

AMINOÁCIDOS LIVRES E AMINOÁCIDOS TOTAIS COMO POTENCIAIS PARÂMETROS DE CARACTERIZAÇÃO ENOLÓGICA

ESTUDO COMPARATIVO EM COLHEITAS PROVENIENTES DA CASTA ROUPEIRO

A. M. P. DE VASCONCELOS * e H. CHAVES DAS NEVES **

* Departamento de Fitotecnia, Universidade Évora

** Departamento de Química, Universidade Nova de Lisboa

RESUMO

Foram analisados vinhos da casta Roupeiro Branco dos anos de 1981 e 1982 tendo-se, em cada caso, determinado os aminoácidos livres e totais. O método utilizado foi a cromatografia gás-líquido capilar dos ésteres isopropílicos dos N-heptafluorbutirilaminoácidos.

Os estudos efectuados sobre colheitas de dois anos sucessivos (1981, 1982) parecem indicar existir um perfil comum quanto às concentrações relativas dos aminoácidos livres em ambas as colheitas, enquanto que os aminoácidos totais sofrem variações. A variação existente nos aminoácidos totais é relacionada com as variações qualitativas dos oligopeptidos analisados por cromatografia gás líquido associada à espectrometria de massa (GC/MS) sob a forma de éteres trimetilsilílicos de N-heptafluorbutiril poliaminoálcoois.

INTRODUÇÃO

A importância bioquímica dos aminoácidos assenta na sua multiplicidade de funções. Como pedra basilar da estrutura proteica, os aminoácidos são indispensáveis às estruturas de suporte e enzimáticas, possuindo funções energéticas e metabólicas fundamentais. Desempenhando papel central na arquitectura celular, tornam-se, por isso, elementos de transcendente importância alimentar. A composição dos alimentos em aminoácidos é um critério importante da classificação dos alimentos (Ooghe *et al.*, 1981).

A ciência enológica tem vindo a atribuir aos aminoácidos dos vinhos uma crescente importância. É geralmente aceite,

que os aminoácidos livres definem as propriedades sensoriais de alguns alimentos (Juerg Solms, 1969 e Jiro Kirimura *et al.*, 1969), determinando muitas das suas características finais. Tal facto leva-nos a considerar que, também nos vinhos, eles vão ter influência nas características finais do mesmo (Poux, 1970 e Gallander *et al.*, 1969). A composição final é determinada pelo processo de maturação das uvas, sensível a variações climáticas, de composição de solos e práticas culturais. A composição dos mostos em aminoácidos tem sido objecto de estudos detalhados.

O nível de aminoácidos livres, sobretudo o dos dominantes na altura da maturação, foi proposto como indicador preventivo dos teores em azoto no solo (Kliwer e Cook, 1974). O conhecimento destas relações aminoácidos/azoto no solo, poderia ser ponto de referência para a detecção de deficientes técnicas culturais, com vista a um melhoramento da qualidade dos vinhos. O teor dos mostos em aminoácidos influencia as características sensoriais (organolépticas) do vinho, visto que, sendo percursores de álcoois superiores (Ough e Bell, 1980) os aminoácidos contribuem, em certa medida, para as características aromáticas do produto, influenciando os processos bioquímicos do envelhecimento. Por outro lado, eles são necessários ao processo de fermentação como substratos para o desenvolvimento das leveduras (Lafon-Lafourcade e Guimberteau, 1962).

Se durante o processo de maturação o azoto orgânico aumenta à custa do teor de azoto mineral, com um substancial aumento dos níveis de prolina (Lafon-Lafourcade e Guimberteau, 1962) — um dos aminoácidos menos assimilável pela levedura durante a fermentação — o teor de aminoácidos baixa notavelmente até ao sexto dia, devido essencialmente ao consumo pelas leveduras (Kluba *et al.*, 1978).

Durante este processo, a prolina é o aminoácido que sofre menor consumo. O teor de aminoácidos aumenta então ligeiramente nos estádios finais da fermentação, para tal contribuindo fortemente os fenómenos de autólise de leveduras.

Os fenómenos bioquímicos que determinam a qualidade final do vinho movem-se dentro de um círculo, no que se refere à composição em aminoácidos: a composição final em aminoácidos depende do balanço entre os aminoácidos consumidos e aminoácidos sintetizados ou libertados por autólise por cada

tipo de levedura; por outro lado, para cada tipo de levedura, a sua acção depende das fontes de azoto disponíveis à partida (Vasconcelos e Chaves das Neves, 1985). Existem indicadores de que estirpes de leveduras importantes no processo de vitivinificação podem ser quimiotaxonomicamente caracterizadas pela sua capacidade em utilizar determinado tipo de aminoácidos (Vasconcelos e Chaves das Neves, 1985).

Métodos de «pattern recognition» e «cluster analysis» têm sido aplicados ao estudo da caracterização topológica, com base nos componentes inorgânicos (Siegmond e Bachman, 1978), compostos voláteis (Ksman e Kowalski, 1980), e mesmo os aminoácidos, em conjunto com outros componentes ou após hidrólise dos peptidos e proteínas (Cabezudo, 1982).

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

O presente trabalho descreve os resultados obtidos no estudo da relação aminoácidos livres/aminoácidos peptídicos para um vinho elementar obtido a partir de uvas da casta Roupeiro, proveniente de uma vinha implantada num campo de ensaio na vinha do Esporão, em Reguengos de Monsaraz. As determinações incidiram sobre duas colheitas de anos sucessivos, 1981 e 1982.

Como método analítico recorreu-se à cromatografia gás-líquido em colunas capilares dos ésteres isopropílicos dos N-heptafluorbutirilaminoácidos (para uma revisão ver Frank, 1984). Os peptidos foram cromatografados sob a forma de éteres trimetilsilílicos dos poliaminoálcoois correspondentes (Frank e Chaves das Neves, 1978). Estes derivados, além de excelentes propriedades cromatográficas possuem ainda características de fragmentação que os tornam especialmente indicados para a análise por cromatografia gás-líquido/espectrometria de massa (GC/MS).

MATERIAL E MÉTODOS

Cromatografia

Utilizou-se um cromatógrafo da marca Pye Unicam, modelo 4500, equipado com um detector de ionização de chama, um repartidor de fluxo e uma coluna capilar de vidro de parede revestida com OV-101 de 34 m \times 0.18 mm d. i.

Como gás de arrastamento utilizou-se o hidrogénio. Pressão de entrada de 50 kPa. As análises foram efectuadas a temperatura programada: temperatura inicial de 110° C, mantida isotérmica durante 5 min., programada linearmente a 3° C/min. até 250° C. Os factores de resposta dos derivados dos aminoácidos individuais foram calculados relativamente ao correspondente derivado de cicloleucina a partir de uma solução contendo 2.5 mg de cada aminoácido da qual se utilizaram 300 μ l para derivatizar. Os resultados quantitativos foram obtidos pelo uso de um integrador computador Shimadzu CR3-A. Os ensaios de GC/MS foram efectuados num instrumento Shimadzu, modelo QP-1000.

Reagentes

Os padrões de aminoácidos e o etanotiol foram adquiridos à firma BDH e são cromatograficamente puros. A cicloleucina e o reagente Borano-THF 1M foram adquiridos à firma Aldrich Europe.

As soluções alcoólicas de HCl foram obtidas por adição lenta de cloreto de acetilo Merck (Darmstadt), recentemente destilado, à quantidade mínima do correspondente álcool, a baixa temperatura, e o volume completado em balão volumétrico até se atingir a concentração final desejada. O isopropanol e o diclorometano foram fornecidos pela firma Merck (Darmstadt). O anidrido heptafluorbutírico (HFBA) foi adquirido à firma Tokyo Kasei e utilizado após destilação prévia. O Hexametildisilazano (HMDS) e a piridina foram fornecidos pela firma Pierce Chemical Co. tendo o primeiro sido utilizado directamente e a piridina após secagem prévia. A fase líquida OV-101 utilizada na preparação da coluna capilar foi a comercializada pela Alltech Associates.

Isolamento dos aminoácidos e peptidos

As amostras de vinhos (20 ml) foram desproteinizadas com álcool 1:4 durante 15 min. a -10°C e, após centrifugação, o excesso alcoólico foi eliminado por evaporação à secura em evaporador rotativo. O resíduo foi retomado com água destilada em balão volumétrico, e foram adicionados 2 ml de uma solução aquosa de cicloleucina de 37 mg/10 ml e o volume completado a 10 ml pela adição de água destilada.

A solução foi passada por uma coluna de 17 g de resina catiónica Dowex 50W-X8 sob forma ácida, e eluída com 50 ml de água destilada e 100 ml de amónia 4M. A solução amoniacal foi concentrada à secura, em vácuo, refeito o volume de 10 ml em balão aferido por adição de água destilada.

250 μl desta solução foram transferidos para um frasco de derivatização, o solvente evaporado sob corrente de azoto e o resíduo, após secagem sob vácuo, foi derivatizado.

Derivatização

Esterificação

O resíduo seco foi dissolvido em 250 μl de 4M HCl/isopropanol e adicionaram-se cerca de 10 μl de etanotiol, o frasco de derivatização foi fechado e aquecido durante 30 min. a 110°C . Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente foi evaporado sob corrente de azoto.

Acilação

Ao resíduo seco da operação anterior foram adicionados 100 μl de diclorometano, 50 μl de HFBA e 10 μl de etanotiol como antioxidante. A mistura foi aquecida a 150°C durante 15 min. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado sob corrente de azoto. O resíduo foi dissolvido em 5 μl de diclorometano e 0.2-0.3 μl desta solução injectados no cromatógrafo.

Derivatização de peptidos

500 μl da solução de aminoácidos e peptidos foram transferidos para um frasco de derivatização e secos sob corrente de azoto. Ao resíduo adicionaram-se 150 μl de HFBA e deixou-se

à temperatura ambiente durante 1/2 hora. Após evaporação sob corrente de azoto, adicionaram-se 300 μ l de uma solução de 1M BH_3 em THF e a solução foi aquecida a 90° C durante 30 min., após o que o excesso de borano foi destruído por adição lenta de metanol a 0° C.

A solução foi novamente evaporada à secura sob corrente de azoto, o resíduo dissolvido em 100 μ l de 1M HCl/metanol e aquecido a 90° C para destruição do complexo de borano. Esta operação foi repetida por duas vezes.

Após evaporação a amostra foi dissolvida em 40 μ l de piridina seca. Adicionaram-se 35 μ l de HMDS após o que a solução foi aquecida a 80° C durante 30 min. A solução foi então directamente utilizada para cromatografia.

Hidrólise

Dergradação de aminoácidos nas condições de hidrólise

200 μ l de uma solução aquosa contendo aproximadamente 0.04 mg de cada um dos aminoácidos em 10 ml foram colocados num frasco de derivatização ao qual se adicionou igual volume de HCl 6M. A solução foi aquecida a 110° C. Os ensaios foram efectuados com tempos de reacção de 6, 16 e 24 horas.

Hidrólise dos peptidos dos vinhos

250 μ l do solução contendo os aminoácidos e peptidos foram transferidos para um frasco de derivatização e o solvente evaporado à secura sob corrente de azoto. Ao resíduo adicionaram-se 250 μ l de uma solução de HCl 6M, o frasco foi fechado e aquecido a 110° C. Foram estudados ensaios com 6, 16 e 24 horas. Em cada caso, após arrefecimento, o solvente foi evaporado sob corrente de azoto e o resíduo derivatizado como descrito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição em aminoácidos livres e após hidrólise ácida foi estudada em dois vinhos elementares, obtidos a partir da casta Roupeiro respectivamente nos anos de 1981 e 1982. O método analítico utilizado foi a cromatografia gás-líquido sobre colunas capilares dos ésteres isopropílicos dos N-heptafluorbu-

tirilaminoácidos. A alta sensibilidade, elevado poder de resolução e versatilidade do método, tornam-no ideal para o estudo de misturas complexas. A possibilidade de acoplamento ao espectrômetro de massa, permite complementar a identificação dos componentes individuais de modo inequívoco. Como padrão interno para o controlo do processo de isolamento e derivatização, bem como para as determinações quantitativas, foi utilizada a cicloleucina. Este aminoácido sintético aparece nos cromatogramas bem resolvido, sem interferir na análise, para além de estar ausente das misturas naturais analisadas.

No Quadro I apresentam-se os resultados obtidos para cada um dos vinhos nos anos estudados, sendo a concentração em aminoácidos livres apresentada na coluna 1, e na coluna 2 os valores obtidos após hidrólise total das ligações peptídicas efectuada por tratamento com HCl 6M a 110° C durante 24 horas, corrigidos em função dos valores correspondentes à destruição real dos aminoácidos livres durante as condições de hidrólise.

Durante o tratamento hidrolítico, os aminoácidos livres sofrem degradação mais ou menos pronunciada. A extensão dessa degradação depende da natureza de cada aminoácido, conforme se pode verificar pela observação da Fig. 1. Aminoácidos como a teonina, ac. α -aminobutírico, glicina, alanina, valina, norleucina e leucina mantêm-se praticamente sem variação durante as primeiras 6 horas nas condições do ataque hidrolítico. Entre as 6 e as 16 horas, porém, sofrem degradação importante que, em alguns casos, atinge valores superiores a 50 %, atingindo a estabilização ao fim deste tempo. A serina e a tirosina, no entanto, sofrem degradação contínua durante todo o processo, mostrando-se fortemente sensíveis a tratamento ácido prolongado. Outro grupo de aminoácidos constituído por ac. aspártico, prolina, ornitina, fenilalanina e ac. glutâmico parecem ser mais resistentes ao tratamento ácido, pelo menos durante as primeiras dezasseis horas. Tratamento mais prolongado tende à sua destruição total, sofrendo a sua concentração uma queda brusca das dezasseis às vinte e quatro horas. Um terceiro grupo de aminoácidos em que se inglobam a cisteína, o triptofano e a hidroxiprolina sofrem destruição brusca logo nas primeiras seis horas de reacção. A lisina, a metionina e de certo modo a própria histidina mostram estabilidade em maior ou menor grau sendo de todos estes a histidina aquele que mais sofre

QUADRO I

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

Comparaison des concentrations relatives des acides aminés libres et totaux du vin Roupeiro des années de 1981 et 1982

Aminoácidos	Concentrações relativas (‰)			
	Livres		Totais após hidrólise (*) (HCl 6 M. 24 hrs)	
	Colheita		Colheita	
	1981	1982	1981	1982
Alanina	6.9	7.3	7.5	3.4
Glicina	3.7	3.7	5.3	2.6
Valina	3.2	1.5	3.1	25.9
Treonina	2.9	2.2	3.1	3.4
Serina	4.4	4.6	5.1	1.7
Leucina	7.8	5.6	7.8	5.6
Prolina	37.0	48.4	32.2	16.4
Cisteína	6.4	7.4	10.8	2.6
Ac. Aspártico	4.4	4.2	6.2	9.5
Hydroxiprolina	1.3	1.8	2.0	0.4
Metionina	1.5	1.0	0.5	1.6
Ac. Glutâmico	6.2	6.3	7.2	8.6
Fenilalanina	4.7	2.3	5.9	4.3
Ornitina	3.6	—	2.8	—
Lisina	5.6	2.4	7.4	7.8
Tirosina	0.3	1.2	—	6.0

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

durante as primeiras seis horas em que a queda de concentração atinge os 50 % para estabilizar seguidamente.

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

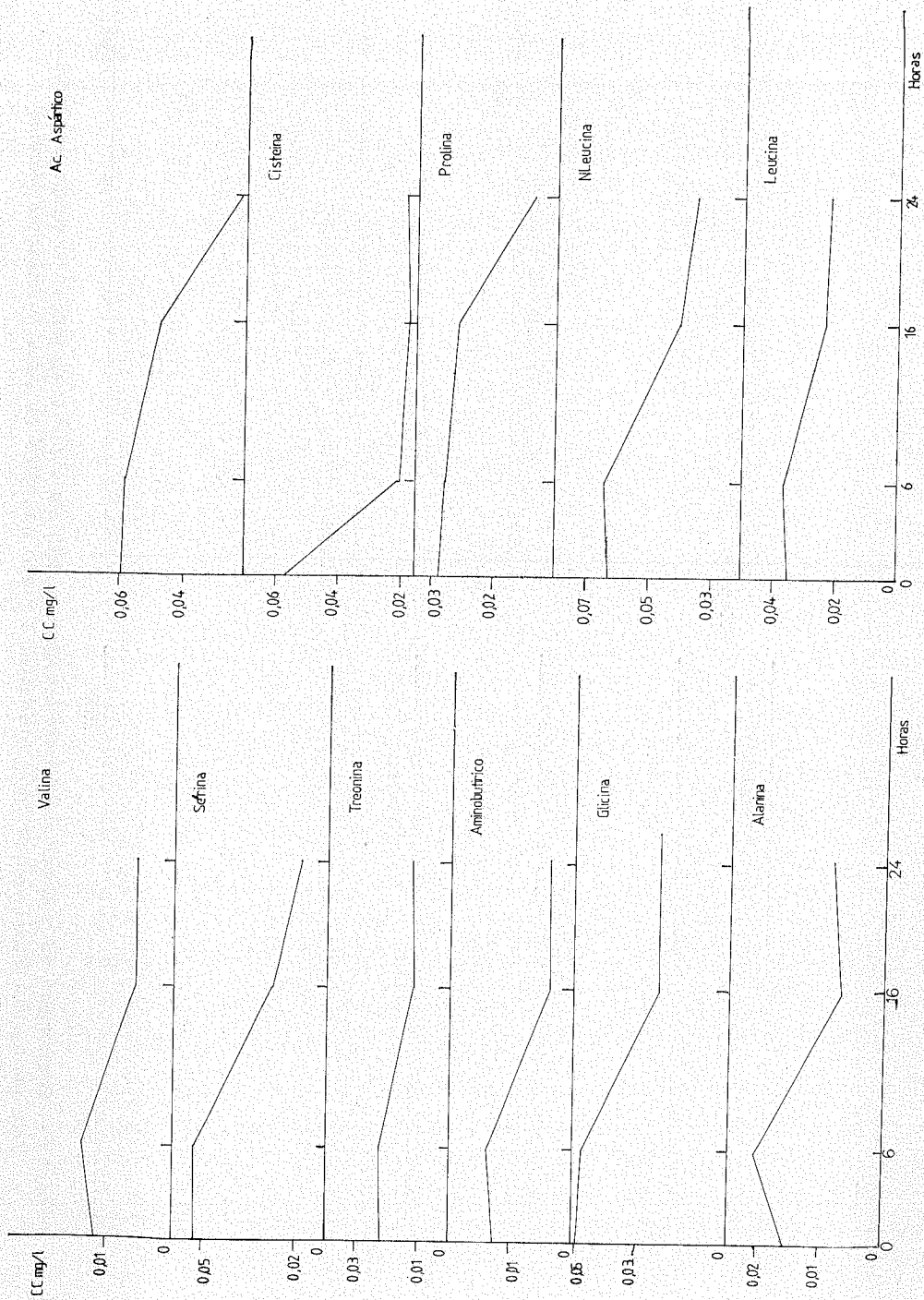


Fig. 1-A — Degradação dos aminoácidos por tratamento com HCl 6M a 110° C em função do tempo de reacção.
Dégradation des acides aminés après traitement à 110° C avec HCl 6M selon le temps de reaction.

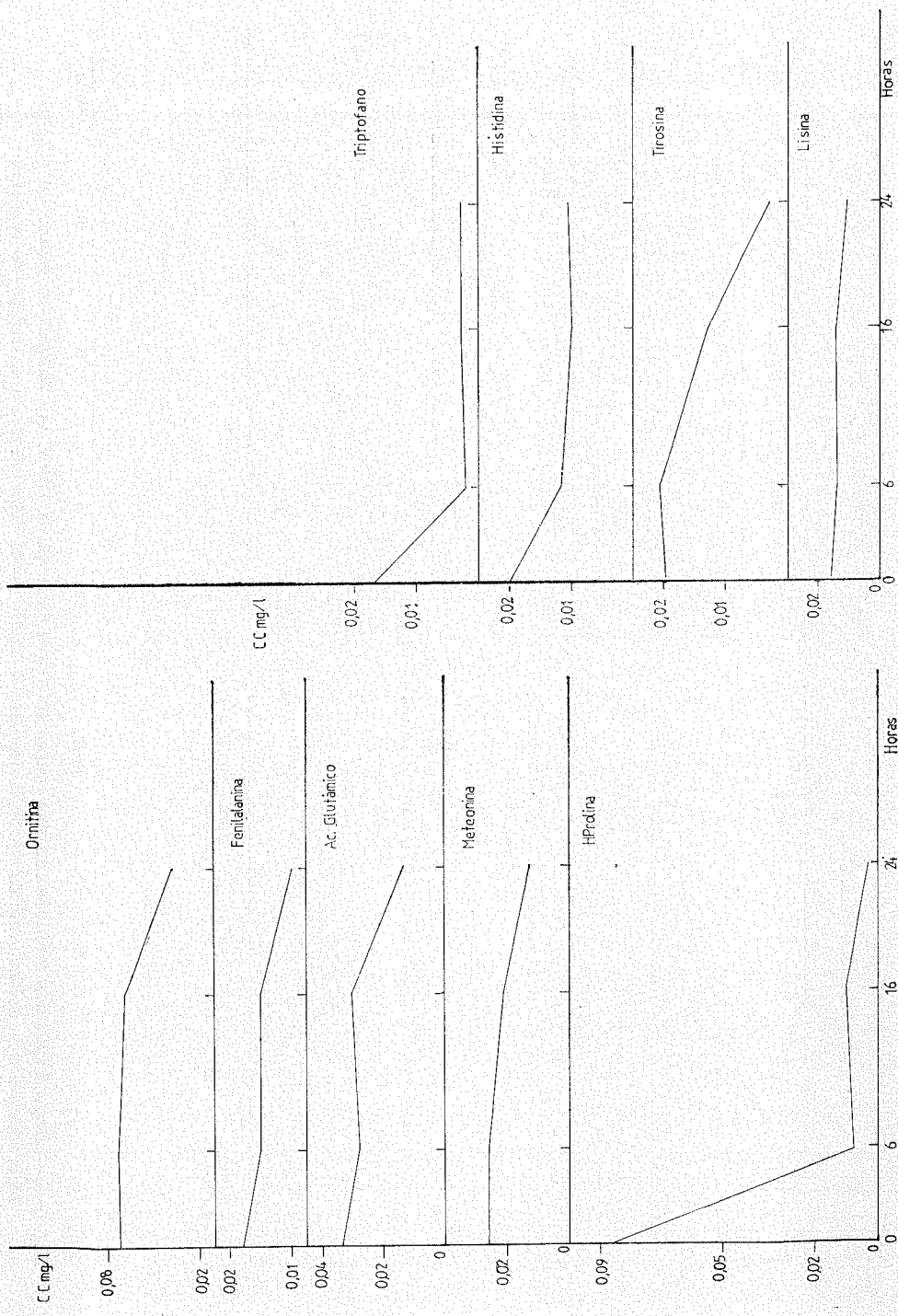


Fig. 1-B — Degradação dos aminoácidos por tratamento com HCl 6M a 110° C em função do tempo de reação.
Dégradation des acides aminés après traitement à 110° C avec HCl 6M selon le temps de réaction.

Na Fig. 2 resumem-se, de forma gráfica e comparativamente, os resultados obtidos em cada um dos anos estudados.

Assim, se exceptuarmos a fenilalanina, a lisina e a tirosina onde as variações de concentração se mostram mais significativas, parece poder afirmar-se que, pelo menos nos anos estudados, as concentrações relativas dos aminoácidos livres obedecem a um perfil comum. O mesmo já não se pode afirmar no

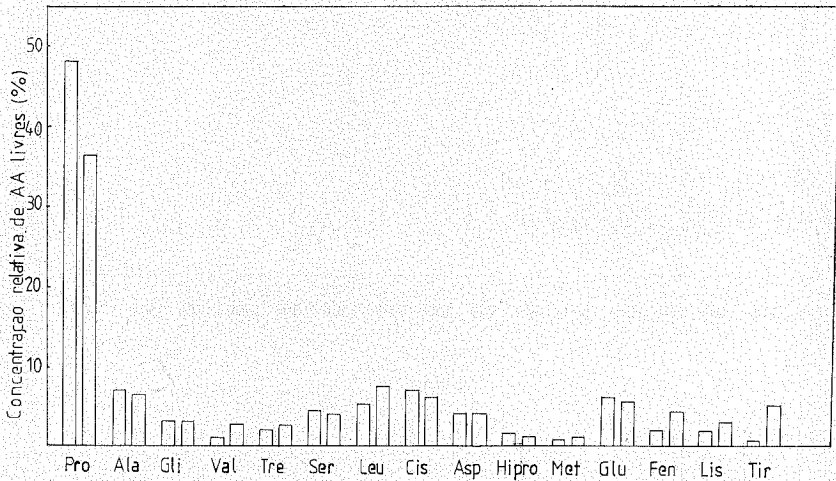


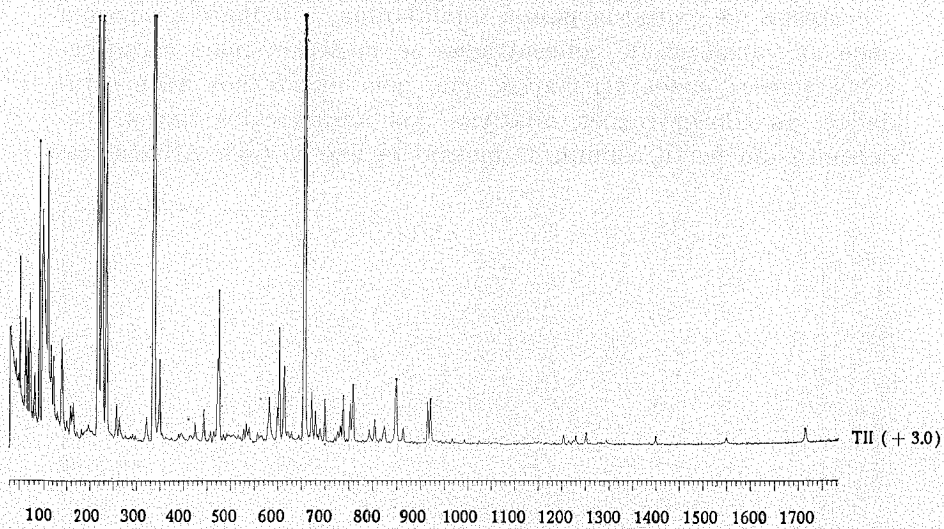
Fig. 2 — Concentrações relativas dos aminoácidos livres do vinho Rouqueiro das colheitas de 1981 e 1982.

Concentrations relative des acides aminés libres du vin Rouqueiro des vendanges de 1981 et 1982.

caso dos valores obtidos para a concentração relativa dos aminoácidos após hidrólise. Aqui, as variações observadas em cada ano nos aminoácidos individuais são importantes, sobretudo para alguns dos aminoácidos. Tal é o caso da alanina, glicina, valina, serina, prolina, cisteína, hidroxiprolina, metionina e tirosina.

Comparando em cada ano os resultados obtidos para a libertação de aminoácidos após hidrólise, pode ainda observar-se que são diferentes os aminoácidos cuja concentração aumenta após hidrólise. No que se refere ao vinho da colheita de 1981 o tratamento hidrolítico provoca aumentos da concentração de alanina, glicina, cisteína, ac. aspártico (ou asparagina) hidroxiprolina, ac. glutâmico (ou glutamina), fenilalanina e lisina.

A



B

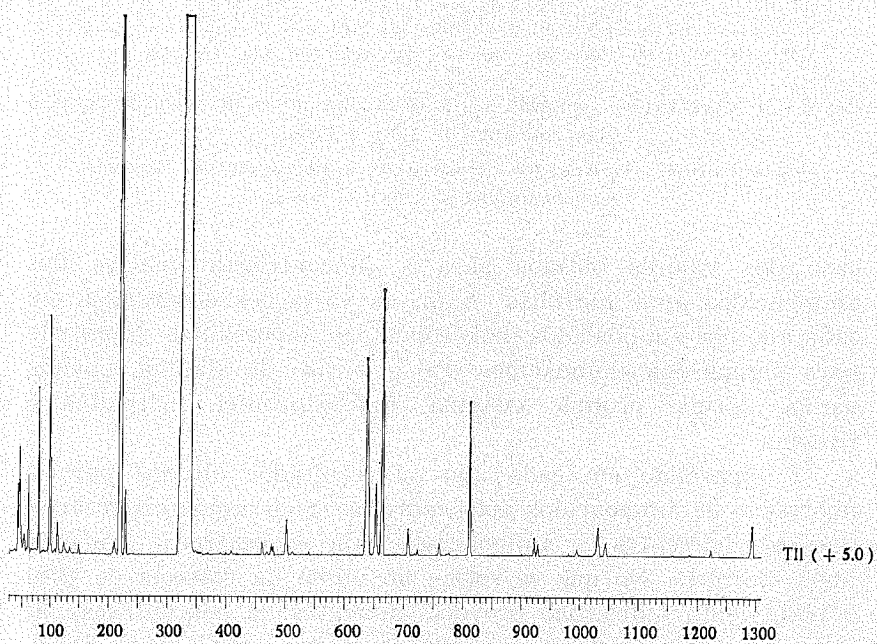


Fig. 3.

Na colheita de 1982 os aminoácidos libertados mais significativamente são, por outro lado, valina, treonina, ac. aspártico (ou asparagina), metionina, ac. glutâmico (glutamina), fenilalanina, lisina e tirosina.

Estes resultados parecem indicar que, nos anos estudados, a variação sazonal se faz sentir fundamentalmente ao nível dos aminoácidos dos peptidos, enquanto o perfil dos aminoácidos livres permanece.

A cromatografia gás-líquido de alta resolução em colunas capilares oferece-se como um método adequado à separação e identificação de oligopeptidos após adequada derivatização (Nau, 1976, Nau and Bieman, 1976). A redução dos N-heptafluorbutirilaminoácidos pelo reagente $\text{BH}_3:\text{THF}$ conduz à formação de poliaminoálcoois que, após trimetilsililação, são suficientemente voláteis para a análise por CG/MS (Frank e Chaves das Neves, 1978). Estes derivados apresentam, excelentes propriedades cromatográficas e espectros de massa contendo informação directa sobre a sua sequência de aminoácidos.

A Figura 3 mostra os traçados de corrente iónica total correspondente aos oligopeptidos existentes nos vinhos elementares provenientes da casta Roupeiro nas colheitas de 1981 e 1982. Após derivatização a simples inspecção do traçado mostra profundas diferenças qualitativas no teor em oligopeptidos. Os resultados mostram que, nas condições usadas, o perfil de

Fig. 3 — TIC dos oligopeptidos do vinho Roupeiro, sob a forma de éteres trimetilsilílicos de N-heptafluorbutirilpoliaminoálcoois. Condições cromatográficas: coluna capilar de vidro de $25\text{ m} \times 0.18\text{ mm}$ d.i. revestida com OV-101. Gás de arrastamento, hélio $p_i = 75\text{ kPa}$; razão de repartição, 1/50; temperatura do forno: 110°C por 5 min., aquecido linearmente a $3^\circ\text{C}/\text{min.}$ até 260°C ; temp. do inj. 250°C temp. da interface e da fonte iónica, 280°C . Energia 70eV. , frequência do varrimento m/z $50\text{-}700/1.5\text{ s}^{-1}$;
A — Vinho Roupeiro de 1981, B — Vinho Roupeiro de 1982.

TIC des oligopeptides du vin Roupeiro sous la forme de éthers trimetilsililés des poliaminoálcooles N-heptafluorbutyryl. Conditions chromatographiques: colonne en verre, $25\text{ m} \times 0.18\text{ mm}$ i.d. revêtus avec OV-101. Gaz vecteur hélium $p_i = 75\text{ kPa}$; rapport de division, 1/50; température du four: 110°C par 5 min. programmé linéairement à $3^\circ\text{C}/\text{min.}$ jusqu'à 260°C ; temp. inj. 250°C ; temp. de l'interface et de la source ionique 280°C . Energie 70eV.

*Vitesse du scan 1.5 s^{-1} m/z $50\text{-}700$; A — Vin Roupeiro 1981,
B — Vin Roupeiro 1982.*

aminoácidos totais após hidrólise, sofre uma variação significativa para cada um dos anos de colheita.

Foi referido que o perfil de aminoácidos totais após hidrólise, poderia constituir parâmetro analítico adequado à caracterização de vinhos. Os resultados obtidos na presente investigação mostram que, no caso estudado, o perfil de aminoácidos livres mostra comportamento sazonal mais homogêneo, de acordo aliás com outros trabalhos (Vasconcelos e Chaves das Neves, 1984).

RÉSUMÉ

Acides aminés libres et totaux comme potentiels paramètres pour la caractérisation énelogique. Étude comparative dans des vins du cépage Roupeiro

Les acides aminés libres et totaux de deux vins du cépage Roupeiro des années de 1981 et 1982 ont été analysés par chromatographie capillaire en phase gazeuse sous la forme de ésters isopropyliques N-heptafluorbutyryl.

La comparaison des résultats obtenus pour chaque vendange indique un profil commun pour les acides aminés libres pendant que les acides aminés totaux presentent des variations importantes.

Les différences observées peuvent être expliquées par des variations qualitatives des oligopeptides dans chaque vin. Les oligopeptides ont été analysés par chromatographie gazeuse associé à l'espectrometrie de masse après dérivatisation sous la forme de éthers O-TMS de N-heptafluorbutyryl poliaminoalcooles.

SUMMARY

Free and total aminoacids as potential parameters for enological characterization. Comparative study on wines from the Roupeiro variety

Free and total amino acids from the Portuguese wine Roupeiro of the years 1981 and 1982 have been studied using capillary gas chromatography. Amino acids have been analysed as the corresponding N-heptafluorbutyryl isopropyl esters.

The results obtained from the two vintages seem to indicate that relative free amino acid concentration are maintained in both vintages. Total amino acids, however, exhibit strong variations. The differences observed in the total amino acids are attributed to qualitative changes of the oligopeptides composition from each wine. Oligopeptides have been analysed by capillary gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) as the corresponding N-heptafluorbutyryl poliaminoalcohols trimethylsilylated.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cabezudo Maria Dolores
1982 Sobre los principales datos analíticos para resolver algunos problemas enológicos. Conferência realizada na J. N. V., Lisboa 13-17 de Junho.
- Frank H. e Chaves das Neves H. J.
1978 Use of borane as reducing agent in sequence analysis of peptides by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom.*, **152**: 357-362.
- Frank, H.
1984 Capillary Gas Chromatography of Amino Acid, In: Glass Capillary Chromatography in Medicine, Clinical Chemistry and Pharmacology (H. Jaeger Ed.) Mancel Dekker, Inc. New York.
- Gallander, J. F., G. A. Gahoon and R. B. Beelman
1969 Free amino acids in musts of eight eastern varieties. *Am. J. Enol. Vitic* **3**: 140-144.
- Jiro Kirimura, Akira Shimizu, Akimitsu Kimizuka, Tsunehiko Ninomiya and Noboru Katsuya
1969 The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. *J. Agr. Food Chem.* **17** (4): 689-695.
- Juerg Solms
1969 The taste of amino acids, peptides, and proteins. *J. Agr. Food Chem.* **17** (4): 686-689.
- Kliewer M. A. e James A. Cook
1974 Arginine levels in grape canes and fruits as indicators of nitrogen status of vineyards. *Am. J. Enol. Vitic.*, **25** (2): 111-118.
- Kluba Richard M., Leonard R. Mattick e L. Ross Hackler
1978 Changes in concentration of free and total amino acid of several native american grape cultivars during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **29** (3): 181-186.
- Kswan Wing-On e Bruce R. Kowalski
1980 Pattern recognition analysis of gas chromatographic data Geographic classification of Wines of *Vitis Vinifera* cv. Pinot Noir from France and the United States. *J. Agric. Food Chem.*, **28**: 356-359.
- Lafon-Lafourcade S. e G. Guimberteau
1962 Evolution des aminoacides au cours de la maturation des raisins. *Vitis*, **3**: 130-135.
- Nau H.
1976 Sequenzanalyse von Polypeptiden und Protein mit der Kombinierten Gaschromatographie-Massenspektrometrie. *Angew-Chem.*, **88** (3): 74-86.
- e Bieman K.
1976 Aminoacid sequencing by gas-chromatography-mass spectrometry using perfluoro-dideuteroalkylated peptide derivatives. A. Gas chromatographic retention indices. *Anal. Biochem.*, **73**: 139-153.
- 1976 B. Interpretation of mass spectra. *Anal. Biochem.*, **73**: 154-174.

Ough C. S. e A. A. Bell

- 1980 Effects of nitrogen fertilization of grapesvines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **31** (2): 122-133.

Ooghe W., H. Kastelijn e A. de Waele

- 1981 Determination de l'origine d'un vin rouge à l'aide du spectre des acides aminés. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **74** (798): 391-408.

Poux, C.

- 1970 Les acides aminés dans les moûts et les vins. *Rev. Franc. Oenol.* **38**: 5.

Siegmund Horst e Knut Bachmann

- 1978 Anwendung der numerischen Taxonomie für die Klassifizierung von Weinen. *Z. Lebensm. Unters-Forsch*, **166**: 298-303.

Vasconcelos A. M. e H. J. Chaves das Neves

- 1984 Estudo comparativo de castas vinícolas pela composição de vinhos elementares em D e L aminoácidos livres e oligopeptidos. Comunicação apresentada no 2.º Encontro Nacional de Biotecnologia, Porto 24-28 Fevereiro.

- 1985 Characterization of *Saccharomyces* Sp. through determination of aminoacid profiles by capillary gas chromatography. *J. H. R. C. & C. C.*, 8 Setembro 547-550.