



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Influência da aplicação de magnésio ao
solo no perfil em aminoácidos de vinhos
tintos**

Ana Sofia Costa Aldeano

Orientação:

Maria João Cabrita

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

Évora, 2017



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Influência da aplicação de magnésio ao
solo no perfil em aminoácidos de vinhos
tintos**

Ana Sofia Costa Aldeano

Orientação:

Maria João Cabrita

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

Évora, 2017

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

– Marie Curie

Aos meus pais e ao meu avô

Agradecimentos

A concretização desta tese de mestrado não teria sido possível sem a cooperação de diversas pessoas, que de sua forma contribuíram para a sua fácil e possível execução.

Em primeiro lugar, quero agradecer à professora Maria João Cabrita, pela sua orientação nesta dissertação de mestrado, pelos conhecimentos científicos transmitidos ao longo da realização da mesma, e também pela disponibilidade e paciência no esclarecimento de dúvidas e pelo constante acompanhamento e apoio no decorrer deste trabalho.

Em segundo, à Magnesitas de Rúbian, Lugo, Espanha, por ter concedido as vinificações do seu ensaio para a elaboração deste trabalho.

À professora Raquel Garcia, que na ausência da professora Maria João, esteve sempre disponível para auxiliar e dar apoio. Ao Nuno Martins, que foi uma ajuda imprescindível no que diz respeito ao HPLC e o seu funcionamento. E ao Rui Bicho e à D. Albina Mendes, pela sua colaboração e constante acompanhamento no laboratório de Enologia da Universidade de Évora.

Gostava também de agradecer à minha família por ser o pilar mais importante na minha vida. Particularmente, à minha mãe pelo constante apoio e ombro amigo; ao meu pai pela compreensão e incentivo; ao meu irmão, que uma vez mais acreditou que iria terminar mais uma etapa; e aos meus avós, especialmente ao meu avô paterno, pois sem ele não seria possível ter ingressado no mestrado.

A todos os meus colegas e amigos que me acompanharam ao longo desta jornada, em particular: à Ana Fonseca, pela sua amizade e amparo, principalmente nos momentos menos fáceis; à Sofia, pelas suas constantes palavras de apoio e incentivo; à Maria Inês, que esteve sempre disponível a ajudar; à Mafalda, à Ana, à Andreia, à Rita e ao Luís, que mesmo à distância demonstraram o seu apoio e encorajamento.

Por fim, agradeço também à Universidade de Évora, pela oportunidade de atingir o objetivo de concluir o mestrado em Viticultura e Enologia e a realização do trabalho de tese.

Abreviaturas

AA – Aminoácidos

AB – Aminas biogénicas

Ca - Cálcio

DAD - Detector *Diode Array*

DEEMM - Diethyl ethoxymethylenemalonate

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

K - Potássio

P - Fósforo

PI - Padrão Interno

Mg - Magnésio

N - Azoto

Resumo

“Influência da aplicação de magnésio ao solo no perfil em aminoácidos de vinhos tintos”

Os aminoácidos são compostos azotados que estão presentes nas uvas e no vinho e são utilizados pelas leveduras, com exceção da prolina, durante o processo fermentativo. As aminas biogénicas são outro tipo de compostos azotados, maioritariamente formados através da descarboxilação de aminoácidos, durante a fermentação malolática.

A nutrição da videira é fundamental pois irá afetar o seu crescimento e desenvolvimento bem como a sua produtividade e qualidade das uvas.

O objetivo deste trabalho é avaliar a influência da aplicação de magnésio ao solo no perfil de aminoácidos de vinhos tintos. Foi ainda analisada a mesma influência no teor em aminas biogénicas. A técnica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência, com detetor *Diode Array*.

Observou-se nos resultados obtidos que não houve diferenças significativas entre os vários tratamentos do ensaio.

Palavras-Chave: Magnésio, Vinho tinto, Aminoácidos, Aminas biogénicas, HPLC-DAD

Abstrat

“Influence of magnesium application to the soil in red wine amino acids profile”

Amino acids are nitrogen compounds that are present in grapes and wine and are used by yeast, with the exception of proline, during the fermentation process. Biogenic amines are other types of nitrogen compounds, mostly formed by the decarboxylation of amino acids, during malolactic fermentation.

The nutrition of the vine is critical to its growth and development, as well as its production and quality of the grapes.

The objective of this work is to evaluate the influence of magnesium application to the soil in red wines amino acid profile. The same influence on the content of biogenic amines was also analyzed. The technique used was high performance liquid chromatography with a Diode Array detector.

It was observed that there were not significant differences among the several treatments of the assay.

Keywords: Magnesium, Red wine, amino acids, biogenic amines, HPLC-DAD

Índice

Agradecimentos	i
Abreviaturas	ii
Resumo	iii
Abstrat	iv
Índice	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Quadros	ix
1. Problemática	1
2. Objetivos Científicos	2
3. Fundamento Teórico	3
3.1. <i>Terroir</i>	3
3.2. Solo e Fertilização	3
3.3. Nutrição Mineral	4
3.3.1. Azoto (N)	5
3.3.2. Fósforo (P), Potássio (K) e Cálcio (Ca)	6
3.3.3. Magnésio (Mg)	7
3.4. Possível relação entre o magnésio e a composição azotada das uvas e vinho	9
3.5. Compostos azotados nas uvas, no mosto e no vinho	10
3.5.1. Aminoácidos (AA)	11
3.5.2. Aminas Biogénicas (AB)	15
3.6. Identificação e quantificação de compostos azotados no vinho	18
3.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	19

3.6.1.1.	Derivatização	21
3.6.1.2.	Padrão Interno	21
3.6.2.	Outras técnicas de quantificação	21
4.	Metodologia Experimental	24
4.1.	Ensaio e Vinificações	24
4.2.	Caracterização físico-química dos vinhos	25
4.3.	Identificação e quantificação de aminoácidos e aminas biogénicas por HPLC-DAD	25
4.3.1.	Aminoácidos e aminas biogénicas analisados	25
4.3.2.	Preparação dos padrões	26
4.3.3.	Preparação das amostras	26
4.3.4.	Condições de quantificação de aminoácidos e aminas biogénicas por HPLC-DAD	27
4.4.	Análise estatística dos resultados	29
5.	Resultados e Discussão	30
5.1.	Caracterização físico-química dos vinhos	30
5.2.	Identificação e quantificação de aminoácidos e aminas biogénicas por HPLC-DAD	31
5.2.1.	Identificação dos aminoácidos e das aminas biogénicas	31
5.2.2.	Quantificação dos aminoácidos nos vinhos	32
5.2.3.	Quantificação das aminas biogénicas nos vinhos	43
5.2.4.	Teor total de aminoácidos e aminas biogénicas nos vinhos	46
6.	Conclusão	48
7.	Limitações e perspectivas futuras	50
8.	Referências Bibliográficas	51

Índice de Figuras

Figura 1. Magnésio como constituinte central do anel tetrapirrólico da clorofila.	8
Figura 2. Principais funções do Magnésio.	9
Figura 3. Estrutura geral de um aminoácido.	11
Figura 4. Principais aminoácidos no vinho.	13
Figura 4. Principais aminoácidos no vinho (continuação).	14
Figura 5. Aminas biogénicas e aminoácidos percursores.	16
Figura 6. Estruturas químicas de algumas aminas biogénicas.	17
Figura 7. Componentes de um sistema HPLC.	20
Figura 8. Amostras das microvinificações analisadas	24
Figura 9. Potenciómetro utilizado nas análises.	25
Figura 10. Filtração das amostras para tubos de HPLC.	27
Figura 11. HPLC Alliance Waters (Mitra).	27
Figura 12. Cromatograma utilizado para a identificação dos compostos.	31
Figura 13. Gráficos comparativos das concentrações de ácido aspártico e ácido glutâmico nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.	33
Figura 14. Gráfico comparativo das concentrações de asparagina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.	34
Figura 15. Gráficos comparativos das concentrações de glutamina, histidina, glicina e treonina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.	35
Figura 16. Gráfico comparativo das concentrações de arginina nas amostras dos	

ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg. 36

Figura 17. Gráfico comparativo das concentrações de alanina + GABA nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg. 37

Figura 18. Gráfico comparativo das concentrações de prolina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg. 38

Figura 19. Gráficos comparativos das concentrações de tirosina e cisteína nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg. 39

Figura 20. Gráficos comparativos das concentrações de valina e metionina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg. 40

Figura 21. Gráficos comparativos das concentrações de isoleucina e triptofano nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg. 41

Figura 22. Gráficos comparativos das concentrações de leucina, fenilalanina, ornitina e lisina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg. 42

Figura 23. Gráficos comparativos das concentrações de histamina, agmatina, espermidina e putrescina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg. 44

Figura 24. Gráficos comparativos das concentrações de tiramina, triptamina e feniletilamina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg. 45

Índice de Quadros

Quadro 1. Aminoácidos e aminas biogénicas analisados.	25
Quadro 2. Reação de derivatização.	26
Quadro 3. Condições da análise de HPLC.	28
Quadro 4. Parâmetros enológicos analisados.	30
Quadro 5. Tempo de retenção, equação da reta e gama de concentração de cada aminoácido.	32
Quadro 6. Tempo de retenção, equação da reta e gama de concentração de cada amina biogénica.	43
Quadro 7. Teor total de aminoácidos e de aminas biogénicas nas amostras do ensaio (média ± DP, mg/L).	46

1. Problemática

O solo é um dos fatores associados ao Terroir com mais importância, uma vez que a sua estrutura e composição vão afetar o crescimento e desenvolvimento da videira, e conseqüentemente, os seus produtos. É do solo que a videira vai retirar os nutrientes necessários ao seu normal desenvolvimento e quando estes não são suficientes, uma das opções é recorrer à fertilização, a fim de corrigir essas deficiências e disponibilizar os macro e micronutrientes essenciais para suprir as necessidades da planta.

Os macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) são aqueles que são necessários em maiores quantidades e são fundamentais para o funcionamento biológico da videira, fazendo parte de algumas macromoléculas e estando diretamente relacionados com o metabolismo da planta. Apesar do azoto (N) ser o macronutriente mais abundante que provem do solo, o fósforo (P), o potássio (K) e o cálcio (Ca) são igualmente importantes para a produtividade e rendimento da videira.

O magnésio (Mg) possui um papel crucial em diversas atividades biológicas, sendo a primordial a fotossíntese, uma vez que é o constituinte central do anel tetrapirrólico das moléculas de clorofila. Qualquer deficiência deste nutriente irá ter impacto no rendimento e produtividade da videira. Uma das causas da deficiência de magnésio, apesar de raramente referido, tem a ver com a competição deste com outros nutrientes. Assim, dada a possível competição dos nutrientes e a importância do magnésio na planta, levantou-se a questão da influência da adição de magnésio no solo no conteúdo em compostos azotados, entre os quais os aminoácidos e as aminas biogénicas.

Os aminoácidos estão presentes nas uvas e são uma das formas de assimilação de azoto pelas leveduras durante a fermentação alcoólica no vinho. O perfil de aminoácidos de um vinho está dependente de diversos fatores, sendo portanto característico de cada um, marcando a sua autenticidade.

As aminas biogénicas são compostos formados maioritariamente a partir da descarboxilação de aminoácidos. Podem ter efeitos tóxicos para o ser humano, quando ingeridas em certas concentrações, sendo uma das causas da intolerância ao vinho, e portanto é pertinente o seu controlo nos vinhos.

2. Objetivos Científicos

O principal objetivo deste trabalho foi verificar se a aplicação de magnésio no solo influencia de algum modo o perfil de aminoácidos de vinhos tintos e também o seu conteúdo em amins biogénicas. Assim, com este trabalho pretendeu-se:

- ✓ Identificar e quantificar os aminoácidos e amins biogénicas em causa, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detetor Diode Array (DAD);
- ✓ Avaliar a influência da correção do teor em magnésio no conteúdo de aminoácidos e amins biogénicas.

3. Fundamento Teórico

3.1. *Terroir*

O conceito de *Terroir* surgiu no fim do século XIX (Magalhães 2010), descrevendo um vínculo entre a qualidade do vinho e as condições em que as videiras são cultivadas (Costantini et al. 2012).

O *Terroir* pode ser definido por um conjunto de factores naturais que fazem parte das condições edafoclimáticas de um dado local (Magalhães 2010), onde estão incluídos: a própria região em que as videiras estão cultivadas; o solo e o subsolo, e todas as suas características envolventes; a paisagem e a topografia do local (relevo, altitude); e o clima, devido à sua diversidade de local para local (Costantini et al. 2012).

Dada a multiplicidade dos factores agregados ao *Terroir*, a interacção destes com a videira será sempre diferente e específica, o que vai conferir a um vinho uma determinada qualidade e tipicidade (Roullier-Gall et al. 2014).

Assim, pode-se constatar que o *Terroir* é um aspecto muito importante e determinante para as características de um vinho, uma vez que relaciona as condições ambientais aos seus atributos sensoriais, reportando o vinho às suas origens (Likar et al. 2015; Roullier-Gall et al. 2014).

3.2. Solo e Fertilização

Dos factores associados ao *Terroir*, o solo é um dos mais importantes (Likar et al. 2015), uma vez que afeta diretamente a videira, mais concretamente o desenvolvimento do seu sistema radicular (Ribéreau-Gayon, et al. 2006).

O solo consiste, assim, na camada superficial da crosta terrestre e define-se como o meio natural para o desenvolvimento das plantas, sendo constituído por matéria mineral sólida, matéria orgânica, água e ar (Costa 2011). Portanto, o solo é o meio onde a planta se fixa através do seu sistema radicular e de onde extrai a água e os nutrientes necessários à sua nutrição (Magalhães 2010). Assim sendo, a composição do solo irá possuir uma grande influência sobre os produtos da videira (uvas, mosto e vinho) (Likar et al. 2015).

Como para qualquer outra cultura, para a videira uma nutrição adequada é essencial para o seu crescimento e rendimento (Baldi et al. 2017). O seu estado de nutrição depende portanto, da qualidade do solo que a sustenta e do meio aéreo envolvente (Magalhães 2010).

Geralmente, a maior parte dos elementos nutritivos é obtida do solo pelas raízes (Costa 2011), e a absorção desses nutrientes pela videira depende, entre outros factores, do próprio estado de nutrição da planta e do equilíbrio entre os elementos minerais no solo (Bravo et al. 2017).

A fertilização baseia-se na adição de nutrientes para manter ou aumentar a fertilidade de um solo, ou seja, a capacidade deste fornecer à planta os elementos necessários ao seu desenvolvimento. Os nutrientes podem ser aplicados diretamente no solo ou pulverizados nas folhas (Sabir et al. 2014), embora a fertilização do solo seja por vezes preferida pelo seu baixo custo (Baldi et al. 2017).

A fertilização do solo é uma técnica vitivinícola antiga, que tem um grande efeito sobre o rendimento da vinha e, conseqüentemente, na qualidade do mosto e do vinho (Delgado et al. 2004; Sánchez-Gómez et al. 2016). Esta prática não pode ser generalizada, uma vez que depende do tipo de solo e as suas propriedades, como também das características e necessidades da planta (Sabir et al. 2014).

3.3. Nutrição Mineral

Certos nutrientes minerais são considerados essenciais para o desenvolvimento das plantas, sendo pelo menos 16 os elementos classificados como essenciais: Carbono (C), Hidrogénio (H), Oxigénio (O), Azoto (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S), Ferro (Fe), Zinco (Zn), Manganês (Mn), Cobre (Cu), Boro (B), Molibdénio (Mo) e Cloro (Cl) (Costa 2011).

O critério mais frequente para classificar os elementos minerais tem a ver com a sua função na planta e a quantidade relativa que é absorvida por esta (Magalhães 2010). Assim, os elementos minerais podem dividir-se em macronutrientes e em micronutrientes (Pilon-Smits et al. 2009). Os primeiros, para além das suas funções bioquímicas, apresentam essencialmente um papel como constituintes das proteínas e enzimas. Nesta categoria estão presentes os elementos: N, P, K, Ca, Mg e S (Maathuis

2009). Os micronutrientes, onde estão incluídos os elementos Fe, Zn, Mn, Cu, B, Mo e Cl, também possuem funções bioquímicas mas sobretudo apresentam uma função catalítica (Hänsch and Mendel 2009).

Como a aplicação de fertilizantes com macronutrientes influencia a disponibilidade de nutrientes para as plantas, a adição de N, P, K, Ca e Mg deve ser efetuada com frequência suficiente para suprir as necessidades da planta, mantendo cada um desses nutrientes na solução do solo. Existem numerosas formulações de fertilizantes que fornecem os macronutrientes individualmente ou em combinações ao solo (Cole et al. 2016).

3.3.1. Azoto (N)

O azoto é o macronutriente mais abundante proveniente do solo (Ancín-Azpilicueta et al. 2011; Burin et al. 2016). Encontra-se no solo sob as formas nítricas, amoniacais e amídicas, sendo a absorção pela videira realizada sobretudo através do ião NO_3^- e também do NH_4^+ (Magalhães 2010).

Este é o nutriente que mais afeta o vigor da videira (Arrobas et al. 2014; Baldi et al. 2017), uma vez que estimula o crescimento desta e a obtenção de uma área foliar maior (Delgado et al. 2004). Desempenha um papel importante no funcionamento biológico da videira (Burin et al. 2016), mais especificamente como constituinte das proteínas e enzimas e também como componente da clorofila, ácidos nucleicos, auxinas e citocininas (Magalhães 2010).

Para além do papel fundamental no crescimento e desenvolvimento da videira, o azoto é também fundamental na cinética de fermentação (Ancín-Azpilicueta et al. 2011; Sánchez-Gómez et al. 2016), contribuindo para a atividade dos microrganismos fermentativos (Burin et al. 2016) e ainda para a formação de compostos aromáticos e aminas biogénicas (Pérez-Álvarez et al. 2017). O azoto vai condicionar, portanto, a composição azotada nas uvas (Pérez-Álvarez et al. 2017) e conseqüentemente, influenciar a qualidade do mosto e do vinho (Ancín-Azpilicueta et al. 2011; Arrobas et al. 2014).

Geralmente, a aplicação no solo da vinha de azoto acontece sob a forma de fertilizantes orgânicos ou inorgânicos, que são posteriormente absorvidos pelas raízes,

provocando assim um desenvolvimento correcto da videira (Ancín-Azpilicueta et al. 2011).

3.3.2. Fósforo (P), Potássio (K) e Cálcio (Ca)

O fósforo é igualmente um nutriente importante para a videira, necessário para o crescimento desta (Hu et al. 2016; Yan et al. 2017) e que pode ser um factor limitante na sua produtividade e rendimento (Tian et al. 2017; X. Wang et al. 2017).

Este macronutriente entra na composição dos fosfolípidos das membranas celulares, das vitaminas e ácidos nucleicos (Magalhães 2010), tendo como principais funções o transporte de energia e o incremento do crescimento dos ápices aéreos e radiculares (Hosseini et al. 2017).

As formas químicas existentes no solo, que são utilizáveis pela planta, são os ortofosfatos, pirofosfatos, metafosfatos e formas orgânicas de fósforo (Magalhães 2010).

A quantidade total de fósforo no solo é muitas vezes maior do que a quantidade disponível para a planta (Cole et al. 2016), devido à fixação de fósforo no solo, estando apenas uma pequena fracção de fósforo inorgânico solúvel no solo, disponível para as plantas (Hu et al. 2016).

É importante ter em atenção à aplicação de fósforo ao solo a longo prazo, uma vez que pode levar à acumulação deste no solo (Yan et al. 2017).

Outro macronutriente crucial na nutrição das plantas é o potássio, sendo o segundo maior nutriente, a seguir ao azoto, a ser assimilado por estas (Blanchet et al. 2017).

Geralmente, é abundante no solo, uma vez que constitui cerca de 2% da crosta terrestre, no entanto nem todas as suas formas estão disponíveis para as plantas (Blanchet et al. 2017; Karim et al. 2017). Das quatro formas que o potássio se pode apresentar no solo – solúvel, permutável, não permutável e estrutural (não disponível) – só 2% do potássio total existente no solo pode ser utilizado pelas plantas (forma solúvel) (Bakhshandeh et al. 2017).

O potássio possui um papel vital no crescimento e desenvolvimento da planta (Bakhshandeh et al. 2017; Karim et al. 2017). Regula processos fisiológicos da planta,

como é o caso da fotossíntese, contribui para a regulação estomática e transpiratória, favorece a translocação de açúcares para o fruto (Delgado et al. 2004; Jan et al. 2017), está envolvido na síntese de grandes moléculas (proteína e amido) e na atividade enzimática (Bakhshandeh et al. 2017). Além disso, o potássio permite que as plantas sobrevivam sob condições de estresse, aumentando a resistência destas aos stresses biótico e abiótico (Bakhshandeh et al. 2017; Jan et al. 2017).

Assim sendo, a adição de potássio aumenta o rendimento da videira, contribuindo ainda para uma maior resistência a situações de secura, resultando numa maior produção de cachos (Arrobas et al. 2014).

O cálcio é o quarto elemento mais abundante na nutrição mineral e desempenha papéis fisiológicos e estruturais importantes no metabolismo das plantas (Schmitt et al. 2017). É absorvido pela planta sob a forma do ião Ca^{2+} , oriundo de carbonatos, sulfatos e cloretos existentes no solo e encontra-se em maior proporção nos órgãos verdes da videira, nomeadamente como constituinte estrutural das paredes celulares (Magalhães 2010). Participa ainda na ativação de sistemas enzimáticos, contribui para o transporte dos glúcidos, para a hidrólise do amido e metabolismo do azoto e controla as respostas das células da planta aos stresses ambientais (Magalhães 2010) (Schmitt et al. 2017). Assim, é considerado um dos nutrientes mais importantes associados à defesa da planta, conferindo alguma resistência a pragas e doenças nestas, através da sua influência no padrão de crescimento, anatomia, morfologia e composição química da planta (Ngadze et al. 2014).

3.3.3. Magnésio (Mg)

O magnésio é um dos macronutrientes mais importantes utilizado pela videira, uma vez que está envolvido em vários processos fisiológicos e estruturais e ainda influencia o metabolismo secundário nas plantas (Guo et al. 2016). Este é absorvido pela videira sob a forma de ião Mg^{2+} (Maathuis 2009).

Um dos papéis mais relevantes do magnésio na planta é o facto de ser o constituinte central do anel tetrapirrólico das moléculas de clorofila (**figura 1**), nos cloroplastos (Tatagiba et al. 2016), tendo assim um papel crucial na fotossíntese

(Gerendás and Führs 2013), nomeadamente na capacidade de promover as reações de luz no estroma (Maathuis 2009). Está também envolvido nas reações de assimilação de CO_2 , sendo que as reações de fotofosforilação que ocorrem nos cloroplastos são afetadas pelos iões Mg^{2+} (Tatagiba et al. 2016).

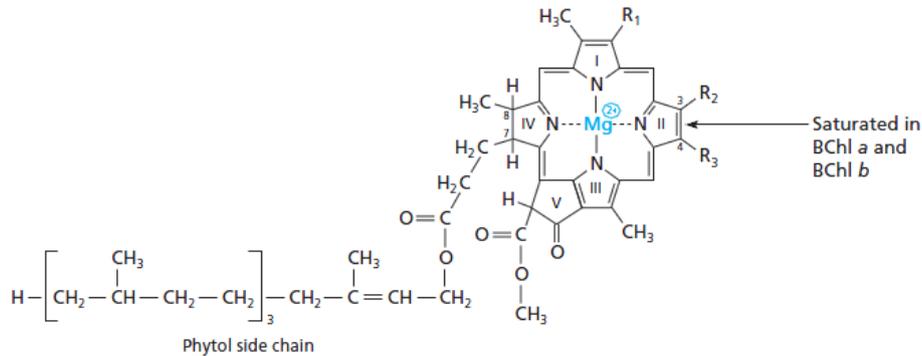


Figura 1. Magnésio como constituinte central do anel tetrapirrólico da clorofila (Fonte: (Moran, et al. 2012)).

No entanto, este elemento está também implicado numa ampla gama de atividades biológicas, também elas de extrema importância (Farzadfar et al. 2017), nomeadamente:

- ◆ Cerca de 75% do magnésio está associado à síntese proteica (Guo et al. 2016), sendo constituinte da estrutura e função dos ribossomas (Tatagiba et al. 2016);
- ◆ É um elemento ativador do sistema enzimático do metabolismo dos glúcidos, proteínas, fosfatases e peroxidases, influenciando ainda os processos de oxidação-redução (Magalhães 2010) (Guo et al. 2016);
- ◆ É essencial para a atividade da RNA polimerase e, portanto, para a formação de RNA nuclear (Tatagiba et al. 2016);
- ◆ Desempenha um papel central no ATP e no metabolismo energético (Tatagiba et al. 2016);
- ◆ Está também envolvido na biossíntese de fosfolípidos e, portanto, na formação de membranas celulares funcionais (Tatagiba et al. 2016).

A **figura 2** representa sucintamente as principais funções do magnésio, descritas anteriormente, nas plantas:

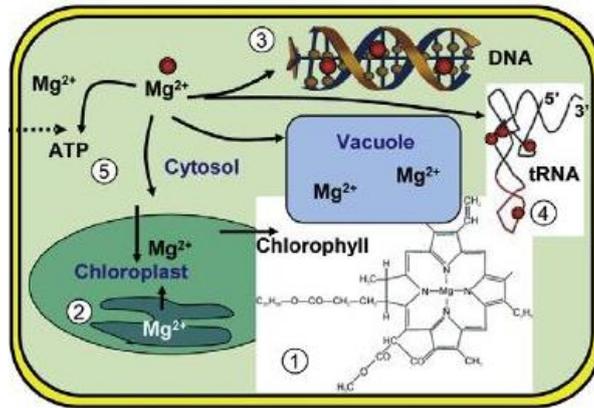


Figura 2. Principais funções do Magnésio: sob a forma de íão Mg^{2+} , é indispensável para a fotossíntese é indispensável para fotossíntese como metal de transição no anel de porfirina de clorofila (1); no cloroplasto, é a principal carga para contrariar a acumulação de um potencial negativo de tilacóides quando a fotossíntese conduz a extrusão de H^+ (2); também se liga a grupos carboxila negativos em polímeros de ácidos nucleicos (3) e ácidos nucleicos menores tal como tRNA (4) para estabilizar sua configuração (Adaptado de (Maathuis 2009)).

Devido às suas funções imprescindíveis e complexas na planta, nomeadamente ao nível da estrutura da clorofila e da síntese proteica, qualquer deficiência deste nutriente resulta em cloroses das folhas (perdas dos teores em clorofila) (Gerendás and Führs 2013), maturação prejudicada e atempamento, por insuficiência de hidratos de carbono produzidos e uma diminuição acentuada do vigor e produtividade (Magalhães 2010).

Os sintomas de deficiência de magnésio podem também estar associados a uma competição deste com outros catiões (K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Na^+) (Cole et al. 2016).

3.4. Possível relação entre o magnésio e a composição azotada das uvas e vinho

A produção de uvas de qualidade adequadas à vinificação depende de inumeros factores, desde o solo, as condições climáticas, o grau de maturação e a própria variedade (Ribéreau-Gayon, et al. 2006) (Conde et al. 2007). A fertilização particularmente, possui um papel indispensável para a qualidade do vinho (Gerendás and Führs 2013).

A importância do magnésio como nutriente essencial das plantas está bem estabelecida porém, o impacto da nutrição em magnésio nos parâmetros de qualidade

tem sido raramente abordado (Gerendás and Führs 2013). Sendo a fotossíntese o processo central para a produção vegetal e dependendo esta do teor em magnésio, este nutriente é fundamental para a planta (Farzadfar et al. 2017).

Devido à possível competição entre os vários nutrientes na planta e a importância verificada do magnésio como nutriente essencial, surgiu a necessidade de averiguar se a adição de magnésio no solo influencia de alguma forma o teor em compostos azotados no vinho, mais concretamente, a concentração em aminoácidos e aminas biogénicas.

3.5. Compostos azotados nas uvas, no mosto e no vinho

Durante a fase de maturação, que decorre após o pintor, ocorre uma panóplia de fenómenos e alterações na uva (Magalhães 2010), sendo os mais relevantes:

- ❖ A acumulação de açúcares;
- ❖ A evolução dos ácidos orgânicos;
- ❖ A acumulação de minerais;
- ❖ A evolução dos compostos azotados;
- ❖ A síntese de compostos fenólicos;
- ❖ E a evolução dos compostos do aroma (Conde et al. 2007).

Os compostos azotados nas uvas podem ser influenciados por vários factores, nomeadamente pelo porta-enxerto, a própria casta, condições ambientais e pelas práticas vitivinícolas (Lee and Schreiner 2010; Lee and Steenwerth 2011).

O transporte das substâncias azotadas para a uva acontece através do xilema e do floema, essencialmente na forma do catião amónio proveniente dos nitratos do solo. Com a maturação das uvas, esta forma de azoto diminui (representando menos de 10% do azoto total), formando-se formas de azoto orgânico (Magalhães 2010).

No mosto e no vinho, o azoto total inclui uma forma mineral (ião amónio) e várias formas orgânicas, entre elas os aminoácidos, oligopeptídeos e polipeptídeos, proteínas, amidas, aminas biogénicas e pirazinas (Ribéreau-Gayon, Glories, et al. 2006).

O azoto assimilável pelas leveduras durante a fermentação é composto principalmente de aminoácidos e azoto mineral (ião amónio) (Burin et al. 2016; Gutiérrez-Gamboa et al. 2017), sendo este último completamente assimilado durante

a fermentação (Casalta et al. 2013). Os aminoácidos, no vinho, representam 30 a 40% do azoto total (Callejón et al. 2010; Soufleros et al. 2003), sendo a prolina o único aminoácido que não é utilizado pelas leveduras (em condições de anaerobiose) (Burin et al. 2016).

3.5.1. Aminoácidos (AA)

Os aminoácidos são moléculas orgânicas constituídas por um átomo de carbono assimétrico (C_{α}) (com exceção do ácido γ -amino-butírico e β -alanina), ligado a um grupo amino (NH_2), um grupo carboxilo ($COOH$), um átomo de hidrogénio e a uma cadeia lateral (R), que é distinta para cada aminoácido (Moran, et al. 2012) (Campbell 2017) (**figura 3**).

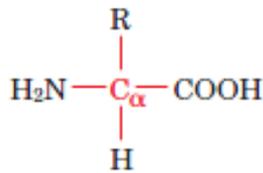


Figura 3. Estrutura geral de um aminoácido (Fonte: (Voet 2013)).

Os aminoácidos podem ter carácter ácido, ou seja, possuem cadeia lateral com carga negativa (como é o caso dos ácido aspártico e ácido glutâmico); carácter básico, em que a cadeia lateral possui carga positiva (por exemplo, a arginina, a histidina e a lisina); ou carácter neutro (prolina, serina, tirosina, triptofano, cisteína, metionina, entre outros) (Voet 2013).

Sendo as unidades estruturais das proteínas (Ibegbulem et al. 2013), os aminoácidos são essenciais para todos os seres vivos, desempenhando um papel indispensável como componentes das paredes celulares, promovendo o seu crescimento, reparação e manutenção (Voet 2013).

No que diz respeito ao vinho, a sua presença pode ter diversas origens e depender de variados factores (Silva et al. 2007; Soufleros et al. 2003). Alguns aminoácidos estão presentes nas uvas, sendo os mais representativos a prolina e a arginina (Garde-Cerdán et al. 2014; Gutiérrez-Gamboa et al. 2017). Estes servem de nutrientes para as leveduras e bactérias lácticas no mosto, podendo ser parcialmente ou totalmente metabolizados durante a fermentação alcoólica e também

metabolizados na fermentação malolática (Burin et al. 2016; Silva et al. 2007). Outros são produzidos por degradação enzimática das proteínas da uva (Callejón et al. 2010; Soufleros et al. 2003) e no final da fermentação, alguns aminoácidos podem ainda ser excretados pelas leveduras ou por proteólise durante a autólise de leveduras mortas (Silva et al. 2007; Soufleros et al. 2003).

A composição dos aminoácidos no vinho depende portanto de múltiplos factores, incluindo a própria variedade da uva; a região e condições climáticas adjacentes; as práticas vitícolas, principalmente a fertilização; o grau de maturação da uva aquando da colheita e as técnicas de vinificação (sendo o tempo de maceração muito importante) (Barrado et al. 2009; Callejón et al. 2010; Duchowicz et al. 2013; Silva et al. 2007; Soufleros et al. 2003; Tuberoso et al. 2015).

Os principais aminoácidos existentes no vinho encontram-se na **figura 4**:

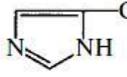
Amino acid	Structure	Abbreviation
Alanine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Ala
Arginine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH} \\ \quad \\ \text{N}-\text{H} \quad \text{COOH} \end{array}$	Arg
Aspartic acid	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Asp
Asparagine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{COOH} \end{array}$	Asn
Citrulline	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{COOH} \end{array}$	Cit
Cysteine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Cys
Glutamic acid	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Glu
Glutamine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{COOH} \end{array}$	Gln
Glycine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Gly
Histidine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ 	His
Isoleucine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{COOH} \end{array}$	Ile
Leucine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{COOH} \end{array}$	Leu

Figura 4. Principais aminoácidos no vinho (Adaptado de: (Ribéreau-Gayon, Glories, et al. 2006).

Amino acid	Structure	Abbreviation
Lysine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Lys
Methionine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Met
Ornithine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Orn
Phenylalanine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Phe
Proline	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Pro
Hydroxy 3 proline	$\begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Hypro
Serine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Ser
Threonine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CHOH}-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Thr
Tryptophan	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Trp
Tyrosine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Tyr
Valine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{COOH} \end{array}$	Val

Figura 4. Principais aminoácidos no vinho (continuação) (Adaptado de: (Ribéreau-Gayon, Glories, et al. 2006).

A glicina é o aminoácido mais simples, uma vez que a cadeia lateral (R) é um simples átomo de hidrogénio (Moran, et al. 2012).

A arginina é o aminoácido predominante e possui uma ligação com diversos aminoácidos (ornitina, ácido aspártico e glutâmico, prolina), tendo um papel importante no metabolismo do azoto (Ribéreau-Gayon, et al. 2006).

A prolina é outro aminoácido representativo, uma vez que não é utilizado pelas leveduras durante a fermentação (Burin et al. 2016).

Nos vinhos tintos, as concentrações médias de compostos azotados são sensivelmente duas vezes maiores do que nos vinhos brancos, devido às técnicas de vinificação, abrangendo a maceração com temperatura elevada, que faz com que as substâncias azotadas se dissolvam mais depressa das películas e grânhas, bem como a autólise das células de leveduras mortas (Ribéreau-Gayon, Glories, et al. 2006).

Assim, os aminoácidos são muito importantes como factor de diferenciação e de autenticidade de um vinho (Duchowicz et al. 2013; Soufleros et al. 2003).

3.5.2. Aminas Biogénicas (BA)

As aminas biogénicas são bases orgânicas de baixo peso molecular (contendo um grupo amino), que podem ter estruturas alifáticas, aromáticas ou heterocíclicas (Marques et al. 2008; Piasta et al. 2014).

Do ponto de vista bioquímico, as aminas biogénicas podem ser formadas principalmente através de quatro reações enzimáticas: descarboxilação; transaminação; aminação redutora; e degradação de certos compostos precursores de aminoácidos (Meléndez et al. 2016; Smit et al. 2014). A descarboxilação é a mais comum, devido à atividade da enzima descarboxilase produzida por microrganismos a partir do precursor do aminoácido correspondente (Ancín-Azpilicueta et al. 2011).

Portanto, com base na figura seguinte (**figura 5**), podemos constatar que a tiramina e a cadaverina são produtos de descarboxilação, respetivamente, da tirosina e da lisina (Arrieta and Prats-Moya 2012), assim como a histamina deriva da descarboxilação da histidina e a triptamina do triptofano (Önal 2007).

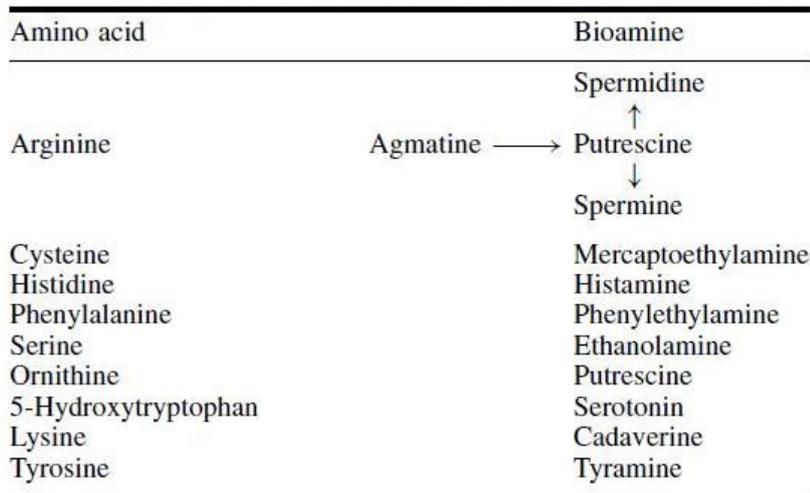


Figura 5. Amina biogénicas e aminoácidos precursores (Adaptado de: (Ribéreau-Gayon, Glories, et al. 2006).

A arginina é o aminoácido precursor de várias amins biogénicas, sendo que a descarboxilação da arginina produz a agmatina, um precursor da putrescina (Cañas et al. 2008). A ornitina também pode ser o precursor direto da putrescina (Arrieta and Prats-Moya 2012) e causar a formação de duas outras amins, a espermidina e a espermina (Önal 2007). A arginina é, portanto, um precursor direto ou indireto de quatro amins biogénicas (Ribéreau-Gayon, Glories, et al. 2006).

Algumas amins estão normalmente presentes nas uvas, dependendo do tipo e composição do solo, fertilização, condições climáticas e o grau de maturação (Meléndez et al. 2016).

No vinho, as amins podem ainda ser formadas durante a fermentação alcoólica (Ancín-Azpilicueta et al. 2011), podendo assim ter duas origens diferentes: a matéria-prima e os processos de fermentação (Marques et al. 2008).

A produção de amins biogénicas é condicionada pelas condições de fermentação, nomeadamente: duração e temperatura de fermentação, o pH, o teor em oxigénio e ainda a duração da maceração com as películas) (Meléndez et al. 2016; Soufleros et al. 2007). A estirpe de levedura utilizada na fermentação alcoólica também vai ter influência no teor de amins no vinho, bem como o conteúdo em aminoácidos no mosto (Arrieta and Prats-Moya 2012; Marques et al. 2008; Meléndez et al. 2016).

Na fermentação malolática pode haver também produção de amins devido à proliferação de bactérias lácticas (Ancín-Azpilicueta et al. 2011; Meléndez et al. 2016) e a sua concentração é modificada durante o processo de envelhecimento do vinho e também no armazenamento (Ancín-Azpilicueta et al. 2011; Arrieta and Prats-Moya 2012).

As amins biogénicas também podem ser originadas de contaminações microbianas devido a insuficientes condições sanitárias das uvas e equipamentos de processamento (Soufleros et al. 2007).

Assim, as amins biogénicas normalmente encontradas nos vinhos são a tiramina e a feniletilamina (amins aromáticas); a histamina e a triptamina (amins heterocíclicas); e a putrescina, a cadaverina, a agmatina, a espermina e a espermidina (amins alifáticas) (Herbert et al. 2006). As suas estruturas químicas podem ser verificadas na figura abaixo (**figura 6**).

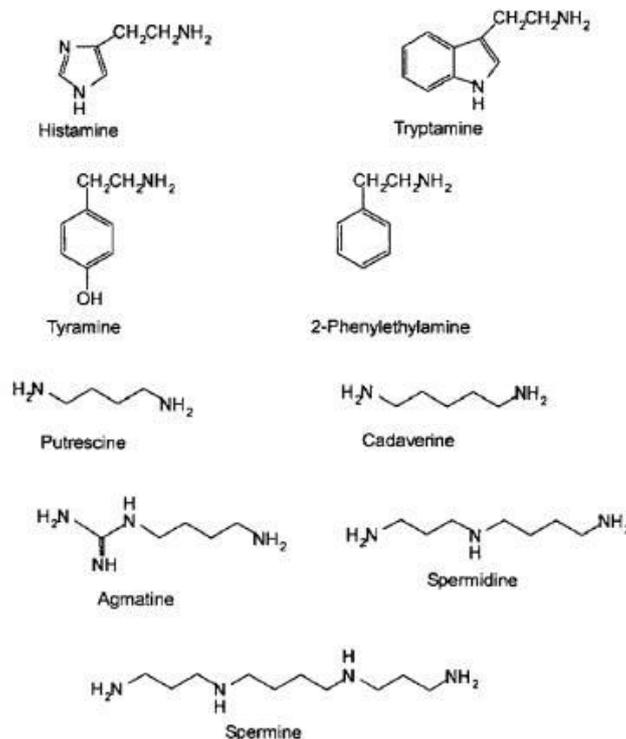


Fig. 1. Chemical structures of some biogenic amines.

Figura 6. Estruturas químicas de algumas amins biogénicas (Fonte: (Önal 2007)).

A concentração de amins biogénicas no vinho é relativamente baixa quando comparada com outros alimentos fermentados (Soufleros et al. 2007). Todavia, a

ingestão de algumas aminas em concentrações mais elevadas pode desenvolver variados sintomas no ser humano, particularmente dores de cabeça, náuseas, vômitos, hipo ou hipertensão, problemas digestivos e ainda reações alérgicas (Smit et al. 2014).

Normalmente as concentrações das aminas são superiores nos vinhos tintos quando comparadas com os vinhos brancos, uma vez que os primeiros geralmente passam por maceração durante a fermentação alcoólica e sofrem fermentação malolática (Ribéreau-Gayon, Glories, et al. 2006).

Assim, as aminas biogénicas são consideradas a causa mais relevante para a intolerância ao vinho, sendo que os efeitos tóxicos das aminas podem ser reforçados pelo álcool, impedindo que os mecanismos de desintoxicação do organismo funcionem devidamente (Arrieta and Prats-Moya 2012).

Portanto, dada a importância do teor em aminas biogénicas no vinho, ao nível de contaminações e também a saúde humana, é essencial a sua monitorização (Önal 2007).

3.6. Identificação e quantificação de compostos azotados no vinho

A identificação e quantificação de aminoácidos e de aminas biogénicas nos vinhos tem uma grande importância enológica, uma vez que estes compostos estão diretamente relacionados à sua qualidade (Herbert et al. 2001).

Dos procedimentos químicos analíticos existentes, os métodos cromatográficos são, sem dúvida, os mais evidentes, uma vez que permitem uma separação cromatográfica qualitativa e quantitativa (Molnár-Perl 2000).

A cromatografia é um método de separação de compostos, no qual a amostra é transportada por uma fase móvel, através de uma fase estacionária fixa, colocada na coluna ou numa superfície sólida (Silva 2012). Estes compostos são, posteriormente, detectados por um detetor que se encontra localizado à saída da coluna cromatográfica. O detetor tem como finalidade detetar e representar, na forma de um gráfico designado por cromatograma, os compostos que percorreram a fase estacionária (Porto 2014). O detetor apenas deteta e identifica um composto se for um espectrómetro de massa.

3.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação devido à sua sensibilidade, a sua fácil adaptação para determinações quantitativas e a sua adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis (Silva 2012). Portanto, é uma técnica bastante utilizada em diversas áreas da ciência e numa variedade de matrizes (incluindo o vinho), principalmente na detecção de aminoácidos e amins biogénicas (Arrieta and Prats-Moya 2012; Kelly et al. 2010; Wang et al. 2014).

O HPLC apresenta, como todas as técnicas, algumas vantagens e certas desvantagens. Permite automatizar o sistema, reduzir o tempo de análise, efetuar análises qualitativas e quantitativas, ter reprodutibilidade de dados e uma boa detetabilidade a diferentes comprimentos de onda. No entanto o equipamento e a sua manutenção é dispendiosa, possui um sistema complexo, apresenta uma baixa sensibilidade perante alguns compostos e está sempre dependente da experiência do operador (Sequeira 2012).

Como técnica cromatográfica, permite a separação de diferentes compostos numa amostra, sendo esta separação conseguida através da afinidade entre a amostra e as fases móvel ou estacionária (Rocha 2015).

Quando a fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar, a cromatografia diz-se de “fase normal” e neste caso os solutos apolares preferem a fase móvel e são eluídos primeiro. Contrariamente, se a fase estacionária for apolar e a fase móvel polar, a cromatografia diz-se de “fase reversa” e neste caso os solutos polares são eluídos primeiro (Sá 2010) (Pinho 2016).

Se durante a separação for utilizado um único solvente de composição constante a eluição é chamada de isocrática. Porém, algumas amostras necessitam de uma separação por gradiente, para que esta seja mais eficiente, requerendo uma mudança na composição da fase móvel durante a análise, com a variação da proporção entre os solventes, que geralmente diferem entre si na polaridade (Silva 2012) (Pinho 2016).

O sistema HPLC é constituído por vários componentes, nomeadamente a bomba, o injetor, a coluna, o detetor e o sistema de registo e processamento de dados (Sequeira 2012) (figura 7).

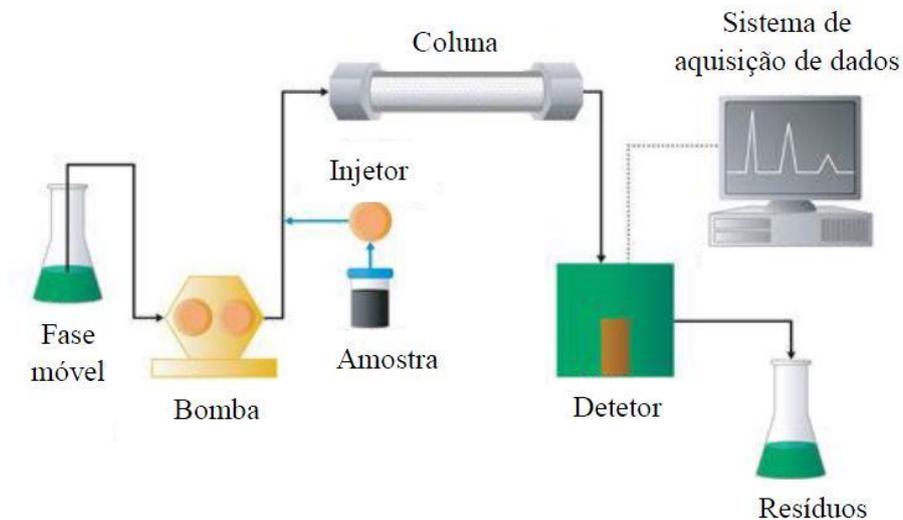


Figura 7. Componentes de um sistema HPLC (Adaptado de: (Waters 2017)).

O injetor é o responsável por introduzir a amostra na fase móvel, para posteriormente ser introduzida na coluna (Porto 2014). A bomba, sob elevada pressão e a uma velocidade de fluxo controlada, vai distribuir a fase móvel, pela coluna cromatográfica (Sequeira 2012)(Pinho 2016). A coluna é o constituinte mais importante e crítico do sistema cromatográfico, uma vez que permite a separação dos componentes da amostra, através da retenção destes na fase estacionária e a posterior eluição dos mesmos com a fase móvel (Pinho 2016). O detetor controla a sensibilidade com que cada composto pode ser detetado e medido, depois de separados na coluna (Sequeira 2012).

Existem vários tipos de detetores utilizados em HPLC, entre eles os de índice de refração (IR), ultravioleta (UV), fluorescência (FL), espectrometria de massa (MS) e *Diode Array* (DAD) (Sequeira 2012), sendo a escolha do detetor a utilizar dependente da natureza da amostra (Sá 2010).

O detetor DAD é frequentemente utilizado acoplado à técnica de HPLC (Rocha 2015). Este detetor possui agrupamentos de fotodíodos que permitem obter informação sobre uma ampla gama de comprimentos de onda, de uma só vez (Anacleto 2016), de forma a corresponder à maior sensibilidade de medição para um

dados compostos (Paula 2012). Se a medição for realizada a um comprimento de onda fixo, o detetor permite obter informação qualitativa e a identificação pelo tempo de retenção, que posteriormente é comparado com os obtidos com padrões puros (Paula 2012)(Anacleto 2016).

3.6.1.1. Derivatização

A análise direta de aminoácidos e de aminas biogénicas é difícil devido às suas diferentes estruturas e por não possuírem um cromóforo específico, não absorvendo assim luz UV nem visível (Arrieta and Prats-Moya 2012; Wang et al. 2014). Assim, geralmente é necessário efetuar uma reacção de derivatização, modificando os compostos de modo a que sejam mais facilmente detetados, sendo esta realizada antes (pré-coluna) ou após a separação cromatográfica (pós-coluna) (Callejón et al. 2010). A mais comum é a derivatização pré-coluna (L. Silva 2008) e existem vários reagentes que podem ser utilizados (Tuberoso et al. 2015), entre os quais o DEEMM, que foi o utilizado no presente trabalho. Este reagente possibilita uma derivatização direta sem preparação prévia, permitindo a quantificação simultânea dos aminoácidos e das aminas biogénicas, sendo muito utilizado aquando da análise deste tipo de compostos nos vinhos (Callejón et al. 2010; Wang et al. 2014).

3.6.1.2. Padrão Interno

O Padrão Interno (PI) é um composto químico, normalmente com estrutura análoga ao composto a quantificar, utilizado na preparação das amostras, a fim de corrigir perdas de analitos no decorrer do processo e que podem induzir a variações cromatográficas (Pinho 2016). A quantidade adicionada é conhecida e igual para todas as amostras e neste caso o PI usado foi o Ácido 2-aminoadípico.

3.6.2. Outras técnicas de quantificação

Nos últimos anos, a evolução da análise instrumental permitiu uma detecção e quantificação dos compostos azotados, com mais sensibilidade e precisão (Callejón et al. 2010).

Para além do HPLC, diferentes técnicas podem ser utilizadas na análise destes compostos (Arrieta and Prats-Moya 2012; Önal 2007), entre eles:

➤ Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia gasosa (GC) é uma alternativa ao HPLC, na análise dos compostos azotados, como os aminoácidos e as aminas biogénicas (Arrieta and Prats-Moya 2012).

O GC separa os compostos usando um gás como fase móvel, que transporta a amostra pela coluna até chegar ao detector (Kusch 2017). Apesar desta técnica ser relativamente rápida e ter um alto poder de resolução e elevada sensibilidade, os compostos azotados têm de ser convertidos em derivados voláteis para serem determinados, o que pode ser uma desvantagem em relação ao HPLC (Callejón et al. 2010; Molnár-Perl 2000).

➤ Método eletroforetico capilar (CE)

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica sensível usada para separar e detectar aminoácidos, péptidos e proteínas (Galievsky et al. 2016). O mecanismo de separação em CE é semelhante ao da eletroforese em gel tradicional, em que as moléculas carregadas migram para o pólo oposto e são separadas entre si sob um campo elétrico, com base no peso molecular (Ban et al. 2015).

Comparativamente com o HPLC, esta técnica é mais barata, os tempos de análise são mais curtos, sem a necessidade de eluição gradiente, logo menos gasto de reagentes, e permite a análise de menores volumes de amostra (Callejón et al. 2010).

➤ Magneto-cromatografia líquida de alta eficiência (HPLMC)

A magneto-cromatografia líquida de alta eficiência (HPLMC) é uma técnica relativamente nova, em que a fase estacionária tem propriedades paramagnéticas e a intensidade de campo magnético que retém seletivamente as substâncias paramagnéticas na fase estacionária, depende da sua susceptibilidade magnética. Portanto, a separação ocorre devido à diferença na força de atracção exercida pelos altos gradientes (Barrado et al. 2009; Callejón et al. 2010).

➤ Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A base da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é semelhante às outras espectroscopia, como a espectroscopia UV-visível, e a frequência de transmissão de ondas infravermelhas é absorvida por núcleos ativos de RMN sob um campo magnético forte (Yang et al. 2017).

A RMN é uma técnica não destrutiva, seletiva e capaz de uma detecção simultânea de um grande número de compostos de baixo peso molecular, em misturas complexas. Tem a vantagem de preparação de amostras é mais simples e menos demorada (Callejón et al. 2010).

4. Metodologia

4.1. Ensaio e Vinificações

As microvinificações utilizadas neste trabalho foram executadas na vindima de 2016, com uvas da casta Aragonéz, provenientes de um ensaio que consistiu em dois níveis de aplicação de P, K, e Ca ao solo e três níveis de fertilização de Mg, num total de seis tratamentos:

- ✓ Sem adição de P, K e Ca, e sem adição de Mg (**SN0**)
- ✓ Sem adição de P, K e Ca, e adição de Mg (dose 1) (**SN1**)
- ✓ Sem adição de P, K e Ca, e adição de Mg (dose 2) (**SN2**)
- ✓ Com adição de P, K e Ca, e sem adição de Mg (**CT0**)
- ✓ Com adição de P, K e Ca, e adição de Mg (dose 1) (**CT1**)
- ✓ Com adição de P, K e Ca, e adição de Mg (dose 2) (**CT2**)

O ensaio de 2016 refere-se a vinificações, em duplicado, num total de 12 vinhos, elaborados com uvas do ensaio descrito, colhidas numa parcela da vinha em que os tratamentos foram efetuados apenas no ano de 2016.

O ensaio de 2015 refere-se a vinificações, sem duplicados, num total de 6 vinhos, elaborados com uvas do ensaio descrito, colhidas numa outra parcela da vinha em que os tratamentos foram efetuados em dois anos, 2015 e 2016. A falta de duplicados das microvinificações ficou a dever-se à falta de uva suficiente.

A **figura 8** ilustra as amostras de vinho para análise.



Figura 8. Amostras das microvinificações analisadas.

4.2. Caracterização físico-química dos vinhos

Para as 18 amostras analisaram-se alguns parâmetros enológicos, tais como:

- pH
- Acidez Total
- Acidez Volátil
- SO₂ Livre
- SO₂ Total
- Teor Alcoólico



Figura 9. Potenciômetro utilizado nas análises.

Estas análises foram efetuadas no laboratório de enologia da Universidade de Évora (Mitra), onde se seguiu os protocolos utilizados no mesmo.

4.3. Identificação e quantificação de aminoácidos e amins biogénicas por HPLC-DAD

4.3.1. Aminoácidos e amins biogénicas analisados

Neste trabalho foram estudados 22 aminoácidos e 8 amins biogénicas, estando estes discriminados na tabela seguinte (**quadro 1**).

Quadro 1. Aminoácidos e amins biogénicas analisados.

Aminoácidos	Ornitina
Ácido Aspártico	Prolina
Ácido Glutâmico	Serina
Alanina	Tirosina
Arginina	Treonina
Asparagina	Triptofano
Cisteína	Valina
Fenilalanina	Amins Biogénicas
GABA	Agmatina
Glicina	Cadaverina

Glutamina	Espermidina
Histidina	Feniletilamina
Isoleucina	Histamina
Lisina	Putrescina
Leucina	Tiramina
Metionina	Triptamina

4.3.2. Preparação dos padrões

As soluções dos aminoácidos e das aminas biogénicas foram preparadas pesando cada um dos compostos e adicionando HCl 0.1 N. Estas soluções foram posteriormente utilizadas para a preparação de uma “solução-mãe”, a partir da qual se preparou padrões, com concentrações conhecidas de cada composto.

Os padrões sofreram o mesmo processo de derivação que as amostras de vinho.

4.3.3. Preparação das amostras

Para cada amostra de vinificação efetuou-se duas réplicas para análise, sendo que para cada um se preparou, em tubos de vidro, uma reacção de derivatização, a qual está presente no quadro seguinte (**quadro 2**).

Quadro 2. Reacção de derivatização.

Volume	Reagente
1,75 mL	Tampão Borato
750 µL	Metanol
1 mL	Amostra (previamente centrifugada)
20 µL	Ácido 2-aminoadipico, 1 g/L (Padrão Interno)
30 µL	DEEMM (Agente Derivatizante)
Agitar suavemente	
Ultra-sons (1h)	
Estufa (2h, a 75 °C)	

Preparou-se também um branco, no qual se substituiu a amostra por 1 mL de HCl 0.1 N.

Após este processo, as amostras foram filtradas, através de filtros de membrana de 0,45 μm , para tubos de HPLC (**figura 10**). De seguida colocou-se os tubos no aparelho de HPLC respetivo e prosseguiu-se com a análise.



Figura 10. Filtração das amostras para tubos de HPLC.

4.3.4. Condições de quantificação de aminoácidos e amins biogénicas por HPLC-DAD

Para a análise cromatográfica utilizou-se um equipamento de HPLC Alliance Waters, equipado com detetor DAD e software Empower (**figura 11**).



Figura 11. HPLC Alliance Waters (Mitra).

O método utilizado foi adaptado de (Gómez-Alonso, Hermosín-Gutiérrez, and García-Romero 2007). A fase estacionária consistiu numa coluna de fase reversa ACE C18-HL (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel teve como eluente A um tampão acetato 25 mM (pH 5.8) com 0,4 g de azida de sódio e o eluente B uma mistura de acetonitrilo e metanol, com uma proporção de 80:20 (v/v). O fluxo foi de 0,9 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 50 µL, sendo a injeção feita de forma automática. As condições da análise estão apresentadas no **quadro 3**:

Quadro 3. Condições da análise de HPLC.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	90	10
20	90	10
30	83	17
30.01	81	19
31	81	19
31.01	80.5	19.5
39.51	77	23
60.11	70.6	29.4
68.11	28	72
73.11	18	82
77.11	0	100
80.11	0	100
85.11	90	10
90	90	10

Para a deteção, utilizou-se um detector Diode Array, sendo esta feita aos comprimentos de onda 269, 280 e 300 nm. A identificação dos aminoácidos e das aminas biogénicas foi conseguida por comparação com o tempo de retenção do respectivo padrão.

A quantificação foi realizada utilizando as curvas de calibração dos padrões respetivos.

4.4. Análise estatística dos resultados

Todos os resultados apresentados foram expressos como média \pm desvio padrão. No tratamento estatístico dos dados experimentais obtidos recorreu-se ao auxílio do programa Microsoft® EXCEL. Com o objetivo de avaliar a existência de diferenças significativas entre os valores experimentais obtidos recorreu-se à análise de variância (ANOVA fator único). Neste trabalho, a ANOVA foi sempre efetuada com um nível de significância $<0,05$, correspondente a um grau de confiança de 95%.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização físico-química dos vinhos

Como referido na metodologia experimental (ponto 4.2.), para as 18 amostras das vinificações analisou-se alguns parâmetros enológicos, estando os resultados presentes no seguinte quadro (**quadro 4**).

Quadro 4. Parâmetros enológicos analisados.

Amostra	SO ₂ Livre (mg/dm ³)	SO ₂ Total (mg/dm ³)	Teor Álcool Adquirido (% vol)	Acidez Total (Ác. Tart. g/dm ³)	Acidez Volátil (Ác. Acét. g/dm ³)	pH
CT0 2015	6	15	17,2	4,21	0,93	4,27
CT1 2015	6	13	16,6	4,65	1,02	4,19
CT2 2015	6	11	16,1	4,55	0,81	4,17
SN0 2015	5	9	15,7	4,8	0,75	4,02
SN1 2015	6	10	16,6	4,77	0,72	4,12
SN2 2015	5	11	16,3	4,73	0,99	4,12
CT0 2016	6	22	15,9	5,16	0,96	3,96
CT0 (A) 2016	6	13	15,8	4,89	0,99	3,83
CT1 2016	5	19	16,3	5,27	1,05	4,02
CT1 (A) 2016	5	18	15,1	5,14	1,02	3,95
CT2 2016	5	29	16,1	5,17	0,75	3,91
CT2 (A) 2016	6	13	16	4,95	0,96	4,04
SN0 2016	6	22	15,5	4,75	0,66	4,01
SN0 (A) 2016	6	18	15,2	5,17	0,87	3,91
SN1 2016	5	29	15,9	4,86	0,78	4,03
SN1 (A) 2016	5	20	15,9	4,77	0,81	3,96
SN2 2016	6	27	16,6	4,92	0,78	3,99
SN2 (A) 2016	5	18	16,1	4,82	1,02	4,15

As análises foram efetuadas após a conclusão da fermentação malolática das vinificações. Este facto pode justificar os valores baixos de SO₂, pois na altura ainda não tinha sido efetuada qualquer correção dos teores de SO₂. Consideram-se vinhos protegidos quando o teor de SO₂ é aproximadamente 30 mg/L.

O teor alcoólico dos vinhos em estudo foi, no geral, elevado.

A acidez total de um vinho tem de ser igual ou superior a 3,5 g/dm³ (expressa em ácido tartárico). Nas vinificações estudadas verifica-se que os valores são todos superiores ao estabelecido, apesar de mais uma vez não ter sido feita nenhuma correção aos mostos. A acidez volátil, por sua vez, tem de ser igual ou inferior a 1,2

g/dm³ (expressa em ácido acético). Os valores de acidez volátil das vinificações, apesar de se encontrarem dentro dos parâmetros estabelecidos, são genericamente altos.

5.2. Identificação e quantificação de aminoácidos e amins biogénicas por HPLC-DAD

5.2.1. Identificação dos aminoácidos e das amins biogénicas

A identificação dos compostos em questão foi obtida comparando os respetivos tempos de retenção, como referenciado no ponto 4.3.4. da metodologia experimental.

Para cada amostra analisada, através de HPLC-DAD, foi obtido um cromatograma, através do qual se conseguiu identificar e posteriormente quantificar cada um dos 22 aminoácidos e 8 amins biogénicas.

O seguinte cromatograma (**figura 12**) foi utilizado para a comparação dos tempos de retenção de cada composto e possível identificação e quantificação dos mesmos.

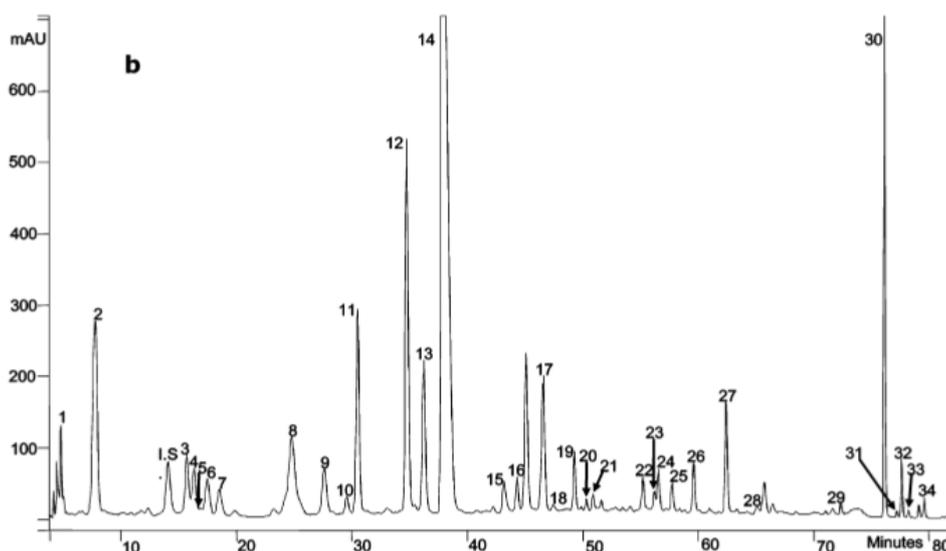


Figura 12. Cromatograma utilizado para a identificação dos compostos. Os picos correspondem a: 1, Ácido aspártico; 2, Ácido glutâmico; I.S, PI (padrão interno); 3, Asparagina; 4, Serina; 6, Glutamina; 7, Histidina; 8, Glicina; 9, Treonina; 11, Arginina; 12, α -Alanina; 13, GABA; 14, Prolina; 15, Histamina; 16, Tirosina; 18, Agmatina; 19, Valina; 20, Metionina; 21, Cisteína; 22, Isoleucina; 23, Triptofano; 24, Leucina; 25, Fenilalanina; 26, Ornitina; 27, Lisina; 28, Espermidina; 29, Tiramina; 30, Putrescina; 31, Triptamina; 32, Cadaverina; e 33, Feniletilamina (Adaptado de: (Gómez-Alonso, Hermosín-Gutiérrez, and García-Romero 2007)).

5.2.2. Quantificação dos aminoácidos nos vinhos

A quantificação de cada aminoácido foi feita através das retas de calibração de cada um deles, elaboradas a partir de padrões com concentrações conhecidas dos mesmos.

No **quadro 5** estão apresentados os tempos de retenção de cada aminoácido bem como a gama de concentrações dos padrões utilizados, e ainda a equação da reta obtida para cada composto, utilizada para o cálculo das concentrações nas amostras, e o respetivo coeficiente de correlação (R^2).

Quadro 5. Tempo de retenção, equação da reta e gama de concentração de cada aminoácido.

Aminoácido	Tempo de retenção (min) ± DP	Equação da reta ($y = mx + b$)	R^2	Gama concentração (mg/L)
Ácido Aspártico	5,40 ± 0,02	$y = 0,0406x - 0,0186$	0,9949	2,22 - 17,73
Ácido Glutâmico	7,44 ± 0,03	$y = 0,0394x - 0,0496$	0,9945	3,21 - 25,66
Aspargina	15,32 ± 0,04	$y = 0,0388x - 0,0333$	0,9946	2,19 - 17,54
Serina	16,26 ± 0,04	$y = 0,0507x - 0,0456$	0,9946	2,25 - 18,0
Glutamina	17,54 ± 0,05	$y = 0,02x - 0,0514$	0,9946	5,65 - 45,20
Histidina	18,20 ± 0,04	$y = 0,0224x - 0,0275$	0,9918	2,07 - 16,54
Glicina	24,54 ± 0,07	$y = 0,0722x - 0,0546$	0,9941	1,77 - 14,14
Treonina	28,65 ± 0,09	$y = 0,0445x - 0,0466$	0,9949	2,44 - 19,55
Arginina	35,60 ± 0,02	$y = 0,0186x + 0,0213$	0,9913	11,92 - 119,2
Alanina + GABA	37,65 ± 0,03	$y = 0,0922x - 0,152$	0,9949	4,28 - 34,20
Prolina	38,94 ± 0,20	$y = 0,0103x + 0,0698$	0,9967	19,04 - 1904
Tirosina	43,19 ± 0,13	$y = 0,1989x - 0,1551$	0,9937	1,79 - 14,34
Valina	47,36 ± 0,03	$y = 0,0452x + 0,0207$	0,9927	1,62 - 12,94
Metionina	49,19 ± 0,05	$y = 0,0331x - 0,0209$	0,9945	1,52 - 12,13
Cisteína	50,41 ± 0,04	$y = 0,0206x + 0,0035$	0,9959	1,93 - 19,30
Isoleucina	56,02 ± 0,06	$y = 0,0195x - 0,0034$	0,9932	1,36 - 13,60
Triptofano	56,37 ± 0,06	$y = 0,0104x - 0,003$	0,9952	1,92 - 19,20
Leucina	58,31 ± 0,08	$y = 0,039x - 0,0257$	0,9946	1,64 - 13,14
Fenilalanina	59,75 ± 0,08	$y = 0,0293x - 0,0169$	0,9952	1,50 - 12,0
Ornitina	64,68 ± 0,03	$y = 0,0933x - 0,0345$	0,9905	0,95 - 7,60
Lisina	66,29 ± 0,01	$y = 0,0541x - 0,0283$	0,9946	1,38 - 11,0

Após a quantificação, e para cada aminoácido, construiu-se um gráfico ilustrativo, a fim de comparar os resultados e verificar eventuais diferenças entre as amostras dos ensaios.

Os primeiros aminoácidos a serem abordados são o ácido aspártico e o ácido glutâmico, que tiveram o mesmo tipo de tendência de resultados. Analisando a **figura 13** podemos verificar que, para estes dois compostos, as amostras do ensaio de 2015 obtiveram maiores diferenças de concentrações entre os tratamentos (CT e SN) e entre as doses de Mg, quando comparando com as amostras do ensaio de 2016. Nos dois anos do ensaio, verifica-se que nas amostras do tratamento SN (sem P, K, Ca), as concentrações não foram muito dispare para as diferentes doses de Mg. Para o tratamento CT (com P, K, Ca), do ensaio de 2015, a diferença mais saliente verifica-se quando a dose de Mg é 0, ou seja, nenhuma.

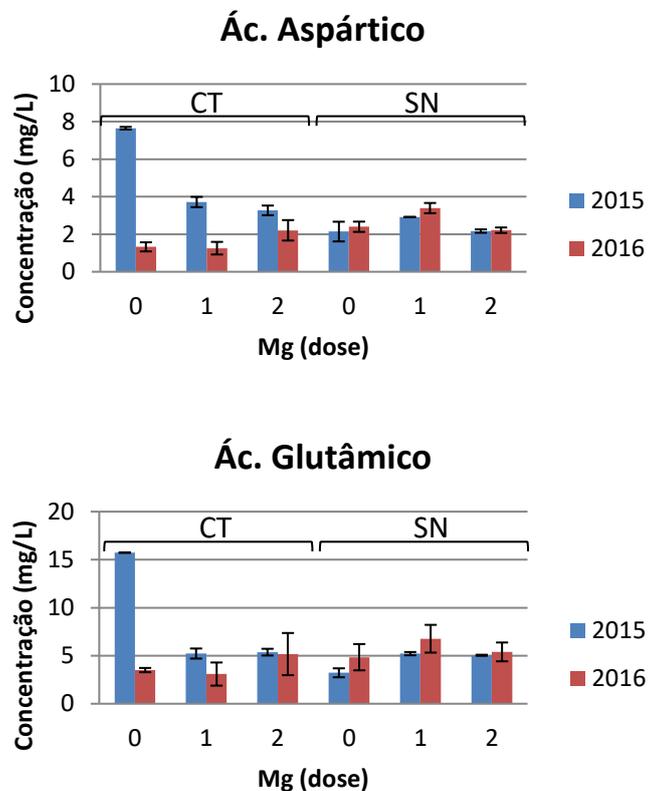


Figura 13. Gráficos comparativos das concentrações de ácido aspártico e ácido glutâmico nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

Em termos genéricos, os teores encontrados para o ácido aspártico variaram entre 1,33 e 7,65 mg/L nos vinhos em estudo. (López et al. 2012) refere valores entre 2,45 e 3,14 mg/L, para vinhos com diferentes pHs. (Alañón et al. 2017) menciona valores a variar entre 7,54 e 11,23 mg/L.

Nos vinhos estudados, os teores em ácido glutâmico encontraram-se entre 3,08 e 15,7 mg/L. (Malec et al. 2017) refere valores 11,7 e 17,6 mg/L enquanto que (Tessarín et al. 2016) menciona valores entre 15,9 e 17,8 mg/L.

No caso da asparagina, no geral, no ensaio do ano de 2016, as concentrações foram ligeiramente superiores do que no ensaio do ano de 2015, porém nada de estatisticamente significativo. Em relação às diferentes doses de Mg, não houve grandes diferenças. É de salientar que na amostra do ensaio CT (com P, K, Ca) com dose 1 de Mg, do ensaio de 2015, não se conseguiu identificar este aminoácido, como pode verificar na **figura 14**.

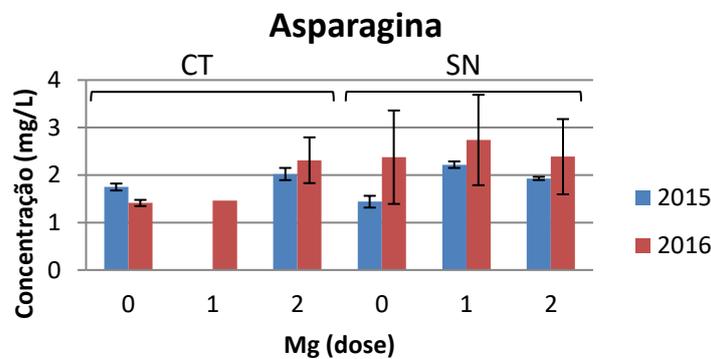


Figura 14. Gráfico comparativo das concentrações de asparagina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

Os teores de asparagina nas vinificações estudadas variaram entre 1,41 e 2,74 mg/L, enquanto que (Alañón et al. 2017) refere valores a variar entre 1,09 e 1,77 mg/L.

Em todas as amostras dos ensaios, não foi possível detetar e identificar o aminoácido serina. Tal pode, eventualmente, dever-se ou ao facto da concentração ser de tal modo baixa que não foi possível detetar com o presente método.

Na **figura 15** estão presentes os gráficos com as diferenças das concentrações dos aminoácidos glutamina, histidina, glicina e treonina.

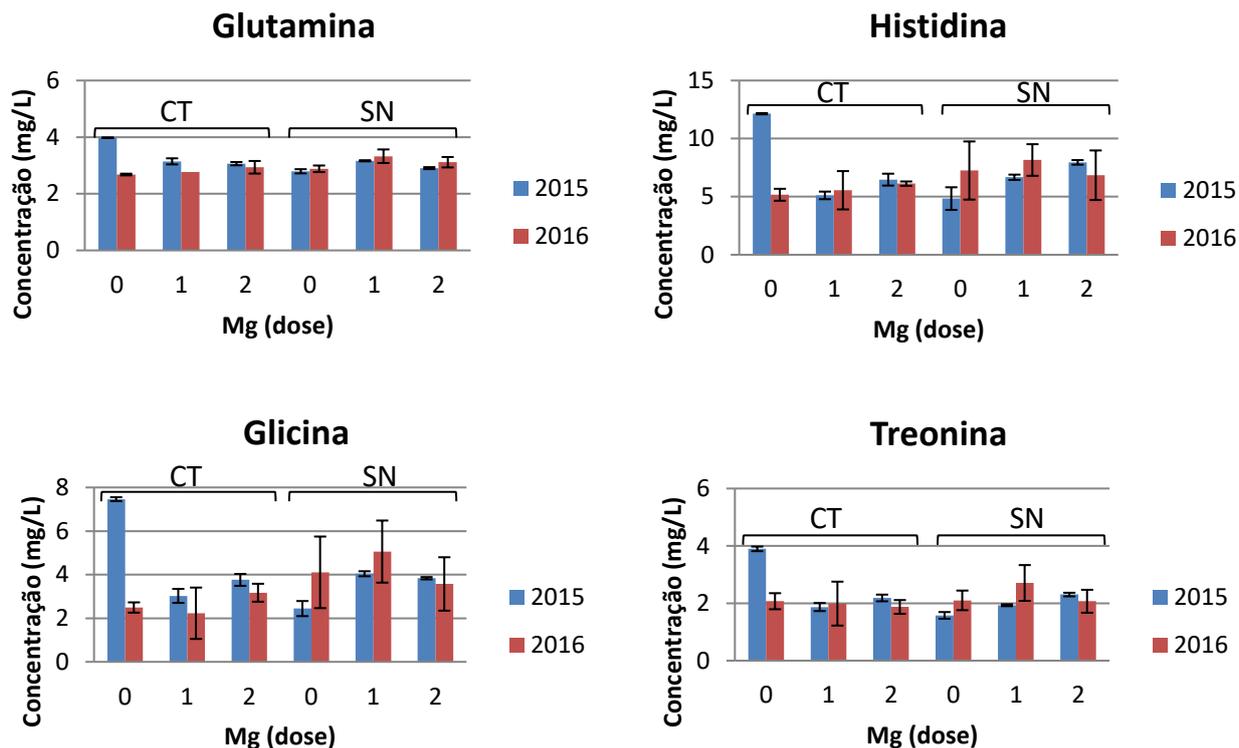


Figura 15. Gráficos comparativos das concentrações de glutamina, histidina, glicina e treonina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

Através dos presentes gráficos, pode-se observar que, para estes quatro compostos, no geral, as diferenças de concentrações comparando os dois anos do ensaio não foram significativas. Da mesma forma, para as diferentes doses de Mg não houve diferenças significativas das suas concentrações. Comparando os dois tipos de tratamentos (CT e SN), apenas a glicina demonstrou uma ligeira disparidade nos dois tratamentos com a mesma dose de Mg, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas. Mais uma vez, a diferença mais saliente verificou-se na amostra do tratamento CT (com P, K, Ca), sem nenhuma dose de Mg, do ensaio de 2015.

Os valores de glutamina nos vinhos analisados variaram entre 2,68 e 3,98 mg/L, indo de encontro aos obtidos no estudo de (López et al. 2012), que variaram entre 2,13 e 4,91 mg/L.

(Malec et al. 2017) menciona valores de histida entre 0,3 e 1,5 mg/L. Nos vinhos estudados, os teores deste aminoácido variaram entre 4,84 e 12,1 mg/L. A

histidina foi, dos aminoácidos doseados neste estudo, aquele que apresentou valores mais dispares dos encontrados na literatura .

A glicina, por sua vez, apresentou valores entre 2,23 e 7,46 mg/L, nos vinhos analisados. (T. Garde-Cerdán et al. 2017) menciona teores entre 5,74 e 7,17 mg/L, em vinhos com casta Tempranillo (Aragonez).

(Tuberoso et al. 2017) refere teores de treonina que variaram entre 3,1 e 12,8 mg/L, não sendo muito distintos aos observados nas vinificações estudadas, que se encontraram entre 1,58 e 3,89 mg/L.

Para a arginina verifica-se que as concentrações nas amostras foram, no geral, muito baixas (**figura 16**). Para o tratamento CT (com P, K, Ca), não se constata diferenças para as várias doses de Mg e comparando os dois anos do ensaio. No tratamento SN (sem P, K, Ca), as diferenças foram um pouco maiores, sendo a concentração mais alta deste composto verificada na amostra proveniente do ensaio com dose 1 de Mg, no ano de 2016.

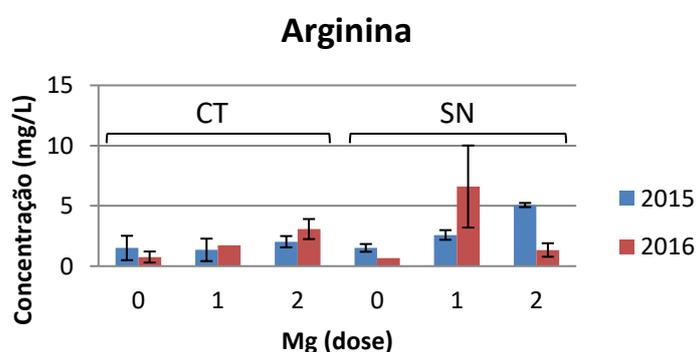


Figura 16. Gráfico comparativo das concentrações de arginina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

Os teores de arginina encontrados nos vinhos estudados variaram entre 0,67 e 6,61 mg/L. (Malec et al. 2017) menciona valores entre 15,4 e 20,2 mg/L, num estudo que identificou aminoácidos por LC-MS. Por sua vez, (Tuberoso et al. 2017) refere valores que variam entre 19 e 29 mg/L, enquanto que (Alañón et al. 2017) referencia teores entre 6,91 e 7,92 mg/L.

No caso da alanina e do GABA, a quantificação destes dois aminoácidos não foi possível ser feita de forma individual, uma vez que os seus picos saíam praticamente

sobrepostos. Assim, as concentrações apresentadas dizem respeito aos dois aminoácidos em conjunto (**figura 17**). Analisando o gráfico podemos constatar que, uma vez mais, a diferença mais notória diz respeito à amostra do tratamento CT (com P, K, Ca), sem nenhuma dose de Mg, do ensaio de 2015, que apresentou uma concentração destes compostos ligeiramente superior, comparada com as restantes. Não houve diferenças significativas das suas concentrações comparando os dois anos do ensaio e as várias doses de Mg. Apenas na amostra do tratamento SN (sem P, K, Ca), com dose 1 de Mg, do ensaio de 2016, apresentou uma concentração levemente superior quando comparado com o tratamento CT (com P, K, Ca), com a mesma dose de Mg.

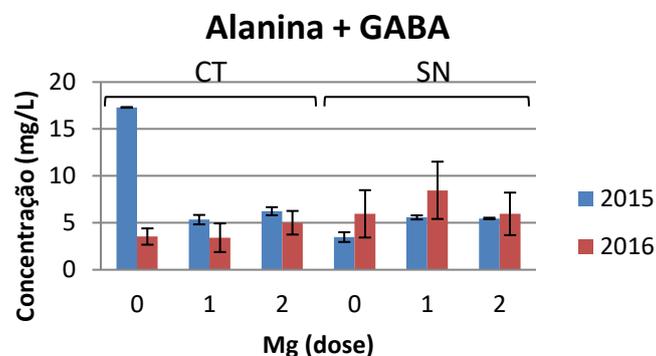


Figura 17. Gráfico comparativo das concentrações de alanina + GABA nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

Nos vinhos analisados, os valores de alanina + GABA encontraram-se entre 3,41 e 17,3 mg/L. (Tuberoso et al. 2017) refere teores de alanina entre 13,7 e 36,9 mg/L e teores de GABA entre 23,6 e 72,4 mg/L. (Alañón et al. 2017) menciona valores de alanina a variar entre 9,97 e 16,14 mg/L e valores de GABA a variar entre 12,03 e 17,96 mg/L.

A prolina foi o aminoácido que, nas amostras, registou concentrações superiores (**figura 18**). No entanto, as variações destas nas amostras foram muito idênticas às dos restantes aminoácidos, sendo o valor de concentração superior e com maior diferença foi na amostra do tratamento CT (com P, K, Ca), sem nenhuma dose de Mg, do ensaio de 2015. No geral, não houve mais diferenças significativas das concentrações entre os dois anos do ensaio. Na amostra do tratamento SN (sem P, K,

Ca), com dose 1 de Mg, do ensaio de 2016, verifica-se uma concentração levemente superior quando comparado com o tratamento CT (com P, K, Ca), com a mesma dose de Mg.

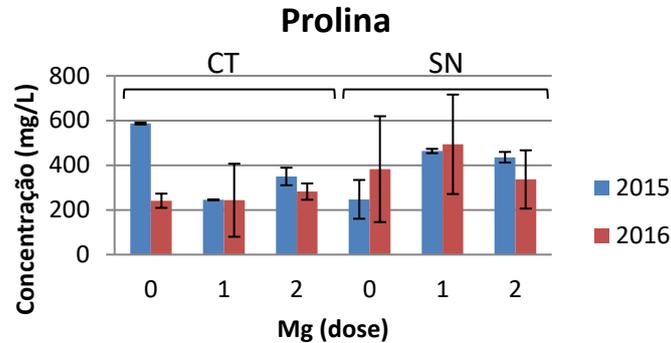


Figura 18. Gráfico comparativo das concentrações de prolina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

Os valores de prolina encontrados nas vinificações estudadas variaram entre 241 e 586 mg/L, estando dentro dos valores encontrados na literatura, sendo que (López et al. 2012) evidencia teores entre 511 e 557 mg/L, enquanto que (Tuberoso et al. 2017) refere valores entre 203 e 891 mg/L. Os elevados teores em prolina encontrados nos vinhos devem-se ao facto de este aminoácido não ser utilizado pelas leveduras.

Relativamente à tirosina e à cisteína, os resultados foram similares, tendo a mesma variação das concentrações nas amostras. Como se pode observar na **figura 19**, para estes dois compostos, não houve diferenças significativas comparando as concentrações nas amostras com diferentes doses de Mg e comparando os dois tipos de tratamentos (CT e SN). Equiparando os dois anos do ensaio também não se verificou grandes diferenças.

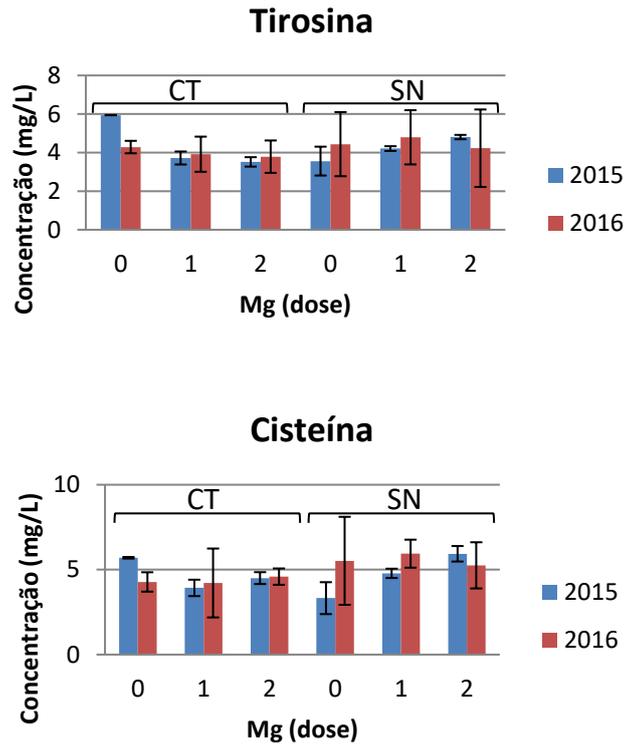


Figura 19. Gráficos comparativos das concentrações de tirosina e cisteína nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

A tirosina apresentou, nos vinhos analisados, valores entre 3,52 e 5,94 mg/L. (T. Garde-Cerdán et al. 2017) mostra teores que variam entre 10,1 e 11,8 mg/L. Já (López et al. 2012) menciona teores entre 0,49 e 1,62 mg/L.

Para a cisteína, (López et al. 2012) menciona valores entre 1,25 e 2,72 mg/L enquanto que (T. Garde-Cerdán et al. 2017) mostra valores que variam entre 7,4 e 8,7 mg/L. Nos vinhos estudados, os teores deste aminoácido encontraram-se entre 3,32 e 5,94 mg/L.

A valina e a metionina, por outro lado, obtiveram resultados díspares dos aminoácidos estudados anteriormente (**figura 20**). A metionina foi um dos aminoácidos em que a concentração não variou praticamente em todas as amostras analisadas. Já a concentração da valina teve mais oscilações, apesar destas não serem estatisticamente significativas. A diferença mais relevante é, novamente, na amostra do tratamento CT (com P, K, Ca), sem nenhuma dose de Mg, do ensaio de 2015, que apresenta uma concentração superior às demais. De salientar também que a amostra

com tratamento SN (sem P, K, Ca), com dose 1 de Mg, do ensaio de 2016, mostrou uma concentração de valina levemente superior, quando comparada com o tratamento CT (com P, K, Ca), com dose igual de Mg.

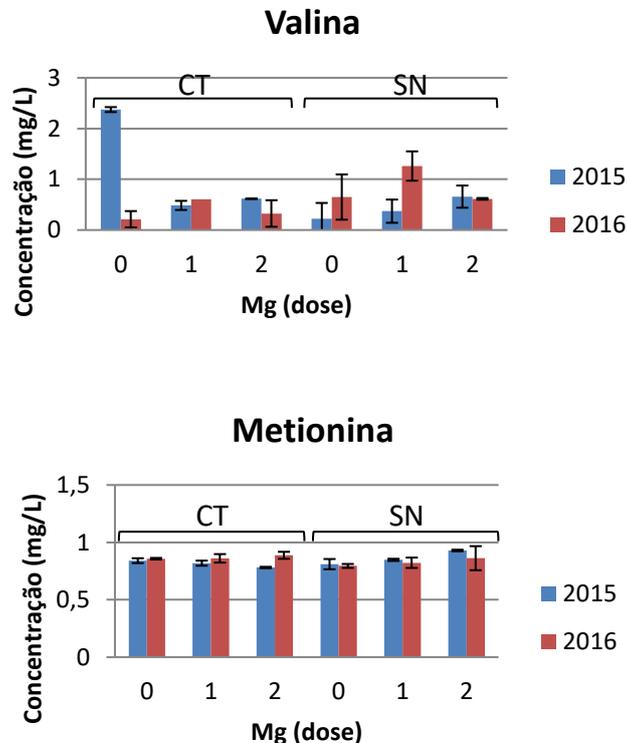


Figura 20. Gráficos comparativos das concentrações de valina e metionina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

As vinificações estudadas apresentaram teores de valina entre os 0,21 e 2,37 mg/L. (Malec et al. 2017) refere valores a variar entre 2,4 e 4,3 mg/L.

(Tessarini et al. 2016) refere teores de metionina que variam entre 0,08 e 0,14 mg/L, não sendo muito diferentes aos encontrados nos vinhos estudados, que mostrarem valores deste aminoácido entre 0,78 e 0,93 mg/L.

No caso da isoleucina e do triptofano, ambos tiveram a mesma tendência de resultados. Como se pode verificar na **figura 21**, na maior parte das amostras, as concentrações destes dois compostos foi ligeiramente superior nas amostras do ensaio de 2016. Mais uma vez, a amostra com tratamento SN (sem P, K, Ca), com dose 1 de Mg, do ensaio de 2016, apresentou uma concentração ligeiramente superior (mais

notória na isoleucina), quando comparada com o tratamento SN (sem P, K, Ca), com dose igual de Mg, do ensaio do ano de 2015.

Uma vez que as concentrações dos aminoácidos foram baixas e os picos da isoleucina e do triptofano saíram praticamente juntos um do outro, a sua correta integração por vezes foi difícil, o que pode explicar algumas desigualdades.

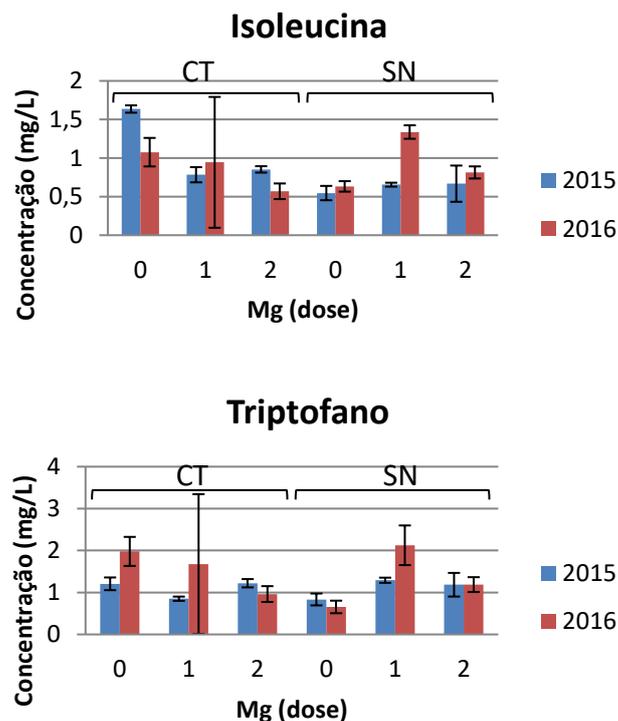


Figura 21. Gráficos comparativos das concentrações de isoleucina e triptofano nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

Os teores de isoleucina, nos vinhos analisados, variaram entre 0,55 e 1,64 mg/L. (T. Garde-Cerdán et al. 2017) refere valores entre 3,96 e 4,59 mg/L.

(Alañón et al. 2017) menciona teores de triptofano que variam entre 1,6 e 2,8 mg/L, indo de encontro aos valores observados nos vinhos estudados, que variaram entre 0,66 e 2,13 mg/L.

Na **figura 22** estão presentes os gráficos com as diferenças das concentrações dos aminoácidos leucina, fenilalanina, ornitina e lisina. Pode-se constatar que no geral, para estes quatro compostos, não houve diferenças significativas das suas

concentrações comparando as amostras dos dois anos do ensaio e as várias doses de Mg. Para os dois tipos de tratamentos (CT e SN), como para vários aminoácidos anteriormente abordados, a maior diferença averiguou-se nas amostras do tratamento CT (com P, K, Ca), sem nenhuma dose de Mg, do ensaio de 2015.

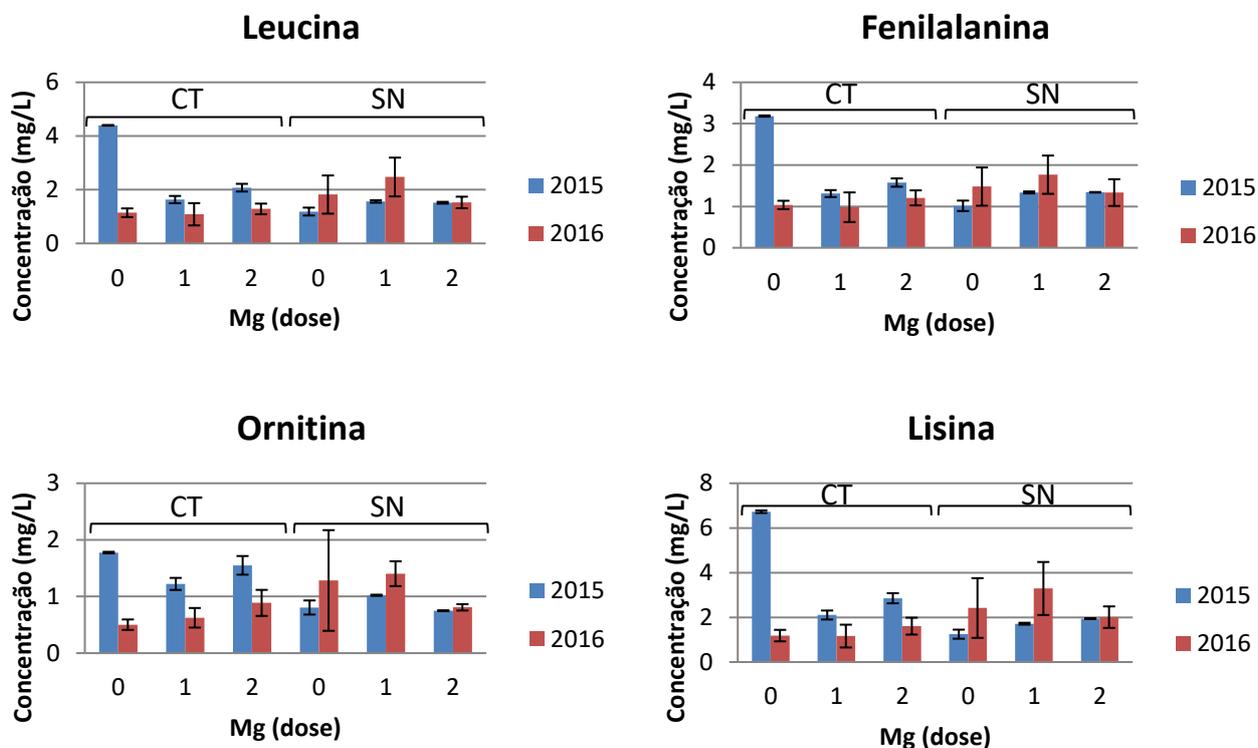


Figura 22. Gráficos comparativos das concentrações de leucina, fenilalanina, ornitina e lisina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

Para os vinhos estudados, os valores de leucina encontraram-se entre 1,09 e 4,39 mg/L. (Alañón et al. 2017) menciona teores deste aminoácido a variar entre 4,22 e 9,40 mg/L.

Os teores de fenilalanina, nas vinificações analisadas, variaram entre 0,98 e 3,18 mg/L, não diferindo dos valores obtidos no estudo de (Malec et al. 2017), que se encontraram entre 2,55 e 5,20 mg/L.

(Tessarín et al. 2016) refere teores de ornitina entre 1,19 e 1,54 mg/L. No presente estudo, os vinhos apresentaram valores de ornitina a variar entre 0,50 e 1,78 mg/L.

Os valores de lisina encontraram-se entre 1,16 e 6,73 mg/L. (López et al. 2012) menciona teores que variam entre 0,8 e 2,9 mg/L, enquanto que no estudo feito por (Malec et al. 2017) se obteve valores entre 4,5 e 8,9 mg/L.

5.2.3. Quantificação das aminas biogénicas nos vinhos

Assim como para os aminoácidos, a quantificação de cada amina biogénica foi efetuada através das retas de calibração de cada uma delas, elaboradas a partir de padrões com concentrações conhecidas dos mesmos.

No **quadro 6** estão apresentados os tempos de retenção de cada amina biogénica assim como a gama de concentrações dos padrões utilizados, e também a equação da reta obtida para cada composto, utilizada para o cálculo das concentrações nas amostras, e o respetivo coeficiente de correlação (R^2).

Quadro 6. Tempo de retenção, equação da reta e gama de concentração de cada amina biogénica.

Amina Biogénica	Tempo de retenção (min) ± DP	Equação da reta ($y = mx + b$)	R^2	Gama concentração (mg/L)
Histamina	41,57 ± 0,07	$y = 0,023x - 0,0162$	0,9952	2,10 - 16,8
Agmatina	44,71 ± 0,06	$y = 0,0702x - 0,0336$	0,9877	2,34 - 18,74
Espermidina	68,34 ± 0,01	$y = 0,0055x - 0,0012$	0,9966	0,82 - 6,54
Tiramina	69,57 ± 0,01	$y = 0,1522x - 0,0873$	0,9919	1,41 - 11,27
Putrescina	72,01 ± 0,01	$y = 0,2025x + 0,0154$	0,9934	1,85 - 14,80
Triptamina	72,60 ± 0,01	$y = 0,1159x - 0,0164$	0,9938	1,30 - 10,4
Cadaverina	73,06 ± 0,01	$y = 0,2019x + 0,4252$	0,9781	3,08 - 24,67
Feniletilamina	73,52 ± 0,01	$y = 0,1177x - 0,0118$	0,9938	0,85 - 6,80

Após a quantificação, e para cada amina, construiu-se um gráfico ilustrativo, a fim de comparar os resultados e verificar possíveis diferenças entre as amostras dos ensaios.

Também para as aminas biogénicas as concentrações foram reduzidas e inclusive não se conseguiu a quantificação de uma delas.

Analisando as aminas histamina, agmatina, espermidina e putrescina, estas tiveram a mesma tendência de resultados, como se pode observar pela **figura 23**. Tal como nos aminoácidos, também estes compostos tiveram as suas maiores concentrações nas amostras do tratamento CT (com P, K, Ca), sem nenhuma dose de

Mg, no ensaio de 2015. Verifica-se ainda um ligeiro aumento das concentrações destas aminas no tratamento SN (sem P, K, Ca), com doses 0 e 1 de Mg, no ensaio de 2016, quando comparando com o ensaio de 2015. Esta diferença é mais notória no caso da agmatina e da putrescina.

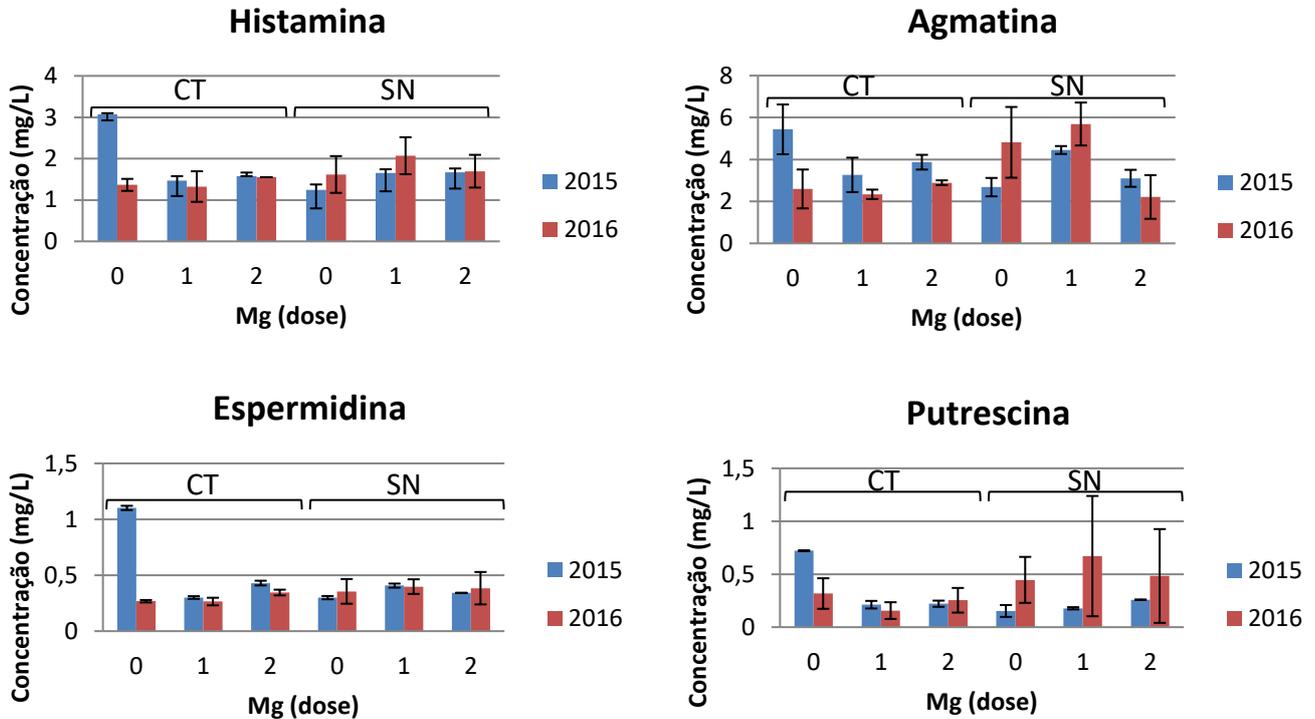


Figura 23. Gráficos comparativos das concentrações de histamina, agmatina, espermidina e putrescina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

Os valores de histamina, nos vinhos estudados, variaram entre 1,24 e 3,07 mg/L. Um estudo feito por (Manetta et al. 2016) refere teores desta amina entre 1,5 e 2,7 mg/L, enquanto que (Alañón et al. 2017) menciona valores que variam entre 1,27 e 2,44 mg/L.

A agmatina registou teores entre 2,21 e 5,69 mg/L, no presente estudo. (Malec et al. 2017) menciona valores entre 16,0 e 58,9 mg/L, num estudo em que detetou os compostos por LC-MS.

(Tuberoso et al. 2017) refere teores de espermidina que variam entre 1,8 e 2,4 mg/L. Nos vinhos analisados, os valores encontraram-se entre 0,26 e 1,10 mg/L.

Os valores de putrescina, no presente estudo, variaram entre 0,15 e 0,72 mg/L. (Alañón et al. 2017) menciona teores desta amina entre 0,13 e 7,9 mg/L.

Relativamente à tiramina, triptamina e feniletilamina, as concentrações destes três compostos não se alteraram praticamente em todas as amostras analisadas, como se pode constatar pela **figura 24**.

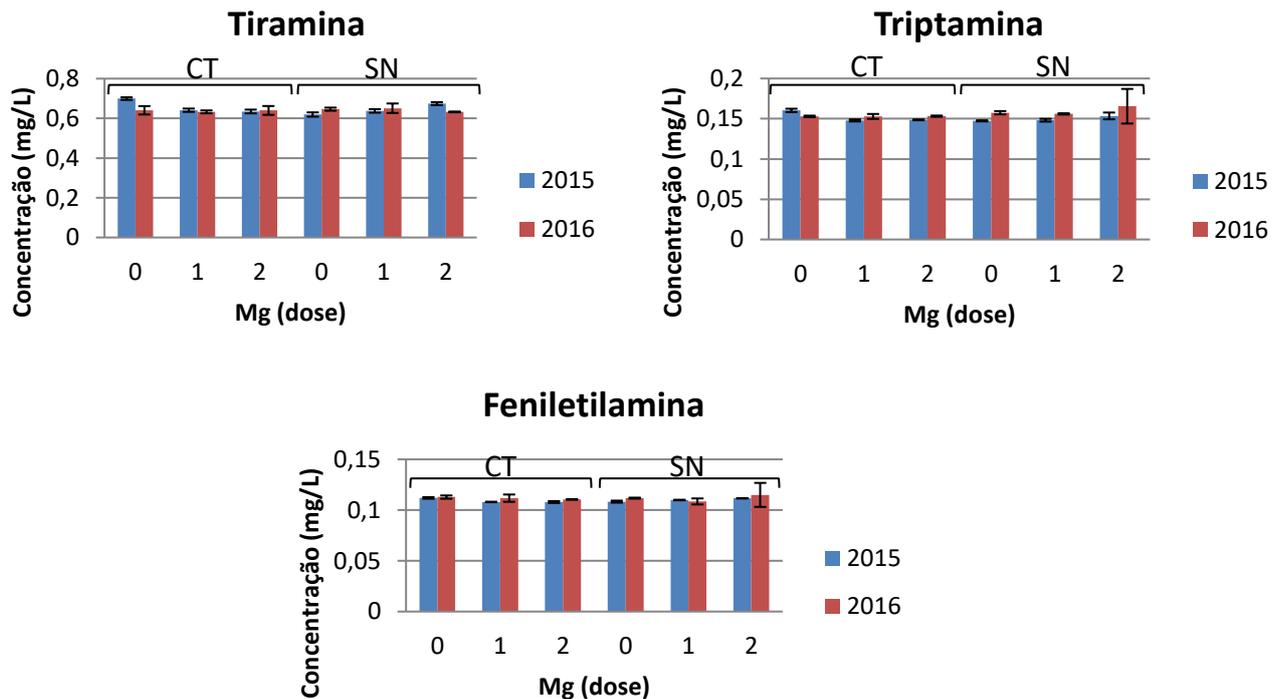


Figura 24. Gráficos comparativos das concentrações de tiramina, triptamina e feniletilamina nas amostras dos ensaios de 2015 e 2016, nos dois tipos de tratamentos (CT e SN) e nas três doses de Mg.

As vinificações analisadas apresentaram valores de tiramina entre 0,61 e 0,69 mg/L. (Manetta et al. 2016) refere teores que variam entre 2,1 e 3,5 mg/L.

(Malec et al. 2017) obteve valores de triptamina entre 0,44 e 1,44 mg/L. No presente estudo, os teores desta amina encontraram-se entre 0,14 e 0,17 mg/L.

A fenietilamina, nos vinhos estudados, registou valores entre 0,10 e 0,11 mg/L, não muitos distintos aos que (Alañón et al. 2017) menciona no seu estudo, que se encontraram entre 0,05 e 0,5 mg/L.

Em todas amostras dos ensaios, não foi possível quantificar a cadaverina. O motivo para tal pode ser a baixa concentração deste composto nas amostras de vinificação.

5.2.4. Teor total de aminoácidos e amins biogénicas nos vinhos

O quadro seguinte (**quadro 7**) mostra o teor total dos aminoácidos e das amins biogénicas estudados, para as amostras dos vários tratamentos do ensaio.

Quadro 7. Teor total de aminoácidos e de amins biogénicas nas amostras do ensaio (média \pm DP, mg/L).

Amostras	Total AA (sem prolina)	Total AA	Total AB
CT0 2015	107,8 \pm 1,10	694,5 \pm 5,33	11,3 \pm 1,24
CT1 2015	45,64 \pm 4,56	290,7 \pm 2,67	6,14 \pm 0,99
CT2 2015	53,96 \pm 3,95	403,6 \pm 43,28	6,99 \pm 0,21
SN0 2015	37,00 \pm 6,34	284,3 \pm 93,09	5,25 \pm 0,66
SN1 2015	52,12 \pm 2,10	515,6 \pm 11,84	7,59 \pm 0,31
SN2 2015	56,40 \pm 2,14	492,1 \pm 25,93	6,31 \pm 0,49
CT0 2016	39,50 \pm 2,83	280,7 \pm 34,61	5,45 \pm 0,67
CT1 2016	36,28 \pm 15,81	279,6 \pm 179,2	4,98 \pm 0,27
CT2 2016	47,99 \pm 6,57	330,1 \pm 29,83	5,95 \pm 0,05
SN0 2016	51,95 \pm 18,52	434,4 \pm 255,5	8,15 \pm 2,45
SN1 2016	72,44 \pm 17,51	565,9 \pm 240,1	9,75 \pm 2,08
SN2 2016	51,54 \pm 11,55	387,9 \pm 141,9	5,69 \pm 2,06

Em termos gerais, o teor total de aminoácidos nos vinhos variou entre 279,6 e 694,5 mg/L, sendo o tratamento CT0 2015 (com P, K, Ca e sem Mg) o que mostrou teores mais elevados, o que é consistente com a análise feita anteriormente, para cada aminoácido individual. (Arrieta and Prats-Moya 2012) refere teores totais de aminoácidos entre 126,0 e 484,9 mg/L enquanto que (Alañón et al. 2017) menciona valores entre 627,0 e 857,6 mg/L.

Comparando os valores totais de aminoácidos sem a prolina e com esta, verifica-se, mais uma vez, que este aminoácido é o que possui concentrações mais elevados comparativamente aos restantes. A razão para tal é o facto de a prolina ser o único aminoácido que não é utilizado pelas leveduras durante a fermentação, sendo o aminoácido predominante no vinho.

O teor total em aminos biogénicas nos vinhos variou entre 4,98 e 11,3 mg/L, sendo o valor mais elevado registado, mais uma vez, no tratamento CT0 2015 (com P, K, Ca e sem Mg). (Tuberoso et al. 2017) observou valores totais de aminos biogénicas entre 11,2 e 32,3 mg/L. Já (Alañón et al. 2017) refere teores que variam entre 7,14 e 37,42mg/L. Porém, o facto de o teor em aminos biogénicas ser baixo é um bom indicativo de qualidade para estes vinhos.

6. Conclusão

Este trabalho tinha como objetivo principal avaliar a influência da aplicação de magnésio no solo, no perfil de aminoácidos de vinhos tintos e também no seu teor em amins biogénicas.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que em todas amostras de vinho, o aminoácido predominante e com concentração mais elevada foi de facto a prolina. A arginina foi um aminoácido por vezes difícil de quantificar, em muito devido ao método utilizado, o que originou algumas diferenças de concentrações nas amostras. O mesmo aconteceu com a isoleucina e triptofano, dado que os respetivos picos se encontravam muito próximos, o que dificultou a integração dos mesmos. A asparagina foi um caso singular pois na amostra do ensaio CT (com P, K, Ca) com dose 1 de Mg, do ensaio de 2015, não se conseguiu identificar. A serina, por sua vez, não foi detetada e identificada em nenhuma das amostras. Exceto os casos anteriormente referidos, os restantes aminoácidos tiveram o mesmo tipo de resultados nas amostras de vinho. Regra geral, as amostras do tratamento CT (com P, K, Ca), sem nenhuma dose de Mg, do ensaio de 2015, foram as que tiveram as maiores concentrações dos aminoácidos. Em alguns compostos foi ainda possível verificar que nas amostras dos tratamentos SN (sem P, K, Ca) as concentrações eram um pouco superiores às amostras do tratamento CT (com P, K, Ca), principalmente para dose 1 de Mg e no ensaio de 2016. A tirosina, a cisteína e a metionina foram os aminoácidos que tiveram menos oscilações de concentrações entre as amostras.

A composição dos aminoácidos no vinho depende de uma série de factores, incluindo a própria casta, a região e condições climáticas, práticas vitícolas como a fertilização, o grau de maturação da uva e as técnicas de vinificação utilizadas. A técnica analítica usada para a sua quantificação também tem a sua influência. Assim, o teor em aminoácidos difere sempre de vinho para vinho, não havendo valores estipulados.

Nos vinhos em estudo, o teor total de aminoácidos apresentou valores dentro da gama de valores encontrados na literatura.

Em relação às aminas biogénicas, dado que são compostos que podem ser nocivos para saúde humana quando presentes em certas concentrações, é sempre importante monitorizar o seu teor nos vinhos. Nas amostras estudadas, as suas concentrações foram, no geral, reduzidas e a cadaverina não foi sequer possível quantificar, o que demonstra que as amostras eram pobres quanto a esse composto. Relativamente às variações de concentrações destes compostos nas amostras, os resultados foram similares aos dos aminoácidos. A tiramina, a triptamina e a feniletilamina não possuíram variações de concentrações nas amostras. No caso da histamina, da agmatina, da espermidina e da putrescina, novamente as amostras do tratamento CT (com P, K, Ca), sem nenhuma dose de Mg, do ensaio de 2015, foram as que apresentaram concentrações maiores. A agmatina e a putrescina ainda revelaram concentrações ligeiramente superiores nas amostras dos tratamentos SN (sem P, K, Ca) comparativamente com as amostras do tratamento CT (com P, K, Ca), principalmente com dose 1 de Mg e diferença mais notória no ensaio de 2016.

As aminas podem ser formadas na fermentação alcoólica ou malolática, a partir da descarboxilação de aminoácidos. O seu teor nos vinhos depende das condições de fermentação e de possíveis contaminações microbianas, sendo a sua concentração no geral, no vinho, baixa comparativamente a outros alimentos.

Em termos de teores totais de aminas biogénicas, os valores encontrados nos vinhos não foram elevados e foram de encontro aos observados na literatura.

Em conclusão, os resultados não mostraram, estatisticamente, diferenças significativas, quando comparados os dois anos do ensaio, os dois tipos de tratamentos (CT e SN) e as várias doses de Mg, o que indica que a aplicação de Mg no solo, quer aplicado só ou em conjunto com outros nutrientes (P, K, Ca), parece não interferir com o teor em aminoácidos e aminas biogénicas, nos vinhos tintos.

7. Limitações e perspectivas futuras

As limitações do presente estudo foram impostas pelo curto período de tempo disponível para a realização do mesmo, uma vez que foi efetuado apenas num semestre. Este facto condicionou o tempo de otimização do método utilizado para a identificação dos compostos e também o número de réplicas das amostras, uma vez que cada análise de HPLC tinha a duração de 90 minutos.

Uma vez que, na literatura, não se encontra estudos desta índole, não foi possível fazer uma comparação de resultados. Era interessante repetir o estudo, a longo prazo, com mais réplicas das amostras, a fim de se obter mais resultados para posterior e possível comparação, e fazer a avaliação do teor em aminoácidos nos mostos em vez de nos vinhos, ou como complemento, de forma a eliminar mais um fator de variação.

8. Referências Bibliográficas

- Alañón, M.E. et al. 2017. "Alternative Amendment for Vineyards from by-Products of Pyro-Bituminous Shale: Effect on Wine Amino Acids and Biogenic Amines." *Food Research International* 101(April): 239–48.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996917305653>.
- Anacleto, Sara. "Implementação e validação de um método de ensaio para análise de cianotoxinas em águas por HPLC-DAD e UPLC-MS/MS." Faculdade de Ciências de Tecnologias, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.
- Ancín-Azpilicueta, C, R Nieto-Rojo, and J Gómez-Cordón. 2011. "Influence of Fertilisation with Foliar Urea on the Content of Amines in Wine." *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 28(7): 877–84.
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79960339647&partnerID=40&md5=00f4cd263112d84a08e47f2261b25db2>.
- Arrieta, Marina Patricia, and María Soledad Prats-Moya. 2012. "Free Amino Acids and Biogenic Amines in Alicante Monastrell Wines." *Food Chemistry* 135(3): 1511–19.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.008>.
- Arrobas, Margarida et al. 2014. "Guidelines for Fertilizer Use in Vineyards Based on Nutrient Content of Grapevine Parts." *Scientia Horticulturae* 172: 191–98.
- Bakhshandeh, Esmail, Hemmatollah Pirdashti, and Khadijeh Shahsavarpour Lendeh. 2017. "Phosphate and Potassium-Solubilizing Bacteria Effect on the Growth of Rice." *Ecological Engineering* 103: 164–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.03.008>.
- Baldi, E. et al. 2017. "Effect of Post-Bloom Foliar Nitrogen Application on Vines under Two Level of Soil Fertilization in Increasing Bud Fertility of 'Trebiano Romagnolo' (Vitis Vinifera L.) Vine." *Scientia Horticulturae* 218: 117–24.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.017>.
- Ban, Eunmi, Young Sook Yoo, and Eun Joo Song. 2015. "Analysis and Applications of Nanoparticles in Capillary Electrophoresis." *Talanta* 141: 15–20.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.020>.
- Barrado, E., J. A. Rodriguez, and Y. Castrillejo. 2009. "Determination of Primary Amino Acids in Wines by High Performance Liquid Magneto-Chromatography." *Talanta* 78(3): 672–75.
- Blanchet, Guillaume et al. 2017. "Spatial Variability of Potassium in Agricultural Soils of the

- Canton of Fribourg, Switzerland." *Geoderma* 290: 107–21.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.12.002>.
- Bravo, S. et al. 2017. "Influence of the Soil pH in the Uptake and Bioaccumulation of Heavy Metals (Fe, Zn, Cu, Pb and Mn) and Other Elements (Ca, K, Al, Sr and Ba) in Vine Leaves, Castilla-La Mancha (Spain)." *Journal of Geochemical Exploration* 174: 79–83.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2015.12.012>.
- Burin, Vívian Maria, Vinícius Caliari, and Marilde T. Bordignon-Luiz. 2016. "Nitrogen Compounds in Must and Volatile Profile of White Wine: Influence of Clarification Process before Alcoholic Fermentation." *Food Chemistry* 202: 417–25.
- Callejón, R. M., A. M. Troncoso, and M. L. Morales. 2010. "Determination of Amino Acids in Grape-Derived Products: A Review." *Talanta* 81(4–5): 1143–52.
- Campbell, Iain. 2017. "Macronutrients, Minerals, Vitamins and Energy." *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 18(3): 141–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpaic.2016.11.014>.
- Casalta, Erick, Jean Marie Sablayrolles, and Jean Michel Salmon. 2013. "Comparison of Different Methods for the Determination of Assimilable Nitrogen in Grape Musts." *LWT - Food Science and Technology* 54(1): 271–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.009>.
- Cole, Janet C. et al. 2016. "Nitrogen, Phosphorus, Calcium, and Magnesium Applied Individually or as a Slow Release or Controlled Release Fertilizer Increase Growth and Yield and Affect Macronutrient and Micronutrient Concentration and Content of Field-Grown Tomato Plants." *Scientia Horticulturae* 211: 420–30.
- Conde, Carlos et al. 2007. "Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality." *Food* 1: 1–22. <http://hdl.handle.net/1822/6820>.
- Costa, Joaquim Botelho da. *Caracterização e Constituição do Solo*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2011.
- Costantini, Edoardo A C, Pierluigi Bucelli, and Simone Priori. 2012. "Quaternary Landscape History Determines the Soil Functional Characters of Terroir." *Quaternary International* 265: 63–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.quaint.2011.08.021>.
- D. Voet, J. Voet, C. Pratt. *Fundamentals of Biochemistry - Life at the molecular level*. John Wiley & Sons, Inc, 2013.
- Delgado, Rubén, Pedro Martín, María Del Álamo, and María Rosa González. 2004. "Changes in the Phenolic Composition of Grape Berries during Ripening in Relation to Vineyard

Nitrogen and Potassium Fertilisation Rates.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(7): 623–30.

Duchowicz, Pablo R., Miguel A. Giraudo, Eduardo A. Castro, and Alicia B. Pomilio. 2013. “Amino Acid Profiles and Quantitative Structure-Property Relationship Models as Markers for Merlot and Torrontés Wines.” *Food Chemistry* 140(1–2): 210–16.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.064>.

Farzadfar, Soudeh, Fatemeh Zarinkamar, and Mostafa Hojati. 2017. “Magnesium and Manganese Affect Photosynthesis, Essential Oil Composition and Phenolic Compounds of *Tanacetum Parthenium*.” *Plant Physiology and Biochemistry* 112: 207–17.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.002>.

Galievsky, Victor A., Alexander S. Stasheuski, and Sergey N. Krylov. 2016. “‘Getting the Best Sensitivity from on-Capillary Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis’ – A Tutorial.” *Analytica Chimica Acta* 935: 58–81.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.015>.

Garde-Cerdán, T. et al. 2014. “Study of the Effects of Proline, Phenylalanine, and Urea Foliar Application to Tempranillo Vineyards on Grape Amino Acid Content. Comparison with Commercial Nitrogen Fertilisers.” *Food Chemistry* 163: 136–41.

Garde-Cerdán, Teresa et al. 2017. “Impact of Phenylalanine and Urea Applications to Tempranillo and Monastrell Vineyards on Grape Amino Acid Content during Two Consecutive Vintages.” *Food Research International* (June).

Gerendás, Jóska, and Hendrik Führs. 2013. “The Significance of Magnesium for Crop Quality.” *Plant and Soil* 368(1–2): 101–28.

Gómez-Alonso, S., I. Hermosín-Gutiérrez, and E. García-Romero. 2007. “Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines , Amino Acids , and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples.” : 608–13.

Guo, Wanli, Hussain Nazim, Zongsuo Liang, and Dongfeng Yang. 2016. “Magnesium Deficiency in Plants: An Urgent Problem.” *The Crop Journal* 4(2): 83–91.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221451411500121X>.

Gutiérrez-Gamboa, Gastón et al. 2017. “Foliar Nitrogen Application in Cabernet Sauvignon Vines: Effects on Wine Flavonoid and Amino Acid Content.” *Food Research International* 96: 46–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.025>.

Hänsch, Robert, and Ralf R. Mendel. 2009. “Physiological Functions of Mineral Micronutrients

- (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl)." *Current Opinion in Plant Biology* 12(3): 259–66.
- Herbert, P et al. 2006. "Journal of Environmental Science and Health , Part B : Pesticides , Food Contaminants , and Agricultural Wastes Relationship Between Biogenic Amines and Free Amino Acid Contents of Wines and Musts from Alentejo (Portugal)." (January): 37–41.
- Herbert, P., L. Santos, and A. Alves. 2001. "Simultaneous Quantification of Primary , Secondary Amino Acids , and Biogenic Amines in Musts and Wines Using OPA / 3-MPA / FMOC-Cl ABSTRACT : Free Amino Acids and Biogenic Amines Occur in Musts and Wines and Affect the Course of Fermentation." 66(9): 1319–25.
- Hosseini, Mehdi et al. 2017. "Comparison of Multiple Statistical Techniques to Predict Soil Phosphorus." *Applied Soil Ecology* 114: 123–31.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.02.011>.
- Hu, Bin et al. 2016. "Responses of Soil Phosphorus Fractions to Gap Size in a Reforested Spruce Forest." *Geoderma* 279: 61–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.05.023>.
- Ibegbulem, C. O. et al. 2013. "Total Amino Acid Profiles of Heat-Processed Fresh *Elaeis Guineensis* and *Raphia Hookeri* Wines." *Food Chemistry* 138(2–3): 1616–20.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.110>.
- Izquierdo Cañas, P. M. et al. 2008. "Amino Acids and Biogenic Amines during Spontaneous Malolactic Fermentation in Tempranillo Red Wines." *Journal of Food Composition and Analysis* 21(8): 731–35.
- Jan, Amin Ullah et al. 2017. "Potassium and Zinc Increase Tolerance to Salt Stress in Wheat (*Triticum Aestivum* L.)." *Plant Physiology and Biochemistry* 116: 139–49.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.05.008>.
- Karim, Adnan Asad et al. 2017. "Potassium Enriched Biochar Production by Thermal Plasma Processing of Banana Peduncle for Soil Application." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 123: 165–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2016.12.009>.
- Kelly, Mary T., Alain Blaise, and Michel Larroque. 2010. "Rapid Automated High Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Amino Acids and Biogenic Amines in Wine, Fruit and Honey." *Journal of Chromatography A* 1217(47): 7385–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.047>.
- Kusch, Peter. 2017. "Application of Gas Chromatography/mass Spectrometry (GC/MS) and Pyrolysis-Gas Chromatography/mass Spectrometry (Py-GC/MS) in Failure Analysis in the Automotive Industry." *Engineering Failure Analysis* (June): 0–1.

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350630716308469>.

- Laurence A. Moran, H. Robert Horton, K. Gray Scrimgeour, Marc D. Perry. *Principles of Biochemistry*. Pearson, 2012.
- Lee, Jungmin, and R. Paul Schreiner. 2010. "Free Amino Acid Profiles from 'Pinot Noir' Grapes Are Influenced by Vine N-Status and Sample Preparation Method." *Food Chemistry* 119(2): 484–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.045>.
- Lee, Jungmin, and Kerri L. Steenwerth. 2011. "Rootstock and Vineyard Floor Management Influence on 'Cabernet Sauvignon' Grape Yeast Assimilable Nitrogen (YAN)." *Food Chemistry* 127(3): 926–33.
- Likar, M. et al. 2015. "Importance of Soil and Vineyard Management in the Determination of Grapevine Mineral Composition." *Science of the Total Environment* 505: 724–31.
- López, Rosa et al. 2012. "Elaboration of Tempranillo Wines at Two Different pHs. Influence on Biogenic Amine Contents." *Food Control* 25(2): 583–90.
- Maathuis, Frans JM. 2009. "Physiological Functions of Mineral Macronutrients." *Current Opinion in Plant Biology* 12(3): 250–58.
- Magalhães, Nuno. *Tratado de Viticultura - A Videira, a Vinha e o Terroir*. Esfera Poética, 2010.
- Malec, Paige A. et al. 2017. "Determination of Amines and Phenolic Acids in Wine with Benzoyl Chloride Derivatization and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography A*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.061>.
- Manetta, Anna Chiara et al. 2016. "Evaluation of Biogenic Amines in Wine: Determination by an Improved HPLC-PDA Method." *Food Control* 62: 351–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.009>.
- Marques, Ana P., Maria C. Leitão, and Maria V. San Romão. 2008. "Biogenic Amines in Wines: Influence of Oenological Factors." *Food Chemistry* 107(2): 853–60.
- Meléndez, M. E., L. A. Sarabia, and M. C. Ortiz. 2016. "Distribution Free Methods to Model the Content of Biogenic Amines in Spanish Wines." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 155: 191–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2016.04.015>.
- Molnár-Perl, I. 2000. "Role of Chromatography in the Analysis of Sugars, Carboxylic Acids and Amino Acids in Food." *Journal of Chromatography A* 891(1): 1–32.
- Ngadze, Elizabeth, Teresa A. Coutinho, David Icishahayo, and Jacquie E. Van der Waals. 2014.

- “Effect of Calcium Soil Amendments on Phenolic Compounds and Soft Rot Resistance in Potato Tubers.” *Crop Protection* 62: 40–45.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.009>.
- Önal, Armağan. 2007. “A Review: Current Analytical Methods for the Determination of Biogenic Amines in Foods.” *Food Chemistry* 103(4): 1475–86.
- Paula, Vanessa. “Caracterização química e biológica do propólis da "Serra de Bornes" por TLC.” Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2012.
- Pérez-Álvarez, Eva P. et al. 2017. “Influence on Wine Biogenic Amine Composition of Modifications to Soil N Availability and Grapevine N by Cover Crops.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* (April).
- Piasta, Anna M. et al. 2014. “New Procedure of Selected Biogenic Amines Determination in Wine Samples by HPLC.” *Analytica Chimica Acta* 834(1): 58–66.
- Pilon-Smits, Elizabeth AH et al. 2009. “Physiological Functions of Beneficial Elements.” *Current Opinion in Plant Biology* 12(3): 267–74.
- Pinho, Ana. “Desenvolvimento de uma técnica de HPLC para a quantificação de colistina em plasma humano e a sua monitorização sérica em doentes internados no chuc.” Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.
- Porto, Helena Sofia Morgado. “HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos.” Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 2014.
- Ribéreau-Gayon, P, D Dubourdieu, Donèche, e Lonvaud. *Handbook of Enology, Volume 1 - The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu. *Handbook of Enology, Volume 2 - The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- Rocha, Tiago. “Desenvolvimento e validação de um método de HPLC-DAD-FLD para a determinação de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) em suplementos alimentares à base de plantas.” Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2015.
- Roullier-Gall, Chloé, Lemia Boutegrabet, Régis D. Gougeon, and Philippe Schmitt-Kopplin. 2014. “A Grape and Wine Chemodiversity Comparison of Different Appellations in Burgundy:

- Vintage vs Terroir Effects." *Food Chemistry* 152: 100–107.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.056>.
- Sabir, Ali et al. 2014. "Vine Growth, Yield, Berry Quality Attributes and Leaf Nutrient Content of Grapevines as Influenced by Seaweed Extract (*Ascophyllum Nodosum*) and Nanosize Fertilizer Pulverizations." *Scientia Horticulturae* 175: 1–8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.021>.
- Sá, Marta. "Avaliação do papel dos ácidos salicílico, abscísico e jasmónico na interacção *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix*: Implementação de um método de análise." Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- Sánchez-Gómez, R. et al. 2016. "Vine-Shoot Waste Aqueous Extract Applied as Foliar Fertilizer to Grapevines: Effect on Amino Acids and Fermentative Volatile Content." *Food Chemistry* 197: 132–40.
- Schmitt, Anne Désirée et al. 2017. "Calcium Biogeochemical Cycle at the Beech Tree-Soil Solution Interface from the Strengbach CZO (NE France): Insights from Stable Ca and Radiogenic Sr Isotopes." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 213: 91–109.
- Sequeira, Cédric Basílio. "Análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais: aplicação de HPLC-SEC-UV-IR e língua eletrónico." Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2012.
- Silva, B M et al. 2007. "HPLC Determination of Free Amino Acids Profile of Dão Red Wine: Effect of *Dekkera Bruxellensis* Contamination." *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 30(9–10): 1371–83.
<http://dx.doi.org/10.1080/10826070701276630>.
- Silva, Liliana da. "Avaliação e validação do grau de exposição de distintos tipos de populações às fumonisinas B1 e B2: alimentos contaminados, teor na urina e relação enfianganina-esfingosina." Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.
- Silva, Patrícia Damasceno. "Determinação de Compostos Fenólicos por HPLC." Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.
- Smit, Inga et al. 2014. "Nitrogen Fertilisation Increases Biogenic Amines and Amino Acid Concentrations in *Vitis Vinifera* Var. Riesling Musts and Wines." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(10): 2064–72.
- Soufleros, E. H., E. Bouloumpasi, C. Tsarchopoulos, and C. G. Biliaderis. 2003. "Primary Amino

- Acid Profiles of Greek White Wines and Their Use in Classification according to Variety, Origin and Vintage." *Food Chemistry* 80(2): 261–73.
- Soufleros, E. H., E. Bouloumpasi, A. Zotou, and Z. Loukou. 2007. "Determination of Biogenic Amines in Greek Wines by HPLC and Ultraviolet Detection after Dansylation and Examination of Factors Affecting Their Presence and Concentration." *Food Chemistry* 101(2): 704–16.
- Tatagiba, S. D., F. M. DaMatta, and F. A. Rodrigues. 2016. "Magnesium Decreases Leaf Scald Symptoms on Rice Leaves and Preserves Their Photosynthetic Performance." *Plant Physiology and Biochemistry* 108: 49–56.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.002>.
- Tessarín, Paola et al. 2016. "Influence of Canopy-Applied Chitosan on the Composition of Organic Cv. Sangiovese and Cabernet Sauvignon Berries and Wines." *Food Chemistry* 210: 512–19.
- Tian, Jihui et al. 2017. "Accumulation and Distribution of Phosphorus in the Soil Profile under Fertilized Grazed Pasture." *Agriculture, Ecosystems and Environment* 239: 228–35.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2017.01.022>.
- Tuberoso, Carlo Ignazio Giovanni et al. 2017. "Characterization, Phenolic Profile, Nitrogen Compounds and Antioxidant Activity of Carignano Wines." *Journal of Food Composition and Analysis* 58: 60–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.017>.
- Tuberoso, Carlo Ignazio Giovanni, Francesca Congiu, Gabriele Serreli, and Stefano Mameli. 2015. "Determination of Dansylated Amino Acids and Biogenic Amines in Cannonau and Vermentino Wines by HPLC-FLD." *Food Chemistry* 175: 29–35.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.120>.
- Wang, Xiaochun et al. 2017. "Contribution of Interspecific Interactions and Phosphorus Application to Increasing Soil Phosphorus Availability in Relay Intercropping Systems." *Field Crops Research* 204: 12–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2016.12.020>.
- Wang, Ya Qin et al. 2014. "Rapid HPLC Analysis of Amino Acids and Biogenic Amines in Wines during Fermentation and Evaluation of Matrix Effect." *Food Chemistry* 163: 6–15.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.064>.
- Waters. 2017. http://www.waters.com/waters/pt_PT/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt_PT (acedido em 2017).

Yan, Xiao et al. 2017. "Phosphorus Fractions and Sorption Characteristics in a Subtropical Paddy Soil as Influenced by Fertilizer Sources." *Geoderma* 295: 80–85.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.02.012>.

Yang, Mingjun et al. 2017. "Advances in Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Techniques for the Investigation of Clathrate Hydrates." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*

74(November 2015): 1346–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.161>.