

ESTUDO DO TEOR EM AMINOÁCIDOS
DAS CASTAS PRINCIPAIS DA REGIÃO DO OESTE
(ALICANTE BRANCO, VITAL, FERNÃO PIRES,
SANTARÉM E TINTA MIÚDA)

POR

M. V. SAN ROMÃO ⁽¹⁾

Centro Nacional de Estudos Vitivinícolas
Departamento de Tecnologia — Dois Portos

INTRODUÇÃO

ESTE estudo foi iniciado em 1972 e foi orientado no sentido de estudar a evolução dos aminoácidos ao longo da maturação das uvas das diferentes castas e procurar possíveis diferenças de casta para casta.

Para poder levar a cabo este trabalho houve, antes de mais, que proceder ao estudo e aperfeiçoamento das técnicas de extracção, separação e caracterização dos aminoácidos.

MATERIAL E MÉTODOS

As castas sobre que incidiu o ensaio foram castas brancas — Alicante Branco, Vital e Fernão Pires; castas tintas — Santarém e Tinta Miúda. Castas existentes no C. N. E. V.

De cada casta foram marcadas 10 cepas ao acaso. Fizeram-se 3 colheitas de cada casta, separadas por 15 dias, sendo a

⁽¹⁾ Este trabalho foi inicialmente programado pelo Eng.º MANUEL DA SILVA PATO. Teve a colaboração técnica das Eng.ªs Téc. Agr.ªs MARIA DA CONCEIÇÃO LEANDRO e MARIA DE LOURDES COSTA.

Recebido para publicação em 30/11/76.

1.^a colheita no início de Setembro. Em cada colheita, era cortado um cacho de cada uma das cepas marcadas. O ensaio efectuou-se em três anos consecutivos, 1972, 1973 e 1974.

Os cachos foram esmagados à mão, o mosto centrifugado e seguidamente trabalhado com vista à extracção e identificação dos aminoácidos, segundo as técnicas a seguir descritas.

Estudo das técnicas a usar

Extracção

A bibliografia consultada apontava toda para a extracção dos aminoácidos por troca-iónica (1), (24), (28), (22), (31), (33).

Foram ensaiadas várias resinas troca-iónicas:

- a) — Amberlite IR 120-H⁺ e Dowex 50 WX 8-H⁺, resinas troca-catiões.
- b) — Amberlite IRA-410 e Dowex 1, resinas troca-aniões.

Optou-se pela Amberlite IR 120-H⁺, por ter sido a que deu melhores resultados.

Este estudo foi efectuado com soluções sintéticas dos aminoácidos mais vulgarmente presentes no vinho.

Usaram-se colunas com as dimensões aproximadas de 50 cm de altura e 1,6 cm de diâmetro interno, com a forma indicada na fig. 1. Esta forma tem a vantagem de evitar que a resina fique seca. O fluxo usado foi de 0,2 ml/ml resina/minuto.

A solução em estudo passou através da resina dando-se a fixação dos aminoácidos na resina. Procedeu-se depois a lavagens sucessivas com mistura hidro-alcoólica a 50 % (para extracção da cor, açúcares, mucilagens, etc., no caso dos vinhos). Finalmente lavou-se com água até eliminar o álcool. Os aminoácidos foram depois eluídos com amónia aproximadamente N, até reacção negativa com a nindrina. O eluído foi evaporado até à secura, em evaporador rotativo, sob vácuo, à temperatura de 40-45° C e finalmente retomado o resíduo com a quantidade necessária de HCl N.

Todo o material usado foi previamente lavado com mistura sulfo-crómica para eliminação da matéria orgânica. Também

a água foi tratada com permanganato de potássio, com a mesma finalidade, sendo posteriormente desionizada.

Após a eluição dos aminoácidos com amónia, a forma H⁺ da resina pode ser regenerada, fazendo atravessar a resina por HCl aproximadamente N (330 ml de HCl N por 100 g de resina) e lavando com água até eliminação do excesso de ácido.

A resina antes de ser usada pela primeira vez, foi lavada

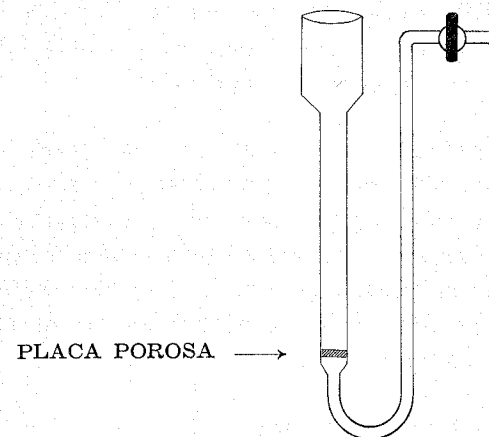


Fig. 1

com todas as soluções a usar normalmente ao longo do processo (solução hidroalcoólica 50 %, amónia N, HCl N e água) para eliminação de possíveis impurezas da resina que poderiam interferir na determinação.

Trabalhando com mosto, como se trata de uma solução bastante densa e com bastantes mucilagens, a extracção dos aminoácidos não pode ser feita em coluna, mas sim por agitação directa do mosto com a resina (200 ml de mosto para 150 g de resina), durante 90 minutos. A solução foi depois decantada e a resina lavada do modo acima descrito. A eluição foi também feita por agitação com amónia N, por várias vezes (cerca de 100 ml de amónia de cada vez), por períodos de 20 minutos, até reacção negativa à ninidrina.

Separação por cromatografia em camada fina

Neste caso houve que ensaiar suportes, desenvolventes e reveladores tendo-se trabalhado também com soluções sintéticas de aminoácidos, nas concentrações indicadas na literatura como

normais no vinho. As soluções são feitas em água, com 10 % de isopropanol e ácido clorídrico concentrado na quantidade mínima necessária para solubilizar o aminoácido.

Suportes — Foi usado o filme Polygram CELMN 300, o filme Eastman Chromagram de celulose e sílica Gel G e, finalmente, placas cobertas com celulose MN 300 na espessura de 250 μ . Os que deram melhores resultados foram o filme de celulose Eastman Chromagram e a placa de celulose MN 300. Optámos pelo último por ser o mais económico.

Desenvolventes — Inicialmente trabalhou-se em cromatografia monodimensional usando como desenvolvente o sistema butanol-ácido acético-água (8:2:2), por ser este um dos mais citados na bibliografia. Como os resultados obtidos não foram, de modo algum, satisfatórios, passámos a trabalhar em cromatografia bidimensional, fazendo várias conjugações de desenvolventes. Assim, foram experimentados:

- Butanol-ácido acético-água (8:2:2).
- Isopropanol-água (7:3).
- Butanol-ácido fórmico-água (75:15:10).
- Etanol-butanol-água-ácido propiónico (5:5:2:5:1).
- Clorofórmio-metanol-amónia (4:4:1).
- Clorofórmio-metanol-amónia (2:2:1).
- Propanol-amónia (67:33).
- Butanol-Acetona-amónia-água (10:10:5:2).
- Isopropanol-ácido fórmico-água (20:1:5).

Finalmente, o sistema que deu melhores resultados nas nossas condições de trabalho, foi o proposto por C. HAWORTH e HEATHCOTE (14), constituído:

- 1.^a dimensão — Isopropanol-butanol-ácido clorídrico N (60:15:25).
- 2.^a dimensão — Álcool amílico terciário-butanol-acetona-metanol-amónia água (50:20:10:5:5:15).

A saturação das câmaras foi feita segundo o método proposto por I. SANKOFF e T. L. SOURKES (30), que consiste

em manter na câmara o solvente usado, substituindo-se por solvente recém-preparado, na altura de proceder ao desenvolvimento.

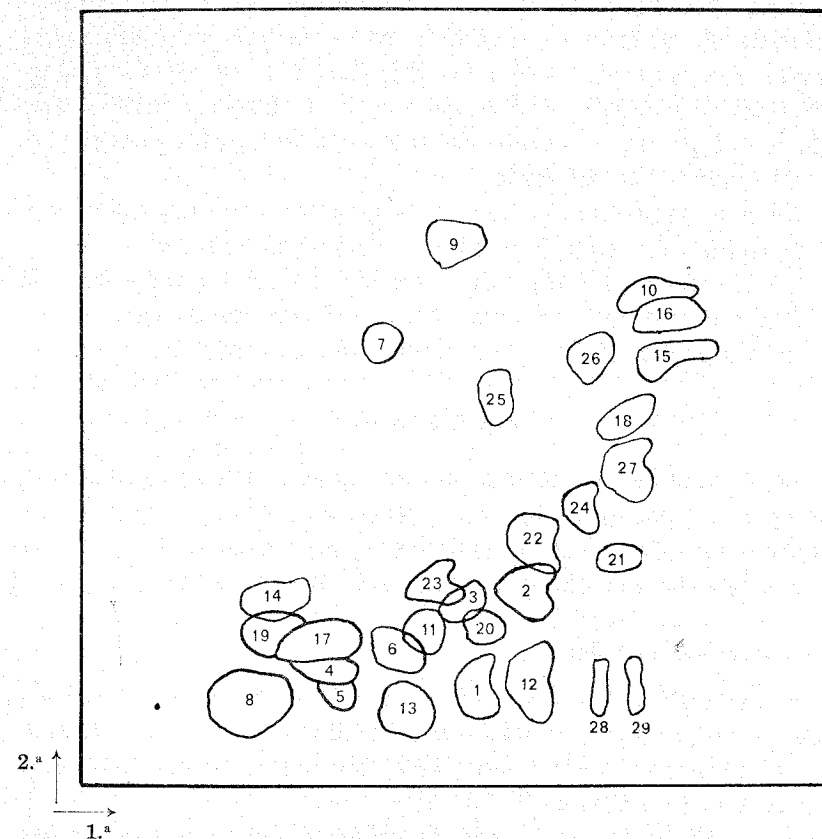


Fig. 2 — 1 — Aspártico; 2 — γ -aminobutírico; 3 — Alanina; 4 — Arginina; 5 — Asparagina; 6 — Cisteico; 7 — Cisteína; 8 — Cistina; 9 — Etanolamina; 10 — Fenilalanina; 11 — Glicina; 12 — Glutâmico; 13 — Glutamina; 14 — Histidina; 15 — Isoleucina; 16 — Leucina + Norleucina; 17 — Lisina; 18 — Metionina; 19 — Ornitina; 20 — Hidroxiprolina; 21 — Pipecólico; 22 — Prolina; 23 — Serina; 24 — Tirosina; 25 — Treonina; 26 — Triptofano; 27 — Valina; 28 — Mancha 1 — não identificada; 29 — Mancha 2 — não identificada.

Os tempos de desenvolvimento a 20° C, com este sistema, foram aproximadamente de 4 horas para a 1.^a dimensão e 3 horas para a 2.^a dimensão.

No fim de cada desenvolvimento, os cromatogramas foram secos em estufa, a 60°, durante 15 minutos.

Reveladores — Foram experimentados vários — Reagente de Dragendorff; Reagente de Ehrlich; Reagente de Nessler conjugado com solução aquosa a 1 % de metaperiodato de sódio; ninidrina + colidina; ninidrina + nitrato de cobre; ninidrina + acetato de cádmio. O escolhido foi o último, e a sua constituição é a seguinte: ninidrina 1 g; acetato de cádmio 2,5 g; ácido acético glacial 10 ml; álcool q. b. p. 500 ml; após dissolução da ninidrina e acetato de cádmio a solução é aquecida a 120° C durante 20 minutos.

Após a pulverização com o revelador, os cromatogramas são aquecidos em estufa, a 60° C durante 15 minutos.

A caracterização foi feita através da comparação de Rf's e cor das diferentes manchas, com padrões conhecidos.

A separação obtida é exemplificada na fig. 2.

RESULTADOS

Os resultados apresentados são apenas semi-quantitativos dado que a separação obtida por cromatografia, embora sendo bastante boa, não permite doseamento quer espectrofotométrico por eluição das manchas, quer mesmo densitométrico.

Aminoácidos identificados

Ácido aspártico — abundante desde o início, em todas as castas.

Ácido γ -aminobutírico — abundante desde o início, aumentando ligeiramente com a maturação; levemente mais abundante no Alicante Branco.

Alanina — Presente em vestígios desde o início em todas as castas; mais abundante no Alicante Branco.

Arginina — muito abundante desde o início, aumentando ligeiramente com a maturação; especialmente abundante no Vital e Santarém.

Asparagina — presente em vestígios desde início; mais abundante no Vital e Santarém.

Cisteico — foi apenas identificado nas colheitas de 1974; presente em pequenas quantidades, mais evidente no Vital e Santarém e mais ou menos constante em todas as colheitas.

Cisteína — presente em vestígios no ano de 1974 e em quantidades um pouco superiores nos outros anos; aumentando ligeiramente com a maturação.

Cistina — presente em pequenas quantidades, aumentando ligeiramente com a maturação e não se apresentando com grandes diferenças de casta para casta.

Etanolamina — apenas identificada em 1974, presente em pequenas quantidades em todas as castas e aumentando ligeiramente com a maturação.

Fenilalanina — presente em quantidades médias e aumentando ligeiramente com a maturação; no ano de 1974, a Tinta Miúda apresenta quantidades levemente inferiores às das outras castas.

Glicina — presente em quantidades médias e semelhantes em todas as castas, aumentando ligeiramente com a maturação.

Glutâmico — muito abundante desde o início em todas as castas.

Glutamina — apenas presente nas colheitas de 1973, em quantidades pequenas, e mais ou menos constantes ao longo da maturação; especialmente evidente no Alicante Branco, Vital e Santarém.

Hidroxiprolina — presente apenas em vestígios, em todas as castas, e ao longo de toda a maturação. Apenas o Fernão Pires, em 1973, apresenta teores um pouco mais elevados.

Histidina — presente em quantidades médias, muito semelhantes em todas as castas e aumentando muito ligeiramente no fim da maturação.

Isoleucina — presente em quantidades médias em todas as castas, aumentando ao longo da maturação.

Leucina + Norleucina — presente em quantidades médias em todas as castas, em teores levemente mais altos no Vital e Santarém, aumentando ao longo da maturação.

Lisina — presente em quantidades médias, ligeiramente mais abundante no Vital e aumentando ligeiramente com a maturação.

Metionina — em pequenas quantidades em todas as castas, com teores ligeiramente superiores para o Vital e Santarém, aumentando ao longo da maturação.

Ornitina — presente em quantidades médias em todas as castas, sem grandes alterações ao longo da maturação.

Pipecólico — apenas detectado em 1974 no Vital, Alicante Branco e Santarém, em vestígios.

Prolina — abundante desde início em todas as castas, praticamente inalterável ao longo da maturação; apenas o Vital em 1974, apresenta teores um pouco mais baixos.

Serina — presente em teores médios, semelhantes nas várias castas, praticamente inalterável ao longo da maturação.

Tirosina — em teores médios, semelhantes nas várias castas, praticamente inalteráveis ao longo da maturação.

Treonina — em teores médios semelhantes nas várias castas, apenas um pouco mais elevados na Tinta Miúda, aumentando ligeiramente com a maturação.

Triptofano — presente em quantidades pequenas, especialmente no Alicante Branco e Tinta Miúda em que por vezes só aparece no fim da maturação; aumenta ligeiramente ao longo da maturação.

Valina — presente em quantidades médias, aumentando com a maturação; o Santarém apresenta teores um pouco mais elevados que as restantes castas.

Aparecem ainda, em vestígios, duas manchas não identificadas, com os seguintes Rf, respectivamente na 1.^a e 2.^a dimensões:

Mancha 1: Rf₁ — 0,68; Rf₂ — 0,05

Mancha 2: Rf₁ — 0,75; Rf₂ — 0,05

CONCLUSÕES

Este estudo foi efectuado numa fase já um pouco adiantada da maturação, tendo, portanto, um significado relativo. Assim, deveria ser iniciado mais cedo, efectuando-se mais colheitas. Paralelamente deveria ter-se em conta um estudo dos solos e adubações. De qualquer modo, podemos verificar que:

— os aminoácidos presentes em teores mais elevados são — arginina, aspártico, aminobutírico, glutâmio e prolina;

— os presentes em teores médios são — fenilalanina, histidina, glicina, isoleucina, leucina, ornitina, serina, tirosina, treonina e valina;

— presentes em quantidades pequenas ou vestígios — alanina, asparagina, cisteico, cisteína, cistina, etanolomina, glutamina, hidroxiprolina, pipecólico e triptofano.

Ao longo da maturação nota-se um aumento marcado da isoleucina, metionina e valina: sofrem um aumento ligeiro — γ -aminobutírico, arginina, cisteína, cistina, etanolomina, fenilalanina, glicina, histidina, lisina, treonina e triptofano; não têm alterações apreciáveis: alanina, aspártico, asparagina, cisteico, glutâmico, glutamina, hidroxiprolina, histidina, ornitina, prolina, serina, tirosina e treonina.

No aspecto qualitativo não se notam, neste ensaio, diferenças apreciáveis entre as várias castas.

No aspecto quantitativo, as castas Vital e Santarém parecem ter um comportamento muito semelhante, apresentando maiores teores que as outras castas dos aminoácidos — asparagina, cisteico, glutamina, leucina, lisina e metionina. A casta Vital apresenta-se com mais prolina que as outras castas, o mesmo acontecendo com o Santarém relativamente à valina.

RESUMO

Incidu este estudo sobre algumas das castas tradicionais da Região do Oeste, sendo a avaliação dos teores de aminoácidos apenas semi-quantitativa.

Para o efeito, procedeu-se ao estudo de técnicas a usar para a extracção e identificação dos aminoácidos.

Verifica-se o aumento marcado, ao longo da maturação, de alguns aminoácidos. Quanto à comparação das várias castas, no aspecto qualitativo, não se notam diferenças apreciáveis de casta para casta, havendo, contudo, algumas diferenças no aspecto quantitativo.

RÉSUMÉ

Le sujet du travail a été l'étude de l'évolution des aminoacides pendant la maturation du raisin de quelques cépages de la Région Ouest.

Nous n'avons pas observé différences très significatives parmi les cépages, sous le point de vue qualitatif; du point de vue semi-quantitatif, quelques différences ont été observés.

Le travail a compris aussi l'étude des techniques d'extraction, séparation et identification des aminoacides.

SUMMARY

This study observed the aminoacids' evolution through the grape ripening of some of the most representative grape-vines of the West Region of Portugal.

It includes the essay of extraction and identification tecnicos of the aminoacids, to be used through the study. Only a semi-quantitative evaluation was obtained.

The aminoacids' concentration increases through the ripening. No representative qualitative differences in the grape-vines were observed. However, considering quantification, some differences were observed.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ALMEIDA, H.
1954 Identificação de aminoácidos no vinho do Porto — n.º 15.
- 2 — BIDAN, P. et ANDRÉ, L.
1958 Sur la composition en acides aminés de quelques vins. *Ann. Technol. Agric.*, vol. 4: 403-431.
- 3 — CAMPOS, L. e SEVERIN, M.
1970 Análise dos aminoácidos livres dos vinhos por cromatografia em fase gasosa. *Vin Port. Doc.*, série II, vol. 5, n.º 2.
- 4 — CASTOR, J. C. B. and ARCHER, T. E.
1956 Amino acids in must and wines — proline, serine and threonine. *Amer. J. Enol. Viticult.*, vol. 7 (1): 19-25.
- 5 — COPLEY, M. N. and TRUTER, E. V.
1969 Thin — film technique for desalting and chromatographing amino acids in two dimensions». *J. Chromatogr.*, 45: 480-483.
- 6 — CULLY, W. J.
1969 Rapid and simple TLC method for amino acids. *Clin. Chem.* 15: 902 e *C. A.*, 71-120322 u.
- 7 — CZERMIK, K. and BURZYNSKI, S.
1969 Qualitative analysis of amino acids using the multiple development of chromatograms in different elements. *Chem. Anal.* (Warsaw), vol. 14: 673.
- 8 — DIMOTAICIS, P.
1958 Determination of free amino acids in greek wines by paper chromatography. *Amer. J. Enol. Viticult.*, vol. 9 (2): 79-85.
- 9 — ELLIS JR., J. P. and PRESCOTT, J. M.
1969 A simplified buffer system for gradient elution in amino acids analysis (Technicon NC — I — automatic amino acids analyser). *J. Chromatogr.*, 43: 260.

- 10 — FANTOZZI, P. and MONTEODORO, G.
1974 Determination of free amino acids in musts and wines by gas-liquid chromatography. *Amer. J. Enol. Viticult.*, vol. 25 (3): 151-156.
- 11 — GALLANDER, J. F.; CAHOON, G. A. and BEELMAN, R. B.
1969 Free amino acids in musts of eight Eastern Grape varieties. *Amer. J. Enol. Viticult.*, vol. 20 (4): 140-145.
- 12 — GATTO, J. L. and BORDERS, JR., C. L.
1970 Séparation of leucine and isoleucine by thin-layer chromatography. *J. Chem. Educ.*, 47: 840.
- 13 — GYORGY, P.
1967 Thin-layer chromatography of aminoacids. *Chromat. Reviews*, vol. 9: 23.
- 14 — HAWORTH, C. and HEATHCOTE, J. G.
1969 An improved technique for the analysis of amino acids and related compounds on thin layers of cellulose — Part I — qualitative separation. *J. Chromatogr.* 41: 380-385.
- 15 — HAWORTH, C. and OLIVER, R. W. A.
1972 A study of the relation-ship between the chromatographic mobilities of peptides and their constituent amino acids on paper and thin-layer of cellulose. *J. Chromatogr.*, vol. 64: 305-316.
- 16 — HEATHCOTE, J. G. and HAWORTH, C.
1969 An improved technique for the analysis of amino acids and related compounds on thin layers of cellulose — Part II — The quantitative determination of amino acids in protein hydrolysates. *J. Chromatogr.*, 43: 84-92.
- 17 — KLEWER, W. M. and NASSAR, A. R.
1966 Changes in concentration of organic acids, sugars and aminoacids in grape leaves. *Amer. J. Enol. Viticult.*, vol. 17: 48-56.
- 18 — KLEWER, W. M.; NASSAR, A. R. and OLMO, H. P.
1966 A general survey of the free amino acids in the Genus *Vitis*. *Amer. J. Enol. Viticult.*, vol. 17: 112-117.
- 19 — KLEWER, W. M.
1968 Changes in the concentrations of free aminoacids in grape berries during maturation. *Amer. J. Enol. Viticult.*, vol. 19: 166-174.
- 20 — KNIGHT, C. S.
1962 Studies of chromatographic media — I — the use of conventional paper chromatography with particular reference to the separation of mixtures of amino acids. *Chromatographic Reviews*, vol. 4: 49.
- 21 — LAFON-LAFOURCADE, S. et GIUMBERTEAU, G.
1962 Evolution des aminoacides au cours de la maturation des raisins. *Vitis*, 3: 130-135.
- 22 — MAUGENET, J. and DREMEYDA, MARIE LAURE
1969 Séparation des acides aminés par chromatographie bidimensionnelle e en couche mince sur film. *Ann. Technol. Agric.*, vol. 18: 237-240.

- 23 — OUGH, C. S. and STASHAK, R. M.
1974 Further studies on proline concentration in grapes and wines.
Amer. J. Enol. Viticult., vol. 25, n.º 1: 7-12.
- 24 — PETINGA, O. S.
1960 Pesquisa de aminoácidos nos mostos das castas mais características da Região do Oeste. Relatório Final de Curso de Eng.º Agrónomo.
- 25 — PILLAY, D. T. N. and MEHDI, R.
1970 Séparation of amino acids by thin layer chromatography.
J. Chromatogr., 47: 119-123.
- 26 — POUX, C. and OURNAC, ANDRÉE
1970 Acides aminés libres et polypeptidiques du vin. *Ann. Technol. Agric.*, vol. 19 (3): 217.
- 27 — RAHM, J.; WEINOVA, A. and PROCHÁZKA, Z.
1971 The effect of the conditions of preparation of cation-exchange resins on their resolution efficiency in ion—exchange chromatography of amino acids. *J. Chromatogr.*, 60: 256-259.
- 28 — RODRIGUES, L. O.
1961 Influência dos Porta-Enxertos 41-B, 8-B, R-99 e R. do Lot sobre o valor dos índices Tecnológicos dos mostos de algumas castas cultivadas na Região Vinícola de Setúbal. Relatório Final de Curso de Eng.º Agrónomo.
- 29 — SANKOFF, I. and SOURKES, T. L.
1963 *Can. J. Bioch. Physiol.*, 41: 1-381.
- 30 — TAYLOR, I. E. P.
1970 Artefacts in aminoacids analysis. Ninhydrin-positive products of carbohydrates hydrolysis. *J. Chromatogr.*, 50: 331-333.
- 31 — TERCELY, D.
1965 Etude des composés azotés du vin. *Ann. Technol. Agric.*, vol. 14 (4): 307-319.
- 32 — THYHÁK, E. and VÁGUJFALYI, D.
1970 Dragendorff reactions for visualization of amino acide derivatives separated by paper or thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 49: 343-348.

DE VINEA ET VINO PORTUGALLÆ DOCUMENTA

Abrev.: *Vin. Port. Doc.*

TRABALHOS PUBLICADOS:

VOLUME VII

Série II — ENOLOGIA

1. Pato, Manuel Augusto da Silva, António Eugénio Mendonça e João Eduardo Viegas Fernandes — Determinação da quantidade de bitartarato de potássio existente nos mostos e nos vinhos que não precipita a uma dada temperatura.
2. San Romão, M. V. — Estudo do teor em aminoácidos das castas principais da região do oeste (Alicante Branco, Vital, Fernão Pires, Santarém e Tinta Miúda).