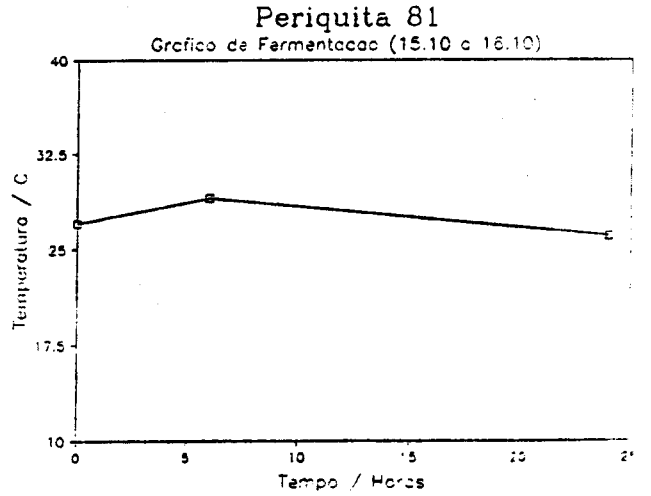
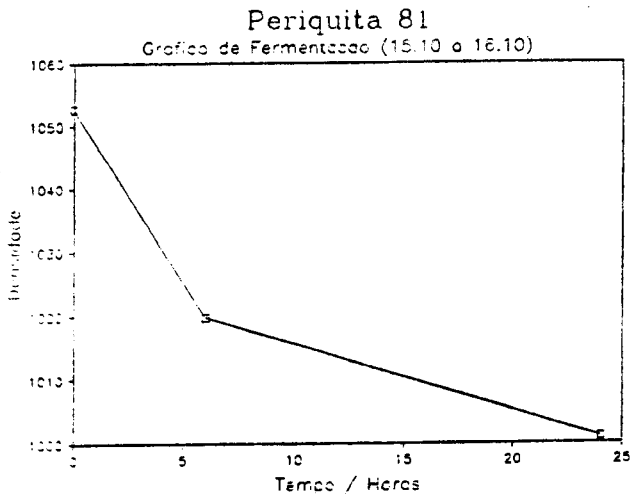
Grafico de Fermentacao (24.9 a 26.9)



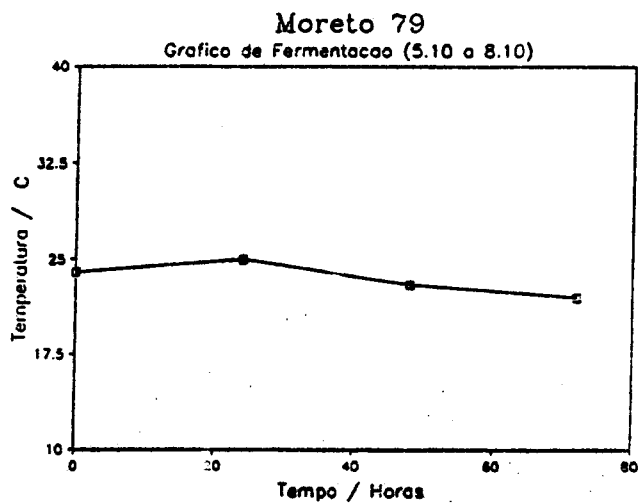
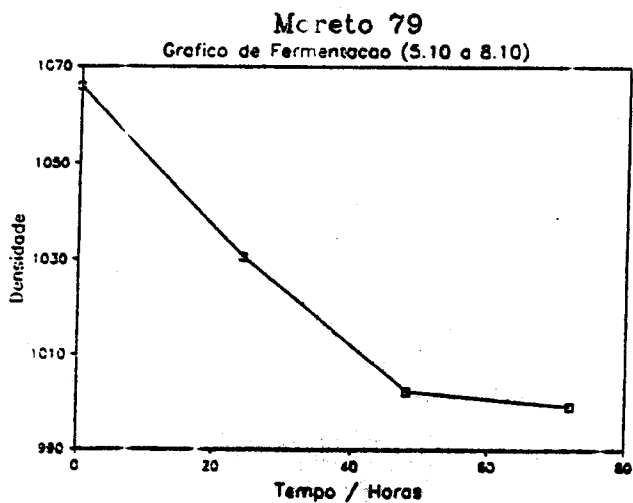
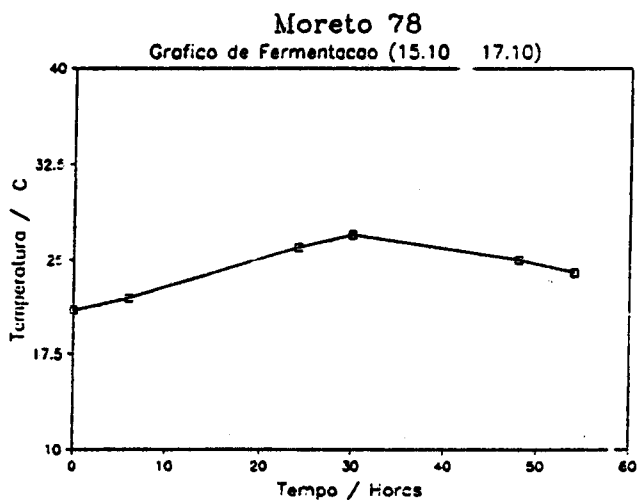
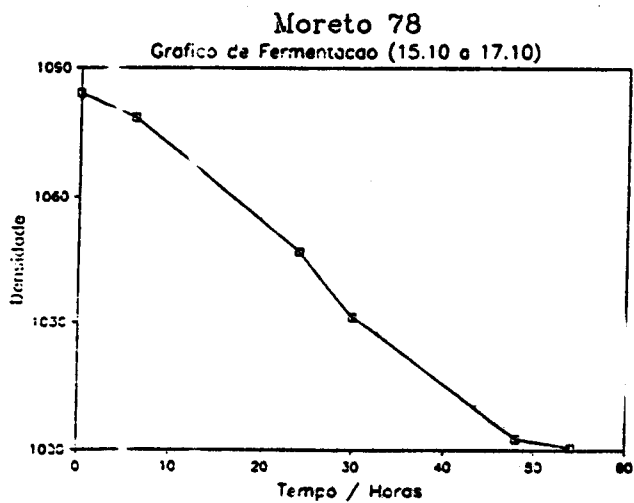
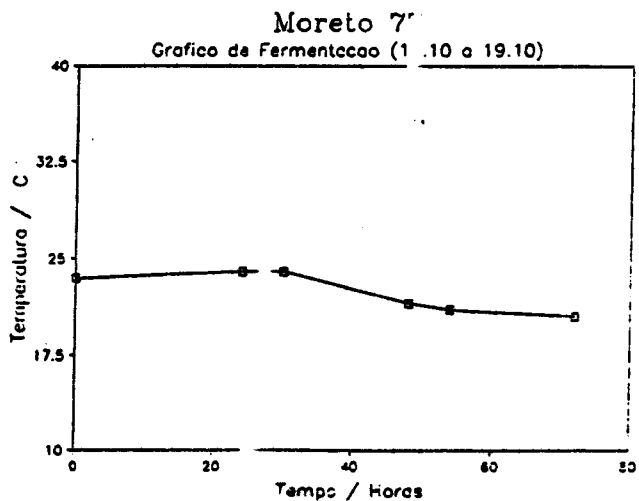
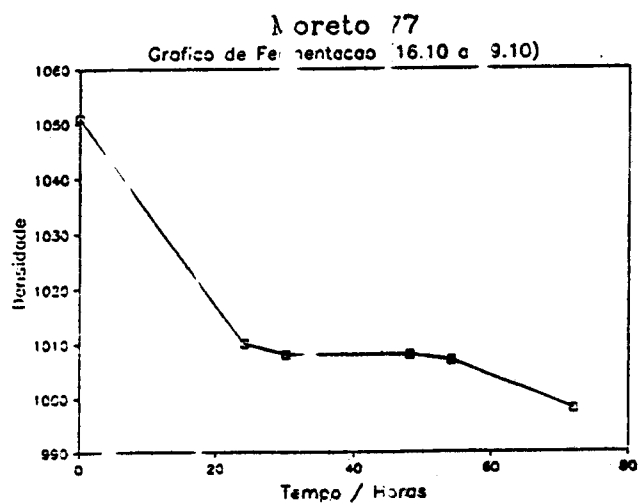
Periquita 79

Grafico de Fermentacao (24.9 a 26.9)

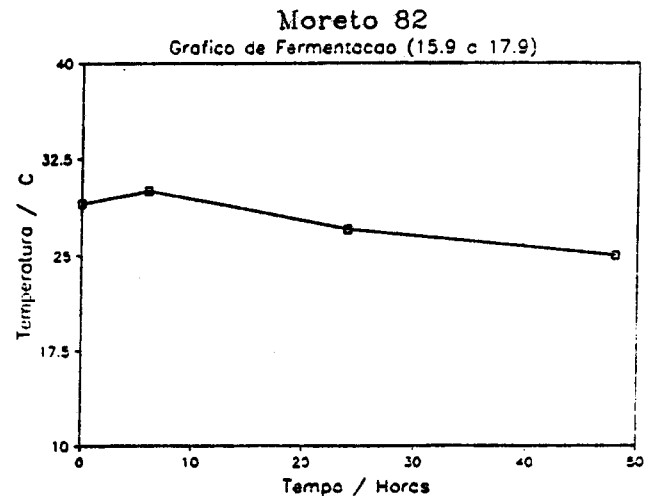
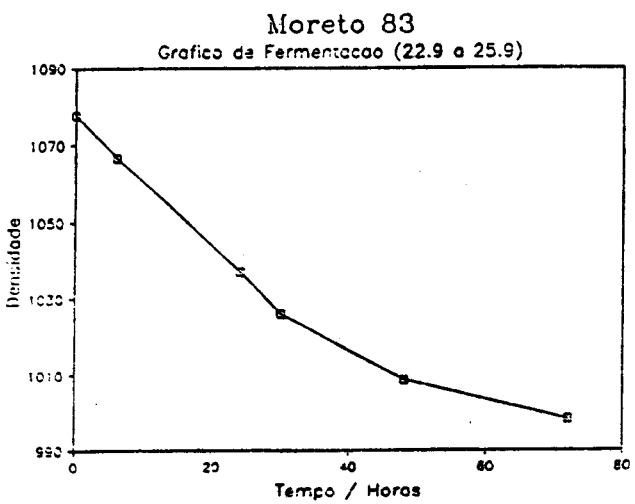
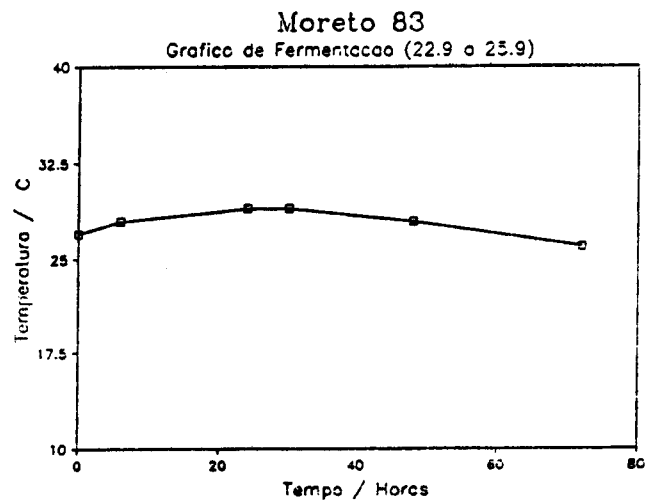
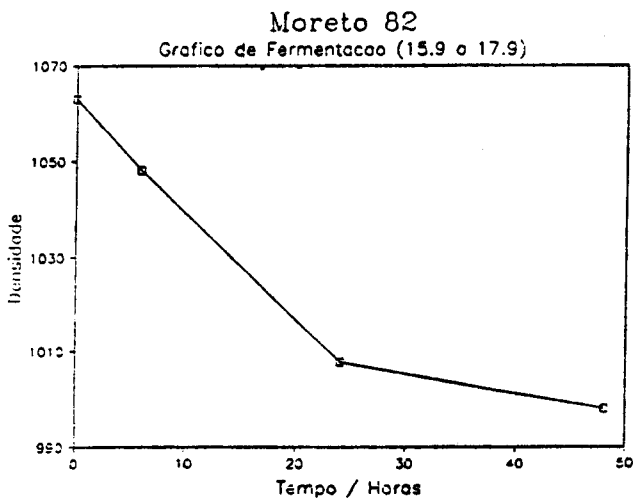
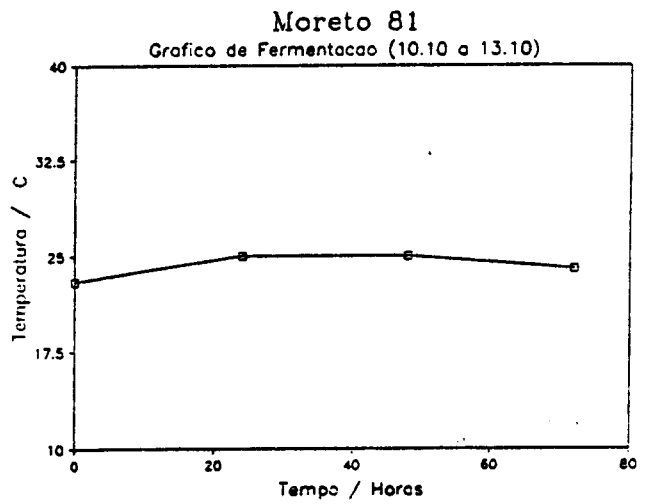
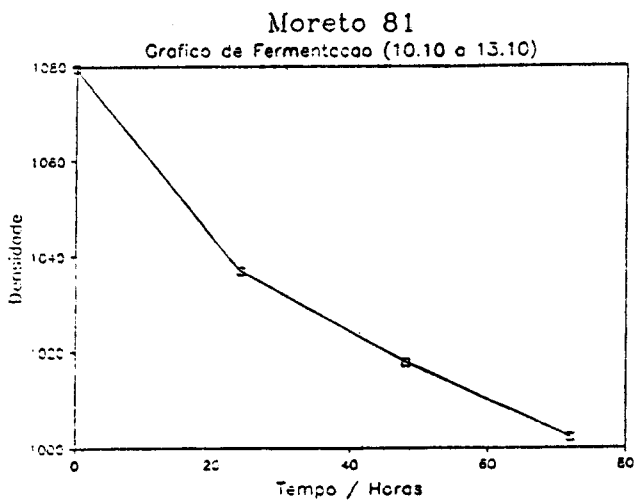




# Moreto



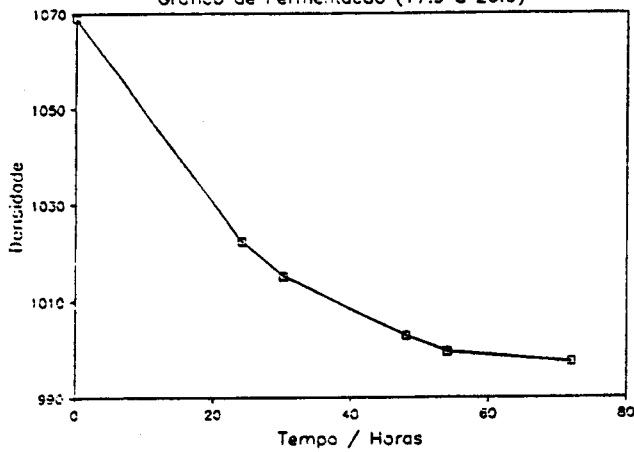




# Aragonez

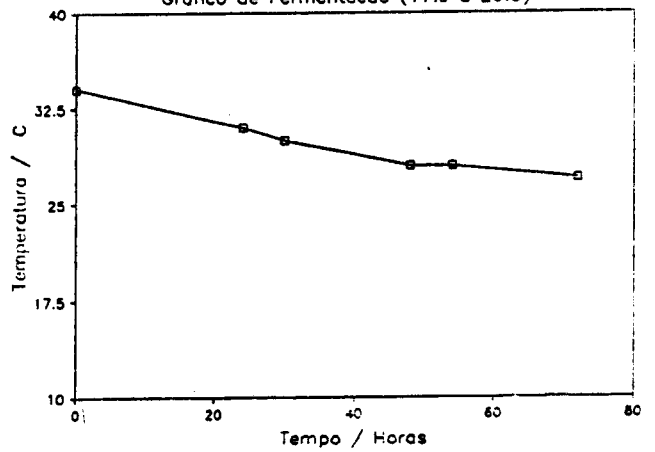
Aragonez 78

Grafico de Fermentacao (17.9 a 20.9)



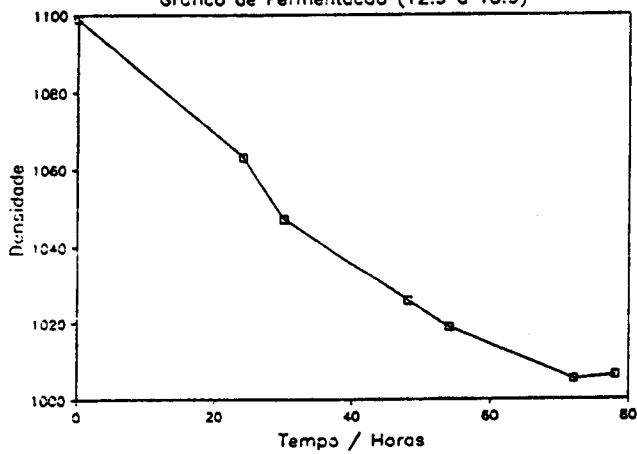
Aragonez 78

Grafico de Fermentacao (17.9 a 20.9)



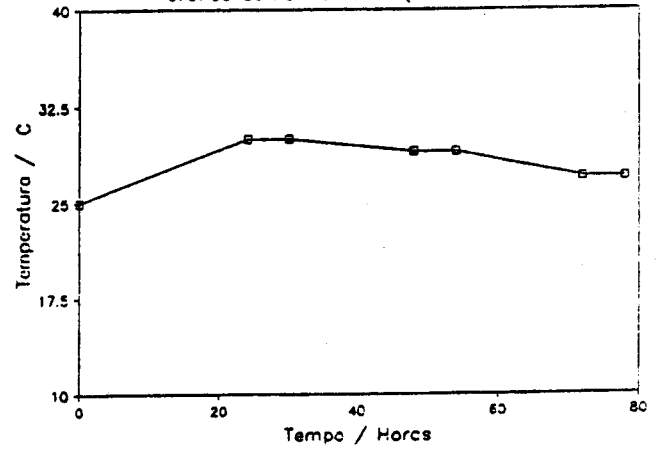
Aragonez 82

Grafico de Fermentacao (12.9 a 15.9)



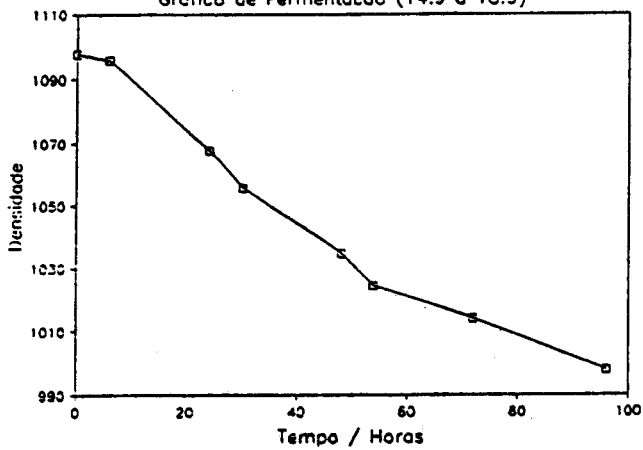
Aragonez 82

Grafico de Fermentacao (12.9 a 15.9)



Aragonez 83

Grafico de Fermentacao (14.9 a 18.9)



Aragonez 83

Grafico de Fermentacao (14.9 a 18.9)

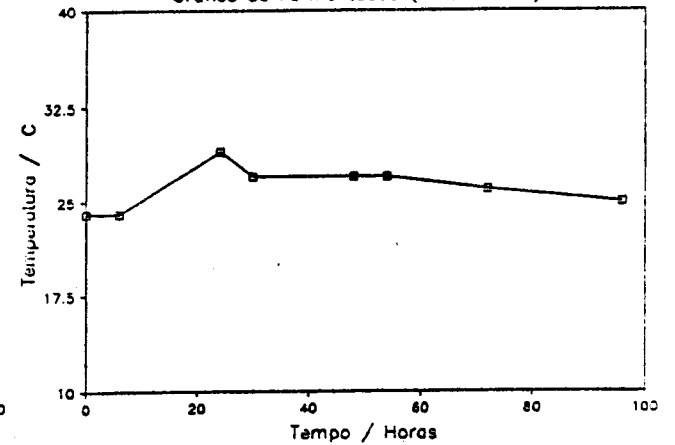


Tabela 9  
Vinho Moreto - Controle analítico

Data de Fim de Fermentação - 19.10.77

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
4.11.77	998,5	13,2	4,9	0,3	4,6	4,0	---	---	---	-	---
8.03.78	----	----	---	0,2	---	---	13	13	---	-	SH <sub>2</sub>
16.05.78	----	----	4,2	0,5	3,6	3,9	--	--	---	S	---
9.05.79	995,1	11,7	4,0	0,6	3,1	3,9	13	13	25,3	-	---

Data de Fim de Fermentação - 17.10.78

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
20.11.78	996,4	11,5	4,7	0,2	4,4	3,3	26	12	27,4	-	---
30.01.79	995,0	11,0	4,1	0,3	3,6	4,0	26	6	23,5	S	---
18.05.79	994,5	11,3	3,6	0,4	3,0	3,9	26	6	23,2	-	B <sup>+</sup>

Data de Fim de Fermentação - 8.10.79

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
19.11.79	996,6	10,9	5,0	0,2	4,6	3,8	26	6	26,4	-	---
16.04.80	----	----	3,6	0,4	3,0	---	13	13	---	S	---
17.06.80	995,4	10,7	3,8	0,5	3,0	3,9	13	13	23,6	-	13,4

Data de Fim de Fermentação - 13.10.81

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
12.11.81	995,1	13,1	5,3	0,3	4,8	4,0	19	26	28,4	-	---
4.01.82	----	----	5,1	0,5	4,4	---	--	--	---	S	---
23.04.82	994,1	13,0	3,7	0,7	2,7	4,2	38	38	26,0	-	14,5

Data de Fim de Fermentação - 17.09.82

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
28.10.82	994,6	12,2	4,5	0,3	4,0	3,8	19	26	25,3	-	---
13.01.83	994,9	12,2	4,6	0,4	4,0	3,7	32	64	---	-	Des
10.03.83	----	----	---	---	---	---	--	--	---	S	---
20.06.83	----	----	5,4	0,9	4,3	3,6	13	102	---	-	---

Tabela 10  
Vinho Trincadeira - Controle analítico

Data de Fim de Fermentação - 30.9.77											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
31.10.77	997.5	14.8	5.2	0.7	4.3						
20.12.77	996.4	14.7	3.9	0.6	2.9	4.1	32	154	34.4	S	---
8.3.78											Bom
28.5.79	994.9	14.4	4.9	0.7	4.0	3.9	26	50	30.7		

Data de Fim de Fermentação - 20.9.78											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
2.11.78	995.7	14.8	5.0	0.3	4.5	3.6	19	26	33.1	-	---
1.02.79	995.0	14.0	5.0	0.3	4.4	---	19	13	30.1	S	---
24.05.79	995.1	14.4	4.9	0.4	4.4	3.9	13	19	31.1	-	Bom

Data de Fim de Fermentação - 2.10.79											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
14.11.79	995.0	14.1	5.8	0.2	5.4	3.8	26	38	30.3	-	---
16.04.80	----	----	4.4	0.3	3.9	---	13	25	----	S	---
19.06.80	993.4	13.7	4.4	0.5	3.7	4.0	13	25	26.2	-	16.4

Data de Fim de Fermentação - 19.9.80											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
12.11.80	994.7	15.0	4.7	0.4	4.1	4.1	13	32	31.6	-	---
29.01.81	994.6	14.9	4.9	0.6	4.1	4.1	13	25	31.1	S	---
3.04.81	----	----	4.9	0.6	4.1	---	--	--	---	-	16.0

Data de Fim de Fermentação - 4.10.81											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
9.11.81	995.8	12.3	4.7	0.7	3.8	4.2	19	19	28.0	-	---
4.01.82	----	----	4.4	0.8	3.3	---	--	--	----	S	---
26.04.82	994.7	12.4	4.8	1.2	3.2	4.1	13	70	26.0	-	12.3

Data de Fim de Fermentação - 19.9.82											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
9.11.82	995.0	17.5	5.0	0.7	4.0	4.1	19	13	---	-	---
14.01.83	995.6	18.0	5.0	0.7	4.0	4.2	32	51	---	N	15.1
10.03.83	----	----	----	----	----	----	--	--	----	Com	---
6.07.83	----	----	5.4	0.8	4.4	4.0	--	13	63	-	---

Data de Fim de Fermentação - 14.9.83											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
18.10.83	993.2	14.7	5.6	0.6	4.9	4.0	19	13	28.0	-	S

Tabela 11  
Vinho Periquita - Controle analítico

Data de Fim de Fermentação - 29.9.77

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
31.10.77	995.5	14.9	5.0	0.4	4.5	4.0	---	---	---	-	---
8.03.78	----	----	---	0.4	---	---	---	---	---	-	Bom
30.05.78	----	----	4.8	---	4.2	3.8	---	---	---	S	---
28.05.79	992.3	14.6	4.6	0.6	3.8	3.9	13	19	26.0	-	---

Data de Fim de Fermentação - 29.9.78

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
13.11.78	994.6	15.2	4.2	0.5	3.5	3.7	13	13	31.8	-	---
5.02.79	994.6	14.5	4.4	0.6	3.6	---	13	19	31.0	S	---
24.5.79	994.3	15.1	4.4	0.4	3.8	4.0	13	32	31.0	-	S

Data de Fim de Fermentação - 26.9.79

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
2.11.79	993.8	11.3	4.9	0.3	4.5	3.7	26	0	21.8	-	---
5.02.80	993.0	11.8	3.8	0.5	3.1	4.0	26	0	21.2	S	---
20.6.80	992.8	11.9	4.1	0.5	3.4	3.9	19	7	21.1	-	15.8

Data de Fim de Fermentação - 16.10.81

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
19.11.81	996.3	11.0	5.5	0.4	4.9	3.6	13	13	26.1	-	---
4.01.82	----	----	4.7	0.6	3.8	---	---	---	---	S	---
26.04.82	995.1	10.9	4.5	0.6	3.6	3.7	13	51	23.4	-	11.8

Data de Fim de Fermentação - 14.9.82

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
22.10.82	992.5	15.2	4.7	0.5	4.1	3.9	26	25	27.6	-	---
14.01.83	993.4	15.1	5.1	0.5	4.4	3.9	26	57	---	N	18.6
10.03.83	----	----	---	---	---	---	---	---	---	Com.	---
6.07.83	----	----	4.7	0.7	3.8	3.8	19	71	---	-	---

Data de Fim de Fermentação - 23.9.83

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
7.11.83	993.9	13.5	5.6	0.3	5.3	3.7	13	19	26.8	S	---

Tabela 12  
Vinho Aragonez - Controle analítico

Data de Fim de Fermentação - 19.10.77

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
4.11.77	999.4	9.3	5.2	0.3	4.8	3.9	---	---	---	-	---
21.12.77	997.6	10.1	4.5	0.4	3.9	3.8	13	89	26.6	S	---
8.03.78	----	----	---	0.5	---	---	---	---	---	-	Sof.
8.06.78	996.2	10.1	5.0	0.7	4.0	3.9	19	26	23.8	-	---

Data de Fim de Fermentação - 20.9.78

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
2.11.78	995.5	14.2	4.6	0.4	4.0	3.8	19	19	31.5	-	---
6.02.79	995.0	14.8	3.9	0.4	3.3	---	19	19	31.8	S	---
31.05.79	994.1	14.7	4.0	0.5	3.3	4.1	19	7	29.8	-	R <sup>+</sup>

Data de Fim de Fermentação - 16.10.79

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
20.11.79	994.8	11.0	5.5	0.3	5.1	3.6	19	57	23.1	-	---
18.04.80	----	---	4.2	0.3	3.8	---	26	32	---	S	---
23.06.80	994.3	10.9	4.1	0.4	3.6	3.9	19	32	21.9	-	16.7

Data de Fim de Fermentação -

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
4.11.81	995.8	13.6	3.4	0.4	2.9	4.5	32	26	30.8	-	---
5.01.82	----	---	3.2	0.4	2.5	---	---	---	---	S	---
26.04.82	995.5	13.6	2.9	0.5	2.2	4.5	38	13	30.2	-	18.5

Data de Fim de Fermentação - 15.9.82

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
25.10.82	993.0	13.7	4.9	0.4	4.3	3.8	19	45	25.4	-	---
18.01.83	993.3	13.7	5.0	0.4	4.3	3.7	45	64	---	N	19.2
3.05.83	----	----	---	---	---	---	---	---	---	S	---
8.07.83	----	----	5.2	0.7	4.4	3.4	19	83	---	-	15.6

Data de Fim de Fermentação - 18.9.83

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
19.10.83	994.0	13.3	5.9	0.3	5.5	3.8	19	32	26.6	S	---



Tabela 13  
Vinho Roupeiro - Controle Analítico

Data de Fim de Fermentação - 19.10.77

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
11.11.77	993.0	13.1	6.0	0.5	5.1	3.6	--	--	24.2	-	---
14.03.78	----	----	---	0.6	---	---	--	--	---	-	MB
9.05.78	----	----	5.3	0.6	4.3	3.6	--	--	---	N	17.7
15.03.79	992.7	13.0	5.0	0.6	4.0	3.7	19	327	23.3	N	---

Data de Fim de Fermentação - 27.9.78

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
8.11.78	992.5	13.7	5.2	0.4	4.6	3.3	19	122	23.6	-	---
5.06.79	991.6	13.6	4.4	0.4	3.8	4.0	19	141	22.4	N	18

Data de Fim de Fermentação - 6.10.79

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
25.03.81	----	----	4.4	0.3	3.9	---	--	--	---	N	12.3

Data de Fim de Fermentação - 29.9.81

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
6.11.81	991.9	12.7	4.8	0.4	4.2	3.8	13	25	21.1	-	---
29.12.81	----	----	4.0	0.7	3.0	---	--	--	---	S	---
11.02.82	991.5	12.6	4.1	0.7	3.1	4.0	19	64	20.6	-	---
29.04.82	----	----	---	---	---	---	--	--	---	-	9.4

Data de Fim de Fermentação - 17.9.82

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
27.10.82	990.7	13.8	5.3	0.4	4.7	3.5	19	96	21.1	-	---
21.01.83	990.8	13.9	5.3	0.4	4.8	3.4	6	96	---	Com.	15.4
13.04.83	989.9	14.0	5.1	0.6	4.4	3.5	6	141	---	-	---
24.05.83	---	--	5.3	0.5	4.6	3.5	6	135	---	-	15.6

Data de Fim de Fermentação - 11.9.83

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
18.10.83	991.7	12.8	5.3	0.3	4.9	3.5	13	13	20.9	-	---
17.11.83	---	--	--	--	--	--	38*	Aplic.10mg/l SO <sub>2</sub>			

Tabela 14  
Vinho Manteúdo - Controle analítico

Data de Fim de Fermentação - 19.10.77											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
11.11.77	996.0	11.3	5.4	0.6	4.7	3.7	--	--	---	-	---
14.03.78	----	----	---	0.4	---	---	---	---	---	-	bom
20.03.79	993.4	11.2	3.9	0.6	3.0	3.7	13	249	20.6	S	11.7
Data de Fim de Fermentação - 9.10.78											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
15.11.78	993.5	11.0	4.4	0.3	3.9	3.4	13	109	20.5	-	---
19.04.79	----	----	---	0.5	---	---	---	---	---	S	---
5.06.79	992.5	11.3	3.7	0.6	2.8	3.9	6	19.2	---	-	Bom
Data de Fim de Fermentação - 3.10.79											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
14.11.79	993.9	10.8	5.5	0.3	5.1	3.4	13	63	18.4	-	---
12.06.80	992.7	10.3	4.7	0.3	4.2	3.4	6	96	17.2	N	13.4
Data de Fim de Fermentação - 13.10.81											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
11.11.81	991.7	11.7	4.5	0.3	4.0	3.9	13	51	18.5	-	---
21.04.82	991.7	11.4	4.3	0.6	3.4	3.7	6	116	17.8	N	10.4
Data de Fim de Fermentação - 23.9.82											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
11.11.82	992.6	11.4	5.3	0.4	4.7	3.5	13	51	19.6	-	---
24.01.83	992.0	11.5	5.1	0.3	4.7	3.3	6	128	---	S	---
27.05.83	----	----	5.3	0.4	4.8	3.3	6	128	---	-	11.0
Data de Fim de Fermentação - 17.9.83											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
18.10.83	992.1	12.2	4.8	0.3	4.5	3.7	13	6	20.4	N	---
18.11.83	----	----	---	---	---	---	45	---	---	-	---
20.02.84	----	----	---	---	---	---	---	---	---	-	12.6



Tabela 15  
Vinho Tarez - Controle analítico

Data de Fim de Fermentação - 8.10.79

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
16.11.79	992.4	12.1	5.4	0.3	4.9	3.4	13	109	20.8	-	---
11.06.80	992.2	11.9	5.0	0.4	4.5	3.5	6	103	19.9	N	14.5

Data de Fim de Fermentação - 24.9.80

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
12.11.80	992.7	12.1	4.6	0.5	3.9	4.0	13	102	21.4	-	---
9.02.81	992.5	12.1	4.1	0.6	3.2	3.8	6	77	21.0	S	---
25.03.81	-----	-----	4.3	0.9	3.1	---	--	--	---	-	5.9

Data de Fim de Fermentação - 4.10.81

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
6.11.81	992.0	11.7	4.8	0.5	4.1	3.7	6	58	19.1	-	---
29.12.81	-----	-----	4.1	0.9	2.9	---	--	--	---	S	---
19.04.82	991.7	11.5	4.4	1.0	3.0	3.7	6	84	17.9	-	5.8

Data de Fim de Fermentação - 18.9.83

Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
24.10.83	994.1	10.8	6.9	0.4	6.4	3.3	6	7	20.2	N	---
17.11.83	-----	---	---	---	---	---	32(apl.10mg/1 SO <sub>2</sub> )		---	---	---
20.02.84	-----	---	---	---	---	---	--	--	---	-	14.8

Tabela 16  
Vinho Rabo de Ovelha - Controle Analítico

Data de Fim de Fermentação - 6.10.77											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
8.11.77	994.0	12.7	5.0	0.4	4.4	3.9	--	--	---	-	---
15.03.78	----	----	---	0.5	---	---	--	--	---	-	B <sup>+</sup>
11.05.78	----	----	4.3	0.5	3.5	3.8	--	--	---	-	16.6
20.03.79	----	----	3.6	0.6	2.7	3.9	19	224	21.5	S	---

Data de Fim de Fermentação - 9.10.78											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
15.11.78	992.5	13.6	4.3	0.3	3.8	3.2	13	141	24.2	-	---
25.01.79	992.4	12.1	3.5	0.6	2.5	4.1	13	128	19.6	S	---
6.06.79	991.5	12.3	3.8	0.8	2.7	4.0	13	141	19.3	-	R

Data de Fim de Fermentação - 11.10.81											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
11.11.81	993.1	11.3	3.4	0.3	2.9	4.0	13	45	20.4	-	---
29.12.81	----	----	3.6	0.5	2.9	---	--	--	---	S	---
21.04.82	992.5	11.2	3.4	0.5	2.7	4.0	13	102	18.9	-	10.4

Data de Fim de Fermentação - 15.9.82											
Data análise	Dens.	Alc.	Ac.T	Ac.V	Ac.F	pH	SO <sub>2</sub> L	SO <sub>2</sub> T	Ext.S	Mal	Prova
26.10.82	991.6	12.6	5.1	0.4	4.5	3.7	13	77	20.3	-	---
24.01.83	991.6	12.8	5.0	0.4	4.5	3.5	6	154	---	-	12.4
14.04.83	991.0	12.9	4.4	0.5	3.7	3.7	9	132	---	S	---
30.05.83	----	----	5.4	0.8	4.3	3.5	13	89	---	-	15.8
25.07.83	----	----	---	---	---	---	--	--	---	-	14.9

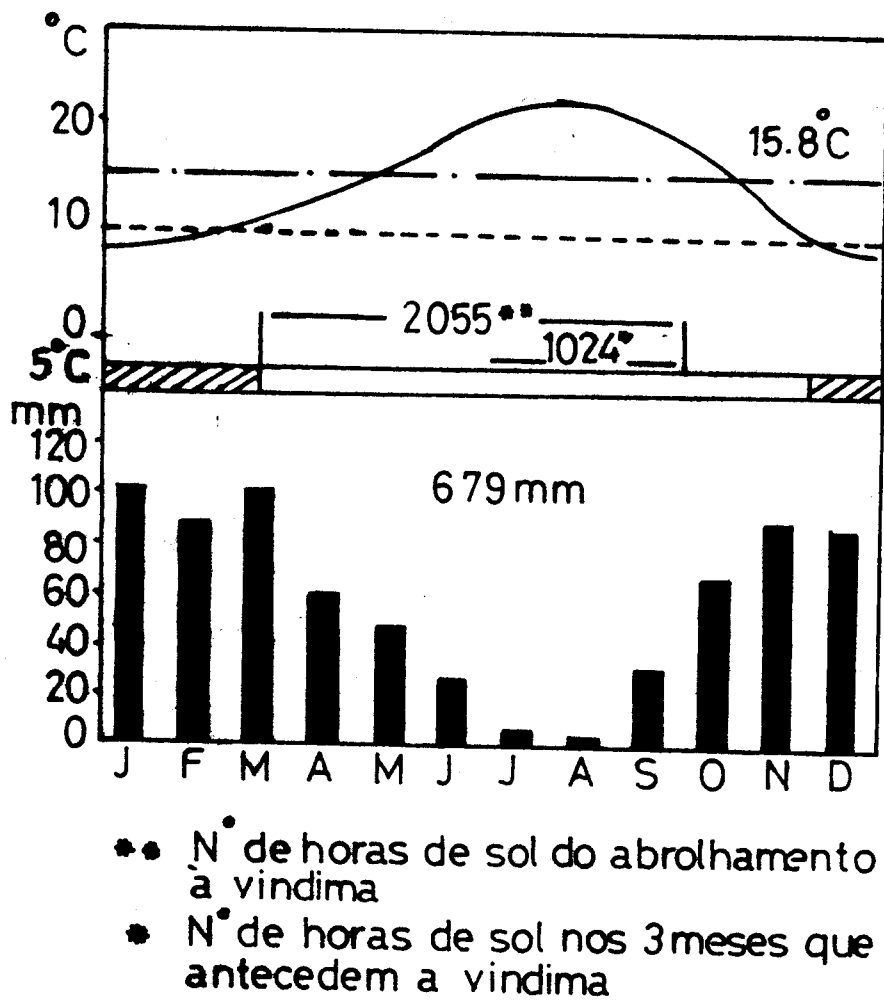


Figura 9 - Climograma da região de Évora

■ Altura Pluviométrica  
 ▨ Período de repouso vegetativo

Tabela 17

Ano	Mês	Elementos climáticos		Precipitação
		Temp. Máx.	Temp. mín	
1977	Maio	22.6	9.5	8.6
	Junho	25.9	11.2	35.9
	Julho	28.3	13.7	30.4
	Agosto	29.7	14.4	0.0
	Setembro	29.4	14.7	10.2
1978	Maio	20.2	9.4	35.7
	Junho	24.1	11.9	13.0
	Julho	32.8	14.2	0.0
	Agosto	32.6	14.7	0.0
	Setembro	33.0	16.2	11.1
1979	Maio	23.4	9.1	0.9
	Junho	30.0	13.6	--
	Julho	31.5	16.5	16.0
	Agosto	32.4	15.3	0.0
	Setembro	29.3	13.9	9.0
1980	Maio	22.5	10.1	45.3
	Junho	30.0	12.4	0.0
	Julho	31.8	14.0	7.4
	Agosto	33.5	15.9	8.9
	Setembro	31.8	14.4	14.6
1981	Maio	23.3	8.2	22.4
	Junho	32.2	15.0	1.7
	Julho	34.2	15.8	0.0
	Agosto	33.3	14.9	0.0
	Setembro	29.4	14.8	20.8
1982	Maio	26.0	0.0	0.0
	Junho	29.9	12.7	0.0
	Julho	30.2	13.9	0.0
	Agosto	33.2	15.6	0.0
	Setembro	28.9	14.5	30.7
1983	Maio	21.1	10.0	14.7
	Junho	30.5	13.3	13.2
	Julho	29.6	14.0	4.0
	Agosto	31.1	15.9	0.0
	Setembro	31.7	15.0	26.0

Tabela 18 - Resultados da análise de aminoácidos livres no vinho da casta Moreto

AA	Ano de Colheita					Média	DP%
	%	1978	1979	1981	1982		
Ala	4.7	7.1	3.4	4.5	9.0	5.7	35.3
Gly	1.6	2.3	2.2	1.6	6.8	2.9	67.9
Val	2.8	6.1	2.7	2.5	4.8	3.8	37.2
Tre	0.6	2.4	1.2	1.4	2.3	1.6	43.2
Ser	0.7	2.4	1.2	1.8	2.6	1.8	39.7
Leu	2.4	5.6	2.3	2.3	4.4	3.4	40.0
Ile	1.8	3.8	1.1	1.2	2.3	2.1	47.9
Gaba	0.8	2.6	2.1	2.1	4.9	2.5	53.6
Pro	70.5	51.7	73.1	64.5	45.8	61.1	17.4
Cys	3.0	2.6	5.1	3.5	2.5	3.3	28.3
Hyp	0.3	---	0.1	0.6	0.2	0.3	62.3
Asx	2.9	4.1	2.3	2.2	4.2	3.2	24.1
Met	4.0	2.4	1.1	5.2	2.2	3.4	35.5
Glx	1.8	2.5	0.7	2.6	3.8	2.3	44.6
Phe	0.8	2.1	0.7	0.9	1.5	1.2	44.1
Orn	---	---	---	1.7	---	---	---
Lys	1.3	2.2	0.8	1.3	2.1	1.2	38.7

Tabela 19 - Resultados da análise de aminoácidos livres no vinho da casta Trincadeira

AA	Ano de Colheita							Média	DP%
	%	1977	1978	1979	1980	1981	1982		
Ala	4.4	8.9	5.3	6.0	4.6	6.3	3.2	5.5	30.4
Gly	1.4	2.1	2.2	1.1	1.4	4.5	1.9	2.1	50.5
Val	1.5	2.7	2.4	2.9	1.2	5.8	1.6	2.6	55.7
Tre	1.0	1.9	1.3	1.7	1.2	5.9	1.5	2.1	76.6
Ser	1.2	1.7	1.1	1.7	0.9	0.4	0.5	1.1	44.8
Leu	1.4	1.9	2.1	3.0	0.8	4.3	1.2	2.1	53.0
Ile	0.9	1.2	2.0	1.5	0.6	4.6	0.7	1.6	78.0
Gaba	2.3	11.1	2.2	2.1	0.1	0.4	0.2	2.6	136.
Pro	77.3	58.3	71.6	50.5	83.3	55.6	80.1	68.1	17.8
Cys	---	---	---	1.6	0.2	0.8	0.3	0.7	76.4
Hyp	---	---	---	0.9	1.2	0.2	0.2	0.6	70.0
Asx	3.5	4.2	4.8	3.3	0.4	3.8	2.8	3.3	40.1
Met	0.9	0.7	0.9	6.3	0.5	0.2	---	1.6	134.
Glx	2.5	4.3	1.8	3.4	1.2	1.9	0.7	1.9	87.7
Phe	0.8	1.1	1.1	2.1	2.1	5.3	2.0	2.0	90.0
Orn	---	---	---	5.1	---	---	---	---	---
Lys	0.8	0.8	1.0	2.2	0.6	---	1.0	1.1	49.2
Tyr	---	---	---	4.5	0.1	1.5	0.7	1.7	99.4

Tabela 20 - Resultados da análise de aminoácidos livres no vinho da casta Periquita

AA	Ano de Colheita						Média	DP%
%	1977	1978	1979	1981	1982	1983	X	
Ala	4.5	14.4	3.7	3.9	1.8	2.4	5.1	83.0
Gly	3.2	4.0	1.9	1.5	1.2	4.8	2.8	75.0
Val	1.1	2.9	1.7	2.2	0.4	0.7	1.8	57.7
Abu	1.4	0.6	---	---	---	---	---	---
Tre	3.3	4.8	1.1	0.7	0.3	0.7	1.8	91.0
Ser	0.9	1.8	1.1	0.9	0.3	0.5	0.9	52.1
Leu	2.0	4.5	2.5	2.4	0.4	0.1	2.0	73.0
Ile	1.1	0.9	0.4	0.5	0.1	0.1	0.5	73.0
Gaba	0.1	0.8	0.2	0.4	0.1	0.1	0.3	
Pro	76.4	56.9	83.3	82.1	93.0	86.1	79.6	14.2
Cys	---	0.3	0.3	0.1	0.2	0.4		
Hyp	---	---	0.4	0.8	0.1	0.3		
Asx	1.6	3.0	0.9	2.5	0.7	0.5	1.5	61.0
Met	1.2	0.5	1.1	0.5	0.2	0.8	0.7	49.2
Glx	1.3	3.0	0.4	1.2	0.5	1.0	1.2	71.3
Phe	0.9	0.3	1.0	0.2	0.3	0.7	0.6	53.2
Orn	---	1.0	---	---	0.2	---		
Lys	0.9	0.4	---	---	---	0.7		

Tabela 21 - Resultados da análise de aminoácidos livres no vinho da casta Aragonez

AA	Ano de Colheita			Média	DP%
%	1978	1981	1982	X	
Ala	7.1	7.0	2.4	5.5	48.8
Gly	2.1	2.3	1.8	2.1	12.2
Val	1.8	3.7	1.6	2.4	48.9
Tre	0.9	1.9	1.0	1.3	43.4
Ser	1.4	2.8	1.2	1.8	48.4
Leu	1.6	5.2	1.6	2.8	74.2
Ile	1.2	2.7	1.0	1.6	56.9
Gaba	8.0	2.1	1.3	3.8	96.3
Pro	40.8	46.9	68.1	51.9	27.8
Cys	0.9	2.4	1.6	1.6	45.9
Asx	3.0	4.1	2.2	3.1	30.8
Hyp	0.04	0.2	0.6		
Met	3.0	4.5	5.9	4.5	32.5
Glx	3.2	3.4	1.6	2.7	36.1
Phe	1.8	2.4	0.4	1.5	66.9
Orn	14.4	1.0	1.7	5.7	132.2
Lys	1.0	3.4	0.9	1.8	80.1
Tyr	1.4	7.8	0.2	3.1	130.3

Tabela 22 - Resultados da análise de aminoácidos livres no vinho da casta Roupeiro

AA	Ano de Colheita						Média	DP%
	%	1977	1979	1980	1981	1982		
Ala	5.1	6.5	5.0	6.8	7.2	6.3	6.2	14.5
Gly	3.5	3.8	4.4	3.7	3.7	3.9	3.8	6.4
Val	2.1	2.3	4.2	3.1	1.4	2.7	2.7	35.8
Tre	2.6	2.8	4.6	2.8	2.2	3.0	3.0	3.1
Ser	3.5	4.0	6.2	4.3	4.2	4.6	4.5	18.8
Leu	4.7	7.8	10.3	7.7	5.5	7.4	6.2	25.9
Ile	4.7	0.2	---	---	---	---	---	---
Gaba	0.4	0.2	2.2	2.8	1.5	---	---	---
Pro	46.9	32.5	28.3	36.2	47.7	39.8	38.6	21.8
Cys	1.4	0.8	2.4	6.3	7.3	3.8	3.7	72.7
Asx	6.9	7.6	9.5	7.0	4.1	7.5	7.1	24.0
Hyp	1.8	2.0	2.2	1.7	1.8	1.9	1.9	7.7
Met	2.6	1.1	2.2	1.5	1.0	1.7	1.7	39.2
Glx	5.4	4.8	9.7	6.0	6.2	6.6	6.5	24.8
Phe	2.8	4.0	6.8	4.6	2.3	4.2	4.1	37.0
Lys	4.7	4.8	0.5	5.5	2.4	3.8	3.6	53.6
Tyr	---	---	1.1	0.3	1.2	---	---	---
His	0.5	1.3	---	---	---	---	---	---
Arg	0.6	1.6	---	---	---	---	---	---

Tabela 23 - Resultados da análise de aminoácidos livres no vinho da casta Manteúdo

AA	Ano de Colheita						Média	DP%
	%	1977	1978	1979	1981	1982		
Ala	5.5	6.9	10.1	7.5	8.5	6.2	7.5	21.4
Gly	2.6	2.5	6.0	7.5	9.2	4.3	5.4	49.7
Val	3.0	4.7	4.5	7.4	4.1	2.8	4.4	38.4
Tre	2.6	2.0	4.7	5.1	4.9	3.2	3.8	35.7
Ser	3.6	0.7	7.4	6.8	10.7	5.7	5.8	57.6
Leu	4.2	5.9	8.4	9.0	7.4	7.0	7.0	26.5
Ile	2.0	2.8	3.0	3.5	3.5	3.5	3.1	22.0
Gaba	3.8	2.3	6.4	3.2	3.6	3.0	3.7	37.0
Pro	42.1	31.2	4.9	2.3	1.9	28.4	18.5	94.1
Cys	4.3	3.0	5.2	4.9	3.6	2.8	4.0	24.8
Hyp	1.6	0.3	2.4	14.3	3.4	0.9	3.8	140.5
Asx	4.1	0.8	8.3	5.3	6.9	5.9	5.2	49.7
Met	2.9	3.1	3.5	2.9	5.9	3.7	3.7	29.7
Glx	4.6	3.5	5.4	5.4	5.1	5.5	4.9	18.3
Phe	2.2	2.7	4.0	4.7	4.6	3.5	3.6	29.0
Orn	2.4	8.2	---	6.5	4.0	---	---	---
Lys	3.1	0.6	7.4	2.1	6.9	5.3	4.2	62.4
Tyr	4.2	15.8	8.4	1.4	6.9	8.1	7.5	63.8

Tabela 24 - Resultados da análise de aminoácidos livres no vinho da casta Tamez

AA	Ano de Colheita					Média	DP%
	%	1979	1980	1981	1982		
Ala	14.5	8.2	12.0	7.7	10.9	10.7	26.3
Gly	7.9	4.6	7.5	5.7	8.6	6.9	24.1
Val	3.5	6.3	6.7	2.2	5.9	4.9	39.9
Tre	5.6	3.6	1.5	2.8	4.2	3.5	43.3
Ser	6.1	4.5	2.4	6.5	4.6	4.8	33.6
Leu	8.4	7.1	12.6	5.2	8.1	8.3	32.8
Ile	1.7	3.5	1.2	1.6	1.7	1.9	46.2
Gaba	7.0	2.4	1.1	2.6	4.8	3.4	
Pro	18.2	28.6	36.0	30.4	14.9	25.6	34.3
Cys	3.0	4.3	0.4	3.0	4.8	3.1	55.0
Hyp	1.5	0.9	1.8	2.6	2.3	1.8	36.7
Asx	6.1	6.7	6.0	4.7	6.7	6.0	13.5
Met	2.6	1.6	0.9	4.1	3.7	3.5	46.8
Glx	2.9	5.9	1.7	3.0	4.4	3.6	45.0
Phe	3.2	3.5	7.2	2.2	4.1	4.0	46.9
Orn	---	1.1	---	---	---		
Lys	3.9	5.9	---	13.8	6.0		
Tyr	3.5	1.1	---	1.8	---		

Tabela 25 - Resultados da análise de aminoácidos livres no vinho da Rabo de Ovelha

AA	Ano de Colheita				Média	DP%
	%	1977	1978	1981		
Ala	6.6	8.2	11.3	6.7	8.2	28.9
Gly	4.4	2.7	5.1	5.6	4.5	31.2
Aba	4.9	---	2.3	3.6		
Sar	0.6	---	---	0.6		
Val	4.3	4.7	8.7	1.9	4.9	61.7
Tre	3.5	2.6	1.2	3.8	2.8	42.2
Ser	4.0	3.0	2.3	5.6	3.7	39.6
Leu	5.8	5.7	8.5	6.6	6.7	23.5
Ile	1.2	2.7	---	4.2		
Gaba	0.4	2.2	---	1.4		
Pro	41.1	36.8	28.2	27.3	33.4	18.3
Cys	4.7	2.6	3.7	4.0	3.8	25.2
Asx	5.3	5.5	5.1	5.4	5.3	1.4
Hyp	0.8	0.4	0.7	1.0	0.8	37.1
Met	0.9	1.6	1.4	2.0	1.5	32.3
Glx	4.7	3.3	5.4	6.0	4.9	26.5
Phe	3.4	2.1	4.0	5.3	3.7	37.4
Orn	---	11.1	0.6	0.7		
Lys	3.8	5.0	9.8	8.2	6.7	44.9
Tyr	---	0.4	---	---		
His	---	1.2	2.1	---		



Tabela 26 - Resultados dos testes de normalidade aplicados ao vinho da casta Periquita

AA	Média	S.D	Var.	C Skew	C Kurt	SC Kurt
Ala	5.1	4.6	21.7	1.6	3.88	-0.44
Gli	2.8	1.4	2.1	0.27	1.5	-0.74
Val	1.8	0.9	0.9	0.3	1.8	-0.61
Tre	1.8	3.2	1.8	0.85	2.07	-0.47
Ser	0.91	0.5	0.3	0.6	2.5	-0.2
Leu	2.0	1.6	2.6	0.29	2.2	-0.42
Ile	0.51	0.4	0.17	0.34	1.6	-0.68
Gab	0.28	0.27	0.08	1.22	3.0	-0.01
Pro	79.6	12.4	153.4	-1.04	3.07	0.03
Cys**	0.21	0.14	0.02	-0.26	1.80	-0.60
Hyp***	0.27	0.3	0.09	0.86	2.49	-0.25
Asx	1.5	1.02	1.05	0.43	1.58	-0.7
Met	0.71	0.39	0.15	0.04	1.6	-0.69
Glx	1.2	0.93	0.88	1.19	3.2	0.12
Phe	0.57	0.34	0.12	0.18	1.3	-0.85

\*\* média de quatro anos

\*\*\* média de cinco anos

Tabela 27 - Resultados dos testes de normalidade aplicados ao vinho da casta Moreto

AA	Média	S.D	Var.	C. Skew	S C Skew	C Kurt	S C Kurt
Ala	5.74	2.26	5.14	0.511	0.466	1.771	-0.561
Gli	2.9	2.20	4.86	1.418	1.295	3.141	0.064
Val	3.78	1.60	2.55	0.636	0.580	1.687	-0.599
Tre	1.58	0.76	0.58	-0.048	-0.044	1.536	-0.668
Leu	3.4	1.52	2.31	0.633	0.578	1.653	-0.614
Ile	2.14	1.15	1.32	0.529	0.483	1.753	-0.569
Gaba	2.5	1.50	2.25	0.730	0.666	2.578	-0.193
Pro	61.12	11.90	141.59	-0.307	-0.280	1.425	-0.719
Cys	3.34	1.06	1.12	1.038	0.947	2.578	-0.192
Hyp	0.25***	0.21	0.048	1.027	0.937	2.436	-0.257
Asx	3.15	0.96	0.92	0.201	0.183	1.244	-0.801
Met	3.35	1.62	2.61	0.310	0.283	1.756	-0.567
Glx	2.28	1.13	1.30	-0.094	-0.086	2.161	-0.383
Phe	1.20	0.59	0.35	0.729	0.665	1.940	-0.484
Lys	1.20	0.59	0.35	0.040	0.037	1.491	-0.689

\*\*\* média de quatro anos

Tabela 28 - Resultados dos testes de normalidade aplicados ao vinho da casta Trincadeira

AA	Média	S.D	Var.	C Skew	S C Skew	C Kurt	S C Kurt
Ala	5.5	1.8	3.30	0.721	0.779	2.883	-0.063
Gli	2.09	1.14	1.30	1.52	1.639	4.081	0.584
Val	2.59	1.56	2.42	1.351	1.459	3.730	0.394
Tre	2.07	1.72	2.94	1.909	2.062	4.879	1.015
Ser	1.07	0.52	0.27	$5.84 \times 10^{-3}$	$6.31 \times 10^{-3}$	1.674	-0.716
Leu	2.1	1.20	1.45	0.838	0.905	2.586	-0.223
Ile	1.64	1.39	1.93	1.566	1.691	4.087	0.587
Gaba	2.63	3.86	14.93	1.766	1.908	4.579	0.853
Pro	68.1	13.13	172.33	-0.182	-0.196	1.382	-0.874
Asx	3.26	1.41	2.00	-1.193	-1.289	3.562	0.303
Met	1.57	2.20	4.82	1.953	2.109	4.979	1.068
Glx	1.90	1.25	1.57	0.452	0.488	2.077	-0.498
Phe	2.0	2.36	5.55	1.816	1.961	4.688	0.911
Lys	1.10**	0.64	0.41	0.996	1.076	3.599	0.323

\*\* média de cinco anos

Tabela 29 - Resultados dos testes de normalidade aplicados ao vinho da casta Aragonéz

AA	Média	S.D	Var.	C.Skew	C.Kurt	SC Kurt	SC Skew
Ala	5.5	2.7	7.2	-0.0706	1.5	-0.53	-0.499
Gli	2.1	0.26	0.07	-0.60	1.5	-0.53	-0.421
Val	2.37	1.16	1.34	0.68	1.5	-0.53	-0.483
Tre	1.27	0.55	0.30	0.67	1.5	-0.53	0.481
Ser	1.8	0.87	0.76	0.67	1.5	-0.53	0.470
Leu	2.8	2.07	4.32	0.707	1.5	-0.53	0.5
Ile	1.63	0.93	0.86	0.67	1.5	-0.53	0.474
Pro	51.93	14.30	205.30	0.565	1.5	-0.53	0.400
Cys	1.63	0.75	0.56	0.081	1.5	-0.53	0.058
Hyp	0.28	0.28	0.08	0.470	1.5	-0.53	0.332
Asx	3.1	0.95	0.91	0.190	1.5	-0.53	0.134
Met	4.46	1.45	2.10	-0.04	1.5	-0.53	-0.03
Glx	2.73	0.99	0.97	-0.674	1.5	-0.53	-0.477
Phe	1.53	1.03	1.05	-0.44	1.5	-0.53	-0.315
Orn	5.7	7.5	56.89	0.700	1.5	0.53	0.495
Lys	1.76	1.41	2.00	0.703	1.5	-0.53	0.497
Tyr	3.13	4.08	16.69	0.639	1.5	-0.53	0.45

Tabela 30 - Resultados dos testes de normalidade aplicados ao vinho da casta Roupeiro

AA	Média	S.D.	Var.	C Skew	S C Skew	C Kurt	SC Kurt
Ala	6.23	0.92	0.85	-0.251	-0.252	1.777	-0.611
Gli	3.83	0.25	0.06	1.179	1.179	3.119	0.060
Val	2.71	0.97	0.94	0.274	0.274	2.162	-0.419
Tre	3.04	0.81	0.65	1.217	1.217	3.459	0.229
Ser	4.54	0.86	0.75	1.188	1.188	3.170	0.085
Leu	6.20	1.92	3.69	0.170	0.170	1.98	-0.512
Gaba	1.42**	1.21	1.48	0.398	0.398	1.614	-0.693
Pro	38.60	8.69	75.60	$8.95 \times 10^{-3}$	$8.95 \times 10^{-3}$	1.726	-0.637
Cys	3.74	2.74	7.50	0.338	0.338	1.484	-0.758
Hyp	1.93	0.15	0.02	0.927	0.927	2.668	-0.166
Asx	7.1	1.75	3.07	-0.899	-0.899	3.271	0.136
Met	1.73	0.68	0.46	0.462	0.462	2.009	-0.495
Glx	6.52	1.64	2.70	1.129	1.129	3.340	0.170
Phe	4.13	1.57	2.45	0.495	0.495	2.372	-0.314
Lys	3.60	2.02	4.07	-0.607	-0.607	2.119	-0.441

\*\* média de cinco anos

Tabela 31 - Resultados dos testes de normalidade aplicados ao vinho da casta Rabo de Ovelha

AA	Média	S.D.	Var.	C Skew	S C Skew	C Kurt	SC Kurt
Ala	8.21	2.53	6.42	1.026	0.837	2.226	-0.316
Gly	4.53	1.47	2.17	-0.670	-0.547	1.893	-0.451
Val	4.90	3.23	10.41	0.637	0.520	2.090	-0.371
Tre	2.8	1.22	1.5	-0.477	-0.390	1.666	-0.545
Ser	3.73	1.57	2.42	0.538	0.439	1.772	-0.501
Leu	6.70	1.66	2.75	0.816	0.666	2.035	-0.394
Ile	2.70**	1.35	1.82	0.128	0.104	2.000	-0.408
Gaba	1.33**	0.53	0.28	0.162	0.133	2.006	-0.406
Pro	33.40	6.46	41.70	0.424	0.347	1.666	-0.544
Cys	3.84	1.00	1.00	-0.579	-0.473	2.070	-0.380
Hyp	0.78	0.29	0.08	-0.298	-0.244	2.020	-0.400
Met	1.53	0.49	0.24	-0.173	-0.141	1.980	-0.417
Glx	4.90	1.36	1.86	-0.602	-0.492	1.866	-0.463
Phe	3.73	1.47	2.16	-0.159	-0.130	1.819	-0.482
Lys	6.70	3.22	10.34	0.177	0.144	1.345	-0.677

\*\* média de três anos

Tabela 32 - Resultados dos testes de normalidade aplicados ao vinho da casta Tamarez

AA	Média	S.D.	Var.	C Skew	S C Skew	C Kurt	SC Kurt
Ala	10.66	2.80	7.85	0.231	0.211	1.693	-0.597
Gly	6.85	1.65	2.74	-0.397	-0.362	1.595	-0.641
Val	4.92	1.97	3.86	-0.507	-0.463	1.538	-0.667
Thr	3.54	1.53	2.35	0.010	9.55x10 <sup>-3</sup>	2.030	-0.443
Ser	4.82	1.62	2.62	-0.487	-0.444	2.052	-0.433
Leu	8.28	2.72	7.40	0.691	0.631	2.514	-0.222
Ile	1.94	0.90	0.80	1.291	1.179	3.025	0.012
Gaba	3.44	2.33	5.42	0.531	0.485	1.910	-0.497
Pro	25.62	8.80	77.36	-0.159	-0.145	1.485	-0.691
Cys	3.10	1.70	2.91	-0.734	-0.670	2.346	-0.299
Hyp	1.82	0.67	0.45	-0.217	-0.193	1.799	-0.548
Asx	6.04	0.82	0.67	-0.937	-0.857	2.524	-0.217
Met	3.50	1.36	1.84	-0.086	-0.079	1.463	-0.701
Glx	3.58	1.61	2.60	0.393	0.359	1.957	-0.476
Phe	4.04	1.89	3.59	1.009	0.921	2.705	-0.135
Lys	7.4**	5.03	25.28	0.603	0.550	2.489	-0.233

\*\* média de quatro anos

Tabela 33 - Resultados dos testes de normalidade aplicados ao vinho da casta Manteúdo

AA	Média	S.D.	Var.	C Skew	S C Skew	C Kurt	SC Kurt
Ala	7.55	1.65	2.71	0.382	0.382	2.329	-0.336
Gly	5.42	2.75	7.54	0.117	0.117	1.569	-0.715
Val	4.44	1.75	3.06	1.125	1.125	3.124	0.062
Tre	3.84	1.38	1.90	-0.256	-0.256	1.469	-0.765
Leu	7.03	1.91	3.67	-0.496	-0.496	2.103	-0.448
Ile	3.14	0.70	0.49	-0.680	-0.680	2.283	-0.358
Gaba	3.72	1.41	2.00	1.211	1.211	3.442	0.221
Pro	18.50	17.90	320.53	0.141	0.141	1.240	-0.880
Cys	4.04	1.01	1.03	0.132	0.132	1.384	-0.808
Hyp	3.84	5.60	31.36	1.643	1.643	3.937	0.468
Asx	5.20	2.68	7.19	-0.739	-0.739	2.550	-0.225
Glx	4.90	0.93	0.87	-0.741	-0.741	2.428	-0.285
Phe	3.64	1.09	1.19	-0.384	-0.384	1.698	-0.651
Lys	4.18	2.60	6.76	-0.111	-0.111	1.647	-0.676
Tyr	7.54	4.89	23.88	0.496	0.496	2.511	-0.244