

**ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS LIVRES DOS VINHOS  
POR CROMATOGRÁFIA EM FASE GASOSA <sup>(1)</sup>**

POR

**LUÍS CAMPOS**

Cadeira de Química Geral e Análise  
Instituto Superior de Agronomia

E

**MICHEL SEVERIN**

Cadeira de Química Geral e Orgânica  
Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat, Gembloux

**INTRODUÇÃO**

É bem conhecida a importância fundamental dos aminoácidos no metabolismo das plantas. Enquanto que os animais dependem de um fornecimento alimentar de certos aminoácidos «essenciais», os vegetais superiores e alguns microorganismos são capazes de sintetizar todos os aminoácidos de que necessitam para a formação de proteínas.

Importantes trabalhos permitiram, no decurso dos últimos anos, a descoberta no reino vegetal de novos aminoácidos livres ou não proteicos, os quais não são geralmente constituintes principais das proteínas, e cuja biossíntese se pode comparar à dos alcalóides.

A introdução das técnicas cromatográficas marcou o início de uma revolução no domínio da química orgânica das substâncias naturais da bioquímica vegetal.

<sup>(1)</sup> Trabalho efectuado no Laboratório de Química Orgânica da «Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat», Gembloux, Bélgica, e subsidiado pelo Centro Nacional de Estudos Vitivinícolas.

Recebido para publicação em 5/6/1970.

A técnica da cromatografia de partição, de Martin e Synge, foi aplicada pela primeira vez em 1941, precisamente à separação de aminoácidos, e DENT, STEPKA & STEWARD (1947) aplicaram a cromatografia bidimensional em papel ao estudo dos compostos azotados solúveis dos organismos vegetais. A cromatografia em coluna de resina permutadora de iões, introduzida por STEIN & MOORE (1948), permitiu separar e purificar os aminoácidos e proceder ao doseamento dos 20 aminoácidos das proteínas.

A estas técnicas seguiu-se a electroforese e a cromatoelectroforese em papel — LEDERER (1955), GEHRLAXHE *et al.* (1954 e 1957), GMELIN (1959) —, a cromatografia e electroforese em camada delgada e a electroforese contínua em papel.

O rápido desenvolvimento registado ultimamente pela cromatografia em fase gasosa fez que esta técnica se apresentasse como o passo seguinte na evolução dos métodos para a determinação dos aminoácidos.

O nosso trabalho tem por objectivo a análise dos aminoácidos livres dos vinhos por cromatografia em fase gasosa, e o estabelecimento da correlação entre esta técnica e a cromatografia em papel, com o fim de permitir a realização mais rápida e eficaz de experiências que interessem aos enólogos, relacionadas com a presença nas uvas, nos mostos e nos vinhos de aminoácidos correntes em quantidades variáveis, ou de aminoácidos especiais, característicos e diferenciadores.

## I — GENERALIDADES

### 1. Estrutura dos aminoácidos livres

Os novos aminoácidos são na sua maioria homólogos ou derivados dos aminoácidos das proteínas. Encontram-se no entanto, nesses compostos, estruturas particulares raras nas substâncias naturais (estrutura ciclopropanóica no ácido 1. aminociclopropano 1. carboxílico, estrutura azetidínica no ácido azetidino 2. carboxílico e nas penicilinas). Assinale-se também que o grupo metilénico da hipoglicina «A» do ácido  $\gamma$ -metilglutâmico e da  $\gamma$ -metilenglutamina não se encontra nas estruturas dos aminoácidos proteicos, e que os aminoácidos livres insaturados são muito raros, só muito recentemente se tendo isolado

os primeiros ácidos monocarboxílicos com um radical «R» insaturado (DARDENNE & CASIMIR, 1968).

### 2. Metabolismo dos aminoácidos

Os aminoácidos proteicos desempenham um papel fundamental no metabolismo do azoto.

Quanto à importância dos aminoácidos livres na biossíntese e na degradação das substâncias azotadas, ela não é ainda bem conhecida, mas é possível que alguns dos componentes deste grupo de novas substâncias intervenha em várias fases do metabolismo celular.

Assim, FOWDEN mostrou que a homoserina é um intermediário da produção de treonina e de metionina a partir do ácido aspártico (1962a), que a  $\beta$ -alanina pode formar-se a partir da descarboxilação do ácido aspártico (1962a), que os ácidos  $\alpha$ -aminoadípico, pipercolico e  $\alpha$ - $\epsilon$ -diaminopimélico se encontram implicados na degradação da lisina (1964). Sabe-se igualmente que existem ligações estreitas entre os novos aminoácidos e os  $\alpha$ -cetoácidos, portanto também com os fenómenos de transaminação (FOWDEN & WEBB, 1955).

### 3. Distribuição dos aminoácidos livres

A repartição dos aminoácidos livres nos diferentes meios vegetais é muito variável. Alguns deles encontram-se em grande número de espécies, como o ácido  $\alpha$ -aminobutírico e a  $\beta$ -alanina, enquanto que a repartição de outros é limitada e característica. Podem encontrar-se presentes em concentrações elevadas ou em vestígios e a sua concentração pode mesmo variar, em cada planta, de órgão para órgão e conforme o estado de germinação.

### 4. Importância dos aminoácidos livres, e da sua análise por cromatografia em fase gasosa

Estão ainda a ser estudados, através de grande número de trabalhos em curso, resultados que permitirão concluir da importância biológica destes compostos.

Contudo, a presença de aminoácidos livres permitiu já resolver problemas importantes de diferenciação de espécies, e sugere continuamente a realização de novas experiências.

Do ponto de vista botânico, é de crer que espécies vizinhas apresentem semelhanças na sua composição qualitativa em aminoácidos, e que alguns géneros ou espécies se diferenciem entre si pela presença de um aminoácido especial ou de um grupo de novas substâncias azotadas naturais. Por exemplo, a presença do ácido piperólico no género *Vigna* permite diferenciá-la do género *Phaseolus* (CASIMIR *et al.*, 1966), e BELL (1962) mostrou, estudando a repartição dos aminoácidos de 49 espécies de *Lathyrus* e de várias espécies de *Vicia*, que o género podia ser dividido em vários grupos de espécies, caracterizada cada uma delas por um conjunto de vários compostos. Esta classificação em grupos por via química corresponde à classificação baseada em estudos citológicos e nos critérios clássicos de taxonomia.

Já se acompanhou, por exemplo, a maturação das uvas estudando a repartição dos seus aminoácidos (SILBER, 1963).

BELL demonstrou, na alimentação animal, o efeito tóxico de alguns aminoácidos, em particular a  $\beta$ -cianoalanina e o ácido  $\alpha$ - $\gamma$ -diaminobutírico (1963). A  $\beta$  ( $\gamma$ -glutamilamina) proprionitrilo provoca no rato deformações do esqueleto (SHILLING & STRONG, 1954).

Por outro lado, está a ser estudado o papel que poderão desempenhar os novos aminoácidos como inibidores dos enzimas.

A análise dos aminoácidos livres e proteicos por cromatografia em fase gasosa, por se revelar um processo, além de mais rápido, muito sensível, permitindo a determinação de quantidades mínimas daqueles compostos que não seria possível realizar por outras técnicas de análise, constitui uma contribuição importante para os progressos da genética, bioquímica das proteínas, ciências agrícolas, nutrição, investigação médica, etc.

## II — A ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

### 1. Considerações gerais

As dificuldades da análise dos aminoácidos por cromatografia em fase gasosa residem nas características específicas destes compostos — fraca volatilidade, polaridade devida aos grupos  $-\text{COOH}$  e  $-\text{NH}_2$ , grande variedade de estruturas e degradação a temperatura elevada.

Torna-se, portanto, necessária a transformação dos aminoácidos em derivados voláteis estáveis a temperaturas elevadas. Devido às grandes diferenças de estrutura que podem apresentar-se (aminoácidos policarboxílicos, poliaminados, hidroxilados, cíclicos, etc.), a escolha do derivado torna-se difícil, e apesar de terem sido publicados sobre o assunto numerosos trabalhos, vários autores continuam a estudar a questão.

Os derivados estudados até agora podem dividir-se em quatro grupos principais: os obtidos por degradação dos aminoácidos, os formados por ciclização, os formados por modificação do grupo aminado ou carboxílico, e os duplos derivados. São estes últimos aqueles que melhor respondem às condições de análise.

### 2. Resumo histórico

Desde 1956 grande número de derivados têm sido investigados tendo em vista a sua utilização na separação dos aminoácidos por cromatografia em fase gasosa.

As primeiras separações foram realizadas por HUNTER, DIMICK & CORSE (1956), que transformaram os aminoácidos em aldeídos pela acção da ninidrina. BAYER, REUTHER & BORN (1957) separaram os ésteres metílicos de alguns aminoácidos simples utilizando uma coluna de sílica e caproato de sódio. No ano seguinte, BAYER (1958) obteve separações de ésteres N-trifluoroacetilados e YOUNGS (1959) efectuou a separação dos ésteres n-butílicos N-acetilados da glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina e prolina.

A partir de então muitos trabalhos têm sido dedicados à análise dos aminoácidos por cromatografia em fase gasosa. DARBRE *et al.* (1965a, 1965b, 1967) e BLAU *et al.* (1963, 1965a,

1965b, 1967) estudaram os ésteres amílicos N-trifluoroacetilados, e RÜHLMANN *et al.* (1961, 1963, 1965) os ésteres trimetilsilílicos dos ácidos N-trimetilsililados. Merecem destaque os trabalhos de GEHRKE, que aperfeiçoou o emprego dos ésteres n-butilílicos N-trifluoroacetilados.

Os trabalhos publicados actualmente visam o aperfeiçoamento dos métodos já descritos na literatura, com o objectivo sobretudo da análise quantitativa.

### 3. Os ésteres butílicos dos aminoácidos N-trifluoroacetilados. Bibliografia

Entre os métodos utilizados para a obtenção de derivados mais voláteis que permitam a análise dos aminoácidos por cromatografia em fase gasosa, os mais estudados têm sido aqueles através dos quais se bloqueiam simultaneamente os grupos  $-NH_2$  e  $-COOH$ .

O método da N-trifluoroacetilação foi introduzido na esterificação dos aminoácidos porque os ésteres assim obtidos possuem um elevado grau de volatilidade e podem portanto ser rapidamente separados por cromatografia em fase gasosa.

Foi ETTRE (1962) quem separou pela primeira vez 10 aminoácidos sob a forma de ésteres butílicos N-trifluoroacetilados (TAB) utilizando colunas capilares de 21 a 45 m contendo QF-1.

ZOMZELY *et al.* (1962) separaram 19 derivados de aminoácidos proteicos.

MAKISUMI *et al.* (1963) estudaram principalmente a separação dos derivados da leucina, utilizando NPGA a 2% sobre Chromosorb W a 142°C e 181°C.

MARCUCCI *et al.* (1965) empregaram uma resina (Amberlite 15 e Dowex 50 × 4) como catalizador da esterificação pelo butanol. Compararam várias fases estacionárias e concluíram que a NPGS, EGSS-X e Carbowax 20M eram as que permitiam melhores resultados. Aplicaram o método à separação dos derivados da prolina nas proteínas.

STEFANOVIC & WALKER (1967) mostraram que a ordem de eluição dos aminoácidos depende grandemente da relação fase estacionária — suporte, devido a uma interacção dos grupos polares dos aminoácidos e os da fase estacionária, e procuraram melhorar a separação fazendo variar aquela relação. Com

base nos resultados obtidos, separaram os TAB sobre EGA 0,65% e fizeram aplicações a hidrolisados de proteínas.

Os trabalhos de PFEIFFER *et al.* (1967) tiveram por objectivo comparar as separações de ésteres amílicos, butílicos e metílicos dos aminoácidos.

O estudo mais exaustivo dos TAB foi efectuado por GEHRKE *et al.* (1965 a 1968), LAMKIN & GEHRKE (1965) e ROACH & GEHRKE (1969a e 1969b).

Os derivados foram preparados do seguinte modo: à mistura de aminoácidos juntava-se metanol contendo 1,2 meq. de HCl anidro. Após 30 minutos eliminava-se o metanol em excesso por evaporação no vácuo a 60°. Adicionava-se então uma solução de butanol-HCl e aquecia-se durante três horas a 100°C, eliminando-se depois o excesso de butanol. Os cloridratos dos ésteres eram então trifluoroacetilados por uma solução de anidrido trifluoroacético em diclorometano. Após duas horas de reacção a 25°C, o anidrido e o  $CH_2Cl_2$  eram eliminados, e dissolviam-se os ésteres butílicos N-trifluoroacetilados em  $CHCl_3$  anidro.

A transformação inicial em ésteres metílicos seguida de transesterificação pelo butanol revelou-se necessária devido à insolubilidade de alguns aminoácidos básicos no butanol.

Nestas condições, o triptofano dava origem a dois derivados (mono e diacetilado), e por outro lado a arginina convertia-se num sal trifluoroacético não volátil que se transformava parcialmente em ornitina após o início da análise.

Por estas razões, os autores introduziram algumas modificações no método de acilação inicial. Esta passou a ser efectuada a 150° durante 5 minutos, em tubo selado, devido à elevada volatilidade do anidrido trifluoroacético. Este método de acilação permite obter derivados completamente acetilados para os vinte aminoácidos das proteínas.

A injeção directa na coluna (injector de vidro) impede as degradações observadas em presença de «flash heater».

Os autores compararam diferentes fases estacionárias (poliésteres, sílica e outras) de forma a obterem uma separação completa dos vinte aminoácidos das proteínas. Como nenhuma resolvesse o problema de forma inteiramente satisfatória, foram ensaiadas fases estacionárias mistas ou em série.

Os melhores resultados foram com uma fase mista constituída por 0,75-0,25% de DEGS — EGSS-X sobre Chromo-

sorb W lavado com ácido, utilizada com programação de temperatura de 67° C a 218° C.

Foram calculadas as respostas molares relativas ao ácido glutâmico, que se revelaram reprodutíveis para os dezanove aminoácidos, e calculado o rendimento dos derivados, que se revelou ser superior a 97 %. Foi também feita a aplicação do método a hidrolizados de proteínas (glúten, K-caseína, etc.).

Após haverem constatado uma resolução incompleta dos vinte aminoácidos, GEHRKE, ZUMWALT & WALL (1968) estudaram os principais factores que influenciam a separação. Visto a presença de água provocar a hidrólise dos derivados, concluíram que se poderia melhorar a eficiência da coluna retirando toda a água do suporte, eliminando-se assim parcialmente a interacção entre o suporte e o derivado. Aqueceram portanto os suportes, e constataram uma melhoria de separação sobre as colunas cujo suporte havia sido aquecido entre 450° C e 600° C. Notaram igualmente um abaixamento das temperaturas de retenção.

Concluíram igualmente os referidos autores que a coluna de EGA sobre Chromosorb G aquecido a 600° C durante 15 horas era a que dava melhores resultados na separação de dezassete aminoácidos. Para a arginina, histidina e cistina, ensaiaram como fases estacionárias a DC-550 e OV-17, revelando-se esta última a mais eficaz. Contudo, o derivado diacetilado da histidina, pouco estável, transformava-se facilmente em monoacetilado. Uma injeção de butanol imediatamente após a injeção dos derivados no cromatógrafo permitia uma conversão quantitativa do derivado diacetilado em monoacetilado. Porém, os resultados obtidos por esta técnica dependiam de certo número de parâmetros cromatográficos e instrumentais. Por essa razão ROACH, GEHRKE & ZUMWALT (1969) introduziram três métodos diferentes para a separação e análise quantitativa da histidina. Em dois desses métodos utilizaram os derivados n-butil N-TFA: no primeiro, o derivado diacetilado é convertido em monoacetilado pela remoção do excesso de anidrido trifluoroacético; no segundo método a histidina é analisada através do seu derivado diacetilado, formado na coluna cromatográfica por injeção de 4 µl de anidrido trifluoroacético, e cromatografada sobre OV-22. E no terceiro método a histidina é convertida no deri-

vado trimetilsilílico (TMS) pela bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e cromatografado numa coluna mista de 3 % w/w de OV-7 e 1,5 % w/w de OV-22. A arginina, triptofano e cistina são também analisadas sob a forma de derivados TMS (Arg<sub>4</sub>, Tri<sub>3</sub>, Cis<sub>4</sub>) nas mesmas condições.

Finalmente GEHRKE *et al.* obtêm uma separação completa dos vinte aminoácidos, utilizando para dezasseis deles uma coluna de EGA 0,325 % sobre Chromosorb G aquecido, lavado com ácido (ou EGA 0,65 % sobre Chromosorb W 80-100 mesh lavado com ácido e aquecido a 140° C durante 12 horas) e para os quatro aminoácidos restantes, uma coluna de OV-17 1,5 % sobre Chromosorb GHT a. w.

As respostas molares relativas ao ácido glutâmico e ao padrão interno (estearato de butilo) revelaram-se satisfatórias.

HERB (1968) e GEETS (1969) consideram que a aplicação do método quantitativo de GEHRKE aos meios biológicos necessita de grandes precauções.

DEL FAVERO *et al.* (1969) estudaram os aminoácidos radioactivos e compararam as respostas molares absolutas obtidas com os TAM, TAB e TAP (derivados n-propil TFA).

Mais recentemente GEHRKE, NAKAMOTO & ZUMWALT (1969) retomaram o estudo dos ésteres trimetilsilílicos de RÜHLMANN & GIESECKE (1961) e RÜHLMANN & MICHAEL (1963 e 1965) e KLEBE *et al.* (1966), que consideram mais estáveis que os TAB.

Actualmente, outros derivados continuam a ser estudados por diferentes autores. Assim, RODA & ZAMORANI (1970) utilizam as feniltiohidantoínas trifluoroacetiladas.

### III — PARTE EXPERIMENTAL

#### 1. Estudos preliminares

##### 1.1. Protocolo dos ensaios

O objectivo da primeira parte deste nosso trabalho será testar o valor do método estudado por GEHRKE e STALLING com o objectivo da aplicação à análise dos aminoácidos livres dos vinhos. Com base nesta síntese bibliográfica que acabámos de fazer escolhemos para a realização do nosso trabalho o derivado que na altura em que o iniciámos parecia responder melhor aos

critérios de sensibilidade, rapidez e estabilidade — os ésteres n-butílicos N-trifluoroacetilados.

Estudaremos a separação, sobre diferentes colunas, de misturas complexas de aminoácidos puros, tanto aminoácidos proteicos como aminoácidos encontrados no estado livre em diversos meios biológicos. Determinaremos também as suas respostas molares, com o objectivo da aplicação do método à análise quantitativa.

### 1.2. Reagentes

O metanol, butanol e cloreto de amónio de que nos servimos provêm da firma MERCK, e o anidrido trifluoroacético da firma FLUKA (91720).

Os aminoácidos utilizados nos ensaios prévios foram fornecidos por MANN RESEARCH LABORATORIES, excepto:  $\alpha$ -amino-butírico e homoserina: NUTRITIONAL BIOCH. CORP.; norleucina, leucina e glutamina: THE BRITISH DRUG HOUSE;  $\beta$ -alanina e asparagina (E. MERCK); glutâmico (RIEDEL DE HAËN);  $\gamma$ -amino-butírico (THEODOR SCHUCHARDT); S-metilcisteína e fenilalanina (CALIFORNIA FOUNDATION FOR BIOL. RESEARCH); ácidos pipercolico e 5-OH-pipercolico e a  $\beta$ -cianoalanina (CALBIOCHEM). Os ácidos  $\gamma$ -hidroxi- $\gamma$ -metilglutâmico, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> <sup>(1)</sup>, e a  $\gamma$ -glutamyl-S-metilcisteína provêm de meios naturais e foram isolados nos laboratórios de Química Orgânica da «Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat», em Gembloux.

O HCl puro anidro foi produzido no laboratório num aparelho de Kipp pela acção do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre o NH<sub>4</sub>Cl, tendo sido secado sobre ácido sulfúrico e Sikkon azul (Fluka).

Prepararam-se as soluções de metanol-HCl e butanol-HCl 1,25 N fazendo borbulhar o HCl gasoso no metanol (butanol) através de um tubo capilar, até a solução conter  $\approx$  5,0 g HCl/100 ml. Procedeu-se seguidamente à titulação com soda cáustica 1 N em presença de fenolftaleína para determinar a concentração em HCl.

O estearato de butilo — padrão interno — preparámo-lo segundo o método de VOGEL (1962) para a preparação do acetato de butilo.

<sup>(1)</sup> G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> — dois diestereoisómeros do ácido  $\beta$ -hidroxi- $\gamma$ -metilglutâmico, isolados pela primeira vez nos laboratórios de Química Orgânica da «Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat», Gembloux (G. DARDENNE).

### 1.3. Material

Utilizámos balões de reacção de 100 ml com embocadura B29 munida de tubos exsiccadores de CaCl<sub>2</sub>; agitador magnético J. K.; banho de parafina em reservatório de aço inoxidável; resistência de aquecimento com termostato Haake K 21; tubos de hidrólise; e evaporador rotativo Büchi.

#### 1.3.1. Aparelhagem cromatográfica

Cromatógrafo VARIAN AEROGRAPH HI-FY 600 D com detector de ionização de chama, equipado com programador de temperatura modelo 326, registador HONEYWELL (-0,2 a 1 mV), e integrador electrónico HEWLETT PACKARD 3370 A. Para as injeções servimo-nos de seringas HAMILTON de 10  $\mu$ l.

#### 1.3.2. Colunas

Utilizámos colunas de vidro de 1,5 m e 1/8", uma de DEGS — EGSS-X 0,25-0,75 % w/w sobre Chromosorb W 60-80 mesh lavado com ácido (a. w.), e outra de EGA 0,325 % sobre Chromosorb G 60-80 mesh lavado com ácido e aquecido previamente a 6000° C. As fases DEGS e EGA, e os suportes, foram fornecidos por VARIAN AEROGRAPH, e a fase EGSS-X por APPLIED SCIENCE LABORATORY.

Nos ensaios para a separação da arginina, histidina e cistina utilizámos uma coluna de vidro de DC-550 a 5 % sobre Chromosorb W a. w. 60-80 mesh.

O aquecimento do Chromosorb G fez-se durante 15 horas à temperatura de 600° C, temperatura de activação que, segundo GEHRKE, melhora a qualidade da separação.

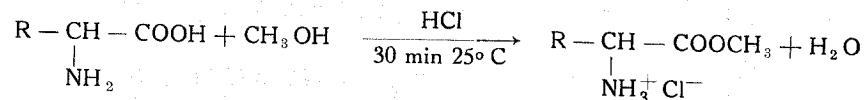
A preparação dos enchimentos foi efectuada dissolvendo uma quantidade determinada da fase num dissolvente apropriado (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ou acetona), e adicionando esta solução numa cápsula ao suporte escolhido, na proporção desejada (w/w) de forma a que o líquido cobrisse todo o suporte. Depois de efectuar a mistura a uma temperatura de 60° C, agitando com uma vareta, evaporou-se o dissolvente sob vazio, a 60° C, no evaporador rotativo. Eliminaram-se os vestígios de dissolvente por aquecimento a 100° C durante duas horas.

#### 1.4. Síntese dos ésteres n-butílicos N-trifluoroacetilados

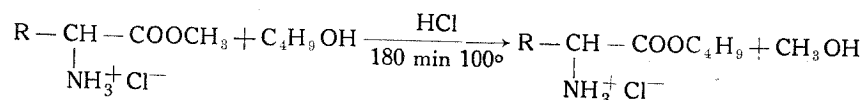
##### 1.4.1. Reações

A síntese destes ésteres efectua-se em três etapas:

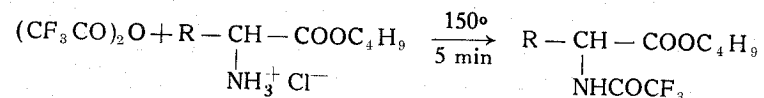
1 — Esterificação dos aminoácidos para formar os cloridratos dos ésteres metílicos:



2 — Transesterificação dos ésteres metílicos para formar os cloridratos dos ésteres butílicos:



3 — Acilação dos ésteres butílicos pelo anidrido trifluoroacético para formar os ésteres n-butílicos N-trifluoroacetilados:



Torna-se necessária a formação dos ésteres metílicos para permitir a solubilização de alguns dos aminoácidos no butanol.

##### 1.4.2. Preparação

Seguiu-se a técnica de GEHRKE e colaboradores para a conversão dos aminoácidos nos seus TAB.

a) Esterificação dos aminoácidos com  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

Dissolveram-se 60 mg da mistura anidra de aminoácidos em 10 ml de metanol-HCl 1,25 N, tapou-se o balão com um tubo de  $\text{CaCl}_2$  e agitou-se a solução durante 30 minutos à temperatura ambiente. Evaporou-se o metanol em excesso no evaporador rotativo a  $70^\circ \text{ C}$ .

b) Transesterificação dos cloridratos dos ésteres metílicos.

Adicionaram-se aos cloridratos 10 ml de butanol-HCl 1,25 N e 1 ml de uma solução do padrão interno (estearato de butilo) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 a 4 mg/ml). Adaptou-se ao balão um tubo de  $\text{CaCl}_2$  e colocou-se aquele num banho de parafina a  $100^\circ \text{ C}$  durante 180 minutos, com agitação. Eliminou-se o HCl em excesso no evaporador rotativo a  $70^\circ \text{ C}$ .

c) Acilação dos cloridratos dos ésteres butílicos.

Adicionaram-se aos cloridratos 4 ml de uma solução a 25 % de anidrido trifluoroacético em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , e agitou-se a solução durante 15 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se uma parte da solução para um tubo de hidrólise, que se fechou ao maçarico, e se colocou num banho de parafina a  $150^\circ \text{ C}$  durante 5 minutos (o nível da parafina não deve ultrapassar o do líquido no tubo).

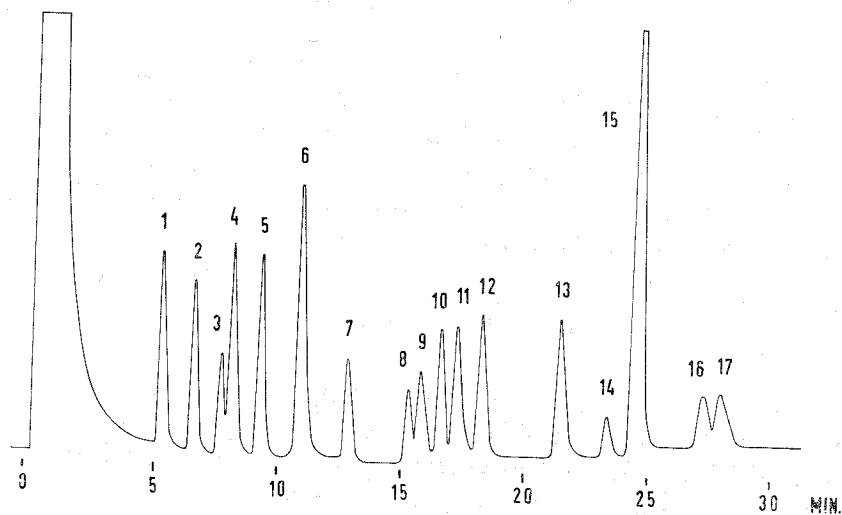
Para os aminoácidos básicos torna-se necessário prolongar a acilação durante 15 minutos.

#### 1.5. Análise de misturas de aminoácidos puros

Foram ensaiadas as colunas referidas em 1.3.2. para a separação dos aminoácidos proteicos, fazendo variar os débitos de gás e a programação de temperatura de forma a obter a melhor separação possível dos derivados.

Os melhores cromatogramas foram obtidos com a coluna mista DEGS — EGSS-X com um débito de azoto de 20 ml/min, e uma programação de temperatura de  $4^\circ/\text{min}$ .; e com a coluna de EGA com um débito de azoto de 20 a 30 ml/min. e programação de temperatura de  $2^\circ/\text{min}$ . Na Fig. 1 apresenta-se um dos cromatogramas obtidos nessas condições.

Procurámos posteriormente obter a separação sobre estas duas colunas de 15 aminoácidos especiais: ácido  $\alpha$ -aminobutírico,  $\beta$ -alanina, norleucina, S-metilcisteína, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, homoserina, asparagina, glutamina, ácido  $\gamma$ -hidroxi- $\gamma$ -metilglutâmico,  $G_1$ ,  $G_2$ , ornitina, ácido pipecólico, ácido 5-OH-pipecólico e  $\beta$ -cianoalanina.



- |                |                      |  |
|----------------|----------------------|--|
| 1 — Alanina    | 7 — Serina           | 13 — Ácido glutâmico                         |
| 2 — Valina     | 8 — Cisteína         | 14 — Tirosina                                |
| 3 — Glicina    | 9 — Metionina        | 15 — Estearato de butilo<br>(padrão interno) |
| 4 — Isoleucina | 10 — Hidroxiprolina  | 16 — Lisina                                  |
| 5 — Leucina    | 11 — Fenilalanina    | 17 — Triptofano                              |
| 6 — Prolina    | 12 — Ácido aspártico |  |

Fig. 1 — Análise por cromatografia em fase gasosa de uma mistura de aminoácidos puros. Coluna de DEGS — EGSS-X; débito de azoto: 20 ml/min.; temp. in.: 75° C; progr.: 4°/min. Volume inj.: 1 µl

Dão-se no Quadro I as temperaturas de retenção e as respostas molares relativas (r. m. r.) <sup>(1)</sup> ao estearato de butilo dos 32 aminoácidos separados sobre as colunas de DEGS — EGSS-X e EGA nas condições de análise referidas.

<sup>(1)</sup>

$$RMR \text{ aa/p} = \frac{\frac{\text{Área do pico do aminoácido}}{\left[ \frac{\text{Massa}}{\text{P. M.}} \right]_{\text{aa.}}}}{\frac{\text{Área do pico do padrão interno}}{\left[ \frac{\text{Massa}}{\text{P. M.}} \right]_{\text{p}}}}$$

RMR aa/p = Resposta molar relativa de qualquer aminoácido em relação ao padrão interno.

QUADRO I

Aminoácidos	DEGS — EGSS-X		EGA	
	Temp. ret. °C	R. M. R.	Temp. ret. °C	R. M. R.
Alanina . . . . .	107	0,35	99	0,31
Valina . . . . .	112	0,49	104	0,43
Glicina . . . . .	116	0,26	109	0,10
Isoleucina . . . . .	117	0,52	110	0,42
Leucina . . . . .	121	0,50	114	0,41
Treonina . . . . .	128	0,45	119	0,23
Prolina . . . . .	129	0,37	120	0,12
Serina . . . . .	134	0,37	124	0,26
Cisteína . . . . .	145	0,29	139	0,10
Metionina . . . . .	147	0,35	145	0,10
Hidroxiprolina . . . . .	151	0,47	147	0,34
Fenilalanina . . . . .	153	0,50	148	0,15
Ácido aspártico . . . . .	157	0,51	150	0,34
Ácido glutâmico . . . . .	169	0,58	165	0,34
Tirosina . . . . .	178	0,16	176	0,19
Lisina . . . . .	194	0,27	(a)	(b)
Triptofano . . . . .	198	0,20	(a)	(b)
Ácido α-aminobutírico . . . . .	110	0,27	102	0,15
β-alanina . . . . .	121	0,32	114	(b)
Norleucina . . . . .	125	0,48	115	0,17
Ac. pipercolico . . . . .	125	(b)		
S-metilcisteína . . . . .	134	0,38	129	0,12
Ácido γ-aminobutírico . . . . .	138	0,35	132	0,13
Homoserina . . . . .	145	0,28	138	(b)
Ácido 5-OH-pipercolico . . . . .	148	(b)		
Asparagina . . . . .	157	0,30	150	0,16
β-cianoalanina . . . . .	155	(b)		
Glutamina . . . . .	169	(b)	165	0,18
γ-hidroxi-γ-metilglutâmico . . . . .	176	0,27	174	(b)
G <sub>1</sub> . . . . .	176	(c)	169	(c)
G <sub>2</sub> . . . . .	180	(c)	(c)	(c)
Ornitina . . . . .	186	0,27	(d)	(d)

(a) — Eluído a temperatura superior à temperatura limite da coluna (195° C).

(b) — Não determinado.

(c) — Não determinado por não dispormos de G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em quantidade suficiente.

(d) — Não eluído.



## 1.6. Conclusões

O conjunto dos ensaios realizados sobre os 35 aminoácidos permite tirar as conclusões que adiante apresentamos.

De forma geral os rendimentos da síntese parecem convenientes e suficientemente reprodutíveis.

Os derivados n-butílicos N-trifluoroacetilados de todos os aminoácidos sofrem uma degradação variável no tempo (GEETS, 1969). Torna-se portanto indispensável injectar os extractos imediatamente após a síntese.

A aparição de picos fantasmas exige uma grande prudência na interpretação dos resultados qualitativos.

A separação dos ésteres n-butil N-trifluoroacetilados dos 20 aminoácidos proteicos não é possível sobre uma única fase estacionária.

As colunas de EGSS-X — DEGS 0,25-0,75% ou EGA 0,325% permitem separações satisfatórias de 17 dos 20 aminoácidos proteicos e resolvem grande parte dos problemas de identificação de todos os aminoácidos livres ensaiados. Através das respostas molares relativas dadas no Quadro I verifica-se que a coluna de EGSS-X — DEGS apresenta maior interesse para a determinação quantitativa, tendo nós recorrido à coluna de EGA apenas para confirmação de algumas identificações, e para a separação do par S-metilcisteína — serina.

Conclui-se, porém, da apreciação das temperaturas de retenção apresentadas no Quadro I, que não é possível separar sobre uma mesma coluna todos os 32 aminoácidos utilizados nos nossos ensaios (além da arginina, histidina e cistina). Verifica-se que alguns aminoácidos possuem praticamente a mesma temperatura de retenção (casos da serina e S-metilcisteína, leucina e  $\beta$ -alanina, etc., sobre EGSS-X — DEGS).

E dada a complexidade dos cromatogramas obtidos e o grande número de aminoácidos livres existentes, torna-se evidente a dificuldade que apresenta a separação completa por cromatografia em fase gasosa dos aminoácidos livres de um meio biológico complexo. Pensamos que a separação prévia dos aminoácidos em grupos, sobre coluna (resina Dowex 1  $\times$  2, forma H<sup>+</sup>), e a análise posterior por cromatografia em fase gasosa das várias fases recolhidas poderia em certos casos ajudar a resolver uma parte dos problemas de identificação.

Porém iríamos assim prescindir de uma das vantagens que se esperam do método: a rapidez da análise.

Observámos ainda que a asparagina, a glutamina, e peptidos presentes (casos da  $\gamma$ -glutamil-S-metilcisteína) são quase completamente hidrolisados através do processo da síntese — a asparagina em ácido aspártico, a glutamina em ácido glutâmico, a  $\gamma$ -glutamil-S-metilcisteína em S-metilcisteína e ácido glutâmico, etc. Em consequência, forma-se o mesmo derivado para os dois compostos de cada um dos pares ácido aspártico — asparagina e ácido glutâmico — glutamina, por exemplo, o que na análise dos aminoácidos livres dificulta a identificação dos compostos que sofrem hidrólise e falseia os resultados quantitativos.

Portanto:

1. Cremos que a cromatografia em fase gasosa dos ésteres n-butílicos dos aminoácidos N-trifluoroacetilados é aplicável à análise tanto dos aminoácidos das proteínas, como dos aminoácidos livres dos meios biológicos. A utilização de duas colunas pode servir à identificação dos aminoácidos de um extracto, ou confirmá-la.

2. Pode a cromatografia em fase gasosa constituir um elemento muito útil como complemento das outras técnicas cromatográficas, em particular da cromatografia em papel, para o estudo dos aminoácidos livres de meios biológicos complexos.

3. Pode, no entanto, não ser viável proceder à identificação e análise quantitativa em meios biológicos de alguns aminoácidos livres por cromatografia em fase gasosa: quando no extracto se encontrem presentes peptidos não separados na preparação prévia da amostra, ou em que não se torne possível separar esses aminoácidos, mesmo sobre mais de uma coluna, de outros que porventura estejam presentes, dado o grande número de aminoácidos livres que podem existir.

## 2. Aplicação à análise dos aminoácidos livres dos vinhos

### 2.1. Protocolo experimental

Aplicámos o método de conversão dos aminoácidos puros nos seus derivados n-butil N-trifluoroacetilados ao estudo dos aminoácidos livres de dois vinhos portugueses. Compararam-se

seguidamente os resultados obtidos por cromatografia em fase gasosa com os obtidos por cromatografia em papel, com o objectivo de concluir das possibilidades do método na identificação e análise quantitativa dos aminoácidos livres dos vinhos.

## 2.2. *Material biológico*

Utilizámos para este estudo dois vinhos portugueses fornecidos pelo Centro Nacional de Estudos Vitivinícolas, e designados por «Dão» e «Torres Vedras 3».

## 2.3. *Isolamento dos aminoácidos livres dos vinhos*

Quando um extracto de um meio biológico se destina a ser analisado por cromatografia, torna-se necessário eliminar as substâncias interferentes.

As técnicas descritas baseiam-se geralmente no emprego de resinas permutadoras de iões.

Para esta purificação seguimos o método de THOMPSON *et al.* (1959), que consiste em fixar sobre uma resina permutadora de catiões fortemente ácida todos os aminoácidos, peptídeos, e catiões. Os aniões, glúcidos, e em geral todas as substâncias não ionizadas, passam para o filtrado.

A lavagem da resina por uma solução tampão apropriada elui quantitativamente os aminoácidos, enquanto os catiões minerais ficam fixados sobre ela.

Efectuámos a purificação sobre uma coluna de Amberlite IR 120 (forma H<sup>+</sup>, 100-120 mesh), de 50 cm de altura e de 4 cm de diâmetro.

Depois da passagem do extracto alcoólico sobre a coluna lavámos esta com álcool para arrastar o máximo de pigmentos. Procedemos em seguida à lavagem com água até à eliminação do álcool, e eluímos os aminoácidos com NH<sub>3</sub> 1 N. A passagem dos aminoácidos pode ser seguida pela reacção da ninidrina.

No final da eluição evaporámos a baixa pressão e a 600° C o filtrado amoniacoal até à eliminação de vestígios de NH<sub>3</sub>, e recuperámos o resíduo com um mínimo de água destilada (2,5 ml).

Os cromatogramas em papel foram obtidos a partir desta solução.

A fim de satisfazer às condições de síntese e de análise por cromatografia em fase gasosa, secámos a solução em presença de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> até à eliminação de toda a água presente.

No fim das operações verificámos que, de um volume de vinho inicial de 100 ml, se haviam extraído, do vinho «Dão», 70 mg de aminoácidos livres, e do vinho «Torres Vedras 3», 34 mg.

## 2.4. *Estudo cromatográfico*

Comparámos a composição em aminoácidos dos extractos assim obtidos por cromatografia em papel e por cromatografia em fase gasosa.

### 2.4.1. *Cromatografia em papel*

Identificámos por cromatografia bidimensional em papel os aminoácidos livres de dois vinhos.

Como solventes utilizámos:

- 1) Butanol-ácido fórmico-água, nas proporções de 75 de butanol, 15 de ácido fórmico e 10 de água (v/v).
- 2) Fenol saturado por um tampão a pH 4,2.

Efectuámos a separação sobre papel Schleicher & Schull 2043b, levando a efeito o desenvolvimento pelo fenol no sentido de progressão mais rápido.

As Fig. 2 e 3 mostram as separações obtidas para os aminoácidos dos dois vinhos analisados.

### 2.4.2. *Cromatografia em fase gasosa*

#### 2.4.2.1. *Síntese dos derivados*

Secaram-se em presença de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> os resíduos provenientes da purificação sobre coluna. Tomámos 19 mg de aminoácidos do vinho «Dão» e 11 mg de aminoácidos do vinho «Torres Vedras 3», e preparámos os derivados n-butil N-trifluoroacetilados como foi descrito em 1.4.2., começando igualmente por dissolver o resíduo em 10 ml de metanol-HCl 1,25 N. A quantidade de anidrido trifluoroacético utilizada na acilação foi reduzida para 3 ml.

2.4.2.2. Condições de análise

Utilizámos as mesmas condições cromatográficas que em 1.5. para a análise dos aminoácidos puros. As condições de obtenção dos cromatogramas representados nas figuras 4 e 5 foram as seguintes: coluna de EGSS-X—DEGS 0,25-0,75% sobre Chromosorb W a. w. 60-80 mesh; temperatura inicial de 75° C; programação de 4°/min.; injetor a 245° C; azoto com um débito de 20 ml/min.; detector de ionização de chama; registador *Honeywell*; velocidade do papel — 1,4 mm/min.

Para a obtenção do cromatograma da figura 6: coluna de EGA 0,325% sobre Chromosorb G 600° a. w. 80-100 mesh, a uma temperatura inicial de 75° C e programação de temperatura de 2°/min., débito de azoto de 20 ml/min., e velocidade do papel 1,4 mm/min.

2.4.3. Resultados

Os resultados da análise tanto por cromatografia em fase gasosa como por cromatografia em papel encontram-se resumidos nos Quadros II, III, IV e V.

Em face destes resultados, há a assinalar:

- 1 — A presença nos cromatogramas obtidos, para ambos os vinhos, por cromatografia em fase gasosa, de 5 picos não identificados.
- 2 — A presença de aminoácidos especiais em grandes quantidades, em especial dos ácidos pipercolico e 5-OH-pipercolico em ambos os vinhos analisados, e do ácido 4-OH-pipercolico no vinho «Dão», e que se não encontra no vinho «Torres Vedras 3».

Legenda das Figs. 2 e 3:

- |                      |  |
|----------------------|--|
| 1 — Alanina          | 12 — Asparagina                              |
| 2 — Valina           | 13 — Ornitina                                |
| 3 — Glicina          | 14 — Ac. $\gamma$ -NH <sub>2</sub> -butírico |
| 4 — Isoleucina       | 15 — Ácido pipercolico                       |
| 5 — Leucina          | 16 — Ácido 5-OH-pipercolico                  |
| 6 — Treonina         | 17 — Não identificado                        |
| 7 — Prolina          | 18 — Não identificado                        |
| 8 — Serina           | 19 — Não identificado                        |
| 9 — Ácido aspártico  | 20 — Tirosina                                |
| 10 — Ácido glutâmico | 21 — Ácido 4-OH-pipercolico                  |
| 11 — Arginina        |  |

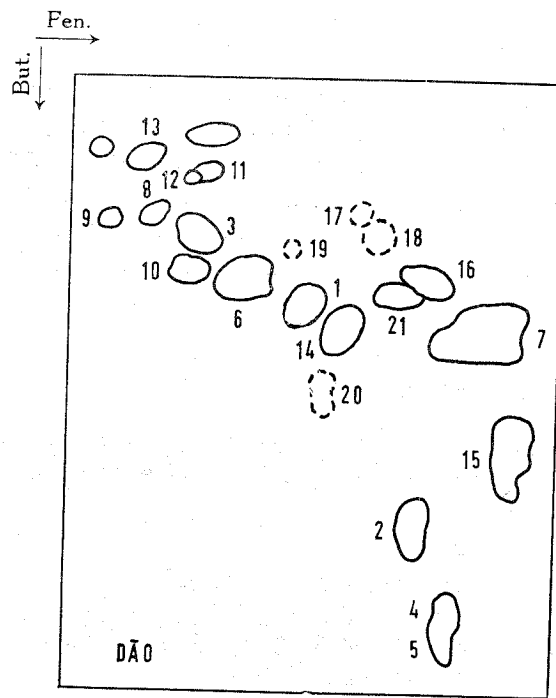


Fig. 2 — Cromatograma dos aminoácidos do vinho «Dão».

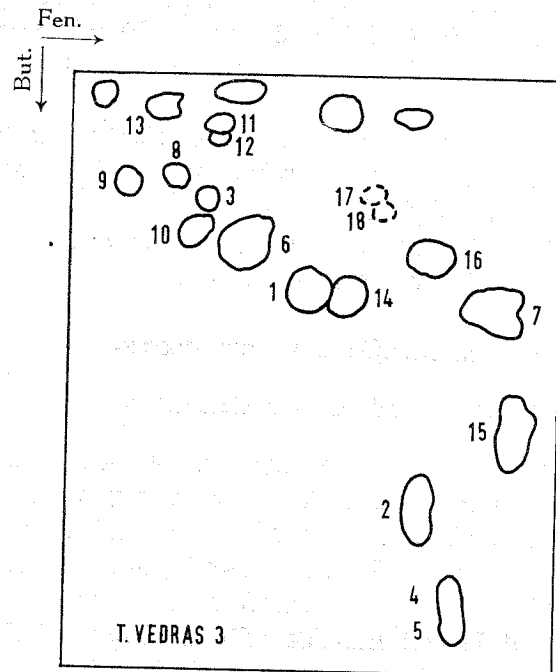


Fig. 3 — Cromatograma dos aminoácidos do vinho «Torres Vedras 3».

QUADRO II

Resultados da análise cromatográfica do vinho «Dão»

Aminoácidos	CFG (mg de aa/100 ml)	Crom. papel (int. das manchas)
Alanina	0,130	5
Valina	0,020	1
Glicina	0,110	3
Isoleucina	0,020	
Leucina	0,035	1 (g)
Treonina		5
Prolina	14,550 (a)	6
Serina	0,055	3
Cisteína	0,035	(h)
Hidroxiprolina	(b)	(i)
Metionina	(b)	—
Fenilalanina	(b)	—
Ácido aspártico	0,205	3
Ácido glutâmico	0,240	3
Tirosina	0,185	1
Ac. $\gamma$ -aminobutírico	0,240	4
Triptofano	(b)	—
Lisina	(b)	(h)
Arginina	(c)	2
Asparagina	(d)	2
Ac. pipercolico	(e)	5
Ac. 4-OH-pipercolico	(f)	3
Ac. 5-OH-pipercolico	(f)	4

- (a) — Não separados; eluídos com o ácido pipercolico.  
 (b) — Em vestígios ou não determinados.  
 (c) — Não eluído.  
 (d) — Eluído com o ácido aspártico.  
 (e) — Eluído com a treonina e a prolina.  
 (f) — Não identificado no cromatograma.  
 (g) — Não separados.  
 (h) — De difícil identificação com os solventes utilizados.  
 (i) — Não reage à ninidrina.

Legenda das Figs. 4 e 5 (cont.):

- 13 — Hidroxiprolina  
 14 — Fenilalanina  
 15 — Ácido aspártico  
 16 — Não identificado  
 18 — Ácido glutâmico  
 19 — (Fig. 4) — Tirosina  
 (Fig. 5) — Não identificado  
 20 — Padrão interno  
 21 — Não identificado  
 22 — Triptofano  
 23 — Não identificado

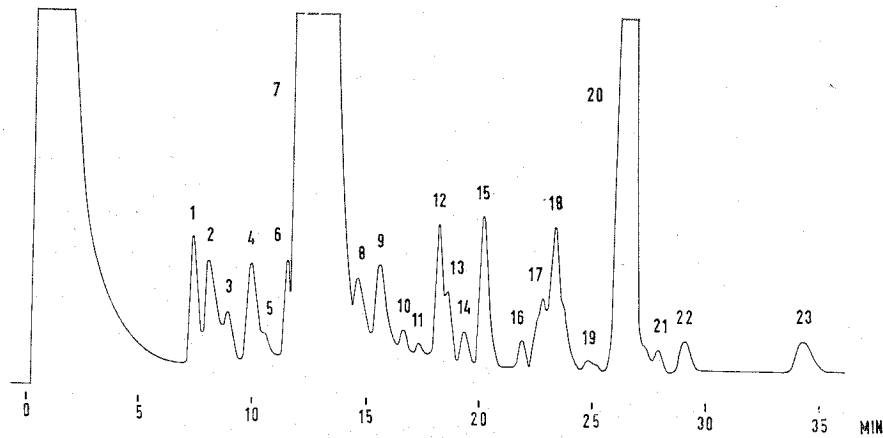


Fig. 4 — Análise por cromatografia em fase gasosa dos aminoácidos livres do vinho «Dão». Vol. inj.: 1  $\mu$ l.

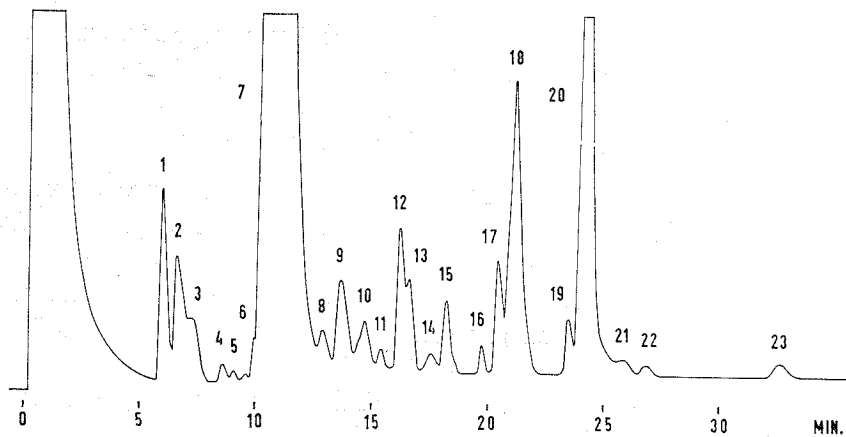


Fig. 5 — Análise por cromatografia em fase gasosa dos aminoácidos livres do vinho «Torres Vedras 3». Vol. inj.: 1  $\mu$ l.

Legenda das Figs. 4 e 5:

- 1 — Alanina  
 2 — Não identificado <sup>(1)</sup>  
 3 — Valina  
 4 — Glicina  
 5 — Isoleucina  
 6 — Leucina  
 7 — Treonina e prolina  
 8 — Serina  
 9 — Ácido  $\gamma$ -NH<sub>2</sub>-butírico  
 10 — Não identificado  
 11 — Cisteína  
 12 — Metionina

<sup>(1)</sup> Supomos tratar-se do ácido  $\alpha$ -aminobutírico.

QUADRO III

Resultados da análise cromatográfica do vinho «Torres Vedras»

Aminoácidos	CFG (mg de aa/100 ml)	Crom. papel (int. das manchas)
Alanina . . . . .	0,215	6
Valina . . . . .	0,075	1
Glicina . . . . .	(b)	2
Isoleucina . . . . .	(b)	
Leucina . . . . .	0,155	1 (g)
Treonina . . . . .		5
Prolina . . . . .	9,765 (a)	6
Serina . . . . .	0,185	3
Cisteína . . . . .	0,140	(h)
Hidroxiprolina . . . . .	(b)	(i)
Metionina . . . . .	(b)	—
Fenilalanina . . . . .	(b)	—
Ácido aspártico . . . . .	0,215	4
Ácido glutâmico . . . . .	0,635	4
Tirosina . . . . .	0,355	—
Ác. $\gamma$ -aminobutírico . . . . .	0,405	4
Triptofano . . . . .	(b)	—
Lisina . . . . .	(b)	(h)
Arginina . . . . .	(c)	2
Asparagina . . . . .	(d)	1
Ác. pipercolico . . . . .	(e)	4
Ác. 4-OH-pipercolico . . . . .	(f)	—
Ác. 5-OH-pipercolico . . . . .	(f)	4

- (a) — Não separados; eluídos com o ácido pipercolico.
- (b) — Em vestígios ou não determinados.
- (c) — Não eluído.
- (d) — Eluído com o ácido aspártico.
- (e) — Eluído com a treonina e a prolina.
- (f) — Não identificado no cromatograma.
- (g) — Não separados.
- (h) — De difícil identificação com os solventes utilizados.
- (i) — Não reage à ninidrina.

QUADRO IV

Aminoácidos não identificados por CFG

N.º do pico (¹)	Temp. de ret. °C
2 (a)	110
10	142
16	163
17	167
21	189

- (¹) — Refere-se aos cromatogramas das figs. 1 e 2.
- (a) — Julgamos corresponder este pico ao ácido  $\alpha$ -aminobutírico.

QUADRO V

Aminoácidos não identificados por cromatografia em papel

DÃO			TORRES VEDRAS		
N.º da mancha	Cor	Intens.	N.º da mancha	Cor	Intens.
17	Amarela	1	17	Amarela	1
18	Violeta	1	18	Violeta	1
19	Violeta	1			

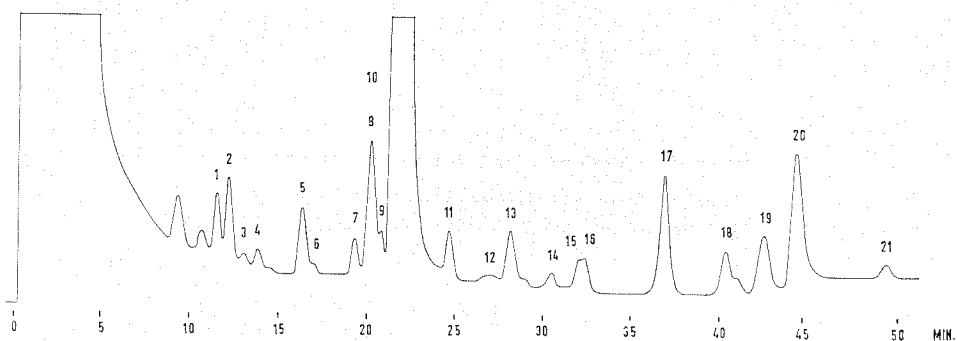
3 — Concentrações de certos aminoácidos que não estão aparentemente em concordância com a intensidade de coloração das manchas correspondentes nos cromatogramas em papel. Ressaltam em especial os casos da prolina, metionina, ácidos aspártico e glutâmico, e tirosina.

A importância do pico correspondente à prolina é devida não só à concentração muito elevada deste aminoácido, mas também ao facto de a treonina e o ácido pipercolico, este presente em grande quantidade, serem eluídos conjuntamente.

O pico da metionina corresponde também ao ácido 5-OH-pipecólico, eluído conjuntamente; daí as suas dimensões.

Anàlogamente, com a tirosina seria eluído outro aminoácido, não identificado.

Quanto às aparentes discordâncias verificadas para as dimensões dos picos correspondentes aos ácidos aspártico e



- |                      |  |
|----------------------|--|
| 1 — Alanina          | 12 — Não identificado                          |
| 2 — Não identificado | 13 — Ácido $\gamma$ -NH <sub>2</sub> -butírico |
| 3 — Não identificado | 14 — Cisteína                                  |
| 4 — Valina           | 15 — Metionina                                 |
| 5 — Glicina          | 16 — Hidroxiprolina                            |
| 6 — Isoleucina       | 17 — Ácido aspártico                           |
| 7 — Não identificado | 18 — Não identificado                          |
| 8 — Leucina          | 19 — Não identificado                          |
| 9 — Não identificado | 20 — Ácido glutâmico                           |
| 10 — Prolina         | 21 — Tirosina                                  |
| 11 — Serina          |  |

Fig. 6 — Análise dos aminoácidos livres do vinho «Dão».  
Coluna EGA 0,325 % s/ Chrom. G; vol. inj.: 1  $\mu$ l.

glutâmico, quando comparadas com as intensidades das manchas correspondentes nos cromatogramas bidimensionais, são elas devidas ao aumento de concentração desses dois aminoácidos motivado pela hidrólise da arginina e glutamina. Esse facto implica que ao pretender-se efectuar a análise quantitativa dos ácidos aspártico e glutâmico por cromatografia em fase gasosa, o que na realidade se obtém é o doseamento dos pares ácido aspártico — asparagina e ácido glutâmico — glutamina.

### 3. Resumo e conclusões

No decurso deste trabalho, começámos por preparar e separar os derivados n-butílicos N-trifluoroacetilados dos aminoácidos, e estudámos a sua aplicação à análise de misturas complexas de aminoácidos por cromatografia em fase gasosa.

Utilizámos o método na análise de 35 aminoácidos diferentes, dos quais 20 aminoácidos proteicos e 15 encontrados no estado livre em diversos meios vegetais.

Verificámos que:

- Em geral, os derivados dos aminoácidos são sintetizados com uma reprodutibilidade conveniente.
- Todos os ésteres butílicos preparados sofrem uma degradação no tempo, que varia de um aminoácido para outro, e de síntese para síntese. Torna-se por isso indispensável proceder-se à análise cromatográfica imediatamente após a síntese.
- Devido ao grande número de aminoácidos livres que podem existir nos meios biológicos complexos, pode não ser possível a separação e identificação de alguns desses compostos. E por outro lado, devido ao facto de alguns deles sofrerem hidrólise durante o processo de síntese — verificámo-lo em particular para a asparagina e a glutamina — pode tornar-se difícil a sua análise quantitativa e a dos aminoácidos em que eles se transformam (em relação aos dois aminoácidos citados, o doseamento do ácido aspártico e glutâmico).

Aplicámos em seguida o método estudado à análise dos aminoácidos de dois vinhos portugueses, e comparámos os resultados com os que obtivemos por cromatografia em papel. Verificámos a sua concordância e pudemos justificar as divergências aparentes que encontrámos. Comprovámos que a análise por cromatografia em fase gasosa se revela mais sensível e mais rápida do que por cromatografia em papel.

Esse estudo comparativo auxiliou-nos na identificação por cromatografia em fase gasosa do ácido  $\gamma$ -aminobutírico, permite levantar a questão da possibilidade da presença de ácido  $\alpha$ -aminobutírico nos vinhos analisados, e pôs em evidência a exis-

tência de aminoácidos não correntes, revelados por cromatografia em fase gasosa, que podem ou não corresponder a manchas não identificadas por cromatografia em papel.

Assinalámos a presença em ambos os vinhos analisados de dois aminoácidos especiais, em quantidades importantes, o ácido pipercolico e o ácido 5-OH-pipercolico, e ainda a existência no vinho «Dão» do ácido 4-OH-pipercolico, que não se encontra no vinho «Torres Vedras 3».

Apesar das restrições assinaladas, pensamos que os resultados qualitativos e quantitativos obtidos na análise dos aminoácidos livres dos vinhos por cromatografia em fase gasosa completam os resultados qualitativos da cromatografia em papel. Mas cremos também que se torna indispensável interpretar os resultados desta análise por cromatografia em fase gasosa comparando-os com os da cromatografia em papel.

### RÉSUMÉ

Dans ce travail nous avons commencé par préparer les dérivés n-butyl N-trifluoroacétylés des acides aminés, et nous avons étudié leur application à l'analyse de mélanges complexes d'acides aminés par chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons ensuite appliqué cette méthode à l'analyse des acides aminés libres de deux vins portugais et nous avons comparé les résultats avec ceux de la chromatographie sur papier. Nous avons observé une bonne concordance entre les résultats et justifié les divergences apparentes observées.

Cette étude comparative a mis en évidence l'existence d'acides aminés spéciaux, révélés par chromatographie en phase gazeuse, dont quelques-uns peuvent correspondre à des taches non identifiées sur papier.

Nous avons remarqué la présence dans les deux vins analysés de deux acides aminés spéciaux — l'acide pipécolique et l'acide 5-OH-pipécolique — et l'existence dans le vin «Dão» de l'acide 4-OH-pipécolique, qui n'existe pas dans le vin «Torres Vedras».

Nous estimons que les résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus dans l'analyse des acides aminés libres des vins par chromatographie en phase gazeuse complètent les résultats

qualitatifs de la chromatographie sur papier et que la chromatographie en phase gazeuse peut rendre des services très appréciables à l'oenologie, notamment dans la réalisation d'essais sur la présence dans les raisins, les moûts et les vins d'acides aminés courants en quantité variable, ou d'acides aminés spéciaux qui pourront aider à leur caractérisation ou différenciation et permettre de suivre les procès de maturation et de fermentation.

### BIBLIOGRAFIA

- BAYER, E.  
1958 Separation of derivatives of amino acids using gas-liquid chromatography. *Gas Chromatography*. Butterworths, Londres, 333-342.
- BAYER, E., REUTHER, K. H. & BORN, F.  
1957 Analyse von Aminosäure-Gemischen mittels Gas-verteilungschromatographie. *Angew. Chem.*, **69**, 640.
- BELL, E. A.  
1962 Associations of ninhydrin-reacting compounds in the seeds of 49 species of *Lathyrus*. *Biochem. J.*, **83**, 225-229.  
1963 Certain non-proteic amino-acids of plants and their effects on animals. *Biochem. J.*, **88**, 58P-59P.
- BELL, E. A. & TIRIMANA, A. S.  
1965 Associations of amino acids and related compounds in the seeds of 47 species of *Vicia*. Their taxonomic and nutritional significance. *Biochem. J.*, **97**, 104-111.
- BLAU, K.  
1968 Analysis of amino acids by gas-chromatography. *Biomedical Applications of Gas Chromatography*, Vol. 2. Plenum Press, Londres.
- BLAU, K. & DARBRE, A.  
1963 Preparation of volatile derivatives of amino acids for gas-chromatography. *Biochem. J.*, **88**, 8P-9P.  
1965a Analyse quantitative des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse. *Chim. Anal.*, **47**, 631-633.  
1965b Gas chromatography of volatile amino acid derivatives (II). *J. Chromatog.*, **17**, 445-449.  
1967 Gas chromatography of volatile amino acid derivatives (III). *J. Chromatog.*, **26**, 35-40.
- CASIMIR, J. & LEMARCHAND, G.  
1966 Répartition et importance systématique des acides aminés et des peptides libres des *Phaseolinae*. *Bull. Jard. Bot.*, **36**, 53.
- DARBRE, A. & BLAU, K.  
1965a Gas chromatography of volatile amino acid derivatives (I). *J. Chromatog.*, **17**, 31-49.

- 1965b Trifluoroacetylated amino acid esters: the stability of the derivatives of cysteine, hydroxyproline, serine, threonine, and tyrosine. *Bioch. Bioph. Acta*, **100**, 298-300.
- 1967 Gas chromatography of volatile amino acid derivatives (IV). *J. Chromatog.*, **29**, 49-57.
- DARBRE, A. & ISLAM, A.  
1968 Gas-liquid chromatography of trifluoroacetylated amino acid methyl esters. *Biochem. J.*, **106**, 923-925.
- DARDENNE, G. & CASIMIR, J.  
1968 Séparation et caractérisation du L(-) 5-méthyl 2-amino 4-hexénoïque à partir de *Leococortinarius Bulbiger*. *Phytochemistry*, **7**, 1401-1406.
- DARDENNE, G., SEVERIN, M. & MARLIER, M.  
1969 Chromatographie en phase gazeuse de nitriles. II — Application à l'identification d'acides  $\alpha$ -aminés isomères. *J. Chromatog.*, **47**, 182-185.
- DEL FAVERO, A., DARBRE, A. & WATERFIELD, M.  
1969 Gas-liquid chromatography of radioactive amino acids as their trifluoroacetyl ester derivatives. *J. Chromatog.*, **40**, 213-218.
- DENT, L. E., STEPKA, W. & STEWARD, F. C.  
1947 Detection of the free amino acids of plant cells by partition chromatography. *Nature*, **160**, 682.
- ETTRE, L. S.  
1962 *13th Annual Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy*, Pittsburgh.
- FOWDEN, L.  
1958 New amino acids of plants. *Biol. Rev.*, **33**, 393-441.  
1962a The non-proteic amino acids of plants. *Endeavour*, **21**, 35-42.  
1962b *Amino Acid Pools*. Elsevier, Amsterdão.  
1964 The chemistry and metabolism of recently isolated amino acids. *Ann. Rev. Biochem.*, **33**, 173-204.
- FOWDEN, L. & WEBB, J. A.  
1955 Evidence of the occurrence of  $\gamma$ -methylene- $\alpha$ -oxoglutaric acid in groundnut plants. *Biochem. J.*, **59**, 228-234.
- GEETS, O.  
1969 Analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides aminés n-butyl N-trifluoroacétylés. *Trav. f. études. Fac. Sc. Agro. de l'Etat*, Gembloux.
- GEHRKE, C. W., LAMKIN, W. M., STALLING, D. L. & SHAHROKHI, F.  
1965 Quantitative gas chromatography of amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **19**, 328-334.
- GEHRKE, C. W. & SHAHROKHI, F.  
1966 Chromatographic separation of n-butyl N-trifluoroacetyl esters of amino acids. *Anal. Biochem.*, **15**, 97-108.
- GEHRKE, C. W., NAKAMOTO, H. & ZUMWALT, K.  
1969 Gas-liquid chromatography of protein amino acid trimethylsilyl derivatives. *J. Chromatog.*, **45**, 24-51.
- GEHRKE, C. W. & STALLING, D. L.

- 1966 Quantitative analysis of the twenty natural protein amino acids by gas-liquid chromatography. *19th Ann. Summer Symp.*, Univ. of Alberta, Canada.
- GEHRKE, C. W., ZUMWALT, R. & WALL, L.  
1968 Gas-liquid chromatography of protein amino acids. Separation factors. *J. Chromatog.*, **37**, 398-413.
- GEHRLAXHE, S. & RENARD, M.  
1954 La chromatographie électrophorèse des acides aminés. *C. R. du XXVII Congrès Intern. de Chimie Industr.*, **3**, 509.
- GEHRLAXHE, S., CASIMIR, J. & RENARD, M.  
1957 La séparation des acides aminés basiques par chromatographie électrophorèse sur papier. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **66**, 251.
- GMELIN, R.  
1959 Die freien Aminosäuren der Samen von *Acacia Willardiana*. *Z. Physiol. Chem.*, **316**, 164-169.
- HALPERN, B., CLOSE, V., WEGMANN, A. & WESTLEY, J. W.  
1968 Gas chromatography of amino acids as N-thiocarbonyl ester derivatives. *Tetrahedron Letters*, **27**, 3119-3122.
- HERB, S. F.  
1968 Gas-liquid chromatography of lipids, carbohydrates and amino acids. *Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 784-788.
- HUNTER, I. R., DIMICK, K. P. & CORSE, J. W.  
1956 Determination of amino acids by ninhydrin oxidation and gas chromatography. *Chemistry Ind.*, Londres.
- KLEBE, J. F., FINKBEINER, H. & WHITE, D. M.  
1966 Silylations with bis (trimethylsilyl) acetamide. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3390-3395.
- LAMKIN, W. M. & GEHRKE, C. W.  
1965 Quantitative gas chromatography of amino acids. Preparation of n-butyl N-trifluoroacetyl esters. *Anal. Chem.*, **37**, 383-398.
- LEDERER, E.  
1955 *Paper Electrophoresis*. Elsevier, Amsterdão.
- MAKISUMI, J., NICHOLLS, C. H. & SAROFF, H. A.  
1963 The influence of esterifying and acetylating groups on the retention times of amino acid derivatives in gas chromatography. *J. Chromatog.*, **12**, 106-108.
- MARCUCCI, F., MUSSINI, E., POY, F. & GAGLIARDI, P.  
1965 Separation of amino acids as their N-trifluoroacetyl-n-butyl esters by gas chromatography. *J. Chromatog.*, **18**, 487-491.
- PFEIFFER, S., ZENON, L., BOCHE, C. & LEONIS, J.  
1967 Séparation des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse. *Soc. Belge Bioch., Réunion de Gif s/ Yvette et Paris*, **12-13**.
- ROACH, D. & GEHRKE, C. W.  
1969a The gas-liquid chromatography of amino acids. *J. Chromatog.*, **43**, 303-310.  
1969b Direct esterification of the protein amino acids. *J. Chromatog.*, **44**, 269-278.



- ROACH, D., GEHRKE, C. & ZUMWALT, R. W.  
1969 Quantitative gas-liquid chromatography of histidine. *J. Chromatog.*, **43**, 311-321.
- RODA, G. & ZAMORANI, A.  
1970 Gas chromatographic analysis of amino acids as trifluoroacetylated phenylthiohydantoin. *J. Chromatog.*, **46**, 315-316.
- RÜHLMANN, K. & GIESECKE, W.  
1961 Gaschromatographie Silylester der Aminosäuren. *Angew. Chem.*, **73**, 113.
- RÜHLMANN, K. & MICHAEL, G.  
1963 Zur Gas-Chromatographie der N-Trimethylsilyl aminosäure-Tri-methylsilylester. *Ed. Gas Chromatographie. Akad. Verlag, Berlin*, 150-157.  
1965 Neue Versuche zur Gas-Chromatographie der Aminosäuresilyl-derivate. *Ed. Gas Chromatographie. Akad. Verlag, Berlin*, 437-448.
- SEVERIN, M. & RENARD, M.  
1963 Etude par chromatographie gazeuse de l'action de l'hypochlorite de soude sur les acides aminés. *Riv. Ital. Sost. Crasse*, **12**, 649-652.
- SHILLING, E. D. & STONG, F. M.  
1954 Isolation, structure and synthesis of a *Lathyrus* factor from *L. Odoratus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2848.
- SILBER, R. L.  
1963 *Food Research*, **25**, 675.
- STALLING, D. L. & GEHRKE, C.  
1966 Quantitative analysis of amino acids by gas chromatography: acylation of arginine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **22**, 329-335.
- STEFANOVIC, M. & WALKER, B. L.  
1967 Effect of stationary phase — support ratio on the gas chromatographic separation of trifluoroacetyl amino acid butyl esters. *Anal. Chem.*, **39**, 710-713.
- STEIN, W. H. & MOORE, S.  
1948 Chromatography of amino acids on strach columns. *J. Biol. Chem.*, **176**, 337-338.
- THOMPSON, J. F., MORRIS, G. J. & GERING, R. K.  
1959 Purification of plant amino acids for paper chromatography. *Anal. Chem.*, **31**, 1028-1031.
- VOGEL, A. I.  
1962 *Practical Organic Chemistry*, 3 ed. Longmans, Londres.
- YOUNGS, C.  
1959 Analysis of mixtures of amino acids by gas phase chromatography. *Anal. Chem.*, **31**, 1019-1021.
- ZOMZELY, C., MARCO, G. & EMERY, E.  
1962 Gas chromatography of the n-butyl-N-trifluoroacetyl derivatives of amino acids. *Anal. Chem.*, **34**, 1414-1417.

TRABALHOS PUBLICADOS:

VOLUME V

Série I — VITICULTURA

- 1 . Frazão, Amélia — Eficácia e fitotoxicidade de fungicidas no tratamento do oídio da videira.

Série II — ENOLOGIA

- 1 . Webb, A. Dinsmoor — Gas-liquid chromatography and wine aroma.
- 2 . Campos, Luís e Severin Michel — Análise dos aminoácidos livres dos vinhos por cromatografia em fase gasosa.