Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP

Paulo Alexandre Fonseca Herbert Ribeiro

# Compostos Aminados Vestigiais em Vinhos do Alentejo

## Aminoácidos livres, aminas e carbamato de etilo

Porto, 2001

**UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Faculdade de Engenharia**

**Departamento de Engenharia Química**

# COMPOSTOS AMINADOS VESTIGIAIS EM VINHOS DO ALENTEJO

## AMINOÁCIDOS LIVRES, AMINAS E CARBAMATO DE ETILO

Paulo Alexandre Fonseca Herbert Ribeiro

UNIVERSIDADE DO PORTO
Faculdade de Engenharia
BIBLIOTECA
Nº

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química, pela Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Orientadora: Prof. Doutora Maria Arminda Costa Alves

**Porto**

**2001**

66(043)/RIBp/COM
UNIVERSIDADE DO PORTO
Faculdade de Engenharia
BIBLIOTECA M
N.º 60148
CDU 66(043)
Data 1 / 2 /2002

**nº de arquivo:**

**"copyright"**

Agradecemos a todas as entidades destacadas a seguir:

Este trabalho inseriu-se no projecto - Análise Vestigial de Vinhos de Qualidade da Região do Alentejo - PRAXIS XXI 3/3.2/AGR/95, no qual se incluiu a Bolsa de Doutoramento BD/3261/96, financiado pela **Fundação da Ciência e Tecnologia**.

Parte da amostragem, referente a mostos e vinhos resultantes de microvinificações, foi realizada com o apoio da **Universidade de Évora**, pela Eng.ª Maria João Cabrita, sendo que esse material será também objecto de estudo da sua tese de doutoramento, embora com diferentes finalidades. Outra parte das amostras estudadas, nomeadamente os 67 vinhos comerciais de 1997, foi fornecida pela **Comissão de Vitivinicultura da região do Alentejo**. As amostras de Vinho da Madeira, foram fornecidas pela **Universidade da Madeira**.

O trabalho experimental foi realizado no **LEPÆ** – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente e Energia, do Departamento de Engenharia Química da FEUP, à excepção da parte inicial do desenvolvimento do método analítico de determinação do carbamato de etilo, que foi realizado no Laboratório do **Instituto do Vinho do Porto**, que forneceu igualmente as amostras de aguardente e de Vinho do Porto, utilizadas no desenvolvimento desse método.

O método de análise do carbamato de etilo foi protegido por registo de uma Patente Portuguesa no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (nº 102520), pela **Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto**, e publicada no Boletim de Propriedade Industrial de 30 de Abril de 2001.

## Resumo

Os aminoácidos livres são compostos que apresentam elevada importância: tecnológica, ao nível das fermentações alcoólica e maloláctica onde são nutrientes essenciais; qualitativa, ao nível do perfil final de compostos fermentativos e pós-fermentativos; como elementos definidores de tipicidade e genuinidade, ao nível do efeito que diferentes "terroir" apresentam nas suas concentrações; e na saúde e segurança alimentar, ao nível da presença de compostos com influência na saúde humana, nos quais as aminas e o carbamato de etilo se incluem.

O presente trabalho versa o desenvolvimento de um método analítico por cromatografia de líquidos de alta eficiência (HPLC), com detecção dos derivados do *o*-ftaldialdeído (OPA) e do cloroformato de 9-fluoro-enil-metilo (FMOC-Cl), para a quantificação simultânea de 33 compostos pertencentes aos grupos dos aminoácidos livres e aminas que ocorrem normalmente em mostos e vinhos, e a partir dele, o estudo da influência que os factores casta, sub-região de produção, ano de produção e produtor, apresentaram nos teores daqueles compostos em mostos e vinhos do Alentejo. Estudou-se também a relação entre os teores de: aminoácidos assimiláveis; de aminoácidos aminogénicos; dos precursores das aminas; de dióxido de enxofre livre e total; de acidez volátil; e do pH, nos teores de cada amina e da soma de aminas biogénicas e totais, de mostos e vinhos. Descreve-se ainda o desenvolvimento de uma nova metodologia analítica por HPLC, detecção de fluorescência e derivatização com 9-xantidrol, para a análise de carbamato de etilo em vinhos, vinhos licorosos e aguardentes (Patente Portuguesa nº 102520).

O método analítico, desenvolvido para a análise dos teores de carbamato de etilo em bebidas alcoólicas, permite a análise deste composto quer em aguardentes, quer em vinhos ou em vinhos licorosos, com valores de precisão, exactidão e limites de detecção semelhantes aos obtidos com o método de referência por GC-MS.

O grupo de amostras estudadas compreendeu 67 vinhos comerciais, brancos e tintos, de 1997, de 8 sub-regiões Alentejanas diferentes, 38 vinhos brancos e tintos monovarietais de 10 das principais castas do encepamento Alentejano, dos anos de 1997 e 1998 e provenientes de 5 sub-regiões diferentes, e 39 mostos das mesmas 10 castas e das mesmas sub-regiões, obtidos nos anos de 1998 e 1999. Em 5 desses mostos tintos e em 5 brancos, foram acompanhados, em 1998, os teores de aminoácidos livres e aminas biogénicas no decorrer das fermentações alcoólica e maloláctica.

Verificou-se que tanto os vinhos tintos como os brancos, apresentavam teores relativamente altos de azoto aminado assimilável (média de 100 mg N/L nos brancos e 60 mg N/L nos tintos), o que pode constituir um factor de instabilidade microbiológica, principalmente no caso dos vinhos brancos.

Os teores de aminas biogénicas encontrados nos 67 vinhos comerciais analisados, podem considerar-se baixos, sobretudo se os compararmos com os verificados noutros alimentos. Nos vinhos comerciais, a histamina, a tiramina, a cadaverina, a triptamina e a β-feniletilamina, encontraram-se em média, sempre abaixo dos 5 mg/L, com excepção da putrescina e da tiramina nos vinhos tintos. A variável mais influente nos teores de aminas biogénicas e totais foi a soma dos aminoácidos livres assimiláveis. A relação positiva verificada entre esses parâmetros, sugere que uma redução dos teores de aminoácidos assimiláveis dos vinhos, pode ter um efeito qualitativo positivo, no que refere aos níveis de aminas acumuladas nesses vinhos.

Nos mostos e vinhos monovarietais estudadas, verificou-se que os factores casta, sub-região e o ano, em parte, influenciaram mais os teores de aminas voláteis e biogénicas em vinhos tintos. As concentrações das aminas etanolamina e etilamina não sofreram grandes alterações quer durante quer após as fermentações dos mostos brancos. A histamina pode ter sido produzida quer durante a fermentação alcoólica quer durante ou após a fermentação maloláctica, enquanto que a tiramina e a putrescina, parecem ter tido origem principalmente após a fermentação alcoólica.

No que respeita ao de carbamato de etilo, foram analisadas 65 amostras, das quais 31 foram vinhos do Alentejo, tendo sido encontrados os teores médios (média ± desvio padrão): 91,2 ± 47,9 μg/L para aguardentes; 31,9 ± 21,2 μg/L para Vinhos do Porto; 33,5 ± 14,5 μg/L para Vinhos da Madeira, e 9,3 ± 11,6 μg/L para amostras de vinhos do Alentejo. Os teores médios de citrulina encontrados nos vinhos comerciais estudados (6,0 mg/L), não colocam problemas ao nível da formação de carbamato de etilo durante o estágio longo destes vinhos.

A análise de componente principal, aplicada aos teores de aminoácidos livres e aminas, permitiu distinguir os vinhos tintos comerciais provenientes da Vidigueira, dos das proveniências de Portalegre, Reguengos, Évora, Moura e Granja. As mesmas variáveis, permitiram a distinção dos vinhos brancos de Portalegre dos de Reguengos, Vidigueira, Évora, Moura e Granja, e ainda distinguir os vinhos produzidos no Redondo, dos produzidos nas restantes sub-regiões, com excepção de Portalegre.

## Summary

The great enological importance of free amino acids spreads from: the technological area, namely in alcoholic and malolactic fermentations where they are essential nutrients; to quality, namely in the final profile of fermentative and post-fermentative compounds; to tipicity and genuinity, through the effect that "terroir" pose in those compounds concentration; and to health and food safety, through the presence of compounds with influence in human health, amines and ethyl carbamate included.

This work deals with the development of an analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC), with detection of *o*-phtaldialdehyde (OPA) and 9-fluoro-enil-methyl chloroformate (FMOC-Cl) derivatives, to allow simultaneous quantification of 33 compounds belonging to free amino acids and amine groups which usually occur in musts and wines and, from it, the study of the influence of factors variety, sub-region of production, year of production and productor on the levels of those compounds in musts and Alentejo wines. It was also studied the relationship between levels of: assimilable amino acids; aminogenic amino acids; amine precursors; free and total sulfur dioxide; volatile acidity; and pH, on the levels of each amine and the sum of biogenic and total amines, of musts and wines. It is also described the development of an new analytical methodology involving HPLC and fluorescence detection, through derivatization with 9-xanthydrol, for the analysis of ethyl carbamate in wines, fortified wines and brandies (Portuguese Patent n$^{er}$ 102520).

The analytical method, developed for ethyl carbamate levels analysis, allows the same procedure in wines, in fortified wines, or in brandies with precision, accuracy and detection limit values similar to the ones obtained with the GC-MS reference method.

The group of samples studied comprised 67 commercial red and white wines, of 1997, from 8 different sub-regions in Alentejo, 38 red and white monovarietal wines from 10 of the main varieties in Alentejo, from 1997 and 1998, coming from 5 different sub-regions, and 39 musts from the same sub-regions, obtained in 1998 and 1999. In 10 of those musts (5 red and 5 white), levels of free aminoacids and biogenic amines were evaluated during alcoholic and malolactic fermentations, in 1998.

As to assimilable amine nitrogen, it was shown that both red and white wines yielded relatively high values (average 60 mg N/L for red and 100 mg N/L for white), which may function as a factor of microbiological instability, mainly in white wines. Biogenic amines levels found in the 67 commercial wines analyzed may be considered

low, specially comparing with the ones found in other foods. In commercial wines, histamine, tyramine, cadaverine, tryptamine and β-phenylethylamine, had average concentrations always below 5 mg/L, except for putrescine and tyramine in red wines. The most influent variable in total and biogenic amines levels was the sum of the assimilable free amino acids. The positive relationship found for those parameters suggests that a reduction in the levels of assimilable amino acids in wines could have a positive qualitative effect as to the levels of accumulated amines in those wines.

For the studied samples, factors variety, sub-region and year of production, partially, had a stronger influence on volatile and biogenic amines levels in red wines. Concentrations of ethanolamine and ethylamine suffered no relevant changes, either during or after the white musts fermentation. Histamine may have been produced both during alcoholic fermentation and during or after malolactic fermentation, whilst tyramine and putrescine seem to have had their origin mainly after alcoholic fermentation.

Regarding to the ethyl carbamate content of the 65 samples studied, including 31 from Alentejo, the average levels were (average ± standard deviation): 91,2 ± 47,9 μg/L in wine brandies; 31,9 ± 21,2 μg/L in Port wine; 33,5 ± 14,5 μg/L in Madeira wine, and 9,3 ± 11,6 μg/L in Alentejo wines. Average levels of citrulline found in the studied commercial wines (6,0 mg/L), pose no problems regarding ethyl carbamate formation during the long storage of these wines.

Through statistical methods of multivariate analysis, namely principal component analysis, applied to levels of free amino acids and amines allowed the distinction of commercial red wines from Vidigueira from the ones of Portalegre, Reguengos, Évora, Moura and Granja. The same variables made possible the distinction of Portalegre white wines from the ones of Reguengos, Vidigueira, Évora, Moura and Granja and also distinguish the wines produced in Redondo from the ones of the other sub-regions, except Portalegre.

## Résumé

Les acides aminés libres sont des composés présentant divers intérêts: intérêt technologique, au niveau des fermentations alcoolique et malolactique dont ils sont les métabolites principaux; qualitatif, au niveau de l'intérêt final que présentent les composés issus de la fermentation et de la post-fermentation; en tant qu'élément définissant l'authenticité, au niveau des effets que différents terroirs présentent dans les concentrations des acides aminés; ainsi qu'un intérêt au niveau de la santé et de la sécurité alimentaire, pour l'influence que présentent ces composés (dans lesquels s'inscrivent les amines et le carbamate d'éthyle) sur la santé humaine.

Cette étude traite du développement d'une méthode analytique par chromatographie liquide haute performance (HPLC), avec détection des dérivés du *o*-phtaldialdéhyde (OPA) et du 9–fluorenylméthylchloroformate (FMOC-Cl), pour la quantification simultanée de 33 composés appartenant au groupe des acides aminés libres et amines présents habituellement dans les moûts et les vins. A partir de cette méthode, on a étudié l'influence des facteurs cépage, région de production, année de production et producteur, en rapport avec les teneurs de ces composés contenus dans les moûts et les vins de l'Alentejo. On a également analysé la relation entre les teneurs en: acides aminés assimilables, acides aminés aminogéniques, précurseurs d'amines, dioxyde de soufre libre et total, acidité volatile, et le pH, pour chaque concentration en amine et l'ensemble des amines biogènes et totales, des moûts et des vins.

Nous décrivons enfin la mise au place d'une nouvelle méthodologie analytique par HPLC et détection de fluorescence, par dérivation avec le 9-xantidrol, pour l'analyse du carbamate d'éthyle dans les vins, vins liquoreux et eaux de vie (Brevet Portuguais n° 102520). La méthode analytique, mise en place pour l'analyse des teneurs en carbamate d'éthyle dans les boissons alcoolisées, permet l'analyse de ce composé aussi bien dans les eaux de vie, que dans les vins ou les vins liquoreux, avec des valeurs de précision, porcentages de recouvrement et limites de détection, similaires aux valeurs obtenues avec la méthode de référence par GC-MS.

Le groupe d'échantillons étudiés comprenait 67 vins commerciaux, blancs et rouges, de 1997, provenant de 8 sous-régions différentes de l'Alentejo; 38 vins blancs et rouges de 10 des principaux cépages de l'Alentejo, des années 1997 et 1998 et provenant de 5 sous-régions différentes; et 39 moûts des 10 même cépages et des mêmes sous-régions, obtenus dans les années 1998 et 1999. Parmi ces moûts, 5 rouges et 5 blancs, ont été étudié, en 1998, et les teneurs en acides aminés libres et amines biogènes au

cours des fermentations alcoolique et malolactique, analysées. On a pu vérifier la présence de fortes teneurs en azote aminé assimilable aussi bien dans les vins rouges que dans les vins blancs (moyenne de 100 mg N/L dans les vins blancs et 60 mg N/L dans les rouges). Les taux des amines biogènes détectés lors des analyses des 67 vins commerciaux, peuvent être considérés comme faible, comparés à ceux présent dans d'autres aliments. Dans les vins commerciaux, l'histamine, la tyramine, la cadavérine, la tryptamine et la β-phényléthylamine, sont détectés en moyenne, à des valeurs toujours inférieures à 5 mg/L, à l'exception de la putrescine et de la tyramine des vins rouges. Le paramètre le plus influent sur les teneurs en amines biogènes et amines totales était la somme des acides aminés libres assimilables. La relation positive vérifiée entre ces paramètres suggère qu'une réduction des teneurs en acides aminés assimilables des vins pourrait avoir un effet qualitativement positif, au niveau des amines accumulées dans ceux-ci. Dans les moûts et les vins étudiés, d'une même variété, on a vérifié que les facteurs cépage, sous-région et année, influençaient de façon plus importante les teneurs en amines volatiles et biogènes dans les vins rouges que dans les autres vins. Les concentrations en amines éthanolamine et éthylamine ne subissaient pas d'importantes fluctuations, que ce soit pendant ou après les fermentations des moûts blancs. L'histamine peut avoir été produite soit durant la fermentation alcoolique, soit pendant ou après la fermentation malolactique, tandis que la tyramine et la putrescine semblent être produites principalement après la fermentation malolactique.

Pour l'étude du carbamate d'éthyle, 65 échantillons ont été analysés, dont 31 étaient des vins de l'Alentejo. Les concentrations moyennes détectées en carbamate d'éthyle (moyenne ± écart type): 91,2 ± 47,9 μ/L pour les eaux de vie; 31,9 ± 21,2 μ/L pour les Vins de Porto; 33,5 ± 14,5 μ/L pour les Vins de Madère, et 9,3 ± 11,6 μ/L pour les échantillons de vins de l'Alentejo. Les teneurs moyennes en citrulline rencontrées dans les vins commerciaux étudiés (6,0 mg/L) ne posent pas de problème pour la formation de carbamate d'éthyle pendant le vieillissement long de ces vins.

Appliquée aux teneurs en acides aminés libres et aux amines, l'analyse en composantes principales, a permis de différencier les vins rouges commerciaux provenant de la Vidigueira, des vins provenant de Portalegre, Reguengos, Evora, Moura et Granja. Les même variables, pourront permettre de différencier les vins blancs de Portalegre, des vins blancs de Reguengos, Vidigueira, Evora, Moura et Granja, et même de différencier les vins produits dans le Redondo de ceux produits dans les autres sous-régions, à l'exception de Portalegre.

Visione del silenzio
Angolo vuoto
Pagina senza parole
Una lettera scritta sopra un viso
Di pietra e vapore
Amore
Inutile finestra

Caetano Veloso (Michelangelo Antonioni)

# Índice

**Resumo** i

**Summary** iii

**Résumé** v

**Preâmbulo** 1

**1. INTRODUÇÃO** 4

**1.1 Vinho, saúde e segurança alimentar** 4

**1.2 Aminoácidos livres** 6

**1.2.1 Importância e papel nas fermentações** 7

**1.2.1.1 Álcoois superiores** 10

**1.2.1.2 Ésteres** 12

**1.2.1.3 Sulfureto de hidrogénio** 13

**1.2.2 Relação com a tipicidade e genuinidade** 16

**1.3 Aminas** 20

**1.3.1 Importância em vinhos** 20

**1.3.2 Relação com os aminoácidos livres** 25

**1.4 Aminoácidos livres e aminas: métodos analíticos** 28

**1.5 Carbamato de etilo** 35

**1.5.1 Importância em vinhos** 36

**1.5.2 Métodos analíticos** 39

**1.6 Quimiometria aplicada à caracterização de mostos e vinhos** 42

**1.7 Objectivo do estudo** 47

**2. MATERIAL E MÉTODOS** 49

**2.1 Objectos de estudo** 49

**2.1.1 Aminoácidos livres e aminas** 49

**2.1.2 Carbamato de etilo** 52

**2.2 Reagentes e outros consumíveis** 53

**2.3 Métodos analíticos** 54

**2.3.1 Quantificação dos aminoácidos livres e aminas** 54

**2.3.1.1 Preparação das amostras e soluções padrão** 54

**2.3.1.2 Preparação do reagente OPA** 54

**2.3.1.3 Preparação do reagente FMOC-Cl** 55

**2.3.1.4 Procedimento de derivatização** 55

**2.3.1.5 Equipamento cromatográfico** 55

**2.3.1.6 Análise cromatográfica** 55

**2.3.1.7 Quantificação** 56

**2.3.1.8 Eliminação/tratamento dos resíduos tóxicos** 57

**2.3.2 Quantificação do carbamato de etilo** 58

**2.3.2.1 Preparação das amostras** 58

**2.3.2.2 Preparação do reagente 9-xantidrol** 58

**2.3.2.3 Procedimento de derivatização** 59

**2.3.2.4 Equipamento cromatográfico** 59

**2.3.2.5 Análise cromatográfica** 59

**2.3.2.6 Quantificação** 60

**2.3.2.7 Eliminação/tratamento dos resíduos tóxicos** 60

**2.3.3 Parâmetros da caracterização sumária de mostos e vinhos** 61

**2.4 Métodos estatísticos** 61

**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO** 62

**3.1 Caracterização sumária das amostras estudadas** 62

**3.2 Aminoácidos livres e aminas** 69

**3.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico** 69

**3.2.1.1 Quantificação da prolina** 72

**3.2.2 Teores de aminoácidos livres e aminas nos vinhos comerciais** 75

**3.2.3 Teores de aminoácidos livres e aminas nos mostos e vinhos monovarietais** 81

**3.2.3.1 Vinhos monovarietais de 1997 e 1998** 82

**3.2.3.2 Mostos monovarietais de 1998 e 1999** 86

**3.2.4 Relação entre o teor de aminoácidos livres e o teor de aminas, de mostos e vinhos** 92

**3.2.4.1 Relação entre o teor de aminoácidos livres e o teor de aminas nos vinhos monovarietais de 1997 e 1998 - GI** 94

**3.2.4.2 Relação entre o teor de aminoácidos livres e o teor de aminas nos vinhos comerciais de 1997 - GII** 100

**3.2.4.3 Relação entre o teor de aminoácidos livres nos mostos e o teor de aminas nos vinhos monovarietais resultantes - GIII** 102

**3.2.5 Influência da casta nos teores de aminoácidos livres e aminas dos vinhos e mostos** 105

**3.2.6 Influência da região de produção nos teores de aminoácidos livres e aminas dos vinhos e mostos** 107

**3.2.7 Influência do ano de produção nos teores de aminoácidos livres e aminas dos vinhos e mostos** 109

**3.2.8 Evolução dos teores de aminoácidos assimiláveis e de aminas durante as fermentações alcoólica e maloláctica** 110

**3.2.9 Análise de componente principal** 119

**3.2.9.1 Análise de componente principal efectuada com os vinhos comerciais** 120

**3.2.9.2 Análise de componente principal efectuada com os vinhos monovarietais** 128

**3.3 Carbamato de etilo** 134

**3.3.1 Estudo da formulação do reagente 9-xantidrol** 136

**3.3.2 Optimização das condições reaccionais** 136

**3.3.3 Desenvolvimento do método de separação por HPLC e quantificação por fluorescência** 138

**3.3.4 Validação do método analítico** 140

**3.3.4.1 Aplicabilidade, especificidade e interferências** 140

**3.3.4.2 Linearidade** 141

**3.3.4.3 Precisão** 142

**3.3.4.4 Exactidão** 142

**3.3.4.5 Limite de detecção** 144

**3.3.5 Teores de carbamato de etilo nas amostras estudadas** 146

**4. CONCLUSÕES** 149

**5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 154

**ANEXOS** 180

# Lista de figuras

**Figura 1.** Representação esquemática da formação de álcoois superiores na célula de levedura. 11

**Figura 2.** Esquema de um possível mecanismo para a formação de ésteres etílicos de aminoácidos durante a fermentação alcoólica. 13

**Figura 3.** Descrição esquemática da redução do enxofre inorgânico via SRS a sulfureto e sua posterior incorporação na biossíntese dos aminoácidos. 14

**Figura 4.** Etapas determinantes na evolução do perfil de aminoácidos desde o mosto até ao vinho. 18

**Figura 5.** Mapa de Portugal com a identificação das 8 sub-regiões vitivinícolas do Alentejo. 50

**Figura 6.** Histograma para o título alcoométrico volúmico adquirido – vinhos comerciais 1997. 62

**Figura 7.** Histograma para o teor em açúcares redutores – vinhos comerciais 1997. 62

**Figura 8.** Histograma para a acidez fixa – vinhos comerciais 1997. 63

**Figura 9.** Histograma para a acidez total – vinhos comerciais 1997. 63

**Figura 10.** Histograma para o pH – vinhos comerciais 1997. 63

**Figura 11.** Histograma para o teor de dióxido de enxofre total – vinhos comerciais 1997. 64

**Figura 12.** Histograma para a massa volúmica – vinhos comerciais 1997. 64

**Figura 13.** Histograma para o teor de dióxido de enxofre livre – vinhos comerciais 1997. 64

**Figura 14.** Histograma para o extracto seco total– vinhos comerciais 1997. 64

**Figura 15.** Histograma para o extracto seco não redutor – vinhos comerciais 1997. 65

**Figura 16.** Histograma para a acidez volátil – vinhos comerciais 1997. 65

**Figura 17.** Histograma para o título alcoométrico volúmico adquirido – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 65

**Figura 18.** Histograma para a acidez fixa – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 65

**Figura 19.** Histograma para o teor em açúcares redutores – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 66

**Figura 20.** Histograma para a acidez total – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 66

**Figura 21.** Histograma para o pH – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 66

**Figura 22.** Histograma para o teor de dióxido de enxofre total – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 66

**Figura 23.** Histograma para o extracto seco total – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 66

**Figura 24.** Histograma para o teor de dióxido de enxofre livre – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 67

**Figura 25.** Histograma para a massa volúmica – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 67

**Figura 26.** Histograma para o extracto seco não redutor – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 67

**Figura 27.** Histograma para a acidez volátil – vinhos monovarietais 1997 e 1998. 67

**Figura 28.** Histograma para o ºBrix corrigido – mostos 1998 e 1999. 68

**Figura 29.** Histograma para o teor de açúcares redutores – mostos 1998 e 1999. 68

**Figura 30.** Histograma para o título alcoométrico volúmico potencial – mostos 1998 e 1999. 68

**Figura 31.** Histograma para o pH – mostos 1998 e 1999. 68

**Figura 32.** Histograma para a acidez total – mostos 1998 e 1999. 68

**Figura 33.** Cromatograma de uma solução padrão (P2). 73

**Figura 34.** Cromatograma de uma amostra de mosto no início da fermentação alcoólica. 73

**Figura 35.** Cromatograma de uma amostra de vinho branco. 74

**Figura 36.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 30 vinhos brancos comerciais de 1997. 76

**Figura 37.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 37 vinhos tintos comerciais de 1997. 77

**Figura 38.** Teores médios de azoto aminado assimilável nos 67 vinhos brancos e tintos comerciais de 1997. 78

**Figura 39.** Teores médios de prolina nos 67 vinhos brancos e tintos comerciais de 1997. 78

**Figura 40.** Teores médios de cada amina presente nos 30 vinhos brancos comerciais de 1997. 80

**Figura 41.** Teores médios de cada amina presente nos 37 vinhos tintos comerciais de 1997. 80

**Figura 42.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 19 vinhos brancos monovarietais de 1997 e 1998. 82

**Figura 43.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 19 vinhos tintos monovarietais de 1997 e 1998. 83

**Figura 44.** Teores médios de azoto aminado assimilável nos 19 vinhos brancos e 19 tintos monovarietais de 1997 e 1998. 84

**Figura 45.** Teores médios de prolina nos 19 vinhos brancos e 19 tintos monovarietais de 1997 e 1998. 84

**Figura 46.** Teores médios de cada amina presente nos 19 vinhos brancos monovarietais de 1997 e 1998. 85

**Figura 47.** Teores médios de cada amina presente nos 19 vinhos tintos monovarietais de 1997 e 1998. 86

**Figura 48.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 20 mostos brancos monovarietais de 1998 e 1999. 87

**Figura 49.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 19 mostos tintos 88

monovarietais de 1998 e 1999.

**Figura 50.** Teores médios de azoto aminado assimilável nos 20 mostos brancos e 19 tintos monovarietais de 1998 e 1999. 88

**Figura 51.** Teores médios de prolina nos 20 mostos brancos e 19 tintos monovarietais de 1998 e 1998. 90

**Figura 52.** Teores médios de cada amina presente nos 20 mostos brancos monovarietais de 1998 e 1999. 90

**Figura 53.** Teores médios de cada amina presente nos 19 mostos tintos monovarietais de 1998 e 1999. 91

**Figura 54.** Relação entre o teor total de aminas e o de aminoácidos assimiláveis, nos vinhos brancos e tintos monovarietais de 1997/1998 – GI. 98

**Figura 55.** Evolução do teor total de azoto aminado assimilável de cada um dos 5 mostos brancos durante a microvinificação. 111

**Figura 56.** Evolução do teor total de azoto aminado assimilável de cada um dos 5 mostos tintos durante a microvinificação. 112

**Figura 57.** Evolução do teor de etanolamina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação. 113

**Figura 58.** Evolução do teor de metilamina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação. 114

**Figura 59.** Evolução do teor de etilamina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação. 115

**Figura 60.** Evolução do teor de histamina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação. 116

**Figura 61.** Evolução do teor de tiramina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação. 117

**Figura 62.** Evolução do teor de putrescina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação. 118

**Figura 63.** Evolução do teor total de aminas biogénicas durante a microvinificação de cada casta. 119

**Figura 64.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 56,4 % da variância total do sistema. 121

**Figura 65.** Projecção bidimensional dos 67 vinhos comerciais identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 56,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis. 122

**Figura 66.** Projecção bidimensional dos 67 vinhos comerciais identificados por produtor, nos dois primeiros componentes principais, que representam 56,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis. 122

**Figura 67.** Projecção bidimensional dos 67 vinhos comerciais identificados por cor, nos dois primeiros componentes principais, que representam 56,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis. 123

**Figura 68.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 62,7 % da variância total do sistema com 37 vinhos tintos. 124

**Figura 69.** Projecção bidimensional dos 37 vinhos tintos comerciais identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 62,7 % da variância total do sistema com 30 variáveis. 125

**Figura 70.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 66,9 % da variância total do sistema com 30 vinhos brancos. 127

**Figura 71.** Projecção bidimensional dos 30 vinhos brancos comerciais identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 66,9 % da variância total do sistema com 30 variáveis. 127

**Figura 72.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 51,4 % da variância total do sistema com 56 vinhos tintos. 129

**Figura 73.** Projecção bidimensional dos 56 vinhos tintos identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 51,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis. 130

**Figura 74.** Projecção bidimensional dos 19 vinhos tintos identificados por castas, nos dois primeiros componentes principais, que representam 51,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis. 131

**Figura 75.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 60,6 % da variância total do sistema com 49 vinhos brancos. 132

**Figura 76.** Projecção bidimensional dos 49 vinhos brancos identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 60,6 % da variância total do sistema com 30 variáveis. 133

**Figura 77.** Projecção bidimensional dos 19 vinhos brancos identificados por castas, nos dois primeiros componentes principais, que representam 60,6 % da variância total do sistema com 30 variáveis. 133

**Figura 78.** Esquema reaccional da formação do xantiluretano a partir do 9-xantidrol e do uretano, em meio ácido. 135

**Figura 79.** Relação entre a área do pico correspondente ao derivado xantilureia, e a razão molar de $H^+$/9-xantidrol. 137

**Figura 80.** Influência do tempo de reacção no rendimento da reacção de derivatização do carbamato de etilo. 138

**Figura 81.** Curva de calibração obtida para soluções padrão na gama de concentrações dos 16,5 μg/L aos 549 μg/L. 141

**Figura 82.** Curva de calibração obtida para soluções padrão na gama de concentrações dos 5,1 μg/L aos 152,1 μg/L. 142

**Figura 83.** Comparação dos valores obtidos na análise do teor de carbamato de etilo em amostras de aguardente, por HPLC e por GC-MS. 143

**Figura 84.** Cromatograma de uma solução padrão de carbamato de etilo com 50,7 μg/L. 144

**Figura 85.** Cromatograma de uma amostra de Vinho do Porto diluída 3 vezes. 145

**Figura 86.** Cromatograma de uma amostra de aguardente vínica (título alcoométrico volúmico adquirido aproximado de 77 % (v/v)) diluída 4 vezes. 145

**Figura 87.** Teor de carbamato de etilo encontrado nas diferentes amostras analisadas por HPLC com detecção por fluorescência. 146

**Figura 88.** Relação entre os teores de arginina e de carbamato de etilo dos 31 vinhos comerciais de 1997 estudados. 147

**Figura 89.** Relação entre os teores de citrulina e de carbamato de etilo dos 31 vinhos comerciais de 1997 estudados. 148

# Lista de tabelas

**Tabela 1.** Teores médios dos aminoácidos mais frequentes, encontrados em alguns mostos de diferentes origens, castas e anos de produção (mg/L). 10

**Tabela 2.** Teores médios dos aminoácidos mais frequentes, encontrados em alguns vinhos de diferentes origens, castas e anos de produção (mg/L). 19

**Tabela 3.** Teores médios de aminas encontrados em alguns vinhos de diferentes origens (mg/L). 24

**Tabela 4.** Comparação dos compostos quantificados por diferentes métodos analíticos, reportados para utilização na análise de mostos e vinhos. 30

**Tabela 5.** Esquema de amostragem utilizado no estudo da influência da casta, proveniência e ano de colheita. 50

**Tabela 6.** Calendário da amostragem efectuada durante as microvinificações das castas da Fundação Eugénio de Almeida de 1998. 51

**Tabela 7.** Calendário de operações efectuadas durante as microvinificações das castas da Fundação Eugénio de Almeida (Évora) de 1998. 52

**Tabela 8.** Gradiente utilizado na separação dos aminoácidos livres e aminas. 56

**Tabela 9.** Composição das soluções padrão de aminoácidos livres e aminas utilizadas na construção das curvas de calibração (mg/L). 57

**Tabela 10.** Procedimento adoptado na recuperação e/ou tratamento dos resíduos produzidos. 58

**Tabela 11.** Gradiente utilizado na análise do carbamato de etilo por HPLC. 59

**Tabela 12.** Valores médios, máximos e mínimos dos parâmetros de análise sumária, por grupo de amostras. 69

**Tabela 13.** Parâmetros de validação obtidos para o método analítico de quantificação de aminoácidos livres e aminas. 71

**Tabela 14.** Análise de variância para os teores de aminas nos vinhos monovarietais – GI. 94

**Tabela 15.** Coeficientes de correlação e significância das regressões lineares efectuadas com os vinhos monovarietais – GI. 96

**Tabela 16.** Análise de variância para os teores de aminas nos vinhos comerciais – GII. 100

**Tabela 17.** Coeficientes de correlação e significância das regressões lineares efectuadas com os vinhos comerciais – GII. 101

**Tabela 18.** Análise de variância para os teores de aminas nos vinhos monovarietais de 1998. 103

**Tabela 19.** Coeficientes de correlação e significância das regressões lineares efectuadas com os mostos monovarietais – GIII – combinados com os vinhos resultantes. 104

**Tabela 20.** Teores médios de aminoácidos assimiláveis, aminas voláteis e biogénicas em vinhos e mostos de diferentes castas, cultivadas em 1998 na mesma sub-região – Évora. 106

**Tabela 21.** Teores médios de aminoácidos assimiláveis, aminas voláteis e biogénicas em vinhos e mostos das castas Roupeiro (branca) e Trincadeira (tinta), cultivadas em 1998 em 108

diferentes sub-regiões.

**Tabela 22.** Comparação das médias de cada casta na mesma sub-região e da mesma casta em diferentes sub-regiões, nos anos estudados (média ± desvio padrão). 109

**Tabela 23.** Identificação das variáveis utilizadas na análise multivariável dos dados analíticos. 120

**Tabela 24.** Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos 10 primeiros componentes principais, obtidos com 30 variáveis. 121

**Tabela 25.** Recuperação do carbamato de etilo em diferentes amostras analisadas por HPLC com detecção de fluorescência. 143

# Lista de siglas e abreviaturas

| | |
|---|---|
| 3-MPA | ácido 3-mercaptopropiónico |
| 6-AQC | carbamato de 6-aminoquinolil-N-succinimidilo |
| 9-X | 9-xantidrol |
| aam | aminoácidos livres aminogénicos |
| abi | aminas biogénicas |
| acv | acidez volátil |
| AEOC | cloroformato de 2-(9-antril)-etilo |
| Ala; ala | alanina |
| Arg; arg | arginina |
| Asn; asn | asparagina |
| Asp; asp | aspartato |
| ass | aminoácidos livres assimiláveis |
| ato | aminas totais |
| ATP | adenosina tri-fosfato |
| ATPase | enzima que catalisa a hidrólise do ATP |
| av | aminas voláteis |
| BNIC | Bureau National Interprofissionel du Cognac |
| BQCA | 3-benzoíl-2-quinolinecarboxialdeído |
| Cad; cad | cadaverina |
| CE | carbamato de etilo |
| Cit; cit | citrulina |
| *cit* | citado por |
| CMA-Cl | cloreto de N-(2-metil)-acetilcarbazol |
| CV | coeficiente de variação |
| CVRA | Comissão de vitivinicultura da região do Alentejo |
| d | declive |
| DAO | diamina oxidase |
| DEP | dicarbonato de dietilo |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| *et al* | e outros |
| Eta; eta | etanolamina |
| Etila; etl | etilamina |
| FACE | factores fisiológicos, aleatórios, culturais e ecológicos |
| Fen | β-feniletilamina |
| FID | detector de ionização por chama |
| FMOC-Cl | cloroformato de 9-fluoro-enil-metilo |
| Gaba; gab | ácido γ-aminobutírico |
| GAP | permease geral de aminoácidos |
| GC | cromatografia de gases de alta resolução |

| | |
|---|---|
| GI | grupo I |
| GII | grupo II |
| GIII | grupo III |
| Gln; gln | glutamina |
| Glu; glu | glutamato |
| Gly; gly | glicina |
| h | hora |
| HDL | lipoproteinas de alta densidade |
| His; his | histidina |
| Hista; hta | histamina |
| HMT | histidina metil-transferase |
| HPLC | cromatografia de líquidos de alta eficiência |
| IDA | 1-metoxicarbonil-indolisina-3,5-dicarbaldeído |
| Ile; ile | isoleucina |
| Iso; iso | isoamilamina |
| IV | espectroscopia de infra-vermelho |
| LDA | análise discriminante linear |
| LDL | lipoproteínas de baixa densidade |
| Leu; leu | leucina |
| Lys; lys | lisina |
| Max | máximo |
| Met; met | metionina |
| Metila; mtl | metilamina |
| mg N/L | miligramas de azoto por litro |
| Min | mínimo |
| min | minuto |
| mM | milimoles por litro |
| *modus vivendi* | modo de viver |
| MS | espectrómetro de massa |
| NADH | nicotinamida-adenina-di-nucleótido |
| NBD-F | 4-fluoro-7nitrobenzeno-2,1,3-oxadiazol |
| Nva | norvalina |
| o | ordenada na origem |
| OPA | *o*-ftaldialdeído |
| Orn; orn | ornitina |
| PCA | análise de componentes principais |
| PCA-COR | análise de componentes principais com base na matriz de correlações |
| PCA-COV | análise de componentes principais com base na matriz de covariâncias |
| PDR | desvio padrão relativo |
| p.ex. | por exemplo |
| Phe; phe | fenilalanina |

| | |
|---|---|
| Pro; pro | prolina |
| Put; put | putrescina |
| Raman | espectroscopia Raman |
| RMN | ressonância magnética nuclear |
| sdd | desvio padrão do declive |
| sdo | desvio padrão da ordenada na origem |
| Ser; ser | serina |
| sol | dióxido de enxofre livre |
| sot | dióxido de enxofre total |
| SRS | sequência de redução do sulfato |
| Thr; thr | treonina |
| Tira; tir | tiramina |
| Trp; trp | triptofano |
| Try | triptamina |
| Tyr, tyr | tirosina |
| UV-Vis | espectroscopia de ultra violeta-visível |
| Val; val | valina |
| *Vide* | veja |

## Agradecimentos

À Prof. Doutora Arminda Alves, pela dedicação e empenho que colocou neste trabalho. O contacto havido durante os seus anos de realização, deu inteiro significado ao conceito de Mestre/Discípulo, bastante mais abrangente do que o muitas vezes restritivo Orientador/Aluno. É com sincera admiração e gratidão que o faço, e não sob qualquer formalismo instituído.

À Maria João Cabrita, pela sua colaboração, quer no trabalho de recolha de amostras que realizou durante as vindimas de 1998, quer ainda na constante disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

À Prof. Doutora Margarida Bastos, pelo incentivo e apoio que prestou durante a realização deste trabalho.

À Prof. Doutora Lúcia Santos, pela colaboração prestada, pelo trabalho final de revisão do texto, e pela alegria com que normalmente enchia o laboratório.

Ao Nuno, à Manuela, e à Maria Joana, pelas amizades que construímos e reforçamos, num local – o laboratório - onde muitas vezes se está sozinho, acompanhado. O sentido de cooperação e companheirismo que sempre incluíram na sua conduta, foi essencial para a conclusão e humanização deste trabalho.

À Sophie e ao António, amigos novos, mas que parecem de sempre, e a todos os velhos amigos, pela amizade, claro.

À minha irmã e ao Paulo, pelo apoio incondicional que sempre deram.

À Patrícia e à Bárbara por partilharmos juntos o sonho de amar.

Aos meu pais, ausentes, já não agradeço, sei que os homenageio perseguindo a Felicidade e a Harmonia.

# PREÂMBULO

## O ENÓLOGO, O FALSIFICADOR, O VINHO E OS SEUS APRECIADORES

Parafraseando Peter Greenway no seu filme "The Cook, the Thief, his Wife and her Lover", a invocação destas entidades engloba em si um vasto campo de discussão, em que os motivos que estão subjacentes à realização deste trabalho se podem abordar num complexo tão abrangente como o assim criado. E é com prazer que comparamos neste título, de forma analogística, o vinho à mulher, na esperança de a homenagear com a comparação.

A conjugação de algumas das características destes grupos, forneceu-nos a matéria de estudo que resultou na escrita deste trabalho.

Abordaremos pois cada uma delas de forma muito breve, estabelecendo relações entre si de forma a introduzir e situar o estudo que nos propusemos realizar.

**O Enólogo.** O enólogo aparece-nos neste contexto como aquele que, conhecendo e apreciando o vinho, faz da sua actividade uma arte e um ofício. Como artista, o enólogo pretende retirar das uvas o máximo das suas "potencialidades estéticas[1]", de forma a tornar o vinho produzido como uma obra única, digna de admiração e fonte de prazer para os seus apreciadores. Como profissional, o enólogo objectiva a obtenção de um produto que satisfaça as expectativas dos consumidores e permita o desenvolvimento da sua empresa, acrescentado-lhe mais-valias provenientes da venda daquele. Todavia, nem sempre estas duas facetas do enólogo se compatibilizam. Na prossecução dos seus objectivos, o enólogo encontra pelo caminho pressões de ambos os lados e um número crescente de legislação a cumprir.

Vai ser este um dos principais interessados na obtenção de conhecimento na área da enologia, principalmente aquele que de forma directa se reflecte na área da tecnologia,

[1] Estética: designação aplicada por Baumgarten, no séc. XVIII, à ciência filosófica que compreende o estudo das obras de arte e o conhecimento dos aspectos da realidade sensorial classificáveis em termos de belo ou feio.

isto é, aquele que depois de obtido permite alterar procedimentos tecnológicos que rentabilizem a produção, aumentem a qualidade ou coloquem um determinado vinho dentro da legislação em vigor na altura.

**O Falsificador**. Haverá porventura vários tipos de falsificador, consoante o tipo de adulteração que está em causa em cada caso. Desde o mais ambicioso que até uvas utiliza para contrafazer o vinho até àquele, menos lesivo, que utiliza uvas brancas para fazer vinho rosé, todos eles violam os interesses dos consumidores, da concorrência e do Estado. Não é contudo a sua classificação que nos interessa fazer aqui, mas sim analisar os seus intuitos.

O falsificador pretende acima de tudo um proveito que não corresponde ao bem que produz, sendo aquele superior ao devido. Pode contrafazer um vinho recorrendo a vários tipos de ilegalidade: o aumento da produção sem aumento da matéria-prima, por exemplo por adição de água; a violação da denominação de origem, sendo mais comum a utilização de uvas, mostos ou vinhos de outra variedade não autorizada ou região; a falsificação do tempo de estágio dos vinhos, ou a inclusão de substâncias não permitidas no vinho. São alguns exemplos das muitas falsificações que é possível praticar.

Sendo inúmeras as possibilidades de adulteração, o falsificador contribui com uma boa parte para a totalidade dos sujeitos de investigação na área da enologia. Não fazem parte estes (porventura enólogos, porque não dizê-lo) do grupo dos principais interessados na obtenção de conhecimentos em enologia.

No extremo oposto ao do falsificador, posicionam-se os organismos regulamentadores e de controlo de qualidade que, por inerência de funções, se interessam ou deviam interessar pela investigação que se faz na área, uma vez que esta lhes fornece algumas ferramentas de combate à fraude.

**O Vinho**. O vinho quer acima de tudo ser tratado com a dignidade que merece. Sem perder a posição justamente adquirida de néctar místico, simultaneamente demoníaco e apaziguador, divino elemento antropológico, sem se converter em algo asséptico, invariante ou de uma modernidade inócua, o vinho quer evoluir, para continuar a ter lugar num contexto em que os alimentos são cada vez mais os nossos medicamentos. Ou tão só, para que nos continue a deixar saboreá-lo lânguida e calmamente, nos intervalos que nos vão restando entre medonhos afazeres. Este poderá ser o ponto de vista de um consumidor mas não será provavelmente o da maioria dos produtores, para quem o vinho não tem quereres. Aí quem quer são eles, pelo vinho.

O vinho dos produtores quererá pois, antes de mais, ser vendido, para que o seu produtor o possa continuar a produzir, cada vez melhor. Para isso, ele tem que ser acessível à faixa de mercado a que se destina, cumprir com as obrigações legais e de qualidade e ainda fazer face à concorrência. Sem parecer tarefa fácil, ainda há muitos que o vão conseguindo. Assim continue.

**Os apreciadores.** Os enófilos querem poder continuar a saborear um copo de bom vinho, a um justo preço, e sem correrem o risco de achar no fim, que o leve rubor que entretanto se instalou nas faces, ou que "fugacidade do olhar" que teima em não desaparecer, se podem dever a um excesso de algum dos compostos, pretensamente perigosos, cuja presença no vinho se vai entretanto estudando.

Para que estes desejos se possam realizar, e porque o consumo do vinho desde sempre se revestiu de complexas motivações que não só o de apenas saciar a sede, tem o vinho que ter um crescente número de novas e diferentes qualidades. Para além da exigência fundamental de estimular os sentidos com a sua potencial infindável complexidade, e de outras, tem o vinho também que não fazer mal a quem o consome, e fazer bem.

Hoje, mais do que nunca, até a mais básica necessidade fisiológica de hidratação se reveste de um maior ou menor conjunto de exigências acessórias, consoante as verdadeiras necessidades. Não basta, num caso mais simples, que a água não esteja contaminada com pesticidas, soda cáustica ou outros compostos mais ou menos abundantes, tem que ter o sabor que nós gostamos (mesmo que isso signifique a sua insipidez), e para além disso ainda tem que nos fazer bem à marreca, ao reumatismo ou de fazer desaparecer aquele terrível mau hálito. A satisfação de necessidades menos evidentemente básicas, remete para cenários algo mais complexos.

Estes factos, induziram-nos uma necessidade de, numa abordagem que se pretende actual às matérias de estudo relacionadas com o vinho, fazer um muito breve, mas orientador, ponto de situação da relação entre o consumo de vinho e a saúde e a segurança alimentar.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Vinho, saúde e segurança alimentar

À análise do consumo de vinho associa-se um dado que não se pode menosprezar – a uva é o fruto mais produzido em todo o mundo [155], produzindo a indústria vitícola, para além do vinho, geleias, doces, uvas de mesa, sumos e conservas. Não é pois de estranhar, que os aspectos económicos da cultura da vinha e do consumo do vinho sejam, na maior parte dos casos, a principal e única preocupação tanto dos Estados como dos produtores. Os lucros que o comércio do vinho representa são, legitimamente ou não, altamente influentes em muitas das questões com ele relacionadas.

A este dado juntam-se outros. Nos últimos anos, a dada altura, verificou-se um decréscimo no consumo de bebidas alcoólicas [274 *cit* 67], porventura devido às campanhas pró-abstémia levadas a cabo por alguns países. Em alguns casos e por diversos motivos, essas campanhas viram os seus efeitos reflectidos especialmente no consumo do vinho. Por outro lado, o consumo do vinho e de outras bebidas alcoólicas, por motivos intrínsecos à sua definição, está associada à ingestão de etanol, sendo os efeitos do seu consumo exagerado amplamente conhecidos e estudados, não só ao nível médico e social, mas também ao nível dos custos que o alcoolismo representa para os Estados. Estes, em particular os de países produtores de vinho, enfrentam assim um desafio, cuja resolução tem duas facetas aparentemente antagónicas. Por um lado promover o consumo do vinho (enfrentando as pressões de certos grupos) preservando os aspectos económicos, mas também sociais e culturais do sector vitivinícola, e por outro prevenir o efeitos negativos (e de alto custo [66 *cit* 67]) do consumo exagerado do álcool.

No que lhe diz respeito, algumas soluções para tal desafio residem aparentemente no próprio vinho e no seu consumo, desde que haja uma cultura e educação que sustentem e tornem informado e consciente tal consumo. Embora haja alguma controvérsia quanto aos responsáveis pelos efeitos, em parte devido à dificuldade inerente à realização de tais estudos, parece hoje consensual que as comunidades que incluem no seu *modus vivendi* o consumo ponderado de bebidas alcoólicas, gozam de uma protecção efectiva contra determinadas enfermidades, relativamente àquelas que o não fazem [37]. Alguns resultados, e o parecer geral da comunidade médica, sugerem que a relação entre o consumo de álcool

e a taxa de mortalidade global se expressa sob a forma de uma curva em **U**, o que significa que a taxa de mortalidade daqueles que bebem moderadamente é inferior à daqueles que não bebem ou o fazem em demasia [201 *cit* 67].

A protecção oferecida pelo consumo de bebidas alcoólicas, tem sido atribuída por uns à presença de etanol nessas bebidas. A ingestão de etanol por si só, parece ter um efeito benéfico ao fazer aumentar os níveis das HDL (High Density Liproproteins) – o chamado bom colesterol -, e fazer baixar os níveis de lípidos aterogénicos, bem como a agregação plaquetária [234]. No entanto, há quem considere que nem todas as diferenças verificadas ao nível das doenças cardiovasculares e da taxa de mortalidade entre populações moderadamente consumidoras e não consumidoras, se expliquem apenas com base na ingestão do etanol.

A presença de outros componentes nos vinhos como os compostos fenólicos, principalmente nos tintos, tem captado a atenção dos investigadores, já que estes compostos apresentam características consideradas benéficas para a saúde humana. Alguns compostos fenólicos existentes nos vinhos são potentes anti-oxidantes, pelo que a sua presença no organismo humano pode conduzir à prevenção de certas doenças relacionadas com os processos oxidativos, como certos tipos de cancro ou certas doenças do foro cardiovascular [125; 178; 242; 271].

Os primeiros a sugerir um mecanismo para explicar os aparentes efeitos benéficos do consumo de vinho tinto, baseado na inibição da oxidação das "Low Density Lipoproteins" (LDL) foram Frankel *et al* [87]. Com o mesmo intuito, embora alargado a vinhos brancos, outros autores se lhes seguiram estudando o mesmo processo oxidativo [271], ou outros como a protecção contra radicais de óxidos de azoto [284], a presença de outros tipos de moléculas anti-oxidantes nos vinhos como a plastoquinona$_{10\text{-}ox}$ [107], ou os processos de aglomeração plaquetária [220].

Por outro lado, seja devido às crescentes preocupações com os aspectos relacionados com a segurança alimentar, seja pelo aumento das pressões internas e externas sobre os mercados e meios de produção agrícolas em termos do aumento da rendibilidade das explorações, o que por vezes conduz a práticas potencialmente lesivas para os consumidores, o vinho tem sido estudado sob outra perspectiva. A que avalia os potenciais efeitos nefastos do seu consumo, não necessariamente associados a uma situação de alcoolismo.

Nesse contexto, têm sido estudados nos vinhos diferentes grupos de compostos, como as micotoxinas das quais a ocratoxina A é um exemplo recente [81], as aminas

biogénicas [169], o carbamato de etilo [137] ou os pesticidas [62]. Os trabalhos têm visado o estudo não só da presença destas substâncias nos vinhos mas também dos factores que a influenciam. Embora em alguns casos possa eventualmente parecer existir um simples interesse económico, disfarçado de genuína preocupação com a segurança alimentar, noutros pode existir um risco potencial. Em qualquer dos casos, e para bem da qualidade do próprio vinho, pelo simples facto de existir a dúvida devemos dissipá-la, estudando, caracterizando e melhorando sempre os vinhos que produzimos e consumimos.

E foi sobre alguns dos compostos mais relacionados com a segurança alimentar, mas também com a genuinidade e tipicidade e portanto com a qualidade, que nos propusemos realizar este estudo, porque o referido desafio parece ganhar-se através da produção e consumo de vinho de qualidade, de uma forma consciente e informada.

Porque a melhoria da qualidade na produção, a presença e concentração de alguns compostos indesejáveis ocorrentes nos vinhos ou a defesa das denominações de origem podem ser influenciadas pelo estudo de compostos como os estudados neste trabalho, abordaremos em seguida o papel e importância dos aminoácidos livres no vinho e no seu processo produtivo, na tipicidade e genuinidade. Será caracterizada também a sua relação com compostos importantes ao nível da qualidade e segurança alimentar.

## 1.2 Aminoácidos livres

O vinho é a resultante de um complexo processo onde interagem microorganismos, mosto e condições físico-químicas. A melhoria da nossa compreensão do metabolismo dos aminoácidos nas leveduras e nas bactérias, bem como da influência dos diversos factores viticulturais e enológicos nas suas concentrações em mostos e vinhos, contribui para a resolução de problemas relacionados com as fermentações, bem como a obtenção de vinhos com características químicas e organolépticas melhoradas.

A importância enológica dos aminoácidos livres situa-se directamente a vários níveis que vão desde a fermentação alcoólica, onde são nutrientes essenciais [113; 130] e podem alterar o perfil final dos compostos fermentativos [35; 105], até à formação de compostos pós-fermentativos [209; 227]. Para além da sua relação directa com as características dos vinhos, os aminoácidos livres têm sido utilizados na caracterização e diferenciação de vinhos, no que respeita à sua tipicidade e genuinidade [50; 77; 115], podendo vir a constituir ferramentas úteis no controlo de qualidade e na defesa das denominações de origem. Ao

nível das fermentações alcoólica e maloláctica, os seus teores iniciais nos mostos podem influenciar quer a cinética das próprias fermentações, quer a qualidade final dos vinhos produzidos, ao condicionarem directa ou indirectamente a concentração de compostos como as aminas biogénicas, o sulfureto de hidrogénio ou outros compostos sulfurados, os álcoois superiores, ou os ésteres, entre outros.

### 1.2.1 Importância e papel nas fermentações

Dependendo das condições de fermentação durante a elaboração de um vinho, as necessidades qualitativas e quantitativas em termos de aminoácidos livres vão ser diversas, embora seja possível à maior parte das leveduras crescerem num meio contendo apenas e qualquer um dos diferentes aminoácidos como única fonte de azoto [113], com as excepções da lisina, da histidina e da cisteína [142; 148; 293]. Para as leveduras do género *Saccharomyces*, os aminoácidos dos mostos apenas são úteis na sua forma livre, já que estas possuem pouca ou nenhuma capacidade proteolítica exógena, o que já não acontece por exemplo com outras leveduras que normalmente coexistem nos mostos e vinhos [153; 195].

No caso de fermentações espontâneas em que se pretende a obtenção de um vinho seco, podem ser necessárias cerca de 13 gerações de leveduras, de modo a atingir-se a concentração final de leveduras viáveis considerada normal de $10^6 - 10^8$ células/mL [6; 32]. No caso de fermentações com inoculação de leveduras seleccionadas, o número de gerações necessárias será normalmente menor, dependendo da quantidade de levedura activa inoculada. Contudo, e em qualquer dos casos, considera-se que para a fermentação completa de cerca de 210 g/L de açúcares fermentáveis são necessários cerca de 140 mg N/L a 160 mg N/L de azoto assimilável (e em que cerca de 20 mg N/L seja proveniente de azoto amoniacal [236]).

Como nutrientes essenciais durante a fermentação alcoólica e constituintes da fracção de azoto assimilável (que para além dos aminoácidos assimiláveis ainda considera a amónia), os teores iniciais de aminoácidos nos mostos influenciam a taxa de crescimento levuriano. Para além de haver diferenças significativas entre estirpes de leveduras quanto às exigências quantitativas de azoto assimilável [133; 134], também os diferentes aminoácidos constituem melhores ou piores fontes de azoto para as leveduras.

No geral, a incapacidade de certos aminoácidos para servirem como fontes biossintéticas de azoto, advém de bloqueios metabólicos permanentes ou condicionais, que

impedem a metabolização parcial ou total desses compostos. Por exemplo, a prolina não é normalmente utilizada em grande extensão em condições enológicas, devido à inibição da sua permease por outras fontes de azoto [156] e à disponibilidade limitada de oxigénio para actividade da prolina oxidase necessária à sua metabolização [74]. No caso da histidina, algumas leveduras parecem não conseguir degradar este aminoácido, enquanto que outras o fazem [154].

Do ponto de vista tecnológico e produtivo, os teores de aminoácidos livres nos mostos têm importância relevante, já que são um dos factores que influenciam as paragens e amuos de fermentação. O transporte para o interior das leveduras faz-se, para a maioria dos aminoácidos, através de dois tipos de sistemas transportadores conhecidos, um de alta e outro de baixa especificidade. O de alta especificidade é constituído pelas diferentes permeases que transportam um só ou um grupo restrito de L-aminoácidos, das quais já se conhecem pelo menos 11 diferentes. Este sistema parece estar funcional principalmente nas primeiras fases do transporte activo dos aminoácidos, enquanto que o de baixa especificidade parece ser o principal mecanismo de transporte nas fases mais avançadas da fermentação. Este sistema de baixa especificidade denomina-se GAP – "General Amino acid Permease" – e possibilita o transporte de D- e L-aminoácidos neutros e básicos [100]. A GAP é inibida e reprimida pela amónia [99].

Como o transporte da maioria dos aminoácidos parece estar associado ao gradiente protónico existente entre o mosto e o interior das leveduras, fazendo-se através de um sistema simporte associado à entrada de protões na célula (que depois voltam para o exterior através de uma ATPase da membrana plasmática [250]), e como a presença de etanol dissipa esse gradiente protónico [51], Bisson sugeriu ser esta a justificação para a acumulação de aminoácidos no interior das leveduras acontecer nas fases iniciais da fermentação onde as condições do meio ainda o permitem [30].

Este é um dos motivos pelo qual a eficácia da adição de fontes de azoto como prática correctiva das paragens e amuo de fermentação por carência de azoto não é independente do momento da sua realização. As práticas mais correntes são a adição de azoto assimilável logo no início da fermentação ou depois da paragem se ter verificado, acompanhadas de um arejamento dos mostos com vista a fornecer um suplemento de oxigénio. No entanto esta parece não ser a estratégia mais correcta. Sablayrolles *et al* (1996) [238] estudaram os efeitos da adição combinada de azoto e oxigénio em diferentes momentos da fermentação e verificaram que essa prática, sendo pouco eficaz no início principalmente no que diz respeito ao oxigénio, originou os melhores resultados em termos

da duração da fermentação e da quantidade de açúcar residual, numa fase intermédia. Em qualquer dos casos, a adição de azoto deverá fazer-se sempre antes da paragem da fermentação para que se registem efeitos positivos [26], tendo-se sempre em atenção que alguns suplementos podem conter azoto em formas inacessíveis para as leveduras (por exemplo, proteínas). Sendo verdade que em alguns casos as paragens ou amuos de fermentação se devem a uma deficiência de azoto assimilável, também é verdade que as causas podem ser outras, como as deficiências vitamínicas, temperaturas extremas, ou o antagonismo entre leveduras e bactérias [31; 32; 122; 127], entre outras.

Podem ser diversos os factores que influenciam os teores iniciais de azoto dos mostos. Quer factores viticulturais como a casta [123; 258], o estado de maturação [85; 118] ou o nível de fertilização azotada [25; 216; 259], quer factores tecnológicos. Sabe-se por exemplo que os mosto de prensa podem conter mais azoto que os de bica aberta [32] ou que a utilização de bentonite pode contribuir para a diminuição da concentração dos aminoácidos nos mostos, principalmente aqueles com carácter básico como a arginina [260].

Na tabela 1, apresentam-se alguns valores da concentração dos principais aminoácidos livres normalmente presentes nos mostos, e referentes a amostras de proveniências geográficas diversas, de diferentes castas e anos de produção.

Os aminoácidos encontrados nas maiores proporções são a glutamina, a alanina, o ácido γ-aminobutírico, a arginina e a prolina (na verdade um iminoácido), embora estes dois últimos sejam, por norma, os maioritários. Pelos dados apresentados, é possível verificar-se que se registam variações apreciáveis nas concentrações de quase todos os aminoácidos livres, entre os mostos estudados. A essa variabilidade estão associadas diferentes condições de fermentescibilidade dos respectivos mostos.

Torna-se pois necessário que os enólogos façam uma avaliação caso a caso dos níveis de azoto dos mostos com que trabalham, de forma a poderem evitar da melhor forma as paragens e amuos de fermentação por carência de azoto, problemas por vezes de difícil resolução. Por outro lado, que lhes permita também calcular a quantidade de azoto assimilável a adicionar em cada caso, de forma a não caírem no extremo oposto de obterem vinhos com grande excesso de azoto assimilável, o que pode contribuir para o aumento da sua instabilidade microbiológica, para a formação aumentada de carbamato de etilo, ou para a diminuição da formação de alguns compostos com influência organoléptica durante a fermentação como os álcoois superiores [32]. Sobre estes últimos faz-se uma abordagem mais aprofundada no decorrer deste capítulo.

**Tabela 1.** Teores médios dos aminoácidos mais frequentes, encontrados em alguns mostos de diferentes origens, castas e anos de produção (mg/L).

| Aminoácido | Proveniência | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Espanha[a] | França[b] | E.U.A.[c] | E.U.A.[d] | Portugal[e] | Mínimo[f] | Máximo[f] |
| Asp | 42,1±6,8 | 12,7 | 33,6±15,5 | | 15 | 13 | 42 |
| Glu | 61,4±9,4 | 69,4 | | | 51 | 51 | 69 |
| Asn | | | | | 17 | | 17 |
| Ser | 98,1±19,3 | 51,4 | | | 48 | 48 | 98 |
| Gln | 214,1±50,0 | | 198,2±213 | | 115 | 115 | 214 |
| His | 73,2±29,3 | 9,6 | 35,1±25,9 | | 61 | 10 | 73 |
| Gly | 13,5±4,1 | | | | 12 | 12 | 14 |
| Thr | 57,5±16,8 | 25,2 | | | 56 | 25 | 58 |
| Cit | | | 6,5±10,1 | | 10 | 6 | 10 |
| Arg | 172,1±60,9 | 233,8 | 339,2±261,5 | 464,7±366,2 | 969 | 172 | 969 |
| Ala | 106,1±11,2 | 34,7 | 191,6±202,5 | | 107 | 35 | 192 |
| Gaba | 57,1±13,4 | | | | 250 | 57 | 250 |
| Tyr | 19,5±6,0 | 6,0 | 18,9±16,7 | | 31 | 6 | 31 |
| Val | 32,4±8,9 | 18,0 | 42,8±35,2 | | 58 | 18 | 58 |
| Met | 8,2±5,3 | 2,1 | 11,9±10,5 | | 19 | 2 | 19 |
| Trp | | 5,2 | | | 36 | 5 | 36 |
| Phe | 15,1±6,2 | 30,6 | 36,9±32,1 | | 12 | 12 | 37 |
| Ile | 12,9±4,1 | 11,6 | 26,2±23,9 | | 33 | 12 | 33 |
| Leu | 16,8±5,5 | 17,4 | 32,9±30,0 | | 19 | 17 | 33 |
| Orn | | | 10,4±13,9 | | 13 | 10 | 13 |
| Lys | 0 | 3,8 | 7,1±5,7 | | 18 | 0 | 18 |
| Pro | 1046±68 | 136 | 1396±1270 | 469±250 | 1176 | 136 | 1396 |

Legenda: Asp - aspartato; Glu - glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba - ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina; a - [105]; b - [85]; c - [123]; d - [258]; e - [20]; f- das médias.

Notas: referência a – 12 mostos brancos da casta Chardonnay; referência b – médias de 2 anos em mostos brancos; referência c – mostos de várias castas brancas e tintas, com diferentes porta-enxertos e de várias proveniências; referência d – 35 mostos brancos de várias castas e de diferentes anos; referência e – 2 mostos tintos para a produção de Vinho do Porto.

Como já foi referido antes, para além de condicionarem a cinética fermentativa e os próprios teores de aminoácidos posteriormente presentes nos vinhos, os teores de aminoácidos livres nos mostos ainda influenciam outros parâmetros importantes tecnologicamente. São deles exemplos as quantidades formadas de compostos voláteis como os álcoois superiores e correspondentes derivados, o sulfureto de hidrogénio, as aminas biogénicas ou o carbamato de etilo. Os dois últimos, por terem sido objectos de estudo durante a realização deste trabalho, serão tratados em capítulos a eles dedicados.

### 1.2.1.1 Álcoois superiores

O teor de álcoois superiores dos mostos é praticamente nulo, residindo no processo fermentativo a sua principal origem [193].

Embora a formação dos álcoois superiores não dependa exclusivamente do metabolismo, pelas leveduras, dos aminoácidos livres [222], estes compostos podem formar-

se directamente a partir dos aminoácidos livres por mecanismos de transaminação ou desaminação, descarboxilação e redução (mecanismo de Ehrlich). Estes mecanismos estão globalmente integrados e resumidos no esquema seguinte:

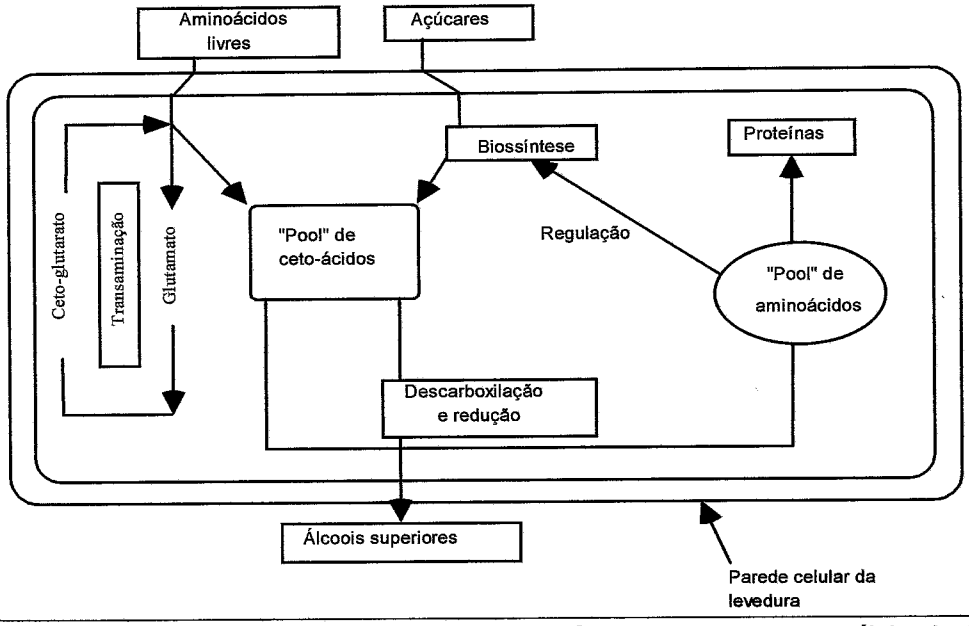



**Figura 1.** Representação esquemática da formação de álcoois superiores na célula de levedura. Adaptado de [17].

Quando os aminoácidos sofrem transaminação ou desaminação os ceto-ácidos resultantes podem ser excretados directamente ou descarboxilados, originando os aldeídos correspondentes e depois reduzidos a álcoois. Este último processo parece desempenhar a importante função metabólica de controlar a reoxidação do NADH [229; 279].

Apesar destas substâncias exibirem um aroma intenso e "duro", por vezes desagradável, teores inferiores a 300 mg/L são normalmente considerados como desejáveis e com uma contribuição positiva para as características organolépticas dos vinhos [232].

Apesar do mecanismo de Ehrlich não ser a única e em alguns casos talvez nem mesmo a principal via de formação dos álcoois superiores [222] já que estes se podem formar igualmente a partir das moléculas dos açúcares, verifica-se que a quantidade de álcoois superiores formados aumenta com o aumento da quantidade de aminoácidos presentes no meio [16]. Um aumento progressivo no azoto assimilável do meio fermentativo, leva a uma redução da concentração dos álcoois superiores (com excepção do n-propanol) [210], devendo-se esta relação inversa provavelmente à repressão da transaminação e por consequência da via de Ehrlich, por parte do azoto [154].

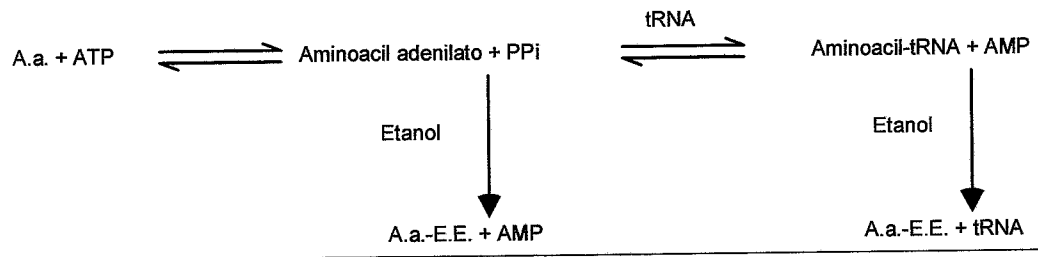



**Figura 2.** Esquema de um possível mecanismo para a formação de ésteres etílicos de aminoácidos durante a fermentação alcoólica. Adaptado de [119].

Legenda: A.a. – aminoácido livre; ATP – adenosina tri-fosfato; Ppi – fosfato inorgânico; tRNA – ácido ribonucleico de transferência; AMP – adenosina mono-fosfato; E.E. – éster etílico.

Este mecanismo permite explicar o padrão de formação dos vários ésteres ao longo da fermentação, as diferenças de produção dos diferentes ésteres encontradas entre as duas estirpes de leveduras utilizadas pelos autores e ainda alguma da toxicidade sobejamente conhecida do etanol durante as fases finais da fermentação.

### 1.2.1.3 Sulfureto de hidrogénio

O sulfureto de hidrogénio ($H_2S$) é um composto ao qual tem sido dedicado muito do esforço de investigação ao nível da enologia, pelas características negativas que a sua presença comporta para as propriedades sensoriais das bebidas alcoólicas. O $H_2S$ é um composto com um aroma desagradável e com um limiar de percepção extremamente baixo, da ordem dos 10 μg/L [112].

A formação do $H_2S$ durante a fermentação alcoólica, dá-se normalmente em quantidades inferiores às do limiar de percepção [112]. No entanto, o $H_2S$ pode ser considerado como um dos mais indesejáveis subprodutos da fermentação alcoólica [289].

À imagem do que acontece com outros compostos, o aparecimento de sulfureto de hidrogénio nos vinhos, pode também ter duas origens distintas: a química e a biológica. A origem química, menos importante, e uma vez que não se relaciona de forma directa com os teores de aminoácidos livres, não será aqui abordada. De uma forma breve, o processo pode resumir-se pela redução não enzimática de enxofre elementar, causada por certos compostos redutores formados pelas leveduras durante a fermentação [247].

No que diz respeito à origem biológica deste composto, cuja formação tem lugar durante a fermentação alcoólica, com ela têm sido relacionados vários factores como as estirpes de leveduras que efectuam as fermentações [1], bactérias, temperatura, pH, vitaminas, concentração celular dos inoculados, iões metálicos, origem das uvas e autólise

das leveduras, (revisto em [76]) e para além destes a presença de compostos sulfurados [112] ou a concentração de azoto aminado livre [95; 132; 289].

Dos factores atrás mencionados, a concentração de azoto aminado livre é aquele que está mais intimamente ligado com a produção de sulfureto de hidrogénio, havendo uma correlação negativa entre a concentração de azoto assimilável e a produção de sulfureto de hidrogénio [112; 131; 290]. Em 1979, Vos e Gray [290] sugerem a hipótese do $H_2S$ ser produzido durante a fermentação pelas leveduras, como uma consequência da carência de azoto assimilável no mosto. Nestas condições, as leveduras excretariam proteases para o meio com a finalidade de assim poderem utilizar o azoto proteico do mosto. Neste processo, os derivados sulfurados seriam libertados sob a forma de $H_2S$.

No entanto, Jiranek e Henschke (1991) [131] contestam em parte este mecanismo, uma vez que é possível observar a formação de $H_2S$ em meios sintéticos sem proteínas e com um deficiente conteúdo em azoto assimilável [263].

Jiranek e Henschke sugerem ainda, que a formação em excesso de sulfureto de hidrogénio durante a fermentação pode ser causada por condições, explicadas a seguir, que levem a uma produção excessiva de $S^{2-}$ (ou $H_2S$, a sua forma ácida) pela via SRS ("Sulfate Reduction Sequence") - figura 3.

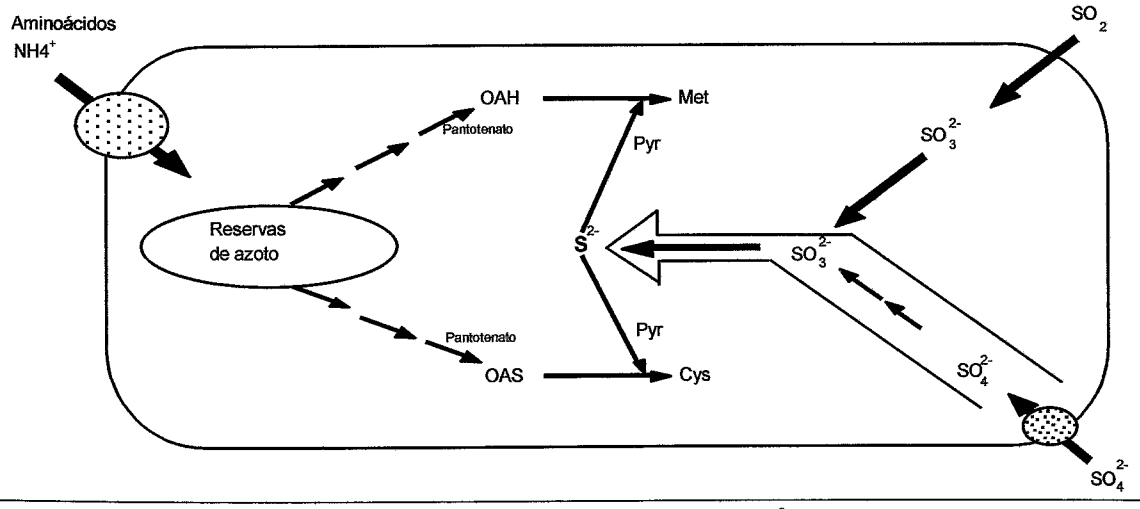



**Figura 3.** Descrição esquemática da redução do enxofre inorgânico via SRS a sulfureto e sua posterior incorporação na biossíntese dos aminoácidos. Adaptado de [131].

Legenda: OAH- O-acetilhomoserina; OAS- O-acetil-serina; Pyr- piridoxina; Met – metionina; Cys – cisteína.

Nesta via metabólica, o $H_2S$ é um intermediário da síntese quer da metionina, quer da cisteína. Estes aminoácidos são essenciais para a síntese proteica. Em condições normais, isto é, de existência de concentrações de metionina ou seus derivados que satisfaçam as necessidades da célula, a produção de $S^{2-}$ é altamente regulada e só se verifica nas quantidades estritamente necessárias. Contudo, em condições que façam baixar os níveis celulares dos derivados da metionina (os principais reguladores da SRS), a via SRS será activada com o intuito de restabelecer esses níveis, havendo a formação de $S^{2-}$ em quantidades superiores às requeridas pela levedura para a biossíntese dos aminoácidos [112].

Esta hipótese foi posteriormente adoptada por Giudici e Kunkee (1994) [95], que confirmaram também a redução do $SO_4^{2-}$ a $S^{2-}$ pelas leveduras, em condições fermentativas de deficiência de azoto assimilável. Anteriormente, Stratford e Rose (1985) [263], propuseram que a produção em excesso de $H_2S$ se deveria principalmente à redução do azoto inorgânico em quantidades superiores às necessárias para o metabolismo celular.

Neste trabalho, foi ainda verificada mais uma vez a importância da estirpe de levedura nos níveis de $H_2S$ produzido e a relação entre a produção de maiores quantidades de n-propanol e estirpes de leveduras que não produzem $H_2S$ ou o produzem em pequenas quantidades [96].

Identificada a carência de azoto assimilável dos mostos como a principal causa actual da produção excessiva de sulfureto de hidrogénio durante a fermentação, embora esta esteja dependente, como já referimos, de factores como a estirpe de levedura, existência de compostos sulfurados precursores de $H_2S$, velocidade de crescimento das culturas e actividade da enzima sulfito reductase, Jiranek *et al* (1995) [132], sugerem que a adição de compostos ao mosto que possam originar precursores azotados que se combinem com o $S^{2-}$ para formar compostos orgânicos sulfurados, pode prevenir essa produção excessiva. Dos compostos acima referidos quase todos os aminoácidos parecem fazer parte, com excepção da cisteína, cuja adição induz a formação e libertação de $H_2S$ em quantidades superiores às provocadas pela própria carência de azoto.

A cinética fermentativa ou os teores de álcoois superiores, de ésteres ou de sulfureto de hidrogénio são, só por si, motivos mais do que suficientes para justificarem a importância da fracção azotada correspondente aos aminoácidos livres e da sua quantificação. No entanto não esgotam a sua lista de influências, como veremos mais à frente neste trabalho.

A quantificação de aminoácidos livres nos mostos não é ainda uma técnica de rotina nos laboratórios de enologia, em grande parte pelo facto dos métodos analíticos existentes para o efeito ainda não o permitirem. Porém, se considerarmos o ponto de vista dos enólogos, existe já pelo menos um método que permite, de uma forma rápida e relativamente simples, a obtenção de informação acerca dos teores de azoto aminado nos mostos. Aos enólogos, não interessará tanto saber os teores individuais de cada um dos diferentes aminoácidos, mas sim ter uma medida dos níveis de azoto assimilável total, de forma a poderem circundar potenciais situações de risco, pelo menos as mais importantes.

Esse método, que nos parece o de maior praticabilidade, baseia-se numa determinação espectrofotométrica a 335 nm de uma solução constituída por sumo e reagente de derivatização com *o*-ftaldialdeído (OPA) [43], sendo o valor obtido comparado com uma recta padrão obtida com base em padrões de isoleucina.

Embora este método permita apenas a quantificação, mais ou menos exacta, dos níveis de azoto aminado primário, deixando de parte o ião amónio que faz parte da fracção azotada assimilável e por vezes representa uma fracção significativa desta nos mostos, a sua aplicação parece-nos de extrema importância e utilidade. Especialmente se associada à quantificação do ião amónio, o que pode ser feito através de um eléctrodo selectivo de amónia [176], ou ainda por métodos enzimáticos ou químicos [110]. A avaliação dos teores de azoto assimilável iniciais dos mostos, pode ainda ser realizada através de métodos microbiológicos [183], que nos parecem contudo de inferior praticabilidade.

### 1.2.2 Relação com a tipicidade e genuinidade

A abordagem dos teores de aminoácidos livres em vinhos pode ser feita sob vários pontos de vista, consoante o objectivo. São, por exemplo, muitas vezes relacionados com a qualidade dos vinhos [105; 275]. No entanto, tal como outros compostos cuja origem reside maioritariamente na matéria prima – os mostos – os aminoácidos livres podem ser bons candidatos a descritores do percurso dos vinhos desde a uva até ao momento do seu consumo.

Os conceitos de tipicidade e genuinidade, desde sempre importantes no sector vitivinícola, estão implícitos de forma fundamental na definição das denominações de origem. A tipicidade, ligada intimamente ao conceito de "terroir", pode ser entendida como o resultado inconfundível da expressão de uma conjuntura de factores: Fisiológicos; Aleatórios; Culturais; e Ecológicos – a que decidimos designar de factores FACE. No grupo de factores

aleatórios incluímos aqueles que todos os anos se modificam (ainda que os outros se mantenham mais ou menos constantes), ou que ainda não controlamos ou compreendemos perfeitamente. Da mesma forma que não existem duas faces iguais, apesar de se poderem agrupar em tipos, também nos vinhos não existem duas combinações exactamente iguais dos factores referidos (basta referirmos os Vinhos de Quinta), sem deixar de ser possível distinguir os vinhos Durienses dos do Dão (duas denominações contíguas geograficamente). E mesmo que dois vinhos nasçam com FACEs idênticas, o envelhecimento encarrega-se de os tornar diferentes. Esta ideia de individualidade parece-nos ligada ao vinho de forma fundamental. Resta-nos conseguir distinguir e agrupar (classificar?) as múltiplas e diferentes FACEs dos vinhos.

Já o conceito de genuinidade é mais geral e abrangente, embora se possa associar ao de tipicidade. É no entanto mais utilizado no sentido da pureza, da verdade, ou da ausência de elementos estranhos à definição de vinho, qualquer que seja a sua origem geográfica ou biológica.

A garantia da tipicidade e da genuinidade tem sido um dos desafios maiores do sector enológico. É que, tal como nos humanos, há operações plásticas que podem enganar mesmo os mais informados. Desde sempre os progressos científicos e tecnológicos puderam ser utilizados de duas formas, para o bem e para o mal, sendo que esta classificação depende sempre do ponto de vista de quem a faz. Não sendo um desafio perdido, antes ganho em muitos casos, a busca de meios de garantir as características de tipicidade e genuinidade segue no seio do próprio vinho. Como se refere no ponto 1.6, a análise de alguns compostos como os isótopos, os elementos minerais, os aminoácidos livres ou os compostos aromáticos pode ser utilizada na caracterização dos vinhos. O objectivo aqui é analisar o papel imputável aos aminoácidos livres nessa caracterização.

As variáveis que afectam os teores de aminoácidos livres nos vinhos são múltiplas e nem todas bem compreendidas. A figura 4 resume-as em forma de diferentes etapas.

O facto dos aminoácidos acompanharem todo o processo produtivo e por ele serem afectados, faz deles bons candidatos a possíveis descritores desse mesmo processo, caso nos seja possível compreendermos perfeitamente o efeito combinado dos factores que influenciam os seus teores em cada passo. A dificuldade reside não na avaliação dos efeitos ao nível individual, mas sim ao nível global, sendo essa que está em causa quando tentamos interpretar os resultados obtidos nos trabalhos de discriminação entre vinhos diferentes.

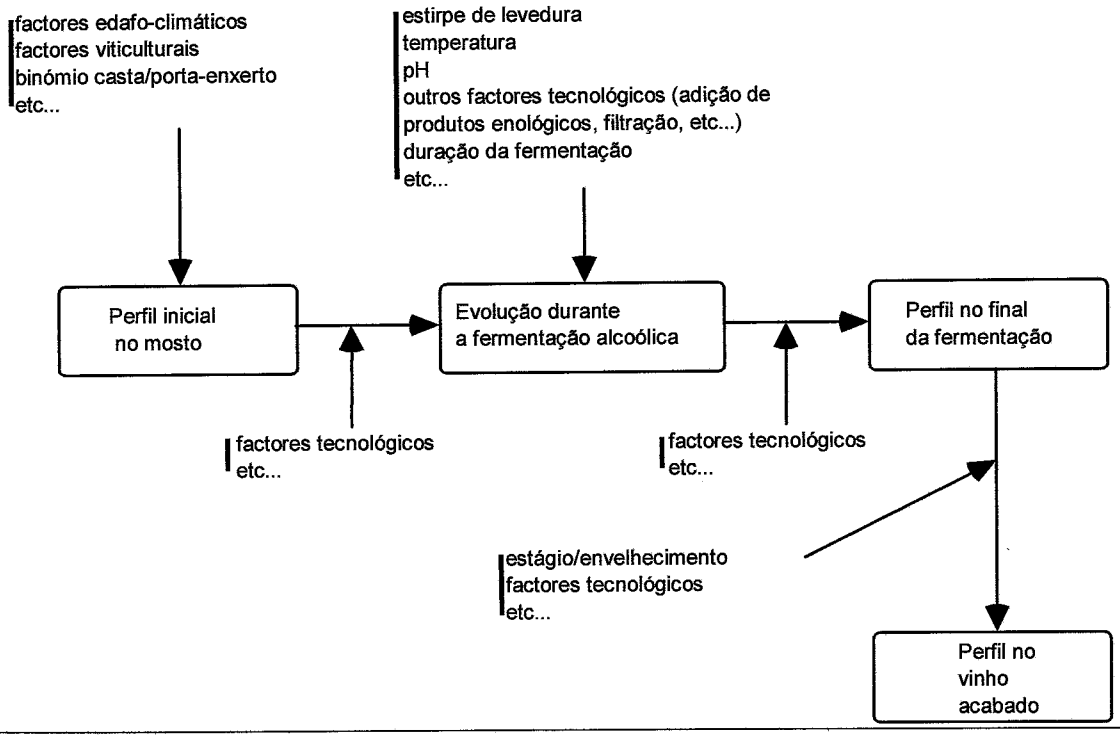



**Figura 4.** Etapas determinantes na evolução do perfil de aminoácidos desde o mosto até ao vinho. Extraído de [235].

Para além dos já referidos, o efeito de muitos dos factores FACE foi já avaliado, em alguns casos, individualmente. Sejam os climáticos [145], os viticulturais como a casta/porta enxerto [211] ou a fertilização azotada [146; 211], ou os tecnológicos como os tratamentos de clarificação [11; 104], tipo de leveduras [97] ou tecnologias de vinificação [12; 103; 198], entre muitos outros. Com base nestes conhecimentos, os teores de aminoácidos livres como únicas variáveis ou associadas a outras, foram utilizados por alguns autores, a maior parte das vezes recorrendo a técnicas de análise multivariável, para distinguirem vinhos de diferentes anos de produção [124], origem geográfica [204; 266], origem varietal [194; 226; 282] ou avaliarem a sua tipicidade [115].

No que se refere aos teores dos aminoácidos livres que é mais frequente encontrar-se nos vinhos, a tabela 2 mostra alguns dos valores reportados por outros autores e por nós, em trabalhos anteriores.

**Tabela 2.** Teores médios dos aminoácidos mais frequentes, encontrados em alguns vinhos de diferentes origens, castas e anos de produção (mg/L).

| Aminoácido | Proveniência | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Espanha[a] | Portugal[b] | Itália[c] | França[d] | Espanha[e] | Mínimo[f] | Máximo[f] |
| Asp | 15,0±9,5 | 69,0±24,9 | 8,7±4,5 | 41±31 | 18 | 9 | 69 |
| Glu | 41,0±32,2 | 83,2±71,2 | 23,8±17,2 | | 32 | 24 | 83 |
| Asn | | | | | 44 | | 44 |
| Ser | 16,0±12,0 | 67,7±18,1 | 6,2±3,5 | 32±37 | | 6 | 68 |
| Gln | 5,1±2,6 | | | 53±106 | | 5 | 53 |
| His | 45,0±20,8 | 56,0±19,5 | 5,9±2,0 | 48±49 | 12 | 6 | 56 |
| Gly | | 116,0±18,7 | 9,9±4,0 | | 18 | 10 | 116 |
| Thr | 10,1±3,4 | 58,4±16,1 | 5,6±3,1 | 36±30 | | 6 | 58 |
| Cit | | | | | | | |
| Arg | 101,1±58,2 | 184,3±151,4 | 59,4±41,7 | 50±53 | | 50 | 184 |
| Ala | 87,4±70,8 | 182,1±42,7 | 17,9±10,4 | 86±73 | 19 | 18 | 182 |
| Gaba | 103,4±17,2 | 93,2±53,2 | 25,8±17,4 | | 12 | 12 | 103 |
| Tyr | 10,4±2,9 | 49,0±13,1 | 7,4±5,5 | | 45 | 7 | 49 |
| Val | 8,0±2,1 | 56,5±13,6 | 3,4±2,6 | 43±27 | 8 | 3 | 57 |
| Met | | | 3,0±0,7 | | 4 | 3 | 4 |
| Trp | | | | | | | |
| Phe | 12,2±7,9 | 41,8±12,6 | 7,7±6,5 | 90±59 | | 8 | 90 |
| Ile | 5,2±1,3 | 40,4±12,6 | 2,6±1,9 | | | 3 | 40 |
| Leu | 21,1±4,7 | 56,9±15,4 | 3,6±2,2 | 74±53 | 19 | 4 | 74 |
| Orn | | | | | 9 | | 9 |
| Lys | 13,9±3,7 | 73,1±19,5 | 13,1±7,9 | 78±71 | 20 | 13 | 78 |
| Pro | 978±36 | 3825±1055 | 180±76 | 857±297 | 615 | 180 | 3825 |

Legenda: Asp - aspartato; Glu - glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; GABA - ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina; a - [105]; b - [115]; c - [248]; d - [29]; e - [36]; f- das médias.

Notas: referência a – 12 vinhos brancos da casta Chardonnay; referência b – médias de 55 vinhos do Porto; referência c – 26 vinhos base para produção de espumante, de dois anos diferentes; referência d – vinhos de 8 castas brancas; referência e – médias de 2 vinhos para produção de Xerez, de dois anos diferentes.

Os dados apresentados, reportam-se a vinhos brancos e tintos, de vários tipos, proveniências, castas e anos. Da mesma forma que para os mostos, os teores de quase todos os aminoácidos apresentam variações consideráveis entre as amostras consideradas. Os aminoácidos mais abundantes são a glicina, a arginina, a alanina, o ácido γ-aminobutírico e a prolina, seguidos em importância pelo glutamato, fenilalanina, leucina e lisina.

Em muitos casos, o teor em prolina é um dos factores com maior poder discriminante, quer se trate de diferenciar castas [265] ou origem geográfica [7; 86]. Os teores de prolina, apesar de poderem ser igualmente influenciados pelos factores FACE, não são normalmente afectados pela fermentação, em oposição aos restantes aminoácidos. Pelos motivos referidos em 1.2.1, a prolina não constitui uma fonte azoto para as leveduras, em condições enológicas. Como tal, e não sendo significativamente alterados os seus teores pela etapa fermentativa, a prolina pode, melhor do que os outros aminoácidos, ser uma variável que melhor descreve os factores FACE que originaram determinado vinho.

## 1.3 Aminas

As exigências dos consumidores em relação às características dos alimentos e das bebidas, são hoje em dia muito específicas no que diz respeito a determinados aspectos, e nesse contexto o vinho não é excepção. Os consumidores, e consumidores somos todos, exigem cada vez mais novos produtos, produtos provenientes de uma determinada região ou de um processo de fabrico particular, com benefícios reais ou com menores efeitos negativos ao nível da saúde. Estes factos modificam continuamente as especificações ao nível da autenticidade, qualidade e segurança alimentar. Um importante grupo de compostos que naturalmente existem nos vinhos – as aminas biogénicas – têm sido estudadas no contexto referido anteriormente.

### 1.3.1 Importância em vinhos

A designação de aminas biogénicas é empregue por vezes de uma forma um pouco ambígua, ora designando apenas as aminas com efeitos nefastos no organismo humano, ora englobando todas as aminas com origem biológica, incluindo as voláteis. Neste trabalho optou-se pelo critério mais restritivo, isto é, por designar de aminas biogénicas as aminas aromáticas e heterocíclicas e as poliaminas.

As aminas biogénicas são compostos naturais com diversas funções nos organismos onde são produzidas, e que podem incluir as de reserva de azoto, controlo de crescimento nos microorganismos e vegetais, e de neurotransmissão em organismos superiores, entre outras [23], mas que, quando ingeridas através de alimentos onde ocorrem, podem interferir com o normal funcionamento do metabolismo humano (por exemplo, algumas apresentam propriedades vasoactivas ou psicoactivas). Um dos motivos pelos quais a histamina, das aminas biogénicas talvez a mais importante, nos provoca a nós humanos, efeitos indesejáveis, é porque pelo menos algumas das nossas células possuem receptores para ela. De facto, existem pelo menos 3 receptores celulares diferentes para a histamina [23], o que reforça o seu papel importante ao nível da regulação de diversos mecanismos fisiológicos. Sendo assim, a histamina pode ter no nosso organismo uma origem endógena e outra exógena, sendo que a produção endógena participa em processos tão distintos como a resposta imunitária, a secreção gástrica, a contracção muscular ou a regulação da microcirculação sanguínea [44].

Numa situação de intoxicação, os efeitos da histamina no organismo humano vão desde o simples rubor facial, passando pelo edema, inflamações localizadas, náuseas e vómitos, diarreias, hipotensão, dores de cabeça, taquicardia, até situações graves que podem acabar com a morte do indivíduo se a concentração de histamina no sangue for suficiente para produzir taquicardia intensa, espasmo generalizado de toda a musculatura lisa e vasodilatação severa dos vasos capilares e edema, o que provoca uma descida grave na tensão arterial [23]. Apesar de, por via intravenosa, a simples administração de 0,5 mg de cloridrato de histamina provocar violentas dores de cabeça, rubor facial, vómitos e outros sintomas, a administração oral de 100 mg de histamina não provoca normalmente reacção em adultos saudáveis [44], já que a sua absorção intestinal é bastante baixa em condições normais. No entanto se essa administração oral for acompanhada de certos alimentos como o atum [192], os efeitos podem ser completamente diferentes, e em alguns casos verificar-se a aparição de sintomas característicos de intoxicação.

Os principais mecanismos de defesa do organismo relativamente à absorção intestinal desta amina são constituídos por uma barreira física constituída pela mucosa intestinal, pelas mucinas (glicoproteínas) produzidas por esta mucosa, que constituem uma segunda barreira, já que têm a capacidade de se ligarem à histamina, e por pelo menos dois sistemas enzimáticos: a histidina metil-transferase (HMT) e a diamino oxidase (DAO) [268], que participam já no catabolismo da histamina dentro do organismo, nomeadamente ao nível hepático e intestinal. Ora, os efeitos distintos verificados aquando da administração oral de histamina na presença de certos alimentos e na sua ausência, parecem estar relacionados com a presença de substâncias que influenciam o funcionamento desses sistemas de defesa, potenciando o efeito da histamina ingerida concomitantemente. Sabe-se hoje, por exemplo, que várias aminas incluindo a tiramina, triptamina, β-feniletilamina, putrescina e cadaverina, são potentes inibidores das HMT e DAO [269]. Adicionalmente, as poliaminas como a putrescina e a cadaverina têm uma afinidade maior do que a histamina para as mucinas, o que conduz a uma situação de competição pelos locais de ligação [268]. Para além disto, a presença de álcool e acetaldeído pode potenciar a presença de aminas biogénicas ao inibirem sistemas enzimáticos envolvidos na sua degradação [4; 23; 175].

Como se viu, nem só a histamina induz efeitos indesejáveis ao nível do organismo humano. Para além dos efeitos já descritos, também as outras aminas biogénicas desempenham funções metabólicas e apresentam efeitos, dos quais só iremos referir alguns dos aspectos negativos. A tiramina possui propriedades vasoconstritoras e histaminolibertadoras [181], e ainda induz a libertação massiva das catecolaminas nos tecidos

[23]. Os efeitos da β-feniletilamina, pela sua similaridade de estrutura e acção, são idênticos aos da tiramina. A triptamina, uma indolamina, tem propriedades vasoactivas, neuroactivas e psicoactivas [63]. As poliaminas como a cadaverina e putrescina, para além de poderem interferir com o transporte transmembranar de catiões orgânicos e inorgânicos [63; 253], têm como principal consequência potenciarem o efeito das outras aminas ao inibirem a DAO e HMT. As monoaminas como a metilamina, etilamina e isoamilamina cujos efeitos no organismo ainda estão pouco estudados, ou não apresentam riscos sérios para a saúde humana ou o fazem apenas em concentrações bastante elevadas. No entanto, como são compostos bastante voláteis e possuem um alto poder irritante em soluções concentradas, podem influenciar negativamente as características dos produtos onde ocorrem.

A síntese biológica das aminas biogénicas, faz-se à custa da descarboxilação de aminoácidos livres, dirigida por enzimas denominadas descarboxilases, ocorrendo normalmente em alimentos ou mal conservados como certos peixes e carnes [94; 285], ou processados através de fermentação ou de um outro processo que envolva proliferação microbiana [19]. Tem sido assumido que é esta a principal forma de produção das aminas biogénicas nos alimentos onde ocorrem, nomeadamente nos vinhos [231].

A presença das aminas biogénicas nos vinhos há muito que merece a atenção de investigadores e enólogos, o que decorre do facto de existirem registos de efeitos nefastos em certos consumidores [23]. A preocupação é justificada adicionalmente pelo facto do consumo do vinho se rodear de um conjunto de circunstâncias de certa forma especiais. Senão vejamos:

- ao consumo de vinho, está muitas vezes associado o consumo de outros alimentos, que podem eles próprios conter quantidades importantes de aminas biogénicas. É o caso de certas conservas de peixe, onde Giorgio *et al* (1993) [94] detectaram teores de histamina que atingiam os 278 mg/kg, os 12 mg/kg de tiramina ou os 78,2 mg/kg de cadaverina, ou então de produtos fermentados como os estudados por Brink *et al* (1990) [39], onde os teores de histamina, de tiramina e β-feniletilamina mais elevados (140 mg/kg, 625 mg/kg e 46 mg/kg, respectivamente) foram registados em queijo, e os de putrescina e cadaverina em "choucroute" (550 mg/kg e 311 mg/kg, respectivamente);

- nos vinhos onde se detecta histamina, existem normalmente outras das aminas referidas anteriormente [5], o que pode conduzir a efeitos de sinergia e potenciação dos efeitos nefastos;

- a presença de etanol e de acetaldeído nos vinhos pode aumentar a absorção intestinal e os efeitos de histamina presente na dieta [23].

No entanto, e a acrescentar ao que foi referido, há ainda investigadores que atribuem alguns dos efeitos endereçados às aminas biogénicas dos vinhos, a outras causas como a uma hipersensibilidade ao dióxido de enxofre [23], sempre presente nos vinhos, ou mesmo a origens psicossomáticas, devido a estudos efectuados em que se verificou um grande número de casos positivos de intoxicação, em indivíduos a quem fora administrado um placebo [173]. Relativamente aos teores de aminas biogénicas encontrados nos alimentos referidos acima, os teores que têm sido registados nos vinhos podem considerar-se baixos, tendo sido já identificadas mais de 25 aminas diferentes em vinhos [158]. As aminas biogénicas que normalmente se encontram em vinhos (não necessariamente em simultâneo) são as seguintes, encontrando-se os respectivos precursores entre parêntesis:

- Aminas aromáticas e heterocíclicas: histamina (histidina); tiramina (tirosina); β–feniletilamina[2] (fenilalanina); e triptamina (triptofano);
- Di-, tri-, e poliaminas alifáticas: putrescina[3] (arginina e ornitina), cadaverina[4] (lisina), agmatina (arginina), espermina e espermidina (putrescina).

Outras aminas sem efeitos negativos descritos (pelo menos nas concentrações normalmente encontrados nos vinhos), são as aminas voláteis alifáticas: etilamina (alanina), metilamina (glicina), isoamilamina[5] (isoleucina) e etanolamina (serina).

Na tabela 3 reúnem-se alguns dados referentes à presença das aminas de ocorrência mais comum em vinhos. É possível verificar que, para a maioria das aminas, a gama de variação encontrada é considerável, sem no entanto atingir os valores apresentados acima referentes a outros alimentos.

[2]- No Inglês é corrente aparecer designada por β-phenylethylamine ou por β-phenethylamine.
[3] Também designada por 1,4-diaminobutano.
[4] Também designada por 1,5-diaminopentano.
[5] Também designada por isopentilamina.

**Tabela 3.** Teores médios de aminas encontrados em alguns vinhos de diferentes origens (mg/L).

| País | Vinhos | n | Hista | | Tira | | Eta | | Etila | | Put | | Cad | | Metila | | Fen | | Try | | Iso | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Min | Máx | Min | Máx | Min | Máx | Min | Máx | Min | Máx | Min | Máx | Min | Máx | Min | Máx | Min | Máx | Min | Máx |
| Vários[a] | T | 102 | **5,73**±0,59 | | **5,18**±0,43 | | | | | | **5,13**±0,50 | | **0,66**±0,11 | | | | | | nd | | | |
| | B | 99 | **3,35**±0,32 | | **4,41**±0,48 | | | | | | **1,94**±0,18 | | **0,92**±0,17 | | | | | | nd | | | |
| Portugal[a] | T | 2 | **1,24**±0,50 | | nd | | | | | | **0,91**±0,17 | | nd | | | | | | nd | | | |
| | B | 4 | **1,12**±0,75 | | **4,43**±2,92 | | | | | | **2,38**±1,22 | | **1,45**±0,99 | | | | | | nd | | | |
| França[a] | T | 50 | **8,14**±1,25 | | **7,27**±0,72 | | | | | | **7,63**±0,92 | | **0,99**±0,23 | | | | | | nd | | | |
| | B | 52 | **4,35**±0,52 | | **6,54**±0,76 | | | | | | **2,26**±0,29 | | **1,43**±0,28 | | | | | | nd | | | |
| França[b] | T+B | 117 | **4,78** | | **5,21** | | | | **1,03** | | **12,54** | | **0,77** | | **0,26** | | **1,31** | | | | **1,53** | |
| | | | 0,03 | 31,63 | 0,13 | 22,10 | | | 0,28 | 2,15 | 0,25 | 137,86 | 0 | 9,91 | 0 | 2,26 | 0 | 9,83 | | | 0 | 10,49 |
| USA[c] | T | 158 | **1,85** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 0,2 | 15,5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | B | 79 | **1,78** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 0,3 | 11,4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Espanha[d] | T | 127 | **4,07** | | **3,03** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 0 | 34,25[f] | 0 | 7,80[f] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | B | 65 | **0,81** | | **1,49** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | R | 34 | **0,86** | | **1,66** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Portugal[e] | T | 6 | **1,21** | | **0,82** | | **15,56** | | **9,15** | | **3,61** | | **0,64** | | **0,68** | | **4,87** | | | | **2,89** | |
| | | | 0,39 | 1,66 | 0 | 2,01 | 9,00 | 24,50 | 5,38 | 11,18 | 1,76 | 6,01 | 0,56 | 0,73 | 0,30 | 1,54 | 0,85 | 12,73 | | | 0,44 | 6,17 |
| | B | 6 | **1,20** | | **0,54** | | **11,32** | | **23,04** | | **2,14** | | **0,63** | | **0,96** | | **0,75** | | | | **1,17** | |
| | | | 0,84 | 1,70 | 0 | 0,78 | 8,00 | 16,46 | 18,94 | 28,55 | 1,31 | 3,63 | 0,40 | 0,71 | 0,53 | 1,56 | 0,29 | 2,05 | | | 0,22 | 4,21 |
| | L | 18 | **0,52** | | **1,24** | | **8,91** | | **10,46** | | **1,28** | | **0,33** | | **0,58** | | **0,39** | | | | **0,74** | |
| | | | 0 | 0,99 | 0,06 | 3,10 | 3,74 | 17,54 | 5,73 | 24,55 | 0,25 | 4,42 | 0 | 0,51 | 0,09 | 0,91 | 0,10 | 1,65 | | | 0,18 | 3,63 |
| **Total de amostras** | | **919** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Máximo** | | | **34,25** | | **22,10** | | **24,50** | | **28,55** | | **137,86** | | **9,91** | | **2,26** | | **12,73** | | | | **10,49** | |
| **Mínimo** | | | **0** | | **0** | | **3,74** | | **0,28** | | **0,25** | | **0** | | **0** | | **0** | | | | **0** | |

Legenda: a - [296]; b - [255]; c - [206]; d - [287]; e - [169]; f - máximo e mínimo referentes ao total de amostras; n - número de amostras; T - tintos; B - brancos; R - rosé; L - licoroso; nd - não detectado; Hista - histamina; Tira - tiramina; Eta - etanolamina; Etila - etilamina; Put - putrescina; Cad - cadaverina; Metila - metilamina; Fen - feniletilamina; Try - triptamina; Iso - isoamilamina.

Nota: Referência a – média ± desvio padrão.

Apesar da complexidade das interacções possíveis entre os diversos factores que interferem com a toxicidade das doses de aminas ingeridas, bem como da grande gama de concentrações encontradas, o que pode tornar o estabelecimento de limites máximos uma tarefa difícil, alguns países estabeleceram já limites máximos recomendados para a presença de histamina em vinhos. São eles a Alemanha (2 mg/L), a Suíça (10 mg/L), a Bélgica (5-6 mg/L), a França (8 mg/L), a Finlândia (5 mg/L), a Áustria (10 mg/L) e a Holanda (3,5 mg/L) [41].

Estes limites reflectem a preocupação que tem sido dirigida à presença de aminas biogénicas em vinhos, embora alguns deles nos pareçam de cumprimento difícil tendo em conta os teores de histamina que têm sido encontrados nestas bebidas.

Para obsidiar a questão da presença de aminas em vinhos, vários estudos têm sido levados a cabo, quer no sentido de caracterizar os teores de aminas presentes nos vinhos de diferentes tipos ou de diferentes regiões, quer no sentido de se conhecerem os factores que influenciam essa presença.

### 1.3.2 Relação com os aminoácidos livres

Apesar de haver já bastante trabalho efectuado sobre as origens e as condições que favorecem a formação de aminas nos vinhos, estes assuntos não se encontram encerrados por não estar completamente esclarecida e compreendida a influência dos factores em causa.

Os trabalhos entretanto realizados, apontam no sentido da origem das aminas residir em dois elementos distintos: as uvas e os processos microbiológicos que têm lugar durante a produção dos vinhos.

No que concerne à origem vegetal, parece não haver dúvidas que os mostos podem apresentar um conteúdo não negligenciável de diferentes aminas. Em 1981, Ough *et al* (1981) [213], identificaram pela primeira vez várias aminas voláteis presentes em uvas, entre elas a isoamilamina, a β-feniletilamina, a metilamina e a etilamina. Quanto às aminas biogénicas, é opinião mais ou menos consensual que as uvas não contêm normalmente histamina em quantidades superiores a 1 mg/L [4; 231], e no que respeita às restantes aminas biogénicas, as quantidades encontradas são, no geral, da mesma ordem de grandeza, com excepção das poliaminas (p.ex. putrescina, cadaverina e espermidina), que são constituintes naturais da videira. As poliaminas encontram-se em diferentes

partes da videira e parecem acumular-se em determinadas condições de "stress" fisiológico [2; 3].

Já no que respeita à origem microbiológica das aminas as opiniões não são tão concordantes. Os primeiros estudos efectuados nesta matéria, sugeriam que os principais agentes produtores de aminas biogénicas nos vinhos fossem as bactérias lácticas (especialmente as *Pediococcus cerevisiae*), e isto por vários motivos. Um deles, é a dificuldade, que aliás ainda hoje se verifica, de se quantificarem pequenas quantidades de aminas biogénicas, principalmente de histamina. Outro, é o de se verificar regra geral, que os vinhos tintos (que, em oposição aos brancos, normalmente realizam a fermentação maloláctica) contêm teores de aminas biogénicas superiores aos brancos (*vide* tabela 3).

Todavia, os estudos realizados posteriormente trouxeram alguma inconsistência à convicção de que as leveduras estariam ilibadas de originar aminas biogénicas nas condições de produção dos vinhos. Uma das formas de se verificar a capacidade de produção de aminas biogénicas por parte de determinados microorganismos é a pesquisa da actividade descarboxilase em meios que os contêm. E se é verdade que se verifica que algumas bactérias lácticas possuem capacidade descarboxilase (sejam *Oenococcus oeni* ou *Pediococcus cerevisiae*) [70; 159; 188], também o é o facto de algumas leveduras poderem apresentar as mesmas características [225]. A acrescentar a este, vem o facto de ser possível detectar em extractos de levedura, quantidades de histamina e tiramina que podem atingir os 2830 mg/kg e 1640 mg/kg respectivamente [34].

Por outro lado, parece que nem sempre as bactérias lácticas com capacidade descarboxilase produzem aminas. A descarboxilação dos aminoácidos por parte das bactérias parece ter uma função energética [187], e como tal Leitão *et al* (2000) [159], bem como Lafon-Lafourcade (1975) [152] e Lonvaud-Funel *et al* (1994) [166] sugeriram que a produção das aminas se dê de forma mais intensa em situações de carência de nutrientes, nomeadamente de glucose ou ácido málico, e que nestes casos a quantidade de histidina presente no meio influencia a quantidade de histamina produzida.

Em reforço desta convicção, vem ainda o facto de alguns autores não terem encontrado relação entre a realização da fermentação maloláctica e a formação de aminas biogénicas, apontando antes para a fermentação alcoólica como a principal fonte destas aminas nos vinhos [42], referindo mesmo um decréscimo dos teores de algumas aminas como a histamina, a putrescina ou a cadaverina durante a fermentação maloláctica. Um outro exemplo, é o trabalho de Vidal-Carou *et al* (1991) [288] em que foi verificado um

decréscimo nos teores de histamina e tiramina durante a alteração microbiológica de alguns vinhos. Alguns autores, sugerem que a presença de aminas como a histamina ou a putrescina nos vinhos são produtos de contaminação microbiológica [42] ou indicativos de deficientes condições sanitárias durante a produção [21; 256].

Não há dúvidas, porém, de que a fermentação maloláctica pode ser uma etapa onde ocorre formação de aminas biogénicas, como o comprovam os trabalhos de Vidal-carou *et al* (1990) [287] e Soufleros *et al* (1998) [255], em que se verificou um aumento significativo dos teores de aminas durante e após a fermentação maloláctica, o que leva alguns autores a considerarem esta a principal origem das aminas biogénicas nos vinhos [4].

Embora a maior parte dos trabalhos que estudaram a influência de alguns factores na formação e presença de aminas biogénicas nos vinhos não tenham quantificado em simultâneo os diferentes aminoácidos livres (ou apresentam apenas os teores de azoto total), alguns fizeram-no e tentaram relacionar os teores de cada aminoácido precursor com a respectiva amina nos vinhos. Contudo, e devido ao pequeno número de trabalhos onde tal foi efectuado, não é possível ainda haver grandes certezas acerca da relação entre os teores de aminoácidos e os teores de aminas nos vinhos, e muito menos da relação entre os teores de aminoácidos nos mostos e os de aminas nos vinhos resultantes, matéria acerca da qual os trabalhos são ainda menos prolixos. Enquanto que Bauza *et al* (1995) [22] encontraram uma correlação significativa entre os teores de putrescina e os dos seus precursores, mas não entre os de β-feniletilamina, tiramina ou histamina e os respectivos precursores, Soufleros *et al* (1998) [255], verificaram que os teores de histamina e tiramina se correlacionavam significativamente com os dos seus precursores e que os vinhos com teores de aminas superiores também apresentavam superiores teores de aminoácidos.

Tal como com outros factores como os teores de $SO_2$ [237; 286; 288], os de ácidos málico e/ou láctico [286; 288], a intensidade de fermentação maloláctica [135; 286; 288], o pH [296], ou o teor total de azoto [206], os teores de aminoácidos livres parecem influenciar as quantidades de aminas produzidas. No entanto, e mais uma vez, tal como com os outros factores, ainda não é possível estabelecer uma relação inequívoca e geral entre os teores de aminoácidos livres e os de aminas biogénicas produzidas durante a produção dos vinhos.

O que parece ressaltar dos trabalhos já realizados, é que podem ser várias as origens das aminas biogénicas nos vinhos, bem como são vários os factores que

condicionam as quantidades que se irão formar em determinado vinho. A conjugação destes factores, não sendo uma tarefa fácil, requer a continuação dos estudos quer no sentido de se caracterizarem os teores num número de amostras tão grande quanto possível, quer no sentido de se encontrar (se é que existe) uma origem principal para cada uma das aminas mais importantes, bem como os factores que mais a influenciam.

Neste trabalho, avaliou-se a influência de vários factores nos teores de aminas de mostos e vinhos, como sejam a região de produção, o ano de produção e a casta, bem como a sua evolução ao longo da fermentação alcoólica e a sua relação com os teores de aminoácidos livres.

## 1.4 Aminoácidos livres e aminas: métodos analíticos

Tal como foi referido anteriormente em relação aos aminoácidos livres, a quantificação por rotina de aminas não é de todo uma realidade nos laboratórios de enologia, quer eles se destinem a dar apoio à produção quer se destinem ao controlo de qualidade ou à fiscalização. Os impedimentos são sobretudo de índole técnica.

Existem globalmente 3 técnicas alternativas que podem ser utilizadas para a análise de aminoácidos livres ou aminas. A primeira, empregando a cromatografia iónica, a ninidrina como reagente de derivatização e detecção por espectroscopia de UV-Vis [64; 160; 243], apresenta problemas ao nível da interferência (nomeadamente na quantificação da prolina) por efeito de matriz e dos limites de detecção conseguidos.

A segunda, é a separação de derivados voláteis dos aminoácidos ou aminas por GC [78; 197; 218] e detecção por FID e/ou MS. A execução desta técnica requer, todavia, uma cuidadosa extracção e pré-concentração da amostra, bem como procedimentos de derivatização pré-coluna algo elaborados. Os passos anteriores à cromatografia propriamente dita, para além de poderem ser bastante demorados, colocam problemas ao nível das percentagens de extracção e rendimento das reacções de derivatização para alguns aminoácidos importantes nos vinhos, nomeadamente para a arginina [126; 139; 283], e histidina. No entanto, se correctamente e cuidadosamente executados, estes métodos apresentam-se como de grande resolução e sensibilidade.

A terceira, baseia-se na separação de derivados de aminoácidos ou de aminas por HPLC e a sua detecção por fluorescência [45; 121; 186; 264]. Este procedimento oferece as vantagens da rapidez e facilidade de execução, já que pode ser executado sem a

extracção ou concentração prévias das amostras, a sua sensibilidade pode ser comparável à obtida por GC, e a sua automatização pode ser mais simples do que os métodos alternativos por GC. Estas vantagens, tornam estes métodos mais apropriados para o processamento de um grande número de amostras. Porventura a desvantagem principal: alguns dos reagentes de derivatização originam picos múltiplos para alguns dos aminoácidos e aminas, e/ou o reagente de derivatização interfere com a quantificação dos derivados [45].

A quantificação de aminoácidos livres e aminas em matrizes como o vinho confronta-se com dois tipos de problemas específicos: primeiro, os baixos níveis destes compostos presentes, apresentando as aminas os teores mais baixos, e, segundo, as interferências causadas pela complexidade da matriz. Tendo como princípio de separação a HPLC, foram já desenvolvidas diversas técnicas de análise para a quantificação de aminoácidos livres e aminas quer em vinhos quer noutras matrizes, sendo as alterações normalmente introduzidas ao nível dos reagentes de derivatização utilizados.

A derivatização pré-coluna, com a formação de derivados fluorescentes, possibilita um ganho significativo em termos de sensibilidade, e a eliminação de muitas interferências devidas à matriz [163], e tem sido a técnica de maior recorrência quando se pretende quantificar os aminoácidos livres em vinhos. Não obstante, a separação dos derivados fluorescentes de aminoácidos e aminas, não deixa de ser uma tarefa difícil, devido à similaridade química e às diferentes gamas de concentração dos diferentes compostos na mesma amostra (por vezes diferem por um factor de 100 ou mais), bem como ao grande número de substâncias analisadas. O método de análise terá pois quer ser bastante selectivo, e de alta resolução.

Os métodos desenvolvidos até hoje, ou só quantificam os aminoácidos primários e (nem sempre) secundários [52; 257], ou só as aminas biogénicas, ou compostos dos dois grupos, mas deixando por quantificar algumas substâncias importantes [22; 158; 169]. Dependendo do método em causa, e apesar de em alguns casos ser possível alargar a lista de compostos que cada determinado método pode permitir quantificar, há em quase todos eles alguns inconvenientes.

A tabela 4, fornece alguma informação acerca dos métodos analíticos reportados mais recentemente adaptados à análise de matrizes complexas como os mostos e vinhos. A lista de compostos considerada na construção desta tabela é constituída por aqueles que ocorrem com mais frequência em mostos e vinhos, ou considerados por nós com elevado interesse enológico.

**Tabela 4.** Comparação dos compostos quantificados por diferentes métodos analíticos, reportados para utilização na análise de mostos e vinhos.

| Composto | Referência | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A[1] | B[2] | C[3] | D[4] | E[5] | F[6] | G[7] | H[8] | I[9] | J[10] | K[11] | L[12] | M[13] | N[14] | O[15] | P[16] |
| Asp | ● | ● | ● | ● | ● | | | ● | [19] | ● | | | ● | ● | ● | [19] |
| Glu | ● | ● | ● | ● | ● | | | ●[18] | [19] | ● | | | ● | ● | ● | [19] |
| Asn | | | | ● | ● | | | ● | ● | ● | | | ● | | ● | ● |
| Ser | ● | ● | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | ● |
| Gln | | | | | ● | | | ● | | ● | | | ● | ● | ● | |
| His | ● | | ● | | | | | ● | ● | ● | ● | | ● | ● | ● | ● |
| Gly | ● | ● | ● | ● | ● | | | ●[18] | ● | ● | | | ● | ● | ● | ● |
| Thr | ● | ● | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | ● |
| Cit | | | | | ● | | | | | | | | ● | | | |
| Arg | ● | ● | | | ● | | | ● | ● | ● | ● | | ● | ● | ● | ● |
| Ala | ● | ● | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | ● |
| Gaba | ● | ● | ● | ● | | | | ●[18] | | ● | | | ● | ● | ● | |
| Tyr | ● | ● | ● | | ● | | | ● | ● | ● | ● | | ● | ● | ● | ● |
| Eta | | | | | | | | | | ●[19] | | ● | | | | |
| Val | ● | ● | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | ● |
| Met | ● | ● | ● | | ● | | | ● | ● | ●[19] | | | [20] | [20] | ● | ● |
| Nva | | | | | | | | | | | | | ● | | | |
| Hista | | | | | | | ● | | | | ● | ● | | | | |
| Trp | [17] | | ● | | ● | | | ● | ● | ● | | | | | | ● |
| Metila | | | | | | ● | | | | | | ● | | | | |
| Phe | ● | ● | ● | | ● | | | ● | ● | ● | ● | | ● | ● | ● | ● |
| Ile | ● | ● | ● | ● | ● | | | ●[18] | ● | ● | | | ● | ● | ● | ● |
| Leu | ● | ● | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● | ● |
| Orn | | | ● | ● | ● | | | | ● | ● | ● | | ● | | ● | ● |
| Lys | ● | ● | ● | ● | ● | | | | ● | ● | | | ● | ● | ● | ● |
| Etila | | | | | | ● | | | | | | ● | | | | |
| Tira | | | | | | | ● | | | | ● | ● | | | | |
| Put | | | | | | ● | ● | | | | ● | ● | | | | |
| Cad | | | | | | ● | ● | | | | ● | ● | | | | |
| Try | | | | | | | ● | | | | | ● | | | | |
| Fen | | | | | | ● | | | | | ● | ● | | | | |
| Iso | | | | | | ● | | | | | | ● | | | | |
| Pro | ● | ● | ● | ● | ● | | | | ● | | | | ● | ● | ● | ● |

Legenda: P – soluções padrão; Asp - aspartato; Glu - glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba - ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Eta – etanolamina; Val – valina; Met – metionina; Nva – norvalina (padrão interno); Hista – histamina; Trp – triptofano; Metila – metilamina; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina; Iso – isoamilamina; Pro – prolina; A - [78]; B - [218]; C - [196]; D - [139]; E - [170]; F - [197]; G - [149]; H- [240]; I - [52]; J - [257]; K - [22]; L - [169]; M - [116]; N - [105]; O - [50]; P- [251].

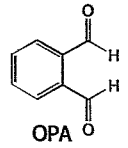
Notas: 1 – GC de derivados trimetilsililados, inclui ainda a hidroxiprolina, a cisteína e o ácido decanóico (padrão interno); 2 - GC de derivados trimetilsililados, inclui ainda os ácidos α-aminobutírico e decanóico (padrão interno); 3 – GC de ésteres N-etoxicarbonil isopropílicos, N-etoxicarbonil metílicos e de N-etoxicarbonil-O(S)-trimetilsili isopropílicos, inclui ainda a *alo*-leucina, a norleucina e a cicloleucina (padrão interno); 4 – GC de derivados N(O,S)-isobutiloxicarbonílicos, inclui ainda a homoserina, o piroglutamato, a cisteína e a cicloleucina (padrão interno); 5 – HPLC de derivados de fenil-iso-tiocianato (PTC), inclui ainda a hidroxiprolina e o ácido α-aminobutírico; 6 - GC-MS de derivados de pentafluorobenzaldeído, inclui ainda a n-butilamina, a n-heptilamina e a metil-$d_3$-amina (padrão interno); 7 – Electroforese capilar de derivados de carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo, inclui ainda a espermina e a espermidina; 8 – HPLC de derivados de OPA/ β-mercaptoetanol; 9 – HPLC de derivados dansilados, inclui ainda a norleucina (padrão interno); 10 - HPLC de derivados de OPA/ β-mercaptoetanol; 11 – HPLC de derivados de cloroformato de 9-fluoro-enil-metilo (FMOC-Cl), inclui ainda a agmatina, a espermina e a espermidina; 12 - HPLC de derivados de OPA/ β-mercaptoetanol; 13 – HPLC de derivados de OPA/ácido 3-mercaptopropiónico; inclui ainda a β-alanina, a N-aminoetil-L-cisteína, a hidroxiprolina e a sarcosina (padrão interno); 14 – HPLC de derivados de fenil-iso-tiocianato (PTC), inclui ainda o ácido α-aminobutírico; 15 – HPLC de derivados de carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo, inclui ainda a cisteína e o ácido α-aminobutírico; 16 - HPLC de derivados dansilados, inclui ainda a norleucina (padrão interno); 17 – coeluição de triptofano e cistina; 18 – coeluição de compostos desconhecidos com estes compostos; 19 – coeluição destes compostos 20 – coeluição com a etanolamina.

Nenhum dos métodos em comparação, está descrito como adequado para a quantificação de todos os compostos considerados.

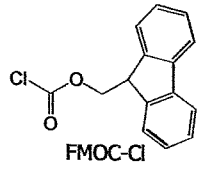
Na obtenção de derivados fluorescentes de aminoácidos e aminas, um dos reagentes mais estudados é o OPA[6], associado a diferentes alquiltióis (que agem como nucleófilos na reacção de derivatização), como o etanotiol [120], o *terc*-butiltiol [228], várias N-acil-L-cisteínas [84; 180], 2-mercaptoetanol [73; 101; 240; 257], e ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA do inglês) [83; 98; 180]. O mecanismo reaccional proposto é o apresentado por Simons e Johnson (1978) [252].

Cada formulação do reagente de derivatização é um compromisso entre a maior sensibilidade permitida por uns, e a maior estabilidade e selectividade de outros. No entanto o OPA tem a desvantagem de não reagir com as aminas secundárias, como a prolina, o que levou alguns autores a procederem à oxidação prévia destes iminoácidos para possibilitar a sua derivatização [61; 83; 129]. Este procedimento, possibilitando a quantificação da prolina e hidroxiprolina, tem a desvantagem de diminuir a resposta de pelo menos alguns dos aminoácidos primários.

Em muitos casos, a impossibilidade de quantificação da prolina em vinhos e mostos, pode ser uma desvantagem considerável, já que este composto é um dos constituintes principais da fracção aminada livre, e pode ser utilizado como elemento de caracterização e genuinidade [53; 205; 277]. No sentido de ultrapassar esta desvantagem, um outro composto, o cloroformato de 9-fluoro-enil-metilo (FMOC-Cl[7]), tem sido estudado. Este composto, reage não só com os grupos amina primários [22; 75; 106; 109], mas também com as aminas secundárias (e portanto com os iminoácidos prolina e hidroxiprolina) [79; 140]. Apesar de permitir a quantificação simultânea dos dois grupos de compostos, a derivatização com FMOC-Cl tem a desvantagem deste reagente interferir com a separação e quantificação dos derivados com interesse, por ser detectado aos comprimentos de onda utilizados na quantificação dos seus derivados, o que não




6 OPA




7 FMOC-Cl

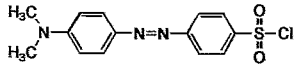
acontece com o OPA, que não apresenta fluorescência como reagente, aos comprimentos de onda utilizados para detectar os seus derivados.

A utilização combinada dos dois reagentes, OPA e FMOC-Cl, quando realizada de forma apropriada, permite a quantificação simultânea de compostos contendo aminas primárias e secundárias, como os aminoácidos e aminas [111; 116; 246].

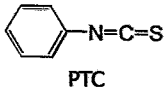
Para além das aminas secundárias, o reagente OPA também não derivatiza a maior parte dos tióis nas condições de reacção normalmente utilizadas. Para que tal aconteça, existem várias alternativas possíveis, embora aquela que nos parece mais adequada é a descrita por Park *et al* (2000) [221], em que o agente nucleófilo, foi substituído por 2-aminoetanol, possibilitando assim a quantificação de compostos de importância crescente em mostos e vinhos, como a glutationa e cisteína.

Convém referir no entanto, que para além do OPA e do FMOC, outros reagentes de derivatização foram estudados nos últimos 30 anos, bem como a derivatização pós-coluna com OPA [72; 230]. A utilização de alguns compostos como agentes de derivatização dos aminoácidos livres e aminas é anterior à do OPA e do FMOC, como o cloreto de dabsilo[8] [162] ou o fenil-iso-tiocianato (PTC[9] – reagente de Edman) [170]. Uma comparação dos métodos empregando estes dois últimos reagentes, bem como o OPA e o FMOC-Cl por HPLC, foi feita em dois artigos consecutivos (1989 e 1990) por Fürst *et al* [91; 92]. Da comparação, vieram a concluir que o OPA permitia melhor sensibilidade, menores erros associados à quantificação da maioria dos aminoácidos, melhor reprodutibilidade e execução mais simples do que a utilização dos outros 3 reagentes. Referem, no entanto, associadas ao OPA a instabilidade dos seus aductos e a impossibilidade de derivatização das aminas secundárias, já aqui referida.

Recentemente, foi desenvolvido um método analítico por HPLC, baseado na separação de derivados fenil-tio-hidantoínas de 18 aminoácidos (derivatização com PTC), em que a fase estacionária é um co-polímero termosensível (poli(metacrilato de N-isopropilacrilamida-*co*-*n*-butilo), e água como fase móvel [136]. Esta nova tecnologia de separação cromatográfica, em que a força motora do mecanismo de retenção parecem ser as interações hidrofóbicas entre as moléculas do soluto e as cadeias poliméricas das




8 Cloreto de Dabsilo




9 PTC

fase estacionária, cuja hidrofobicidade é dependente da temperatura, pode constituir uma alternativa muito vantajosa aos métodos actuais de separação em colunas de fase reversa, por ser muito menos poluente e onerosa em termos económicos e ambientais.

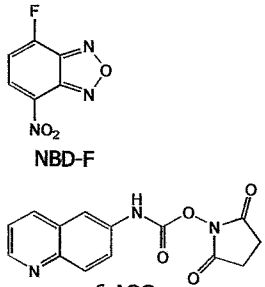
Alguns dos restantes reagentes utilizados foram, de forma resumida, o NBD-F[10] (4-fluoro-7-nitrobenzo-1,2,3-oxadiazol) que permite a derivatização pré-coluna de aminoácidos primários e secundários, bem como dos sulfurados (embora requerendo uma modificação do protocolo de derivatização) [292], o 6-AQC[11] (carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo), com as vantagens documentadas de um rápido e simples procedimento de derivatização, uma boa gama de linearidade, grande estabilidade dos derivados e baixos limites de detecção [57; 58; 149], permitindo ainda a detecção das aminas secundárias. Este reagente foi ainda utilizado com a mesma finalidade, mas em que foi empregue a detecção electroquímica [161].

O BQCA[12] (3-benzoíl-2-quinolinecarboxialdeído), cujo processo de síntese está descrito, foi igualmente utilizado, pela conveniência dos seus máximos de absorção quando detectado por fluorescência com indução laser (laser He-Cd) e dos baixos limites de detecção que proporciona (descritos como sendo da ordem dos poucos fentogramas) [24]. Não derivatiza as aminas secundárias.

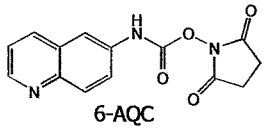
Um outro aldeído, o IDA (1-metoxicarbonil-indolisina-3,5-dicarbaldeído), foi utilizado com derivatização pré-coluna, para a análise de pequenas quantidades de aminoácidos primários (da ordem das fentomoles). No entanto, e apesar de permitir a quantificação da amónia, este reagente requer um tempo de reacção relativamente longo (cerca de 15 minutos), e não permitiu e quantificação de aminoácidos como a tirosina e o triptofano, nem dos secundários como a prolina [203].

---

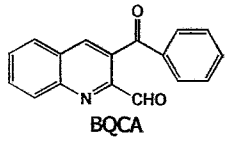
10 NBD-F



11 6-AQC



12 BQCA



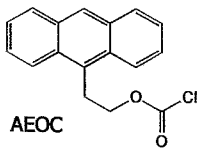
Um análogo do FMOC-Cl, o AEOC[13] (cloroformato de 2-(9-antril)-etilo), foi estudado na quantificação de aminas primárias e secundárias e comparado com o FMOC-Cl em derivatização pré-coluna e detecção por espectroscopia de UV-Vis. Os autores concluem que, apesar das características semelhantes dos dois reagentes em termos de derivatização e separação, os derivados do AEOC permitem limites de detecção uma ordem de magnitude mais baixos do que os do FMOC-Cl, quando detectados por UV-Vis [33].

Para finalizar esta descrição, que não pretende de forma alguma ser exaustiva, já que existem muitos mais reagentes derivatizantes que se apresentam como análogos de alguns dos citados, refira-se ainda o CMA-Cl[14] (cloreto de N-(2-metil)-acetilcarbazol), que permite quantificar a prolina (embora apresente problemas na quantificação do triptofano) e aminas primárias em quantidades da ordem das fentomoles (aminoácidos) ou das picomoles (poliaminas). Os seus derivados apresentam uma estabilidade bastante acima do normal (cerca de 24 horas, quando o normal são alguns minutos ou horas) [295].

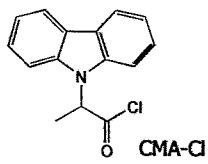
Não obstante o constante aparecimento de novos reagentes de derivatização, com características melhoradas, optamos neste trabalho por recorrer à combinação dos reagentes OPA e FMOC-Cl, por serem aqueles cuja utilização está melhor estudada e documentada, possibilitando um ganho de tempo no desenvolvimento de uma metodologia analítica que possibilitasse o doseamento simultâneo dos dois grupos de compostos (aminoácidos livres e aminas).

---

13 AEOC




14




CMA-Cl

## 1.5 Carbamato de etilo

No início dos anos 60, um composto com promissoras características esterilizantes – o dicarbonato de dietilo - começou a ser usado na indústria alimentar. No vinho, o dicarbonato de dietilo (DEP[15]), permite matar leveduras em poucos minutos e também bactérias, embora de forma mais lenta. A possibilidade de se ter um agente que possibilitava a pasteurização dos vinhos a frio, cujos principais produtos de degradação em meio aquoso são o etanol e o dióxido de carbono [273], entusiasmou alguns enólogos para a sua utilização na estabilização microbiológica de vinhos.

Num trabalho bastante contestado anos mais tarde, Löfroth e Gejvall (1971) [165] descreveram a formação de carbamato de etilo (CE) em quantidades que atingiam os 2,6 mg/L em vinho branco, 1,3 mg/L em cerveja e 0,46 mg/L em sumo de laranja, tendo sido estas bebidas tratadas com DEP em doses que variaram entre os 250 μg/L e os 1000 μg/L. O CE (também denominado uretano) foi analisado recorrendo a técnicas de diluição isotópica, e a quantidade formada dependia directamente da quantidade de pasteurizante adicionado, bem como da quantidade de amónia presente. O carbamato de etilo é um composto que se supõe ter propriedades cancerígenas em humanos, já que exibe efeitos carcinogénicos em animais de laboratório se utilizado em altas doses (mg/g) [179], pelo que a sua presença em alimentos apela a um controlo rigoroso.

Estes resultados conduziram ao impedimento da utilização do DEP nos Estados Unidos, com base na impossibilidade de se concluir inequivocamente acerca da presença ou ausência de CE em bebidas tratadas com DEP, devido a dificuldades analíticas [208], tendo originado uma série de trabalhos posteriores, com o intuito de se elucidarem as origens e os teores de CE em bebidas alcoólicas. Tais trabalhos, em que foram utilizados métodos de análise diferentes do utilizado por Löfroth e Gejvall, vieram a mostrar que os resultados por eles obtidos estavam, com grande probabilidade, afectados de um erro que se traduzia em concentrações de CE detectadas, cerca de 100 vezes superiores às na realidade presentes. Num desses estudos, Ough (1976) mostra que por um lado, o CE existe naturalmente em alimentos e bebidas fermentadas [208], tendo postulado que a sua formação se devia à etanólise do carbamil-fosfato naturalmente existente nesses produtos, e por outro que a adição de DEP, em doses que foram de 50 mg/L a 100 mg/L,

[15] No Inglês: diethyl pyrocarbonate (DEP), também designado por Baycovin.

conduzia à formação média de menos de 1 μg/L de CE, em vinhos tintos, rosé e brancos [207], sugerindo a reavaliação da impossibilidade de utilização do DEP.

A problemática relacionada com a presença de CE em bebidas alcoólicas, emergiu definitivamente quando em meados dos anos 80, o governo Canadiano ordenou retirar-se do mercado diversas bebidas alcoólicas (entre as quais Vinho do Porto), após ter sido verificado que em algumas dessas bebidas havia carbamato de etilo em concentrações que podiam chegar aos 13400 μg/L [128], o que culminou com o estabelecimento de limites máximos para os diferentes tipos de bebidas neste país, e com a intensificação do desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a quantificação do CE e do estudo do seu processo de formação.

### 1.5.1 Importância em vinhos

Actualmente, sabe-se já bastante acerca dos processos de formação do CE, bem como dos factores que a condicionam nas bebidas alcoólicas, onde o CE existe naturalmente em quantidades vestigiais (normalmente da ordem dos μg/L). Contudo, e não obstante o grande número de novas técnicas entretanto reportadas para a quantificação do CE, são escassos os dados publicados referindo os teores deste composto em bebidas alcoólicas, através de amostragens que se possam considerar representativas do mercado internacional, e muito menos do Europeu em particular. Uma das excepções parece ser a de Karumanchiri *et al* (1996) [137], que, embora através da publicação de uma breve nota, referem a análise de cerca de 16000 amostras de vinho, provenientes de todas as regiões produtoras do mundo[16], e recolhidas em 1994 e 1995. Da amostra global, 1,3 % apresentava teores de CE compreendidos entre 20 e 30 μg/L, e 0,3 % superiores a 30 μg/L.

A convicção existente no que diz respeito ao seu processo de formação, é a de que esta se dá por via não enzimática, através da reacção entre o etanol e compostos que contenham um grupo carbamilo. As bebidas alcoólicas, nomeadamente as que contêm teores de etanol superiores, são assim meios que podem proporcionar a formação de CE. Parece no entanto, que a presença de etanol nas bebidas alcoólicas pode funcionar como uma protecção contra os efeitos nocivos do CE ingerido em concomitância. Isto foi sugerido pelo trabalho de Stoewsand *et al* (1996), em que a

[16] No original: "About 16000 wines... ...from every viticultural region of the world."

administração de etanol em conjunto com a dieta a animais de laboratório, fez diminuir a incidência de tumores provocados pelo CE [262], o que levou estes investigadores a supôr que as pequenas quantidades de CE ingerido através do consumo de vinho podem provocar pouco ou nenhum efeito nos consumidores, devido ao efeito protector do etanol.

Apesar da existência nos mostos de compostos carbamilados, não se detecta a presença de CE em sumos ou mostos, uma vez que nestes não existe etanol, nem se verifica a sua formação em condições normais durante a fermentação alcoólica, mesmo na presença de compostos carbamilados [128; 219].

Uma origem reconhecida de compostos que podem reagir com o etanol e formar carbamato de etilo é o metabolismo da arginina. As vias metabólicas de degradação da arginina, podem contribuir para a formação de ureia e de citrulina, e as leveduras possuem normalmente a maquinaria enzimática necessária para estas reacções [184; 219]. A ureia e a citrulina (em menor extensão) são considerados como os principais precursores do CE em vinhos [147; 184; 212; 261], pelo que o estudo dos factores que afectam a sua presença em mostos e vinhos se revelaram de maior importância no controlo da formação de CE nestas bebidas. Em bebidas alcoólicas destiladas, podem existir outros precursores de carbamato de etilo que não a ureia ou a citrulina (compostos não voláteis) [28].

A abordagem preventiva no sentido de evitar o aparecimento de altos teores de carbamato de etilo tem sido feita basicamente de duas formas: evitar a existência em grandes quantidades dos compostos precursores do CE nas bebidas alcoólicas ou, na impossibilidade de o fazer, promover a sua degradação ou desaparecimento.

Como os principais precursores de CE existentes nos vinhos provêm, regra geral, do metabolismo da arginina, o controlo dos seus níveis faz-se influenciando os factores que, ou afectam os níveis de arginina ou os níveis dos seus derivados metabólicos, e esses factores podem ser vários.

No plano viticultural, como os níveis de fertilização azotada e o binómio casta/porta-enxerto influenciam os níveis de aminoácidos livres nos mostos, os níveis de arginina nos mostos e vinhos podem ser controlados pela avaliação do estado de nutrição azotada da vinha e, se necessário, pela utilização de castas de reconhecida baixa produção de arginina.

Do mesmo modo, é desejável que se avaliem os teores de arginina e de azoto assimilável nos mostos, de forma a poder-se prever as quantidades de suplementos azotados que seja eventualmente necessário aplicar.

Recentemente foi reportado um método espectrofotométrico (derivatização com OPA e N-acetil-L-cisteína) para a quantificação expedita da arginina em mostos [15]. Este método vem descrito como bastante aplicável em condições de produção (isto é, em laboratórios de adega), e com bons parâmetros de precisão e exactidão.

Altos teores de azoto assimilável ou de arginina podem contribuir para um aumento da produção de ureia e/ou sua excreção pelas leveduras [10; 182; 214; 217], não sendo desejável que os teores de arginina ultrapassem os 1000 mg/L. Para além disto, é necessário frisar que os diferentes perfis de compostos azotados existentes nos mostos, afectam de forma diversa o metabolismo da arginina por parte das levedura. Por exemplo, altos teores de glutamato, glutamina ou amónia diminuem a metabolização da arginina por parte das leveduras [10; 185; 214], mas por outro lado, da mesma forma que os altos teores de azoto assimilável no final da fermentação, também parecem inibir a reabsorção da ureia eventualmente produzida e que assim permanecerá no vinho [10].

Ao nível da fermentação alcoólica, há ainda que evidenciar que a utilização da arginina bem como a produção de ureia e a sua excreção, dependem estreitamente da estirpe de levedura em causa [182; 214; 217]. É desejável que os níveis de ureia nos vinhos não ultrapassem os 5 mg/L [147; 261], e para tal é possível a utilização de leveduras com baixa capacidade de metabolização da arginina, nos casos em que tal se manifeste necessário, por exemplo quando existem altos teores de arginina nos mostos. O arejamento no final da fermentação parece prevenir o aparecimento de altos teores de ureia nos vinhos [114].

Os factores tecnológicos, podem de igual forma afectar os níveis de CE produzido. Para além dos já referidos e que influenciam a utilização dos aminoácidos durante e fermentação, há outros que podem assumir elevada importância. Um deles é o aquecimento a que certos vinhos são sujeitos durante a sua manufactura, e que pode fazer aumentar significativamente os teores de carbamato de etilo [80; 128]. De igual forma também o tempo e a temperatura de armazenagem influenciam a quantidade final de CE dos vinhos [147]. O estágio dos vinhos sobre as borras, faz aumentar os teores de compostos azotados nos vinhos, embora não se tenha provado a influência negativa deste factor [270].

À elaboração de vinhos fortificados, pelo acréscimo de etanol que a fortificação representa, acresce um maior risco de formação de CE, seja pelos teores de CE que podem existir na aguardente a adicionar, seja pelo efeito inibitório do etanol sobre as

leveduras que podem não poder reutilizar a ureia eventualmente formada, pelo que o estudo da evolução do CE deve ser feita em cada caso.

Uma outra fase em que podem aumentar os precursores de CE nos vinhos é a fermentação maloláctica. Embora haja bactérias que possuem as enzimas necessárias para degradar completamente a arginina via arginina deiminase [224], outras apenas possuem parte das enzimas necessárias a essa via metabólica, e originam a acumulação de citrulina [164]. Apesar da citrulina reagir mais lentamente com o etanol para formar CE a baixa temperaturas [261], a sua presença em altas concentrações ao longo do tempo nos vinhos, contribui para a formação de CE. Uma vez que existe a possibilidade de utilização de estirpes de bactérias com demonstrada baixa produção de citrulina [13; 69], ela pode ser explorada nos casos em que se pretenda realizar a fermentação maloláctica.

Ao nível das acções preventivas há ainda a assinalar a utilização de urease ácida em vinhos com altos teores de ureia, no sentido de os fazer baixar por via enzimática [88]. No entanto, e devido à potencial presença no vinho de compostos com capacidade inibitória (iões fluoreto, ácido málico e ácido gálico) relativamente a esta enzima, a sua utilização em enologia ainda carece de alguns desenvolvimentos [89].

### 1.5.2 Métodos analíticos

Como se viu anteriormente, o carbamato de etilo ocorre nos vinhos em teores que normalmente não ultrapassam a 2 ou 3 dezenas de microgramas por litro, podendo no entanto, atingir uma centena no caso de vinhos licorosos ou mesmo mais no caso de bebidas destiladas.

Apesar da sua importância, o CE não é quantificado por rotina nos laboratórios de enologia, especialmente se nos referirmos a vinhos e a vinhos licorosos. Tal como acontece com outras substâncias, a causa principal parece ser a inexistência de uma metodologia analítica que o permita fazer.

A determinação do carbamato de etilo em bebidas alcoólicas, nomeadamente em vinhos, coloca dificuldades ao nível analítico, devido às baixas concentrações em que normalmente se encontra, e à interferência da matriz. A sua quantificação exige portanto uma técnica muito selectiva e sensível e de alto poder de resolução.

A técnica de análise de eleição para a análise do CE tem sido a cromatografia em fase gasosa (GC). O motivo é essencialmente um: a existência de detectores selectivos e a facilidade com se podem acoplar a este tipo de cromatografia, em particular os

espectrómetros de massa. Embora a grande sensibilidade e poder de resolução da cromatografia em fase gasosa não sejam factores de desprezar, as colunas analíticas e os actuais detectores utilizados em cromatografia de líquidos de alta eficiência (HPLC), permitem hoje em dia performances muito semelhantes em muitos casos.

Os níveis de CE habitualmente encontrados nas bebidas alcoólicas (ou outros alimentos), inviabilizam a sua quantificação directa por HPLC, uma vez que teria que se recorrer à sua detecção por espectroscopia de UV-Vis. No entanto, este tipo de detectores só raramente permite a quantificação de tão baixos teores de compostos.

No sentido de eliminar tanto quanto possível os compostos não voláteis e os interferentes, muitos dos métodos desenvolvidos e reportados para a análise do CE, preconizam uma extracção líquido-líquido e uma etapa de pré-concentração, antes da separação por cromatografia [59; 157]. Alguns dos métodos ainda incluem passos adicionais de extracção e concentração [46; 71].

A detecção do CE é normalmente feita ou confirmada por espectrometria de massa, seja com ionização por impacto electrónico [40; 71], seja com ionização química [40; 46]. Outros princípios de detecção como os subjacentes ao funcionamento dos detectores de condutividade electrolíticos de Hall [46; 59] e de Coulson [207; 291], termoiónico de azoto-fósforo [18; 27; 28] ou o analisador de energia térmica no modo de azoto [47; 71], foram já estudados e utilizados.

O método de referência [233] adoptado pelo OIV e também pela Comunidade Europeia, emprega a extracção com cloreto de metileno, a evaporação à secura e subsequente recuperação do extracto em acetato de etilo, antes da separação por cromatografia de gases de alta resolução, e detecção por espectrometria de massa.

Apesar de os métodos analíticos desenvolvidos por GC permitirem limites de detecção tão baixos quanto 1 μg/L [40; 47], o longo tempo requerido pelos procedimentos de extracção, a perda adicional de reprodutibilidade que se pode verificar quando são efectuados passos de re-extracção dos extractos com o consequente aumento da incerteza associada ao resultado final, bem como o elevado custo dos aparelhos e a necessidade de operadores treinados, representam as principais desvantagens destas técnicas analíticas. De uma forma geral, os laboratórios de controlo de qualidade encontram dificuldades na utilização de tais procedimentos, especialmente no que se refere à análise por rotina de um grande número de amostras.

No sentido de evitar alguns dos passos de preparação das amostras necessários por outras técnicas, um trabalho recentemente publicado refere o uso de um padrão

interno marcado com um isótopo estável e injecção directa dos extractos em coluna capilar seguida de análise por GC-MS/MS [40]. No entanto, e apesar de estar demonstrado que é possível implementar a técnica de GC-MS/MS (ou outras técnicas similares) em análises de rotina, o alto custo dos aparelho e sua manutenção, bem como a complexidade das técnicas utilizadas, parecem continuar a ser aspectos negativos.

Neste trabalho, optamos por uma abordagem completamente nova no que diz respeito à técnica de análise utilizada – a análise de CE por HPLC. Apesar de na quantificação do carbamato de etilo por GC a sua derivatização tenha sido já empregue [18; 93], no sentido de baixar os limites da sua detecção ou aumentar a selectividade do método analítico, os procedimentos de preparação da amostra mantiveram-se igualmente elaborados e demorados.

A utilização de um detector específico, como o de fluorescência, em HPLC, permite, com frequência, limites de detecção da ordem das partes por bilião (μg/L) e não se torna imprescindível a extracção das amostras, devido à sua grande selectividade. No entanto, a utilização deste detector limita-se a compostos que apresentem capacidades fluorescentes, o que não acontece com o carbamato de etilo. Como tal, impõe-se uma derivatização de forma a que o seu derivado o seja. Dos muitos compostos fluorescentes que se podem utilizar como reagentes de derivatização, há um - o 9-xantidrol - que há muito se sabe reagir com o CE e que é utilizado para a identificação de amidas [55].

A utilização do 9-xantidrol (9-X) para quantificar por GC o CE de aguardentes foi já descrita [93]. De facto, ao fazer-se reagir, em meio ácido, o CE com um excesso de 9-X, obtém-se com bons rendimentos, um produto cristalino insolúvel – o xantiluretano. Sob impacto electrónico, esta xantilamida sofre uma fragmentação característica que envolve as cadeias alquilamida laterais, o que torna os derivados detectáveis por GC-MS. No entanto, o problema desta técnica reside nos passos de extracção líquido-líquido e pré-concentração, que continua a ser necessário efectuar antes da precipitação do xantiluretano, de forma a eliminar-se os interferentes e aumentar a sensibilidade. Apesar de a utilização do 9-X permitir uma maior selectividade do método, ao fazer precipitar apenas os compostos dos extractos que reagem com o 9-X, este método continua a exigir uma preparação da amostra bastante complexa.

No método desenvolvido durante este trabalho, a reacção de derivatização do CE com o 9-X foi modificada, de forma a tornar solúvel o xantiluretano e ser possível separá-lo por HPLC com detecção por fluorescência, não sendo necessário efectuar operações prévias de extracção ou concentração das amostras.

## 1.6 Quimiometria aplicada à caracterização de mostos e vinhos

Com a transição da chamada química analítica clássica para os modernos métodos instrumentais de análise, os analistas passaram a gerar e a gerir um volume muito superior de informação sobre cada amostra. Basta pensarmos que uma única análise cromatográfica pode fornecer informação simultânea sobre duas ou três (ou mais) dezenas de parâmetros analíticos, sendo que em muitos laboratórios coexistem várias metodologias com esta capacidade, como as cromatográficas e as espectroscópicas. Adicionalmente e em consequência disto, passamos em muitos casos de uma abordagem qualitativa para uma outra quantitativa, o que exige uma análise diferente desses dados analíticos.

Os tipos de variáveis com que os analistas se deparam hoje podem ser agrupadas em dois grandes grupos: as que provêm de análises espectrais (IV, UV-Vis, RMN, MS, Raman, etc.) e as que derivam directamente da medição de quantidades dos constituintes químicos presentes na amostra. Existem ainda outras como as provenientes de certas medições electroquímicas, termodinâmicas ou físicas.

Uma condição fundamental na utilização dos dados analíticos obtidos, por exemplo por espectrometria ou cromatografia, é a de que as variáveis signifiquem o mesmo para todas as amostras (objectos). Embora isto nos remeta para a importância da correcta identificação dos sinais obtidos por essas técnicas, não nos alongaremos nesta matéria, já que ela seria necessariamente extensa.

A análise química dos vinhos tem normalmente dois tipos de objectivos: ou o posicionamento das amostras num determinado contexto de especificações e/ou limites, e a caracterização da distribuição de uma determinada variável, a obtenção de relações entre duas ou mais variáveis (reconhecimento de estruturas), ou a previsão de uma ou mais variáveis com base noutras. A prossecução do segundo objectivo exige por vezes o recurso aos chamados métodos de análise multivariável. Estes métodos são usados normalmente para a obtenção de informação útil contida num grande volume de dados, e que não é evidente por simples observação.

Em muitos dos casos, nomeadamente nos trabalhos de discriminação entre vinhos com características diferentes (seja região ou país de proveniência, ano de produção, ou alguma outra qualidade intrínseca), a abordagem é quase sempre exploratória, ao invés de confirmatória.

Tukey [276], diz a propósito das análises exploratórias que "é importante percebermos o que podemos fazer, antes de tentarmos medir quão bem fizemos o que pensamos ter feito". E de facto, os métodos exploratórios são um conjunto de ferramentas manipuladoras de dados, para que possamos ver aquilo que eles parecem dizer [294]. Apesar de os métodos de análise multivariável se ocuparem de matrizes compostas por um determinado número de objectos e de variáveis onde o objectivo é o reconhecimento de estruturas, eles são muitas vezes precedidos de análises univariável (ou seja em que cada variável é analisada independentemente das outras, e em que o objectivo é normalmente o de caracterizar a sua distribuição) ou bivariável (em que se busca de forma frequente a elucidação da dependência ou independência entre duas variáveis).

Em qualquer dos casos, muita da informação é fornecida pelos programas que realizam os cálculos estatísticos sob a forma de representações gráficas bidimensionais ou tridimensionais. No entanto, e no caso dos métodos multivariável, a representação e interpretação de representações pluridimensionais (entenda-se como pluri mais do que 3) é uma tarefa difícil, se não impossível na maioria dos casos, e como tal parte dos métodos de análise multivariável têm como objectivo a redução do número dessas dimensões.

Do vários critérios utilizados até à data na redução de dimensões, o subjacente à análise de componentes principais (PCA[17]) tem sido um dos mais empregues quando se trata de dados referentes a vinhos.

A análise de componentes começa por identificar a direcção no espaço multidimensional original que representa a maior variabilidade dos dados. De seguida, faz o mesmo num espaço ortogonal à primeira direcção e assim sucessivamente até que as coordenadas obtidas desta forma – os componentes principais – expliquem uma determinada parte da variância total da amostra, isto é, da soma das variâncias de todas as variáveis originais [294].

Cada um dos componentes principais vai ser uma combinação linear das variáveis que nesse espaço explicam a maior parte da variância total, criando-se sempre em cada passo, uma matriz de residuais minimizados (pelo método dos mínimos quadrados), que passa a conter os novos objectos. Quando essa matriz contém apenas valores muito próximos de zero termina o processo, e os objectos originais são então

[17] No Inglês: Principal Component Analysis (PCA).

representados no sistema de coordenadas constituídas pelos vários componentes principais.

Há duas formas distintas de determinar os componentes principais, embora ambas baseadas em variáveis centradas na média: uma que utiliza os dados nas suas escalas originais (PCA sobre covariâncias, PCA-COV) e outra que utiliza as variáveis normalizadas para uma variância igual a 1 (PCA sobre correlações, PCA-COR). A normalização é feita da seguinte forma:

$$Zij = \frac{(xij - \bar{x}j)}{sj}$$

em que *zij* é o novo valor da variável, *xij* o seu valor original, $\bar{x}j$ a média simples dos valores correspondentes à variável e *sj* o seu desvio padrão. A decisão de se trabalhar com a matriz de covariâncias ou de correlações, deve ser tomada com base no facto de as diferentes variáveis apresentam gamas de variação muito diferentes e/ou valores absolutos muito díspares [191].

No caso das variáveis referentes aos vinhos, é frequente a necessidade da sua normalização, já que por vezes se comparam parâmetros tão distintos como o pH (variação normal da ordem das décimas da unidade), a idade (variações da ordem das unidades ou das dezenas) ou o teor em aminoácidos totais (variações possíveis da ordem das centenas ou dos milhares).

A estrutura criada pela redução de dimensões através de PCA só é considerada estável, quando não se modifica sob pequenas alterações da matriz inicial. Quer isto dizer que os coeficientes dos componentes principais obtidos não se devem alterar significativamente por introdução ou subtracção de um pequeno número de amostras ao conjunto inicial. A análise de estabilidade pode ser feita recorrendo a técnicas de "resampling" ou de "cross-validation" [294].

Após se ter encontrado uma estrutura interessante, com um pequeno número de dimensões (de preferência 3 no máximo) e que represente a maior parte da variabilidade da amostra inicial (digamos 95 %), a sua interpretação pode ser feita por intermédio da identificação das variáveis que para cada componente principal contém os coeficientes de maior peso na sua construção, e a sua relação com a distribuição relativa dos vários objectos originais relativamente a esse componente.

Uma outra parte dos métodos de análise multivariável visa a obtenção de modelos previsores, estabelecendo a ponte entre a análise de dados exploratória e a confirmatória. Mais uma vez, de todos os métodos previsores existentes vamos referir um

dos mais frequentemente empregues: a análise discriminante linear (LDA do inglês). O seu princípio assenta na obtenção de um conjunto o mais pequeno possível de combinações lineares de previsores. O seu objectivo é normalmente o de classificar um novo objecto, atribuindo-lhe uma classe ou grupo, após uma fase inicial dita de aprendizagem.

A fase de aprendizagem baseia-se em duas matrizes de dados originais, digamos a matriz X (constituída pelos valores das diferentes variáveis mensuráveis experimentalmente) e a matriz Y (constituída pelos valores não mensuráveis experimentalmente, definidores de cada classe, como a origem geográfica, etc.). Por ser conhecida a matriz Y, a análise discriminante linear inclui-se nos métodos supervisionados, ao contrário do que acontece com a análise de componentes principais (não supervisionado). Esta fase compreende a construção de regras matemáticas, ou funções discriminantes, que associem os objectos a uma determinada classe, cujo poder discriminante ou previsor pode ser avaliado por uma comparação dos resultados da previsão com os observados na realidade para um determinado objecto. A obtenção dessas funções discriminantes começa, muitas vezes, por uma redução de dimensões do espaço previsor original, efectuada de forma análoga à descrita para a determinação dos componentes principais. Desta forma, utilizam-se partes da informação contida nas respostas originais para prever novos casos.

No caso de se possuir uma matriz inicial suficientemente extensa, esta pode ser dividida num grupo de treino e num grupo de teste, no qual vão ser testadas as capacidades previsoras das funções discriminantes obtidas na fase de treino. Nesta fase, apenas a matriz X é conhecida, sendo a matriz Y preenchida com base nas funções discriminantes obtidas durante a fase de treino.

Tem sido maioritariamente com base nestes métodos de análise multivariável ou noutros baseados em processos ligeiramente diferentes mas objectivos semelhantes, que muitos dos dados referentes a vinhos tem sido analisados.

No que diz respeito à utilização dessas técnicas, alguns autores efectuaram já abordagens mais aprofundadas, quer referindo especificamente a utilização de estatística multivariável à classificação de vinhos (embora as considerações feitas se possam aplicar a outros objectos) como Kaufmann (1997) [138], a utilização da análise discriminante linear em química analítica como Coomans *et al* (1979) [60], ou uma revisão mais generalizada da utilização da quimiometria (que se refere no geral à aplicação de

métodos estatísticos a dados químicos) e dos seus diferentes métodos em química analítica [38].

Aos dados referentes a vinhos e mostos, estas técnicas foram também já amplamente aplicadas. O objectivo é, regra geral, um dos dois mais perseguidos: a distinção entre castas ou a distinção entre origens geográficas. Contudo, e apesar dos trabalhos já realizados neste âmbito, os resultados obtidos têm ainda uma aplicação muito reduzida.

A diferenciação de mostos e vinhos no que diz respeito à sua idade, origem geográfica, varietal ou mesmo tecnológica, com base em métodos estatísticos, resume-se à tentativa de obtenção de um modelo que descreva aquilo que é observado, e o que é já demonstrado. E o que é observado é que existem diferenças detectáveis por via sensorial, quer entre vinhos de diferentes idades, quer de diferentes origens. Por outro lado, sabe-se que factores como a casta, clima, práticas viticulturais e enológicas, entre outros, afectam as características físico-químicas de mostos e vinhos. Como tal, às diferenças observadas bem como a cada combinação dos factores referidos, devem estar associadas diferenças ao nível das concentrações dos constituintes de tais vinhos. Uma instituição que assenta a sua existência nestes factos e ao mesmo tempo para eles contribui é a das denominações de origem. Com a sua criação e, no caso português, das comissões de vitivinicultura, assumiu-se a existência de diferenças entre vinhos de diferentes denominações, que as comissões se encarregam de garantir. Este facto contribui para a homogeneização de práticas e procedimentos, aumentando as afinidades entre os vinhos de uma mesma denominação e acentuando porventura as diferenças entre diferentes denominações.

O motivo de ainda não serem utilizadas técnicas de análise multivariável na caracterização de vinhos e defesa das denominações de origem de forma extensiva, reside quanto a nós em dois factos importantes: primeiro, existe uma dificuldade inerente ao estabelecimento de relações explanatórias entre os resultados obtidos e observáveis e os conceitos físico-químicos e/ou bioquímicos que lhes devem estar subjacentes, o que tem dificultado, quiçá a par da insuficiência de trabalhos realizados até à data, a definição e generalização das variáveis analíticas com maior poder discriminante em cada caso; segundo, mesmo que estivessem definidas essas variáveis, nem todos os laboratórios de enologia encarregues de contribuir para a defesa das denominações de origem e para o controlo de qualidade, possuem capacidade analítica para, em rotina, quantificarem os compostos que se vêm estudando como possíveis factores de caracterização. A maior

parte deles cabe no conjunto dos compostos vestigiais, cujos métodos de análise exigem por vezes equipamento dedicado de alto custo e adequada formação técnico-científica dos operadores.

Referindo apenas alguns dos trabalhos entretanto realizados, parece-nos importante realçar as variáveis que mais têm sido utilizadas como elementos discriminantes. Os dados isotópicos referentes à abundância de isótopos de hidrogénio, carbono e oxigénio, pela forma como são afectados pelas variáveis ano de produção, casta, clima, tecnologia e região, têm sido apontados como bons candidatos a variáveis discriminantes capazes de diferenciar vinhos com diferenças a esses níveis [171]. Também os elementos minerais presentes nos vinhos têm sido objecto de estudo com finalidades idênticas [150; 177]. O pressuposto é basicamente o mesmo, sendo estes componentes afectados mais ou menos pelos mesmos factores que os referidos anteriormente, sendo o solo um factor de grande peso já que é essa a fonte de elementos minerais da videira. Não obstante, e como complicação adicional, outros factores como os tecnológicos parecem contribuir com uma importante parcela de influência, fazendo com que no final e somadas todas as contribuições (nem sempre no mesmo sentido) seja um pouco mais complicada a diferenciação e a interpretação dos resultados. Adicionalmente, o desconhecimento que ainda prevalece no que diz respeito ao papel e interacções entre muitos dos elementos minerais dos vinhos, também tem contribuído para o rol de dificuldades postas na sua utilização.

Apesar de certos grupos de compostos como os aminoácidos (sobre o valor dos aminoácidos livres como elementos discriminantes, foram já feitas as considerações consideradas pertinentes no ponto 1.2.2) ou os voláteis [14; 151; 199] poderem ser suficientes, por si só, para discriminar diferentes grupos de vinhos, é comum a associação de diferentes tipos de parâmetros químicos nessa discriminação. Seja a combinação de dados provenientes apenas da chamada análise sumária [189; 190; 244; 267], ou destes com outros como os ésteres [9], ou os álcoois superiores [200].

## 1.7 Objectivo do estudo

O trabalho que se descreve a seguir, teve como principais objectivos o estudo dos teores de aminoácidos livres e de aminas em mostos e vinhos da região do Alentejo, a pesquisa de factores que influenciem esses teores, e a utilização destes parâmetros

analíticos na pesquisa de subgrupos entre as amostras estudadas. Adicionalmente, pretendeu-se alargar o espectro de substâncias azotadas analisadas, que se relacionem de forma íntima com os teores de aminoácidos livres, e cuja importância ao nível da segurança alimentar assim o justifique. Assim foi o caso do carbamato de etilo.

Dentro destes objectivos, pretendeu-se estudar os teores de azoto aminado assimilável em diferentes mostos e vinhos do Alentejo, a relação entre os teores de aminoácidos livres e os teores de aminas, a importância das fermentações alcoólica e maloláctica nos teores de aminas, e o efeito de factores como a casta, a sub-região de proveniência, ano e produtor nos teores dos compostos referidos acima. Recorreu-se a técnicas analíticas de cromatografia de líquidos de alta eficiência, na quantificação dos aminoácidos livres e das aminas nas matrizes referidas.

Procurou-se ainda estudar a importância da quantificação dos aminoácidos livres e das aminas na caracterização e diferenciação das diferentes amostras estudadas, recorrendo-se a técnicas de análise estatística multivariável, nomeadamente a análise de componente principal.

O estudo dos teores de aminoácidos livres e de aminas, mormente as biogénicas, em vinhos, reveste-se de inegável interesse ao nível enológico, na medida em que estas substâncias se relacionam directamente com aspectos produtivos, económicos, de qualidade e de segurança alimentar. Como a produção de vinhos é uma actividade de reconhecida tradição e importância na economia nacional, os estudos efectuados com matéria-prima Portuguesa ao nível da enologia, têm a vantagem de poder contribuir para o conhecimento e defesa das nossas denominações de origem, e para o aumento da qualidade dos nossos produtos, e consequentemente podem contribuir para um melhor posicionamento dos nossos produtores face a mercados cada vez mais globais, mas também onde reina uma concorrência e um grau de exigências muito elevado.

# 2. MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 Objectos de estudo

### 2.1.1 Aminoácidos livres e aminas

A realização do estudo relacionado com os aminoácidos livres e aminas compreendeu a análise de vários tipos de amostras, nomeadamente a análise de amostras de vinhos e de mostos quer à data de vindima, quer durante a fermentação. No total foram analisadas 276 amostras, sendo 105 de vinhos (67 vinhos comerciais e 38 vinhos monovarietais resultantes de microvinificações) e 171 de mostos, no início e em diferentes fases da fermentação.

As amostras de vinhos compreenderam dois grupos distintos. Um grupo englobando 67 amostras de vinhos comerciais de 1997 (30 brancos e 37 tintos), provenientes de diferentes produtores distribuídos pelas diferentes sub-regiões do Alentejo (figura 5), e fornecidos pela Comissão de Viticultura da Região do Alentejo (CVRA), descritos na tabela A1. Um outro grupo de vinhos monovarietais, produzidos nos anos de 1997 (20 amostras) e 1998 (18 amostras), com as principais castas cultivadas no Alentejo, provenientes também de várias sub-regiões Alentejanas (figura 5), e fornecidos pela Universidade de Évora.

O primeiro grupo de vinhos, que permaneceu em garrafa até ao momento da sua análise, permitiu estudar os teores de aminoácidos livres e aminas em vinhos comerciais e a influência dos factores produtor e região. O segundo grupo, destinou-se ao estudo da relação entre aminoácidos livres e aminas e ainda da influência dos factores casta, proveniência e ano de colheita nos teores desses compostos nos vinhos.

**Figura 5.** Mapa de Portugal com a identificação das 8 sub-regiões vitivinícolas do Alentejo.

Legenda: 1 – Portalegre; 2 – Borba; 3 – Redondo; 4 – Reguengos; 5 – Vidigueira; 6 – Évora; 7 – Moura; 8 – Granja.

O esquema de amostragem utilizado está representado na tabela 5, e serve também para exemplificar a amostragem seguida nos caso dos mostos.

**Tabela 5.** Esquema de amostragem utilizado no estudo da influência da casta, proveniência e ano de colheita.

| Sub-região | Castas tintas | | | | | Castas brancas | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Aragonez | Moreto | Castelão | Tinta Caiada | Trincadeira | Arinto | Perrum | Antão Vaz | Rabo de Ovelha | Roupeiro |
| Évora | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| Reguengos | | | | | x | | | | | x |
| Redondo | | | | | x | | | | | x |
| Borba | | | | | x | | | | | xx |
| Vidigueira | | | | | xxx | | | | | x |
| Portalegre | | | | | x | | | | | x |

Nota: cada casta na correspondente sub-região foi estudada nos anos de 1997 e 1998 no caso dos vinhos, e em 1998 e 1999 no caso dos mostos; xx- dos vinhos, só foram obtidos os de 1997; xxx- só foram obtidos mostos de 1999 e vinhos de 1997.

Estudou-se ainda um grupo de 171 amostras de mostos em diferentes fases da fermentação, igualmente fornecidos pela Universidade de Évora. Estas amostras compreenderam mostos de 1998 (19 amostras) e de 1999 (20 amostras), bem como as amostras recolhidas durante as microvinificações de 1998 (que conduziram aos vinhos de 1998 da sub-região de Évora). No total, foram recolhidas 47 amostras das fermentações dos mostos brancos e 85 dos tintos. O esquema de amostragem seguido no decorrer das microvinificações foi o descrito na tabela 6. Em média, forma retiradas 18 amostras durante cada uma das 10 microvinificações estudadas.

Depois de recolhidas quer no início, quer durante a fermentação, as amostras dos mostos foram imediatamente congeladas e mantidas a −15 °C até ao momento da análise.

**Tabela 6.** Calendário da amostragem efectuada durante as microvinificações das castas da Fundação Eugénio de Almeida de 1998.

| Agosto | Setembro | Outubro | Novembro |
|---|---|---|---|
| **Antão Vaz** | | | |
| | 3; 5; 7; 9; 11; 13; 15; 17; 19; 21; 23; 25; 27; 29 | 1; 3; 5; 7; 14 | |
| **Perrum** | | | |
| | 21; 23; 25; 27; 29 | 1; 3; 5; 7; 9; 11; 13; 15; 17; 19; 21; 23; 25; 27; 29; 31 | 2; 4; 11 |
| **Arinto** | | | |
| | 15; 17; 19; 21; 23; 24; 26; 28; 30 | 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22; 24; 26; 28; 30 | 6 |
| **Roupeiro** | | | |
| 27; 29; 31 | 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22; 24; 26; 28; 30 | 2; 4; 6; 7; 14 | |
| **Rabo de Ovelha** | | | |
| 27; 29; 31 | 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22; 24; 26; 28; 30 | 2; 4; 6; 7; 14 | |
| **Trincadeira** | | | |
| 31 | 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 15; 22; 29 | 6; 13 | |
| **Aragonez** | | | |
| 31 | 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 15; 22; 29 | 6; 13 | |
| **Tinta Caiada** | | | |
| 31 | 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 15; 22; 29 | 6; 13 | |
| **Castelão** | | | |
| | 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 30 | 7; 14; 21; 29 | |
| **Moreto** | | | |
| | 29; 30 | 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 15; 22; 29 | 5 |

As microvinificações foram efectuadas na Universidade de Évora, no núcleo da Mitra, e todas as operações efectuadas durante as mesmas, encontram-se descritas na tabela 7.

As castas tintas foram vinificadas na presença de películas e grainhas (com desengaço total) em microvinificadores de aço inox, em volumes de cerca de 40 L, e sem

controlo de temperatura. Após o final da fermentação alcoólica, os vinhos tintos foram trasfegados para recipientes de vidro idênticos aos dos brancos, onde permaneceram até ao momento do engarrafamento (cerca de 7 meses após o início da fermentação alcoólica). A fermentação maloláctica ocorreu espontaneamente em todos os vinhos tintos.

As castas brancas foram vinificadas em recipientes de vidro, em volumes de cerca de 20 L, sem películas ou grainhas (bica aberta), e com controlo de temperatura (a 17 °C). Os vinhos brancos, foram mantidos nos recipientes de vidro até ao momento do engarrafamento (cerca de 7 meses após o início da fermentação alcoólica), tendo sido clarificados pelo frio e filtrados antes deste. Estas amostras foram analisadas cerca de 1 ano e meio após o engarrafamento, tendo permanecido em garrafa durante esse período.

Todos os mostos foram desinfectados com 100 mg/L de $SO_2$ no início da fermentação.

**Tabela 7.** Calendário de operações efectuadas durante as microvinificações das castas da Fundação Eugénio de Almeida (Évora) de 1998.

| Casta | Operação | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Início da fermentação | envasilhamento | Trasfega e atesto | Pesquisa da fermentação maloláctica positiva e desinfecção com 50 mg/L $SO_2$ |
| Roupeiro | 27/8/98 | | 7/10/98 | 7/10/98 |
| Rabo de Ovelha | 27/8/98 | | 7/10/98 | 7/10/98 |
| Antão Vaz | 3/9/98 | | 7/10/98 | 7/10/98 |
| Perrum | 21/9/98 | | 4/11/98 | 4/11/98 |
| Arinto | 15/9/98 | | 30/10/98 | 30/10/98 |
| Trincadeira | 31/8/98 | 7/9/98 | 21/9/98 | 6/10/98 |
| Castelão | 15/9/98 | 22/9/98 | 2/10/98 | 15/10/98 |
| Aragonez | 31/8/98 | 7/9/98 | 21/9/98 | 6/10/98 |
| Moreto | 29/9/98 | 8/10/98 | 20/10/98 | 29/10/98 |
| Tinta Caiada | 31/8/98 | 7/9/98 | 21/9/98 | 6/10/98 |

### 2.1.2 Carbamato de etilo

Durante o desenvolvimento do método de análise para o carbamato de etilo foram analisadas 65 amostras, distribuídas por vários tipos: 31 vinhos comerciais da região do Alentejo (provenientes do conjunto de vinhos comerciais de 1997 analisadas

durante o estudo dos teores de aminoácidos livres e aminas), 12 vinhos da Madeira (fornecidos pela Universidade da Madeira), 9 vinhos do Porto (fornecidos pelo Instituto do Vinho do Porto) e 13 amostras de aguardente vínica (com teor de etanol de 77 % (v/v)) destinadas à produção de vinho do Porto (fornecidas igualmente pelo Instituto do Vinho do Porto).

## 2.2 Reagentes e outros consumíveis

Os aminoácidos livres ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), alanina (Ala), arginina (Arg), histidina (His), glicina (Gly), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptofano (Trp) ácido γ-aminobutírico (Gaba), serina (Ser), lisina (Lys), treonina (Thr), metionina (Met), leucina (Leu), isoleucina (Ile), valina (Val), prolina (Pro) e dois intermediários do ciclo da ureia, ornitina (Orn) e citrulina (Cit), foram adquiridos à Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

As 10 aminas, etanolamina (Eta), metilamina (Metila), etilamina (Etila), histamina (Hista), tiramina (Tira), β-feniletilamina (Fen), triptamina (Try), isoamilamina (Iso), cadaverina (Cad) e putrescina (Put), foram adquiridas à Fluka Chemie (Buchs, Suíça).

O padrão interno norvalina (Nva), utilizado na quantificação dos aminoácidos primários e aminas foi fornecido pela Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemanha).

O carbamato de etilo foi adquirido à Aldrich-Chemie (Steinheim, Alemanha).

Todos os reagentes necessários à preparação de eluentes e soluções tampão eram de grau analítico, os solventes utilizados em cromatografia eram de grau gradiente Lichrosolv e foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes de derivatização eram apropriados para fluorescência. A água era destilada, desionisada (resistividade mínima de 18 $M\Omega cm^{-1}$, sistema Milli-Q, Millipore) e filtrada (filtro de 0,45 μm de diâmetro de poro).

Os eluentes cromatográficos foram filtrados (filtro de 0,45 μm de diâmetro de poro) e desgaseificados por corrente de hélio.

Todos os reagentes utilizados nas reacções de derivatização forma adquiridos com a maior pureza disponível. O reagente *o*-ftaldialdeído (OPA) utilizado na quantificação dos aminoácidos primários e aminas, tinha uma pureza de 97 % e foi adquirido à Aldrich-Chemie. O reagente cloroformato de 9-fluoro-enil-metilo (FMOC-Cl)

utilizado na quantificação da prolina, tinha uma pureza $\geq$ 99 %, e foi fornecido pela Fluka.

O reagente 9-xantidrol utilizado na quantificação do carbamato de etilo foi fornecido pela Fluka, e tinha uma pureza de 99 %.

## 2.3 Métodos analíticos

### 2.3.1 Quantificação dos aminoácidos livres e aminas

#### 2.3.1.1 Preparação das amostras e soluções padrão

As amostras de mosto foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 r.p.m. e o sobrenadante diluído (1:4 v/v) com uma solução de padrão interno (Nva) em HCl 0,1 M. Posteriormente, a solução obtida foi filtrada com um filtro descartável de 0,45 μm (Teknochroma, Madrid, Espanha) antes de ser injectada no sistema cromatográfico. As amostras de vinho foram preparadas de forma similar, excluindo o passo inicial de centrifugação.

As soluções padrão de aminoácidos livres e aminas foram preparadas por diluição com HCl 0,1 M de uma solução mãe, e tratadas de forma idêntica às outras amostras no que diz respeito à sua filtração.

#### 2.3.1.2 Preparação do reagente OPA

O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se 51,2 mg de *o*-ftaldialdeído em 1,5 mL de etanol. Depois disto, foram adicionados 80 μL de ácido 3-mercaptopropiónico e 1750 mg de tiocianato de potássio, após o que foi ajustado a um volume final de 50 mL com solução tampão de borato (0,4 mol/L, pH 10,4). Este reagente foi dividido em alíquotas de 2 mL e armazenado a -15 °C. Nestas condições a solução de reagente OPA mostrou-se estável durante cerca de 2 meses, sendo utilizada uma nova alíquota diariamente.

### 2.3.1.3 Preparação do reagente FMOC-Cl

O reagente FMOC-Cl preparou-se dissolvendo-se em acetonitrilo a quantidade de reagente necessária para uma concentração de 2,5 g/L. O reagente assim preparado foi armazenado a -15 °C, mantendo-se estável durante vários meses.

### 2.3.1.4 Procedimento de derivatização

Para a amostragem, reacções de derivatização e injecções efectuadas durante a quantificação dos aminoácidos livres e aminas biogénicas, foi utilizado um injector automático.

**Primeira injecção**. Adicionaram-se 200 μL de reagente OPA a 200 μL de solução tampão borato (0,4 mol/L, pH 10,6). Depois disto, adicionaram-se 40 μL da amostra diluída à mistura de reacção, que se deixou a reagir durante 2,5 minutos num frasco do amostrador automático. No final, foram injectados imediatamente 20 μL.

**Segunda injecção**. A 420 μL de solução tampão borato (0,4 mol/L, pH 10,6) foram adicionados 15 μL de amostra diluída, após o que se adicionaram 15 μL de reagente FMOC-Cl. A reacção decorreu durante 2 minutos num frasco do amostrador automático, após o que se injectaram 20 μL, 112 minutos após a primeira injecção.

### 2.3.1.5 Equipamento cromatográfico

O sistema cromatográfico de HPLC utilizado no desenvolvimento do método de análise de aminoácidos livres e aminas, e posterior análise das amostras, era Merck Hitachi, modelo L-6200A, equipado com um detector de fluorescência Merck-Hitachi modelo F-1080, um amostrador automático Merck-Hitachi modelo L-7250 Lachrom e uma interface D-7000 (Merck-Hitachi, Tóquio, Japão). As colunas cromatográficas foram Merck LichroCART® 250-4 Superspher®100 RP-18 *endcapped* (25 cm x 4.6 mm; com partículas de 5 μm) instalada num forno 7981 da Jones Chromatography (Mid Glamorgan, Gales, Reino Unido), a 42 °C.

### 2.3.1.6 Análise cromatográfica

A separação cromatográfica por HPLC, foi efectuada com recurso a um gradiente binário (tabela 8).

A fase móvel A era uma solução de acetato de sódio 20 mM, com 0,018 % (v/v) de trietilamina, 0,3 % (v/v) de tetrahidrofurano e 0,010 % (v/v) de uma solução de EDTA a 4 % (m/v). O pH foi ajustado a 7,20 com uma solução de ácido acético a 0,1 % (v/v).

A fase móvel B era uma solução constituída por 20 % (v/v) de uma solução de acetato de sódio (100 mM, pH 6.0), 40 % (v/v) de acetonitrilo, 40 % (v/v) de metanol e 0,018 % (v/v) de trietilamina. O volume injectado em cada análise foi de 20 μL.

**Tabela 8.** Gradiente utilizado na separação dos aminoácidos livres e aminas.

| **Tempo** (min) | **Fluxo** (mL/min) | **% Eluente B** | **Tempo** (min) | **Fluxo** (mL/min) | **% Eluente B** |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,7 | 5 | 70,5 | 0,4 | 50 |
| 2 | 0,7 | 10 | 85 | 0,4 | 57 |
| 20 | 0,7 | 23 | 85,5 | 0,6 | 57 |
| 20,5 | 0,9 | 23 | 105 | 0,6 | 60 |
| 40 | 0,9 | 23 | 110 | 0,7 | 80 |
| 45 | 0,9 | 25 | 110,5 | 0,5 | 80 |
| 45,5 | 0,8 | 25 | 117 | 0,5 | 80 |
| 52,5 | 0,8 | 25 | 120 | 1,2 | 100 |
| 53 | 0,9 | 25 | 135 | 1,2 | 100 |
| 53,5 | 0,7 | 25 | 136 | 0,7 | 5 |
| 70 | 0,7 | 50 | 138 | 0,7 | 5 |

A detecção por fluorescência foi efectuada aos comprimentos de onda de excitação/emissão de 340/450 nm para os derivados dos aminoácidos primários e aminas, e 237/450 nm para o derivado da prolina. A mudança de comprimentos de onda foi efectuada aos 115 minutos após a primeira injecção.

### 2.3.1.7 Quantificação

Foi utilizado o método do padrão interno na quantificação dos aminoácidos primários e aminas e o método do padrão externo na quantificação da prolina. O padrão interno utilizado foi a norvalina. A composição das soluções padrão utilizadas na quantificação dos aminoácidos livres e aminas, está descrita na tabela 9.

**Tabela 9.** Composição das soluções padrão de aminoácidos livres e aminas utilizadas na construção das curvas de calibração (mg/L).

| Composto | P1 | P2 | P3 | P4 |
|---|---|---|---|---|
| Asp | 1,06 | 2,66 | 5,32 | 10,65 |
| Glu | 1,18 | 2,94 | 5,88 | 11,77 |
| Asn | 1,06 | 2,64 | 5,28 | 10,57 |
| Ser | 0,84 | 2,10 | 4,20 | 8,41 |
| Gln | 1,19 | 2,97 | 5,93 | 11,87 |
| His | 1,24 | 3,10 | 6,21 | 12,42 |
| Gly | 0,60 | 1,50 | 3,00 | 6,01 |
| Thr | 0,95 | 2,38 | 4,76 | 9,53 |
| Cit | 1,40 | 3,50 | 7,01 | 14,02 |
| Arg | 3,79 | 9,48 | 18,96 | 37,91 |
| Ala | 0,71 | 1,78 | 3,56 | 7,13 |
| Gaba | 0,82 | 2,06 | 4,12 | 8,25 |
| Tyr | 1,45 | 3,62 | 7,25 | 14,50 |
| Eta | 0,13 | 1,34 | 2,68 | 4,01 |
| Val | 0,94 | 2,34 | 4,68 | 9,37 |
| Met | 1,19 | 2,98 | 5,97 | 11,94 |
| Nva | 5,86 | 5,86 | 5,86 | 5,86 |
| Hista | 0,30 | 1,52 | 3,04 | 4,56 |
| Trp | 1,65 | 4,12 | 8,24 | 16,49 |
| Metila | 0,14 | 1,36 | 2,71 | 4,07 |
| Phe | 1,32 | 3,30 | 6,61 | 13,22 |
| Ile | 1,05 | 2,62 | 5,25 | 10,50 |
| Leu | 1,05 | 2,62 | 5,25 | 10,50 |
| Orn | 1,06 | 2,64 | 5,29 | 10,58 |
| Lys | 1,17 | 2,92 | 5,85 | 11,70 |
| Etila | 0,08 | 1,36 | 2,71 | 4,07 |
| Tira | 0,14 | 1,40 | 2,80 | 4,20 |
| Put | 0,16 | 1,55 | 3,10 | 4,65 |
| Cad | 0,15 | 1,51 | 3,02 | 4,52 |
| Try | 0,15 | 1,53 | 3,07 | 4,60 |
| Fen | 0,13 | 1,32 | 2,64 | 3,96 |
| Iso | 0,11 | 1,12 | 2,23 | 3,35 |
| Pro | 24,52 | 61,29 | 122,59 | 245,18 |

Legenda: P – soluções padrão; Asp - aspartato; Glu - glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; GABA - ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Eta – etanolamina; Val – valina; Met – metionina; Nva – norvalina (padrão interno); Hista – histamina; Trp – triptofano; Metila – metilamina; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina; Iso – isoamilamina; Pro – prolina.

### 2.3.1.8 Eliminação/tratamento dos resíduos tóxicos

Durante a realização da parte experimental deste trabalho, e sempre que possível, foi efectuada uma recuperação, diminuição da toxicidade ou armazenamento adequado dos resíduos produzidos.

Na quantificação dos aminoácidos livres e aminas por HPLC, o volume médio de resíduos de eluentes produzidos por análise foi de 102,6 mL. Destes, 51,9 % eram de fase móvel A e 48,1 % de fase móvel B. A composição média dos resíduos de eluentes foi de 2,72 g/L de acetato de sódio, 1,56 mL/L de tetrahidrofurano, 180 μL/L de trietilamina,

19,2 % (v/v) de acetonitrilo, 19,2 % (v/v) de metanol e no máximo 1,86 mg/L de OPA e 0,34 mg/L de FMOC.

Efectuaram-se, em média, 9 injecções por cada litro de resíduos produzido.

O procedimento adoptado com estes resíduos, bem como com os resíduos de ácido 3-mercaptopropiónico, de reagentes OPA e FMOC-Cl, e da acetona utilizada nas lavagens de material estão descritos na tabela 10.

**Tabela 10.** Procedimento adoptado na recuperação e/ou tratamento dos resíduos produzidos.

| Resíduo | Procedimento |
|---|---|
| Eluentes cromatográficos | ★ Teste de peróxidos (Perex-test art.1.16206 Merck)<br>★ Se necessário, desactivação dos peróxidos com Kit Perex (art.1.16207 Merck)<br>★ Purificação por destilação fraccionada<br>★ Neutralização dos resíduos da destilação com algumas gotas de solução diluída de HCl |
| Ácido 3-mercaptopropiónico | ★ Todo o material utilizado e resíduos, oxidados durante várias horas com uma solução de hipoclorito de sódio |
| Reagente OPA | ★ O mesmo que para o ácido 3-mercaptopropiónico |
| Reagente FMOC-Cl | ★ Neutralização por adição de um excesso de metanol |
| Acetona das lavagens de material | ★ Purificação por destilação fraccionada |

## 2.3.2 Quantificação do carbamato de etilo

### 2.3.2.1 Preparação das amostras

Todas as amostras foram diluídas com água ultrapura ou com uma solução de etanol de concentração tal, que no final a solução resultante tivesse um teor de etanol de 20 %. As amostras de aguardente vínica foram diluídas 1:3 (v/v) com água, as amostras de vinhos licorosos diluídas 1:2 (v/v) com solução de etanol a 20 % (v/v) e as amostras de vinho diluídas 1:2 (v/v) com solução de etanol a 24 % (v/v).

As amostras de vinho, aguardente e padrões foram filtradas com um filtro descartável de 0,45 μm antes de serem injectadas no sistema cromatográfico.

As soluções padrão foram preparadas em solução de etanol a 20 % (v/v), por diluição de uma solução mãe de concentração aproximada de 5 g/L.

### 2.3.2.2 Preparação do reagente 9-xantidrol

A preparação do reagente 9-xantidrol efectuou-se tal qual descrito na Patente Portuguesa registada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (nº 102520) e

publicada no Boletim de Propriedade Industrial de 30 de Abril de 2001, e que se descreve a seguir: dissolveu-se a massa necessária de 9-xantidrol em 1-propanol, de forma a obter-se uma solução com a concentração final de 0,02 mol/L. Esta solução é estável durante mais de 2 meses desde que mantida no escuro e a T < 0º C. A determinação da estabilidade do reagente, foi efectuada com base na diferença relativa (<5 %) entre a resposta do detector a uma solução padrão de carbamato de etilo de 50,7 μg/L, analisada durante o período de 2 meses.

### 2.3.2.3 Procedimento de derivatização

A reacção de derivatização efectuou-se adicionando-se 500 μL de amostra diluída a 100 μL de solução reagente de 9-xantidrol 0,02 mol/L. Depois disto, adicionaram-se 50 μL de uma solução de HCl 1,5 mol/L à solução anterior. Após 5 minutos de reacção, injectaram-se 15 μL no sistema cromatográfico.

### 2.3.2.4 Equipamento cromatográfico

Todos as análises cromatográficas foram realizadas num cromatógrafo Hewlett Packard (Waldbronn, Alemanha) 1090 AminoQuant Series II, equipado com um detector de fluorescência Hewlett Packard 104, tudo controlado por uma ChemStation Hewlett Packard (revisão A06). A coluna analítica era uma AminoQuant 200 x 2,1 mm Hewlett Packard, com partículas de 5 μm, e uma pré-coluna ODS Hypersil 5 μm 20 x 2,1 mm Hewlett Packard.

### 2.3.2.5 Análise cromatográfica

A eluição e separação dos compostos presentes nas amostras e soluções padrão foi efectuada com recurso a um gradiente binário que se descreve na tabela 11.

**Tabela 11.** Gradiente utilizado na análise do carbamato de etilo por HPLC.

| Tempo (minutos) | 0,01 | 18 | 19 | 20 | 26 | 28 | 29 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % Fase móvel B | 45 | 50 | 100 | 100 | 100 | 45 | 45 |
| Fluxo (mL/min) | 0,45 | 0,45 | 0,63 | 0,8 | 0,8 | 0,45 | 0,45 |

A fase móvel A era constituída por uma solução de acetato de sódio 20 mM, com pH 7,2, e a fase móvel B constituída por acetonitrilo.

A detecção dos derivados foi efectuada por fluorescência aos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 233 nm e 600 nm, respectivamente. O tempo de resposta do detector seleccionou-se para 4000 mseg e a frequência da lâmpada para 220 Hz. Utilizou-se uma fenda de excitação de 2 mm x 2 mm, uma fenda de emissão de 4 mm x 4 mm, e um filtro de absorção de 280 nm[18].

### 2.3.2.6 Quantificação

Devido à importância do composto em causa e dos baixos teores em que ocorre no vinhos, torna-se desejável que a sua quantificação se efectue com recurso ao método do padrão interno, para minimizar os erros associados à determinação da sua concentração. Consoante a técnica de separação e/ou detecção, foram já utilizados vários compostos como padrão interno na quantificação do CE. Os mais utilizados têm sido os análogos do CE como o carbamato de metilo [27; 93] o carbamato de *terc*-butilo [18; 223], o carbamato de N-butilo [18; 80], ou o carbamato de ciclopentilo [217; 261], ou então outros compostos como sejam o tetradecanoato de metilo [80] ou o nitrobenzeno [128].

Durante o desenvolvimento deste trabalho foi estudado o carbamato de metilo como possível padrão interno. No entanto, e porque se detectou a presença deste composto numa amostra de aguardente, optou-se por se efectuar a quantificação do CE através do método do padrão externo, tal como fizeram outros autores [40; 46; 47; 59; 71].

### 2.3.2.7 Eliminação/tratamento dos resíduos tóxicos

Na análise do carbamato de etilo por HPLC, os eluentes cromatográficos foram tratados da mesma forma descrita anteriormente (*vide* tabela 11). Porque o carbamato de etilo é um possível agente carcinogénico para o Homem (frase de risco R-45), todas as soluções e material foram cuidadosamente manuseados, sob ventilação e com luvas (frases de segurança S-53, S-45). Todo o material que contactou com o carbamato de etilo, foi lavado com solução quente de hidróxido de sódio [223] e os resíduos colocados num contentor rotulado de RESÍDUOS ORGÂNICOS NÃO HALOGENADOS, para um posterior encaminhamento adequado.

[18] Este filtro, também denominado "cut-off", absorve toda a radiação de comprimento de onda igual ou inferior a 280 nm.

### 2.3.3 Parâmetros da caracterização sumária de mostos e vinhos

Os parâmetros ºBrix, título alcoométrico volúmico potencial e adquirido, o teor de açúcares redutores, a acidez total, volátil e fixa, o pH, os teores de dióxido de enxofre livre e total, a massa volúmica, e os extractos secos não redutor e total, foram determinados através dos métodos OIV [202].

## 2.4. Métodos estatísticos

Todos os métodos estatísticos empregues neste trabalho, como a comparação de médias, a análise de variância, a análise de componentes principais, e a análise de regressão linear, foram efectuados com o programa Statgraphics® Plus versão para Windows 1.4 1995.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Caracterização sumária das amostras estudadas

A caracterização sumária das amostras que foram alvo deste estudo, teve como principal utilidade podermos avaliar se existem diferenças fundamentais na constituição dos mostos e vinhos em causa, ou valores anormais em algum desses parâmetros nas amostras estudadas, que possam inviabilizar a abordagem feita posteriormente em relação a outras variáveis. Os parâmetros que fizeram parte desta caracterização foram, no caso dos mostos, o ºBrix, o título alcoométrico volúmico potencial, o teor de açúcares, a acidez total e o pH, e no caso dos vinhos os teores de dióxido de enxofre livre e total, a massa volúmica, o título alcoométrico volúmico adquirido, o teor de açúcares redutores, o extracto seco não redutor e total, a acidez total, fixa e volátil, e o pH. Os resultados dessas análises encontram-se representados na sua totalidade nas tabelas A2 e A3 (vinhos comerciais), B1 a B4 (vinhos monovarietais) e C1 a C4 (mostos), e estão resumidos nas figuras seguintes (6 a 32).

Os parâmetros da análise sumária dos vinhos comerciais de 1997 encontram-se resumidos nas figuras 6 a 16.

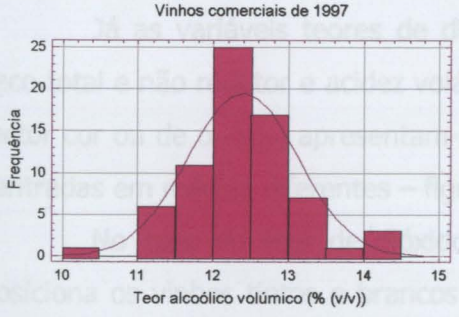



**Figura 6.** Histograma para o título alcoométrico volúmico adquirido – vinhos comerciais 1997.

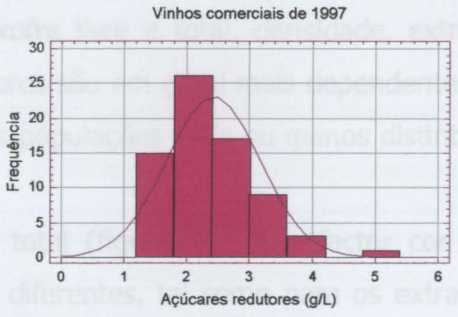



**Figura 7.** Histograma para o teor em açúcares redutores – vinhos comerciais 1997.

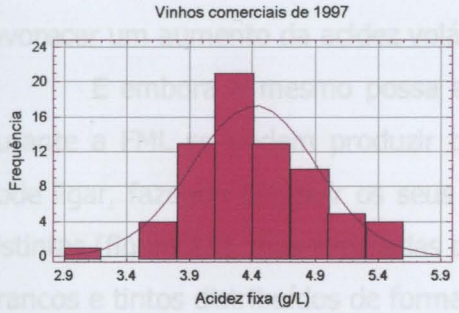



**Figura 8.** Histograma para a acidez fixa – vinhos comerciais 1997.

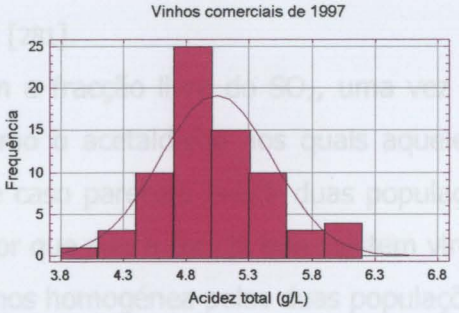



**Figura 9.** Histograma para a acidez total – vinhos comerciais 1997.

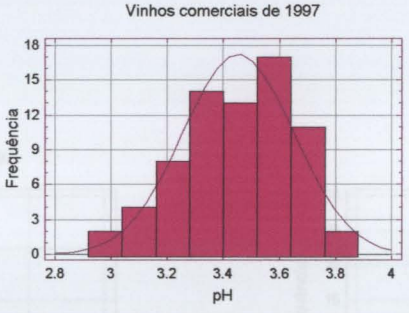



**Figura 10.** Histograma para o pH – vinhos comerciais 1997.

Os vinhos comerciais estudados apresentaram, no seu conjunto, uma distribuição próxima da normal para os parâmetros título alcoométrico volúmico adquirido, açúcares redutores, acidezes fixa e total e pH – figuras 6 a 10. Estes parâmetros analíticos dependem menos do factor cor do que os restantes estudados, e como tal é de esperar que apresentem o comportamento verificado.

Já as variáveis teores de dióxido de enxofre livre e total, densidade, extracto seco total e não redutor e acidez volátil, cujos valores são em geral mais dependentes do factor cor ou de outros, apresentam-se como duas populações mais ou menos distintas e centradas em médias diferentes – figuras 11 a 16.

No caso do teor de dióxido de enxofre total (figura 11), é o factor cor que posiciona os vinhos tintos e brancos com médias diferentes, tal como para os extractos secos total e não redutor (figuras 14 e 15) e para a massa volúmica (figura 12). Para a acidez volátil (figura 16), embora associado ao factor cor, o factor importante é muito provavelmente a realização da fermentação maloláctica, que é normal acontecer nos vinhos tintos. Apesar de não termos quaisquer dados analíticos que possam fundamentar

esta afirmação, é todavia um facto que a realização da fermentação maloláctica pode favorecer um aumento da acidez volátil nos vinhos [281].

E embora o mesmo possa acontecer com a fracção livre do $SO_2$, uma vez que durante a FML se podem produzir compostos como o acetaldeído aos quais aquele se pode ligar, fazendo diminuir os seus teores, neste caso parecem existir duas populações distintas (figura 13), mas separadas por outro factor que não a cor, já que existem vinhos brancos e tintos distribuídos de forma mais ou menos homogénea pelas duas populações.

No geral, não se verificaram valores muito extremos, com excepção de 2 vinhos brancos relativamente ao teor de $SO_2$ total (figura 11).

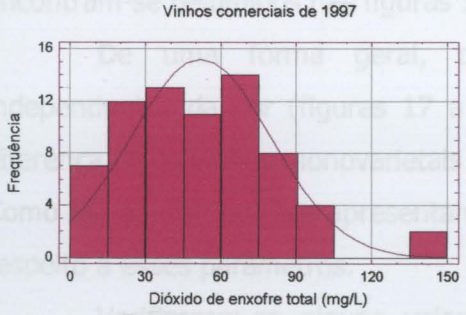



**Figura 11.** Histograma para o teor de dióxido de enxofre total – vinhos comerciais 1997.

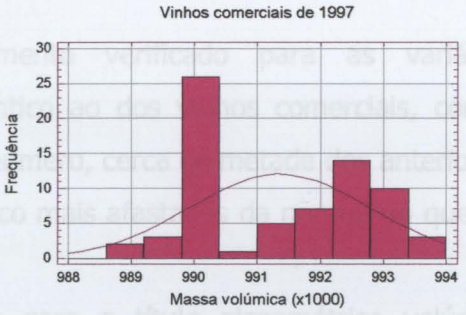



**Figura 12.** Histograma para a massa volúmica – vinhos comerciais 1997.

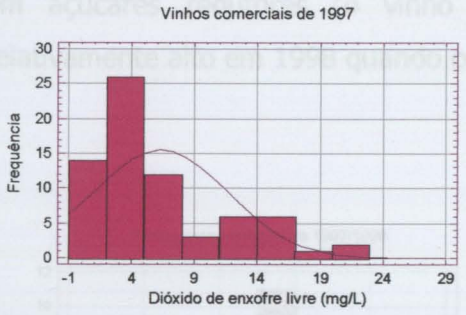



**Figura 13.** Histograma para o teor de dióxido de enxofre livre – vinhos comerciais 1997.

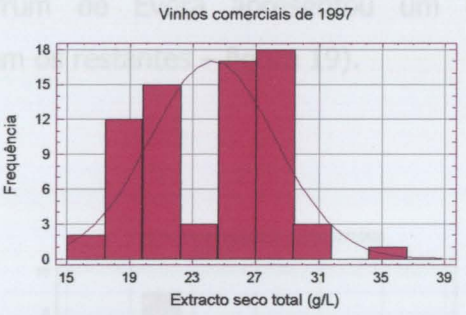



**Figura 14.** Histograma para o extracto seco total– vinhos comerciais 1997.

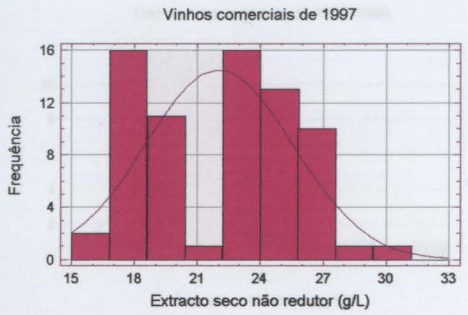



**Figura 15.** Histograma para o extracto seco não redutor – vinhos comerciais 1997.

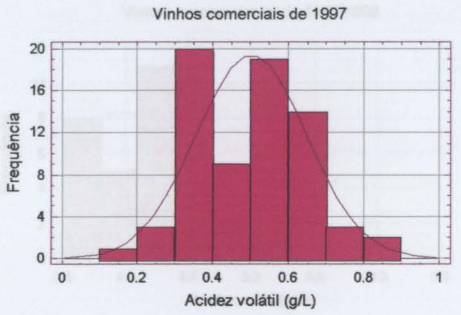



**Figura 16.** Histograma para a acidez volátil – vinhos comerciais 1997.

Os parâmetros da análise sumária dos vinhos monovarietais de 1997 e 1998 encontram-se resumidos nas figuras 17 a 27.

De uma forma geral, o comportamento verificado para as variáveis independentes da cor (figuras 17 a 21) foi idêntico ao dos vinhos comerciais, com a diferença de os vinhos monovarietais serem, em número, cerca de metade dos anteriores. Como tal, as distribuições apresentam-se um pouco mais afastadas da normal no que diz respeito a esses parâmetros.

Verificaram-se alguns valores extremos para o título alcoométrico volúmico adquirido (os vinhos Moreto de Évora e Trincadeira da Vidigueira, ambos tintos de 1997, apresentaram-se com valores mais baixos do que os restantes – figura 17), e para o teor em açúcares redutores (o vinho branco Perrum de Évora apresentou um teor relativamente alto em 1998 quando comparado com os restantes – figura 19).

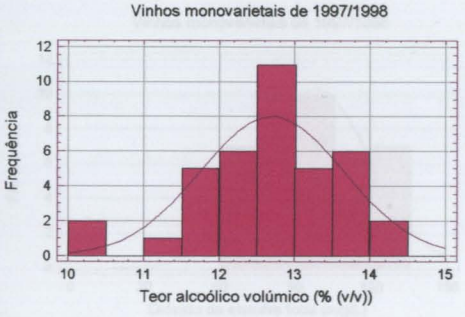



**Figura 17.** Histograma para o título alcoométrico volúmico adquirido – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

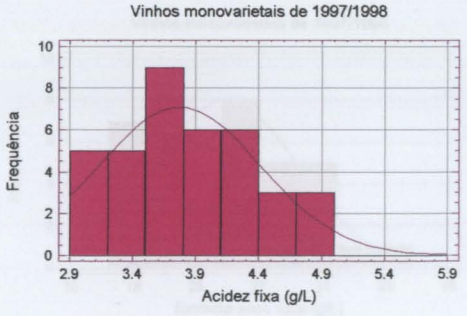



**Figura 18.** Histograma para a acidez fixa – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

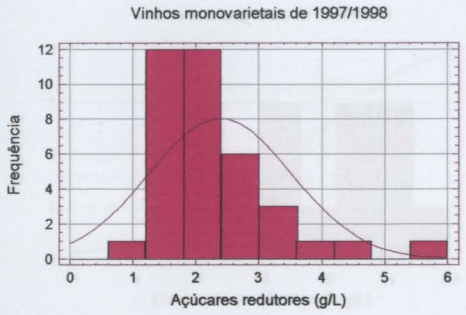



**Figura 19.** Histograma para o teor em açúcares redutores – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

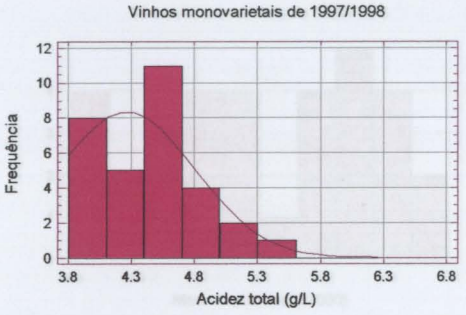



**Figura 20.** Histograma para a acidez total – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

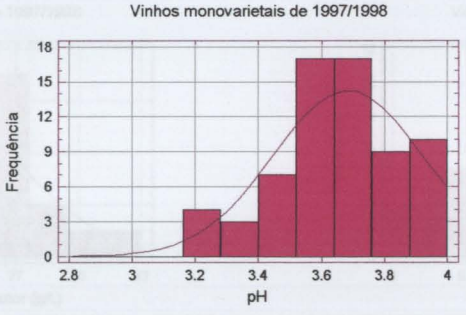



**Figura 21.** Histograma para o pH – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

No que diz respeito às restantes variáveis, a distribuição dos diferentes vinhos fez-se ou em dois grupos distintos, tal como para os vinhos comerciais, ou apresentou uma distribuição muito diferente da normal como foi o caso do $SO_2$ livre (figura 24) e da massa volúmica (figura 25). A esta situação não deve ser indiferente o facto de se tratar de um número relativamente pequeno de amostras provenientes de microvinificações.

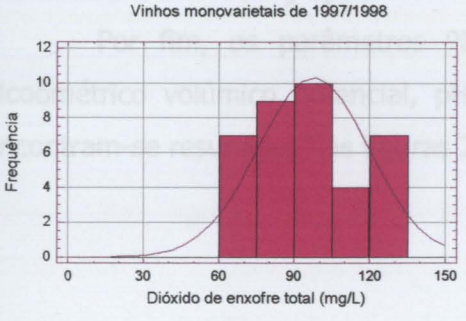



**Figura 22.** Histograma para o teor de dióxido de enxofre total – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

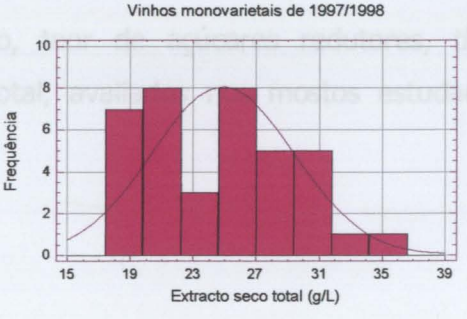



**Figura 23.** Histograma para o extracto seco total – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

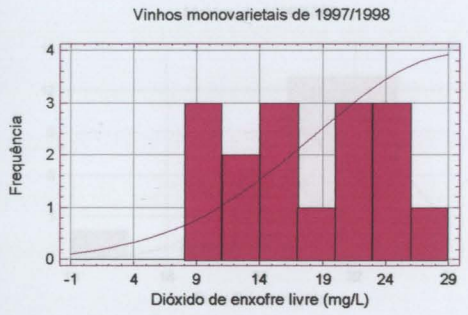



**Figura 24.** Histograma para o teor de dióxido de enxofre livre – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

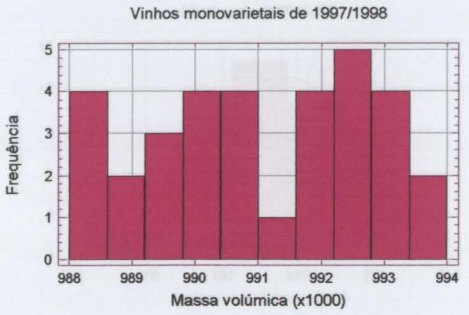



**Figura 25.** Histograma para a massa volúmica – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

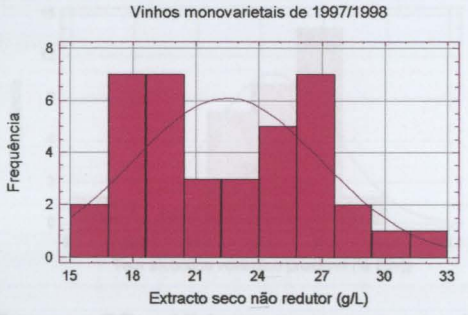



**Figura 26.** Histograma para o extracto seco não redutor – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

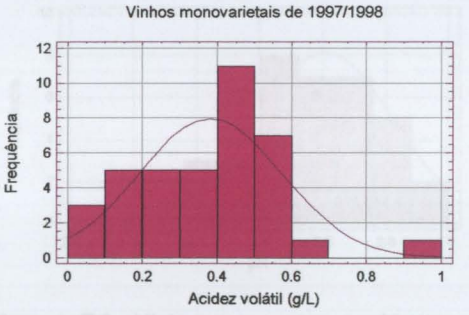



**Figura 27.** Histograma para a acidez volátil – vinhos monovarietais 1997 e 1998.

Um dos vinhos estudados (vinho tinto Aragonez de Évora de 1998), apresentou um valor de acidez volátil extremo, relativamente aos vinhos de 1997 e 1998 – figura 27.

Comparando os vinhos comerciais com os monovarietais, verificaram-se nos últimos, valores ligeiramente superiores de $SO_2$ livre e total, de pH e de teor alcoólico, e inferiores de acidez fixa e total. Os restantes parâmetros apresentaram valores médios idênticos entre os dois grupos.

Por fim, os parâmetros ºBrix corrigido, teor de açúcares redutores, título alcoométrico volúmico potencial, pH e acidez total, avaliados nos mostos estudados, encontram-se resumidos nas figuras 28 a 32.

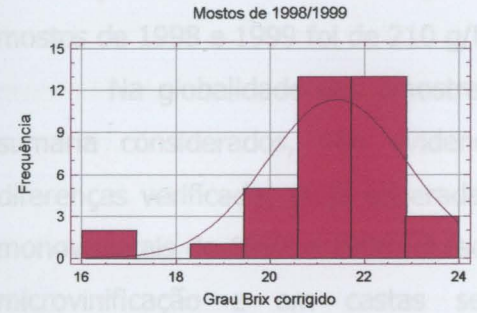



**Figura 28.** Histograma para o ºBrix corrigido – mostos 1998 e 1999.

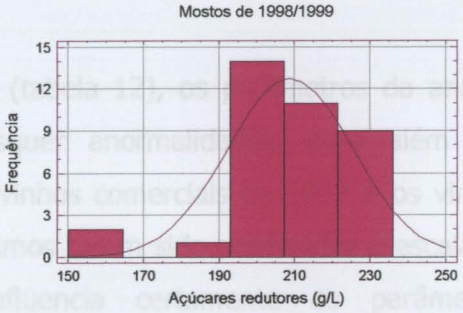



**Figura 29.** Histograma para o teor de açúcares redutores – mostos 1998 e 1999.

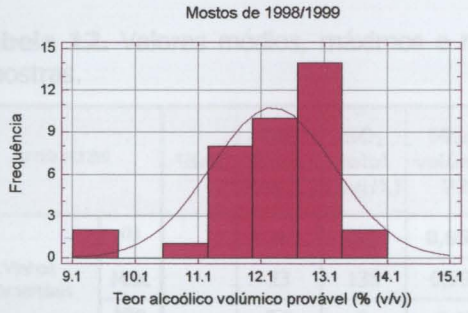



**Figura 30.** Histograma para o título alcoométrico volúmico potencial – mostos 1998 e 1999.

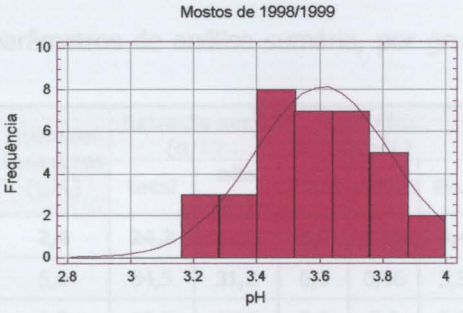



**Figura 31.** Histograma para o pH – mostos 1998 e 1999.

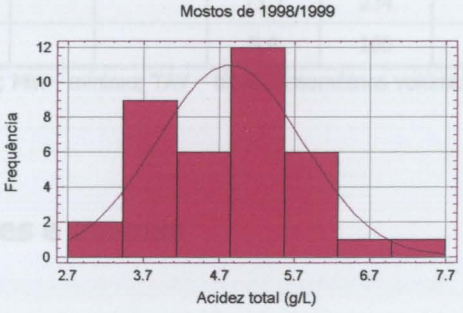



**Figura 32.** Histograma para a acidez total – mostos 1998 e 1999.

Nas figuras 28, 29 e 30 é possível verificar que, para as variáveis aí representadas, 2 dos mostos estudados apresentam valores extremos inferiores aos dos restantes. Essas amostras correspondem às castas Moreto (tinta) e Perrum (branca) que, na vindima de 1999, foram vindimadas após chuva (*vide* tabela C4) originando um efeito

de diluição do conteúdo dos bagos. O valor médio do teor de açúcares redutores nos mostos de 1998 e 1999 foi de 210 g/L.

Na globalidade das amostras estudadas (tabela 12), os parâmetros da análise sumária considerados, não evidenciaram quaisquer anormalidades, para além das diferenças verificadas (e já esperadas) entre os vinhos comerciais de 1997 e os vinhos monovarietais de 1997 e 1998. O facto de os últimos terem sido produzidos à escala da microvinificação e em castas separadas, influencia certamente os parâmetros considerados.

**Tabela 12.** Valores médios, máximos e mínimos dos parâmetros de análise sumária, por grupo de amostras.

| Amostras | | °Brix | $SO_2$ livre (mg/L) | $SO_2$ total (mg/L) | Massa volúmica P20 | TAV (% (v/v)) | Açúcares redutores (g/L) | Extracto seco (g/L) | | Acidez (g/L) | | | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | total | não redutor | total | volátil | fixa | |
| Vinhos comerciais | **m** | | **6** | **52** | **0,9914** | **12,4[a]** | **2,4** | **24,2** | **22,0** | **5,0** | **0,50** | **4,4** | **3,4** |
| | Max | | 23 | 138 | 0,9936 | 14,4 | 5,0 | 34,5 | 31,2 | 6,2 | 0,86 | 5,5 | 3,9 |
| | Min | | 0,5 | 9 | 0,989 | 10,4 | 1,2 | 16,5 | 15,8 | 3,9 | 0,2 | 3,0 | 2,9 |
| Vinhos monovarietais | **m** | | **30** | **98** | **0,9913** | **12,7[a]** | **2,4** | **24,9** | **22,5** | **4,2** | **0,38** | **3,8** | **3,8** |
| | Max | | 45 | 162 | 0,9965 | 14,5 | 6,0 | 35,0 | 32,0 | 5,4 | 0,92 | 5,0 | 4,6 |
| | Min | | 10 | 68 | 0,9877 | 10,2 | 1,1 | 18,3 | 15,7 | 2,8 | 0,02 | 1,6 | 3,2 |
| Mostos | **m** | **21,4** | | | | **12,3[b]** | **209** | | | **4,8** | | | **3,6** |
| | Max | 23,6 | | | | 13,7 | 234 | | | 7,2 | | | 4,1 |
| | Min | 17 | | | | 9,4 | 160 | | | 2,9 | | | 3,2 |

Legenda: m – média, Max – máximo; Min – mínimo; TAV – título alcoométrico volúmico; [a] - TAV adquirido; [b] – TAV potencial.

## 3.2 Aminoácidos livres e aminas

### 3.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico

A quantificação dos aminoácidos livres e aminas, foi uma das fases determinantes da realização deste trabalho, já que nos forneceu a maior parte dos dados analíticos que lhe servem de base. No entanto, e na ausência de uma metodologia analítica que possibilitasse a quantificação simultânea dos dois grupos de compostos, de forma a abranger todos aqueles que consideramos essenciais, houve necessidade de a desenvolver, tendo-se optado pela cromatografia de líquidos de alta eficiência, como método separativo.

A metodologia desenvolvida, que permite a análise de um grande número de compostos (33 no total), tem 138 minutos como duração da análise cromatográfica propriamente dita, sendo a resposta de fluorescência linear na gama de concentrações estudada.

O limite de detecção (tabela 13), foi em média de 0,58 mg/L para os aminoácidos (excepto para a arginina – 2,95 mg/L), 0,28 mg/L para as aminas, e 27,3 mg/L para a prolina, calculado com base nas curvas de calibração. Apesar de os limites de detecção obtidos para as aminas biogénicas serem ligeiramente superiores aos obtidos por outros métodos [169], ainda assim eles se mostraram apropriados para os objectivos pretendidos.

A repetibilidade de 7 injecções variou de 0,6 % a 11, 6 % (desvio padrão relativo – DPR) para soluções padrão (com uma concentração média de aminoácidos livres de 2,75 mg/L e de aminas de 1,4 mg/L) e de 0,5 % a 19,2 % para amostras de vinho (tabela 13). O triptofano foi o aminoácido em que se verificou maior DPR na sua determinação nos padrões (11,1 %) e a glutamina nas amostras de vinho (19,2 %). Relativamente ao mesmo parâmetro, foi a putrescina a amina com maior DPR nos padrões (11,6 %), e a triptamina nos vinhos (16,0 %).

A exactidão foi avaliada através do cálculo da percentagem de recuperação, obtida por adição de uma determinada quantidade de padrão a uma amostra de vinho (tabela 13). De 6 determinações independentes, calculou-se uma recuperação média de 99,8 % (coeficiente de variação = 11,1 %). O valor mínimo obtido foi para a isoamilamina (81 %) e o máximo para a histamina (138 %).

**Tabela 13.** Parâmetros de validação obtidos para o método analítico de quantificação de aminoácidos livres e aminas.

| Composto | Repetibilidade (DPR%) | | Recuperação (%) | Limite de detecção (mg/L) |
|---|---|---|---|---|
| | Padrão | Vinho tinto | | |
| Asp | 2,5 | 0,5 | 124 | 0,47 |
| Glu | 0,6 | 0,8 | 102 | 0,93 |
| Asn | 0,8 | 4,4 | 101 | 0,53 |
| Ser | 2,1 | 2,0 | 102 | 0,75 |
| Gln | 6,7 | 19,2 | 94 | 0,21 |
| His | 1,2 | 6,5 | 100 | 0,21 |
| Gly | 5,7 | 4,8 | 109 | 0,35 |
| Thr | 1,6 | 5,4 | 107 | 0,28 |
| Cit | 0,7 | 8,4 | 101 | 0,88 |
| Arg | 0,6 | 4,9 | 97 | 2,95 |
| Ala | 4,4 | 4,3 | 106 | 2,07 |
| Gaba | 9,3 | 14,2 | 97 | 0,18 |
| Tyr | 1,6 | 2,2 | 101 | 0,44 |
| Eta | 8,7 | 3,2 | 98 | 0,21 |
| Val | 2,3 | 3,1 | 106 | 0,66 |
| Met | 0,8 | 3,9 | 102 | 0,84 |
| Nva | 3,8 | 5,5 | 98 | - |
| Hista | 4,1 | 7,3 | 138 | 0,81 |
| Trp | 11,1 | 9,6 | 92 | 0,67 |
| Metila | 7,8 | 8,4 | 82 | 0,1 |
| Phe | 1,1 | 4,0 | 103 | 0,9 |
| Ile | 1,8 | 3,6 | 103 | 0,35 |
| Leu | 1,6 | 3,6 | 103 | 0,61 |
| Orn | 1,8 | 14,9 | 89 | 0,1 |
| Lys | 2,7 | 7,7 | 94 | 0,26 |
| Etila | 4,3 | 7,3 | 85 | 0,24 |
| Tira | 3,5 | 6,6 | 91 | 0,10 |
| Put | 11,6 | 12,2 | 105 | 0,20 |
| Cad | 5,5 | 12,7 | 87 | 0,17 |
| Fen | 8,5 | 16,0 | 90 | 0,35 |
| Try | 4,2 | 8,5 | 94 | 0,47 |
| Iso | 2,8 | 5,2 | 81 | 0,12 |
| Pro | 3,9 | 6,5 | 110 | 27,3 |

Legenda: DPR- desvio padrão relativo; Asp - aspartato; Glu - glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba - ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Eta – etanolamina; Val – valina; Met – metionina; Nva – norvalina (padrão interno); Hista – histamina; Trp – triptofano; Metila – metilamina; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina; Iso – isoamilamina; Pro – prolina

O tempo de análise relativamente longo necessário para cada amostra, é um compromisso entre a necessidade de uma separação cromatográfica que permita a melhor quantificação de todos os compostos e a necessidade de um método analítico suficientemente rápido, que permita a análise de um grande número de amostras. Num método anteriormente desenvolvido [116], vocacionado para a análise de aminoácidos livres em vinhos, verificava-se a co-eluição de alguns compostos importantes e/ou a sua ausência na lista de compostos que o método permitia quantificar. De salientar, que a arginina e o Gaba por vezes co-eluiam, e a metionina co-eluía com um interferente, que

agora sabemos ser a etanolamina. Não eram quantificadas a citrulina, a ornitina, e as aminas.

No sentido de contornar estes problemas, mostrou-se necessário estender o tempo de análise para permitir uma melhor quantificação dos 23 aminoácidos (incluindo a citrulina e a ornitina) e 10 aminas, que foi possível analisar pelo método desenvolvido.

### 3.2.1.1 Quantificação da prolina

A execução do método analítico utilizado, pressupõe a realização de uma 2ª injecção durante a execução do gradiente binário de eluentes preconizado na separação cromatográfica. Já anteriormente, foram descritos métodos em que, no mesmo volume de amostra, se faz reagir o OPA com os aminoácidos primários e o FMOC-Cl com os secundários como a prolina [111; 116; 246]. Inicialmente, o OPA é adicionado à amostra onde reage com os aminoácidos e aminas primárias, sendo depois adicionado o FMOC-Cl, para reagir com os iminoácidos e aminas secundárias. No entanto, se tal procedimento fosse adoptado com o gradiente de eluição utilizado, o derivado da prolina co-eluiria com alguns picos das aminas, tornando impossível a quantificação ou de um ou de outros, já que tem de se efectuar uma mudança nos comprimentos de onda de excitação/emissão de fluorescência necessária para a quantificação da prolina. Para evitar este problema, decidimos efectuar uma segunda reacção de derivatização, com uma maior diluição da amostra (do que no caso da reacção com o OPA) para diminuir a interferência de outros compostos e a sobrecarga da coluna analítica.

A quantificação da prolina e das aminas em causa é possível nestas condições, uma vez que os derivados FMOC-Cl dos aminoácidos primários eluem da coluna analítica antes da prolina, numa altura em que os comprimentos de onda do detector estão seleccionados para a quantificação dos derivados OPA, não sendo por isso detectados. Esta metodologia permite a quantificação da prolina com parâmetros aceitáveis de validação, tal como se mostra na tabela 13, havendo contudo um pequeno decréscimo no tempo útil das colunas analíticas.

A figura 33 representa o cromatograma de uma solução padrão. Aí, pode verificar-se que a separação de grande parte dos compostos se faz pela linha de base. O par Fen/Try mostrou-se de difícil separação. Contudo, devido aos baixos teores encontrados destes compostos (quase sempre abaixo dos seus limites de detecção) – figuras 34 e 35 - a sua quantificação foi possível, a maior parte das vezes, de forma satisfatória.

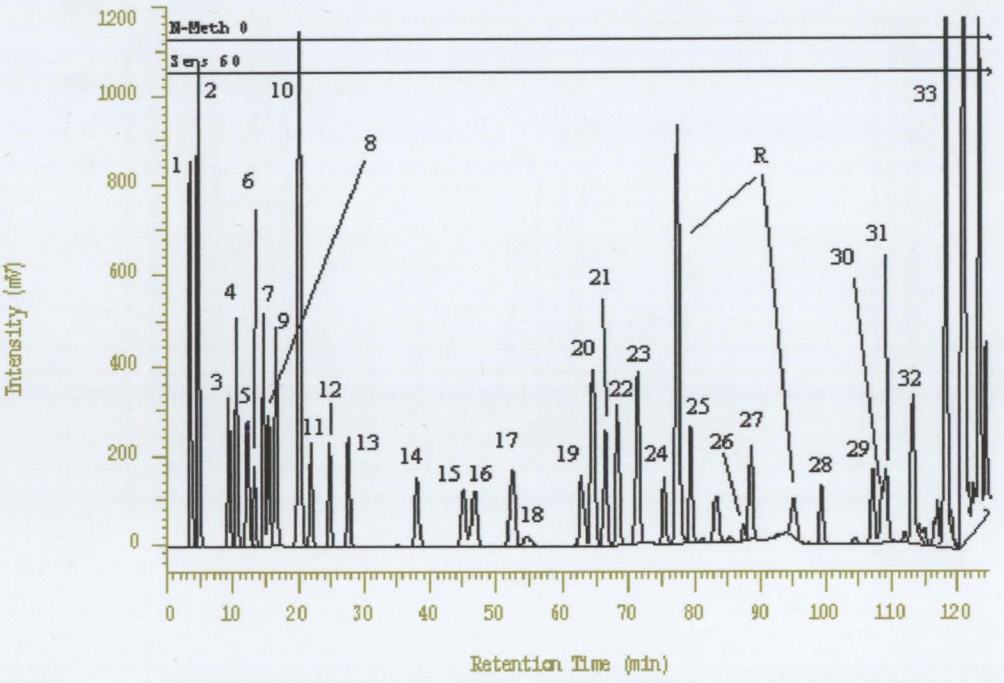



**Figura 33.** Cromatograma de uma solução padrão (P2).

Legenda: 1-Asp, 2-Glu, 3-Asn, 4-Ser, 5-Gln, 6-His, 7-Gly, 8-Thr, 9-Cit, 10-Arg, 11-Ala, 12-Gaba, 13-Tyr, 14-Eta, 15-Val, 16-Met, 17-Nva, 18-Hista, 19-Trp, 20-Metila, 21-Phe, 22-Ile, 23-Leu, 24-Orn, 25-Lys, 26-Etila, 27-Tira, 28-Put, 29-Cad, 30-Fen, 31-Try, 32-Iso, 33-Pro, R - picos do reagente presentes nos brancos de reacção.

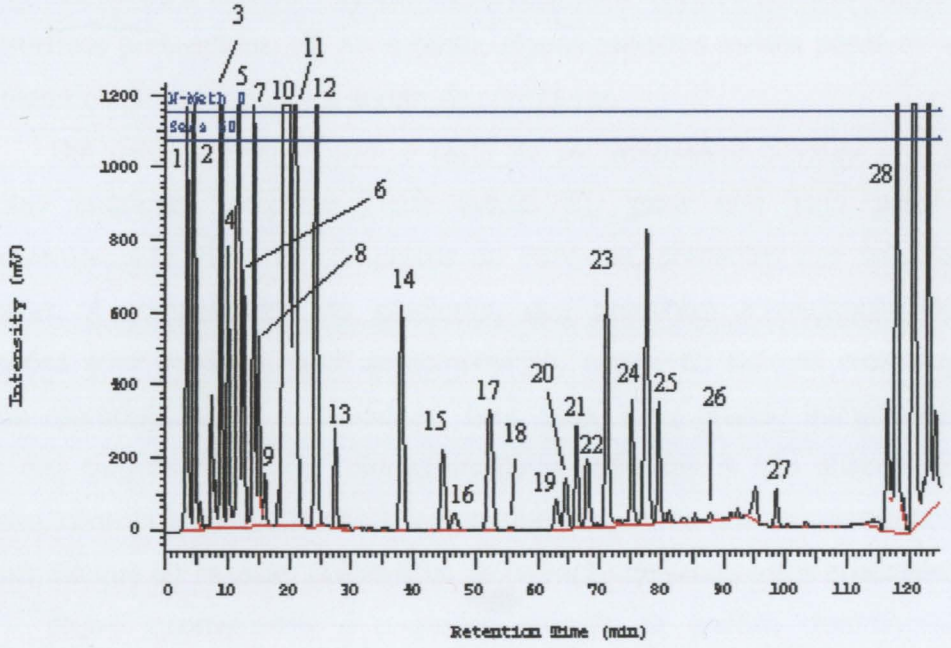



**Figura 34.** Cromatograma de uma amostra de mosto no início da fermentação alcoólica.

Legenda: 1-Asp, 2-Glu, 3-Asn, 4-Ser, 5-Gln, 6-His, 7-Gly, 8-Thr, 9-Cit, 10-Arg, 11-Ala, 12-Gaba, 13-Tyr, 14-Eta, 15-Val, 16-Met, 17-Nva, 18-Hista, 19-Trp, 20-Metila, 21-Phe, 22-Ile, 23-Leu, 24-Orn, 25-Lys, 26-Tira, 27-Put, 28-Pro.

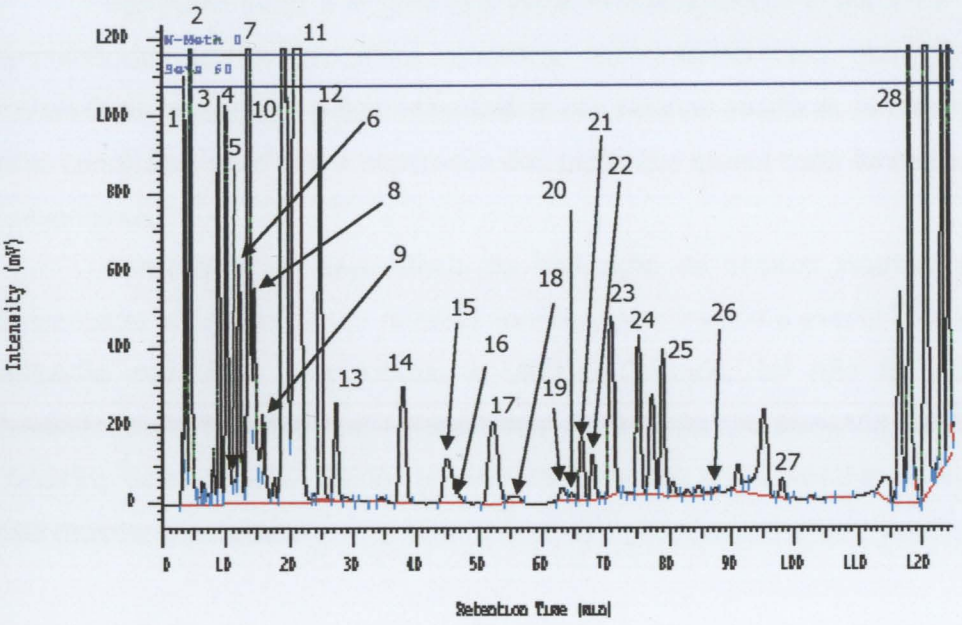



**Figura 35.** Cromatograma de uma amostra de vinho branco.

Legenda: 1-Asp, 2-Glu, 3-Asn, 4-Ser, 5-Gln, 6-His, 7-Gly, 8-Thr, 9-Cit, 10-Arg, 11-Ala, 12-Gaba, 13-Tyr, 14-Eta, 15-Val, 16-Met, 17-Nva, 18-Hista, 19-Trp, 20-Metila, 21-Phe, 22-Ile, 23-Leu, 24-Orn, 25-Lys, 26-Tira, 27-Put, 28-Pro.

No geral, o método mostrou-se fiável e com bons parâmetros de validação para os objectivos pretendidos. Há no entanto, alguns aspectos menos positivos associados a esta metodologia que julgamos serem de considerar.

Um deles prende-se com o facto de ser necessário efectuar um gradiente de eluentes bastante complexo (*vide* tabela 8), para que seja possível separar convenientemente todos os compostos de interesse, presentes nas soluções padrão e amostras. A complexidade do gradiente, que preconiza a realização de pequenas alterações quer de fluxo, quer de composição, requer do sistema cromatográfico uma grande reprodutibilidade e fiabilidade, bem como uma grande homogeneidade, entre lotes, das características das colunas analíticas utilizadas. A não observação do último preceito, contribuiu para que não fosse possível obter uma grande reprodutibilidade entre colunas, no que diz respeito aos tempos de retenção dos compostos analisados.

Outro inconveniente é a grande duração da análise cromatográfica, o que dificulta a análise de um grande número de amostras. Este inconveniente foi de certa forma ultrapassado com a utilização de um injector automático, que permitiu a realização de análises durante a noite.

Por outro lado, a largura dos picos cromatográficos é afectada pelo tempo de permanência dentro da coluna analítica, aumentando com este. Como tal, esta metodologia requer que a fase estacionária das colunas analíticas se encontre sempre em boas condições, para que a separação dos picos que eluem mais tarde se faça de forma conveniente.

Conscientes da importância da realização de ensaios interlaboratoriais para a conveniente validação de um método analítico, procuramos a execução dos mesmos com aplicação específica para mostos e vinhos. Contudo, tal não foi possível dada a inexistência de métodos que abrangessem uma gama tão alargada de compostos. Não obstante, os resultados obtidos encontram-se dentro dos intervalos de valores descritos pela maioria dos autores.

### 3.2.2 Teores de aminoácidos livres e aminas nos vinhos comerciais

Os dados obtidos na determinação dos teores de aminoácidos livres e aminas nas 67 amostras de vinhos comerciais de 1997, encontram-se na sua totalidade apresentados nas tabelas A4 a A7.

A obtenção destes dados teve na sua essência dois propósitos distintos. O primeiro, foi caracterizar os teores destes compostos nas amostras em causa, e o outro objectivo foi verificar se os factores região e produtor exercem influência nos teores dessas substâncias nos vinhos estudados. Para tal, foram estudados vinhos de 3 diferentes produtores e de diferentes sub-regiões, sendo que nem a todos os produtores correspondem vinhos de todas as sub-regiões consideradas. Estudaram-se ainda as possíveis relações entre os teores de aminas e os de aminoácidos livres, sendo esta avaliação feita em conjunto com as amostras de vinhos monovarietais.

Em termos dos teores de cada aminoácido livre (com excepção da prolina) nos vinhos comerciais brancos e tintos de 1997, as figuras 36 e 37 mostram que os teores médios dos aminoácidos livres existentes nos vinhos, embora no geral mais elevados nos brancos, não diferiram muito consoante estes eram brancos ou tintos. As excepções foram a arginina, a fenilalanina e a lisina. Estes últimos, apresentaram-se normalmente em quantidades bastante superiores nos vinhos brancos, e constituíram os aminoácidos mais abundantes, juntamente com o ácido γ-aminobutírico e a prolina (o majoritário), quer em brancos quer em tintos.

Outros aminoácidos foram encontrados por vezes em quantidades apreciáveis, relativamente aos restantes. Nos vinhos brancos (figura 36) foi a metionina, e nos tintos (figura 37) a alanina e o glutamato.

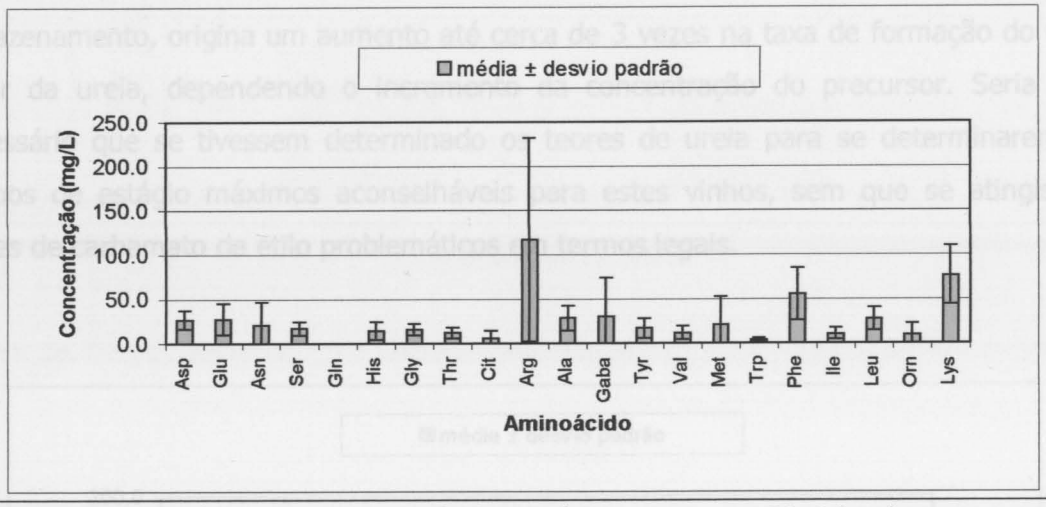



**Figura 36.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 30 vinhos brancos comerciais de 1997.

No que diz respeito aos valores absolutos e relativos das concentrações encontradas, estes encontram-se dentro daqueles apresentados na tabela 2 e reportados por outros autores.

Nos vinhos brancos (figura 36), a asparagina, a arginina, o ácido γ-aminobutírico, a metionina e a ornitina, foram os 5 aminoácidos cujos teores apresentaram maior variabilidade. Nos vinhos tintos, a citrulina, a arginina, a alanina, a metionina, e a ornitina foram os 5 que mais variaram entre os vinhos estudados (figura 37).

No que diz respeito aos teores de citrulina nos 67 vinhos estudados, um dos possíveis precursores de carbamato de etilo (CE) nos vinhos, os teores médios foram de 6,0 mg/L (6,2±8,2[19] nos brancos e 5,8±7,1[20] mg/L nos tintos), tendo o valor máximo sido detectado num vinho branco (23,9 mg/L). Se tivermos em atenção a taxa de formação de carbamato de etilo calculada por Stevens e Ough (1993) [261] de 0,00015 μg/L/dia/mg citrulina, calculada a partir da formação de carbamato de etilo em vinhos a cerca de 18 °C e com um máximo de 50 mg/L de citrulina, pode ser calculado em cerca de 90 anos o tempo de estágio a essa temperatura, para que se formassem 30 μg/L de CE (o valor limite estabelecido para vinhos pelo Canadá) com origem apenas na citrulina existente em

[19] - média±desvio padrão
[20] - idem

média nos vinhos estudados. Há no entanto que ter em atenção que o principal precursor de CE nos vinhos parecer ser a ureia (com taxas de formação cerca de 4 vezes superiores às da citrulina), e que a variável que mais influencia a taxa de formação de CE é a temperatura, verificando-se que um aumento de 10 °C na temperatura de armazenamento, origina um aumento até cerca de 3 vezes na taxa de formação do CE a partir da ureia, dependendo o incremento da concentração do precursor. Seria pois necessário que se tivessem determinado os teores de ureia para se determinarem os tempos de estágio máximos aconselháveis para estes vinhos, sem que se atingissem teores de carbamato de etilo problemáticos em termos legais.

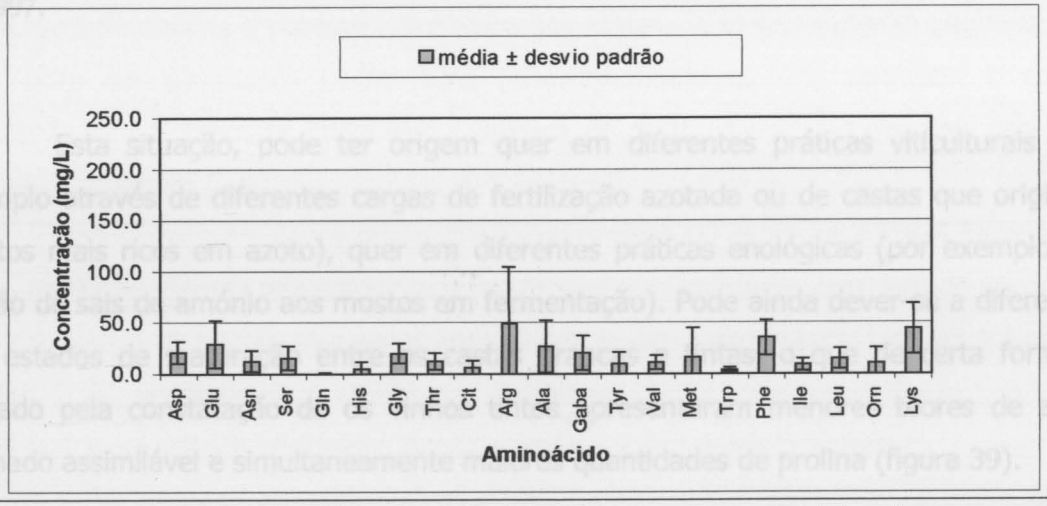



**Figura 37.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 37 vinhos tintos comerciais de 1997.

Traduzida em azoto aminado assimilável, em que se tem em consideração a contribuição em termos de átomos de azoto de cada um dos aminoácidos, o teor médio dos vinhos brancos (100 mg N/L) foi quase o dobro do teor médio verificado nos vinhos tintos (60 mg N/L) - figura 38.

Saliente-se que os teores apresentados são apenas os devidos ao azoto aminado, sendo que a fracção devida ao azoto de proveniência amoniacal pode constituir uma parte importante do azoto assimilável existente nos vinhos [272].

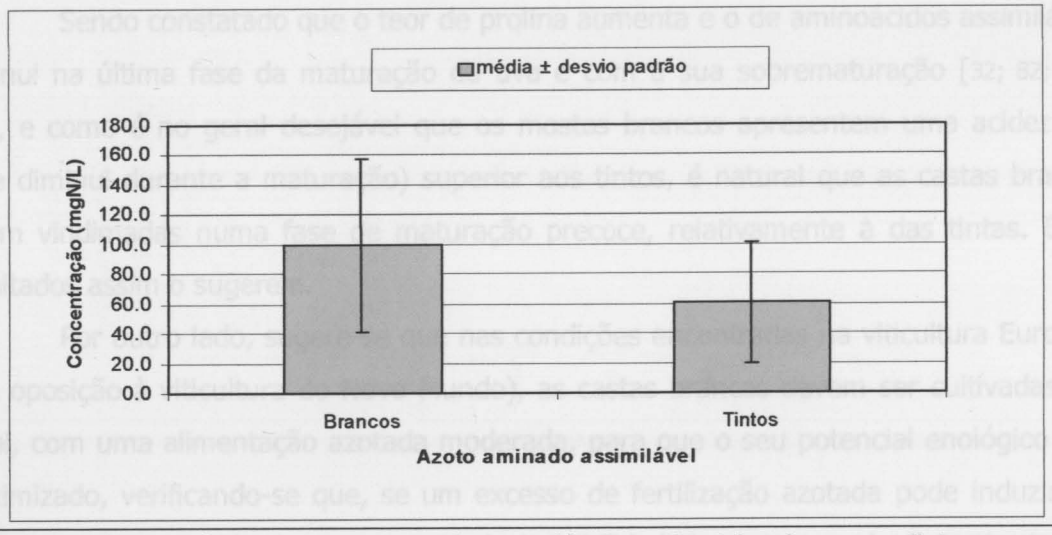



**Figura 38.** Teores médios de azoto aminado assimilável nos 67 vinhos brancos e tintos comerciais de 1997.

Esta situação, pode ter origem quer em diferentes práticas viticulturais (por exemplo através de diferentes cargas de fertilização azotada ou de castas que originam mostos mais ricos em azoto), quer em diferentes práticas enológicas (por exemplo por adição de sais de amónio aos mostos em fermentação). Pode ainda dever-se a diferenças nos estados de maturação entre as castas brancas e tintas, o que de certa forma é apoiado pela constatação de os vinhos tintos apresentaram menores teores de azoto aminado assimilável e simultaneamente maiores quantidades de prolina (figura 39).

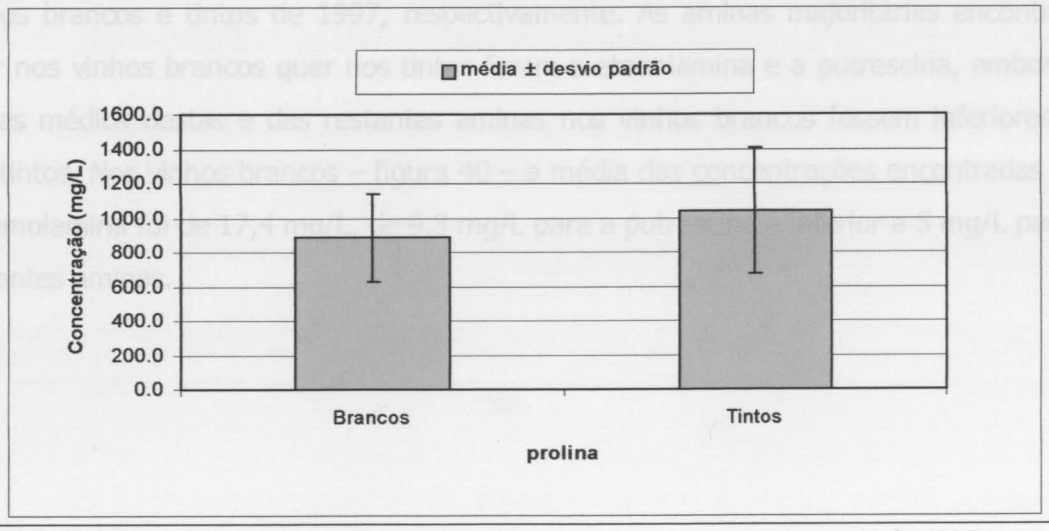



**Figura 39.** Teores médios de prolina nos 67 vinhos brancos e tintos comerciais de 1997.

Sendo constatado que o teor de prolina aumenta e o de aminoácidos assimiláveis diminui na última fase da maturação da uva e com a sua sobrematuração [32; 82; 143; 144], e como é no geral desejável que os mostos brancos apresentem uma acidez fixa (que diminui durante a maturação) superior aos tintos, é natural que as castas brancas sejam vindimadas numa fase de maturação precoce, relativamente à das tintas. Estes resultados assim o sugerem.

Por outro lado, sugere-se que nas condições encontradas na viticultura Europeia (em oposição à viticultura do Novo Mundo), as castas brancas devem ser cultivadas, no geral, com uma alimentação azotada moderada, para que o seu potencial enológico seja maximizado, verificando-se que, se um excesso de fertilização azotada pode induzir um vigor excessivo na vinha e um aumento da sensibilidade aos ataques de *Botrytis cinerea*, a sua carência diminui o potencial aromático das castas. Já as castas tintas originam uvas mais ricas em compostos polifenólicos (nomeadamente os que conferem a cor) e açúcares, em condições de baixa disponibilidade de azoto, desde que não haja carências hídricas acentuadas [280].

Se tivermos em conta que a quantidade média de azoto assimilável (aminado e amoniacal) considerada necessária para se efectuar a fermentação completa de um mosto com cerca de 210 g/L de açúcares fermentáveis é aproximadamente 140 mg N/L a 160 mg N/L [236], verifica-se que muitos dos vinhos estudados apresentaram quantidades de azoto suficiente para a realização de uma fermentação alcoólica completa, apenas com base no azoto aminado assimilável (figura 38).

As figuras 40 e 41 mostram os teores médios de cada amina quantificada nos vinhos brancos e tintos de 1997, respectivamente. As aminas majoritárias encontradas quer nos vinhos brancos quer nos tintos foram a etanolamina e a putrescina, embora os teores médios destas e das restantes aminas nos vinhos brancos fossem inferiores aos dos tintos. Nos vinhos brancos – figura 40 – a média das concentrações encontradas para a etanolamina foi de 17,4 mg/L, de 9,3 mg/L para a putrescina e inferior a 5 mg/L para as restantes aminas.

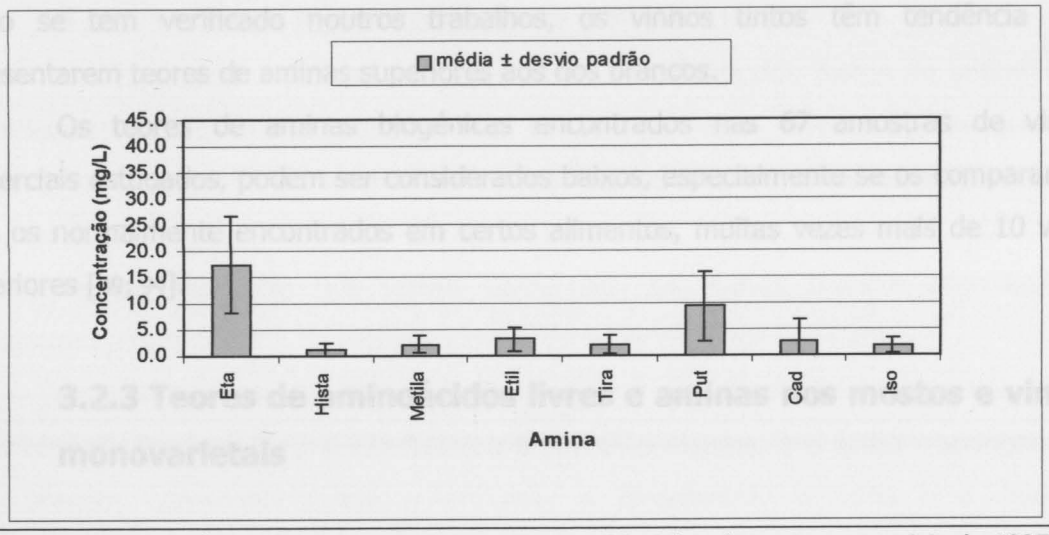



**Figura 40.** Teores médios de cada amina presente nos 30 vinhos brancos comerciais de 1997.

Já nos vinhos tintos – figura 41 – a concentração média de etanolamina encontrada foi de 30,0 mg/L, de 22,7 mg/L de putrescina e inferior a 5 mg/L para as restantes aminas encontradas, com excepção da etilamina (média de 5,9 mg/L) e da tiramina (média de 5,2 mg/L).

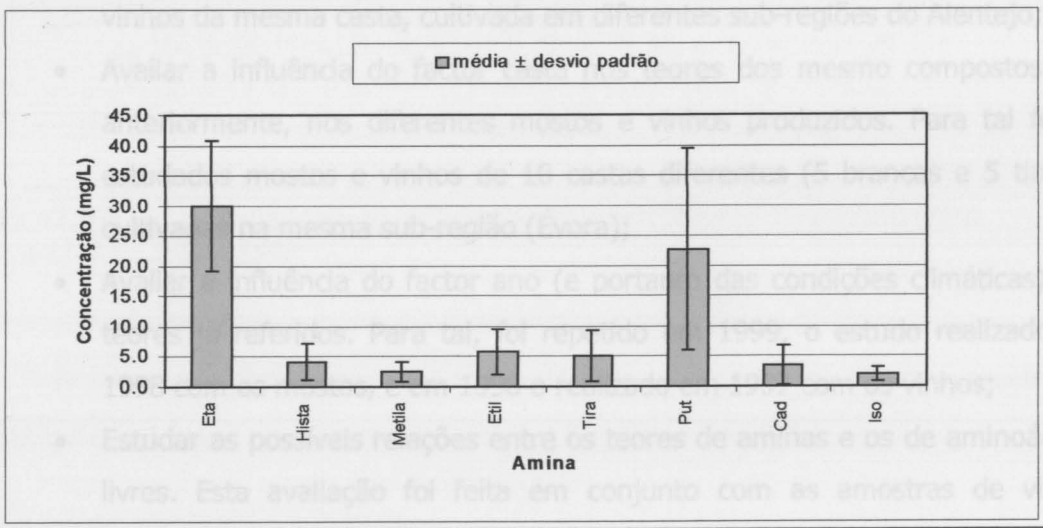



**Figura 41.** Teores médios de cada amina presente nos 37 vinhos tintos comerciais de 1997.

No geral, as concentrações de aminas biogénicas e voláteis podem comparar-se em grandeza, com aquelas que têm sido reportadas na literatura (*vide* tabela 3). Tal

como se tem verificado noutros trabalhos, os vinhos tintos têm tendência para apresentarem teores de aminas superiores aos dos brancos.

Os teores de aminas biogénicas encontrados nas 67 amostras de vinhos comerciais estudados, podem ser considerados baixos, especialmente se os compararmos com os normalmente encontrados em certos alimentos, muitas vezes mais de 10 vezes superiores [39; 94].

### 3.2.3 Teores de aminoácidos livres e aminas nos mostos e vinhos monovarietais

Os dados obtidos na determinação dos teores de aminoácidos livres e aminas nas diversas amostras de mostos monovarietais de 1998 e 1999, encontram-se na sua totalidade apresentados nas tabelas C5 e C6, e C17 e C18, respectivamente para aminoácidos livres e aminas. Os dados referentes aos vinhos monovarietais de 1997 e 1998 são apresentados nas tabelas B5 a B8.

Os objectivos que se pretenderam atingir com a análise destas amostras, foram:

- Avaliar a influência do factor sub-região nos teores de aminoácidos livres e aminas dos diferentes mostos e vinhos. Para tal foram estudados mostos e vinhos da mesma casta, cultivada em diferentes sub-regiões do Alentejo;
- Avaliar a influência do factor casta nos teores dos mesmo compostos que anteriormente, nos diferentes mostos e vinhos produzidos. Para tal foram estudados mostos e vinhos de 10 castas diferentes (5 brancas e 5 tintas), cultivadas na mesma sub-região (Évora);
- Avaliar a influência do factor ano (e portanto das condições climáticas) nos teores já referidos. Para tal, foi repetido em 1999, o estudo realizado em 1998 com os mostos, e em 1998 o realizado em 1997 com os vinhos;
- Estudar as possíveis relações entre os teores de aminas e os de aminoácidos livres. Esta avaliação foi feita em conjunto com as amostras de vinhos comerciais.

Numa primeira abordagem, e por conveniência da proximidade com a análise efectuada como os vinhos comerciais, fizemos a análise dos teores médios de aminoácidos livres e aminas nos vinhos monovarietais, produzidos por microvinificação. Mais à frente serão analisados os resultados obtidos com as amostras de mostos.

### 3.2.3.1 Vinhos monovarietais de 1997 e 1998

Nas figuras 42 e 43 estão representadas as médias dos teores de aminoácidos assimiláveis nos 38 vinhos monovarietais de 1997 e 1998. Nestas figuras podemos constatar que, no geral, os teores médios dos aminoácidos livres existentes nos vinhos monovarietais são muito idênticos aos encontrados nos vinhos comerciais (figuras 36 e 37). Tal como acontecia nos vinhos comerciais, os vinhos brancos monovarietais apresentam teores médios de aminoácidos livres superiores aos dos tintos.

Os aminoácidos majoritários (sem considerar a prolina) encontrados nos vinhos monovarietais brancos (figura 42) foram a arginina, a alanina, e o ácido γ-aminobutírico (nos brancos comerciais foram a arginina, a fenilalanina, a lisina e o ácido γ-aminobutírico).

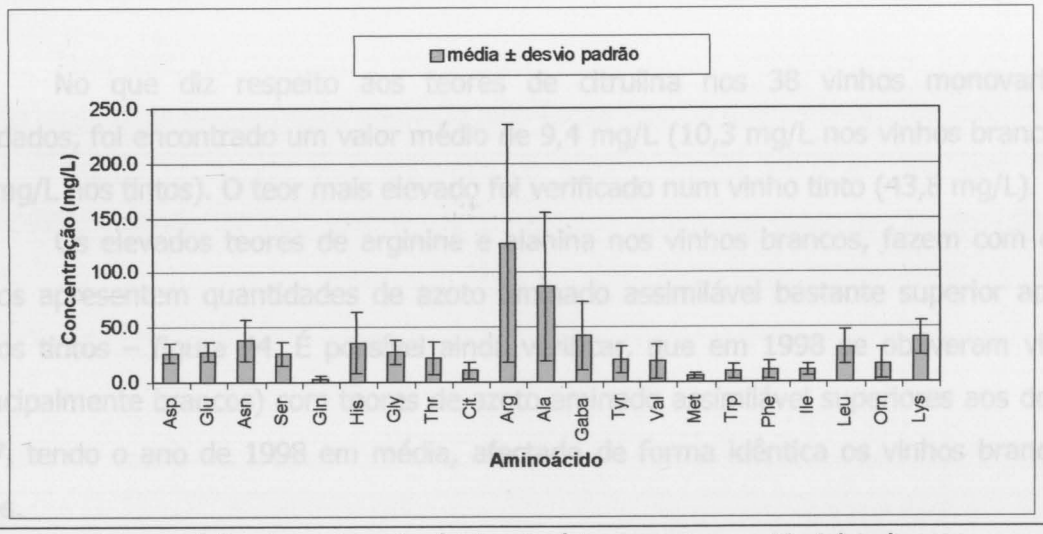



**Figura 42.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 19 vinhos brancos monovarietais de 1997 e 1998.

Nos vinhos tintos (figura 43), os aminoácidos majoritários foram a arginina, a alanina e a lisina (nos tintos comerciais foram a arginina e a lisina).

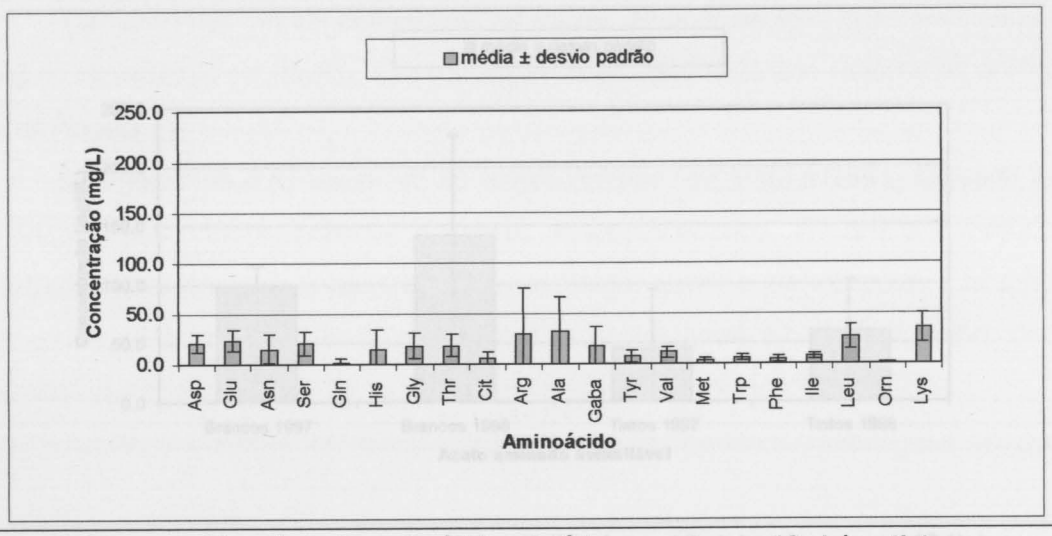



**Figura 43.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 19 vinhos tintos monovarietais de 1997 e 1998.

No que diz respeito aos teores de citrulina nos 38 vinhos monovarietais estudados, foi encontrado um valor médio de 9,4 mg/L (10,3 mg/L nos vinhos brancos, e 8,5 mg/L nos tintos). O teor mais elevado foi verificado num vinho tinto (43,8 mg/L).

Os elevados teores de arginina e alanina nos vinhos brancos, fazem com estes vinhos apresentem quantidades de azoto aminado assimilável bastante superior ao dos vinhos tintos – figura 44. É possível ainda verificar, que em 1998 se obtiveram vinhos (principalmente brancos) com teores de azoto aminado assimilável superiores aos dos de 1997, tendo o ano de 1998 em média, afectado de forma idêntica os vinhos brancos e tintos.

Como foi verificado nos vinhos comerciais, os teores de azoto aminado assimilável dos vinhos brancos monovarietais é cerca do dobro do dos vinhos tintos.

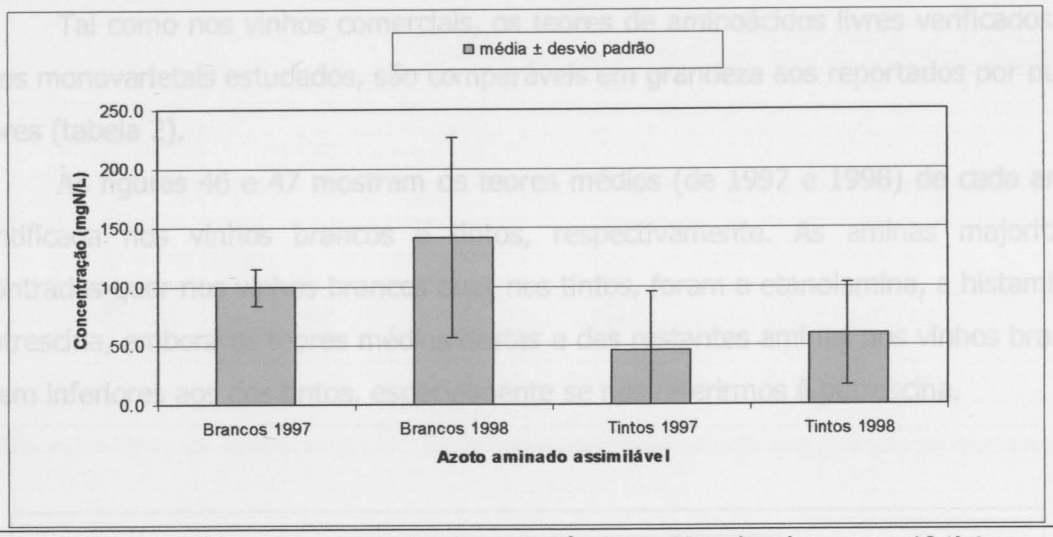



**Figura 44.** Teores médios de azoto aminado assimilável nos 19 vinhos brancos e 19 tintos monovarietais de 1997 e 1998.

Mais uma vez também, o teor médio de prolina nos vinhos brancos foi em média inferior aos dos tintos, e menos afectado pelo factor ano do que os restantes aminoácidos livres – figura 45, tendo sido encontrados valores muito idênticos aos dos vinhos comerciais, e sendo também este o aminoácido majoritário no conjunto dos aminoácidos totais.

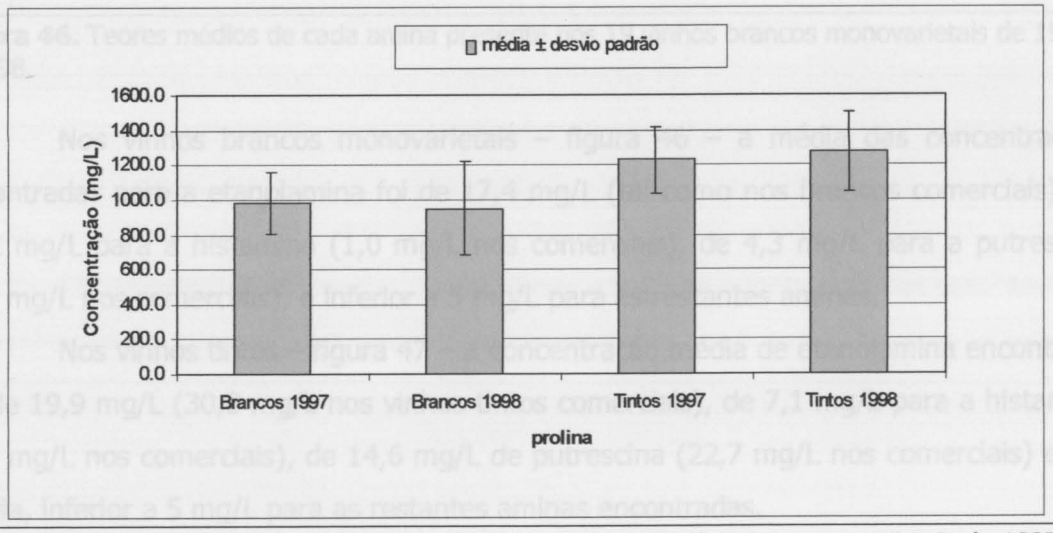



**Figura 45.** Teores médios de prolina nos 19 vinhos brancos e 19 tintos monovarietais de 1997 e 1998.

Tal como nos vinhos comerciais, os teores de aminoácidos livres verificados nos vinhos monovarietais estudados, são comparáveis em grandeza aos reportados por outros autores (tabela 2).

As figuras 46 e 47 mostram os teores médios (de 1997 e 1998) de cada amina quantificada nos vinhos brancos e tintos, respectivamente. As aminas majoritárias encontradas quer nos vinhos brancos quer nos tintos, foram a etanolamina, a histamina e a putrescina, embora os teores médios destas e das restantes aminas nos vinhos brancos fossem inferiores aos dos tintos, especialmente se nos referirmos à putrescina.

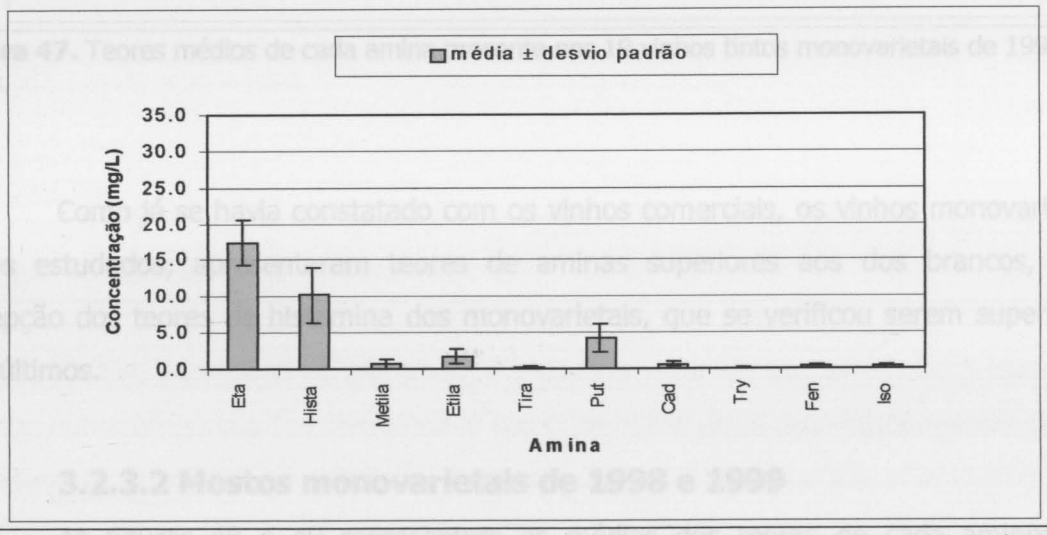



**Figura 46.** Teores médios de cada amina presente nos 19 vinhos brancos monovarietais de 1997 e 1998.

Nos vinhos brancos monovarietais – figura 46 – a média das concentrações encontradas para a etanolamina foi de 17,4 mg/L (tal como nos brancos comerciais), de 10,2 mg/L para a histamina (1,0 mg/L nos comerciais), de 4,3 mg/L para a putrescina (9,3 mg/L nos comerciais), e inferior a 5 mg/L para as restantes aminas.

Nos vinhos tintos – figura 47 – a concentração média de etanolamina encontrada foi de 19,9 mg/L (30,0 mg/L nos vinhos tintos comerciais), de 7,1 mg/L para a histamina (4,2 mg/L nos comerciais), de 14,6 mg/L de putrescina (22,7 mg/L nos comerciais) e em média, inferior a 5 mg/L para as restantes aminas encontradas.

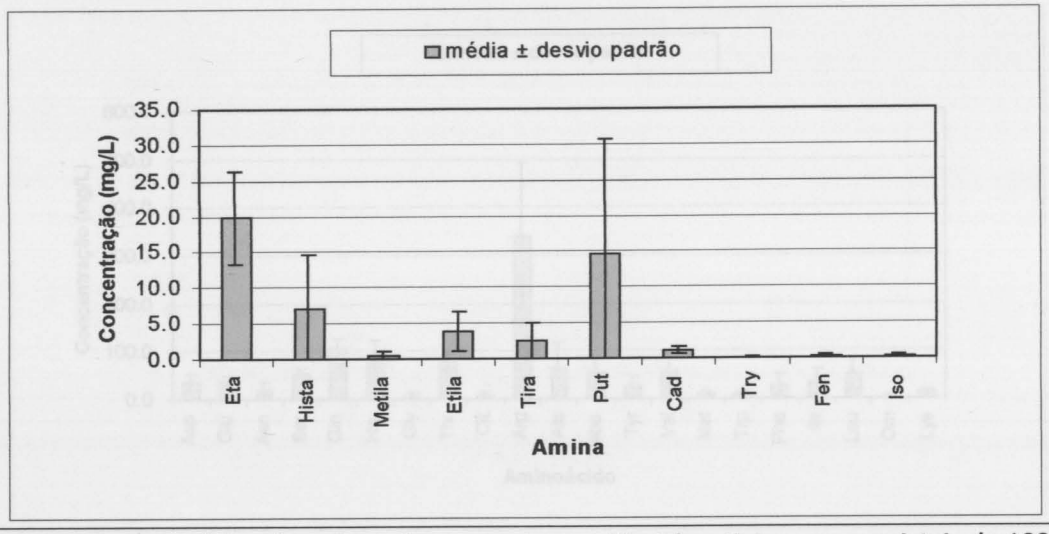



**Figura 47.** Teores médios de cada amina presente nos 19 vinhos tintos monovarietais de 1997 e 1998.

Como já se havia constatado com os vinhos comerciais, os vinhos monovarietais tintos estudados, apresentaram teores de aminas superiores aos dos brancos, com excepção dos teores de histamina dos monovarietais, que se verificou serem superiores nos últimos.

### 3.2.3.2 Mostos monovarietais de 1998 e 1999

As figuras 48 e 49 representam as médias dos teores de cada aminoácido assimilável quantificado nos mostos brancos e tintos de 1998 e 1999, respectivamente. Verifica-se que o aminoácido predominante é a arginina, tanto nos mostos brancos como nos tintos, havendo também em alguns casos, quantidades importantes de glutamina, histidina, treonina e alanina.

Em média, e tal como se verificou para os vinhos, os mostos brancos apresentaram-se mais ricos em aminoácidos livres do que os tintos.

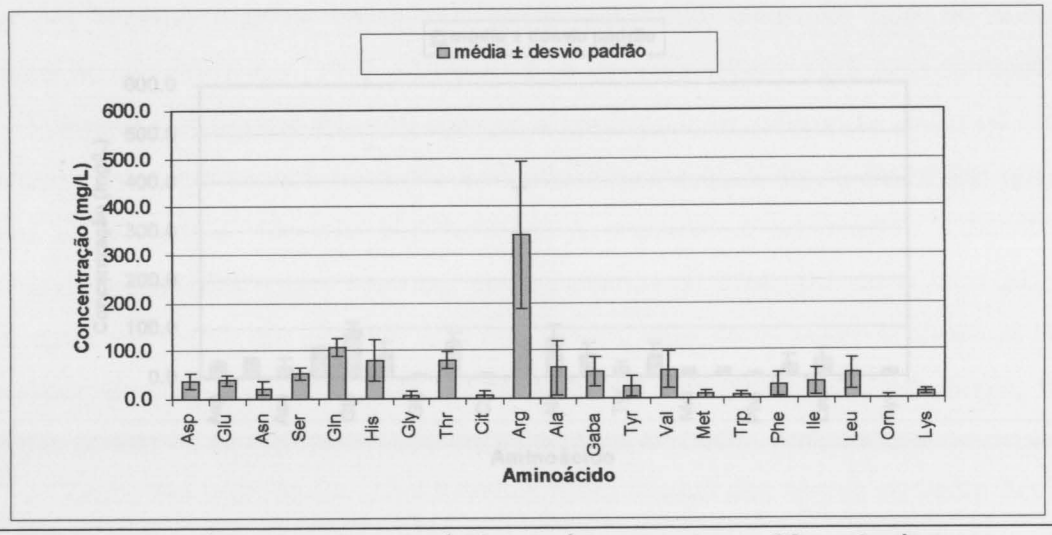



**Figura 48.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 20 mostos brancos monovarietais de 1998 e 1999.

É possível ainda verificar que nos mostos não existem praticamente citrulina e ornitina, em oposição aos vinhos, onde estes aminoácidos aparecem certamente como consequência do metabolismo levuriano e bacteriano. O mesmo se pode afirmar em relação à lisina, e em parte ao glutamato e à alanina, uma vez que estes não existem nos mostos numa proporção tão considerável como na maior parte dos vinhos. Ao estudarem a autólise de leveduras em condições próximas das enológicas, Lurton *et al* (1989) [167] verificaram que a libertação, por proteólise, do conteúdo azotado das leveduras era directamente dependente do pH, sendo que a pH=5 quase 60 % do azoto era libertado sob a forma de glutamato, alanina e lisina. Também Martínez-Rodríguez e Polo (2000) [172], verificaram que 50 % dos aminoácidos livres libertados durante a autólise de leveduras num meio modelo, eram alanina, Gaba, fenilalanina, leucina e glutamato.

Quando ausente dos mostos ou existente em pequenas quantidades, a alanina pode ser produzida, consoante as necessidades, a partir de outros aminoácidos no decorrer da fermentação alcoólica. Usseglio-Tomasset e Bosia (1990) [278] verificaram que, durante a fermentação de mostos brancos, a maior parte da alanina existente nos vinhos obtidos foi produzida durante a fermentação e se encontrava incorporada em péptidos. O glutamato, é um intermediário importante no metabolismo de muitos aminoácidos, quer nas vias anabólicas quer nas catabólicas, verificando-se um aumento importante dos seus níveis, independentemente da fonte de azoto disponível para o crescimento das leveduras [293].

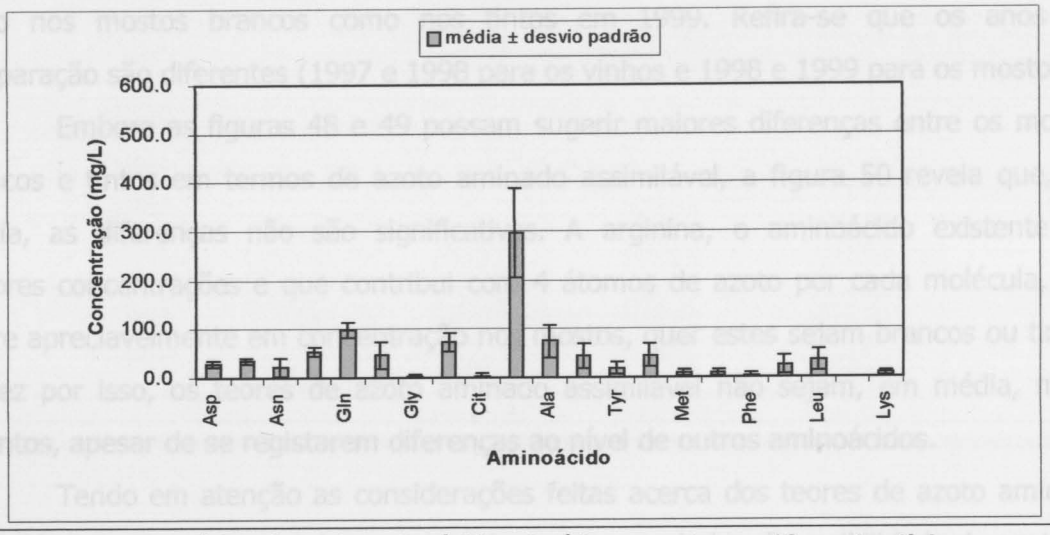



**Figura 49.** Teores médios de cada aminoácido primário presente nos 19 mostos tintos monovarietais de 1998 e 1999.

Em termos de azoto aminado assimilável, os mostos estudados apresentaram quantidades consideradas como suficientes (e excedentárias) para a realização da fermentação alcoólica (figura 50).

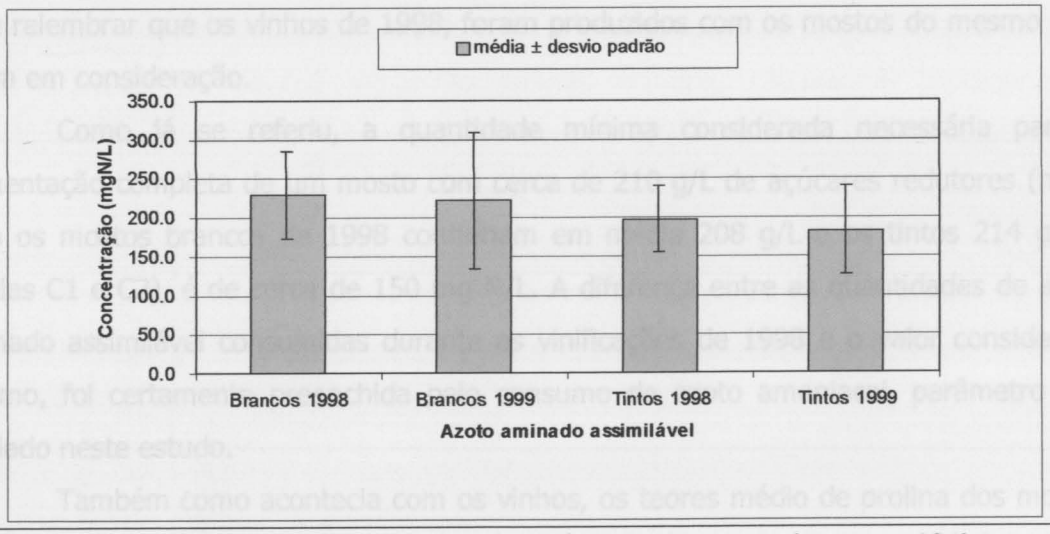



**Figura 50.** Teores médios de azoto aminado assimilável nos 20 mostos brancos e 19 tintos monovarietais de 1998 e 1999.

Parece que o factor ano não afectou de forma tão marcante como nos vinhos, os teores de azoto aminado assimilável dos mostos, embora se registem médias inferiores

tanto nos mostos brancos como nos tintos em 1999. Refira-se que os anos em comparação são diferentes (1997 e 1998 para os vinhos e 1998 e 1999 para os mostos).

Embora as figuras 48 e 49 possam sugerir maiores diferenças entre os mostos brancos e tintos em termos de azoto aminado assimilável, a figura 50 revela que, em média, as diferenças não são significativas. A arginina, o aminoácido existente em maiores concentrações e que contribui com 4 átomos de azoto por cada molécula, não difere apreciavelmente em concentração nos mostos, quer estes sejam brancos ou tintos. Talvez por isso, os teores de azoto aminado assimilável não sejam, em média, muito distintos, apesar de se registarem diferenças ao nível de outros aminoácidos.

Tendo em atenção as considerações feitas acerca dos teores de azoto aminado assimilável verificado nos vinhos comerciais, e que uma baixa disponibilidade de azoto na vinha para as castas tintas pode ser um factor de qualidade, ao contrário das brancas [280], a comparação dos teores de azoto aminado assimilável dos mostos e vinhos brancos e tintos de 1998, indicam um consumo de respectivamente 87 mg N/L e 138 mg N/L, o que corresponde respectivamente a 38 % e 70 % da quantidade existente inicialmente nos mostos, pelo que seria interessante estudar a relação entre os teores verificados nos mostos e a qualidade dos vinhos produzidos, nomeadamente em termos de análise sensorial, no sentido de se optimizarem as cargas de azoto aplicadas na vinha. É de relembrar que os vinhos de 1998, foram produzidos com os mostos do mesmo ano, agora em consideração.

Como já se referiu, a quantidade mínima considerada necessária para a fermentação completa de um mosto com cerca de 210 g/L de açúcares redutores (neste caso os mostos brancos de 1998 continham em média 208 g/L e os tintos 214 g/L – tabelas C1 e C2), é de cerca de 150 mg N/L. A diferença entre as quantidades de azoto aminado assimilável consumidas durante as vinificações de 1998 e o valor considerado mínimo, foi certamente preenchida pelo consumo de azoto amoniacal, parâmetro não avaliado neste estudo.

Também como acontecia com os vinhos, os teores médio de prolina dos mostos tintos são superiores aos dos brancos (figura 51), tendo sido verificada uma diminuição nos seus teores médios, de 1998 para 1999.

Também nos mostos, a prolina é por norma o aminoácido mais abundante.

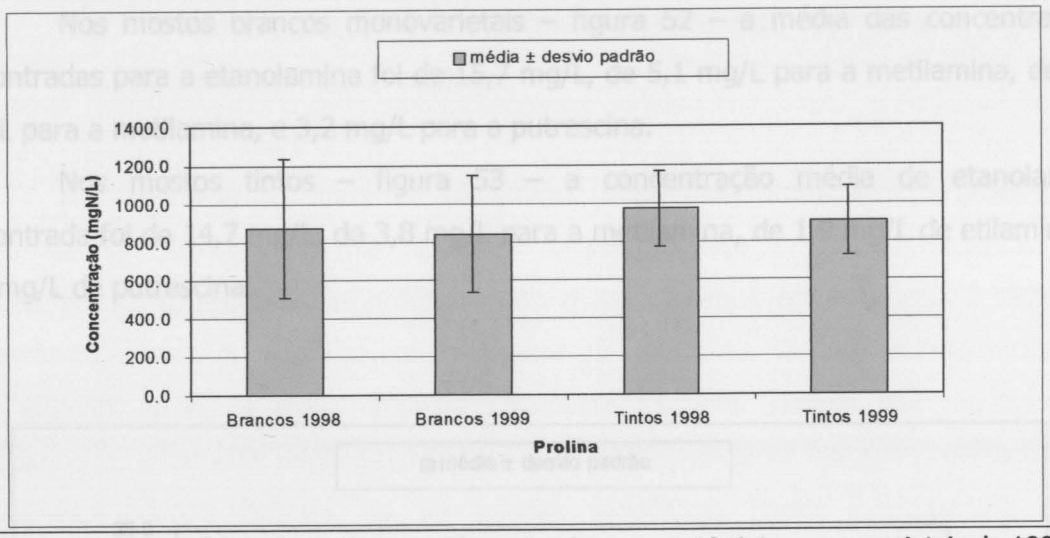



**Figura 51.** Teores médios de prolina nos 20 mostos brancos e 19 tintos monovarietais de 1998 e 1998.

As figuras 52 e 53, mostram os teores médios (de 1998 e 1999) de cada amina quantificada nos mostos brancos e tintos, respectivamente. As aminas majoritárias encontradas quer nos mostos brancos quer nos tintos foram a etanolamina, a metilamina, a etilamina (todas estas, aminas voláteis) e a putrescina. Os mostos não apresentaram grandes diferenças entre brancos e tintos, relativamente ao teor de aminas.

Nos mostos brancos no entanto não foi encontrada histamina, enquanto que nos tintos a média foi de 0,2 mg/L. As aminas tiramina, cadaverina, triptamina, β-feniletilamina e isoamilamina não se encontraram na maior parte dos mostos estudados.

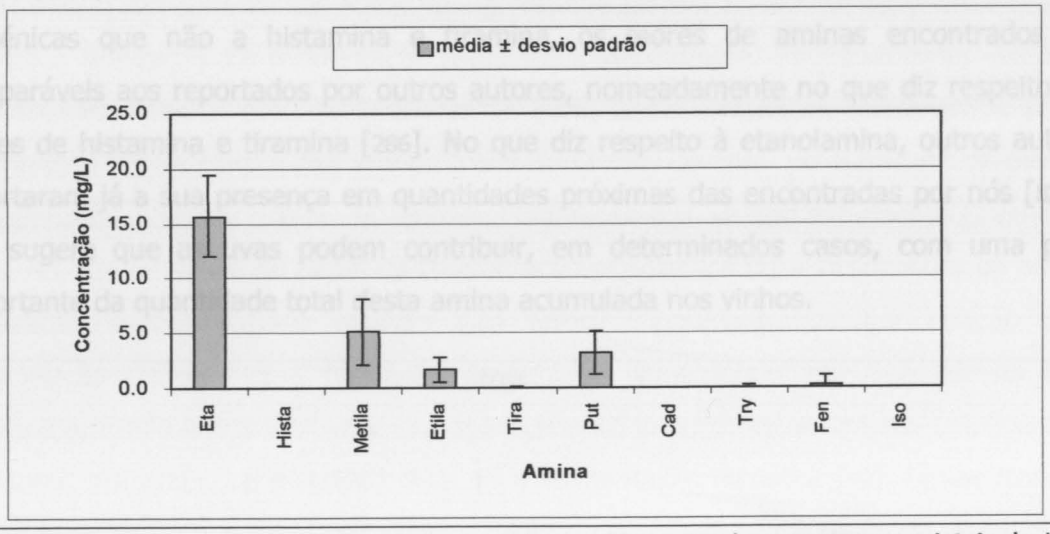



**Figura 52.** Teores médios de cada amina presente nos 20 mostos brancos monovarietais de 1998 e 1999.

Nos mostos brancos monovarietais – figura 52 – a média das concentrações encontradas para a etanolamina foi de 15,7 mg/L, de 5,1 mg/L para a metilamina, de 1,7 mg/L para a metilamina, e 3,2 mg/L para a putrescina.

Nos mostos tintos – figura 53 – a concentração média de etanolamina encontrada foi de 14,7 mg/L, de 3,8 mg/L para a metilamina, de 1,9 mg/L de etilamina, e 4,1 mg/L de putrescina.

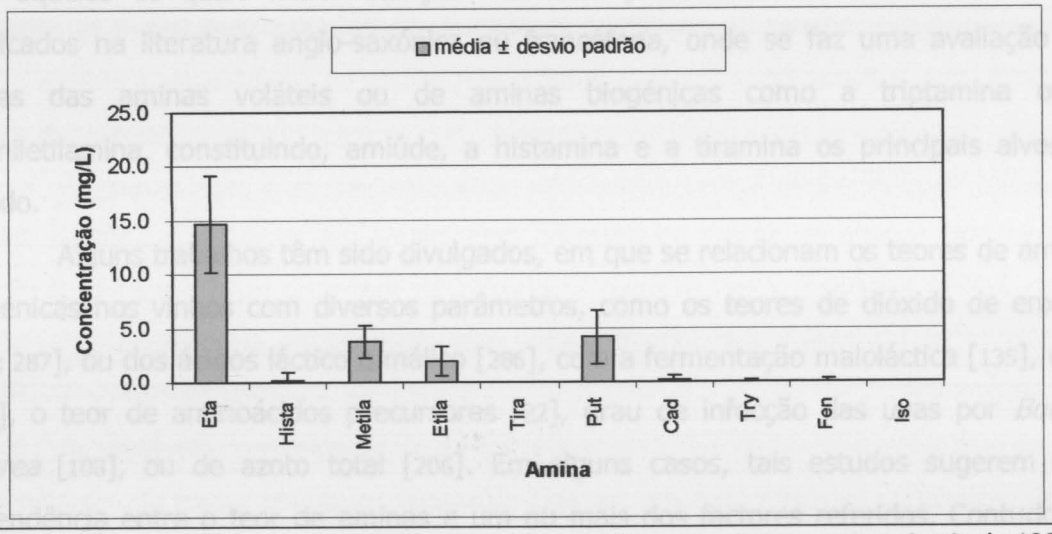



**Figura 53.** Teores médios de cada amina presente nos 19 mostos tintos monovarietais de 1998 e 1999.

Apesar de não existirem muitos dados publicados sobre os teores de aminas em mostos, especialmente se nos referirmos às aminas voláteis e às outras aminas biogénicas que não a histamina e tiramina, os teores de aminas encontrados são comparáveis aos reportados por outros autores, nomeadamente no que diz respeito aos teores de histamina e tiramina [286]. No que diz respeito à etanolamina, outros autores reportaram já a sua presença em quantidades próximas das encontradas por nós [82], o que sugere que as uvas podem contribuir, em determinados casos, com uma parte importante da quantidade total desta amina acumulada nos vinhos.

### 3.2.4 Relação entre o teor de aminoácidos livres e o teor de aminas, de mostos e vinhos

Até ao presente, mais de 25 aminas diferentes foram já reportadas como existentes nos vinhos [158], não estando, todavia, elucidadas por completo as suas origens ou as condições que proporcionam o seu aparecimento. Devido à diferente importância relativa que cada grupo de aminas apresenta nos vinhos, as biogénicas têm sido aquelas às quais maior atenção tem sido prestada. Poucos são os trabalhos publicados na literatura anglo-saxónica ou francófona, onde se faz uma avaliação dos teores das aminas voláteis ou de aminas biogénicas como a triptamina ou a β-feniletilamina, constituindo, amiúde, a histamina e a tiramina os principais alvos de estudo.

Alguns trabalhos têm sido divulgados, em que se relacionam os teores de aminas biogénicas nos vinhos com diversos parâmetros, como os teores de dióxido de enxofre [237; 287], ou dos ácidos láctico e málico [286], com a fermentação maloláctica [135], o pH [296], o teor de aminoácidos precursores [22], grau de infecção das uvas por *Botrytis cinerea* [108], ou de azoto total [206]. Em alguns casos, tais estudos sugerem uma dependência entre o teor de aminas e um ou mais dos factores referidos. Contudo, há entre eles outros que apontam aparentemente em direcções diferentes.

No que se refere às origens das aminas, alguns dos trabalhos já reportados indicam a fermentação maloláctica como o processo onde a maior parte das aminas se formam, incluindo a histamina e a tiramina [4; 287]. Num importante trabalho, Soufleros *et al* (1998) [255] referem um aumento significativo do teor de aminas biogénicas durante e após a realização da fermentação maloláctica espontânea. Foi igualmente verificada uma relação entre o teor de aminoácidos livres e de compostos relacionados com a proliferação bacteriológica nos vinhos (caso do lactato de etilo, do succinato de dietilo e da γ-butirolactona), e o teor de aminas biogénicas dos vinhos estudados. Contudo, e ainda no que se refere ao papel da fermentação maloláctica no aparecimento de aminas biogénicas, outros autores referem não terem encontrado qualquer relação entre fermentação maloláctica e formação de aminas biogénicas como a histamina ou a putrescina, tendo antes verificado um aparecimento importante de aminas (etanolamina, agmatina, putrescina, e tiramina) durante a fermentação alcoólica [42]. Nesse trabalho, descreve-se ainda o aumento da concentração de tiramina e diminuição da de histamina durante a fermentação maloláctica, enquanto que num outro, os autores referem a

diminuição da concentração das duas aminas durante o processo de alteração microbiológica de alguns vinhos [288].

Parece evidente que tanto as leveduras como as bactérias lácticas são capazes de produzir aminas durante os processos fermentativos que conduzem, dependendo a quantidade acumulada da amina em causa, e das condições em que tais processos decorrem.

Uma vez que os aminoácidos assimiláveis constituem, regra geral, a principal fonte de azoto quer das leveduras quer das bactérias lácticas, condicionando por conseguinte o seu desenvolvimento, decidimos investigar se existem relações entre os teores destes compostos e os teores de aminas voláteis e biogénicas, nos mostos e vinhos estudados.

Por outro lado, e já que possuímos informação acerca de parâmetros relativos à análise sumária dos vinhos em causa, com os quais os teores de aminas podem estar relacionados (como o pH ou o teor de dióxido de enxofre livre), incluímos também estas variáveis na análise que efectuamos, com vista a pesquisar a existência de correlações importantes entre as variáveis em causa.

As variáveis com mais interesse investigar serão certamente aquelas que se sabe influenciarem de forma directa os teores de aminas, em determinadas condições. Dentre todas as variáveis consideradas, as que podem apresentar uma relação mais directa com o teor de aminas são:

- As que influenciam ou dependem do tipo de microorganismos que se desenvolvem durante a produção dos vinhos. São elas o teor de dióxido de enxofre livre e total, o pH, a acidez volátil, e de certa forma o teor de azoto aminado assimilável;
- As que influenciam directamente a quantidade de aminas produzidas por um determinado microorganismo. Das variáveis avaliadas por nós, possuem esta capacidade os aminoácidos precursores de cada amina.

As amostras foram consideradas em grupos separados, em que se consideraram os vinhos monovarietais provenientes das microvinificações de 1997 e 1998 no GRUPO I (GI), os vinhos comerciais de 1997 no GRUPO II (GII), e os mostos de 1998 num outro conjunto denominado GRUPO III (GIII). Os mostos incluídos no GIII são os que originaram os vinhos monovarietais de 1998.

O primeiro conjunto de resultados – GI – foi utilizado para procurar relações entre as variáveis consideradas importantes e os teores de aminas nesses vinhos. As

características da obtenção destes vinhos (por microvinificação), em que muitos dos parâmetros tecnológicos foram idênticos para todos os vinhos e, na sua maior parte, conhecidos, diminuem a variabilidade que a esses factores pode estar associada, e facilita o reconhecimento de padrões. A existir qualquer relação entre os factores em causa nos vinhos, ela será mais evidente neste grupo de amostras.

O segundo grupo de amostras – GII – foi utilizado para avaliar até que ponto os resultados obtidos com o GI, podiam ser estendidos a um grupo de amostras muito mais heterogéneo, o dos vinhos comerciais.

Os resultados do GIII, permitiram a procura de relações entre os teores de aminoácidos livres nos mostos, e os teores de aminas dos respectivos vinhos.

### 3.2.4.1 Relação entre o teor de aminoácidos livres e o teor de aminas nos vinhos monovarietais de 1997 e 1998 – GI

Numa primeira análise, fomos verificar se existia alguma fonte de variabilidade nos vinhos em causa, nomeadamente associada ao factor cor e ano. Para tal, efectuamos uma análise de variância para cada uma das variáveis que resolvemos considerar dependentes, isto é, para cada uma das aminas individuais e para o somatório das aminas biogénicas e das aminas totais. Os resultados são apresentados na tabela 14.

**Tabela 14.** Análise de variância para os teores de aminas nos vinhos monovarietais – GI.

| Fonte de variabilidade | eta | | hta | | mtl | | etl | | tir | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F | p | F | p | F | p | F | p | F | p |
| COR | | | | | | | 10,54 | 0,0026 | 17,06 | 0,0002 |
| ANO | | | | | | | | | 13,86 | 0,0007 |
| **Fonte de variabilidade** | **put** | | **cad** | | **fen** | | **abi** | | **ato** | |
| | F | p | F | p | F | p | F | p | F | p |
| COR | 7,46 | 0,0099 | 21,14 | 0,0001 | | | 3,68 | 0,0635 | 3,97 | 0,0544 |
| ANO | | | | | 7,38 | 0,0103 | | | | |

Legenda: eta – etanolamina; hta – histamina, mtl – metilamina; etl – etilamina; tir – tiramina; put – putrescina; cad – cadaverina; fen – β-feniletilamina; abi – aminas biogénicas totais; ato – aminas totais.

Nota: as aminas triptamina e isoamilamina não se encontraram nas amostras em causa; apenas se apresentam os resultados com $p<0,1$.

Os resultados obtidos, indicam que o factor COR afectou de forma muito significativa ($p<0,01$) as variáveis etilamina e putrescina, de forma altamente significativa ($p<0,001$) a tiramina e a cadaverina e, pode dizer-se, de forma significativa uma vez que os valores de p são bastante baixos, as variáveis aminas biogénicas totais e aminas totais.

O factor ANO, parece influenciar apenas a tiramina de forma altamente significativa, e a β-feniletilamina, esta de forma significativa.

Assim, na pesquisa de relações entre as variáveis analíticas e os teores de aminas dos vinhos, o grupo inicial de vinhos foi dividido em brancos e tintos para as variáveis etl, put, tir, cad, abi e ato, sendo considerado no seu conjunto para as restantes variáveis.

As variáveis consideradas com possível influência nos teores de aminas dos vinhos são os aminoácidos precursores de cada uma das aminas, as variáveis globais aminoácidos assimiláveis totais e aminoácidos aminogénicos totais, e as variáveis da análise sumária, teor de dióxido de enxofre livre e total e pH.

Na tabela 15 estão representados os resultados obtidos com as análises de regressão linear efectuadas para os vinhos monovarietais de 1997 e 1998.

Os resultados obtidos nestas análises, indicam que a amina cujo teor dependeu de forma mais directa da concentração do seu precursor (neste caso percursores, a arginina e a ornitina) foi a putrescina, com um coeficiente de correlação igual a 0,752 e de forma altamente significativa ($p<0,001$). No entanto, isso só se verificou em relação à arginina. Os aminoácidos assimiláveis totais e os aminoácidos aminogénicos totais, estão altamente correlacionados, e como os teores de putrescina se correlacionam melhor com as duas últimas variáveis do que com a arginina (tabela 15), não se pode excluir a hipótese de a correlação verificada com o seu precursor se dever ao facto de a arginina constituir o principal contribuinte para essas duas variáveis.

Outra amina cujos teores parecem depender de forma altamente significativa dos teores do seu precursor (fenilalanina) existentes nos vinhos, é a β-feniletilamina, com um coeficiente de correlação de 0,640. A formação das restantes aminas não dependeu de forma muito directa da concentração do seu precursor, especialmente a tiramina (percursor - tirosina) e a cadaverina (percursor – lisina).

No que diz respeito à putrescina, estes resultados concordam com os de Bauza *et al* (1995) [22], que verificaram uma dependência significativa entre os teores de putrescina e os dos seus precursores nos vinhos. No entanto estes autores não verificaram qualquer dependência entre os teores de β-feniletilamina, histamina ou tiramina e as dos seus precursores.

**Tabela 15.** Coeficientes de correlação e significância das regressões lineares efectuadas com os vinhos monovarietais – GI.

| Variável | | eta | | hta | | mtl | | etl | | tir | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | R | p | R | p | R | p | R | p | R | p |
| precursor | B | 0,522 | 0,0009 | 0,454 | 0,0048 | 0,470 | 0,0033 | | | | |
| | T | | | | | | | 0,522 | 0,0262 | | |
| ass | B | 0,375 | 0,0222 | 0,502 | 0,0016 | 0,542 | 0,0005 | | | | |
| | T | | | | | | | 0,710 | 0,0010 | 0,474 | 0,0472 |
| aam | B | | | 0,455 | 0,0047 | 0,5025 | 0,0015 | | | | |
| | T | | | | | | | 0,492 | 0,0379 | | |
| sot | B | | | | | | | 0,474 | 0,0403 | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| sol | B | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| acv | B | 0,337 | 0,0415 | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | 0,524 | 0,0255 |
| pH | B | 0,361 | 0,0280 | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | 0,4827 | 0,0425 |
| **Variável** | | **put** | | **cad** | | **fen** | | **abi** | | **ato** | |
| | | R | p | R | p | R | p | R | p | R | p |
| precursor | B | | | | | 0,640 | 0,0000 | | | | |
| | T | 0,752[a] | 0,0003 | | | | | | | | |
| ass | B | | | | | | | 0,683 | 0,0013 | 0,775 | 0,0001 |
| | T | 0,893 | 0,0000 | | | | | 0,885 | 0,0000 | 0,907 | 0,0000 |
| aam | B | | | | | | | 0,635 | 0,0035 | 0,759 | 0,0002 |
| | T | 0,864 | 0,0000 | | | | | 0,848 | 0,0000 | 0,824 | 0,0000 |
| sot | B | | | 0,502 | 0,0284 | | | | | | |
| | T | | | 0,542 | 0,0202 | | | | | | |
| sol | B | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| acv | B | | | | | | | | | | |
| | T | 0,731 | 0,0006 | | | | | 0,622 | 0,0058 | 0,554 | 0,0171 |
| pH | B | | | | | -0,399 | 0,0144 | | | | |
| | T | 0,760 | 0,0003 | | | | | 0,591 | 0,0097 | 0,518 | 0,0275 |

Legenda: eta – etanolamina; hta – histamina, mtl – metilamina; etl – etilamina; tir – tiramina; put – putrescina; cad – cadaverina; fen – β-feniletilamina; abi – aminas biogénicas totais; ato – aminas totais; [a]- apenas para a arginina; B – vinhos brancos; T – vinhos tintos; ass – aminoácidos livres assimiláveis; aam – aminoácidos aminogénicos; sot – dióxido de enxofre total; sol – dióxido de enxofre livre; acv – acidez volátil.

Nota: as aminas triptamina e isoamilamina não se encontraram nas amostras em causa; apenas se apresentam os resultados com $p<0,05$.

Atendendo ao baixos níveis de aminas normalmente encontradas nos vinhos, e às quantidades dos respectivos precursores que, no geral, ainda existem quase todos em alguma quantidade nos vinhos, estes resultados sugerem que a disponibilidade do aminoácido precursor, apenas afectará a formação da respectiva amina em determinado grau e circunstâncias. Voltaremos a este assunto no decorrer desta análise.

Outro facto a realçar, é o de não se terem verificado correlações significativas entre os teores de dióxido de enxofre total e livre e os das aminas, para quase a totalidade dos casos. As únicas correlações significativas foram encontradas entre o teor de dióxido de enxofre total e os teores de etilamina nos vinhos brancos, e os teores de

cadaverina tanto em brancos como em tintos. Alguns autores [237; 286; 287] verificaram uma relação negativa entre os teores de dióxido de enxofre total de vinhos tintos e os teores de tiramina, e de histamina em alguns casos, concluindo que altos teores de dióxido de enxofre inibiriam selectivamente o desenvolvimento de microorganismos produtores. Não obstante, dentre esses autores, uns houve que num trabalho posterior [288], em que foi estudada a evolução dos teores de histamina e tiramina durante a alteração microbiológica de vinhos a várias temperaturas, não encontraram qualquer relação entre o teor de dióxido de enxofre e os níveis daquelas aminas.

No caso presente, os resultados sugerem exactamente o contrário em relação à formação da etilamina e cadaverina. Isto é, sugerem uma relação positiva. Apesar da baixa significância das correlações e dos baixos coeficientes, o agora verificado pode justificar-se pela inibição selectiva das bactérias *Oenococcus* (consideradas como menores produtoras de aminas e menos tolerantes ao dióxido de enxofre) relativamente às *Pediococcus* e *Lactobacillus* (consideradas normalmente com maior capacidade de produção de aminas e mais resistentes ao $SO_2$).

No que diz respeito à acidez volátil (parâmetro normalmente relacionado o tipo de microorganismo e as suas condições de proliferação nos vinhos, aumentando quase sempre com o aumento da proliferação bacteriana), também os nossos resultados diferem em parte dos encontrados por alguns outros autores. Não encontramos qualquer relação entre a acidez volátil e os teores de histamina, ao contrário do descrito por Vidal-Carou *et al* em 1990 [287], mas de acordo com os resultados que apresentaram posteriormente em 1991 [288], onde não verificaram também qualquer relação entre o teor de histamina e o de acidez volátil. Ainda os mesmos autores, no trabalho publicado em 1990, reportaram a relação encontrada entre os teores de tiramina (e de histamina) e a acidez volátil de vinhos brancos e rosé, mas não dos tintos. Com as excepções da etanolamina, da histamina e da metilamina (onde a análise envolveu vinhos brancos e tintos), as correlações encontradas por nós foram sempre válidas apenas para os vinhos tintos.

Quanto à influência do pH na quantidade de aminas dos vinhos, os resultados da tabela 15, sugerem que os vinhos com maior pH, têm tendência para apresentarem maior teores de aminas biogénicas e totais, sendo os teores de putrescina os mais correlacionados com esse parâmetro. Há no entanto a excepção da β-feniletilamina, cujos teores parecem diminuir com o aumento do pH, embora o coeficiente de correlação obtido e a sua significância sejam bastante baixos. Cilliers e van Wyk (1985) [54] ao

estudarem vinhos Sul Africanos, verificaram que todos os vinhos com mais de 10 mg/L de histamina tinham pH superior a 3,7. Tal como os teores de dióxido de enxofre, o pH dos vinhos influencia o tipo de bactérias que neles se podem desenvolver. O efeito verificado em alguns casos de baixos teores de certas aminas, em vinhos com baixos valores de pH, pode dever-se à selecção positiva de bactérias *Oenococcus*, em detrimento das *Lactobacillus* e *Pediococcus*, menos resistentes a condições de maior acidez [68; 102].

Por fim, os coeficientes de correlação mais elevados e com maior grau de significância, foram verificados entre as variáveis aminoácidos assimiláveis e aminogénicos e os teores de aminas totais, de aminas biogénicas, e de putrescina. Estes parâmetros parece assumirem maior importância nos vinhos tintos, para os quais os coeficientes de correlação são superiores de forma consistente.

O coeficiente de correlação mais elevado foi obtido para a relação entre o teor total de aminas e o teor de aminoácidos assimiláveis (R= 0,907 para os vinhos tintos e R= 0,775 para os brancos). Este parâmetro parece ser, dos estudados, o mais importante no que respeita à quantidade de aminas existentes nos vinhos – figura 54.

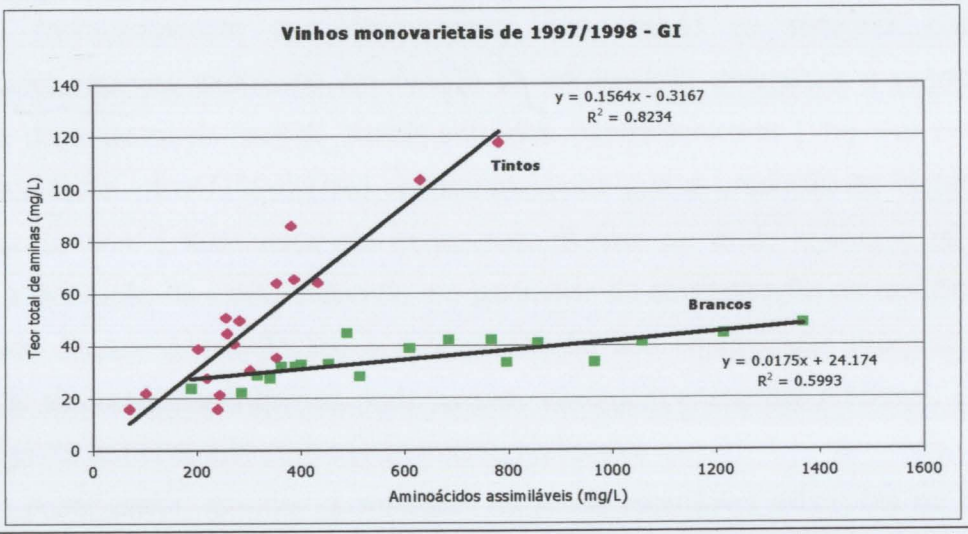



**Figura 54.** Relação entre o teor total de aminas e o de aminoácidos assimiláveis, nos vinhos brancos e tintos monovarietais de 1997/1998 – GI.

O teor de aminoácidos assimiláveis mostrou mesmo ser tanto ou mais importante para a formação das aminas biogénicas (histamina, tiramina, putrescina, cadaverina e β-feniletilamina) do que os teores dos seus precursores, como se pode constatar pelos respectivos coeficientes de correlação – tabela 15. Como já se referiu atrás, é normal

encontrar nos vinhos a maior parte dos precursores das aminas biogénicas consideradas (histidina, tirosina, arginina e ornitina, lisina e fenilalanina), e como tal, não parece ser por falta de disponibilidade dos precursores que os microorganismos produzem menor quantidade das respectivas aminas. No entanto, o alto coeficiente de correlação encontrado para os aminoácidos aminogénicos, deixa antever a importância deste parâmetro pelo menos em determinadas situações.

A grande dependência verificada entre a formação quer das aminas biogénicas quer das voláteis (englobadas nas aminas totais), principalmente nos vinhos tintos, aponta no sentido de ser a maior ou menor disponibilidade de aminoácidos assimiláveis, a determinar em grande parte a quantidade de aminas produzidas.

Pelo menos nas bactérias lácticas, a produção de aminas biogénicas parece ter uma função essencialmente energética. Tal convicção, é fundamentada pelo facto de alguns autores sugerirem que a acumulação de histamina ocorre principalmente como resultado da proliferação bacteriana em meios pobres [152], tendo sido verificada a produção de histamina por parte das bactérias lácticas estudadas apenas em condições de não proliferação, mas não em condições óptimas de crescimento. Assim, a capacidade de produção de aminas biogénicas não será uma característica constante das bactérias lácticas (nomeadamente das *Oenococcus oeni*), sendo os sistemas enzimáticos necessários, apenas expressos em função da composição energética e nutricional do meio, e dependente da fase de crescimento dos microorganismos [159]. Por outro lado, Lounvaud-Funel *et al* (1994) [166] verificaram ainda que a produção de histamina por *Oenococcus oeni* é estimulada em meios sem glucose ou ácido málico, e que nestes casos, a produção da amina depende em particular da concentração da histidina, o seu precursor. Nestas circunstâncias, a descarboxilação dos aminoácidos precursores, com formação das respectivas aminas, pode ter uma vantagem energética adicional, à imagem do que já foi demonstrado para outros microorganismos.

A ser assim, grandes quantidades de azoto assimilável existentes no meio (do qual os aminoácidos assimiláveis constituem, normalmente, a maior parte), podem induzir um crescimento microbiano que mais tarde não pode ser sustentado, por falta de nutrientes. Em consequência, os microorganismos em maior número do que seria normal, entram numa fase de não proliferação, durante a qual podem produzir quantidades importantes de aminas como meio de obtenção adicional de energia metabólica. Nestas condições, a disponibilidade de cada um dos precursores das aminas será determinante para a quantidade acumulada no final. Isto parece ser verdade especialmente para as

bactérias lácticas, uma vez que verificamos (tabela 15) uma dependência muito maior da quantidade de aminoácidos assimiláveis nos vinhos tintos do que nos vinhos brancos onde, regra geral, não ocorreu a fermentação maloláctica.

### 3.2.4.2 Relação entre o teor de aminoácidos livres e o teor de aminas nos vinhos comerciais de 1997 - GII

A utilização nesta fase deste conjunto de dados referentes aos vinhos comerciais, teve como principal objectivo, averiguar até que ponto as relações verificadas para os vinhos produzidos por microvinificação, se podiam estender a um conjunto de vinhos bastante mais heterogéneo do que o primeiro.

Da mesma forma que para os vinhos monovarietais, fomos averiguar se o factor COR influenciou o teor das diferentes aminas, e no seu conjunto, nos vinhos comerciais estudados (neste caso apenas existem amostras de um único ano e como tal o factor ANO não interveio). A tabela 16 contém os resultados da análise de variância efectuada. Com as diferenças de nestes vinhos não se terem detectado as aminas triptamina e β-feniletilamina, enquanto que nos comerciais foi a isoamilamina e a triptamina, e de o factor COR ter influenciado os teores de etanolamina e histamina de uma forma altamente significativa nos vinhos comerciais, a influência desse factor nos restantes parâmetros foi idêntica à registada para os vinhos monovarietais, produzidos por microvinificação.

**Tabela 16.** Análise de variância para os teores de aminas nos vinhos comerciais – GII.

| Fonte de variabilidade | eta | | hta | | mtl | | etl | | tir | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F | p | F | p | F | p | F | p | F | p |
| COR | 22,15 | 0,0000 | 24,71 | 0,0000 | | | 12,38 | 0,0008 | 18,58 | 0,0001 |
| **Fonte de variabilidade** | **put** | | **cad** | | **iso** | | **abi** | | **ato** | |
| | F | p | F | p | F | p | F | p | F | p |
| COR | 20,04 | 0,0000 | | | | | 24,25 | 0,0000 | 29,07 | 0,0000 |

Legenda: eta – etanolamina; hta – histamina, mtl – metilamina; etl – etilamina; tir – tiramina; put – putrescina; cad – cadaverina; iso – isoamilamina; abi – aminas biogénicas totais; ato – aminas totais.

Nota: as aminas triptamina e β-feniletilamina não se encontraram nas amostras em causa; apenas se apresentam os resultados com $p<0,1$.

Na pesquisa de relações entre as variáveis analíticas e os teores de aminas dos vinhos, o grupo inicial de vinhos comerciais foi, portanto, dividido em brancos e tintos

para as variáveis eta, hta, etl, tir, put, abi e ato, sendo considerado no seu conjunto para as restantes variáveis (mtl, cad e iso).

Na tabela 17 apresentam-se as correlações verificadas entre os diversos parâmetros considerados, bem como as respectivas significâncias, sempre que estas se revelaram superiores a 95 %.

**Tabela 17.** Coeficientes de correlação e significância das regressões lineares efectuadas com os vinhos comerciais – GII.

| Variável | | eta | | hta | | mtl | | etl | | tir | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | R | p | R | p | R | p | R | p | R | p |
| precursor | B | 0,511 | 0,0046 | | | 0,636 | 0,0000 | | | | |
| | T | 0,469 | 0,0051 | | | | | | | | |
| ass | B | 0,518 | 0,0040 | | | 0,508 | 0,0000 | 0,491 | 0,0069 | 0,572 | 0,0012 |
| | T | | | | | | | | | | |
| aam | B | 0,608 | 0,0005 | | | 0,308 | 0,0142 | 0,394 | 0,0343 | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| sot | B | | | -0,508 | 0,0022 | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| sol | B | | | | | | | | | | |
| | T | -0,450 | 0,0076 | | | | | | | | |
| acv | B | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| pH | B | | | | | | | | | -0,411 | 0,0268 |
| | T | | | | | | | | | | |

| Variável | | put | | cad | | iso | | abi | | ato | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | R | p | R | p | R | p | R | p | R | p |
| precursor | B | | | | | 0,351 | 0,0048 | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| ass | B | 0,498 | 0,0059 | 0,541 | 0,0000 | 0,354 | 0,0044 | 0,626 | 0,0003 | 0,666 | 0,0001 |
| | T | | | | | | | 0,447 | 0,0081 | 0,438 | 0,0094 |
| aam | B | 0,416 | 0,0248 | 0,304 | 0,0154 | | | 0,423 | 0,0221 | 0,552 | 0,0019 |
| | T | | | | | | | 0,379 | 0,0269 | 0,381 | 0,0263 |
| sot | B | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| sol | B | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| acv | B | | | | | | | | | | |
| | T | 0,671 | 0,0000 | | | | | 0,4565 | 0,0067 | | |
| pH | B | | | | | | | -0,374 | 0,0459 | | |
| | T | | | | | | | | | | |

Legenda: eta – etanolamina; hta – histamina, metl – metilamina; etl – etilamina; tir – tiramina; put – putrescina; cad – cadaverina; iso – isoamilamina; abi – aminas biogénicas totais; ato – aminas totais; B – vinhos brancos; T – vinhos tintos; ass – aminoácidos livres assimiláveis; aam – aminoácidos aminogénicos; sot – dióxido de enxofre total; sol – dióxido de enxofre livre; acv – acidez volátil.

Nota: as aminas triptamina e β-feniletilamina não se encontraram nas amostras em causa; apenas se apresentam os resultados com $p<0,05$.

Como seria de esperar, os coeficientes de correlação encontrados para este grupo de amostras – GII – são, no geral, inferiores aos encontrados para os vinhos do GI

BIBLIOTECA F.E. PORTO

A maior heterogeneidade destes vinhos no que respeita à sua composição em termos de castas, com eventuais efeitos ao nível do teor de aminas [254], e principalmente no que concerne aos procedimentos tecnológicos que estiveram na base da sua elaboração, alguns igualmente influentes nos teores aminas [241], é aqui reflectida.

Os coeficientes obtidos são agora superiores na maioria dos casos, nos vinhos brancos, aos invés do que acontecia com os vinhos monovarietais. No entanto, e aparte algumas diferenças existentes entre as tabelas 15 e 17, parece-nos importante realçar que estes resultados continuam a apontar no sentido de ser o teor em aminoácidos assimiláveis, dos parâmetros estudados, aquele que mais influencia os teores de aminas biogénicas e voláteis nos vinhos estudados. Também aqui, cada uma das aminas analisadas se correlaciona melhor em todos os casos com o teor em aminoácidos assimiláveis do que com o respectivo precursor.

Das diferenças encontradas, as que nos merecem maior atenção são as correlações negativas encontradas entre os teores de etanolamina e de histamina, e os teores de dióxido de enxofre livre e total, respectivamente, nos vinhos tintos. Um comportamento semelhante foi observado por Vidal-Carou *et al* (1990) [287] em relação ao efeito do teor de $SO_2$ total nos teores de histamina e tiramina, em vinhos tintos espanhóis. A maior importância do $SO_2$ nos vinhos tintos pode estar relacionada com a sua acção após a fermentação maloláctica. Mesmo após a fermentação maloláctica, os vinhos possuem nutrientes em quantidade capaz de sustentar o desenvolvimento (ou pelo menos manter a sua actividade) de microorganismos de contaminação, com a eventual capacidade de produção de aminas. Nos vinhos em que o $SO_2$ se apresentar em concentrações mais altas, o desenvolvimento ou actividade desses microorganismos será menor ou nula.

No seu conjunto, os resultados obtidos para os grupos GI e GII, apontam no sentido de, para se diminuir o teor de aminas dos vinhos, ser mais eficaz diminuir o seu teor em aminoácidos assimiláveis (mais fácil em termos práticos) do que o teor dos seus precursores (muito mais complicado de levar a cabo).

### 3.2.4.3 Relação entre o teor de aminoácidos livres nos mostos e o teor de aminas nos vinhos monovarietais resultantes - GIII

A comparação dos teores de aminoácidos assimiláveis ou de azoto assimilável existentes nos vinhos com os respectivos teores de aminas, é um pouco como olharmos para o que sobrou de uma festa, ver os estragos que os convivas fizeram, sem na

realidade termos muito a ideia de quanto é que beberam. Através da presença de altos teores de azoto assimilável nos vinhos, podemos inferir que o teor de azoto assimilável que o mosto que lhe deu origem continha deveria ser igualmente alto. No entanto, para teores médios ou baixos a dúvida será maior. Os teores dos mostos seriam baixos de início, ou foi a actividade microbiana que os fez baixar?

Por outro lado, a haver uma dependência entre o teor de cada amina e do seu ou seus precursores, estudar os teores do precursor no início do processo, isto é antes da fermentação alcoólica, pode fornecer-nos alguma informação acerca da importância deste processo para a formação de aminas. Este estudo foi possível com as amostras do grupo GIII – os mostos monovarietais de 1998 – associadas aos vinhos de 1998 (incluídas no grupo GI), que deles resultaram.

Nas análises de regressão linear efectuadas com os teores de aminas dos vinhos, em função dos vários parâmetros relacionados com os aminoácidos dos mostos, foi tomada em consideração uma nova análise de variância efectuada agora apenas com os vinhos monovarietais de 1998 – tabela 18.

**Tabela 18.** Análise de variância para os teores de aminas nos vinhos monovarietais de 1998.

| **Fonte de variabilidade** | **eta** | | **hta** | | **mtl** | | **etl** | | **tir** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F | p | F | p | F | p | F | p | F | p |
| COR | 3,27 | 0,0892 | | | | | 6,21 | 0,0241 | 51,11 | 0,0000 |
| **Fonte de variabilidade** | **put** | | **cad** | | **fen** | | **abi** | | **ato** | |
| | F | p | F | p | F | p | F | p | F | p |
| COR | 7,00 | 0,0176 | 3,24 | 0,0907 | | | 4,83 | 0,0430 | 4,82 | 0,0432 |

Legenda: eta – etanolamina; hta – histamina, metl – metilamina; etl – etilamina; tir – tiramina; put – putrescina; cad – cadaverina; fen – β-feniletilamina; abi – aminas biogénicas totais; ato – aminas totais.

Nota: as aminas triptamina e isoamilamina não se encontraram nas amostras em causa; apenas se apresentam os resultados com $p<0,1$.

Com base na análise de variância efectuada, verifica-se que o factor COR apenas não influenciou os teores de hta, mtle e fen, considerando-se apenas os vinhos de 1998.

Foram assim considerados para nas análises de regressão linear, os teores de histamina, metilamina e β-feniletilamina no conjunto dos vinhos de 1998, e dos restantes parâmetros nos vinhos brancos e tintos separadamente. Os resultados das regressões efectuadas encontram-se na tabela 19.

**Tabela 19.** Coeficientes de correlação e significância das regressões lineares efectuadas com os mostos monovarietais – GIII – combinados com os vinhos resultantes.

| Variável | | eta | | hta | | mtl | | etl | | tir | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | R | p | R | p | R | p | R | p | R | p |
| precursor | B | | | 0,492 | 0,0380 | 0,5180 | 0,0277 | | | | |
| | T | | | | | | | | | 0,811 | 0,0080 |
| ass | B | | | 0,492 | 0,0383 | 0,685 | 0,0017 | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| aam | B | | | 0,412 | 0,0895 | 0,713 | 0,0009 | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| **Variável** | | **put** | | **cad** | | **fen** | | **abi** | | **ato** | |
| | | R | p | R | p | R | p | R | p | R | p |
| precursor | B | | | | | | | | | | |
| | T | | | | | | | | | | |
| ass | B | | | | | | | 0,845 | 0,0041 | 0,894 | 0,0011 |
| | T | | | | | | | | | | |
| aam | B | | | | | | | 0,778 | 0,0136 | 0,861 | 0,0029 |
| | T | | | | | | | | | | |

Legenda: eta – etanolamina; hta – histamina, metl – metilamina; etl – etilamina; tir – tiramina; put – putrescina; cad – cadaverina; fen – β-feniletilamina; abi – aminas biogénicas totais; ato – aminas totais; B – vinhos brancos; T – vinhos tintos; ass – aminoácidos livres assimiláveis; aam – aminoácidos aminogénicos.

Nota: as aminas triptamina e isoamilamina não se encontraram nas amostras em causa; apenas se apresentam os resultados com $p<0,10$.

Devido ao pequeno número de amostras disponíveis para esta análise (9 vinhos brancos e 9 tintos), algumas das regressões lineares não se mostraram significantes ao nível dos 90 % de grau de confiança ($p<0,10$), como foi o caso das aminas biogénicas e das aminas totais em vinhos tintos. Ainda assim, no caso destes parâmetros em vinhos brancos, verificaram-se correlações elevadas e quase sempre altamente significativas entre o teor de aminas biogénicas e totais, e o teor de aminoácidos assimiláveis e aminogénicos – tabela 19.

Não deixa de ser de realçar que, se no conjunto dos vinhos de 1997 e 1998, e considerando os teores de aminoácidos dos vinhos, os teores de aminas biogénicas e totais estavam menos correlacionados nos vinhos brancos do que nos tintos, agora, e considerando os teores de aminoácidos dos mostos, é nos vinhos brancos que se registam as maiores correlações.

Tendo em atenção que os teores de aminas nos vinhos brancos e tintos são normalmente distintos, sendo regra geral superiores nos tintos, e que nos vinhos brancos da região do Alentejo por norma não se realiza a fermentação maloláctica, pode dizer-se que, nestes vinhos, a quantidade de aminas biogénicas e voláteis acumuladas no final da sua elaboração, dependendo de forma maioritária das quantidades existentes nas uvas e das formadas durante a fermentação alcoólica, é significativamente influenciada pela

quantidade de aminoácidos assimiláveis existentes nos mostos. Já para os vinhos tintos, os menores coeficientes de correlação encontrados e a sua falta de significância, podem indicar que a quantidade de aminas que se acumulam nestes vinhos, dependa não só da quantidade de aminoácidos assimiláveis existentes no mosto, mas também de outros factores que influenciem a realização da fermentação maloláctica. Daí que no caso dos vinhos tintos, a comparação dos teores de aminas com os teores de aminoácidos nos vinhos, possa incluir como factor influente, também uma maior ou menor actividade proteolítica exibida por bactérias lácticas, o que pode fazer variar a quantidade de aminoácidos presentes no meio. Leitão *et al* (2000) [159] verificaram que algumas das bactérias lácticas que estudaram, exibiam capacidade proteolítica quando cultivadas num meio contendo vinho, actividade esta que era dependente da composição em nutrientes do meio e das fase de crescimento das bactérias. No entanto, de 220 culturas de isolados de *Oenococcus oeni* testadas, apenas 6 evidenciaram simultaneamente a actividade proteolítica e descarboxilase, apontando claramente no sentido de a quantidade de aminas formadas após a fermentação maloláctica ser bastante dependente da estirpe e das condições do meio.

### 3.2.5 Influência da casta nos teores de aminoácidos livres e aminas dos vinhos e mostos

A influência da casta nos níveis de aminoácidos livres e aminas foi avaliada através do estudo destes compostos em mostos e vinhos produzidos com uvas de diferentes castas, provenientes todas da mesma sub-região de Évora.

Nesta análise, foram utilizados unicamente os mostos e vinhos de 1998 produzidos na sub-região de Évora. Na tabela 20 podemos verificar que tanto os mostos como os vinhos brancos apresentaram, em média, teores de aminoácidos assimiláveis superiores aos tintos. Das castas brancas, a única excepção foi a casta Perrum, onde se detectaram nos mostos e vinhos, baixos teores de aminoácidos e aminas voláteis e biogénicas. Com excepção das aminas voláteis nos mostos, os mostos e vinhos tintos apresentaram em média teores de aminas superiores aos brancos.

De uma forma geral, as castas com teores de aminoácidos assimiláveis superiores foram aquelas onde se registaram também os teores de aminas mais elevados, principalmente se nos referirmos aos vinhos.

**Tabela 20.** Teores médios de aminoácidos assimiláveis, aminas voláteis e biogénicas em vinhos e mostos de diferentes castas, cultivadas em 1998 na mesma sub-região – Évora.

| Parâmetro | ass (mg/L) | av (mg/L) | abi (mg/L) | ass (mg/L) | av (mg/L) | abi (mg/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **casta** | mostos brancos | | | vinhos brancos | | |
| Roupeiro | 1489 | 37,0 | 5,9 | 1214 | 25,3 | 19,1 |
| Perrum | 743 | 20,3 | 1,8 | 286 | 11,8 | 10,3 |
| Rabo de Ovelha | 1687 | 31,4 | 6,2 | 1367 | 23,8 | 24,8 |
| Arinto | 1607 | 34,4 | 4,2 | 1057 | 20,3 | 20,9 |
| Antão Vaz | 1350 | 26,3 | 4,2 | 965 | 22,5 | 10,9 |
| **média** | **1375** | **29,9** | **4,5** | **978** | **20,7** | **17,2** |
| CV (%) | 27 | 22 | 39 | 42 | 26 | 37 |
| **casta** | mostos tintos | | | vinhos tintos | | |
| Castelão | 952 | 15,1 | 2,0 | 255 | 22,7 | 28,1 |
| Tinta Caiada | 1254 | 30,6 | 10,5 | 354 | 34,8 | 29,3 |
| Aragonez | 1053 | 24,1 | 3,7 | 781 | 35,6 | 82,0 |
| Trincadeira | 935 | 27,5 | 8,4 | 382 | 33,3 | 52,6 |
| Moreto | 1063 | 14,1 | 2,3 | 69 | 11,5 | 4,5 |
| **média** | **1051** | **22,3** | **5,4** | **368** | **27,6** | **39,3** |
| CV (%) | 12 | 33 | 71 | 71 | 38 | 74 |

Legenda: ass – aminoácidos livres assimiláveis; av – aminas voláteis; abi – aminas biogénicas; CV – coeficiente de variação.

Comparando o efeito da casta nos teores de aminoácidos e aminas nos mostos brancos e tintos, parece que o factor casta afectou principalmente a quantidade de aminas biogénicas (abi) existentes nos mostos tintos, como se pode avaliar pelo coeficiente de variação correspondente. Em contrapartida, o teor de aminoácidos assimiláveis (ass) dos mostos tintos, foi menos afectado pelo factor casta do que o dos brancos.

Nos vinhos, as fases fermentativas e de armazenamento, introduziram no geral, uma maior variabilidade principalmente nos teores de aminoácidos assimiláveis e de aminas voláteis.

Com a excepção do teor de aminoácidos assimiláveis nos mostos, o factor casta introduziu maior variabilidade em todas as variáveis consideradas nos mostos e vinhos tintos.

Nos vinhos, os coeficientes de variação encontrados são, por certo, o somatório das influências da casta e das fases fermentativa e de acabamento, e das suas diversas interdependências. A grande variabilidade verificada nos teores de aminoácidos assimiláveis e de aminas biogénicas dos vinhos tintos, é o resultado das diferentes interacções entre a casta, as leveduras e as bactérias, e entende-se que seja superior à dos vinhos brancos, afectados normalmente por menos um factor do que os tintos – a fermentação maloláctica.

Estes resultados sugerem que o factor casta (dentre as estudadas) pode ter uma influência importante nos teores de aminoácidos assimiláveis e de aminas dos vinhos. Se, no que diz respeito aos aminoácidos livres, é consensual a ideia de que o binómio casta/porta-enxerto pode introduzir uma variabilidade marcante nos seus teores [123; 258], já no que respeita às aminas, e até por uma certa escassez de estudos nesse sentido, os resultados nem sempre são concordantes. Como exemplos, podemos referir os trabalhos de Kállay e Bódy-Szalkai (1996) [135] e de Ough (1971) [206] e Soleas *et al* (1999) [254]. Os primeiros, constataram não haver uma influência significativa quer do ano de produção, da região ou casta nos teores de aminas biogénicas dos 73 vinhos Húngaros que analisaram. No entanto, os resultados dos dois últimos estudos de 1971 e 1999, levaram os autores a concluir que a casta influenciou significativamente os teores de aminas biogénicas nos mais de 300 vinhos da Califórnia e de Ontário, respectivamente.

As diferentes castas, da mesma forma que podem influenciar os teores de aminoácidos livres, quer de forma intrínseca (por originarem mostos com diferentes teores desses compostos) quer extrínseca (por exemplo por determinados microorganismos poderem estar preferencialmente associados a determinadas castas), podem actuar nos teores de aminas acumuladas num determinado vinho, através dos mesmos factores.

### 3.2.6 Influência da região de produção nos teores de aminoácidos livres e aminas dos vinhos e mostos

A influência da região de produção nos teores de aminoácidos livres e aminas de mostos e vinhos do Alentejo, foi avaliada por recurso ao estudo de mostos e vinhos das castas Roupeiro (branca) e Trincadeira (tinta), cultivadas em diferentes sub-regiões Alentejanas no ano de 1998. Deve ser referido que neste ano não se obtiveram vinhos Roupeiro da sub-região de Borba, nem Trincadeira de Vidigueira (*vide* tabela 5), no entanto, decidimos incluir na análise tanto os vinhos Roupeiro de Vidigueira como o Trincadeira de Borba, já que se pretendeu avaliar o efeito de diferentes proveniências em mostos e vinhos da mesma casta, e não o efeito das proveniências Borba e Vidigueira em particular.

A tabela 21 mostra os teores médios de aminoácidos assimiláveis e de aminas voláteis e biogénicas nos mostos das duas castas, cultivadas em diferentes sub-regiões do Alentejo.

Tal como aconteceu com as amostras consideradas para o estudo da influência da casta, os mostos e vinhos tintos apresentaram um teor de aminoácidos assimiláveis menor, e de aminas maior do que os dos brancos.

O teor de aminas biogénicas nos mostos de Roupeiro, foi o parâmetro dos mostos mais afectado pelo factor sub-região. O factor casta, ao contrário do agora considerado, afectou principalmente este parâmetro nos mostos tintos (tabela 20).

**Tabela 21.** Teores médios de aminoácidos assimiláveis, aminas voláteis e biogénicas em vinhos e mostos das castas Roupeiro (branca) e Trincadeira (tinta), cultivadas em 1998 em diferentes sub-regiões.

| **Parâmetro** | **ass (mg/L)** | **av (mg/L)** | **abi (mg/L)** | **ass (mg/L)** | **av (mg/L)** | **abi (mg/L)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Sub-região** | mostos Trincadeira | | | vinhos Trincadeira | | |
| Portalegre | 1257 | 34.3 | 7.7 | 630 | 43.6 | 60.0 |
| Reguengos | 748 | 15.3 | 8.0 | 282 | 26.9 | 22.9 |
| Redondo | 710 | 22.7 | 5.4 | 258 | 23.6 | 21.3 |
| Évora | 935 | 27.5 | 8.4 | 382 | 33.3 | 52.6 |
| Borba | 711 | 12.4 | 2.1 | 101 | 13.8 | 8.2 |
| **média** | **712** | **22.2** | **12.6** | **331** | **28.2** | **33.0** |
| CV (%) | 33 | 40 | 21 | 59 | 39 | 67 |
| **Sub-região** | mostos Roupeiro | | | vinhos Roupeiro | | |
| Portalegre | 1027 | 22.5 | 4.3 | 513 | 15.7 | 12.5 |
| Reguengos | 852 | 17.2 | 4.4 | 316 | 16.7 | 12.0 |
| Redondo | 1167 | 25.9 | 5.4 | 401 | 20.4 | 12.4 |
| Vidigueira | 1065 | 28.7 | 10.6 | 610 | 23.8 | 14.5 |
| Évora | 1489 | 37.0 | 5.9 | 1214 | 25.3 | 19.1 |
| **média** | **1066** | **24.5** | **5.2** | **611** | **20.4** | **14.1** |
| CV (%) | 23 | 33 | 61 | 58 | 21 | 21 |

Legenda: ass – aminoácidos assimiláveis; av– aminas voláteis; abi – aminas biogénicas; CV – coeficiente de variação.

No caso dos vinhos, os tintos (Trincadeira), como aconteceu para o factor casta, foram aqueles que apresentaram coeficientes de variação superiores, em relação a qualquer dos parâmetros considerados. Neste caso porém, as diferenças verificadas entre os brancos e os tintos para as variações dos aminoácidos assimiláveis não são tão evidentes como o foram para o factor casta.

A influência da sub-região Évora parece ter-se feito sentir na casta branca e na tinta de maneira idêntica, pois foi aí onde se produziram os mostos Roupeiro e os vinhos Roupeiro e Trincadeira mais ricos em aminas e aminoácidos assimiláveis. Borba, foi a sub-região onde se produziram os mostos e vinhos Trincadeira mais pobres em aminoácidos assimiláveis e aminas, e Reguengos os vinhos Roupeiro.

### 3.2.7 Influência do ano de produção nos teores de aminoácidos livres e aminas dos vinhos e mostos

É possível verificar na tabela 22, que não se verificaram diferenças significativas entre os teores de aminoácidos assimiláveis de mostos ou vinhos dos dois anos estudados para as diferentes castas (na mesma sub-região) e para as diferentes sub-regiões (mesmas castas). No entanto e no geral, o ano de 1998 originou mostos e vinhos mais ricos em azoto aminado assimilável e aminas voláteis ou biogénicas do que os outros anos em comparação. As únicas diferenças com significado estatístico (pelo menos para uma probabilidade de 95 %) foram encontradas para os teores de aminas voláteis nos mostos das diferentes castas brancas e nos vinhos Trincadeira de diferentes sub-regiões.

**Tabela 22.** Comparação das médias de cada casta na mesma sub-região e da mesma casta em diferentes sub-regiões, nos anos estudados (média ± desvio padrão).

| Parâmetro | Aminoácidos assimiláveis (mg/L) | | Aminas voláteis (mg/L) | | Aminas biogénicas (mg/L) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **mostos** | **tintos** | **brancos** | **tintos** | **brancos** | **tintos** | **brancos** |
| castas 1998 | 1052±127 | 1376±375 | 22,3±7,4 | 29,9[b]±6,7 | 5,4±3,2 | 4,5±1,8 |
| castas 1999 | 1096±104 | 1270±429 | 20,7±4,0 | 20,5[b]±3,9 | 3,2±1,7 | 2,0±1,6 |
| Roupeiros 1998 (brancos) | 1066±249 | | 24,5±8,0 | | 5,2±3,2 | |
| Roupeiros 1999 (brancos) | 871±146 | | 17,9±2,7 | | 2,8±1,8 | |
| Trincadeiras 1998 (tintos) | 904±234 | | 22,8±8,9 | | 6,1±2,2 | |
| Trincadeiras 1999 (tintos) | 760±272 | | 20,2±4,2 | | 5,2±2,1 | |
| **vinhos** | **tintos** | **brancos** | **tintos** | **brancos** | **tintos** | **brancos** |
| castas 1997 | 329±39 | 653±214 | 24,1±5,2 | 21,1±2,5 | 26,5±9,4 | 16,0±2,3 |
| castas 1998 | 368±261 | 978±416 | 27,7±10,5 | 20,9±5,3 | 41,8±27,0 | 17,7±6,5 |
| Roupeiros 1997 (brancos) | 409±108 | | 17,6±3,2 | | 14,3±4,9 | |
| Roupeiros 1998 (brancos) | 564±355 | | 20,4±4,2 | | 14,1±3,0 | |
| Trincadeiras 1997 (tintos) | 255±32 | | 18,8[b]±8,3 | | 8,6±6,1 | |
| Trincadeiras 1998 (tintos) | 331±195 | | 28,2[b]±11,1 | | 33,0±22,2 | |

Legenda: a – diferença muito significativa (99 %) entre os resultados de diferentes anos dentro da mesma categoria; b - diferença significativa (95 %) entre os resultados de diferentes anos dentro da mesma categoria.

Nota: castas – 10 castas diferentes, todas provenientes de Évora, Roupeiros e Trincadeiras – amostras de 4 sub-regiões diferentes (exclui- Borba no Caso dos Roupeiro e Vidigueira nos caso das Trincadeira).

Estes resultados concordam com os publicados por Sass-Kiss *et al* (2000) [241], onde os autores descrevem que os principais factores a afectarem quantitativa e qualitativamente os teores de aminas no vinhos estudados, foram o ano e a tecnologia de produção utilizada, mas discordam dos publicados por Kállay e Bódy-Szalkai (1996) [135] que não registaram uma influência significativa do ano, região ou casta nos teores de

aminas biogénicas dos vinhos que estudaram. Neste caso, apenas o factor tecnologia (principalmente o acabamento dos vinhos) influenciou os teores em causa.

### 3.2.8 Evolução dos teores de aminoácidos assimiláveis e de aminas durante as fermentações alcoólica e maloláctica

Estudou-se a variação da concentração de cada amina durante a microvinificação de 10 mostos provenientes da sub-região de Évora, na vindima de 1998. Foram fermentados 5 mostos tintos (das castas Aragonez, Moreto, Castelão, Tinta Caiada e Trincadeira) e 5 brancos (Arinto, Perrum, Antão Vaz, Rabo de Ovelha e Roupeiro). Verificou-se a realização espontânea da fermentação maloláctica, em todos os vinhos tintos obtidos, e no vinho branco da casta Rabo de Ovelha.

Os dados referentes à quantificação dos aminoácidos livres durante as 10 microvinificações, encontram-se apresentados na sua totalidade nas tabelas C7 a C16, e os resultados relativos às aminas nas tabelas C19 a C28.

As figuras 55 e 56, mostram a evolução do teor total de azoto aminado assimilável, em cada uma das fermentações brancas e tintas, respectivamente. Note-se que a última análise, foi efectuada cerca de 1 ano e meio após o final da fermentação alcoólica, tempo durante o qual o vinhos permaneceram em garrafa.

Na figura 55 é possível verificar que, de um modo geral, a assimilação do azoto aminado nos mostos brancos começou a realizar-se de imediato com o início da fermentação alcoólica. Em quase todas as fermentações (com excepção da casta Perrum) verificou-se uma grande variação dos teores de azoto aminado assimilável no decorrer da fermentação tumultuosa (normalmente depois de 1 ou dois dias de fermentação). Ainda assim, é possível verificar que em todas as fermentações se atingiu um mínimo no teor de azoto aminado assimilável entre o 3º e o 11º dia de fermentação, após o que se verificou em algumas, um aumento ligeiro desses teores.

Apesar de no vinho da casta Rabo de Ovelha se ter realizado a fermentação maloláctica, esta microvinificação não se distingue das outras em termos da evolução do teor de azoto aminado assimilável.

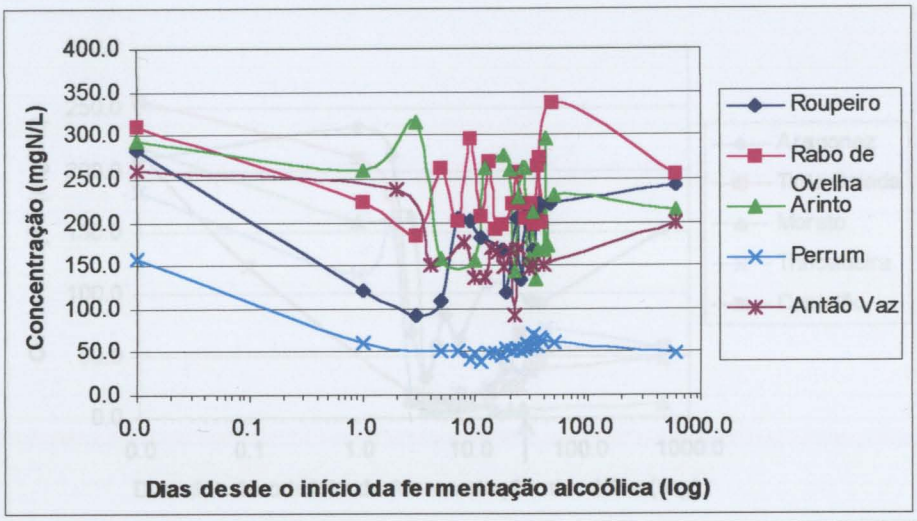



**Figura 55.** Evolução do teor total de azoto aminado assimilável de cada um dos 5 mostos brancos durante a microvinificação.

Já nas microvinificações dos mostos tintos – figura 56 – foi possível observar um comportamento mais característico. Com excepção da fermentação do mosto da casta Castelão, na qual se verificou logo desde o início uma assimilação do azoto aminado, em todas as outras se registou uma fase inicial (no 1º dia) caracterizada por uma menor taxa de consumo, seguida de uma fase de assimilação muito acentuada, com o alcance de um mínimo nos teores de azoto aminado assimilável (por volta do 3º dia de fermentação).

Depois do 10º dia de fermentação, verificou-se uma reposição de azoto aminado assimilável no meio em todas as castas, exceptuando-se a casta Moreto. É de salientar que o vinho Moreto foi o vinho onde se registaram os teores mais baixos de aminas voláteis e biogénicas. Em oposição, na microvinificação da casta Aragonez, em cujo vinho se registaram os teores mais elevados dos mesmos parâmetros, verificou-se que a cedência de aminoácidos assimiláveis ao meio por parte das leveduras se iniciou mais cedo e de forma mais acentuada, do que em qualquer outra.

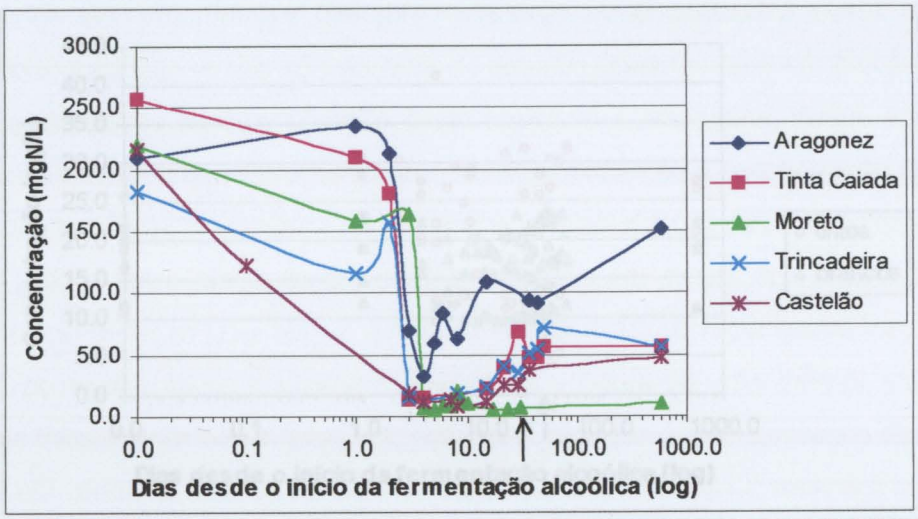



**Figura 56.** Evolução do teor total de azoto aminado assimilável de cada um dos 5 mostos tintos durante a microvinificação.

Nota: A seta indica tempo médio que os vinhos tintos demoraram a completar a fermentação maloláctica (33 dias em média, máximo 36, mínimo 30).

Verifica-se que a libertação de substâncias azotadas, durante e após a fermentação alcoólica, parece ser bastante dependente da maior ou menor tolerância ao etanol exibida por diferentes estirpes de *Saccharomyces* [239]. Apesar de ser uma matéria que carece de estudos complementares, a escolha de leveduras apropriadas pode permitir controlar, de certa forma, a quantidade de azoto libertado para os vinhos no final das fermentações, contribuindo para um maior controlo da estabilidade dos vinhos resultantes.

As figuras 57 a 62 mostram a evolução dos teores das aminas detectadas cujos variações foram significativas, durante as microvinificações dos mostos brancos e tintos de 1998. As aminas cadaverina, triptamina, β-feniletilamina e isoamilamina encontraram-se, na maioria das amostras, em teores inferiores aos limites de detecção do método analítico para estas aminas.

Durante as fermentações alcoólica e maloláctica os teores de etanolamina não variaram de uma forma significativa nos mostos estudados – figura 57.

É possível verificar que os teores iniciais de etanolamina nos mostos brancos e tintos não foram distintos, apesar de no final os vinhos tintos obtidos apresentassem tendência para teores ligeiramente mais elevados do que os brancos. Durante as microvinificações, os teores nos mostos tintos variaram mais em relação aos teores iniciais e finais do que nos brancos.

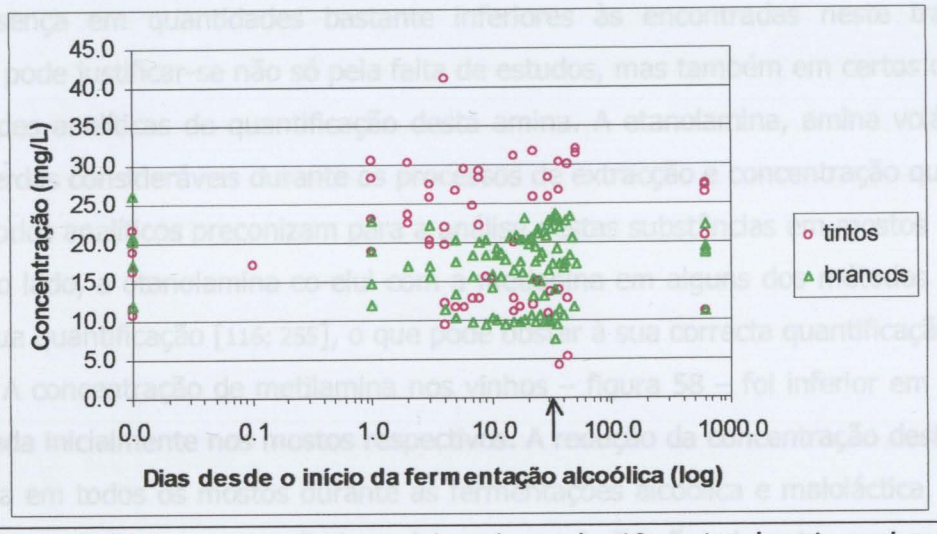



**Figura 57.** Evolução do teor de etanolamina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação.

Nota: A seta indica tempo médio que os vinhos tintos demoraram a completar a fermentação maloláctica (33 dias em média, máximo 36, mínimo 30).

Apesar de em algumas das microvinificações tintas haver um aumento ligeiro dos teores de etanolamina, as quantidades desta amina encontradas nos vinhos estudados parece provir maioritariamente das uvas. Estes resultados não são concordantes com os obtidos por Buteau *et al* (1984) [42] ao estudarem microvinificações de mostos tintos. Estes autores, apesar de terem encontrado etanolamina nos mostos (média de 2,4 mg/L) observaram uma formação significativa desta amina durante a fermentação alcoólica, até uma concentração média de 21 mg/L. Para além disso, estes autores obtiveram resultados que sugeriram que as bactérias *Oenococcus oeni* utilizadas, originaram um decréscimo da concentração desta amina, ao contrário das *Pediococcus cerevisiae* que a faziam aumentar. Não obstante, os teores de etanolamina encontrados nos mostos são comparáveis aos reportados por outros autores [82] encontradas em castas Francesas (média de 18,3 mg/L para mostos de 3 castas analisadas em dois anos consecutivos).

Embora os estudos realizados até ao momento no sentido de caracterizar os teores de etanolamina nos mostos e os processos da sua acumulação nos vinhos originem resultados relativamente díspares, parece que a presença desta amina nos vinhos, pode ter duas origens distintas: as uvas e os processos fermentativos. Apesar desta amina não ter grande importância ao nível da segurança do produto, pode influenciar as características sensoriais dos vinhos onde ocorre, uma vez que é uma amina volátil.

A disparidade de resultados que se verifica, no que diz respeito aos teores desta amina em mostos e vinhos, uma vez que, mesmo em vinhos, há autores que descrevem a

sua presença em quantidades bastante inferiores às encontradas neste trabalho e noutros, pode justificar-se não só pela falta de estudos, mas também em certos casos por dificuldades analíticas de quantificação desta amina. A etanolamina, amina volátil, pode sofrer perdas consideráveis durante os processos de extracção e concentração que muitos dos métodos analíticos preconizam para a análise destas substâncias em mostos e vinhos. Por outro lado, a etanolamina co-elui com a metionina em alguns dos métodos descritos para a sua quantificação [116; 255], o que pode obstar à sua correcta quantificação.

A concentração de metilamina nos vinhos – figura 58 – foi inferior em média, à encontrada inicialmente nos mostos respectivos. A redução da concentração desta amina, verificada em todos os mostos durante as fermentações alcoólica e maloláctica, pode ter sido devida à sua evaporação ou à sua metabolização durante o processo de microvinificação, embora a ocorrência destes processos não tenha até ao momento sido demonstrada. No entanto, as temperaturas de fermentação, normalmente mais elevadas nas fermentações das castas tintas, podem contribuir para maiores taxas de evaporação, justificando o facto de se ter verificado uma diminuição mais acentuada nas vinificações dos mostos tintos (apesar de em alguns casos se ter registado um aumento durante a fermentação alcoólica), e corroborando a possibilidade de ocorrência e predominância do processo físico.

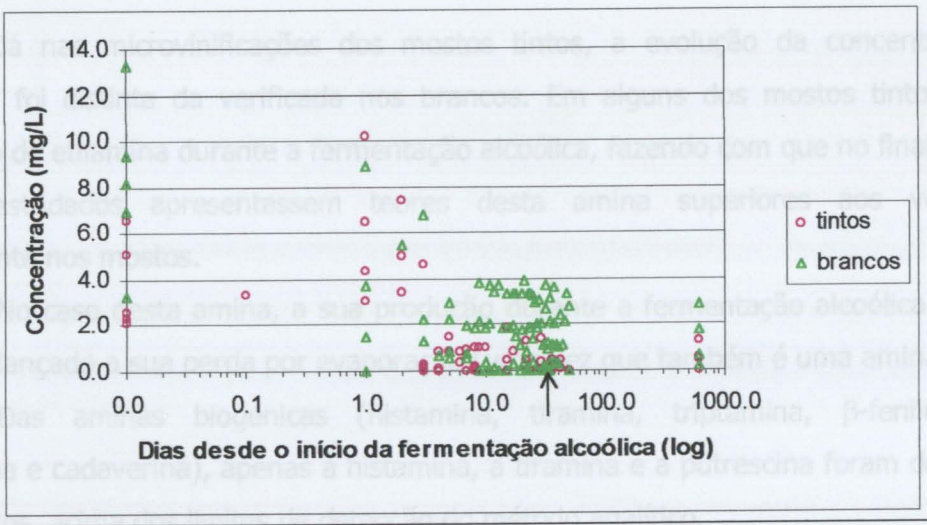



**Figura 58.** Evolução do teor de metilamina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação.

Nota: A seta indica tempo médio que os vinhos tintos demoraram a completar a fermentação maloláctica (33 dias em média, máximo 36, mínimo 30).

A concentração de etilamina – figura 59 – apresentou dois comportamentos distintos, relativamente à sua evolução no decorrer das microvinificações, consoante se tratou dos mostos brancos ou dos tintos. Nos brancos, as concentrações verificadas nos vinhos eram idênticas às registadas nos mostos no início das fermentações, sem ter sofrido alterações significativas durante o processo de vinificação.

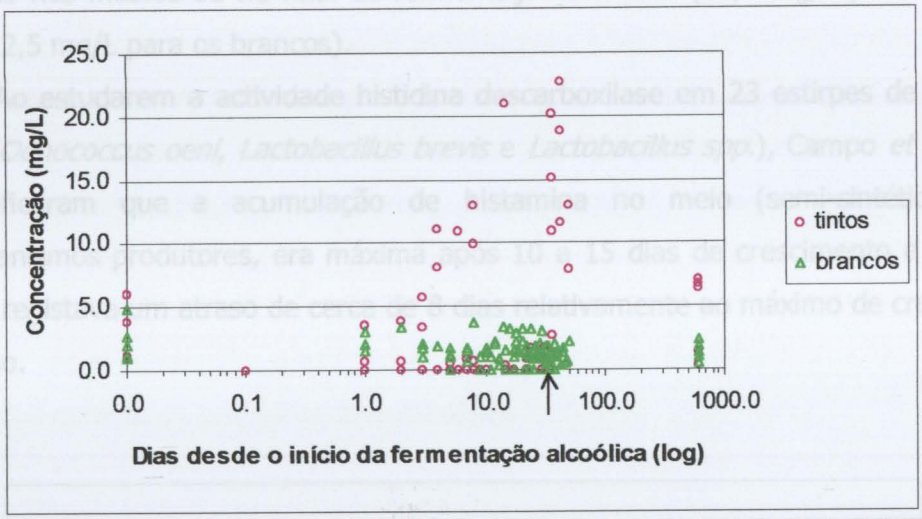



**Figura 59.** Evolução do teor de etilamina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação.

Nota: A seta indica tempo médio que os vinhos tintos demoraram a completar a fermentação maloláctica (33 dias em média, máximo 36, mínimo 30).

Já nas microvinificações dos mostos tintos, a evolução da concentração de etilamina foi distinta da verificada nos brancos. Em alguns dos mostos tintos, houve produção de etilamina durante a fermentação alcoólica, fazendo com que no final, 3 dos 5 vinhos estudados apresentassem teores desta amina superiores aos verificados inicialmente nos mostos.

No caso desta amina, a sua produção durante a fermentação alcoólica pode ter contrabalançado a sua perda por evaporação (uma vez que também é uma amina volátil).

Das aminas biogénicas (histamina, tiramina, triptamina, β-feniletilamina, putrescina e cadaverina), apenas a histamina, a tiramina e a putrescina foram detectadas nos mostos, acima dos limites de detecção do método analítico.

No que diz respeito à histamina – figura 60 -, verificou-se a sua ausência da quase totalidade dos mostos brancos e tintos. Apenas se detectou em dois mostos. Em alguns casos, verificou-se um aumento da concentração desta amina em alguns casos,

logo no início da fermentação alcoólica, embora para valores da mesma ordem dos encontrados no mostos tintos no início (máximo de 2,4 mg/L no mosto Tinta Caiada).

No caso dos vinhos brancos, também durante a realização da fermentação maloláctica, não se verificou um aumento significativo destas amina. No entanto, cerca de 1 ano e meio após o final da fermentação maloláctica nos vinhos tintos, verificou-se que as amostras continham, de forma consistente, teores de histamina superiores aos verificados nos mostos ou no final da fermentação alcoólica (11,1 mg/L para os vinhos tintos e 12,5 mg/L para os brancos).

Ao estudarem a actividade histidina descarboxilase em 23 estirpes de bactérias lácticas (*Oenococcus oeni, Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus spp.*), Campo *et al* (2000) [70] verificaram que a acumulação de histamina no meio (semi-sintético) pelos microorganismos produtores, era máxima após 10 a 15 dias de crescimento e que este máximo, registava um atraso de cerca de 8 dias relativamente ao máximo de crescimento bacteriano.

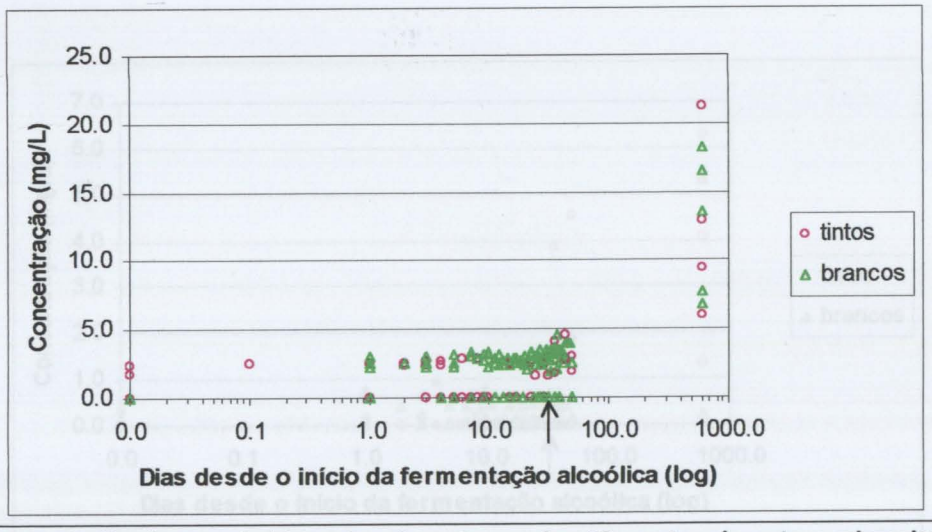



**Figura 60.** Evolução do teor de histamina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação.

Nota: A seta indica tempo médio que os vinhos tintos demoraram a completar a fermentação maloláctica (33 dias em média, máximo 36, mínimo 30).

Os resultados que obtivemos, mostram um aumento dos níveis de histamina em todos os vinhos estudados. No entanto, apenas os vinhos tintos e o vinho branco Rabo de Ovelha efectuaram fermentação maloláctica, e para além disso, o vinho em que se registou um menor teor de aminas foi um vinho tinto. Teria sido desejável efectuar-se

uma amostragem ao longo do período de armazenagem, no sentido de elucidar em que momento se verificou o aumento dos níveis de histamina, nos vinhos brancos e tintos.

A figura 61, mostra a evolução dos teores de tiramina em função do tempo decorrido desde o início da fermentação alcoólica dos mostos estudados.

É possível verificar que os vinhos brancos e tintos se distinguem pelos teores de tiramina. Os vinhos brancos apresentam no final (0,2 mg/L, em média), teores de tiramina muito próximos dos encontrados no início nos mostos (0,1 mg/L, em média), não se tendo verificado uma variação significativa durante a fermentação destes mostos.

No caso das castas tintas, observou-se algo diferente. Com baixos teores iniciais de tiramina nos mostos, verificou-se durante as microvinificações das 5 castas, um aumento da concentração de tiramina, imediatamente a seguir à conclusão da fermentação maloláctica. Estes resultados parecem não estar de acordo com as conclusões de Soufleros *et al* (1998) [255] e Vidal-Carou *et al* (1990) [286], que verificaram uma correlação significativa entre os níveis de tiramina e de histamina encontrados durante os processos fermentativos.

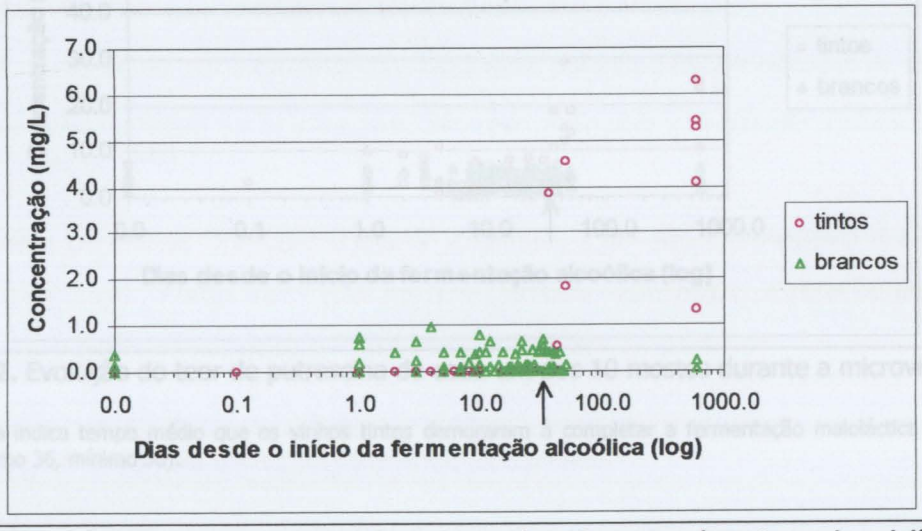



**Figura 61.** Evolução do teor de tiramina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação.

Nota: A seta indica tempo médio que os vinhos tintos demoraram a completar a fermentação maloláctica (33 dias em média, máximo 36, mínimo 30).

Nas fermentações que estudamos, parece que a tiramina foi produzida durante a fermentação maloláctica, já que apenas se notou um aumento significativo nos vinhos tintos, e apenas depois desta fermentação estar concluída, apesar de não se ter registado o mesmo no vinho branco Rabo de Ovelha, onde também se realizou esta fermentação.

A evolução dos teores de putrescina, fez-se de uma forma idêntica ao verificado para a tiramina – figura 62 –, apesar de menos consistente, já que em dois dos vinhos tintos não se verificou um aumento dos teores de putrescina. Com excepção de um dos vinhos, cujo teor de putrescina foi excepcionalmente alto, o teor médio desta amina nos vinhos (em média 15,0 mg/L), 1 ano e meio após o início da fermentação, foi cerca de 3 vezes superior ao encontrado nos mostos (em média 4,4 mg/L).

Altos níveis de putrescina e cadaverina podem estar associados a deficientes condições de higiene durante a produção dos vinhos, como sugerem alguns autores [54], Nos vinhos tintos estudados, a fermentação maloláctica parece ter sido a principal origem desta amina, enquanto que nos vinhos brancos foram as quantidades inicialmente presentes nos mostos.

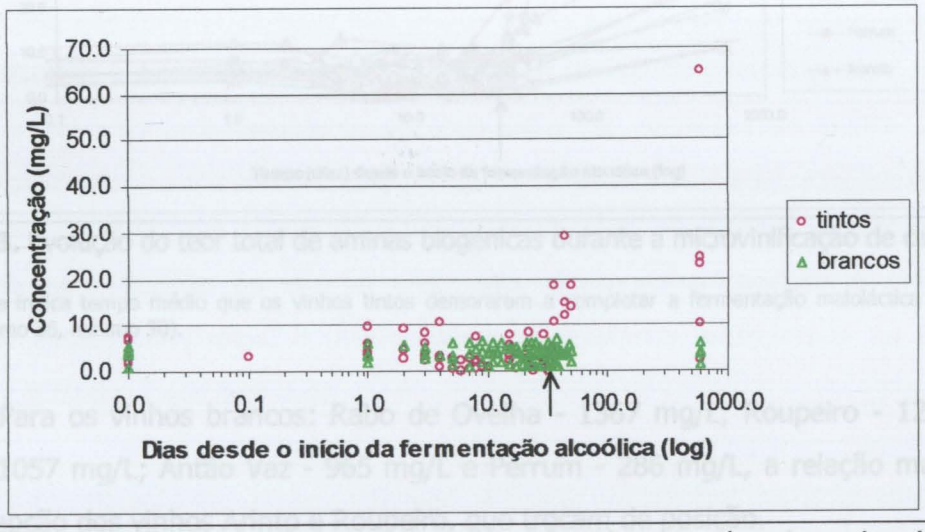



**Figura 62.** Evolução do teor de putrescina de cada um dos 10 mostos durante a microvinificação.

Nota: A seta indica tempo médio que os vinhos tintos demoraram a completar a fermentação maloláctica (33 dias em média, máximo 36, mínimo 30).

Analisando agora os resultados por castas individuais – figura 63 – verificou-se que, em relação ao teor total de aminas biogénicas (histamina, tiramina, triptamina, β-feniletilamina, putrescina e cadaverina), as castas Aragonez, Trincadeira e Tinta Caiada, foram aquelas onde se verificaram os valores mais altos nos vinhos produzidos. Neste ponto, deve ser enfatizado que as castas onde se verificaram as concentrações mais altas de aminas biogénicas nos vinhos, também foram aquelas onde se registaram os valores

mais elevados de aminoácidos assimiláveis. Para os vinhos tintos, as concentrações totais de aminoácidos assimiláveis foram, por ordem decrescente: Aragonez - 781 mg/L; Trincadeira - 382 mg/L; Tinta Caiada - 354 mg/L; Castelão - 255 mg/L e Moreto - 69 mg/L. Esta ordem, coincide com a obtida se os mesmos vinhos forem dispostos por ordem decrescente do teor total de aminas biogénicas, considerando vinhos tintos e brancos em separado – figura 63.

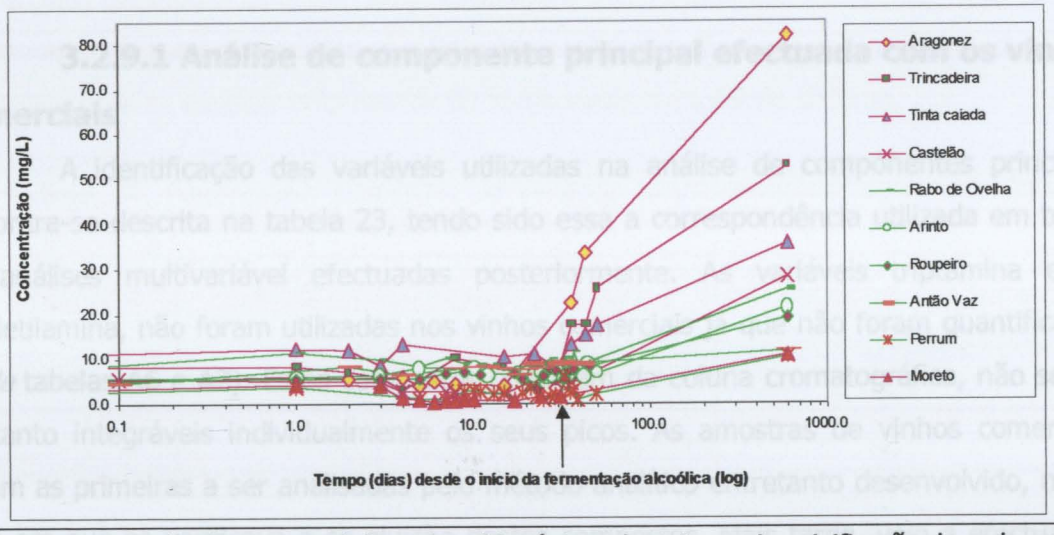



**Figura 63.** Evolução do teor total de aminas biogénicas durante a microvinificação de cada casta.

Nota: A seta indica tempo médio que os vinhos tintos demoraram a completar a fermentação maloláctica (33 dias em média, máximo 36, mínimo 30).

Para os vinhos brancos: Rabo de Ovelha - 1367 mg/L; Roupeiro - 1214 mg/L; Arinto - 1057 mg/L; Antão Vaz - 965 mg/L e Perrum - 286 mg/L, a relação mantém-se, com excepção dos vinhos Arinto e Roupeiro, que trocam de posição.

### 3.2.9 Análise de componente principal

A análise de componente principal permite verificar se existem correlações importantes entre variáveis, possibilitando a eliminação de informação redundante (sem contribuição adicional para a variância global), com a consequente diminuição da complexidade do sistema em apreço. De igual forma, permite destacar a existência de subgrupos dentro do conjunto inicial de objectos (os vinhos neste caso) evidenciando quais as variáveis que mais contribuem para essa eventual separação entre objectos.

A análise dos teores de 32 compostos em cerca de 70 vinhos comerciais, oriundos de diversas sub-regiões Alentejanas (8 no total), produzidos por 3 diferentes produtores (que desconhecemos), possibilita a obtenção de dados com um grande interesse para a caracterização dos objectos e avaliação da influência de alguns dos factores variantes dentro da amostragem global (cor, proveniência e produtor). Pelas suas características, a análise de componente principal apresenta-se como uma das ferramentas de eleição para alcançar tais propósitos.

### 3.2.9.1 Análise de componente principal efectuada com os vinhos comerciais

A identificação das variáveis utilizadas na análise de componentes principais encontra-se descrita na tabela 23, tendo sido essa a correspondência utilizada em todas as análises multivariável efectuadas posteriormente. As variáveis triptamina e β-feniletilamina, não foram utilizadas nos vinhos comerciais já que não foram quantificadas (*vide* tabelas A6 e A7). Estes compostos coeluiram da coluna cromatográfica, não sendo portanto integráveis individualmente os seus picos. As amostras de vinhos comerciais foram as primeiras a ser analisadas pelo método analítico entretanto desenvolvido, numa fase em que se verificava a co-eluição destes compostos. Mais tarde, veio a efectuar-se um ajuste no gradiente de eluição efectuado, de modo a conduzir a uma melhor separação destes compostos, e que resultou no gradiente apresentado na secção de material e métodos (*vide* tabela 8).

**Tabela 23.** Identificação das variáveis utilizadas na análise multivariável dos dados analíticos.

| Variável | Identificação | Variável | Identificação |
|---|---|---|---|
| asp | aspartato | phe | fenilalanina |
| glu | glutamato | ile | isoleucina |
| asn | asparagina | leu | leucina |
| ser | serina | orn | ornitina |
| gln | glutamina | lys | lisina |
| his | histidina | pro | prolina |
| gly | glicina | eta | etanolamina |
| thr | treonina | hta | histamina |
| cit | citrulina | mtl | metilamina |
| arg | arginina | etl | etilamina |
| ala | alanina | tir | tiramina |
| gab | ácido γ-aminobutírico | put | putrescina |
| tyr | tirosina | cad | cadaverina |
| val | valina | try | triptamina |
| met | metionina | fen | β-feniletilamina |
| trp | triptofano | iso | isoamilamina |

Todas as análises foram efectuadas com variáveis normalizadas, devido à grande diferença de valores absolutos existente entre elas. Se tal não tivesse sido feito, as variáveis com valor absoluto mais elevado poderiam ter tido um peso maior, apenas pelo facto da sua variância absoluta ser superior, podendo não reflectir necessariamente uma maior variância relativa.

A análise de componente principal efectuada com as 30 variáveis aminoácidos livres e aminas, disponíveis para este grupo de amostras, e os 67 objectos vinhos comerciais, originou a obtenção de 2 componentes principais que descrevem apenas 56,4 % da variância total da amostra. A tabela 24 mostra que são necessários 10 componentes principais para se explicar pelo menos 90 % da variância total do sistema.

**Tabela 24.** Percentagem cumulativa da variância total explicada pelos 10 primeiros componentes principais, obtidos com 30 variáveis.

| Componente Principal | Percentagem cumulativa da variância total explicada | Componente Principal | Percentagem cumulativa da variância total explicada |
|---|---|---|---|
| 1 | 43,1 | 6 | 81,4 |
| 2 | 56,4 | 7 | 84,2 |
| 3 | 66,5 | 8 | 86,8 |
| 4 | 73,8 | 9 | 88,9 |
| 5 | 77,9 | 10 | 90,7 |

A figura 64 mostra que as variáveis que têm maior peso no 2º componente principal são a metionina, a glutamina, a prolina (esta a única com peso negativo nos dois componentes) e as aminas histamina, etanolamina, tiramina, putrescina e etilamina. No 1º componente são todas as restantes com excepção da fenilalanina, da lisina e da isoamilamina, estas com baixo peso nos dois primeiros componentes principais.

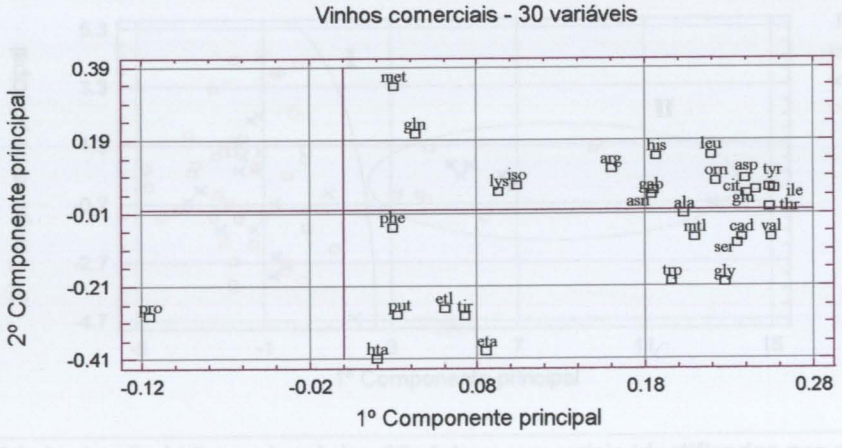



**Figura 64.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 56,4 % da variância total do sistema.

A projecção bidimensional dos 67 vinhos comerciais nos dois primeiros componentes principais – figura 65 – mostra que é possível distinguir dois grupos de vinhos com um posicionamento diferente, sobretudo em relação ao primeiro componente principal. Verifica-se ainda que os vinhos de Moura, Reguengos e Granja se encontram todos posicionados no grupo I, e que os vinhos do grupo I se posicionam ao longo do 2º componente principal, sendo mais afectados pelas variáveis metionina, glutamina, prolina, histamina, etanolamina, tiramina, putrescina e etilamina, ao contrário dos vinhos do grupo II.

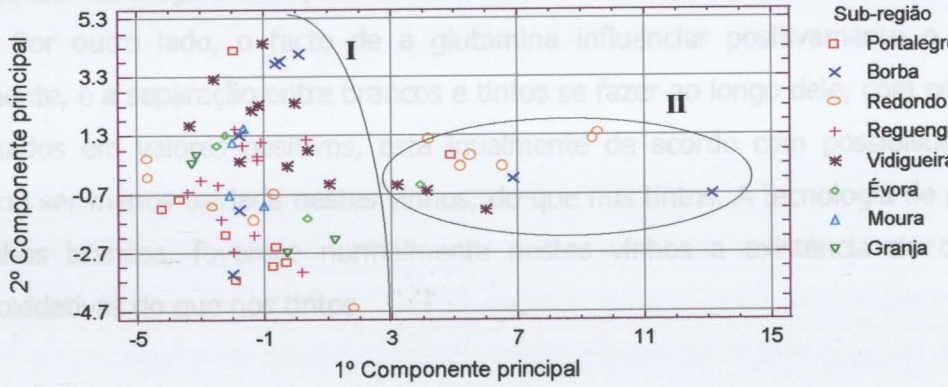



**Figura 65.** Projecção bidimensional dos 67 vinhos comerciais identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 56,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis.

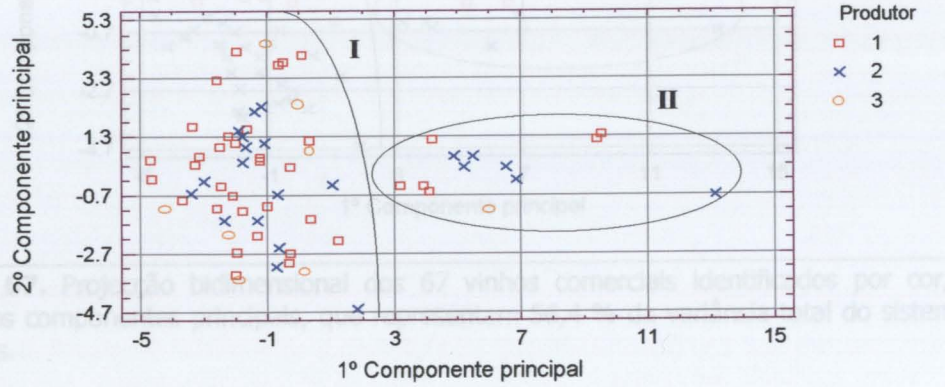



**Figura 66.** Projecção bidimensional dos 67 vinhos comerciais identificados por produtor, nos dois primeiros componentes principais, que representam 56,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis.

A figura 66 revela que não é o factor produtor que está na base da distinção entre os dois grupos uma vez que neles existem vinhos dos 3 diferentes produtores.

Na figura 67 podemos ver a distribuição dos 67 vinhos agora identificados pela cor. Numa primeira análise, podemos identificar que os vinhos brancos se encontram, na sua maioria, situados para valores positivos do segundo componente principal, enquanto que os tintos para valores negativos.

As variáveis que afectam negativamente esse componente são a prolina e as aminas histamina, tiramina, putrescina (estas, as 3 aminas biogénicas que ocorrem com maior frequência nos vinhos), e ainda as aminas voláteis etanolamina e etilamina. Isto está de acordo como facto de se considerar que, no geral, os vinhos tintos apresentam teores de aminas biogénicas superiores aos dos brancos.

Por outro lado, o facto de a glutamina influenciar positivamente o segundo componente, e a separação entre brancos e tintos se fazer ao longo dele, com os brancos posicionados em valores positivos, está igualmente de acordo com possibilidade de a glutamina ser menos oxidada nestes vinhos, do que nos tintos. A tecnologia de produção dos vinhos brancos, favorece normalmente nestes vinhos a existência de condições menos oxidativas do que nos tintos.

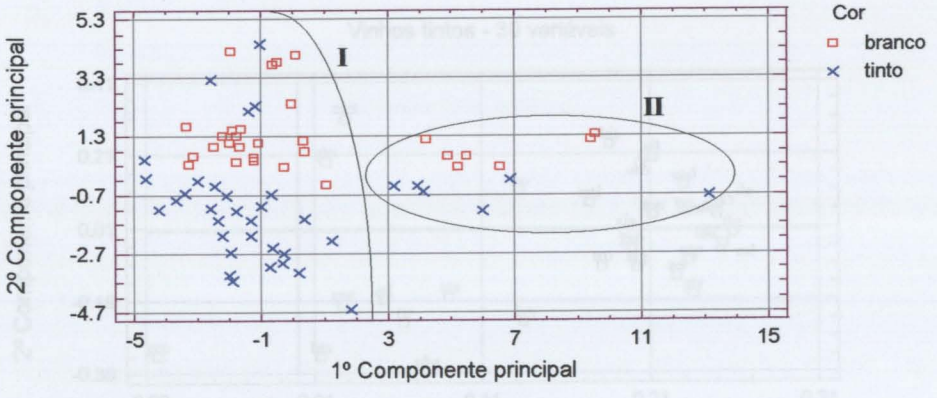



**Figura 67.** Projecção bidimensional dos 67 vinhos comerciais identificados por cor, nos dois primeiros componentes principais, que representam 56,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis.

Apesar de não parecer ser o factor cor que está na base da distinção dos dois grupos I e II, é possível ver na figura 67, que existem grupos distintos quer entre os vinhos tintos quer entre os vinhos brancos.

Decidimos então efectuar a análise de componente principal com as mesmas 30 variáveis, mas considerando os vinhos tintos e brancos separadamente.

A influência das variáveis nos dois primeiros componentes principais obtidos para apenas os 37 vinhos tintos, mantém-se de maneira idêntica ao verificado para os 67 vinhos em conjunto. Verifica-se no entanto que a lisina e a fenilalanina, bem como as algumas variáveis inicialmente com maior peso no 1º componente principal, passaram agora a influenciar também o 2º componente (figura 68).

A prolina encontra-se posicionada no extremo oposto dos restantes aminoácidos, o que está de acordo com o facto de se verificar normalmente um aumento dos teores de prolina e uma diminuição dos teores de aminoácidos assimiláveis até à maturação das uvas [32; 82; 143]. Assim, é de esperar que os teores de prolina mais elevados se registem em vinhos com menor conteúdo nos restantes aminoácidos, isto embora haja outros factores que influenciem os teores tanto de prolina como dos aminoácidos assimiláveis, como o sejam o ano de colheita, a origem geográfica ou a casta. Neste contexto, o 1º componente principal pode diferenciar os diferentes vinhos tintos pelo grau de maturação das uvas utilizadas para os produzir.

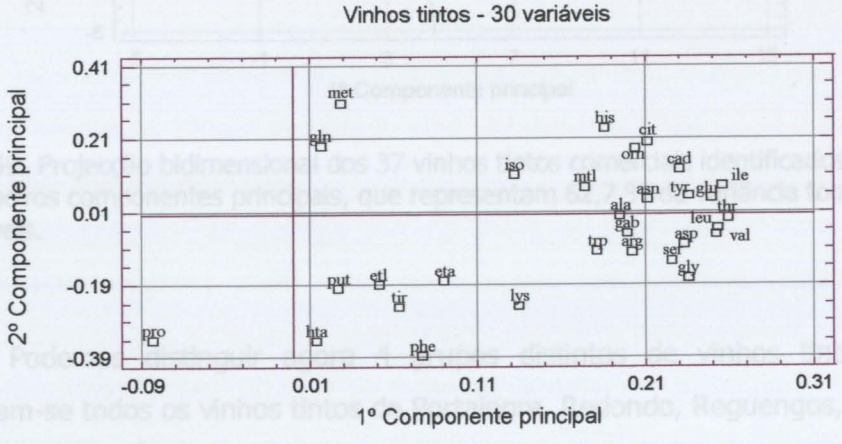



**Figura 68.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 62,7 % da variância total do sistema com 37 vinhos tintos.

É ainda de realçar que as variáveis putrescina e cadaverina, se posicionam com influências bastante distintas nos dois primeiros componentes principais (figura 68). A presença destas duas poliaminas é por vezes considerada como significado de contaminações microbiológicas provocadas de falta de higiene. Por outro lado, a putrescina, a histamina e a tiramina, apresentam influências semelhantes, sugerindo uma associação destas 3 aminas em determinados vinhos.

A figura 69, mostra a separação conseguida através da projecção dos vinhos tintos nos dois primeiros componentes principais. Estes dois componentes, são agora suficientes para representar 62,7 % da variância total dos sistema, com os dez primeiros componentes a representarem 93,7 %, valores superiores ao verificado com os 67 vinhos. Este facto resulta de se terem menos objectos no sistema e o mesmo número de variáveis.

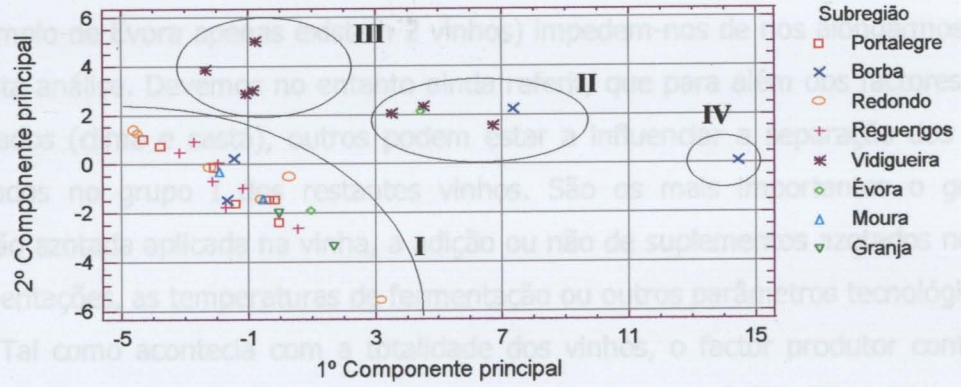



**Figura 69.** Projecção bidimensional dos 37 vinhos tintos comerciais identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 62,7 % da variância total do sistema com 30 variáveis.

Podemos distinguir agora 4 grupos distintos de vinhos tintos. No grupo I encontram-se todos os vinhos tintos de Portalegre, Redondo, Reguengos, Moura e Granja. Os 2 vinhos de Évora encontram-se distribuídos pelos grupos I e II. Os vinhos da Vidigueira, encontram-se exclusivamente no grupos II e III, e o grupo IV contém apenas um vinho de Borba, estando os restantes vinhos desta sub-região distribuídos pelos grupos I e II. A separação obtida sugere que os vinhos da Vidigueira se distinguem dos

vinhos das sub-regiões presentes de forma exclusiva no grupo I, com base essencialmente nas variáveis que agora mais afectam o 2º componente principal.

Pode ainda verificar-se que os vinhos da Vidigueira e de Borba se distribuem essencialmente ao longo do 1º componente. O que pode indicar que estes vinhos foram produzidos com uvas com uma maior heterogeneidade ao nível da maturação, ao contrário dos vinhos provenientes das outras regiões. É ainda possível que a esta separação, estejam associadas características específicas destas sub-regiões, relativamente às restantes. Esta influência, no caso da Vidigueira, pode dever-se ao facto de esta sub-região apresentar um microclima muito específico, proporcionado pela barreira orográfica aos ventos do Norte que a Serra de Portel constitui. É nesta sub-região onde se verificam as maiores amplitudes térmicas do Alentejo.

Já no caso de Borba (e Évora), é possível que o factor importante não seja de cariz edafo-climático, mas que se relacione com a diferente composição, em termos de castas, dos vinhos posicionados fora do grupo I. A falta de informação acerca da composição específica de cada um dos vinhos comerciais, em termos da percentagem de cada casta nesses vinhos, e o pequeno número de objectos em algumas das sub-regiões (por exemplo de Évora apenas existem 2 vinhos) impedem-nos de nos alongarmos muito mais nesta análise. Devemos no entanto ainda referir, que para além dos factores acima mencionados (clima e casta), outros podem estar a influenciar a separação dos vinhos posicionados no grupo I dos restantes vinhos. São os mais importantes o grau de fertilização azotada aplicada na vinha, a adição ou não de suplementos azotados no início das fermentações, as temperaturas de fermentação ou outros parâmetros tecnológicos.

Tal como acontecia com a totalidade dos vinhos, o factor produtor continua a não ter influência na separação obtida, uma vez que nos grupos I, II e III, existem vinhos dos três diferentes produtores.

À imagem do que fizemos com os tintos, se agora consideramos as mesmas 30 variáveis e projectarmos os 30 vinhos brancos nos dois primeiros componentes com elas obtidos, obtemos um sistema em que os dois primeiros componentes principais explicam 66,9 % da variância total do sistema e que os primeiros dez componentes explicam 95,8 %.

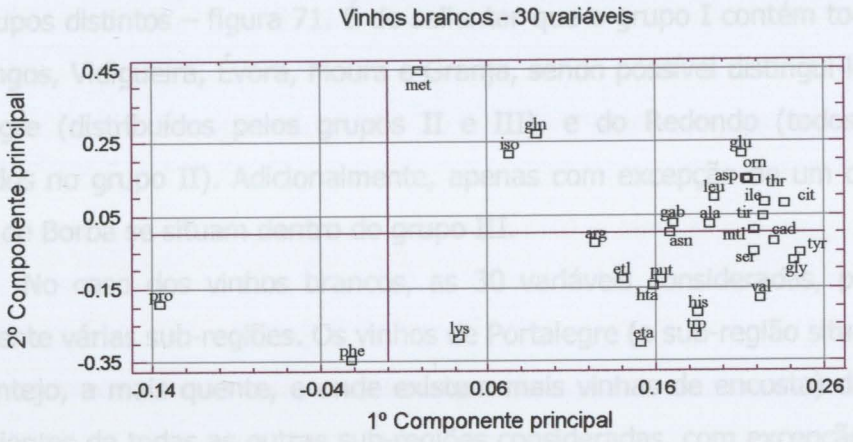



**Figura 70.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 66,9 % da variância total do sistema com 30 vinhos brancos.

Na figura 70, pode observar-se que as variáveis metionina e prolina, tal como nos tintos, são importantes na distribuição dos vinhos brancos ao longo do 2º componente principal. As aminas biogénicas histamina, tiramina, putrescina e as voláteis etilamina e etanolamina, deixam agora de ter apenas influência no 2º componente, passando também a contribuir para a distribuição dos objectos ao longo do 1º componente principal.

Tal como acontecia nos vinhos tintos, a prolina apresenta uma influência contrária à dos aminoácidos assimiláveis no 1º componente principal.

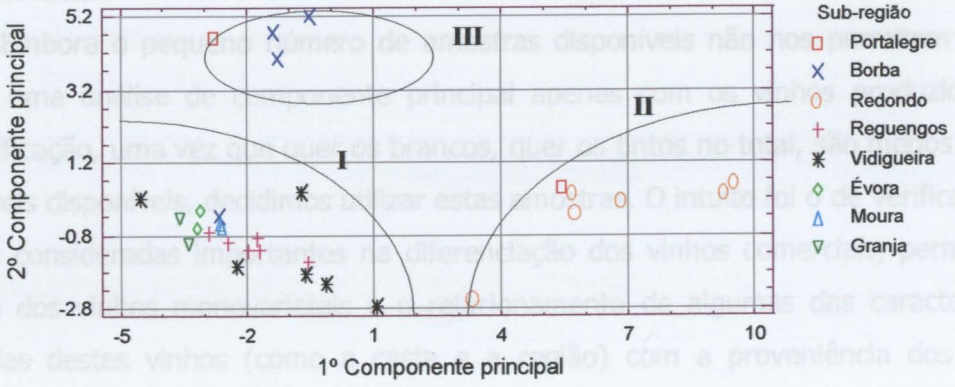



**Figura 71.** Projecção bidimensional dos 30 vinhos brancos comerciais identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 66,9 % da variância total do sistema com 30 variáveis.

As 30 variáveis consideradas, permitem a separação dos 30 vinhos brancos em três grupos distintos – figura 71. É de salientar que o grupo I contém todos os vinhos de Reguengos, Vidigueira, Évora, Moura e Granja, sendo possível distingui-los dos vinhos de Portalegre (distribuídos pelos grupos II e III), e do Redondo (todos exclusivamente colocados no grupo II). Adicionalmente, apenas com excepção de um objecto, todos os vinhos de Borba se situam dentro do grupo III.

No caso dos vinhos brancos, as 30 variáveis consideradas, permitem separar claramente várias sub-regiões. Os vinhos de Portalegre (a sub-região situada mais a Norte no Alentejo, a mais quente, e onde existem mais vinhas de encosta) distinguem-se dos provenientes de todas as outras sub-regiões consideradas, com excepção das de Borba e Redondo (as sub-regiões que se seguem a Portalegre se caminharmos para Sul – *vide* figura 5). Saliente-se que dos ponto de vista climático, orográfico e até viticultural, Portalegre é a sub-região que mais se distingue das restantes.

A região do Redondo (sub-região perfeitamente delimitada por limites naturais) sobressai perfeitamente das restantes (exceptuando a de Portalegre), estando os seus vinhos todos agrupados no grupo II. Como se verificou com os tintos, os vinhos brancos de Borba distinguem-se quase todos dos restantes vinhos (aqui, com excepção dos de Portalegre).

O factor produtor parece também não ter influência na separação dos diferentes grupos de vinhos brancos, embora todos os objectos do grupo III pertençam ao produtor 1.

### 3.2.9.2 Análise de componente principal efectuada com os vinhos monovarietais

Embora o pequeno número de amostras disponíveis não nos permitam sequer efectuar uma análise de componente principal apenas com os vinhos produzidos por microvinificação, uma vez que quer os brancos, quer os tintos no total, são menos do que as variáveis disponíveis, decidimos utilizar estas amostras. O intuito foi o de verificar se as variáveis consideradas importantes na diferenciação dos vinhos comerciais, permitem a distinção dos vinhos monovarietais e o relacionamento de algumas das características conhecidas destes vinhos (como a casta e a região) com a proveniência dos vinhos comerciais.

Uma das formas de se verificar a estabilidade dos sistemas de componentes principais obtidos com uma determinada matriz, é a introdução de pequenas alterações

na matriz de dados original [294], que não deverão introduzir grandes modificações na projecção espacial dos objectos. Só então se poderá considerar real a estrutura observada.

Assim, ao grupo inicial de 30 vinhos brancos comerciais de 1997, foram acrescentados os 19 vinhos brancos monovarietais (castas Roupeiro, Antão Vaz, Rabo de Ovelha, Perrum e Arinto) produzidos em 1997 (10) e 1998 (9), e ao grupo de 37 vinhos tintos acrescentados os 19 vinhos tintos monovarietais (castas Aragonez, Tinta Caiada, Castelão, Moreto e Trincadeira).

A introdução de novos objectos nas duas matrizes iniciais referentes aos vinhos brancos e tintos comerciais de 1997, provocou alterações significativas quer no peso das variáveis em cada um dos componentes principais – figuras 72 e 75 – quer na projecção dos objectos nos dois primeiros componentes principais agora obtidos – figuras 73 e 76 – o que pode ser devido ao grande número (relativamente às matrizes originais) de novos objectos introduzidos. Por outro lado, o facto de se terem incluído vinhos de um novo ano (os vinhos de 1998), pode igualmente ter influenciado a importância de cada variável na construção dos novos componentes principais.

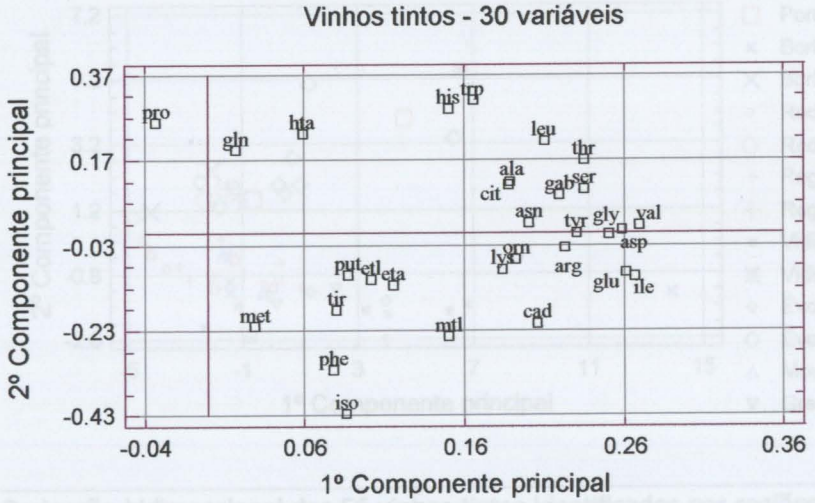



**Figura 72.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 51,4 % da variância total do sistema com 56 vinhos tintos.

No caso dos vinhos tintos, o peso de algumas variáveis como a prolina, a glutamina, a histamina ou a metionina (figura 72) nos dois primeiros componentes

principais, alterou-se significativamente em relação ao observado com apenas 37 objectos (figura 68), bem como a percentagem da variância total explicada pelo sistema, que baixou para os 51,4 % (dos 62,7 %, com 37 vinhos). Esta modificação, provocou alterações significativas na projecção dos 37 vinhos tintos da matriz inicial, com a qual era possível por exemplo distinguir os vinhos de Vidigueira dos das restantes sub-regiões (com excepção de Évora e Borba).

Todos os vinhos tintos monovarietais, resultantes das microvinificações, se encontram posicionados para valores positivos do 2º componente principal (figura 73), ao contrário dos vinhos comerciais, posicionados maioritariamente para valores negativos do 2º componente. Ambos os grupos se distribuem ao longo do 1º componente principal.

Pela distribuição relativa dos vinhos comerciais e monovarietais, verifica-se que não foi possível associar proveniências idênticas dos dois grupos de vinhos, estando os vinhos monovarietais de uma determinada sub-região bastante afastados, no geral, dos vinhos comerciais da mesma sub-região.

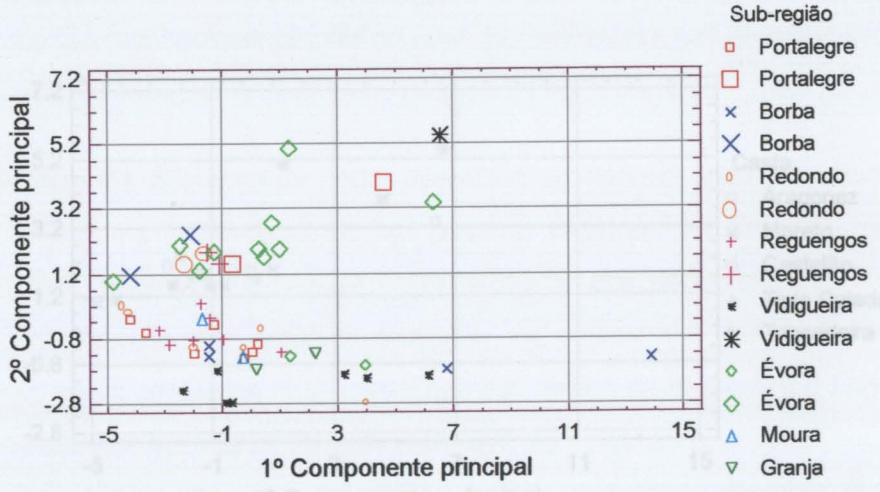



**Figura 73.** Projecção bidimensional dos 56 vinhos tintos identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 51,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis.

Nota: os símbolos maiores referem-se aos vinhos monovarietais.

De forma nítida, o 2º componente principal permite distinguir entre vinhos comerciais e vinhos monovarietais, enquanto que o 1º componente influencia a projecção

dos vinhos das diferentes proveniências em cada um dos subgrupos (comerciais e monovarietais).

Para se perceber de que forma os vinhos monovarietais se distribuem no sistema de componentes principais obtidos com as 30 variáveis e os 56 objectos, identificamos apenas esses 19 objectos com as respectivas castas. A figura 74 mostra a projecção bidimensional apenas dos 19 vinhos monovarietais nos dois primeiros componentes principais. É possível verificar-se uma dispersão considerável entre os vinhos monovarietais das castas Aragonez e Moreto (da mesma sub-região), de anos diferentes.

É possível que a proximidade entre os vinhos monovarietais das castas Trincadeira e Castelão (figura 74) e os comerciais das sub-regiões Redondo, Portalegre e Reguengos (figura 73), se deva ao facto de essas castas serem: a Trincadeira, importante nos encepamentos de Portalegre, Borba, Redondo, Évora e Reguengos, e a Castelão a casta mais importante em todas as sub-regiões vitícolas do Alentejo, com excepção da Granja/Amareleja.

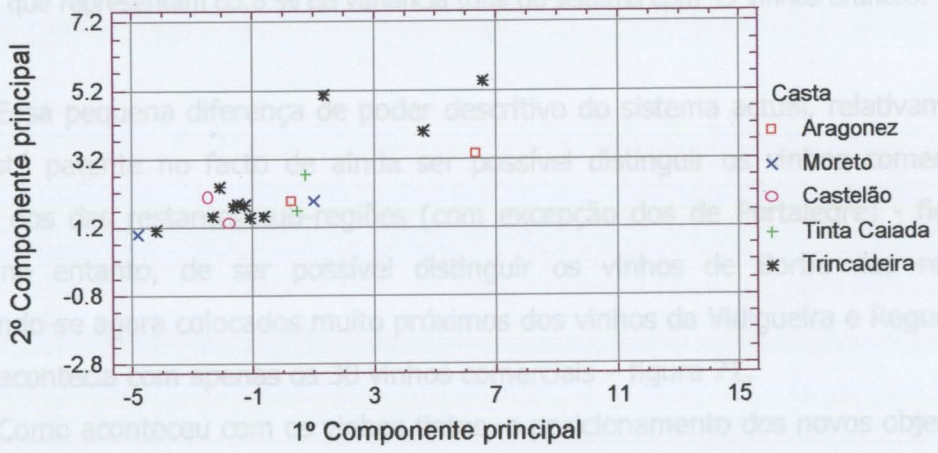



**Figura 74.** Projecção bidimensional dos 19 vinhos tintos identificados por castas, nos dois primeiros componentes principais, que representam 51,4 % da variância total do sistema com 30 variáveis.

Tal como havia acontecido com os vinhos tintos, também a introdução dos 19 novos objectos, na matriz de vinhos brancos comerciais inicial, provocou alterações na

forma como algumas variáveis contribuem para cada um dos dois primeiros componentes principais (figura 75). A prolina, a fenilalanina e a lisina são alguns exemplos. Apesar dessas alterações, a percentagem de variância explicada pelos dois primeiros componentes principais (60,6 %), não é muito inferior à obtida para a matriz com apenas 30 vinhos brancos comerciais (66,9 %).

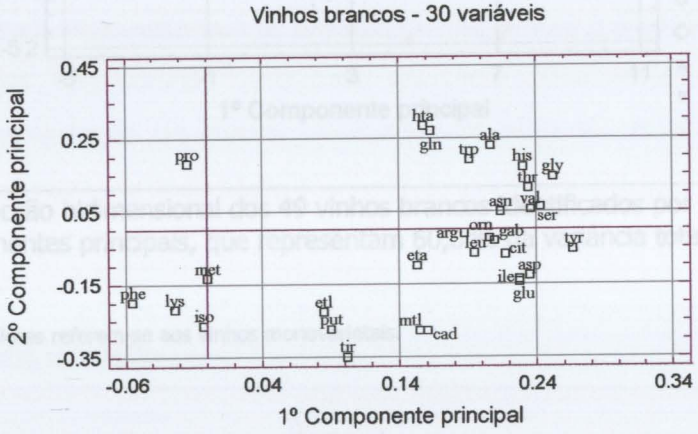



**Figura 75.** Projecção bidimensional da influência das 30 variáveis nos dois primeiros componentes principais, que representam 60,6 % da variância total do sistema com 49 vinhos brancos.

Essa pequena diferença de poder descritivo do sistema actual, relativamente ao inicial, está patente no facto de ainda ser possível distinguir os vinhos comerciais do Redondo dos das restantes sub-regiões (com excepção dos de Portalegre) - figura 76. Deixou, no entanto, de ser possível distinguir os vinhos de Borba dos restantes, encontrando-se agora colocados muito próximos dos vinhos da Vidigueira e Reguengos, o que não acontecia com apenas os 30 vinhos comerciais – figura 71.

Como aconteceu com os vinhos tintos, o posicionamento dos novos objectos faz-se essencialmente para valores positivos do 2º componente principal, enquanto que os vinhos comerciais se colocam para valores negativos. A distinção dos vinhos dentro dos dois subgrupos faz-se principalmente, tal como para os tintos, à custa do 1º componente principal.

Se considerarmos apenas a distribuição dos objectos ao longo do 1º componente principal, verifica-se que os vinhos comerciais e monovarietais de Reguengos e Borba se encontram posicionados para valores muito próximos.

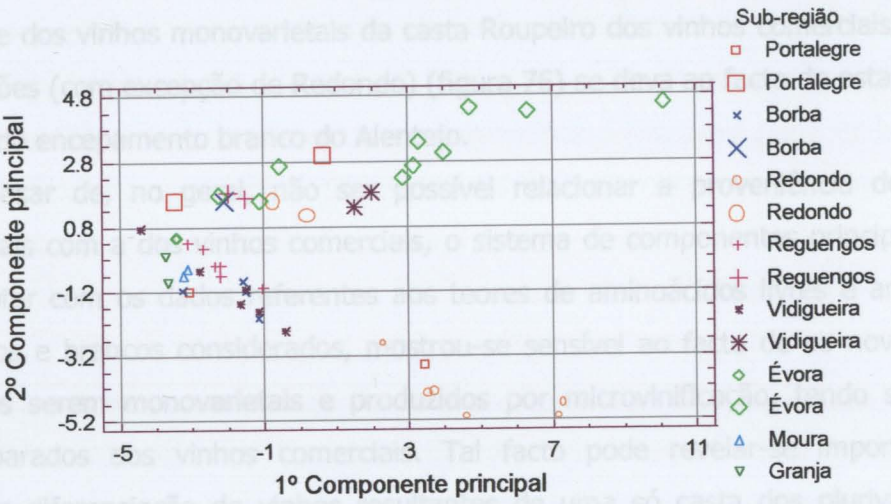



**Figura 76.** Projecção bidimensional dos 49 vinhos brancos identificados por regiões, nos dois primeiros componentes principais, que representam 60,6 % da variância total do sistema com 30 variáveis.

Nota: os símbolos maiores referem-se aos vinhos monovarietais.

Verifica-se ainda que os vinhos da casta Rabo de Ovelha dos dois anos 1997 e 1998 (ambos de Évora) são os que se distinguem mais entre eles, ao contrário dos vinhos das outras castas – figura 77.

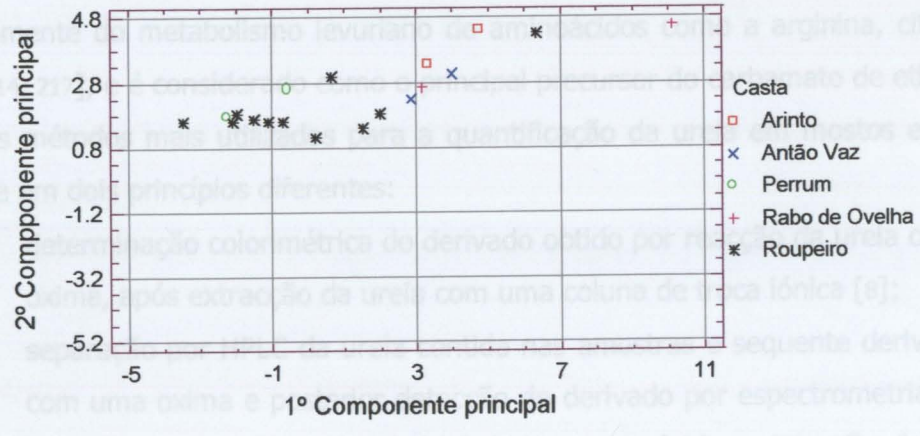



**Figura 77.** Projecção bidimensional dos 19 vinhos brancos identificados por castas, nos dois primeiros componentes principais, que representam 60,6 % da variância total do sistema com 30 variáveis.

Do mesmo modo que para a casta Trincadeira nos vinhos tintos, é possível que a proximidade dos vinhos monovarietais da casta Roupeiro dos vinhos comerciais de todas as sub-regiões (com excepção de Redondo) (figura 76) se deva ao facto de esta casta ser a principal do encepamento branco do Alentejo.

Apesar de, no geral, não ser possível relacionar a proveniência dos vinhos monovarietais com a dos vinhos comerciais, o sistema de componentes principais que é possível obter com os dados referentes aos teores de aminoácidos livres e aminas dos vinhos tintos e brancos considerados, mostrou-se sensível ao facto de os novos vinhos introduzidos serem monovarietais e produzidos por microvinificação, tendo sido estes vinhos separados dos vinhos comerciais. Tal facto pode revelar-se importante por exemplo na diferenciação de vinhos resultantes de uma só casta dos plurivarietais, e mesmo de vinhos monovarietais entre si.

## 3.3 Carbamato de etilo

O desenvolvimento de uma nova metodologia analítica que permite a quantificação do carbamato de etilo, surgiu na sequência da pesquisa efectuada no sentido do desenvolvimento de um método analítico para a quantificação da ureia em matrizes complexas como os mostos e vinhos, sem os inconvenientes dos métodos desenvolvidos até à data, como sejam a morosidade e complexidade das operações requeridas para a sua execução. A ureia é um composto azotado, proveniente maioritariamente do metabolismo levuriano de aminoácidos como a arginina, citrulina e ornitina [114; 217], e é considerado como o principal precursor do carbamato de etilo [184].

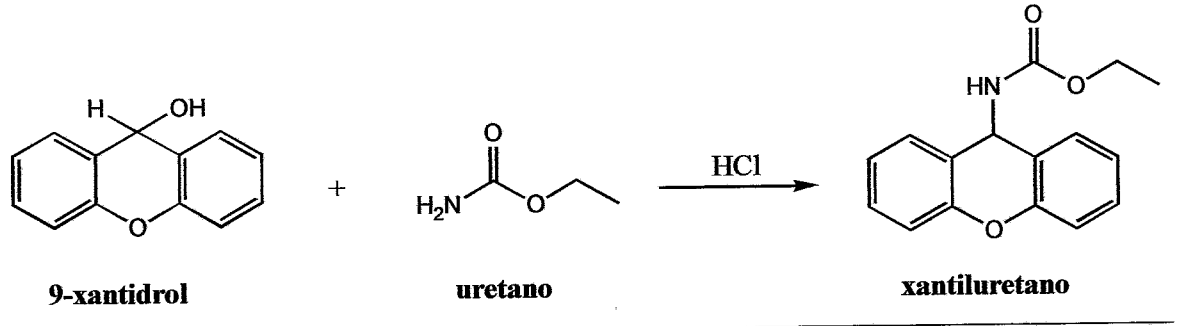
Os métodos mais utilizados para a quantificação da ureia em mostos e vinhos, baseiam-se em dois princípios diferentes:

- determinação colorimétrica do derivado obtido por reacção da ureia com uma oxima, após extracção da ureia com uma coluna de troca iónica [8];
- separação por HPLC da ureia contida nas amostras e sequente derivatização com uma oxima e posterior detecção do derivado por espectrometria de UV-Vis [174], ou degradação da ureia pela urease ácida e detecção da amónia produzida após reacção com OPA e detecção por fluorescência [89; 90; 249].

No entanto, estes métodos não se mostram efectivamente simples e rápidos para se poderem implementar, por exemplo, em análises de rotina.

No decorrer do trabalho de desenvolvimento de um método que pudesse substituir os existentes na quantificação da ureia, foi utilizado o reagente 9-xantidrol como reagente de derivatização da ureia. Este reagente, há muito que se sabe reagir com as aminas e amidas [55], e que foi utilizado na quantificação da ureia [141], embora aí por gravimetria. Mais recentemente, o 9-xantidrol foi também descrito como sendo útil na quantificação do carbamato de etilo, embora o método desenvolvido exija a precipitação prévia do derivado do carbamato de etilo, seguida de solubilização para posterior separação por GC e detecção por espectrometria de massa [93]. No entanto, a abordagem que fizemos da utilização do reagente 9-xantidrol na reacção com a ureia foi distinta da efectuada pelos outros autores. Em lugar de favorecermos a precipitação do derivado xantilureia como nos outros métodos, optamos por evitar a sua insolubilização, através do estudo da composição do meio reaccional, e sua posterior separação por HPLC e detecção selectiva por fluorescência. Da obtenção do derivado solúvel da ureia, rapidamente se passou para a obtenção do derivado solúvel do carbamato de etilo, composto com importância analítica e enológica superior, tendo posteriormente todo o método sido estudado e optimizado para a quantificação do carbamato de etilo, em detrimento da ureia.

A figura 78 mostra a formação do derivado do carbamato de etilo (uretano), por reacção com o 9-xantidrol, em meio ácido. A estrutura aromática do 9-xantidrol, faz com que ele seja um bom reagente de precipitação já que na reacção com as amidas e as aminas, passa de álcool a amida, sendo o último composto menos solúvel em meios polares. Em contrapartida, torna-se dificultada a solubilização dos derivados em meios aquosos, ou hidroalcoólicos como é o caso dos vinhos e aguardentes.




**9-xantidrol** **uretano** **xantiluretano**

**Figura 78.** Esquema reaccional da formação do xantiluretano a partir do 9-xantidrol e do uretano, em meio ácido.

O desenvolvimento do método de análise de carbamato de etilo, teve basicamente 4 etapas distintas, embora por vezes realizadas em simultâneo: a pesquisa de um bom solvente para a preparação do reagente 9-X; a optimização da composição do meio reaccional; o desenvolvimento de um método cromatográfico capaz da quantificação dos derivados do 9-X; e a validação da metodologia analítica desenvolvida.

### 3.3.1 Estudo da formulação do reagente 9-xantidrol

A preparação da solução de reagente 9-X tem dois aspectos que são fundamentais no sucesso de obtenção de um meio reaccional que permita a solubilização dos derivados do 9-X. O primeiro é o solvente utilizado para a dissolução do composto, e o segundo é a concentração do composto na solução de reagente.

Na procura de um solvente que permitisse a solubilização do 9-X e dos derivados xantidril, foram estudados os seguintes solventes: acetonitrilo, metanol, etanol, tetrahidrofurano, 1-propanol e 1-butanol. O solvente do 9-X tem que obedecer a três requisitos fundamentais, como ser miscível em água, ser relativamente polar para favorecer a reacção de derivatização, e favorecer a solubilidade dos derivados formados. De todos os solventes estudados, o 1-propanol foi o que conduziu a melhores resultados, quer em termos de rendimento de reacção quer em termos da solubilidade dos produtos da reacção. A reacção em presença do 1-butanol como solvente, colocou problemas ao nível da homogeneidade do meio reaccional, devido à grande viscosidade deste solvente.

A concentração do 9-xantidrol foi determinada em simultâneo com a determinação das melhores condições de derivatização, nomeadamente no estudo da melhor razão molar de $H^+$/9-xantidrol. Verificou-se o aumento do rendimento da reacção com o aumento da concentração do reagente 9-X, sendo a razão molar $H^+$/9-xantidrol igualmente importante, já que a reacção é catalizada em meio ácido (figura 77). Este último factor, acabou por ser o mais importante, como se verá mais adiante.

### 3.3.2 Optimização das condições reaccionais

A optimização da composição do meio reaccional, teve sempre duas preocupações fundamentais, que se resumem na obtenção de um rendimento adequado

da reacção de derivatização, e ao mesmo tempo evitar a precipitação dos derivados formados.

Foram estudadas: a razão molar de $H^+$/9-xantidrol; o tipo de catalisador ácido utilizado (clorídrico, acético e sulfúrico); e o tempo de reacção.

Utilizando-se o HCl, o estudo da melhor razão molar $H^+$/9-xantidrol, foi efectuado com base na relação entre a área do pico da ureia e a respectiva razão molar.

Como se referiu anteriormente, esta parte do estudo foi efectuado ainda com a ureia como analito, tendo a transposição dos resultados obtidos para o carbamato de etilo sido efectuada com resultados muito satisfatórios. Na figura 79 é possível verificar-se que a área do pico de uma mesma solução, constituída por iguais volumes de um vinho tinto do Alentejo e de uma solução de ureia (5 mg/L), atinge um máximo para uma razão molar de cerca de 36, possivelmente por haver um maior rendimento da reacção de derivatização.

Na prática, usou-se uma razão molar de 37,5, por conveniência da preparação das soluções de reagente e de ácido e da medição dos volumes durante a reacção de derivatização, verificando-se uma diminuição de cerca de 6 % na área do pico.

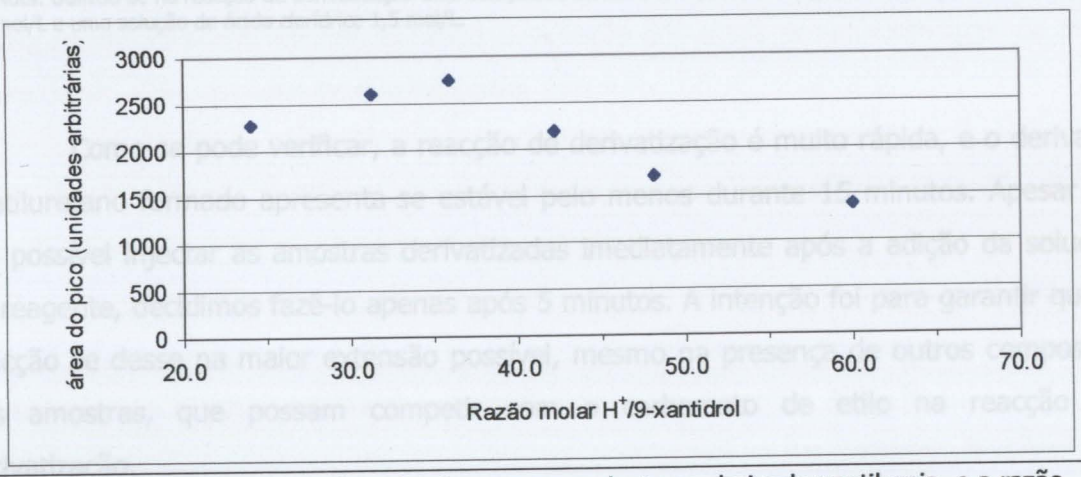



**Figura 79.** Relação entre a área do pico correspondente ao derivado xantilureia, e a razão molar de $H^+$/9-xantidrol.

Nota: Utilizou-se como amostra uma solução constituída por volumes iguais de um vinho tinto do Alentejo e de uma solução 5 mg/L de ureia.

Foram ainda comparados 3 diferentes ácidos, na reacção de derivatização. Não tendo sido encontradas diferenças significativas no rendimento das reacções de

derivatização (avaliadas pela mediação da área do pico de uma mesma solução de ureia), com a utilização do ácido sulfúrico, do ácido acético ou do ácido clorídrico.

Para o estudo do tempo de reacção, foi determinada a área do pico do derivado xantiluretano, para diferentes tempos de reacção. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na figura 80.

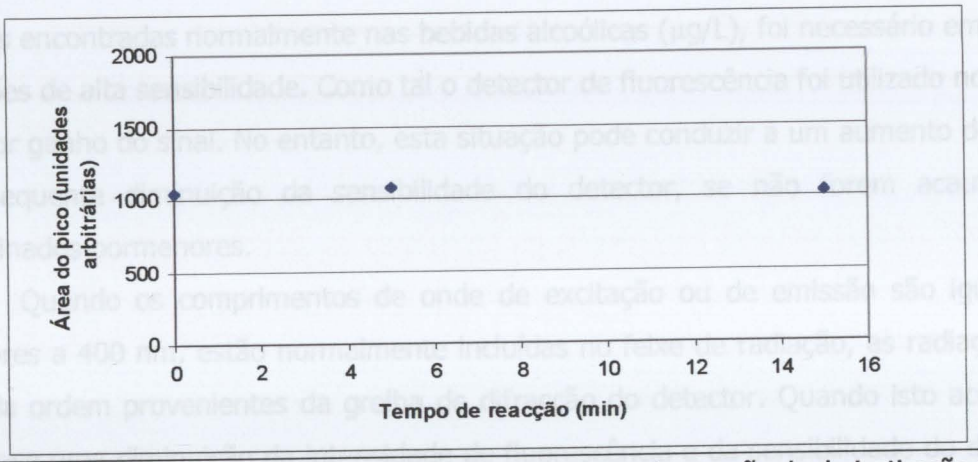



**Figura 80.** Influência do tempo de reacção no rendimento da reacção de derivatização do carbamato de etilo.

Nota: Utilizou-se na reacção de derivatização uma solução de carbamato de etilo 100 μg/L, uma solução de 9-X 0,02 mol/L e uma solução de ácido clorídrico 1,5 mol/L.

Como se pode verificar, a reacção de derivatização é muito rápida, e o derivado xantiluretano formado apresenta-se estável pelo menos durante 15 minutos. Apesar de ser possível injectar as amostras derivatizadas imediatamente após a adição da solução de reagente, decidimos fazê-lo apenas após 5 minutos. A intenção foi para garantir que a reacção se desse na maior extensão possível, mesmo na presença de outros compostos nas amostras, que possam competir com o carbamato de etilo na reacção de derivatização.

### 3.3.3 Desenvolvimento do método de separação por HPLC e quantificação por fluorescência

Esta etapa foi sendo levada a cabo durante a optimização da composição do meio reaccional, e começou pela definição dos comprimentos de onda de excitação e emissão a que seria efectuada a detecção após a cromatografia. A selecção dos

comprimentos de onda óptimos, efectuou-se por injecção de uma solução de xantilureia, e detecção utilizando-se todos os comprimentos de onda possíveis quer na excitação quer na emissão. Aquando do início da detecção do pico da xantilureia, a bomba dos eluentes era parada, sendo posteriormente efectuados espectros de excitação e emissão ao composto presente no detector. Os comprimentos de onda que se mostraram mais apropriados para a excitação e para a emissão foram 233 nm e 600 nm.

Para ser possível a detecção de quantidades de carbamato de etilo, tão baixas como as encontradas normalmente nas bebidas alcoólicas (μg/L), foi necessário empregar condições de alta sensibilidade. Como tal o detector de fluorescência foi utilizado no modo de maior ganho do sinal. No entanto, esta situação pode conduzir a um aumento do ruído e consequente diminuição da sensibilidade do detector, se não forem acautelados determinados pormenores.

Quando os comprimentos de onde de excitação ou de emissão são iguais ou superiores a 400 nm, estão normalmente incluídas no feixe de radiação, as radiações de segunda ordem provenientes da grelha de difracção do detector. Quando isto acontece, verifica-se uma diminuição da intensidade de fluorescência e da sensibilidade do detector em análises de alta sensibilidade, e há necessidade da utilização de filtros de absorção (também designados por filtros "cut-off"), que eliminem a presença dessa radiação. A utilização destes filtros, elimina também a radiação difractada proveniente quer do feixe de excitação, quer do feixe de fluorescência.

Nas condições estabelecidas neste trabalho, apenas a radiação de fluorescência (emissão) foi superior a 400 nm. Deste modo, apenas foi necessária a utilização de um filtro de absorção, entre a célula e o detector de fluorescência.

Apesar de não ter sido possível a utilização de um filtro com uma maior gama de absorção do que o utilizado (280 nm), por exemplo de 430 nm, uma vez que não existia disponível, o que podia melhorar as características de detecção do método, o filtro de absorção empregue proporcionou um aumento considerável na sensibilidade de detecção.

No que diz respeito à separação cromatográfica dos derivados do 9-X, desenvolveu-se um programa gradiente relativamente elaborado (*vide* tabela 11), e que englobou duas fases distintas: a primeira, dos 0 aos 18 minutos, destinada a separar o derivado xantiluretano dos diversos compostos detectados nas condições empregues, e a segunda, dos 18 aos 29 minutos, com o objectivo de eluir os compostos menos polares e de preparar a coluna analítica para uma nova análise.

Com a coluna analítica utilizada (AminoQuant 200 x 2,1 mm Hewlett Packard, com partículas de 5 μm), a passagem lenta dos 45 % para os 50 % (v/v) do eluente B (acetonitrilo) nos primeiros 18 minutos do programa gradiente, revelou-se necessária para uma separação satisfatória do pico do xantiluretano dos restantes compostos. A separação dos derivados do 9-xantidrol mostrou-se muito sensível à composição do eluente, provavelmente devido à sua porção xantidril que os torna relativamente idênticos em questões de polaridade. É no entanto possível, que com a utilização de outra coluna analítica, com outras características cromatográficas, seja possível realizar uma separação isocrática dos compostos de interesse num espaço de tempo razoável, com a consequente simplificação da metodologia.

A primeira parte do programa gradiente foi mantida até aos 18 minutos, para permitir a quantificação futura do carbamato de propilo (um possível padrão interno, já que parece não se formar nas bebidas alcoólicas em quantidades detectáveis [65]) como uma melhoria da técnica analítica. No entanto, esta primeira parte do gradiente pode ser reduzida para 11 minutos (diminuindo o tempo de análise), se a segunda parte do programa de eluição for iniciado imediatamente após a eluição do pico correspondente ao xantiluretano.

Na segunda parte do programa gradiente (*vide* tabela 11), o aumento da proporção do eluente B (acetonitrilo) para 100 % faz-se em 1 minuto, ao passo que o aumento do fluxo para 0,8 ml/min se faz em dois minutos, de maneira a evitar um aumento acentuado na pressão, que ocorria se a alteração dos dois parâmetros fosse realizada simultaneamente num espaço de tempo curto como aquele que se utiliza.

### 3.3.4 Validação do método analítico

#### 3.3.4.1 Aplicabilidade, especificidade e interferências

A metodologia desenvolvida aplica-se à análise de bebidas alcoólicas e de soluções hidroalcoólicas de carbamato de etilo. O reagente de derivatização utilizado (9-xantidrol) é específico para os grupos amina e amida, através de uma reacção de substituição nucleofílica, na qual o grupo amina ou amida actua como um nucleófilo.

No sentido de se estudar a possível interferência da matriz, foram estudadas várias aminas e aminoácidos normalmente presentes no vinhos. Essas substâncias foram: a etilamina, a etanolamina, a metilamina, a histamina, a β-feniletilamina, a triptamina, a tiramina, a putrescina, a cadaverina e a isoamilamina, e o aspartato, o glutamato, a

asparagina, a serina, a glutamina, a histidina, a glicina, a treonina, a citrulina, a arginina, a alanina, o γ-aminobutirato, a tirosina, a valina, a metionina, o triptofano, a fenilalanina, a isoleucina, a leucina, a ornitina, a lisina e a prolina. A concentração média dos aminoácidos na solução padrão analisada era de 22 mg/L, com excepção da arginina (90 mg/L) e da prolina (509 mg/L), e das aminas de 8,4 mg/L. Nenhum destes compostos interferiu com a correcta quantificação do pico correspondente ao derivado do carbamato de etilo. Da mesma forma, também não foi verificada interferência de altos teores de açúcares redutores, como acontece com certos vinhos licorosos, na reacção de derivatização.

### 3.3.4.2 Linearidade

A resposta do detector de fluorescência mostrou-se linear na gama de concentrações de carbamato de etilo dos 5 aos 550 μg/L (figura 81).

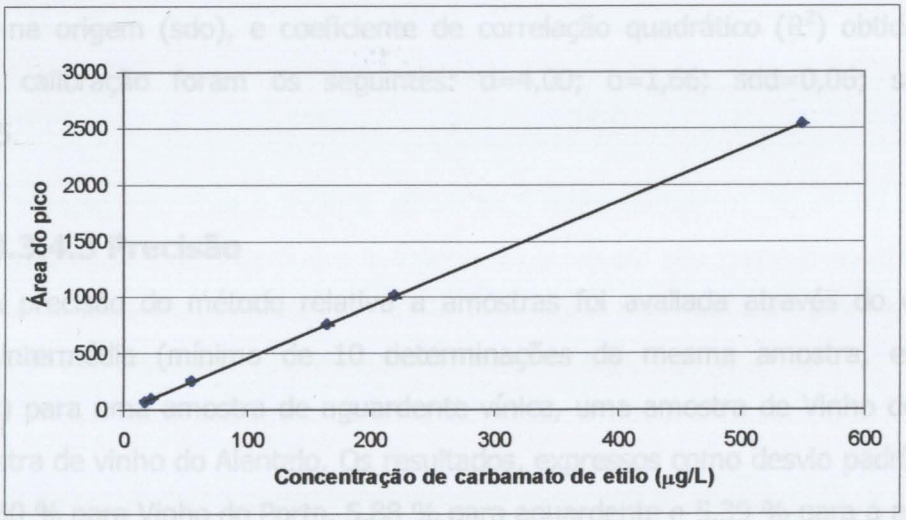



**Figura 81.** Curva de calibração obtida para soluções padrão na gama de concentrações dos 16,5 μg/L aos 549 μg/L.

Nota - Os parâmetros da recta são: ordenada na origem = 1, 08; declive = 4,62; $R^2$ = 1,0.

Contudo, e devido aos baixos níveis normalmente encontrados nas bebidas alcoólicas estudadas, bem como aos limites máximos recomendados, a curva de calibração foi estudada na gama de concentrações de maior aplicabilidade do método – dos 5 aos 150 μg/L de CE (figura 82).

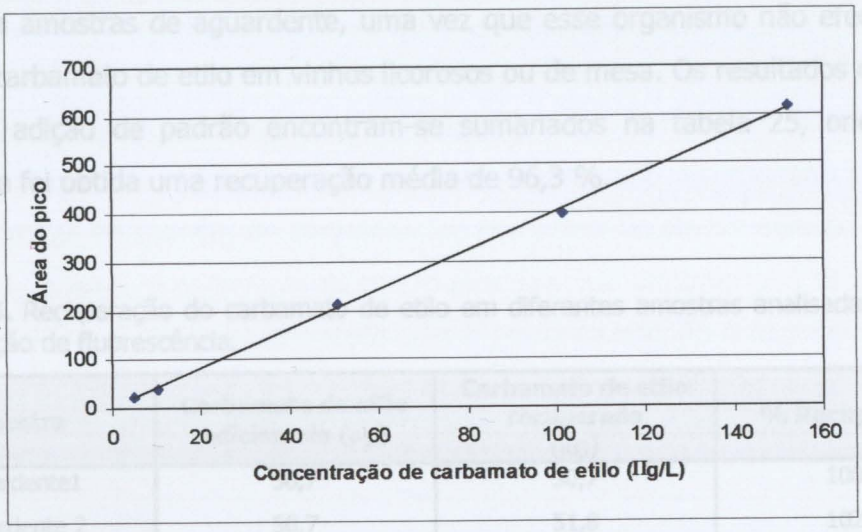



**Figura 82.** Curva de calibração obtida para soluções padrão na gama de concentrações dos 5,1 µg/L aos 152,1 µg/L.

Nota - Os parâmetros da recta são: ordenada na origem = 1, 66; declive = 4,00; $R^2$ = 0,9995.

Na gama de concentrações utilizada, os valores médios (de 3 determinações) do declive (d), da ordenada na origem (o), desvio padrão do declive (sdd), desvio padrão da ordenada na origem (sdo), e coeficiente de correlação quadrático ($R^2$) obtidos para a curva de calibração foram os seguintes: d=4,00; o=1,66; sdd=0,06; sdo=2,9 e $R^2$=0,9995.

### 3.3.4.3 Precisão

A precisão do método relativa a amostras foi avaliada através do cálculo da precisão intermédia (mínimo de 10 determinações da mesma amostra, em 3 dias diferentes) para uma amostra de aguardente vínica, uma amostra de Vinho do Porto, e uma amostra de vinho do Alentejo. Os resultados, expressos como desvio padrão relativo foram: 7,60 % para Vinho do Porto, 5,88 % para aguardente e 5,39 % para a amostra de vinho do Alentejo. A precisão média obtida para as diferentes amostras foi de 6,3 %.

### 3.3.4.4 Exactidão

A exactidão foi avaliada pelo método da adição de padrão, com uma amostra de aguardente vínica, de Vinho do Porto e de vinho do Alentejo, e ainda por comparação dos resultados obtidos pelo método presente, com os obtidos para as mesmas amostras de aguardente, por GC-MS através do método oficial [202], no BNIC (Bureau National Interprofissionnel du Cognac - França). Apenas foram comparados os resultados

referentes a amostras de aguardente, uma vez que esse organismo não efectua análise do teor de carbamato de etilo em vinhos licorosos ou de mesa. Os resultados obtidos pelo método da adição de padrão encontram-se sumariados na tabela 25, onde se pode verificar que foi obtida uma recuperação média de 96,3 %.

**Tabela 25.** Recuperação do carbamato de etilo em diferentes amostras analisadas por HPLC com detecção de fluorescência.

| Amostra | Carbamato de etilo adicionado (μg) | Carbamato de etilo recuperado (μg) | % Recuperação |
|---|---|---|---|
| Aguardente1 | 50,7 | 50,7 | 100,0 |
| Aguardente 2 | 50,7 | 51,8 | 102,2 |
| Aguardente 3 | 50,7 | 51,3 | 101,1 |
| Aguardente 4 | 50,7 | 45,1 | 89,0 |
| Vinho do Porto 1 | 50,7 | 46,2 | 91,1 |
| Vinho do Porto 2 | 50,7 | 45,1 | 89,0 |
| Vinho do Porto 3 | 50,7 | 53,5 | 105,5 |
| Vinho do Porto 4 | 50,7 | 47,2 | 93,0 |
| Vinho branco 1 | 50,7 | 49,4 | 97,5 |
| Vinho branco 2 | 50,7 | 48,0 | 94,6 |
| **Média** | **50,7** | **48,8** | **96,3** |

A comparação com o método oficial está representada na figura 83. É possível verificar nesta figura que o declive e a ordenada na origem são respectivamente iguais a 1 e a 0 (com uma probabilidade de 97,5 %), sendo por isso concluído que os dois métodos originam resultados que não diferem entre si significativamente.

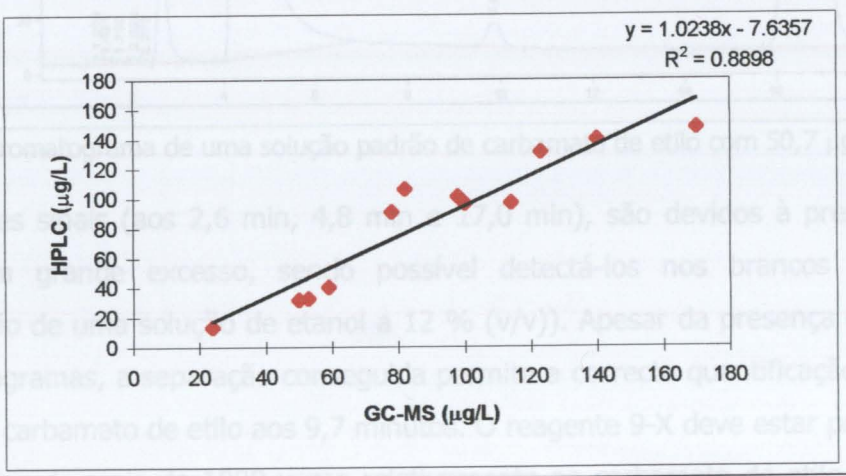



**Figura 83.** Comparação dos valores obtidos na análise do teor de carbamato de etilo em amostras de aguardente, por HPLC e por GC-MS.

Os valores obtidos para a precisão e exactidão, indicam que o método é suficientemente preciso e exacto para se poder comparar com os métodos de análise por GC-MS, incluindo o de referência [48; 56; 168; 202]. Estes parâmetros podem ainda ser melhorados através da utilização de um padrão interno como o carbamato de propilo, e da automatização da reacção de derivatização, por utilização de um injector automático. Como padrão interno, o carbamato de metilo não deve ser utilizado com este método, já que o factor de resposta deste composto com o presente método é da mesma ordem de grandeza (o que não acontece com outros métodos [27]), tendo sido detectado (aos 6,9 minutos) numa amostra de aguardente contendo altos níveis de carbamato de etilo (> 500 μg/L).

### 3.3.4.5 Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado com base na curva de calibração. O valor médio obtido – 4,2 μg/L – é comparável aos obtidos para o método de referência ou similares [59; 157; 202].

A análise de uma solução padrão (figura 84) mostra a existência de vários picos cromatográficos, para além do correspondente ao derivado do carbamato de etilo.

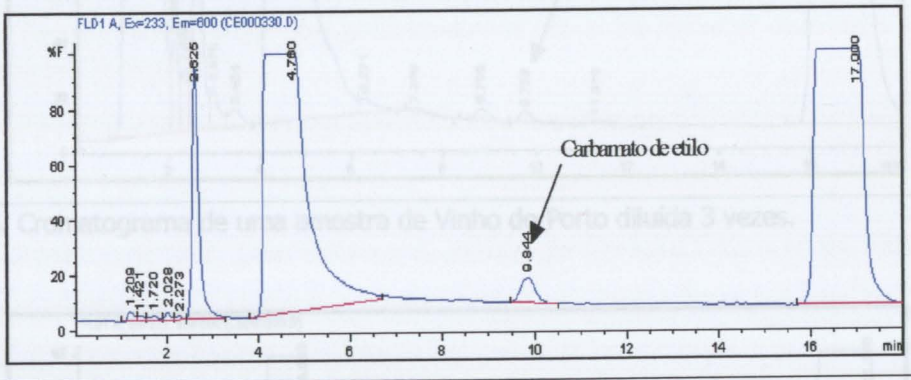



**Figura 84.** Cromatograma de uma solução padrão de carbamato de etilo com 50,7 μg/L.

Esses sinais (aos 2,6 min, 4,8 min e 17,0 min), são devidos à presença do 9-xantidrol em grande excesso, sendo possível detectá-los nos brancos de reacção (derivatização de uma solução de etanol a 12 % (v/v)). Apesar da presença destes picos nos cromatogramas, a separação conseguida permite a correcta quantificação do pico do derivado do carbamato de etilo aos 9,7 minutos. O reagente 9-X deve estar presente num excesso molar de mais de 1000 vezes relativamente ao carbamato de etilo, já que nas

amostras de vinho existem outros compostos com forte poder nucleófilo, como certos aminoácidos, aminas e amidas, concorrendo com o carbamato de etilo para a reacção com o 9-X. Desta maneira, assegura-se que a reacção de derivatização é reprodutível em amostras diferentes.

A diluição das amostras, para além de reduzirem o ruído cromatográfico devido ao efeito da matriz, tem a vantagem de normalizar o teor alcoólico das amostras, tornando o meio reaccional mais homogéneo. Para além disto, possibilita a diminuição da influência das matrizes injectadas na coluna analítica e pré-coluna, já que não é efectuada qualquer extracção. Esta prática permitiu a análise de cerca de 200 injecções por pré-coluna, sem uma diminuição apreciável da resolução. Durante o desenvolvimento deste método utilizou-se apenas uma coluna analítica, na qual foram efectuadas mais de 400 injecções, incluindo amostras e soluções padrão.

As amostras mais complexas, como os vinhos e os vinhos licorosos (figura 85), foram analisadas sem uma diminuição apreciável da precisão ou exactidão (tabela 25), relativamente às menos complexas como as de aguardente (figura 86).

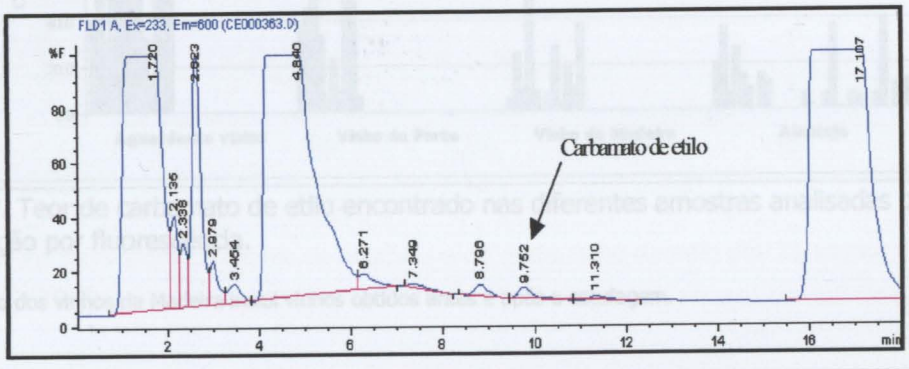



**Figura 85.** Cromatograma de uma amostra de Vinho do Porto diluída 3 vezes.

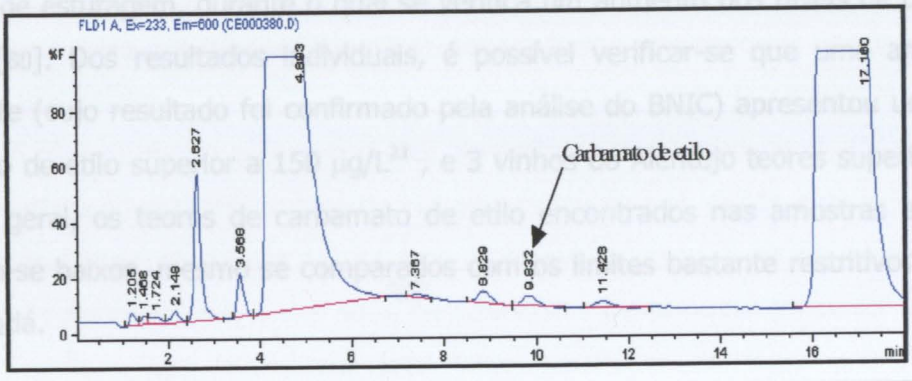



**Figura 86.** Cromatograma de uma amostra de aguardente vínica (título alcoométrico volúmico adquirido aproximado de 77 % (v/v)) diluída 4 vezes.

### 3.3.5 Teores de carbamato de etilo nas amostras estudadas

Os valores médios (média ± desvio padrão) dos teores de carbamato de etilo determinados nas 65 diferentes amostras estudadas foram: 91,2 ±47,9 μg/L para aguardentes; 31,9 ± 21,2 μg/L para Vinhos do Porto; 33,5 ± 14,5 μg/L para Vinhos da Madeira, e 9,3 ± 11,6 μg/L para amostras de vinhos do Alentejo. Os resultados da análise das amostras estudadas estão representados na figura 87.

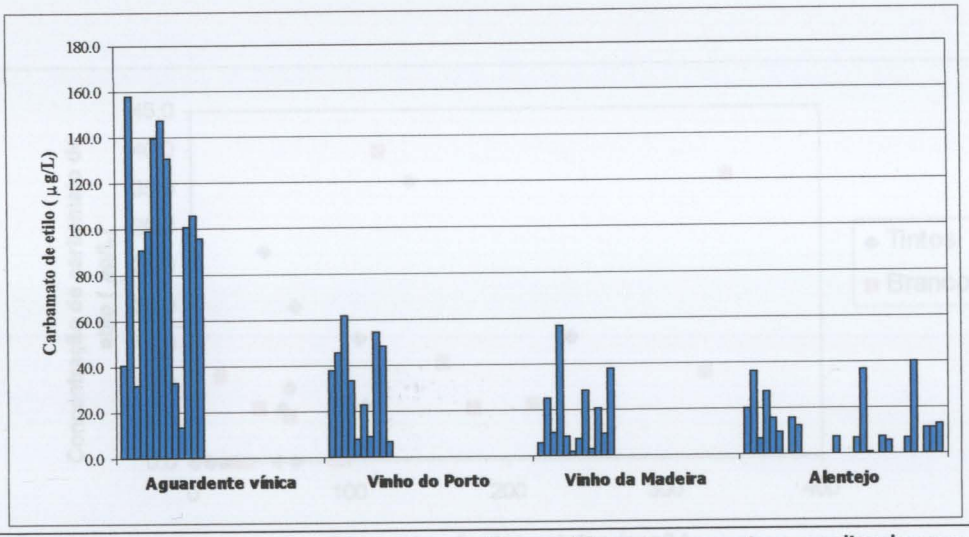



**Figura 87.** Teor de carbamato de etilo encontrado nas diferentes amostras analisadas por HPLC com detecção por fluorescência.

Nota. O grupo dos vinhos da Madeira inclui vinhos obtidos antes e após a estufagem.

Convém assinalar, que alguns dos Vinhos da Madeira foram analisados antes do processo de estufagem, durante o qual se verifica um aumento dos níveis de carbamato de etilo [80]. Dos resultados individuais, é possível verificar-se que uma amostra de aguardente (cujo resultado foi confirmado pela análise do BNIC) apresentou um teor de carbamato de etilo superior a 150 μg/L[21] , e 3 vinhos do Alentejo teores superiores a 30 μg/L. No geral, os teores de carbamato de etilo encontrados nas amostras estudadas, revelaram-se baixos, mesmo se comparados com os limites bastante restritivos impostos pelo Canadá.

[21] Os limites actualmente impostos pelo Canadá para os teores de carbamato de etilo em bebidas são: 150 μg/L – para aguardentes; 100 μg/L – para vinhos licorosos; 30 μg/L – para vinhos.

Dos 67 vinhos comerciais disponíveis inicialmente para a realização deste trabalho, foram seleccionados 31 (16 tintos e 15 brancos), que apresentavam os teores mais baixos e mais altos de arginina (precursor de ureia) e/ou de citrulina (precursor directo do CE), com o objectivo de estudarmos a influência dos teores desses compostos no teor de carbamato de etilo desses vinhos.

Verificou-se que não existe uma relação evidente entre os níveis de arginina dos vinhos e o seu teor em CE – figura 88 -, assim como também não é possível atribuir ao factor cor uma influência evidente no mesmo parâmetro.

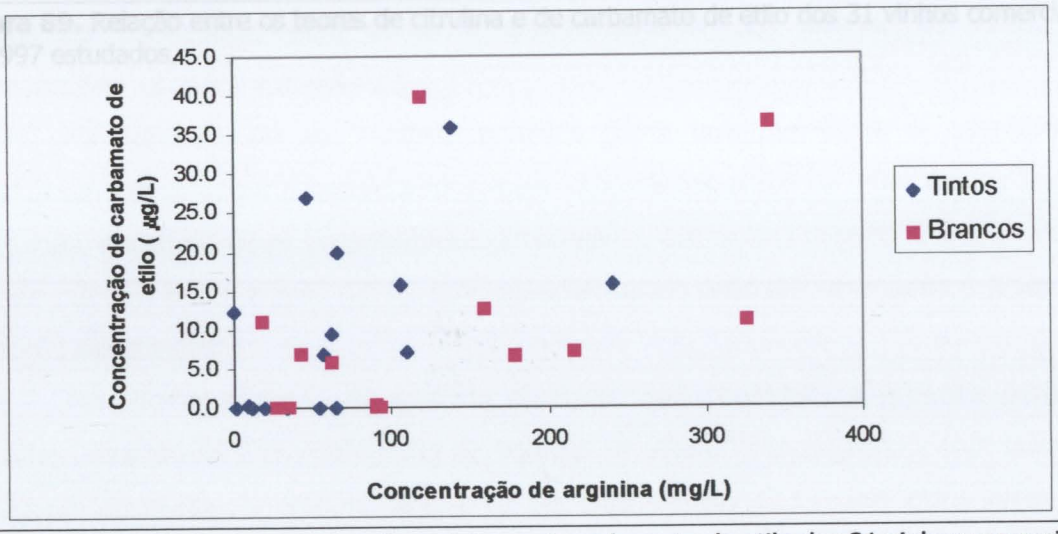



**Figura 88.** Relação entre os teores de arginina e de carbamato de etilo dos 31 vinhos comerciais de 1997 estudados.

Como precursor da ureia, a avaliação dos níveis de arginina tem uma importância maior se for realizada nos mostos, uma vez que aí poderá fornecer informação acerca da quantidade de ureia que potencialmente se poderá formar, no decorrer das fermentações alcoólica e maloláctica.

Da mesma forma que com o teor de arginina, a quantidade de CE parece não depender significativamente do teor de citrulina existente nos vinhos estudados – figura 89. Estes resultados reforçam a necessidade de se avaliarem os níveis de ureia existentes nos vinhos, substância que, pelas suas características de principal precursor do CE nas bebidas alcoólicas, tem necessariamente uma importância enológica superior às da citrulina e arginina.

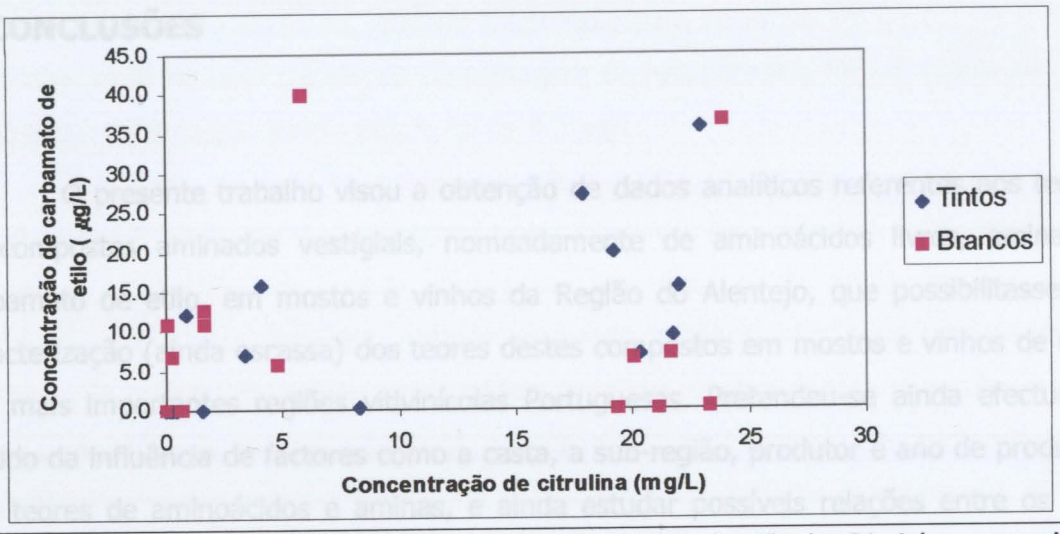



**Figura 89.** Relação entre os teores de citrulina e de carbamato de etilo dos 31 vinhos comerciais de 1997 estudados.

# 4. CONCLUSÕES

O presente trabalho visou a obtenção de dados analíticos referentes aos teores de compostos aminados vestigiais, nomeadamente de aminoácidos livres, aminas e carbamato de etilo, em mostos e vinhos da Região do Alentejo, que possibilitassem a caracterização (ainda escassa) dos teores destes compostos em mostos e vinhos de uma das mais importantes regiões vitivinícolas Portuguesas. Pretendeu-se ainda efectuar o estudo da influência de factores como a casta, a sub-região, produtor e ano de produção nos teores de aminoácidos e aminas, e ainda estudar possíveis relações entre os dois grupos de compostos, bem como o comportamento das aminas ao longo das fermentações alcoólica e maloláctica.

Na ausência de um método analítico fiável que permitisse a quantificação simultânea dos compostos considerados mais importantes entre os aminoácidos livres e as aminas, desenvolveu-se uma metodologia analítica, que veio a permitir a análise de um grande número de amostras (276), com parâmetros de precisão, exactidão e limites de detecção adequados.

No estabelecimento do método analítico, que constituiu a primeira parte do trabalho, adoptou-se a cromatografia de líquidos de alta eficiência (HPLC) com detecção de fluorescência dos 33 compostos que foi decidido analisar (23 aminoácidos livres e 10 aminas). O método analítico tem como principal vantagem, a análise simultânea dos aminoácidos e aminas mais abundantes e importantes em mostos e vinhos, num total de 33 compostos, e que não era possível até então com nenhum dos métodos já estabelecidos. O limite de detecção, foi em média de 0,58 mg/L para os aminoácidos primários (excepto para a arginina – 2,95 mg/L), 0,28 mg/L para as aminas, e 27,3 mg/L para a prolina. A repetibilidade de 7 injecções variou de 0,6 % a 11, 6 % (desvio padrão relativo) para soluções padrão e de 0,5 % a 19,2 % para amostras de vinho. A exactidão, avaliada através do cálculo da percentagem de recuperação, foi em média de 99,8 % (CV = 11,1 %). A quantificação das substâncias permitida pelo método, possibilita a obtenção de dados importantes para a caracterização não só da tipicidade e genuinidade dos vinhos, mas também da sua qualidade e segurança alimentar.

O método analítico por HPLC e detecção de fluorescência, desenvolvido para a análise do teor de carbamato de etilo em bebidas alcoólicas, permitiu a análise deste composto quer em aguardentes, quer em vinhos ou vinhos licorosos. A precisão média,

avaliada através do cálculo da precisão intermédia para amostras foi de 6,3 % (CV). A exactidão, avaliada pelo cálculo da percentagem de recuperação, foi em média de 96,3 %. O limite de detecção médio obtido foi de 4,2 μg/L.

Pelo facto da fase de preparação de amostra se resumir a uma diluição da mesma e de uma reacção de derivatização com a duração de 5 minutos, esta metodologia permite a análise de um grande número de amostras, sendo ainda possível a sua automatização, o que poderá contribuir para uma melhoria dos seus parâmetros de validação. O método de análise desenvolvido, pela sua originalidade e inovação, e pelas suas características de aplicabilidade, simplicidade de execução, e parâmetros de validação, nomeadamente o seu limite detecção médio, foi objecto de protecção, através do registo de uma Patente Nacional no Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Os resultados obtidos na quantificação dos aminoácidos livres nos 67 vinhos comerciais, (30 brancos e 37 tintos), provenientes das 8 sub-regiões Alentejanas (Portalegre, Borba, Redondo, Reguengos, Vidigueira, Évora, Borba e Granja - Amareleja), e nos 38 vinhos monovarietais de 1997 e 1998, produzidos por microvinificação permitiram concluir não haver diferenças significativas ao nível quantitativo e qualitativo entre os dois grupos de amostras. Os aminoácidos mais abundantes foram, em média, a arginina, a alanina, o ácido γ-aminobutírico, a lisina e a prolina (este o mais abundante em qualquer dos vinhos). No geral, os vinhos brancos apresentaram teores superiores da maioria dos aminoácidos livres primários, e inferiores de prolina, relativamente aos tintos. Esta diferença reflectiu-se ao nível da quantidade de azoto aminado assimilável existente nos vinhos, superior em média nos brancos. Relativamente a este importante parâmetro, verificou-se que tanto os vinhos tintos comerciais como os brancos, apresentavam valores médios relativamente altos (média ± desvio padrão: 100 ± 58 mg N/L nos brancos; 60 ± 41 mg N/L nos tintos), o que pode constituir um factor de instabilidade microbiológica, principalmente nos vinhos brancos. Os vinhos monovarietais de 1997 apresentaram teores médios de azoto aminado assimilável (média ± desvio padrão: 100 ± 70 mg N/L para os brancos; 42 ± 32 mg N/L para os tintos) muito idênticos aos comerciais do mesmo ano, especialmente no caso dos brancos. Considerando que do azoto aminado assimilável médio existente nos mostos de 1998 apenas foi consumido 38 % nas vinificações brancas e 70 % nas tintas, a quantificação dos níveis de amónia nesses mostos, e o estudo da relação entre os teores de azoto assimilável aminado e amoniacal e a qualidade dos vinhos obtidos, pode contribuir para se avaliarem os valores óptimos de carga azotada aplicada em cada caso na vinha.

No que respeita às aminas biogénicas, este é o primeiro trabalho a fornecer valores acerca dos teores destes compostos em vinhos do Alentejo, sendo original na avaliação da evolução dos teores das 10 aminas mais importantes nos vinhos, ao longo das fermentações alcoólica e maloláctica, e na comparação dos teores destes compostos em vinhos com os seus teores de aminoácidos livres assimiláveis e aminogénicos.

Verificou-se que as aminas mais abundantes, nos vinhos comerciais estudados, quer em brancos quer em tintos, foram a etanolamina e a putrescina, com teores médios de 23,7 mg/L e de 16,0 mg/L, respectivamente. As aminas biogénicas, histamina, tiramina, cadaverina, triptamina e β-feniletilamina, encontraram-se em média, sempre abaixo dos 5 mg/L, com excepção da putrescina, e da tiramina nos vinhos tintos (média de 5,2 mg/L). A triptamina e a β-feniletilamina, encontraram-se, de modo geral, abaixo dos limites de detecção do método analítico. Os teores de aminas dos vinhos monovarietais apresentaram-se comparáveis, em parte, aos dos vinhos comerciais. Nesses vinhos, as aminas mais abundantes foram a etanolamina, a histamina e a putrescina. Os teores médios encontrados nos vinhos brancos dos dois anos estudados foram de 17,4 mg/L de etanolamina, 10,2 mg/L de histamina e 4,3 mg/L de putrescina. Nos tintos, 19,9 mg/L de etanolamina, 7,1 mg/L de histamina e 14,6 mg/L de putrescina.

Os teores de aminas biogénicas encontrados nos 96 vinhos analisados, podem considerar-se baixos, sobretudo se os compararmos com aqueles que têm sido reportados por outros autores, como existentes noutros alimentos. Em muitos casos, os teores aí encontrados são mais de 10 vezes superiores aos verificados nos vinhos.

De todas as aminas quantificadas nos mostos, a etanolamina, metilamina, a etilamina, e a putrescina, foram as mais abundantes. As quantidades de etanolamina encontradas nos mostos (concentração média de 15,2 mg/L entre mostos brancos e tintos, nos dois anos), não diferiram muito das encontradas nos vinhos das mesmas castas e das mesmas sub-regiões. Com excepção da etanolamina, todas as outras aminas se encontraram, em média, abaixo dos 5 mg/L nos mostos brancos e tintos dos dois anos estudados, sendo que a histamina, a tiramina, a cadaverina, a triptamina e a isoamilamina, não foram encontradas na generalidade dos mostos.

O estudo da evolução da concentração das diferentes aminas durante e após a fermentação alcoólica dos 5 mostos brancos e 5 tintos, de diversas castas provenientes de Évora, permitiu distinguir diferentes comportamentos consoante os compostos em causa. As aminas triptamina, β-feniletilamina, e cadaverina, encontraram-se, regra geral, em concentrações abaixo dos limites de detecção do método analítico, quer nos mostos,

quer nos vinhos produzidos. As concentrações de etanolamina e etilamina, cujos teores nos vinhos eram muito próximos dos encontrados nos mostos, não sofreram grandes alterações quer durante quer após as fermentações dos mostos brancos. No caso dos tintos, apesar de durante as fermentações se ter verificado um aumento dos seus teores em alguns casos, no final, o resultado foi idêntico ao dos brancos. A metilamina, sofreu uma redução na sua concentração durante a fermentação de todos os mostos estudados.

A histamina, pode ter sido produzida quer durante a fermentação alcoólica quer durante a fermentação maloláctica, enquanto que a tiramina e a putrescina, parecem ter tido origem principalmente durante ou após a fermentação maloláctica, já que apenas se verificou um aumento dos seus teores relativamente aos verificados nos mostos, no caso dos vinhos tintos.

No estudo da influência da casta, sub-região de produção, e ano de produção nos teores de aminoácidos assimiláveis, e de aminas biogénicas e voláteis, verificou-se que esses factores, no geral, influenciaram mais estes teores nos vinhos tintos.

Aos estudarmos a influência dos factores: teor de aminoácidos assimiláveis; teor de aminoácidos aminogénicos; teor de dióxido de enxofre livre e total; e pH, nos teores de aminas biogénicas e totais dos 96 vinhos estudados, verificamos que as variáveis mais correlacionadas e com maior importância enológica foram os teores de aminoácidos assimiláveis e de aminas biogénicas e totais. Este facto indica que uma redução dos teores de aminoácidos assimiláveis dos vinhos, pode ter um efeito qualitativo positivo, ao nível dos níveis de aminas acumuladas nesses vinhos. A acidez volátil, apenas se correlacionou com os teores de aminas biogénicas dos vinhos tintos, onde se verificou uma relação positiva entre os referidos factores. Nos vinhos monovarietais estudados, e na ausência da fermentação maloláctica, caso dos vinhos brancos do Alentejo, os teores de aminas biogénicas e totais dos vinhos correlacionaram-se de forma muito significativa (coeficientes de correlação médios entre brancos e tintos de 0,870) com os teores de aminoácidos assimiláveis dos respectivos mostos. Nos vinhos tintos, onde ocorre normalmente a fermentação maloláctica, a relação não foi evidente, o que se deve certamente à importância que esse processo pode ter na acumulação de aminas nos vinhos onde ocorre.

Relativamente aos teores de carbamato de etilo, é a primeira vez que se obtêm valores deste parâmetro em vinhos comerciais Portugueses, que não os licorosos. Salvaguardando a necessidade de se realizar um estudo de validação mais aprofundado, do método de análise de carbamato de etilo por HPLC, nomeadamente através de

comparações interlaboratoriais, os valores obtidos para os teores desta substância nos vinhos analisados, entre os quais os vinhos do Alentejo (média de 9,3 μg/L), apresentaram teores de carbamato de etilo que podem ser considerados baixos na maioria dos casos. Os teores médios de citrulina encontrados nos vinhos comerciais (6,0 mg/L), não colocam problemas ao nível da formação de carbamato de etilo durante o estágio longo destes vinhos, devendo sempre, porém, ser acauteladas as convenientes condições de armazenamento dos vinhos, nomeadamente no que diz respeito à temperatura, já que a taxa de formação do carbamato de etilo depende dela directamente.

Embora com um número de amostras relativamente pequeno (37), o que confere uma importância relativa à análise componente principal efectuada, esta evidenciou diferenças ao nível dos teores de aminoácidos livres e aminas, entre os vinhos tintos comerciais provenientes da Vidigueira, e os das proveniências de Portalegre, Reguengos, Évora, Moura e Granja. As mesmas variáveis, permitiram a distinção dos vinhos brancos de Portalegre dos de Reguengos, Vidigueira, Évora, Moura e Granja, e ainda distinguir os vinhos produzidos no Redondo, dos produzidos nas restantes sub-regiões, com excepção de Portalegre.

No futuro, e depois de devidamente validado em condições de execução por rotina, o método de análise do carbamato de etilo pode constituir uma alternativa válida aos actuais métodos por GC-MS, como método de rastreio em laboratórios de enologia. Os resultados obtidos, reforçam a necessidade do desenvolvimento de um método analítico sem os inconvenientes dos métodos actuais, para a quantificação por rotina da ureia em vinhos, o que permitirá um melhor enquadramento deste assunto relativamente aos vinhos Portugueses.

Por outro lado, o estudo da influência do teor de amónia dos mostos na quantidade de aminas acumuladas nos vinhos, a avaliação por rotina dos teores de azoto assimilável nos mostos e a caracterização dos teores de aminoácidos livres e aminas num conjunto de vinhos mais extenso, poderão contribuir de modo significativo, para a melhoria da qualidade dos vinhos produzidos, e do conhecimento das suas características específicas, relativamente a outros, e portanto da defesa das Denominações de Origem.

# 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. Acree, T. E.; Elisabeth, P. S.; Splittstoesser, D. F. **1972**. Effect of yeast strain and type of sulfur compound on hydrogen sulfide production. *Am. J. Enol. Vitic.* 23(1): 6-9.
2. Adams, D. O.; Bates, D. J.; Adams, D. F.; Franke, K. E. **1992**. The effect of agmatine and other precursors on the accumulation of putrescine in grape leaves. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(3): 239-243.
3. Adams, D. O.; Franke, K. E.; Christensen, L. P. **1990**. Elevated putrescine levels in grapevine leaves that display symptoms of potassium deficiency. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(2): 121-125.
4. Aerny, J. **1985**. Origine de l'histamine dans les vins – connaissances actuelles. *Bull. OIV* 656/657: 1016-1019.
5. Aerny, J. **1990**. Presence d'histamine et d'autres amines biogènes dans les vins. *OIV f. v.* nº 881.
6. Agenbach, W. A. **1977**. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. *In*: Proceedings of the South African Society for Enology and Viticulture. Cape Town, p.
7. Aires-de-Sousa, J. **1996**. Verifying wine origin: a neural network approach. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(4): 410-414.
8. Almy, J.; Ough, C. S. **1989**. Urea analysis for wines. *J. Agric. Food Chem.* 37(4): 968-970.
9. Alvarez, I.; Casp, A.; Zunica, L.; Aleixandre, J. L.; Garcia, M. J. **1997**. Application de méthodes d'analyses multidimensionnelles à la différenciation des vins blancs Espagnols d'appellation d'origine. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 31(2): 99-107.
10. An, D.; Ough, C. S. **1993**. Urea excretion and uptake by wine yeasts as affected by various factors. *Am. J. Enol: Vitic.* 44(1): 35-40.
11. Ancin, C.; Ayesteran, B.; Garrido, J. **1996**. Clarification by vacuum filtration of Grenache must. Utilization of free amino acids during fermentation and bottle-aging of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(3): 313-322.

12. André, P.; Bénard, P.; Flanzy, C.; Tacchini, M. **1981**. Vinification par macération carbonique. Évolution des acides aminés libres et liés, présents dans les moûts et le vin. *Sci. Alim.* 1(1): 27-53.

13. Arena, M. E.; Saguir, F. M.; Manca de Nadra, M. C. **1999**. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 155-161.

14. Arrhenius, S. P.; McCloskey, L. P.; Sylvan, M. **1996**. Chemical markers for aroma of *Vitis vinifera* var. Chardonnay regional wines. *J. Agric. Food Chem.* 44(4): 1085-1090.

15. Austin, K. T.; Butzke, C. E. **2000**. Spectrometric assay for arginine in grape juice and must. *Am. J. Enol. Vitic.* 51(3): 227-232.

16. Äyräpää, T. **1968**. Formation of higher alcohols by various yeasts. *J. Inst. Brew.* 74: 169-178.

17. Äyräpää, T. **1971**. On the formation of higher alcohols by yeasts and its dependence on nitrogenous nutrients. *Kem. Tidskr.* 83: 79-90.

18. Bailey, R.; North, D.; Myatt, D.; Lawrence, J. F. **1986**. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by methylation gas chromatography with nitrogen phosphorus thermoionic detection. *J. Chrom.* 369: 199-202.

19. Baker, G. B.; Wong, J. T. F.; Coutts, R. T.; Pasutto, F. M. **1987**. Simultaneous extraction and quantitation of several biogenic amines in cheese and chocolate. *J. Chrom.* 392: 317-331.

20. Baker, J.; Bellworthy, S. J.; Hogg, T. A.; Kirby, R. M.; Reader, H. P.; Rogerson, F. S. S.; Watkins, S. J.; Barnett, J. A. **1996**. Two methods of Port vinification: A comparison of changes during fermentation and of characteristics of the wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(1): 37-41.

21. Battaglia, R.; Frölich, D. 1978. HPLC determination of histamine in wine. J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 2: 100-101.

22. Bauza, T.; Blaise, A.; Daumas, F.; Cabanis, J. **1995**. Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorimetric detection. *J. Chrom. A* 707: 373-379.

23. Bauza, T.; Blaise, A.; Teissedre, P. L.; Cabanis, J. C.; Kanny, G.; Moneret-Vautrin, D. A.; Daumas, F. **1995**. Les amines biogènes du vin – Métabolism et toxicité. *Bull. OIV* 767/768: 42-67.

24. Beale, S. C.; Hsieh, Y.–Z.; Savage, J. C.; Wiesler, D.; Novotny, M. **1989**. 3-Benzoyl-2-quinolinecarboxaldehyde: a novel fluorogenic reagent for the high-sensitivity chromatographic analysis of primary amines. *Talanta* 36(1/2): 321-325.

25. Bell, A. A.; Ough, C. S.; Kliewer, W. M. **1979**. Effects on must and wine composition, rates of fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson Seedless grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 30(2): 124-129.

26. Bely, M.; Sablayrolles, J.-M.; Barre, P. **1990**. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferm. Bioeng.* 70: 246-252.

27. Bertrand, A.; Barros, P. **1988**. Dosage du carbamate d'éthyle dans les vins et les eaux-de-vie. *Connaiss. Vigne Vin* 22(1): 39-47.

28. Bertrand, A.; Triquet-Pissard, R. **1986**. Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin. Observations sur son origine. *Connaiss. Vigne Vin* 20(2): 133-136.

29. Bidan, P.; André, L. **1958**. Sur la composition en acides aminés de quelques vins. *Annales de Technologie* IV: 403-432.

30. Bisson, L. F. **1991**. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. *In:* Rantz, J. Editor. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA, p. 78.

31. Bisson, L. F. **1999**. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(1): 107-119.

32. Bisson, L. F.; Butzke, C. E. **2000**. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 51(2): 168-177.

33. Björklund, J.; Einarsson, S.; Engström, A.; Grzegorczyk, A.; Becker, H.–D. **1998**. Automated amino acid determination by high-performance liquid chromatography with 2-(9-anthryl)ethyl chloroformate as precolumn reagent. *J. Chrom. A* 798: 1-8.

34. Blackwell, B.; Mabbitt, L. A.; Marley, E. **1969**. Histamine and tyramine content of yeast products. *J. Food Sci.* 34: 47-51.

35. Bosso, A. **1996**. Influenza dell'aggiunta di dosi crescenti di azoto ammoniacale ai mosti sulla composizione in sostanze volatili di origine fermentativa e sulle principali caratteristiche olfattive di alcuni vini bianchi. *Riv. Vitic. Enol.* 3: 3-28.

36. Botella, M. A.; Perez-Rodriguez, L.; Domecq, B.; Valpuesta, V. **1990**. Amino acid content of Fino and Oleroso Sherry wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(1): 12-15.

37. Brenner, H.; Rothenbacher, D.; Bode, G.; Adler, G. **1999**. Inverse graded relation between alcohol consumption and active infection with *Helicobacter pylori*. *Am. J. Epidemiol.* 149(6): 571-576.

38. Brereton, R. G. **1987**. Chemometrics in analytical chemistry. A review. *Analyst* 112(December): 1635-1657.

39. Brink, B. T.; Damink, C.; Joosten, H. L. M. J.; Huis Int Velt, J. H. J. **1990**. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Inter. J. Fd. Microbiol.* 11: 73-84.

40. Brumley, W. C.; Canas, B. J.; Perfetti, G. A.; Mossoba, M. M.; Sphon, J. A.; Corneliussen, P. E. **1988**. Quantitation of ethyl carbamate in Whiskey, Sherry, Port, and wine by gas chromatography/tandem mass spectrometry using a triple quadrupole mass spectrometer. *Anal. Chem.* 60(10): 975-978.

41. Busto, O.; Guasch, J.; Borrull, F. **1996**. Biogenic amines in wine: a review of analytical methods. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 30 (2): 85-101.

42. Buteau, C.; Duitschaever, C. L.; Ashton, G. C. **1984**. A study of the biogenesis of amines in a Villard Noir wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 35(4): 228-236.

43. Butzke; Dukes. **1998**. Concentration of primary amino acids in grape juice: NOPA procedure. In: http://wineserver.ucdavis-edu/oldsite/NOPA98.html, 11 Abril, 2001, 15.00 h.

44. Cabanis, J.–C. **1985**. L'histamine et sa toxicité. *Bull. OIV* 656/657: 1009-1015.

45. Caceres, I.; Barahona, F.; Polo, C. **1986**. El análisis íntegro de los vinos. IV. Cromatografía de líquidos de alta eficacia. *Alimentacion Equipos y Tecnologia* Mayo-Junio: 141-152.

46. Cairns, T.; Siegmund, E. G.; Luke, M. A.; Doose, G. M. **1987**. Residue levels of ethyl carbamate in wines and spirits by gas chromatography and mass spectrometry/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 59(17): 2055-2059.

47. Canas, B. J.; Havery, D. C.; Joe, F. J. Jr. **1988**. Rapid gas chromatographic method for determining ethyl carbamate in alcoholic beverages with thermal energy analyzer detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(3): 509-511.

48. Canas, B. J.; Joe, F. L. Jr.; Diachenko, G. W.; Burns, G. **1994**. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by gas chromatography with mass selective detection: collaborative study. *J. A.O.A.C. Int.* 77(6): 1530-1536.

49. Cantagrel R.; Carles, J. **1978**. *Ann. Nutr. Aliment.* 32: 1073-1094.

50. Carnevillier, V.; Schlich, P.; Guerreau, J.; Charpentier, C.; Feuillat, M. **1999**. Characterization of the production regions of Chardonnay wines by analysis of free amino acids. *Vitis* 38(1): 37-42.

51. Cartwright, C. P.; Juroszek, J.-R.; Beavan, M. J.; Ruby, F. M. S.; de Morais, S. M. F.; Rose, A. H. **1986**. Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microb.* 132: 369-377.

52. Casoli, A.; Colagrande, O. **1982**. Use of high-performance liquid chromatography for the determination of amino acids in sparkling wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 33(3): 135-139.

53. Castino, M.; Piracci, A.; Spera, G. **1981**. La prolina nei vini a D.O.C.: Colli Albani, Frascati, Marino, Velletri, Trebbiano e Merlot d'Aprilia, Cesanese del Piglio, Montepulciano d'Abruzzo, Verdicchio di Jesi. *Annali dell'Istituto Sperimentale per L'Enologia* – Asti XII(520): 340-352.

54. Cilliers, J. D.; van Wyk, C. J. **1985**. Histamine and tyramine content of South African wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 6: 35-40.

55. Clarke, H. T.; Haynes, B. **1978**. Recherche des groupments fonctionnels. *In:* Brick, E. C. Shone, G. G. Editors. Chimie organique analyse qualitative et quantitative. Paris. Vuibert, p.30.

56. Clegg, B. S.; Frank, R. **1988**. Detection and quantitation of trace levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages by selected ion monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 36(3): 502-505.

57. Cohen, S. A.; de Antonis, K. M. **1994**. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *J. Chrom. A* 661: 25-34.

58. Cohen, S. A.; Michaud, D. P. **1993**. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 211: 279-287.

59. Conacher, H. B.; Page, B. D.; Lau, B. P.-Y.; Lawrence, J. F.; Bailey, R. Calway, P.; Hanchay, J.-P.; Mori, B. **1987**. Capillary column gas chromatographic determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70(4): 749-751.

60. Coomans, D.; Massart, D. L.; Kaufman, L. **1979**. Optimization by statistical linear discriminat analysis in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* 112: 97-122.

61. Cooper, J. D. H.; Lewis, M. T.; Turnell, D. C. **1984**. Pre-column *o*-phthalaldehyde derivatization of amino acids and their separation using reversed-phase high-performance liquid chromatography. I. Detection of the imino acids hydroxyproline and proline. *J. Chrom.* 285: 484-489.

62. Correia, M.; Delerue-Matos, C.; Alves, A. **2000**. Multi-residue methodology for pesticide screening in wines. *J. Chrom. A* 889: 59-67.

63. Coutts, R. T.; Baker, G. B.; Pasutto, F. M. **1986**. Foodstuffs as source of psychoactive amines and their precursors: content, significance, and identification. *Adv. in Drug. Res.* 15: 169-233.

64. Cunico, R. L.; Schlabach, T. **1983**. Comparison of ninhydrin and *o*-phthalaldehyde post-column detection techniques for high-performance liquid chromatography of free amino acids. *J. Chrom.* 266: 461-470.

65. Daudt, C. E.; Ough, C. S.; Stevens, D.; Herraiz, T. **1992**. Investigations into ethyl carbamate, *n*-propyl carbamate, and urea in fortified wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(4): 318-322.

66. David, J. P. **1994**. Vin et société. *In:* Encyclopédie Touristique des Vins de France. Paris. Hachette, p. 322-323.

67. David, J. P. **1995**. Wine-Health-Society. *Bull. OIV* 767/768: 8-41.

68. Davis, C. R.; Wibowo, D.; Fleet, G. H.; Lee, T. H. **1988**. Properties of wine lactic acid bacteria: Their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(2): 137-142.

69. de Orduña, R. M.; Liu, S.-Q.; Patchett, M. L.; Pilone, G. J. **2000**. Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *J. Appl. Microbiol.* 89: 547-552.

70. del Campo, G.; Lavado, I.; Duenas, M.; Irastorza, A. **2000**. Note. Histamine production by some lactic acid bacteria isolated from ciders. *Food Sci. Techn. Int.* 6(2): 117-121.

71. Dennis, M. J.; Howarth, N.; Massey, R. C.; Parker, I. **1986**. Method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages by capillary gas chromatography. *J. Chrom.* 369: 193-198.

72. Dong, M. W.; Gant, J. R. **1985**. High-speed liquid chromatographic analysis of amino acids by post-column sodium hypochlorite-*o*-phthalaldehyde reaction. *J. Chrom.* 327: 17-25.

73. Dorresteijn, R. C.; Berwald, J. G.; Zomer, G.; de Gooijer, C. D.; Wieten, G.; Beuvery, E. C. **1996**. Determination of amino acids using *o*-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization. Effect of reaction conditions. *J. Chrom. A* 724: 159-167.

74. Duteurtre, B.; Bourgeosis, C.; Chollot, B. **1971**. Study of the assimilation of proline by brewing yeast. *J. Inst. Brew.* 77: 28.

75. Einarsson, S.; Folestad, S.; Josefsson, B.; Lagerkvist, S. **1986**. High-resolution reversed-phase liquid chromatography system for the analysis of complex solutions of primary and secondary amino acids. *Anal. Chem.* 58(8): 1638-1643.

76. Eschenbruch, R. **1974**. Sulfite and sulfide formation during winemaking - a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 25(3): 157-161.

77. Etiévant, P.; Schlich, P.; Bouvier, J.–C.; Symonds, P.; Bertrand, A. **1988**. Varietal and geographic classification of French red wines in terms of elements, amino acids and aromatic alcohols. *J. Sci. Food Agric.* 45: 25-41.

78. Fantozzi, P.; Montedoro, G. **1974**. Determination of free amino acids in musts and wines by gas-liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 25(3): 151-156.

79. Fernández-Trapiella, A. C. **1990**. Quantitative analysis of methionine, cysteine, and lysine in feeds by reverse-phase liquid chromatography using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate: preliminary study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73(6): 935-939.

80. Ferreira, M. A.; Fernandes, J. O. **1992**. The application of an improved GC-MS procedure to investigate ethyl carbamate behaviour during the production of Madeira wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(4): 339-343.

81. Festas, I.; Herbert, P.; Santos, L.; Cabral, M.; Barros, P.; Alves, A. **2000**. Ochratoxin A in some Portuguese wines: method validation and screening in Port wine and Vinho Verde. Am. J. Enol. Vitic. 51(2): 150-154.

82. Feulliat, M. **1998**. *In:* Œnologie – Fondements scientifiques et technologiques. Collection Sciences & techniques agroalimentaires, Technique & Documentation, Paris, p. 94-121.

83. Fiorino, A.; Frigo, G.; Cucchetti, E. **1989**. Liquid chromatographic analysis of amino and imino acids in protein hydrolysates by post-column derivatization with *o*-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid. *J. Chrom.* 476: 83-92.

84. Fitznar, H. P.; Lobbes, J.; Kattner, G. **1999**. Determination of enantiomeric amino acids with high-performance liquid chromatography and pre-column derivatisation with *o*-phthalaldehyde and N-isobutyrylcysteine in seawater and fossil samples (mollusks). *J. Chrom. A* 832: 123-132.

85. Flanzy, C.; Poux, Ch. **1965**. Note sur la teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin en fonction des conditions de l'année (maturation et fermentation). *Ann. Technol. Agric.* 14(1): 87-91.

86. Forina, M.; Armanino, C.; Castino, M.; Ubigli, M. **1986**. Multivariate data analysis as a discriminating method of the origin of wines. *Vitis* 25: 189-201.

87. Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E. **1993**. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 341: 1103-1104.

88. Fujinawa, S.; Burns, G.; de la Teja, P. **1990**. Application of acid urease to reduction of urea in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(4): 350-354.

89. Fujinawa, S.; Kodama, S.; Todoroki, H.; Suzuki, T. **1992**. Trace urea determination in red wine and its degradation by acid urease. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(4): 362-366.

90. Fujinawa, S.; Todoroki, H.; Ohashi, N.; Toda, N.; Terasaki, M. **1990**. Application of an acid urease to wine: determination of trace urea in wine. *J. Food Sci.* 55(4): 1018-1022.

91. Fürst, P.; Pollack, L.; Graser, T. A.; Godel, H.; Stehle, P. **1989**. HPLC analysis of free amino acids in biological material – an appraisal of four pre-column derivatization methods. *J. Liquid Chrom.* 12(14): 2733-2760.

92. Fürst, P.; Pollack, L.; Graser, T. A.; Godel, H.; Stehle, P. **1990**. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *J. Chrom.* 499: 557-569.

93. Giachetti, C.; Assandri, A.; Zanolo, G. **1991**. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethyl carbamate as the xanthylamide derivative in Italian aqua vitae (grappa) samples. *J. Chrom.* 585: 111-115.

94. Giorgio, B.; Tisse, C.; Guerrere, M. **1993**. Mise au point d'une nouvelle méthode pour le dosage des amines biogènes. Application aux conserves de sardines. *Sci. Aliments* 13: 737-750.

95. Giuduci, P.; Kunkee, R. E. **1994**. The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 45(1): 107-112.

96. Giuduci, P.; Zambonelli, C.; Kunkee, R. E. **1993**. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. *Am. J. Enol. Vitic.* 44(1): 17-21.

97. Goñi, D. T.; Azpilicueta, C. A. **1999**. Use of nitrogen compounds in spontaneous and inoculated wine fermentations. *J. Agric. Food Chem.* 47(10): 4018-4024.

98. Graser, T. A.; Godel, H. G.; Albers, S.; Földi, P.; Fürst, P. **1985**. An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. *Anal. Biochem.* 151: 142-152.

99. Grenson, M.; Hou, C. **1972**. Ammonia inhibition of the general amino acid permease and its suppression in NADPH-specific glutamate dehydrogenaseless mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 48: 749-756.

100. Grenson, M.; Hou, C.; Crabeel, M. **1970**. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a general amino acid permease. *J. Bact.* 103(3): 770-777.

101. Griffin, M.; Leah, J.; Mould, N.; Compton, G. **1988**. Construction of an ion-exchange amino acid analyser kit for use with high-performance liquid chromatography apparatus. *J. Chrom.* 431: 285-295.

102. Guerzoni, M. E.; Sinigaglia, M.; Gardini, F.; Ferruzzi, M.; Torriani, S. **1995**. Effects of pH, temperature, ethanol and malate concentration on *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc oenos*: Modelling of the malolactic activity. *Am. J. Enol. Vitic.* 46(3): 368-374.

103. Guitart, A.; Hernández-Orte, P.; Cacho, J. **1997**. Effects of maceration on the amino acid content of Chardonnay musts and wines. *Vitis* 36(1): 43-47.

104. Guitart, A.; Hernández-Orte, P.; Cacho, J. **1998**. Effect of different clarification treatments on the amino acid content of Chardonnay musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 49(4): 389-396.

105. Guitart, A.; Hernández-Orte, P.; Ferreira, V.; Peña, C.; Cacho, J. **1999**. Some observations about the correlation between the amino acid content of musts and wines of the Chardonnay variety and their fermentation aromas. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(3): 253-258.

106. Gustavsson, B.; Betnér, I. **1990**. Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and 1-aminoadamantane. *J. Chrom.* 507: 67-77.

107. Gvozdjáková, A.; Kucharská, J.; Durišin, P.; Minárik, E. **1996**. Is plastoquinone$_{10\text{-}ox}$ an antioxidant marker of red wines? *Vitis* 35(2): 103-104.

108. Hajos, G.; Sass-Kiss, A.; Szerdahelyi, E.; Bardocz, S. **2000**. Changes in biogenic amine content of Tokai grapes, wines, and Aszu-wines. *J. Food Sci.* 65(7): 1142-1144.

109. Haynes, P. A.; Sheumack, D.; Kibby, J.; Redmond, J. W. **1991**. Amino acid analysis using derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 540: 177-185.

110. Hebbard, S.; Goodman, K.; Jin, H. N. **1993**. Chemical analysis of ammonium and amino acids in Chardonnay juices. *The Australian Grapegrower and Winemaker* May: 19-21.

111. Heems, D.; Luck, G.; Fraudeau, C.; Vérette, E. **1998**. Fully automated precolumn derivatization, on-line dialysis and high-performance liquid chromatographic analysis

of amino acids in food, beverages and feedstuff. *J. Chrom. A* 798: 9-17.

112. Henschke, P. A.; Jiranek, V. **1991**. Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must. *In:* Rantz, J. Editor. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA, p. 172-184.

113. Henschke, P. A.; Jiranek, V. **1993**. Yeasts – Metabolism of nitrogen compounds. *In*: Fleet, G. Editor. Wine microbiology and biotechnology. Hardwood Academic Publishers p. 77-164.

114. Henschke, P. A.; Ough, C. S. **1991**. Urea accumulation in fermenting grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(4): 317-321.

115. Herbert, P.; Barros, P.; Alves, A. **2000**. Detection of Port wine imitations by discriminant analysis using free amino acids profiles. *Am. J. Enol. Vitic.* 51(3): 262-268.

116. Herbert, P.; Barros, P.; Ratola, N.; Alves, A. **2000**. HPLC determination of amino acids in musts and Port wine using OPA/FMOC derivatives. *J. Food Sci.* 65(7): 1130-1133.

117. Heresztyn, T. **1984**. Methyl and ethyl amino acid esters in wine. *J. Agric. Food Chem.* 32: 916-918.

118. Hernández-Orte, P.; Guitart, A.; Cacho, J. **1999**. Changes in the concentration of amino acids during the ripening of *Vitis vinifera* Tempranillo variety from the *Denomination d'Origine* Somontano (Spain). *Am. J. Enol. Vitic.* 50(2): 144-154.

119. Herraiz, T.; Ough, C. S. **1993**. Formation of ethyl esters of amino acids by yeasts during the alcoholic fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 44(1): 41-48.

120. Hill, D. W.; Walters, F. H.; Wilson, T. D.; Stuart, J. D. **1979**. High performance liquid chromatographic determination of amino acids in the picomole range. *Anal. Chem.* 51(8): 1338-1341.

121. Himuro, A.; Nakamura, H.; Tamura, Z. **1983**. Fluorometric determination of secondary amines by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *J. Chrom.* 264: 423-433.

122. Huang, Y.-C.; Edwards, C. G.; Peterson, J. C.; Haag, K. M. **1996**. Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(1): 1-10.

123. Huang, Z.; Ough, C. S. **1989**. Effect of vineryard locations, varieties, and rootstocks on the juice amino acid composition of several cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 40(2): 135-139.

124. Huang, Z.; Ough, C. S. **1991**. Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(3): 261-267.

125. Hurtado, I.; Caldú, P.; Gonzalo, A.; Ramon, J. M.; Mínguez, S.; Fiol, C. **1997**. Antioxidative capacity of wine on human LDL oxidation *in Vitro*: effect of skin contact in winemaking of white wine. *J. Agric. Food Chem.* 45(4): 1283-1289.

126. Hušek, P. **1991**. Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. *J. Chrom.* 552: 289-299.

127. Ingledew, W. M.; Kunkee, R. E. **1985**. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(1): 65-76.

128. Ingledew, W. M.; Magnus, C. A.; Patterson, J. R. **1987**. Yeast foods and ethyl carbamate formation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 38(4): 332-335.

129. Ishida, Y.; Fujita, T.; Asai, K. **1981**. New detection and separation method for amino acids by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 204: 143-148.

130. Jiranek, V.; Eglinton, J. M.; Gockowiak, H.; Langridge, P.; Henschke, P. A. **1993**. Nitrogen: a critical regulator of fermentation. *In:* Proceedings of the eighth Australian Wine Industrytechnical Conference, The Australian Wine Research Institute, p. 133-141.

131. Jiranek, V.; Henschke, P. **1991**. Assimilable nitrogen: regulator of hydrogen sulfide production during fermentation. *Australian Grapegrower and Winemaker* April: 27-30.

132. Jiranek, V.; Langridge, P.; Henschke, P. **1995**. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2): 461-467.

133. Jiranek, V.; Langridge, P.; Henschke, P. A. **1990**. Nitrogen requirement of yeast during wine fermentation. *In*: Williams, P. J.; Davidson, D. M.; Lee, T. H. Editors.

Proceedings of the seventh Australian Wine Industrytechnical Conference, Australian Industrial Publishers, p. 166-171.

134. Jiranek, V.; Langridge, P.; Henschke, P. A. **1995**. Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* 46(1): 75-83.

135. Kállay, M.; Bódy-Szalkai, M. **1996**. Ammine biogene nei vini ungheresi. *Riv. Vitic. Enol.* 3: 29-38.

136. Kanazawa, H.; Sunamoto, T.; Matsushima, Y. **2000**. Temperature-responsive chromatographic separation of amino acid phenylthiohydantoins using aqueous media as the mobile phase. *Anal. Chem.* 72(24): 5961-5966.

137. Karumanchiri, A.; Ng, E.; Yan, J. **1996**. Carbamate: from it's discovery in 1979 to it's current status, based on test data of 16 000 wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(3): 348.

138. Kaufmann, A. **1997**. Multivariate statistics as a classification tool in the food laboratory. *J. A.O.A.C. Int.* 80(3): 665-675.

139. Kim, K. R.; Kim, J. H.; Cheong, E.–J.; Jeong, C.–M. **1996**. Gas chromatographic amino acid profiling of wine samples for pattern recognition. *J. Chrom. A* 722: 303-309.

140. Kirschbaum, J.; Luckas, B. **1994**. Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine. *J. Chrom. A* 661: 193-199.

141. Kiser, R. W.; Shetlar, M. D.; Johnson, G. D. **1961**. Determination of the composition of urea-hydrocarbon complexes. *Anal. Chem.* 33(2): 314-315.

142. Kitamoto, K.; Yoshizawa, K.; Ohsumi, Y.; Anraku, Y. **1988**. Dymanic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol.* 170(6): 2683-2686.

143. Kliewer, W. M. **1968**. Changes in the concentration of free amino acids in grape berries during maturation. Am. J. Enol. Vitic. 36(1): 65-76.

144. Kliewer, W. M. **1970**. Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. *J. Food Sci.* 35: 17-21.

145. Kliewer, W. M. **1977**. Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 28(2): 96-103.

146. Kliewer, W. M.; Cook, J. A. **1971**. Arginine and total free amino acids as indicators of the nitrogen status of grapevines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96(5): 581-587.

147. Kodama, S.; Suzuki, T.; Fujinawa, S.; de la Teja, P.; Yotsuzuka, F. **1994**. Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage. *Am. J. Enol. Vitic.* 45(1): 17-24.

148. Kolothumannil, C. T.; Hynes, S. H.; Ingledew, W. M. **1993**. Excretion of proline by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of arginine-supplemented high gravity wheat mash. *J. Ind. Microb.* 12: 93-98.

149. Kovács, Á.; Simon-Sarkadi, L.; Ganzler, K. **1999**. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *J. Chrom.* A 836: 305-313.

150. Kwan, W. -O.; Kowalski, B. R.; Skogerboe, K. **1979**. Pattern recognition analysis of elemental data. Wines of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir from France and the United States. *J. Agric. Food Chem.* 27(6): 1321-1326.

151. Kwan, W.-O.; Kowalski, B. R. **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(2): 356-359.

152. Lafon-Lafourcade, S. **1975**. L'histamine des vins. *Connaiss. Vigne Vin* 9: 103-115.

153. Lagace, L. S.; Bisson, L. F. **1990**. Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 147-155.

154. Large, P. J. **1986**. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* 2: 1-34.

155. Larrauri, J. A.; Ruperez, P.; Calixto, F. S. **1996**. Antioxidant activity of wine pomace. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(4): 369-372.

156. Lasko, P. F.; Brandiss, M. C. **1981**. Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 148: 241-247.

157. Lau, B. D.; Weber, D.; Page, B. D. **1987**. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *J. Chrom.* 402: 233-241.

158. Lehtonen, P. **1996**. Determination of amines and amino acids in wine – A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(2): 127-133.

159. Leitão, M. C.; Teixeira, H. C.; Crespo, M. T. B.; San Romão, M. V. **2000**. Biogenic amines occurrence in wine. Amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* 48(7): 2780-2784.

160. LePage, J. N.; Rocha, E. M. **1983**. Liquid chromatography with postcolumn reaction for detection of amines and amino acids. *Anal. Chem.* 55(8): 1360-1364.

161. Li, G.–D.; Krull, I. S.; Cohen, S. A. **1996**. Electrochemical activity of 6-aminoquinolyl urea derivatives of amino acids and peptides. Application to high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chrom. A* 724: 147-157.

162. Lin. J.–K.; Lai, C.–C. **1980**. High performance liquid chromatographic determination of naturally occurring primary and secondary amines with dabsyl chloride. *Anal. Chem.* 52(4): 630-635.

163. Lindroth, P.; Mopper, K. **1979**. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* 51(11): 1667-1674.

164. Liu, S.–Q.; Pritchard, G. G.; Hardman, M. J.; Pilone, G. J. **1994**. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *Am. J. Enol. Vitic.* 45(2): 235-242.

165. Löfroth, G.; Gejvall, T. **1971**. Diethyl pyrocarbonate: formation of urethan in treated beverages. *Science* 174(December): 1248-1250.

166. Lonvaud-Funel, A.; Joyeux, A. **1994**. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bact.* 77: 401-407.

167. Lurton, L.; Segain, J. P.; Feuillat, M. **1989**. Étude de la protéolyse au cours de l'autolyse de levures en milieu acide. *Sci. Aliments* 9(1):111-123.

168. Ma, Y.-P.; Deng, F.-Q.; Chen, D.-Z.; Sun, S.-W. **1995**. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by capillary multi-dimensional gas chromatography with thermionic specific detection. *J. Chrom. A* 695: 259-265.

169. Mafra, I.; Sol, C.; Herbert, P.; Alves, A. **1999**. Evaluation of biogenic amines in Portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(1): 128-132.

170. Marcé, R. M.; Calull, M.; Guasch, J.; Borrull, F. **1989**. Determination of free amino acids in wine by HPLC using precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Am. J. Enol. Vitic.* 40(3): 194-198.

171. Martin, G. J.; Guillou, C.; Martin, M. L.; Cabanis, M.–T.; Tep, Y.; Aerny, J. **1988**. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *J. Agric. Food Chem.* 36(2): 316-322.

172. Martínez-Rodríguez, A.; Polo, M. C. **2000**. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.* 48(4): 1081-1085.

173. Masyczek, R.; Ough, C. S. **1983**. The "red wine reaction" syndrome. *Am. J. Enol. Vitic.* 34(4): 260-264.

174. Matsudo, T.; Sasaki, M. **1995**. Determination of urea and citrulline in fermented foods and beverages. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(5): 827-830.

175. Maynard, L. S.; Schenker, V. J.; **1962**. Monoamine oxidase inhibition by ethanol *in vitro*. Nature 196: 575-576.

176. Mc William, D. J. ; Ough, C. S. **1974**. Measurement of ammonia in musts and wines using a selective electrode. *Am. J. Enol. Vitic.* 25(2): 67-72.

177. Medina, B.; van Zeller, A. L. **1984**. Differenciation des vins de trois regions de France. *Connaiss. Vigne Vin* 18(4): 225-235.

178. Meyer, A. S.; Yi, O.–S.; Pearson, D. A.; Waterhouse, A. L.; Frankel, E. N. **1997**. Inhibition of human Low-Density Lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* 45(5): 1638-1643.

179. Mirvish, S. S. **1968**. The carcinogenic action and metabolism of urethan and N-hydrohyurethan. *Adv. Cancer Res.* 11: 1-42.

180. Molnár-Perl, I.; Vasanits, A. **1999**. Stability and characteristics of the *o*-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and *o*-phthalaldehyde/N-acetyl-*L*-cysteine reagents and their amino acid derivatives measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A* 835: 73-91.

181. Moneret-Vautrin, D. A. **1983**. False food allergies: nonspecific reactions to foostuffs. *In*: Lessof, M. H. Editor. Clinical reaction to foods. Chichester. John Wileys & son L.T.D., p. 135.

182. Monteiro, F. F.; Bisson, L. F. **1991**. Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(3): 199-208.

183. Monteiro, F. F.; Bisson, L. F. **1991**. Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(1): 47-57.

184. Monteiro, F. F.; Trousdale, E. K; Bisson, L. F. **1989**. Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *Am. J. Enol. Vitic.* 40(1): 1-8.

185. Monteiro, F. F.; Trousdale, E. K; Bisson, L. F. **1992**. Nitrogen supplementation of grape juice. II. Effect on amino acid and urea release following fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(1): 11-17.

186. Monteiro, M. J. P.; Bertrand, A. **1994**. Validation d'une méthode de dosage. Application à l'analyse des amines biogènes du vin. *Bull. OIV* 765/766: 916-962.

187. Moolenaar, D.; Bosscher, J. S.; Ten Brink, B.; Drissen, A. J. M.; Konings, W. N. **1993**. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J. Bacteriol.* 175: 2864-2870.

188. Moreno–Arribas, V.; Torlois, S.; Joyeux, A.; Bertrand, A.; Lonvaud-Funel, A. **2000**. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *J. Appl. Microbiol.* 88: 584-593.

189. Moret, I.; di Leo, F.; Giromini, V.; Scarponi, G. **1984**. Multiple discriminant analysis in the analytical differentiation of Venetian white wines. 4. Application to several vintage years and comparison with the *k* nearest-neighbor classification. *J. Agric. Food Chem.* 32(2): 329-333.

190. Moret, I.; Scarponi, G.; Capodaglio, G.; Zanin, S.; Camaiani, G.; Toniolo, A. **1980**. Analytical parameters in the characterization of three Venetian wines. Application of the statistical linear discriminant analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 31(3): 245-249.

191. Morrison, D. F. **1990**. *Multivariate Statistical methods*. 3ª Edição. Singapura. McGraw-Hill, 495 p.

192. Motil, K. J.; Scrimshaw, N. S. **1979**. The role of exogenous histamine in scombroid poisoning. *Toxicol. Lett.* 3: 219-223.

193. Moutounet, M. **1969**. Biosynthèse des alcools supérieurs des boissons fermentées. *Ann. Technol. Agric.* 18(3): 249-261.

194. Mulet, A.; Berna, A.; Forcen, M. **1992**. Differentiation and grouping characteristics of varietal grape musts and wines from Majorcan origin. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(3): 221-226.

195. Nelson, G.; Young, T. W. **1986**. Yeast extracellular proteolytic enzymes for chill-proofing beer. *J. Inst. Brew.* 92: 599-603.

196. Neves, H. J. C.; Vasconcelos, A. M. P. **1983**. Separação e análise quantitativa de aminoácidos por cromatografia gás-líquido. *Rev. Port. Quím.* 25(184): 184-192.

197. Ngim, K. K.; Ebeler, S. E.; Lew, M. E.; Crosby, D. G.; Wong, J. W. **2000**. *J. Agric. Food Chem.* 48(8): 3311-3316.

198. Nicol, M.-Z.; Romieu, C.; Flanzy, C. **1988**. Catabolisme de l'aspartate et du glutamate dans les baies de raisin en anaérobiose. *Sci. Alim.* 8(1): 51-65.

199. Noble, A. C.; Flath, R. A.; Forrey, R. R. **1980**. Wine headspace analysis. Reproducibility and application to varietal classification. *J. Agric. Food Chem.* 28(2): 346-353.

200. Nogueira, J. M. F.; Nascimento, A. M. D. **1999**. Analytical characterization of Madeira wine. *J. Agric. Food Chem.* 47(2): 566-575.

201. O.M.S./WHO Technical report. **1994**. Cardiovascular disease risk factors: new areas for research. Report of a WHO Scientifique group, O.M.S., Genève, Suisse.

202. Office International de la Vigne et du Vin (OIV). **1990**. *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*. Paris.

203. Oguri, S.; Uchida, C.; Mishina, M.; Miki, Y.; Kakehi, K. **1996**. Determination of amino acids by pre-column fluorescence derivatization with 1-methoxycarbonylindolizine-3,5-dicarbaldehyde. *J. Chrom. A* 724: 169-177.

204. Ooghe, W.; Kastelijn, H. **1984**. Détermination de l'authenticité d'un Beaujolais Primeur a l'aide du spectre des acides aminés. *Ann. Fals. Chim.* Octobre (831): 467-477.

205. Ooghe, W.; Kastelijn, H.; de Waele, A. **1981.** Détermination de l'origine d'un vin rouge a l'aide du spectre des acides amines. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 74(798): 381-408.

206. Ough, C. S. **1971.** Measurement of histamine in California wines. *J. Agric. Food Chem.* 19(2): 241-244.

207. Ough, C. S. **1976.** Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. II. Possible formation of ethylcarbamate from diethyl dicarbonate addition to wine. *J. Agric. Food Chem.* 24(2): 328-331.

208. Ough, C. S. **1976.** Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. *J. Agric. Food Chem.* 24(2): 323-328.

209. Ough, C. S. **1984.** Volatile nitrogen compounds in fermented beverages. *In:* Nykänen, L.; Lehtonen, P. Editors. Proceedings of the Alko Symposium on Flavour Research of Alcoholic Beverages. Helsinky. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 3, p. 199-225.

210. Ough, C. S.; Bell, A. A. **1980.** Effects of nitrogen fertilization of grapevines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 31(2): 122-123.

211. Ough, C. S.; Cook, J. A.; Lider, L. A. **1968.** Rootstock-scion interactions concerning wine making. II. Wine compositional and sensory changes attributed to rootstock and fertilizer level differences. *Am. J. Enol. Vitic.* 19(4): 254-265.

212. Ough, C. S.; Crowell, E. A.; Gutlove, B. R. **1988.** Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 139-142.

213. Ough, C. S.; Daudt, C. E.; Crowell, E. A. **1981.** Identification of new volatile amines in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* 29(5): 938-941.

214. Ough, C. S.; Huang, Z.; An. D.; Stevens, D. **1991.** Amino acid uptake by four commercial yeasts to two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and reabsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(1): 26-40.

215. Ough, C. S.; Lee, T. H. **1981.** Effect of vineyard nitrogen fertilization level on the formation of some fermentation esters. *Am. J. Enol. Vitic.* 32(2): 125-127.

216. Ough, C. S.; Lider, L. A.; Cook, J. A. **1968.** Rootstock-scion interactions concerning wine making. I. Juice composition changes and effects on fermentation rate with St.

George and 99-R rootstocks at two nitrogen fertilizer levels. *Am. J. Enol. Vitic.* 19(4): 213-227.

217. Ough, C. S.; Stevens, D.; Sendovski, T.; Huang, Z.; An, D. **1990**. Factors contributing to urea formation in commercially fermented wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(1): 68-73.

218. Ough, C. S.; Tabacman, H. **1979**. Gas chromatographic determination of amino acid differences in Cabernet Sauvigon grapes and wines as affected by rootstocks. *Am. J. Enol. Vitic.* 30(4): 306-311.

219. Ough. C. S.; Crowell, E. A.; Mooney, L. A. **1988**. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(3): 243-249.

220. Pace-Asciak, C. R.; Rounova, O.; Hahn, S. E.; Diamandis, E. P.; Goldberg, D. M. **1996**. Wines and grapes juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin. Chim. Acta* 246: 163-182.

221. Park, S. K.; Boulton, R. B.; Noble, A. C. **2000**. Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. *Food Chem.* 68: 475-480.

222. Peynaud, E.; Guimberteau, G. **1962**. Sur la formation des alcools supérieurs par les levures de vinification. *Ann. Technol. Agric.* 11(2): 85-105.

223. Pierce, W. M. Jr.; Clark, A. O.; Hurst, H. E. **1988**. Determination of ethyl carbamate in distilled alcoholic beverages by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(4): 781-784.

224. Pilone, G. J.; Clayton, M. J.; van Duivenboden, R. J. **1991**. Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 153-157.

225. Pogorzelsky, E. **1992**. Studies of the formation of histamine in must and wines from elderberry fruit. J. Sci. Food Agric. 60: 239-244.

226. Presa-Owens, C. de la; Lamuela-Raventos, R. M.; Buxaderas, S.; Torre-Boronat, M. C. de la. **1995**. Characterization of Macabeo, Xarel.lo, and Parellada white wines from the Penedès region. II. *Am. J. Enol. Vitic.* 46(4): 529-541.

227. Pripis-Nicolau, L.; de Revel, G.; Bertrand, A.; Maujean, A. **2000**. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *J. Agric. Food Chem.* 48(9): 3761-3766.

228. Qu, Y.; Arckens, L.; Vandenbussche, E.; Geeraerts, S.; Vandesande, F. **1998**. Simultaneous determination of total and extracellular concentration of the amino acid neurotransmitters in cat visual cortex by microbore liquid chromatography and electrochemical detection. *J. Chrom. A* 798: 19-26.

229. Quain, D. E. **1988**. Studies on yeast physiology-impact of fermentation performance and product quality. *J. Inst. Brew.* 95: 315-323.

230. Radjai, M. K.; Hatch, R. T. **1980**. Fast determination of free amino acids by ion-pair high-performance liquid chromatography using on-line post-column derivatization. *J. Chrom.* 196: 319-322.

231. Radler, F.; Fäth, K.-P. **1991**. Histamine and other biogenic amines in wines. *In:* Rantz, J. Editor. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA, p. 185-195.

232. Rapp, A.; Versini, G. **1991**. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. *In:* Rantz, J. Editor. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA, p. 156-164.

233. Regulamento (CE) nº 761/1999 da Comissão de 12 de Abril de 1999. **1999**. Determinação do carbamato de etilo nos vinhos: método de detecção selectiva por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias,* 14 Abril: 12-14.

234. Renaud, S. *et al.* **1992**. Wine, alcohol, platelets and the French Paradox. *The Lancet* 339(8808): 1523-1526.

235. Ribeiro, P. A. F. H. **1996**. Caracterização de aminoácidos livres em mostos e vinho do Porto – Relação com a tipicidade. Tese de Mestrado, Porto: 204 p.

236. Ribéreau-Gayon, P. **1999**. Observations related to the causes and consequences of stuck fermentation in vinification. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 33(1): 39-48.

237. Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Hernandez, J. F.; Mariné-Font, A. **1983**. Study of the evolution of tyramine content during the vinification process. *J. Food Sci.* 48: 417-418, 429.

238. Sablayrolles, J.–M.; Salmon, J.–M.; Barre, P. **1996**. Carences nutritionnelles des moûts. Efficacité des ajouts combinés d'oxygène et d'azote ammoniacal. *Rev. Franc. d'Œnologie* Juin/Juillet (159): 25-32.

239. Salgueiro, S. P.; Sá-Correia, I.; Novais, J. M. **1988**. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. Appl. Environm. Microbiol. 54(4): 903-909.

240. Sanders, E. M.; Ough. C. S. **1985**. Determination of free amino acids in wine by HPLC. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(1): 43-46.

241. Sass-Kiss, A.; Szerdahelyi, E.; Hajos, G. **2000**. Study of biologically active amines in grapes and wines by HPLC. *Chromatographia* 52 part 2 Suppl. S: S316-S320.

242. Satué-Gracia, M. T.; Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R. M.; Frankel, E. N. **1999**. Spanish sparkling wines (Cavas) as inhibitors of *in Vitro* human Low-Density Lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 47(6): 2198-2202.

243. Sayem-el-Daher, N.; Simard, R. E.; L'Heureux, L. **1983**. Determination of mono-, di- and polyamines in foods using a single-column amino acid auto-analyzer. *J. Chrom.* 256: 313-321.

244. Scarponi, G.; Moret, I.; Capodaglio, G.; Cescon, P. **1982**. Multiple discriminant analysis in the analytical differentiation of Venetian wines. 3. A reelaboration with addition of data from samples of 1979 vintage Prosecco wine. *J. Agric. Food Chem.* 30(6): 1135-1140.

245. Schreier, P.; Drawert, F.; Junker, A. **1976**. Identification of volatile constituents from grapes. *J. Agric. Food Chem.* 24(2): 331-336.

246. Schuster, R. **1988**. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 431: 271-284.

247. Schütz, M.; Kunkee, R. E. **1977**. Formation of hydrogen sulfide from elemental sulfur during fermentation by wine yeast. *Am. J. Enol. Vitic.* 28(3): 137-144.

248. Scopigno, P. T.; Bonafaccia, G.; Mezzasoma, A. **1983**. Studio sulla variabilità dei contenuti in aminoacidi liberi ed azoto totale, conseguente alla tecnologia di spumantizzazione dei vini. *La Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 12(4): 267-272.

249. Seiichi, K.; Toshimasa, S. **1995**. Highly sensitive method for urea detection in wine. *J. Food Sci.* 60(5): 1097-1109.

250. Serrano, R. **1978**. Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cell. Biochem.* 22: 51-63.

251. Silva, A.; Colagrande, O. **1987**. La cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) nel controllo di alcuni indici di qualità dei vini. *Industrie delle Bevande* 16(2): 81-98.

252. Simons, S. S. Jr.; Johnson, D. F. **1978**. Reaction of *o*-phthalaldehyde and thiols with primary amines: formation of 1-alkyl(and aryl)thio-2-alkylisoindoles. *J. Org. Chem.* 43(14): 2886-2891.

253. Sokoll, P. P.; Gates, S. B. **1990**. Effect of endogenous and exogenous polyamines on organic cation transport in rabbit renal plasma membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255(1): 52-58.

254. Soleas, G. J.; Carey, M.; Goldberg, D. M. **1999**. Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines. *Food Chem.* 64(1): 49-58.

255. Soufleros, E.; Barrios, M.-L.; Bertrand, A. **1998**. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49(3): 266-278.

256. Soufleros, E.; Bertrand, A. **1987**. Etude sur le "tsipouro", eau-de-vie de marc traditionnelle de Grèce, précursor de l'ouzo. *Vigne Vin* 21: 93-111.

257. Soufleros, E.; Bertrand, A. **1998**. Evaluation d'une méthode CLHP adaptée au dosage des acides aminés du vin. *Vitis* 37(1): 43-53.

258. Spayd, S. E.; Andersen-Bagge, J. **1996**. Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(4): 389-402.

259. Spayd, S. E.; Wample, R. L.; Evans, R. G.; Stevens, R. G.; Seymour, B. J.; Nagel, C. W. **1994**. Nitrogen fertilization of white Riesling grapes in Washington. Must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 45(1): 34-42.

260. Sponholz, W. R.; Rapp, A. **1989**. Chemie des weines. Germany. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, p. 162.

261. Stevens, D. F.; Ough, C. S. **1993**. Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 44(3): 309-312.

262. Stoewsand, G. S.; Anderson, J. L.; Munson, L. **1996**. Wine and the effect of body weight on ethyl carbamate-induced tumorigenesis in mice. *J. Wine Research* 7(3): 207-211.

263. Stratford, M.; Rose, A. H. **1985**. Hydrogen sulphide production from sulphite by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microb.* 131: 1417-1424.

264. Subden, R. E.; Brown, R. G.; Noble, A. C. **1978**. Determination of histamines in wines and musts by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 166: 310-312.

265. Symonds, P.; Cantagrel, R. **1982**. Application de l'analyse discriminante a la différenciation des vins. *Ann. Fals. Exp. Chim.* Février 75(805): 63-74.

266. Tapias, R. M.; Callao, P.; Larrechi, M. S. **1987**. Application de l'analyse multidimensionnelle des donnees a la reconnaissance des vins rouges de la Rioja. *Connaiss. Vigne Vin* 21(1):43-57.

267. Tapias, R. M.; Larrechi, M. S.; Guasch, J.; Rubio, J.; Rius, F. X. **1986**. Enological parameters and pattern recognition methods in the geographic differentiation of Spanish red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37(3): 195-201.

268. Taylor, S. L. **1986**. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *C.R.C. Crit. Ver. Toxicol.* 17: 91-129.

269. Taylor, S. L.; Lieber, E. R. **1979**. *In vitro* inhibitors of rat intestinal histamine metabolizing enzymes. Food *Cosmet. Toxicol.* 17: 237-240.

270. Tegmo-Larsson, I.-M.; Henick-Kling, T. **1990**. The effect of fermentation and extended lees contact on ethyl carbamate formation in New York wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(4): 269-272.

271. Teissedre, P. L.; Waterhouse, A. L.; Walzem, R. L.; German, J. B.; Frankel, E. N.; Ebeler, S. E.; Clifford, A. J. **1996**. Composés phénoliques du raisin et du vin et santé. *Bull. OIV* 781/782: 251-277.

272. Tercelj, D. **1965**. Étude des composés azotés du vin. *Ann. Technol. Agric.* 14(4): 307-319.

273. Thoukis, G.; Bouthilet, R. J.; Ueda, M.; Caputi, A. Jr. **1962**. Fate of diethyl pyrocarbonate in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 13: 105-113.

274. Tinlot, R. **1994**. Rapport du Directeur Général de l'O.I.V. Assemblée Générale de l'O.I.V., Séance plénière, Paris 6 Juin, France.

275. Trioli G.; Paronetto, L. **1992**. Relazioni tra componenti azotate dei mosti e qualità dei vini. *Vignevini* 19(1/2): 29-36.

276. Tukey, W. **1977**. Exploratory data analysis. Addison-Wesley Ed., Reading.

277. Usseglio-Tomasset, L. **1981**. Sulla validitá del dosaggio della prolina per il giudizio di genuinitá del vino. *Rivista di Viticoltura e di Enologia* 34(3): 120-121.

278. Usseglio-Tomasset, L.; Bosia, P. D. **1990**. Évolution des acides aminés et des oligopeptides du moût au vin. *Bull. O.I.V.* 707/708: 21-46.

279. van Dijken, J. P.; Scheffers, W.A. **1986**. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 32: 199-224.

280. van Leeuwen, C.; Friant, P.; Soyer, J.-P.; Molot, C.; Chone, X.; Dubourdieu, D. **2000**. L'intéret du dosage de l'azote total et de l'azote assimilable dans le moût comme indicateur de la nutrition azotée de la vigne. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 34(2): 75-82.

281. van Vuuren, H. J. J.; Dicks, L. M. T. **1993**. *Leuconostoc oenos*: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44(1): 99-112.

282. Vasconcelos, A. M. F. S. C. F. P. **1988**. Perfil de aminoácidos livres como parâmetro enológico para caracterização de vinhos elementares Alentejanos em função da casta de origem. Tese de Doutoramento, Universidade de Évora. 296 p.

283. Vasconcelos, A. M. P.; das Neves, H. J. C. **1990**. HRGC of wine free amino acids as a tool for elementary wine characterization. *J. High Resol. Chrom.* 13(July): 494-498.

284. Verhagen, J. V.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A. **1996**. Nitric oxide radical scavenging by wines. *J. Agric. Food Chem.* 44(12): 3733-3734.

285. Vidal, M. C.; Izquierdo, M. L.; Martin, M. C.; Marine, A. **1990**. Histamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage. *Food Chem.* 37: 239-249.

286. Vidal-Carou, M. C.; Ambatlle-Espunyes, A.; Ulla-Ulla, M. C.; Mariné-Font, A. **1990.** Histamine and tyramine in Spanish wines: Their formation during the winemaking process. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(2): 160-167.

287. Vidal-Carou, M. C.; Codony-Salcedo, R.; Mariné-Font, A. **1990.** Histamine and tyramine in Spanish wines: Relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. *Food Chem.* 35: 217-227.

288. Vidal-Carou, M. C.; Codony-Salcedo, R.; Mariné-Font, A. **1991.** Changes in the concentration of histamine and tyramine during wine spoilage at various temperatures. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(2): 145-149.

289. Vos, P. J. A.; Gray, R. S. **1977.** The origin and control of hydrogen sulphide during fermentation of grape must. *In*: Proceedings of the South African Society for Enology and Viticulture. Cape Town, p. 37.

290. Vos, P. J. A.; Gray, R. S. **1979.** The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must. *Am. J. Enol. Vitic.* 30(3): 187-197.

291. Wallker, G.; Winterlin, W.; Fauda, H.; Seiber, J. **1974.** Gas chromatographic analysis of urethane (ethylcarbamate) in wines. *J. Agric. Food. Chem.* 22(6): 944-947.

292. Watanabe, Y.; Imai, K. **1983.** Liquid chromatographic determination of amino and imino acids and thiols by postcolumn derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzo-1,2,3-oxadiazole. *Anal. Chem.* 55(11): 1786-1791.

293. Watson, T. G. **1976.** Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* 96: 263-268.

294. Weighs, C. **1993.** Multivariate exploratory data analysis and graphics: a tutorial. *J. Chemom.* 7: 305-340.

295. You, J.; Lao, W.; Ou, Q.; Sun, X. **1999.** Fluorescence properties of carbazole-N-(2-methyl)acetyl chloride and determination of amino compounds via high-performance liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization. *J. Chrom. A* 848: 117-130.

296. Zee, J. A.; Simard, R. E.; L'Heureux, L.; Tremblay, J. **1983.** Biogenic amines in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34(1): 6-9.

# ANEXOS

## ANEXO A. Dados referentes aos vinhos comerciais fornecidos pela CVRA

### Lista de tabelas

**Tabela A1.** Origem geográfica e identificação das amostras de vinhos comerciais de 1997 fornecidas pela CVRA.

**Tabela A2.** Resultados das análises sumárias dos vinhos brancos comerciais de 1997.

**Tabela A3.** Resultados das análises sumárias dos vinhos tintos comerciais de 1997.

**Tabela A4.** Concentração de aminoácidos livres nos vinhos brancos comerciais de 1997 (mg/L).

**Tabela A5.** Concentração de aminoácidos livres nos vinhos tintos comerciais de 1997 (mg/L).

**Tabela A6.** Concentração de aminas nas amostras de vinhos brancos comerciais de 1997 (mg/L).

**Tabela A7.** Concentração de aminas nas amostras de vinhos tintos comerciais de 1997 (mg/L).

**Tabela A1.** Origem geográfica e identificação das amostras de vinhos comerciais de 1997 fornecidas pela CVRA.

| CASTAS BRANCAS | | CASTAS TINTAS | |
|---|---|---|---|
| **Código da amostra** | **Origem** | **Código da amostra** | **Origem** |
| 111 | Portalegre | 113 | Portalegre |
| 112 | | 114 | |
| 121 | | 122 | |
| 211 | Borba | 123 | |
| 212 | | 131 | |
| 213 | | 132 | |
| 221 | | 133 | |
| 311 | Redondo | 214 | Borba |
| 312 | | 215 | |
| 313 | | 216 | |
| 321 | | 222 | |
| 322 | | 223 | |
| 323 | | 314 | Redondo |
| 411 | Reguengos | 315 | |
| 412 | | 316 | |
| 413 | | 317 | |
| 421 | | 324 | |
| 422 | | 325 | |
| 423 | | 326 | |
| 511 | Vidigueira | 414 | Reguengos |
| 512 | | 415 | |
| 513 | | 416 | |
| 521 | | 424 | |
| 522 | | 425 | |
| 531 | | 426 | |
| 532 | | 431 | |
| 611 | Évora | 514 | Vidigueira |
| 612 | | 515 | |
| 711 | Moura | 516 | |
| 712 | | 523 | |
| 811 | Granja | 524 | |
| 812 | | 533 | |
| | | 534 | |
| | | 613 | Évora |
| | | 614 | |
| | | 713 | Moura |
| | | 714 | |
| | | 813 | Granja |
| | | 814 | |

Nota: Os três digitos que compoêm o código de cada amostra identificam respectivamente a sub-região, o produtor e a amostra relativamente a esse produtor. Assim o vinho 121 será um vinho proveniente de Portalegre, do produtor 2 e identificado com o nº 1.

**Tabela A2.** Resultados das análises sumárias dos vinhos brancos comerciais de 1997.

| Origem | Código da amostra | SO2 livre mg/l | SO2 total mg/l | massa volúmica P20 | álcool %v | açúcares redutores g/l | extracto seco total g/l | extracto seco não redutore | acidez total g/l | acidez volátil g/l | acidez fixa | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Portalegre | 111 | 3,50 | 35,00 | 0,9891 | 12,73 | 1,55 | 19,55 | 18,01 | 5,75 | 0,33 | 5,33 | 3,21 |
| | 112 | 10,00 | 69,00 | 0,9905 | 11,40 | 1,52 | 19,05 | 17,54 | 5,64 | 0,38 | 5,16 | 3,23 |
| | 121 | 15,00 | 92,00 | 0,9896 | 12,35 | 1,77 | 19,70 | 17,94 | 5,09 | 0,38 | 4,62 | 3,26 |
| Borba | 211 | 1,00 | 53,50 | 0,9895 | 11,70 | 1,55 | 17,35 | 15,81 | 4,57 | 0,47 | 3,98 | 3,10 |
| | 212 | 2,50 | 78,00 | 0,9900 | 12,45 | 2,08 | 20,95 | 18,87 | 3,93 | 0,71 | 3,05 | 3,50 |
| | 213 | 2,00 | 68,50 | 0,9903 | 12,20 | 1,69 | 21,10 | 19,42 | 5,29 | 0,63 | 4,51 | 3,33 |
| | 221 | 14,00 | 78,50 | 0,9890 | 12,50 | 1,47 | 18,45 | 16,99 | 5,45 | 0,33 | 5,04 | 2,94 |
| Redondo | 311 | 6,00 | 77,00 | 0,9899 | 12,55 | 2,15 | 20,95 | 18,80 | 4,41 | 0,54 | 3,74 | 3,42 |
| | 312 | 10,50 | 87,50 | 0,9900 | 12,10 | 1,65 | 20,00 | 18,35 | 4,58 | 0,43 | 4,05 | 3,28 |
| | 313 | 1,00 | 28,00 | 0,9899 | 12,15 | 1,67 | 19,80 | 18,14 | 4,48 | 0,49 | 3,87 | 3,38 |
| | 321 | 12,00 | 80,50 | 0,9899 | 12,05 | 2,13 | 19,40 | 17,13 | 5,21 | 0,37 | 4,75 | 2,94 |
| | 322 | 6,50 | 68,00 | 0,9893 | 13,20 | 2,00 | 21,35 | 19,36 | 5,25 | 0,37 | 4,79 | 3,14 |
| | 323 | 6,00 | 75,50 | 0,9903 | 13,55 | 2,14 | 25,00 | 22,86 | 5,99 | 0,41 | 5,48 | 3,05 |
| Reguengos | 411 | 3,50 | 53,00 | 0,99 | 12,55 | 2,04 | 21,85 | 19,82 | 4,76 | 0,29 | 4,40 | 3,41 |
| | 412 | 3,00 | 28,50 | 0,99 | 13,00 | 2,22 | 22,70 | 20,49 | 4,96 | 0,37 | 4,51 | 3,57 |
| | 413 | 3,50 | 61,00 | 0,99 | 12,60 | 2,02 | 21,30 | 19,64 | 5,26 | 0,31 | 4,88 | 3,34 |
| | 421 | 15,00 | 92,50 | 0,99 | 11,85 | 2,75 | 20,60 | 17,86 | 5,24 | 0,32 | 4,84 | 3,35 |
| | 422 | 11,50 | 45,00 | 0,99 | 11,20 | 1,73 | 19,65 | 17,92 | 5,00 | 0,29 | 4,63 | 3,38 |
| | 423 | 2,50 | 63,00 | 0,99 | 11,55 | 2,93 | 20,60 | 17,68 | 4,70 | 0,39 | 4,21 | 3,36 |
| Vidigueira | 511 | vest. | 29,50 | 0,99 | 11,50 | 1,57 | 19,65 | 18,08 | 4,88 | 0,43 | 4,34 | 3,29 |
| | 512 | 3,00 | 46,00 | 0,99 | 11,95 | 1,80 | 19,60 | 17,81 | 4,67 | 0,38 | 4,20 | 3,42 |
| | 513 | 3,50 | 45,00 | 0,99 | 12,20 | 1,80 | 20,20 | 18,41 | 4,95 | 0,37 | 4,49 | 3,39 |
| | 521 | 11,00 | 68,50 | 0,99 | 13,15 | 1,93 | 21,05 | 19,12 | 5,16 | 0,40 | 4,67 | 3,41 |
| | 522 | 15,50 | 70,50 | 0,99 | 12,45 | 4,96 | 22,65 | 17,70 | 4,64 | 0,66 | 3,82 | 3,32 |
| | 531 | 1,00 | 27,50 | 0,99 | 11,05 | 2,67 | 19,70 | 17,03 | 5,35 | 0,20 | 5,10 | 3,15 |
| | 532 | 5,00 | 42,50 | 0,99 | 12,15 | 1,69 | 21,15 | 19,47 | 5,36 | 0,33 | 4,94 | 3,33 |
| Evora | 611 | 16,00 | 138,00 | 0,99 | 14,35 | 3,41 | 26,60 | 23,20 | 4,89 | 0,31 | 4,50 | 3,36 |
| | 612 | 16,50 | 136,50 | 0,99 | 12,95 | 2,06 | 21,75 | 19,69 | 5,20 | 0,25 | 4,89 | 3,54 |
| Moura | 711 | 17,50 | 93,00 | 0,99 | 12,20 | 1,52 | 21,25 | 19,78 | 5,55 | 0,31 | 5,16 | 3,51 |
| | 712 | 23,00 | 89,00 | 0,99 | 12,50 | 1,40 | 20,20 | 18,81 | 5,34 | 0,37 | 4,88 | 3,48 |
| Granja | 811 | 11,50 | 68,00 | 0,99 | 10,35 | 1,28 | 17,50 | 16,23 | 4,88 | 0,33 | 4,46 | 3,26 |
| | 812 | 4,00 | 62,50 | 0,99 | 11,25 | 1,24 | 19,00 | 17,77 | 4,95 | 0,38 | 4,48 | 3,28 |

**Tabela A3.** Resultados das análises sumárias dos vinhos tintos comerciais de 1997.

| Origem | Código da amostra | SO2 livre mg/l | SO2 total mg/l | massa volúmica P20 | álcool %v | açúcares redutores g/l | extracto seco total g/l | extracto seco não redutores | acidez total | acidez volátil g/l | acidez fixa | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Portalegre | 113 | 3,00 | 30,00 | 0,9928 | 11,60 | 2,24 | 25,40 | 23,16 | 4,74 | 0,62 | 3,96 | 3,64 |
| | 114 | 7,50 | 42,00 | 0,9934 | 12,70 | 2,60 | 30,30 | 27,70 | 4,92 | 0,66 | 4,09 | 3,72 |
| | 122 | 3,50 | 46,00 | 0,9934 | 12,03 | 3,55 | 28,30 | 24,75 | 4,78 | 0,46 | 4,21 | 3,67 |
| | 123 | 3,00 | 26,50 | 0,9936 | 12,43 | 3,88 | 16,51 | 26,18 | 4,85 | 0,62 | 4,08 | 3,66 |
| | 131 | 0,50 | 14,00 | 0,9915 | 13,15 | 2,39 | 26,90 | 24,51 | 5,53 | 0,56 | 4,84 | 3,33 |
| | 132 | 6,00 | 14,50 | 0,9911 | 13,03 | 2,77 | 25,25 | 22,49 | 5,48 | 0,67 | 4,65 | 3,37 |
| | 133 | 2,00 | 18,50 | 0,9926 | 11,80 | 2,65 | 25,70 | 23,06 | 6,18 | 0,56 | 5,49 | 3,16 |
| Borba | 214 | 2,00 | 87,50 | 0,9934 | 12,33 | 2,96 | 29,15 | 26,20 | 5,31 | 0,86 | 4,24 | 3,51 |
| | 215 | 1,50 | 9,00 | 0,9925 | 12,48 | 2,32 | 27,25 | 24,93 | 5,35 | 0,83 | 4,26 | 3,56 |
| | 216 | 3,00 | 11,50 | 0,9930 | 12,58 | 2,81 | 29,05 | 26,25 | 4,91 | 0,68 | 4,07 | 3,62 |
| | 222 | 12,00 | 31,50 | 0,9919 | 12,70 | 3,92 | 26,60 | 22,69 | 4,83 | 0,48 | 4,23 | 3,56 |
| | 223 | 2,50 | 38,00 | 0,9918 | 13,30 | 2,50 | 28,10 | 25,60 | 4,98 | 0,55 | 4,29 | 3,65 |
| Redondo | 314 | 1,50 | 40,00 | 0,99 | 11,70 | 2,38 | 24,60 | 22,23 | 5,11 | 0,52 | 4,46 | 3,47 |
| | 315 | 4,50 | 34,50 | 0,99 | 14,40 | 3,30 | 34,50 | 31,20 | 5,19 | 0,66 | 4,37 | 3,81 |
| | 316 | 4,00 | 49,00 | 0,99 | 13,30 | 2,75 | 28,90 | 26,15 | 4,84 | 0,53 | 4,18 | 3,61 |
| | 317 | 5,50 | 54,00 | 0,99 | 12,28 | 2,37 | 26,25 | 23,88 | 5,36 | 0,38 | 4,88 | 3,47 |
| | 324 | 2,50 | 25,50 | 0,99 | 12,13 | 2,98 | 26,75 | 23,78 | 4,94 | 0,60 | 4,19 | 3,65 |
| | 325 | 5,50 | 28,50 | 0,99 | 12,10 | 3,18 | 27,30 | 24,12 | 4,91 | 0,64 | 4,11 | 3,63 |
| | 326 | 3,50 | 21,50 | 0,99 | 12,70 | 3,58 | 28,40 | 24,82 | 4,98 | 0,53 | 4,33 | 3,61 |
| Reguengos | 414 | 1,00 | 9,50 | 0,99 | 12,50 | 2,29 | 26,50 | 24,22 | 5,62 | 0,71 | 4,73 | 3,57 |
| | 415 | 1,50 | 16,00 | 0,99 | 12,78 | 2,14 | 27,95 | 25,82 | 5,28 | 0,68 | 4,44 | 3,60 |
| | 416 | 0,50 | 10,00 | 0,99 | 12,73 | 1,82 | 25,70 | 23,89 | 5,27 | 0,62 | 4,50 | 3,54 |
| | 424 | 6,50 | 42,00 | 0,99 | 12,10 | 2,12 | 24,70 | 22,58 | 4,44 | 0,51 | 3,81 | 3,58 |
| | 425 | 5,50 | 51,00 | 0,99 | 11,30 | 2,11 | 25,40 | 23,29 | 4,82 | 0,52 | 4,17 | 3,44 |
| | 426 | 6,50 | 45,00 | 0,99 | 11,70 | 2,20 | 26,10 | 23,90 | 4,72 | 0,48 | 4,12 | 3,49 |
| | 431 | 1,00 | 12,50 | 0,99 | 13,20 | 2,37 | 27,10 | 24,73 | 5,16 | 0,77 | 4,20 | 3,55 |
| Vidigueira | 514 | 3,50 | 66,50 | 0,99 | 12,40 | 3,69 | 26,20 | 22,52 | 4,37 | 0,52 | 3,72 | 3,65 |
| | 515 | 4,00 | 48,00 | 0,99 | 12,13 | 2,84 | 26,55 | 23,71 | 4,72 | 0,56 | 4,02 | 3,60 |
| | 516 | 3,00 | 57,50 | 0,99 | 12,40 | 3,34 | 26,70 | 23,36 | 4,58 | 0,54 | 3,90 | 3,57 |
| | 523 | 20,50 | 60,50 | 0,99 | 12,90 | 3,49 | 29,50 | 26,01 | 4,68 | 0,66 | 3,86 | 3,62 |
| | 524 | 17,00 | 62,00 | 0,99 | 12,83 | 3,56 | 29,05 | 25,49 | 4,67 | 0,66 | 3,83 | 3,64 |
| | 533 | 2,50 | 48,50 | 0,99 | 11,90 | 3,23 | 27,50 | 24,27 | 5,01 | 0,54 | 4,34 | 3,51 |
| | 534 | 2,50 | 29,50 | 0,99 | 12,95 | 2,95 | 29,70 | 26,75 | 5,03 | 0,51 | 4,39 | 3,55 |
| Evora | 613 | 12,50 | 69,50 | 0,99 | 12,90 | 2,68 | 27,15 | 24,48 | 4,38 | 0,54 | 3,70 | 3,76 |
| | 614 | 5,50 | 103,00 | 0,99 | 14,20 | 2,46 | 29,30 | 26,84 | 4,11 | 0,43 | 3,58 | 3,87 |
| Moura | 713 | 4,50 | 66,00 | 0,99 | 12,23 | 1,97 | 27,95 | 25,98 | 4,99 | 0,58 | 4,27 | 3,71 |
| | 714 | 6,50 | 53,50 | 0,99 | 12,53 | 2,59 | 27,20 | 24,62 | 6,04 | 0,60 | 5,29 | 3,34 |
| Granja | 813 | 2,00 | 31,50 | 0,99 | 11,68 | 2,85 | 27,90 | 25,06 | 6,20 | 0,54 | 5,52 | 3,24 |
| | 814 | 4,50 | 32,00 | 0,99 | 12,00 | 2,06 | 28,40 | 26,35 | 4,98 | 0,69 | 4,11 | 3,71 |

**Tabela A4.** Concentração de aminoácidos livres nos vinhos brancos comerciais de 1997 (mg/L).

| Amino -ácido | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **VB112** | 28,4 | 30,5 | 12,3 | 10,9 | 0,4 | | 8,7 | 12,1 | 5,5 | 39,7 | 18,0 | 9,1 | 9,3 | | 97,3 | | 20,8 | 9,9 | 31,9 | | 35,3 | 463,2 |
| **VB121** | 32,2 | 35,6 | 38,2 | 22,6 | 1,0 | 23,6 | 23,5 | 19,0 | 23,3 | 91,2 | 36,8 | 53,1 | 30,0 | 19,0 | 19,8 | 6,7 | 29,0 | 19,3 | 32,7 | 36,4 | 53,7 | 574,1 |
| **VB211** | 37,0 | 45,0 | 16,8 | 15,8 | 0,8 | | 14,7 | 18,5 | 5,8 | 118,6 | 36,4 | 33,9 | 10,6 | | 98,3 | | 25,3 | 11,1 | 43,7 | 13,8 | 48,3 | 831,6 |
| **VB212** | 32,4 | 47,4 | 10,9 | 16,0 | 0,8 | | 12,6 | 12,7 | 5,6 | 246,6 | 37,6 | 78,7 | 8,5 | | 96,7 | | 19,9 | 9,3 | 24,6 | 15,6 | 39,0 | 1206,8 |
| **VB213** | 33,2 | 47,0 | 13,3 | 12,6 | 0,4 | | 11,7 | 14,4 | 5,6 | 64,5 | 32,9 | 20,8 | 10,0 | 10,8 | 97,7 | | 22,0 | 10,6 | 31,8 | 25,3 | 45,1 | 618,2 |
| **VB221** | 18,7 | 13,0 | 12,1 | 13,6 | | 7,3 | 11,9 | 7,4 | 0,3 | 43,2 | 23,7 | 2,4 | 10,9 | 7,7 | 4,3 | 3,5 | 63,0 | 5,3 | 23,6 | 0,1 | 90,0 | 822,8 |
| **VB311** | 33,7 | 41,1 | 27,5 | 22,6 | 0,1 | 31,6 | 21,2 | 16,0 | 12,2 | 497,7 | 45,2 | 183,5 | 27,4 | 20,2 | 10,5 | 5,9 | 114,6 | 2,7 | 36,3 | 5,5 | 122,2 | 790,8 |
| **VB312** | 50,0 | 68,9 | 149,1 | 34,1 | 0,4 | 30,8 | 30,6 | 21,4 | 21,6 | 215,8 | 54,0 | 106,8 | 41,3 | 28,1 | 24,3 | 7,0 | 42,4 | 25,5 | 52,0 | 37,1 | 90,3 | 607,9 |
| **VB313** | 49,8 | 71,9 | 29,8 | 33,5 | 0,6 | 34,9 | 28,0 | 24,7 | 23,9 | 341,1 | 63,1 | 136,7 | 44,1 | 28,0 | 24,5 | 8,0 | 30,6 | 25,0 | 48,8 | 44,2 | 82,7 | 593,3 |
| **VB321** | 34,5 | 41,2 | 27,0 | 24,3 | 0,4 | 27,8 | 23,2 | 20,2 | 20,1 | 178,2 | 40,7 | 75,0 | 31,6 | 19,8 | 20,0 | 6,2 | 30,2 | 19,4 | 35,8 | 29,2 | 56,8 | 657,2 |
| **VB322** | 45,8 | 54,5 | 31,1 | 29,7 | | 18,6 | 27,4 | 24,9 | 21,1 | 93,1 | 35,9 | 21,7 | 39,5 | 26,4 | 25,0 | 7,2 | 41,1 | 25,0 | 49,9 | 16,6 | 74,5 | 574,5 |
| **VB323** | 33,1 | 40,7 | 27,3 | 29,0 | 0,4 | 30,2 | 22,3 | 21,7 | 19,4 | 90,1 | 36,6 | 18,3 | 33,4 | 21,5 | 22,2 | 6,7 | 32,5 | 20,9 | 36,2 | 19,9 | 61,2 | 477,1 |
| **VB411** | 24,1 | 18,7 | 14,2 | 22,5 | 0,2 | 8,9 | 15,4 | 5,6 | 1,6 | 41,0 | 13,2 | 14,5 | 13,9 | 12,1 | 6,6 | 3,6 | 77,5 | 9,6 | 26,3 | | 83,6 | 1042,2 |
| **VB412** | 31,0 | 23,3 | 1,7 | 22,2 | 0,1 | 13,6 | 15,7 | 11,0 | 0,6 | 35,0 | 28,1 | 13,0 | 14,2 | 11,7 | 6,3 | 3,5 | 77,8 | 9,3 | | | 91,0 | 1329,2 |
| **VB413** | 24,8 | 19,8 | 14,9 | 13,7 | 0,1 | 23,0 | 17,9 | 6,5 | 1,7 | 326,6 | 34,6 | 43,2 | 16,1 | 11,8 | 6,4 | 4,2 | 85,2 | 9,2 | 31,8 | 0,6 | 74,8 | 1037,4 |
| **VB421** | 19,0 | 16,5 | 17,9 | 12,6 | | 17,4 | 13,0 | 6,1 | 1,7 | 159,3 | 29,8 | 2,1 | 11,1 | 7,5 | 3,0 | 4,0 | 51,9 | 5,2 | 15,6 | 3,3 | 52,7 | 1007,0 |
| **VB422** | 17,5 | 14,3 | 16,1 | 11,0 | 0,1 | 19,2 | 11,1 | 5,8 | 3,4 | 166,8 | 24,5 | 4,5 | 8,8 | 6,0 | 2,5 | 3,8 | 42,2 | 4,4 | 13,3 | 5,6 | 77,1 | 932,4 |
| **VB423** | 19,4 | 16,8 | 19,7 | 12,8 | 0,3 | 22,5 | 14,6 | 6,7 | 0,5 | 213,3 | 30,8 | 15,4 | 11,4 | 7,5 | 3,0 | 4,3 | 51,5 | 5,0 | 15,4 | 5,2 | 56,0 | 994,1 |
| **VB511** | 24,7 | 18,3 | 15,1 | 19,7 | 0,1 | 15,5 | 15,6 | 11,9 | 2,5 | 43,5 | 33,4 | 14,6 | 13,4 | 13,5 | 6,8 | 3,9 | 81,3 | 11,0 | 29,1 | 8,1 | 107,0 | 1210,4 |
| **VB512** | 9,9 | 10,2 | 9,7 | 5,0 | | 8,5 | 8,5 | 7,6 | 1,2 | 46,9 | | 5,3 | 9,1 | 7,8 | 3,7 | 3,4 | 27,2 | 6,7 | 13,2 | 0,8 | 52,8 | 1059,0 |
| **VB521** | 29,1 | 25,1 | 16,2 | 24,9 | | 5,4 | 20,8 | 12,8 | 2,1 | 118,0 | 39,8 | 17,1 | 20,7 | 16,4 | 10,6 | 3,8 | 121,0 | 12,8 | 39,7 | 5,6 | 165,5 | 1304,3 |
| **VB522** | 18,4 | 15,9 | 11,5 | 9,8 | | 13,1 | 12,8 | 9,3 | 0,8 | 35,0 | 25,7 | 3,2 | 12,7 | 9,7 | 5,6 | 3,5 | 71,5 | 8,4 | 25,4 | 1,5 | 94,1 | 1250,0 |
| **VB531** | 34,7 | 19,2 | 13,0 | 11,6 | 1,3 | 14,6 | 16,2 | 19,6 | | 91,6 | | 5,4 | 19,4 | 12,3 | 9,4 | 3,4 | 94,9 | 12,2 | 38,1 | 1,6 | 136,4 | 738,0 |
| **VB532** | 29,3 | 17,8 | 33,7 | 17,7 | 0,1 | 17,0 | 17,1 | 10,7 | 4,8 | 61,8 | 29,7 | 5,6 | 16,6 | 12,3 | 9,7 | 3,5 | 114,6 | 10,0 | 40,1 | 9,5 | 139,8 | 973,8 |
| **VB611** | 15,6 | 17,9 | 11,7 | 22,4 | | 10,7 | 12,9 | 7,1 | 0,2 | 28,0 | 26,3 | 3,8 | 9,3 | 6,9 | 3,5 | 3,4 | 51,2 | 5,4 | 14,8 | | 55,9 | 967,6 |
| **VB612** | 20,7 | 18,0 | 8,3 | 9,0 | | 10,7 | 10,9 | 7,8 | 0,7 | 26,7 | 22,8 | 4,6 | 10,1 | 8,3 | 4,8 | 3,4 | 55,1 | 7,0 | 16,4 | 1,2 | 63,7 | 1165,1 |
| **VB711** | 22,2 | 15,7 | 4,8 | 15,5 | | 9,1 | 12,4 | 8,7 | | 31,7 | 23,2 | 5,2 | 11,1 | 9,4 | 4,9 | 3,6 | 69,0 | 8,1 | 23,4 | 0,3 | 93,7 | 712,9 |
| **VB712** | 18,7 | 15,6 | 14,9 | 13,2 | | 9,1 | 9,9 | 6,8 | 0,4 | 31,0 | 22,5 | 6,8 | 9,2 | 8,3 | 5,1 | 3,6 | 58,5 | 7,2 | 20,1 | 1,2 | 81,8 | 802,1 |
| **VB811** | 11,8 | 9,7 | 5,0 | 7,0 | | 6,2 | 9,5 | 4,9 | 0,9 | 29,0 | 9,3 | 6,1 | 7,6 | 9,9 | 3,1 | 4,0 | 29,8 | 4,3 | 13,4 | 2,9 | 20,0 | 874,7 |
| **VB812** | 12,1 | 8,8 | 4,9 | 8,6 | 0,1 | 7,7 | 9,5 | 5,6 | 0,1 | 18,0 | 7,1 | 6,1 | 7,4 | 5,6 | 2,4 | 3,5 | 35,7 | 4,8 | 11,9 | | 59,1 | 927,8 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro - prolina; VB - vinho branco.

**Tabela A5.** Concentração de aminoácidos livres nos vinhos tintos comerciais de 1997 (mg/L).

| Amino ácido | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **VT113** | 7,3 | 9,7 | 5,1 | 5,9 | 0,1 | | 10,1 | 4,8 | 0,2 | 1,5 | 12,5 | 6,1 | | 3,5 | 0,8 | 3,6 | 21,5 | 2,4 | 5,0 | | 11,4 | 586,1 |
| **VT114** | 27,9 | 24,6 | 4,4 | 21,0 | 0,1 | 0,1 | 27,0 | 12,9 | 1,2 | 6,6 | 45,1 | 12,2 | 3,9 | 11,2 | 5,4 | 3,9 | 49,6 | 7,8 | 24,6 | 5,0 | 50,5 | 1512,4 |
| **VT122** | 20,4 | 21,5 | 13,6 | 15,5 | | | 22,7 | 10,9 | 2,1 | 50,9 | 36,5 | 14,0 | 10,8 | 9,5 | 4,6 | 4,5 | 41,6 | 6,9 | 16,1 | 4,9 | 49,7 | 1416,6 |
| **VT123** | 18,5 | 22,6 | 12,4 | 10,4 | 0,3 | | 23,9 | 10,0 | 3,1 | 5,6 | 31,2 | 26,9 | 1,8 | 10,5 | 4,3 | 5,2 | 34,6 | 7,5 | 12,2 | 12,5 | 39,9 | 1534,1 |
| **VT131** | 6,6 | 17,8 | 26,5 | 12,0 | | 2,8 | 17,5 | 7,6 | 7,3 | 15,4 | 26,5 | 31,2 | 2,5 | 5,9 | 3,6 | 3,6 | 31,0 | 3,9 | 7,5 | 1,6 | 33,7 | 1108,9 |
| **VT132** | 9,1 | 12,7 | 17,3 | 12,0 | | 1,3 | 17,6 | 7,6 | 1,5 | 6,6 | 25,3 | 7,7 | 1,7 | 5,2 | 3,6 | 3,7 | 23,9 | 3,2 | 6,4 | 4,8 | 27,7 | 1082,0 |
| **VT133** | 1,5 | 2,7 | 3,7 | 5,9 | | 0,7 | 5,0 | 2,7 | 2,5 | 3,9 | 3,2 | 2,5 | 1,8 | 2,0 | | 3,6 | 9,1 | 1,5 | 1,8 | 4,3 | 6,6 | 1092,4 |
| **VT214** | 13,9 | 24,7 | 10,0 | 10,8 | | 7,6 | 15,8 | 8,8 | 7,0 | 14,4 | 19,1 | 19,6 | 6,3 | 7,7 | 3,9 | 3,5 | 40,4 | 5,3 | 8,4 | 1,8 | 23,8 | 999,8 |
| **VT216** | 11,1 | 16,6 | 4,1 | 12,5 | | 2,7 | 12,5 | 7,6 | 6,9 | 10,4 | 10,9 | 44,6 | 3,1 | 7,7 | 3,9 | 3,5 | 36,1 | 5,6 | 9,1 | 1,3 | 20,3 | 858,3 |
| **VT222** | 34,7 | 69,5 | 29,5 | 30,7 | 0,5 | 15,3 | 31,1 | 24,8 | 21,7 | 62,1 | 61,1 | 43,5 | 33,4 | 22,4 | 20,8 | 7,3 | 30,3 | 20,3 | 30,8 | 71,4 | 49,8 | 575,7 |
| **VT223** | 57,0 | 134,3 | 44,9 | 54,5 | | 19,4 | 54,4 | 48,1 | 22,0 | 240,2 | 128,2 | 80,1 | 48,6 | 38,2 | 29,2 | 7,6 | 47,7 | 31,0 | 55,0 | 47,2 | 78,4 | 741,7 |
| **VT314** | 1,3 | 7,7 | 2,8 | 7,8 | | 3,1 | 6,1 | 3,7 | 8,3 | 9,3 | 5,2 | 2,7 | 5,0 | 2,9 | 3,1 | | 20,7 | 2,5 | 4,1 | 1,2 | 10,9 | 1631,0 |
| **VT315** | 17,6 | 19,8 | 6,4 | 12,8 | | 3,2 | 15,2 | 7,2 | | 54,7 | | 6,7 | 7,6 | 5,0 | 2,8 | 3,4 | 27,3 | 5,6 | 6,9 | 1,4 | 33,3 | 1210,7 |
| **VT317** | 6,1 | 7,0 | 5,6 | 1,1 | | | 4,7 | 3,3 | 1,6 | 19,9 | | 5,1 | 3,7 | 1,7 | | 3,4 | 17,2 | 4,2 | 5,5 | 1,4 | 14,9 | 1006,6 |
| **VT324** | 22,9 | 23,8 | 8,9 | 8,9 | 0,1 | | 22,6 | 11,6 | 3,0 | 93,0 | | 38,3 | 8,2 | 8,6 | 3,7 | 3,4 | 39,0 | 7,6 | 13,5 | 5,6 | 68,9 | 1179,8 |
| **VT325** | 27,3 | 28,8 | 23,0 | 9,6 | 0,3 | 7,5 | 26,4 | 13,4 | 3,4 | 109,9 | | 40,4 | 9,4 | 10,8 | 3,8 | 3,4 | 33,7 | 8,8 | 15,1 | 4,8 | 61,2 | 1219,0 |
| **VT326** | 30,0 | 44,5 | 31,0 | 22,0 | | | 35,4 | 21,5 | 3,7 | 190,9 | | 38,1 | 1,9 | 15,0 | 7,7 | 3,4 | 79,8 | 14,2 | 29,3 | 2,5 | 127,1 | 1299,6 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro - prolina; VT - vinho tinto.

**Tabela A5.** Concentração de aminoácidos livres nos vinhos tintos comerciais de 1997 (mg/L) (continuação).

| Amino ácido | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **VT414** | 19,6 | 17,2 | 14,6 | | 1,0 | 2,0 | 16,1 | 10,4 | 1,5 | 54,3 | | 22,9 | 1,9 | 11,3 | 3,1 | 3,4 | 25,9 | 9,1 | 14,2 | 1,5 | 39,1 | 1202,8 |
| **VT415** | 21,8 | 21,8 | 6,7 | 17,4 | | 1,9 | 20,8 | 11,1 | | | 40,6 | 6,5 | 8,4 | 10,4 | 1,8 | 3,8 | 39,9 | 6,1 | 10,7 | 2,1 | 35,9 | 1311,2 |
| **VT416** | 18,2 | 19,2 | 9,4 | 15,2 | | | 23,0 | 7,0 | 0,4 | 1,5 | 40,2 | 20,7 | | 8,2 | 2,6 | 3,7 | 38,1 | 5,1 | 12,1 | 0,9 | 41,6 | 1527,7 |
| **VT424** | 8,6 | 8,2 | 9,1 | 7,0 | 0,2 | 1,4 | 9,3 | 4,8 | | 5,2 | 16,7 | 5,3 | 3,8 | 5,5 | 1,5 | 3,7 | 27,7 | 3,5 | 8,5 | | 27,2 | 1215,0 |
| **VT425** | 12,8 | 10,7 | 5,8 | 9,2 | | 7,1 | 10,2 | 5,6 | 0,3 | 12,1 | 15,9 | 4,3 | 6,2 | 5,2 | 1,3 | 3,7 | 31,5 | 3,4 | 7,6 | 1,9 | 27,7 | 1229,0 |
| **VT426** | 18,6 | 14,1 | 2,5 | 12,6 | | 4,0 | 13,9 | 7,5 | | 10,4 | 22,2 | 5,0 | 7,8 | 7,4 | 2,2 | 3,7 | 44,6 | 5,2 | 12,1 | 0,8 | 28,1 | 1435,8 |
| **VT431** | 29,4 | 27,4 | 3,6 | 21,9 | | | 26,3 | 13,9 | 0,9 | | 48,3 | 42,2 | 13,9 | 14,5 | 3,5 | 3,9 | 56,1 | 9,0 | 15,1 | | 54,9 | 1480,6 |
| **VT514** | 28,5 | 35,5 | 14,5 | 23,1 | 0,3 | 15,8 | 19,3 | 17,3 | 17,9 | 46,8 | 25,3 | 18,2 | 26,4 | 16,8 | 17,3 | 6,0 | 22,4 | 16,8 | 21,0 | 27,9 | 46,7 | 542,1 |
| **VT515** | 16,6 | 26,0 | 9,7 | | | 1 | 10,1 | 8,6 | 5,6 | 22,8 | 16,8 | 14,2 | | 7,6 | 95,6 | | 16,0 | 8,9 | 9,5 | 10,7 | 31,1 | 349,2 |
| **VT516** | 30,1 | 32,9 | 17,8 | 22,9 | 0,1 | 16,8 | 22,8 | 19,7 | 20,3 | 57,0 | 31,0 | 31,2 | 22,6 | 18,2 | 18,7 | 6,7 | 23,8 | 18,5 | 21,0 | 38,6 | 36,2 | 543,1 |
| **VT523** | 27,2 | 38,9 | 12,1 | | | | 14,8 | 12,9 | 7,5 | 24,3 | 27,1 | 19,7 | 0,6 | 11,9 | 95,2 | | 17,4 | 9,6 | 13,0 | 16,8 | 45,6 | 419,0 |
| **VT524** | 19,6 | 38,8 | 12,1 | | | | 14,8 | 13,1 | 5,7 | 23,2 | 27,3 | 19,2 | 0,8 | 12,1 | 95,1 | | 17,1 | 9,5 | 13,0 | 16,0 | 51,1 | 413,3 |
| **VT533** | 16,3 | 36,6 | 12,8 | 11,6 | 3,5 | 19,5 | 14,9 | 10,8 | 5,9 | 58,3 | 31,9 | 16,5 | 2,7 | 1 | 95,7 | | 15,5 | 9,1 | 12,2 | 13,7 | 40,6 | 535,1 |
| **VT534** | 29,9 | 54,7 | 31,4 | 29,7 | 0,7 | 16,9 | 35,3 | 22,0 | 22,9 | 138,6 | 51,6 | 39,9 | 32,4 | 21,7 | 20,8 | 6,8 | 27,6 | 20,1 | 25,9 | 15,5 | 32,4 | 744,8 |
| **VT613** | 26,3 | 35,8 | 6,9 | 33,7 | 0,4 | 2,3 | 24,4 | 14,5 | 4,1 | 106,1 | | 15,4 | 13,0 | 13,8 | 4,4 | 3,4 | 58,3 | 10,4 | 18,7 | 16,9 | 81,8 | 1230,7 |
| **VT614** | 26,5 | 57,1 | 25,6 | 28,3 | 0,1 | 17,5 | 21,9 | 19,4 | 19,2 | 66,5 | 36,7 | 17,0 | 27,0 | 18,0 | 18,7 | 6,5 | 23,7 | 18,0 | 21,8 | 18,8 | 37,9 | 683,7 |
| **VT713** | 24,3 | 24,7 | 2,3 | 25,2 | | 0,5 | 20,0 | 11,9 | 1,3 | 71,5 | 4,8 | 5,7 | 1,5 | 14,1 | 4,3 | 3,7 | 51,1 | 9,4 | 16,0 | 5,6 | 78,2 | 1075,7 |
| **VT714** | 19,1 | 21,5 | 2,1 | 18,4 | 0,1 | 1,5 | 17,6 | 9,0 | 0,2 | 33,6 | 13,7 | 10,0 | 9,2 | 9,6 | 1,9 | 3,6 | 37,5 | 7,1 | 11,3 | 0,9 | 36,2 | 1175,4 |
| **VT813** | 28,3 | 26,5 | 5,5 | 18,2 | | 0,8 | 23,0 | 11,4 | 1,6 | 65,1 | 57,7 | 13,0 | 1,9 | 10,9 | 4,6 | 3,9 | 49,2 | 5,9 | 12,4 | 7,2 | 48,4 | 1153,9 |
| **VT814** | 36,8 | 37,4 | 4,6 | 26,6 | 0,1 | 1,0 | 30,6 | 14,9 | 2,0 | 115,9 | 67,0 | 4,1 | 23,8 | 15,5 | 4,3 | 3,9 | 88,4 | 8,5 | 17,4 | 2,2 | 93,4 | 1279,9 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina; VT – vinho tinto.

**Tabela A6.** Concentração de aminas nos vinhos brancos comerciais de 1997 (mg/L).

| Amostra | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try+Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **VB112** | | | 1,0 | 1,0 | 1,3 | 2,3 | | | |
| **VB121** | 27,0 | 2,6 | 5,0 | 4,4 | 5,0 | 16,6 | 10,3 | | 2,9 |
| **VB211** | | | 1,7 | 3,0 | 2,0 | 6,1 | | | |
| **VB212** | | | 0,9 | 2,2 | 1,7 | 4,5 | | | 4,3 |
| **VB213** | 4,7 | | 0,8 | 1,8 | 1,1 | 4,7 | | | 4,1 |
| **VB221** | 16,7 | | 1,7 | 3,3 | | 5,3 | | | |
| **VB311** | 37,8 | | 1,5 | 3,2 | 1,3 | 21,9 | 1,2 | | 4,5 |
| **VB312** | 26,9 | 2,5 | 5,1 | 4,4 | 4,9 | 16,3 | 10,1 | | 2,8 |
| **VB313** | 27,7 | 2,5 | 5,9 | 6,3 | 4,9 | 16,4 | 10,1 | | 2,8 |
| **VB321** | 25,9 | 2,5 | 5,6 | 5,5 | 4,8 | 16,0 | 9,9 | | 2,8 |
| **VB322** | 24,4 | 2,8 | 5,1 | 5,0 | 5,4 | 18,1 | 11,2 | | 3,1 |
| **VB323** | 31,8 | 2,8 | 5,0 | 4,7 | 5,3 | 17,9 | 11,1 | | 3,1 |
| **VB411** | 13,2 | 1,7 | 0,9 | 5,3 | 1,5 | 4,2 | 1,4 | | 2,1 |
| **VB412** | 19,9 | | 1,3 | 0,8 | 1,5 | 4,4 | 1,4 | | 0,3 |
| **VB413** | 22,9 | | 2,8 | 3,4 | 1,5 | 4,1 | 1,4 | | 1,3 |
| **VB421** | 22,6 | | 2,3 | 2,2 | | 4,8 | | nd | 1,0 |
| **VB422** | 19,5 | | 1,9 | | | 4,5 | | | 0,6 |
| **VB423** | 23,7 | | 2,2 | 3,5 | | 8,7 | | | 0,8 |
| **VB511** | 14,9 | 1,7 | 1,0 | 7,5 | 1,5 | 7,9 | 2,1 | | 2,1 |
| **VB512** | 8,3 | | nd | | | 3,8 | | | |
| **VB521** | 16,8 | 5,2 | 1,2 | 4,3 | 2,6 | 16,7 | 2,4 | | 2,1 |
| **VB522** | 14,6 | 1,7 | 0,6 | 4,6 | 1,5 | 7,9 | 2,2 | | 2,1 |
| **VB531** | 16,5 | | nd | | 3,2 | 7,2 | | | |
| **VB532** | 14,0 | 1,7 | 1,0 | 8,3 | 1,5 | 6,9 | 1,8 | | 2,1 |
| **VB611** | 12,6 | | 1,3 | | | 3,2 | | | |
| **VB612** | 10,4 | 1,7 | 0,6 | | 1,5 | 4,0 | 1,4 | | 2,1 |
| **VB711** | 17,4 | | 1,5 | 0,3 | | 3,6 | | | |
| **VB712** | 11,4 | 1,7 | 0,6 | 3,9 | 1,5 | 3,5 | 1,4 | | 2,1 |
| **VB811** | 18,2 | | 1,6 | 3,0 | 1,0 | 11,5 | | | 1,7 |
| **VB812** | 22,4 | | 1,6 | 1,1 | 1,6 | 26,1 | | | 0,5 |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina; nd – não determinado; VB – vinho branco.

**Tabela A7.** Concentração de aminas nos vinhos tintos comerciais de 1997 (mg/L).

| Amostra | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try+Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **VT113** | 26,8 | 4,1 | 2,2 | 5,0 | 4,9 | 17,9 | 1,6 | | |
| **VT114** | 35,0 | 5,2 | 2,3 | 9,2 | 10,3 | 24,9 | 2,1 | | 1,8 |
| **VT122** | 37,4 | 5,4 | 3,1 | 11,4 | 2,3 | 20,8 | 2,9 | | 2,6 |
| **VT123** | 39,3 | 5,2 | 3,0 | 10,3 | 9,4 | 23,1 | 2,8 | | 3,0 |
| **VT131** | 58,6 | 12,0 | 1,4 | 5,0 | 7,3 | 20,5 | 1,5 | | 1,0 |
| **VT132** | 30,7 | 4,4 | 3,4 | 7,7 | 6,4 | 27,9 | 2,7 | | 2,0 |
| **VT133** | 30,4 | 3,9 | 3,0 | 6,4 | 1,7 | 14,3 | 2,8 | | |
| **VT214** | 39,5 | | 1,7 | 3,9 | 6,2 | 39,7 | 1,4 | | 2,1 |
| **VT216** | 42,3 | 12,4 | 1,6 | 3,3 | 5,7 | 68,6 | 1,3 | | 2,3 |
| **VT222** | 33,6 | 2,5 | 4,6 | 8,1 | 4,9 | 16,5 | 10,2 | | 2,9 |
| **VT223** | 44,2 | 2,9 | 5,4 | 5,2 | 5,7 | 19,0 | 11,8 | | 3,3 |
| **VT314** | 37,7 | | | 1,6 | 1,3 | 5,6 | 1,3 | | 1,2 |
| **VT315** | 20,6 | 4,9 | nd | 11,3 | 3,4 | 7,5 | 3,1 | | 3,1 |
| **VT317** | 17,1 | | nd | 6,5 | | 6,6 | | | |
| **VT324** | 23,4 | 5,8 | nd | 10,3 | 5,1 | 21,9 | 2,9 | | 2,3 |
| **VT325** | 21,8 | 5,5 | nd | | 4,9 | 33,6 | 2,8 | | 2,5 |
| **VT326** | 28,9 | 8,1 | nd | 15,9 | 21,3 | 58,9 | 3,3 | | 2,7 |
| **VT414** | 20,2 | 5,3 | nd | | 5,2 | 26,9 | 3,2 | | |
| **VT415** | 34,9 | 5,0 | 2,5 | 5,0 | 2,6 | 31,9 | 2,1 | nd | 2,0 |
| **VT416** | 36,0 | 5,1 | 2,2 | 3,6 | 9,5 | 18,8 | 1,8 | | |
| **VT424** | 30,7 | 4,2 | 2,0 | 2,4 | 2,1 | 4,1 | 1,6 | | 2,1 |
| **VT425** | 32,2 | | 2,0 | 4,4 | 1,4 | 8,4 | 1,7 | | 2,7 |
| **VT426** | 28,7 | 4,1 | 2,1 | 7,2 | 3,0 | 18,4 | 1,6 | | 2,3 |
| **VT431** | 37,6 | 6,4 | 2,7 | 4,8 | 1,4 | 78,5 | 2,7 | | 2,6 |
| **VT514** | 30,6 | 2,4 | 4,2 | 10,8 | 4,7 | 15,6 | 9,7 | | 2,7 |
| **VT515** | 5,7 | | 0,7 | 2,6 | 2,3 | 7,0 | 1,9 | | 3,2 |
| **VT516** | 42,3 | 2,7 | 5,3 | 4,4 | 5,2 | 17,5 | 10,8 | | 3,0 |
| **VT523** | 12,3 | | 1,3 | 4,5 | 2,8 | 31,5 | 1,9 | | 3,4 |
| **VT524** | 11,8 | | 0,8 | 4,4 | 2,6 | 40,3 | 1,9 | | 3,4 |
| **VT533** | 10,3 | | 1,4 | 3,9 | 3,1 | 8,2 | 1,9 | | 3,3 |
| **VT534** | 44,0 | 5,0 | 7,7 | 4,8 | 5,4 | 18,0 | 11,2 | | 3,1 |
| **VT613** | 22,8 | 6,4 | nd | 11,8 | 4,8 | 12,7 | 3,0 | | 2,9 |
| **VT614** | 34,3 | 2,6 | 4,3 | 4,1 | 5,0 | 16,9 | 10,5 | | 2,9 |
| **VT713** | 21,3 | 4,6 | 1,1 | | 11,7 | 10,1 | 2,9 | | 2,1 |
| **VT714** | 26,7 | 4,5 | 1,6 | 1,5 | 2,1 | 9,1 | 1,7 | | 0,7 |
| **VT813** | 29,3 | 5,6 | 3,1 | 9,2 | 15,0 | 12,4 | 2,3 | | 2,2 |
| **VT814** | 31,4 | 7,5 | 3,3 | 7,2 | 1,7 | 26,9 | 1,9 | | 0,9 |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina; nd – não determinado; VT – vinho tinto.

# ANEXO B. Dados referentes aos vinhos fornecidos pela Universidade de Évora

## Lista de tabelas

**Tabela B1.** Análise sumária dos vinhos resultantes das microvinificações referentes ao estudo das castas de Évora (Vindimas de 1997).

**Tabela B2.** Análise sumária dos vinhos resultantes das microvinificações referentes ao estudo das regiões (Vindimas de 1997).

**Tabela B3.** Análise sumária dos vinhos resultantes das microvinificações referentes ao estudo das castas de Évora (Vindimas de 1998).

**Tabela B4.** Análise sumária dos vinhos resultantes das microvinificações referentes ao estudo das regiões (Vindimas de 1998).

**Tabela B5.** Concentração de aminoácidos livres nas amostras de vinhos das diversas microvinificações de 1997 (mg/L).

**Tabela B6.** Concentração de aminoácidos livres nas amostras de vinhos das diversas microvinificações de 1998 (mg/L).

**Tabela B7.** Concentração de aminas nas amostras de vinhos das diversas microvinificações de 1997 (mg/L).

**Tabela B8.** Concentração de aminas nas amostras de vinhos das diversas microvinificações de 1998 (mg/L).

**Tabela B1.** Análise sumária dos vinhos resultantes das microvinificações referentes ao estudo das castas de Évora (vindima de 1997).

| Amostra | $SO_2$ livre (mg/L) | $SO_2$ total (mg/L) | massa volúmica P20 | TAV (% (v/v)) | açúcares redutores (g/L) | extracto seco total (g/L) | extracto seco não redutor (g/L) | acidez total (g/L) | acidez volátil (g/L) | acidez fixa (g/L) | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Castas Brancas** | | | | | | | | | | | |
| Roupeiro | 33,00 | 91,50 | 0,9888 | 13,13 | 1,10 | 19,80 | 18,70 | 4,70 | 0,29 | 4,34 | 3,73 |
| AntãoVaz | 45,00 | 129,50 | 0,9906 | 12,00 | 1,57 | 21,40 | 19,84 | 4,68 | 0,14 | 4,50 | 3,77 |
| Rabo de Ovelha | 43,00 | 127,00 | 0,9904 | 12,00 | 1,38 | 20,60 | 19,22 | 4,41 | 0,17 | 4,19 | 3,67 |
| Perrum | 44,00 | 117,00 | 0,9896 | 12,23 | 2,27 | 19,40 | 17,13 | 4,97 | 0,19 | 4,73 | 3,26 |
| Arinto | 38,50 | 125,50 | 0,9899 | 12,48 | 2,34 | 20,95 | 18,62 | 4,72 | 0,20 | 4,47 | 3,37 |
| **Castas Tintas** | | | | | | | | | | | |
| Trincadeira | 42 | 161,5 | 0,9931 | 13,1 | 2,685 | 30,7 | 28,02 | 4,635 | 0,36 | 4,185 | 3,8 |
| Moreto | 15,5 | 68,5 | 0,9946 | 10,48 | 1,905 | 26,8 | 24,90 | 3,81 | 0,48 | 3,21 | 3,99 |
| Tinta Caiada | 17 | 80,5 | 0,9938 | 11,7 | 2,675 | 28,65 | 25,98 | 5,1 | 0,445 | 4,54 | 3,55 |
| Aragonez | 23 | 79 | 0,993 | 12,6 | 1,6 | 29,2 | 27,6 | 3,61 | 0,45 | 3,045 | 4,125 |
| Castelão | 21 | 85 | 0,99245 | 12,22 | 1,875 | 26,7 | 24,82 | 4,525 | 0,435 | 3,98 | 3,725 |

Legenda: TAV – título alcoométrico volúmico adquirido.

**Tabela B2.** Análise sumária dos vinhos resultantes das microvinificações referentes ao estudo das regiões (vindima de 1997).

| Amostra | $SO_2$ livre (mg/L) | $SO_2$ total (mg/L) | massa volúmica P20 | TAV (% (v/v)) | açúcares redutores (g/L) | extracto seco total (g/L) | extracto seco não redutor (g/L) | acidez total (g/L) | acidez volátil (g/L) | acidez fixa (g/L) | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Casta Roupeiro** | | | | | | | | | | | |
| Évora | 33 | 91,5 | 0,98875 | 13,125 | 1,1 | 19,8 | 18,7 | 4,695 | 0,285 | 4,335 | 3,73 |
| Vidigueira | 45 | 93 | 0,9877 | 14,5 | 1,27 | 21 | 19,73 | 4,42 | 0,36 | 3,97 | 3,795 |
| Redondo | 43 | 98,5 | 0,98825 | 13,4 | 1,225 | 19,15 | 17,925 | 4,415 | 0,465 | 4,335 | 3,56 |
| Reguengos | 37,5 | 102,5 | 0,9881 | 13,6 | 1,73 | 19,5 | 17,77 | 4,425 | 0,435 | 3,88 | 3,74 |
| Borba | 43,5 | 123,5 | 0,9895 | 12,2 | 1,46 | 18,8 | 17,34 | 5,375 | 0,31 | 4,985 | 3,435 |
| Portalegre | 43,5 | 110,5 | 0,9881 | 14 | 3,6 | 20,5 | 16,9 | 3,975 | 0,265 | 3,645 | 3,64 |
| **Casta Trincadeira** | | | | | | | | | | | |
| Évora | 42 | 161,5 | 0,9931 | 13,1 | 2,685 | 30,7 | 28,015 | 4,635 | 0,36 | 4,185 | 3,8 |
| Vidigueira | 17,5 | 90 | 0,99625 | 10,2 | 3,01 | 30,25 | 27,24 | 4,73 | 0,57 | 4,015 | 3,82 |
| Redondo | 9,5 | 106,5 | 0,9965 | 12,2 | 3,08 | 30,5 | 27,42 | 4,555 | 0,49 | 3,945 | 3,82 |
| Reguengos | 10,5 | 97 | 0,9932 | 11,2 | 2,36 | 25,3 | 22,94 | 4,415 | 0,5 | 3,79 | 3,715 |
| Borba | 14 | 77,5 | 0,9918 | 12,7 | 1,38 | 26,65 | 25,27 | 4,11 | 0,425 | 3,575 | 3,92 |
| Portalegre | 9,5 | 72,5 | 0,9933 | 14,25 | 2,985 | 35 | 32,015 | 4,885 | 0,435 | 4,34 | 3,82 |

Legenda: TAV – título alcoométrico volúmico adquirido.

**Tabela B3.** Análise sumária dos vinhos resultantes das microvinificações referentes ao estudo das castas de Évora (1998).

| Amostra | $SO_2$ livre (mg/L) | $SO_2$ total (mg/L) | massa volúmica P20 | TAV (% (v/v)) | açúcares redutores (g/L) | extracto seco total (g/L) | extracto seco não redutor (g/L) | acidez total (g/L) | acidez volátil (g/L) | acidez fixa (g/L) | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Castas Brancas** | | | | | | | | | | | |
| Roupeiro | 32,50 | 123,50 | 0,9899 | 13,75 | 3,59 | 24,40 | 20,82 | 3,99 | 0,37 | 3,53 | 3,96 |
| Rabo deOvelha | 33,50 | 95,50 | 0,9908 | 12,70 | 2,28 | 23,70 | 21,42 | 4,65 | 0,39 | 4,17 | 3,73 |
| AntãoVaz | 28,50 | 100,50 | 0,9893 | 13,30 | 2,03 | 21,60 | 19,57 | 3,35 | 0,03 | 2,99 | 4,11 |
| Arinto | 30,50 | 101,00 | 0,9904 | 12,80 | 4,55 | 22,90 | 18,35 | 5,22 | 0,03 | 4,82 | 3,23 |
| Perrum | 20,50 | 104,00 | 0,9911 | 11,65 | 5,85 | 21,55 | 15,71 | 3,72 | 0,02 | 3,47 | 3,29 |
| **Castas Tintas** | | | | | | | | | | | |
| Trincadeira | 33 | 80 | 0,99195 | 13,45 | 2,78 | 28,9 | 26,12 | 4,05 | 0,6 | 3,3 | 4 |
| Tinta | 41,5 | 73 | 0,9926 | 12,5 | 1,95 | 27,7 | 25,75 | 4,085 | 0,65 | 3,35 | 3,905 |
| Aragonez | 16 | 68 | 0,9938 | 13 | 1,57 | 32,3 | 30,73 | 2,8 | 0,92 | 1,65 | 4,595 |
| Castelão | 35 | 74 | 0,991 | 12,95 | 1,74 | 24,95 | 23,20 | 3,76 | 0,6 | 3,02 | 3,895 |
| Moreto | 25,5 | 76 | 0,99275 | 11,6 | 2,06 | 25,45 | 23,385 | 3,63 | 0,54 | 2,96 | 4,015 |

Legenda: TAV – título alcoométrico volúmico adquirido.

**Tabela B4.** Análise sumária dos vinhos resultantes das microvinificações referentes ao estudo das regiões (1998).

| Amostra | $SO_2$ livre (mg/L) | $SO_2$ total (mg/L) | massa volúmica P20 | TAV (% (v/v)) | açúcares redutores (g/L) | extracto seco total (g/L) | extracto seco não redutor (g/L) | acidez total (g/L) | acidez volátil (g/L) | acidez fixa (g/L) | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Casta Roupeiro** | | | | | | | | | | | |
| Évora | 32,50 | 123,50 | 0,9899 | 13,75 | 3,59 | 24,40 | 20,82 | 3,99 | 0,37 | 3,53 | 3,96 |
| Vidigueira | 23,50 | 111,50 | 0,9889 | 12,58 | 1,44 | 18,50 | 17,06 | 3,42 | 0,20 | 3,17 | 3,86 |
| Portalegre | 24,50 | 128,00 | 0,9907 | 13,75 | 6,04 | 26,50 | 20,46 | 4,21 | 0,25 | 3,90 | 3,67 |
| Reguengos | 39,50 | 102,50 | 0,9885 | 12,88 | 2,10 | 18,30 | 16,21 | 3,87 | 0,26 | 3,55 | 3,75 |
| Redondo | 43,50 | 122,00 | 9897,0000 | 13,00 | 2,75 | 21,90 | 19,15 | 3,83 | 0,22 | 3,56 | 3,67 |
| **Casta Trincadeira** | | | | | | | | | | | |
| Évora | 33 | 80 | 0,99195 | 13,45 | 2,775 | 28,9 | 26,125 | 4,05 | 0,6 | 3,3 | 4 |
| Portalegre | 12,5 | 67,5 | 0,9924 | 13,7 | 2,36 | 30,65 | 28,29 | 4,08 | 0,57 | 3,365 | 3,905 |
| Borba | 33 | 84 | 0,99215 | 12,55 | 1,49 | 26,9 | 25,41 | 4,29 | 0,52 | 3,64 | 3,98 |
| Reguengos | 36,5 | 73,5 | 0,9926 | 12,55 | 2,135 | 28 | 25,865 | 4,105 | 0,41 | 3,59 | 3,975 |
| Redondo | 33,5 | 85 | 0,9921 | 13,65 | 2,525 | 30 | 27,475 | 4,35 | 0,56 | 3,65 | 3,96 |

Legenda: TAV – título alcoométrico volúmico adquirido.

**Tabela B5.** Concentração de aminoácidos livres nas amostras de vinhos das diversas microvinificações de 1997 (mg/L).

| Casta | Proveniência | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Vinhos 1997** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Castelão** | **Évora** | 13,7 | 19,6 | 9,5 | 15,0 | | 3,9 | 13,2 | 7,7 | 4,6 | | 24,7 | 14,4 | 8,5 | 5,6 | 3,3 | 4,8 | 3,0 | 4,2 | 18,8 | 1,1 | 26,6 | 1172,9 |
| **Aragonez** | **Évora** | 24,9 | 30,6 | 13,3 | 25,5 | | 2,0 | 21,1 | 24,8 | 2,4 | 3,1 | 42,1 | 15,9 | 12,7 | 13,3 | 7,0 | 4,6 | 7,6 | 11,5 | 46,8 | | 44,3 | 1376,6 |
| **Tinta Caiada** | **Évora** | 23,0 | 28,9 | 27,8 | 23,0 | | 22,0 | 25,2 | 15,1 | 2,4 | 73,1 | 44,2 | 24,0 | 17,1 | 7,8 | | 5,5 | 5,0 | 8,4 | 27,5 | 2,8 | 50,4 | 1274,9 |
| **Moreto** | **Évora** | 26,1 | 24,6 | 13,8 | 21,8 | 0,3 | 1,1 | 24,7 | 19,6 | 2,9 | 40,3 | 37,6 | 22,3 | 16,9 | 16,4 | 6,0 | 6,2 | 7,1 | 12,4 | 38,3 | | 48,6 | 1591,1 |
| **Trincadeira** | **Portalegre** | 32,4 | 29,8 | 14,9 | 27,0 | 0,1 | 3,2 | 24,0 | 15,9 | 2,1 | 1,0 | 31,4 | 15,3 | 6,0 | 5,2 | 9,2 | 5,4 | 5,1 | 7,1 | 27,2 | 1,8 | 37,8 | 1366,3 |
| **Trincadeira** | **Borba** | 13,3 | 18,3 | 13,4 | 14,7 | 0,4 | 51,4 | 7,9 | 8,8 | 2,1 | | 16,4 | 9,6 | 8,1 | 10,9 | 1,1 | 4,4 | 3,7 | 5,1 | 24,9 | 1,2 | 24,1 | 1092,2 |
| **Trincadeira** | **Reguengos** | 18,9 | 15,6 | 7,5 | 15,2 | 0,1 | | | 24,8 | 16,2 | | 27,6 | 12,9 | 10,6 | 12,7 | 2,7 | 5,0 | 5,4 | 7,2 | 30,2 | | 30,5 | 1050,2 |
| **Trincadeira** | **Redondo** | 18,1 | 20,9 | 0,7 | 14,8 | 0,2 | 9,5 | 16,6 | 8,3 | 10,1 | | 37,3 | 9,4 | 10,1 | 6,5 | 3,0 | 4,5 | 3,8 | 4,1 | 9,7 | 3,3 | 28,1 | 1017,8 |
| **Trincadeira** | **Vidigueira** | 31,5 | 28,6 | 1,7 | 27,1 | 0,3 | 68,2 | 38,5 | 21,2 | 43,8 | 181,0 | 91,8 | 105,7 | 24,3 | 16,6 | 6,4 | 27,2 | 9,6 | 11,6 | 25,1 | 73,6 | 59,0 | 1485,1 |
| **Trincadeira** | **Évora** | 20,1 | 22,3 | 6,4 | 2 | 1,0 | 13,6 | 16,9 | 9,5 | 13,3 | 0,9 | 50,1 | 12,9 | 9,6 | 7,9 | 3,8 | 5,2 | 4,0 | 5,9 | 13,8 | 3,1 | 31,3 | 1090,3 |
| **Arinto** | **Évora** | 26,9 | 27,8 | 54,3 | 26,2 | 4,3 | 45,0 | 40,7 | 17,1 | 11,3 | 143,8 | 108,2 | 54,2 | 37,6 | 23,3 | 6,5 | 17,8 | 12,3 | 10,6 | 23,3 | 31,2 | 44,5 | 1082,8 |
| **Perrum** | **Évora** | 20,3 | 24,3 | 42,2 | 10,9 | 2,4 | 8,4 | 24,0 | 16,0 | 5,8 | 55,5 | 84,7 | 53,2 | 14,8 | 6,9 | 3,4 | 15,6 | 4,6 | 4,7 | 12,8 | 17,2 | 26,1 | 623,0 |
| **Rabo de Ovelha** | **Évora** | 34,9 | 27,6 | 33,0 | 22,3 | 2,6 | 55,2 | 34,4 | 17,6 | 27,9 | 225,9 | 112,8 | 91,0 | 16,0 | 12,9 | 6,6 | 21,6 | 7,4 | 8,9 | 21,5 | 39,2 | 37,0 | 1045,7 |
| **Antão Vaz** | **Évora** | 38,0 | 28,7 | 29,1 | 22,2 | 5,5 | 38,1 | 28,0 | 20,5 | 31,1 | 242,8 | 58,2 | 49,3 | 19,7 | 14,3 | 7,1 | 12,9 | 9,6 | 11,4 | 27,0 | 53,0 | 49,7 | 1089,4 |
| **Roupeiro** | **Portalegre** | 11,3 | 13,7 | 12,5 | 13,9 | 1,5 | 7,2 | 10,1 | 10,8 | 5,8 | 15,4 | 11,5 | 6,9 | 6,5 | 5,4 | 3,6 | 3,9 | 3,8 | 4,2 | 12,3 | 2,0 | 27,0 | 775,4 |
| **Roupeiro** | **Borba** | 19,6 | 20,1 | 20,7 | 22,5 | 1,1 | 11,8 | 14,9 | 7,4 | 5,2 | 51,8 | 39,1 | 8,5 | 1 | 8,9 | 5,0 | 3,4 | 8,8 | 6,8 | 23,3 | 7,9 | 44,6 | 847,6 |
| **Roupeiro** | **Reguengos** | 19,9 | 23,1 | 15,6 | 21,1 | 1,7 | 17,7 | 14,2 | 17,5 | 4,7 | 32,9 | 49,1 | 20,6 | 12,6 | 10,4 | 5,4 | 3,4 | 8,6 | 8,1 | 23,3 | 8,3 | 44,5 | 978,5 |
| **Roupeiro** | **Redondo** | 25,8 | 27,7 | 24,5 | 22,1 | 0,2 | 30,9 | 25,2 | 12,1 | 11,2 | 67,7 | 10,9 | 69,0 | 18,6 | 12,9 | 6,6 | 3,4 | 10,6 | 1 | 26,0 | 22,4 | 51,2 | 1016,2 |
| **Roupeiro** | **Vidigueira** | 31,9 | 29,1 | 25,5 | 38,8 | 1,2 | 30,8 | 30,2 | 25,1 | 9,4 | 128,4 | 79,1 | 14,0 | 20,2 | 23,6 | 11,9 | 3,4 | 15,3 | 18,6 | 47,2 | 18,9 | 81,6 | 1186,9 |
| **Roupeiro** | **Évora** | 25,4 | 25,2 | 13,3 | 30,9 | 0,1 | 16,4 | 18,5 | 22,1 | 4,9 | 39,3 | 44,4 | 12,0 | 14,8 | 17,7 | 7,3 | 3,4 | 11,8 | 13,8 | | 4,9 | 63,3 | 1166,3 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela B6.** Concentração de aminoácidos livres nas amostras de vinhos das diversas microvinificações de 1998 (mg/L).

| Casta | Proveniência | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Vinhos 1998** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Castelão** | **Évora** | 13,0 | 19,6 | 17,2 | 19,6 | | | 16,0 | 10,2 | 6,9 | 65,0 | 0,1 | 17,8 | 0,5 | 11,0 | 1,5 | 4,3 | 4,6 | 5,6 | 15,9 | | 26,1 | 950,5 |
| **Aragonêz** | **Évora** | 34,6 | 45,7 | 57,5 | 46,9 | 0,9 | 55,9 | 44,3 | 31,7 | 13,9 | 183,2 | 0,1 | 85,4 | 7,4 | 21,6 | 8,0 | 13,4 | 12,4 | 12,9 | 44,3 | 0,5 | 60,1 | 1157,1 |
| **Tinta Caiada** | **Évora** | 21,0 | 27,2 | 25,9 | 24,1 | 1,8 | 0,2 | 24,8 | 20,2 | 4,1 | 26,9 | 37,8 | 26,0 | 2,5 | 16,2 | 0,2 | 7,8 | 6,4 | 8,3 | 32,5 | | 39,6 | 1381,9 |
| **Moreto** | **Évora** | 4,7 | 6,1 | 1,9 | 5,4 | 0,6 | 0,7 | 5,3 | 6,0 | 2,8 | | 6,8 | 4,5 | | 5,1 | | 3,4 | | 2,2 | 6,0 | | 7,8 | 1026,7 |
| **Trincadeira** | **Portalegre** | 36,1 | 42,6 | 35,2 | 45,0 | 0,4 | 46,9 | 43,4 | 35,9 | 3,0 | 18,4 | 152,2 | 30,1 | 3,5 | 2 | 1,7 | 11,7 | 7,2 | 9,6 | 33,0 | | 54,5 | 1527,7 |
| **Trincadeira** | **Borba** | 3,4 | 8,4 | 7,7 | 7,9 | 0,9 | | 7,5 | 8,1 | 3,2 | 1,0 | 2,0 | 4,5 | | 5,6 | | 4,4 | 0,2 | 2,7 | 11,5 | | 13,3 | 1062,6 |
| **Trincadeira** | **Reguengos** | 19,9 | 16,4 | 12,1 | 19,1 | 2,0 | | 19,2 | 15,6 | 4,0 | 58,4 | 2,7 | 10,3 | 0,5 | 13,1 | | 5,2 | 4,9 | 7,2 | 33,5 | | 37,5 | 1506,4 |
| **Trincadeira** | **Redondo** | 22,0 | 18,7 | 3,6 | 17,7 | | 14,2 | 17,3 | 13,7 | 2,7 | 49,4 | 10,2 | 12,3 | 1,6 | 10,6 | | 5,0 | 3,1 | 5,6 | 23,7 | | 26,8 | 1342,2 |
| **Trincadeira** | **Évora** | 30,3 | 30,9 | 4,4 | 3,5 | 18,2 | 28,6 | | 47,4 | 21,3 | | 46,9 | 2,7 | 20,4 | 15,7 | 1,0 | 7,3 | 5,9 | 8,6 | 40,3 | | 48,5 | 1511,7 |
| **Perrum** | **Évora** | 15,8 | 18,3 | 30,9 | 12,0 | 1,7 | 6,5 | 17,8 | 11,5 | 7,1 | 24,6 | 36,2 | 13,4 | 12,6 | 10,2 | 0,6 | 4,4 | 5,4 | 5,0 | 24,3 | 6,0 | 22,1 | 326,8 |
| **Arinto** | **Évora** | 30,4 | 34,8 | 51,1 | 38,1 | 3,5 | 64,9 | 48,8 | 34,7 | 11,8 | 275,5 | 217,0 | 63,1 | 29,1 | 23,8 | 1,3 | 10,7 | 9,9 | 9,0 | 4,0 | 20,3 | 38,8 | 1206,8 |
| **Antão Vaz** | **Évora** | 29,3 | 37,4 | 62,7 | 26,2 | 5,8 | 73,3 | 34,6 | 19,7 | 11,9 | 258,0 | 132,8 | 70,9 | 19,9 | 18,6 | 4,5 | 12,2 | 9,9 | 12,7 | 50,5 | 38,4 | 36,0 | 1095,7 |
| **Roupeiro** | **Reguengos** | 11,9 | 15,2 | 22,3 | 21,4 | 1,5 | 20,5 | 14,6 | 13,9 | 6,6 | 40,3 | 36,7 | 11,3 | 9,2 | 11,2 | 1,4 | 4,0 | 5,8 | 7,4 | 3 | 1,9 | 28,4 | 827,0 |
| **Roupeiro** | **Vidigueira** | 26,1 | 27,1 | 49,9 | 28,4 | 1,3 | 47,0 | 30,3 | 21,4 | 8,4 | 116,9 | 28,8 | 23,6 | 17,8 | 22,5 | 4,1 | 6,0 | 12,0 | 14,7 | 58,9 | 11,3 | 53,3 | 1053,9 |
| **Rabo de Ovelha** | **Évora** | 41,7 | 43,5 | 69,8 | 54,8 | 5,0 | 108,5 | 43,0 | 74,2 | 13,1 | 284,1 | 239,6 | 82,1 | 61,6 | 75,9 | 9,2 | 15,6 | 42,5 | 26,5 | 42,5 | 14,1 | 19,8 | 1134,3 |
| **Roupeiro** | **Portalegre** | 25,3 | 34,0 | 51,6 | 18,9 | 4,0 | 10,8 | 23,1 | 15,7 | 7,8 | 19,0 | 122,5 | 51,4 | 20,1 | 16,6 | 2,8 | 11,5 | 9,2 | 8,3 | 35,7 | 7,8 | 17,2 | 894,8 |
| **Roupeiro** | **Redondo** | 20,8 | 23,3 | 44,1 | 19,4 | 1,3 | 17,0 | 25,7 | 16,0 | 7,4 | 41,5 | 47,8 | 8,9 | 13,0 | 11,7 | 3,7 | 4,1 | 8,2 | 9,4 | 40,5 | 6,0 | 31,2 | 854,5 |
| **Roupeiro** | **Évora** | 42,8 | 46,1 | 73,0 | 35,4 | 7,8 | 69,9 | 37,4 | 4,0 | 3,9 | 336,1 | 193,3 | 99,4 | 31,1 | 26,0 | 10,4 | 20,6 | 14,6 | 13,4 | 56,2 | 10,4 | 46,5 | 1152,5 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela B7.** Concentração de aminas nas amostras de vinhos das diversas microvinificações de 1997 (mg/L).

| Casta | Proveniência | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Vinhos 1997** | | | | | | | | | | | |
| **Periquita** | **Évora** | 16,8 | 15,2 | | 1,0 | | 4,4 | 1,2 | | 0,2 | |
| **Aragonez** | **Évora** | 18,0 | | 0,2 | 2,9 | | 12,9 | 1,4 | | 0,2 | |
| **Tinta Caiada** | **Évora** | 26,0 | 21,1 | 0,1 | 5,5 | | 9,9 | 1,2 | | 0,4 | |
| **Moreto** | **Évora** | 19,6 | 11,1 | 3,2 | 3,0 | 0,1 | 27,2 | 1,3 | | | |
| **Trincadeira** | **Portalegre** | 19,2 | | | 8,7 | | 1,3 | 1,4 | | 0,2 | |
| **Trincadeira** | **Borba** | 11,3 | | | 1,0 | | 2,3 | 1,3 | | | |
| **Trincadeira** | **Reguengos** | 12,2 | | | 2,5 | 0,1 | 5,2 | 1,2 | | 0,2 | |
| **Trincadeira** | **Redondo** | 12,9 | 6,2 | 0,3 | 1,9 | 0,5 | 3,7 | 1,4 | | 0,7 | |
| **Trincadeira** | **Vidigueira** | 25,4 | 8,3 | 0,3 | 7,0 | | 7,9 | 2,7 | | 0,9 | |
| **Trincadeira** | **Évora** | 19,1 | 8,3 | 0,3 | 4,4 | | 5,9 | 2,2 | | 0,7 | |
| **Arinto** | **Évora** | 20,6 | 13,7 | 1,0 | 2,3 | | 2,7 | 1,3 | | 0,5 | |
| **Perrum** | **Évora** | 17,5 | 10,3 | 0,3 | 1,0 | | 2,5 | 1,0 | | 0,5 | |
| **Rabo de Ovelha** | **Évora** | 20,0 | 8,8 | 0,3 | 3,1 | | 7,4 | 0,8 | | 0,5 | |
| **Antão Vaz** | **Évora** | 16,6 | 8,6 | 0,3 | 2,6 | | 3,6 | 0,8 | | 0,5 | 0,3 |
| **Roupeiro** | **Portalegre** | 12,2 | 5,1 | 0,3 | 1,2 | | 3,6 | 0,8 | | 0,5 | |
| **Roupeiro** | **Borba** | 14,8 | 7,7 | 0,7 | 0,8 | | 2,9 | 0,1 | | 0,3 | |
| **Roupeiro** | **Reguengos** | 15,2 | 8,6 | 0,9 | 1,3 | | 5,5 | 0,2 | | 0,3 | |
| **Roupeiro** | **Redondo** | 18,3 | 14,2 | 1,2 | 3,0 | | 7,6 | 0,2 | | 0,3 | |
| **Roupeiro** | **Vidigueira** | 21,0 | 13,9 | 1,1 | 0,1 | | 5,7 | 0,2 | | 0,3 | |
| **Roupeiro** | **Évora** | 16,3 | 9,3 | 0,8 | 1,2 | | 4,1 | 0,2 | | 0,3 | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela B8.** Concentração de aminas nas amostras de vinhos das diversas microvinificações de 1998 (mg/L).

| Casta | Proveniência | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Vinhos 1998** | | | | | | | | | | | |
| **Periquita** | **Évora** | 20,9 | 12,8 | 0,5 | 1,3 | 4,1 | 10,2 | 0,8 | | 0,2 | |
| **Aragonêz** | **Évora** | 27,6 | 9,5 | 1,3 | 6,7 | 5,4 | 65,0 | 1,9 | | 0,2 | |
| **Tinta Caiada** | **Évora** | 27,3 | | 0,4 | 7,0 | 5,3 | 23,2 | 0,7 | | 0,1 | |
| **Moreto** | **Évora** | 11,1 | | | 0,4 | 1,3 | 2,4 | 0,6 | | 0,1 | |
| **Trincadeira** | **Portalegre** | 34,3 | 15,8 | 0,7 | 8,6 | 7,5 | 35,3 | 1,2 | | 0,2 | |
| **Trincadeira** | **Borba** | 13,3 | | | 0,5 | 2,2 | 5,1 | 0,7 | | 0,1 | |
| **Trincadeira** | **Reguengos** | 21,6 | | 0,1 | 5,1 | 6,0 | 15,7 | 1,1 | | 0,1 | |
| **Trincadeira** | **Redondo** | 19,9 | 6,2 | 0,1 | 3,6 | 4,3 | 9,6 | 0,9 | | 0,2 | |
| **Trincadeira** | **Évora** | 26,5 | 21,2 | 0,5 | 6,3 | 6,3 | 24,2 | 0,9 | | | |
| **Perrum** | **Évora** | 11,1 | 7,7 | 0,2 | 0,6 | 0,2 | 1,5 | 0,6 | | 0,6 | |
| **Arinto** | **Évora** | 18,6 | 16,5 | 0,7 | 1,0 | 0,2 | 3,7 | 0,7 | | | |
| **Antão Vaz** | **Évora** | 19,0 | 6,7 | 1,8 | 1,8 | 0,2 | 3,5 | 0,6 | | | |
| **Roupeiro** | **Reguengos** | 15,3 | 6,6 | 0,3 | 1,2 | 0,2 | 4,8 | 0,7 | | | |
| **Roupeiro** | **Vidigueira** | 21,0 | 6,8 | 0,3 | 3,2 | 0,2 | 6,9 | 0,7 | | | |
| **Rabo de Ovelha** | **Évora** | 19,5 | 18,2 | 2,9 | 1,4 | 0,2 | 5,8 | 0,8 | | | |
| **Roupeiro** | **Portalegre** | 13,6 | 10,3 | 0,2 | 1,9 | 0,2 | 1,0 | 0,6 | | 0,6 | |
| **Roupeiro** | **Redondo** | 17,8 | 7,0 | 0,2 | 2,4 | 0,2 | 4,1 | 0,7 | | 0,5 | |
| **Roupeiro** | **Évora** | 22,3 | 13,5 | 0,7 | 2,3 | | 4,2 | 1,1 | | 0,2 | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

# ANEXO C. Dados referentes aos mostos fornecidos pela Universidade de Évora

## Lista de Tabelas

**Tabela C1.** Características dos mostos usados nas microvinificações referentes ao estudo das regiões (Vindima de 1998).

**Tabela C2.** Características dos mostos usados nas microvinificações referentes ao estudo das castas de Évora (Vindima de 1998).

**Tabela C3.** Características dos mostos usados nas microvinificações referentes ao estudo das regiões (Vindima de 1999).

**Tabela C4.** Características dos mostos usados nas microvinificações referentes ao estudo das castas de Évora (Vindima de 1999).

**Tabela C5.** Concentração de aminoácidos livres nas amostras de mostos das diversas microvinificações de 1998 (mg/L).

**Tabela C6.** Concentração de aminoácidos livres nas amostras de mostos das diversas microvinificações de 1999 (mg/L).

**Tabela C7.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Aragonez (mg/L).

**Tabela C8.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Tinta Caiada (mg/L).

**Tabela C9.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Moreto (mg/L).

**Tabela C10.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Trincadeira (mg/L).

**Tabela C11.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Castelão (mg/L).

**Tabela C12.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Roupeiro (mg/L).

**Tabela C13.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Rabo de Ovelha (mg/L).

**Tabela C14.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Arinto (mg/L).

**Tabela C15.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Perrum (mg/L).

**Tabela C16.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Antão Vaz (mg/L).

**Tabela C17.** Concentração de aminas nas amostras de mostos das diversas microvinificações de 1998 (mg/L).

**Tabela C18.** Concentração de aminas nas amostras de mostos das diversas microvinificações de 1999 (mg/L).

**Tabela C19.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Aragonês (mg/L).

**Tabela C20.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Tinta Caiada (mg/L).

**Tabela C21.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Moreto (mg/L).

**Tabela C22.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Trincadeira (mg/L).

**Tabela C23.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Castelão (mg/L).

**Tabela C24.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Roupeiro (mg/L).

**Tabela C25.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Rabo de Ovelha (mg/L).

**Tabela C26.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Arinto (mg/L).

**Tabela C27.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Perrum (mg/L).

**Tabela C28.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Antão Vaz (mg/L).

**Tabela C1.** Características dos mostos usados nas microvinificações referentes ao estudo das regiões (vindima de 1998).

| Amostra | Data | Grau brix corrigido | Álcool provável % (v/v) | Açúcares (g/L) | Acidez total (g/L) | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mosto da Casta Trincadeira** | | | | | | |
| Évora | 31-08-1998 | 23,0 | 13,38 | 227 | 5,75 | 3,68 |
| Borba | 07-09-1998 | 21,0 | 12,0 | 204 | 5,48 | 3,51 |
| Portalegre | 28-08-1998 | 22,8 | 13,2 | 224 | 5,89 | 3,69 |
| Redondo | 07-09-1998 | 22,5 | 13,0 | 221 | 5,70 | 3,62 |
| Reguengos | 07-09-1998 | 21,5 | 12,35 | 210 | 4,08 | 3,76 |
| **Mosto da Casta Roupeiro** | | | | | | |
| Évora | 27-08-1998 | 22,4 | 12,9 | 220 | 4,84 | 3,94 |
| Vidigueira | 31-08-1998 | 20,8 | 11,9 | 202 | 4,12 | 3,90 |
| Portalegre | 27-08-1998 | 22,8 | 13,2 | 224 | 5,13 | 3,79 |
| Redondo | 27-08-1998 | 21,2 | 12,2 | 206 | 4,75 | 3,84 |
| Reguengos | 03-09-1998 | 21,1 | 12,05 | 205 | 4,02 | 3,84 |

Notas: não foi feito vinho Trincadeira da Vidigueira, não foi feito vinho Roupeiro de Borba; desinfecção: 100 mg/L de $SO_2$ com solução sulfurosa de 15%.

**Tabela C2.** Características dos mostos usados nas microvinificações referentes ao estudo das castas de Évora (vindima de 1998).

| Amostra | Data | Grau brix corrigido | Álcool provável % (v/v) | Açúcares (g/L) | Acidez total (g/L) | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Castas tintas** | | | | | | |
| Trincadeira | 31/8/98 | 23,0 | 13,4 | 227 | 5,75 | 3,68 |
| Aragonez | 31/8/98 | 22,8 | 13,2 | 225 | 3,64 | 3,94 |
| Tinta Caiada | 31/8/98 | 22,0 | 12,7 | 216 | 5,32 | 3,64 |
| Periquita | 15/9/98 | 21,2 | 12,1 | 206 | 4,35 | 3,63 |
| Moreto | 29/9/98 | 20,0 | 11,38 | 193 | 3,52 | 3,88 |
| **Castas brancas** | | | | | | |
| Roupeiro | 27/8/98 | 22,4 | 12,9 | 220 | 4,84 | 3,94 |
| Rabo-de-Ovelha | 27/8/98 | 21,1 | 12,05 | 205 | 5,62 | 3,81 |
| Antão Vaz | 3/9/98 | 22,2 | 12,8 | 217 | 3,82 | 4,05 |
| Arinto | 15/9/98 | 21,7 | 12,45 | 212 | 6,72 | 3,41 |
| Perrum | 21/9/98 | 18,9 | 10,6 | 181 | 3,41 | 3,52 |

Notas: não foi feito vinho Trincadeira da Vidigueira, não foi feito vinho Roupeiro de Borba; desinfecção: 100 mg/L de $SO_2$ com solução sulfurosa de 15%.

**Tabela C3.** Características dos mostos usados nas microvinificações referentes ao estudo das regiões (Vindima de 1999).

| Amostra | Data | Grau brix corrigido | Álcool provável % (v/v) | Açúcares (g/L) | Acidez total (g/L) | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mosto da Casta Trincadeira** | | | | | | |
| Évora | 31-08-1999 | 23,6 | 13,7 | 234 | 5,08 | 3,59 |
| Borba | 16-09-1999 | 20,2 | 11,5 | 195 | 5,26 | 3,30 |
| Portalegre | 31-08-1999 | 22,8 | 13,2 | 224 | 5,44 | 3,34 |
| Redondo | 31-08-1999 | 20,5 | 11,65 | 199 | 5,11 | 3,45 |
| Reguengos | 01-09-1999 | 22,8 | 13,2 | 225 | 4,94 | 3,64 |
| Vidigueira | 06-09-1999 | 21,2 | 12,2 | 207 | 5,41 | 3,55 |
| **Mosto da Casta Roupeiro** | | | | | | |
| Évora | 31-08-1999 | 22,0 | 12,7 | 215 | 4,68 | 3,46 |
| Vidigueira | 02-09-1999 | 21,3 | 12,2 | 208 | 4,91 | 3,53 |
| Portalegre | 31-08-1999 | 22,8 | 13,2 | 224 | 5,51 | 3,28 |
| Redondo | 31-08-1999 | 20,5 | 11,65 | 199 | 4,79 | 3,36 |
| Reguengos | 26-08-1999 | 20,3 | 11,55 | 196 | 4,88 | 3,43 |
| Borba | 15-09-1999 | 20,7 | 11,8 | 201 | 7,18 | 3,27 |

Notas: Desinfecção 100 mg/L de $SO_2$ com solução sulfurosa de 15%; nos brancos aplicou-se 2% de levedura e 0,2 g/L de bentonite.

**Tabela C4.** Características dos mostos usados nas microvinificações referentes ao estudo das castas de Évora (Vindima de 1999).

| Amostra | Data | Grau brix corrigido | Álcool provável % (v/v) | Açúcares (g/L) | Acidez total (g/L) | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Castas tintas** | | | | | | |
| Trincadeira | 31/9/99 | 23,6 | 13,7 | 234 | 5,8 | 3,59 |
| Aragonez | 31-08-1999 | 22,1 | 12,75 | 216 | 3,50 | 4,08 |
| T. Caiada | 15-09-1999 | 22,4 | 12,9 | 220 | 4,58 | 3,59 |
| Castelão | 13-09-1999 | 22,5 | 13 | 221 | 5,58 | 3,45 |
| Moreto | 23-09-1999 | 17 | 9,4 | 160 | 3,50 | 3,68 |
| **Castas brancas** | | | | | | |
| Roupeiro | 31-08-1999 | 22,0 | 12,75 | 215 | 4,68 | 3,46 |
| Rabo-de-Ovelha | 14-09-1999 | 20,9 | 11,95 | 203 | 4,25 | 3,61 |
| Antão Vaz | 14-09-1999 | 21,7 | 12,45 | 212 | 3,97 | 3,69 |
| Arinto | 14-09-1999 | 23,0 | 13,4 | 227 | 6,0 | 3,23 |
| Perrum | 23-09-1999 | 17,1 | 9,45 | 161 | 2,93 | 3,48 |

Notas: Desinfecção 100 mg/L de $SO_2$ com solução sulfurosa de 15%; nos brancos aplicou-se 2% de levedura e 0,2 g/L de bentonite; o Perrum foi vindimado após chuva; o Moreto foi vindimado após chuva.

BIBLIOTECA F.E. PORTO

**Tabela C5.** Concentração de aminoácidos livres nas amostras de mostos das diversas microvinificações de 1998 (mg/L).

| Casta | Proveniência | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mostos 1998** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Roupeiro** | **Redondo** | 38,3 | 31,9 | 26,8 | 41,9 | 124,0 | 83,7 | 5,5 | 85,2 | 9,6 | 326,2 | 83,5 | 63,2 | 27,8 | 67,3 | 8,9 | 9,6 | 38,0 | 35,5 | 47,6 | | 12,8 | 891,6 |
| **Roupeiro** | **Reguengos** | 35,1 | 33,9 | 15,7 | 41,0 | 94,3 | 57,7 | 3,1 | 74,7 | 6,2 | 239,8 | 66,1 | 29,9 | 13,9 | 43,3 | 3,3 | 11,8 | 18,4 | 19,9 | 33,1 | | 10,3 | 884,3 |
| **Roupeiro** | **Portalegre** | 38,3 | 39,0 | 24,7 | 49,1 | 96,4 | 68,4 | 4,9 | 82,5 | 9,5 | 263,7 | 95,9 | 38,8 | 28,6 | 56,5 | 9,8 | 11,8 | 30,9 | 27,9 | 40,4 | | 9,8 | 1066,1 |
| **Roupeiro** | **Évora** | 46,4 | 42,6 | 53,0 | 60,6 | 124,8 | 146,4 | 11,5 | 93,7 | 15,1 | 332,4 | 119,5 | 59,9 | 36,0 | 96,6 | 24,5 | 13,8 | 55,5 | 56,7 | 80,3 | | 20,3 | 1183,8 |
| **Roupeiro** | **Borba** | 31,8 | 44,9 | 14,4 | 36,7 | 112,8 | 25,7 | 3,7 | 46,8 | 5,2 | 323,9 | 0,1 | 86,5 | 5,2 | 14,9 | 2,3 | 6,1 | 4,7 | 8,2 | 15,6 | | 6,4 | 514,3 |
| **Perrum** | **Évora** | 33,6 | 40,4 | 6,7 | 45,3 | 108,1 | 26,8 | 2,4 | 56,6 | 6,9 | 278,8 | 0,1 | 54,1 | 15,7 | 11,4 | 1,7 | 5,5 | 9,3 | 12,3 | 20,6 | | 7,2 | 34,0 |
| **Periquita** | **Évora** | 26,2 | 32,5 | 29,5 | 50,3 | 91,1 | 32,6 | | 66,8 | | 435,1 | 25,7 | 31,8 | 5,5 | 39,5 | 6,8 | 4,8 | 1,9 | 22,6 | 43,6 | | 5,9 | 736,5 |
| **Roupeiro** | **Vidigueira** | 38,0 | 39,2 | 20,3 | 5,0 | 96,3 | 91,0 | 5,8 | 8,0 | 9,3 | 297,8 | 0,1 | 98,9 | 23,5 | 62,5 | 6,3 | 8,0 | 34,7 | 35,8 | 47,4 | | 19,8 | 823,0 |
| **Rabo de Ovelha** | **Évora** | 90,4 | 64,9 | 52,8 | 56,0 | 123,8 | 157,8 | 20,9 | 99,5 | 18,4 | 368,9 | 0,1 | 118,1 | 65,2 | 122,4 | 20,8 | 11,6 | 85,5 | 75,8 | 103,4 | 5,7 | 25,3 | 992,8 |
| **Arinto** | **Évora** | 49,0 | 52,8 | 27,5 | 70,8 | 101,4 | 138,1 | 33,5 | 106,7 | 25,2 | 350,2 | 0,1 | 103,6 | 6,0 | 138,6 | 18,9 | 8,1 | 83,6 | 106,5 | 107,0 | 3,9 | 21,9 | 1241,3 |
| **Antão Vaz** | **Évora** | 49,6 | 51,4 | 31,6 | 54,9 | 98,6 | 139,0 | 8,6 | 82,4 | 19,8 | 33 | 0,1 | 10,0 | 6,0 | 94,3 | 6,7 | 17,8 | 46,9 | 50,4 | 73,4 | 13,5 | 21,4 | 1077,8 |
| **Tinta Caiada** | **Évora** | 31,9 | 45,9 | 10,7 | 69,4 | 10 | 57,5 | 9,3 | 86,7 | 10,8 | 427,3 | 70,7 | 110,3 | 38,5 | 53,6 | 10,8 | 20,7 | 12,3 | 29,0 | 40,8 | 3,6 | 14,7 | 1007,7 |
| **Aragonez** | **Évora** | 36,7 | 39,9 | 17,3 | 60,1 | 95,8 | 78,3 | 6,6 | 74,8 | 18,7 | 298,3 | 83,5 | 20,2 | 31,8 | 65,2 | 9,8 | 8,8 | 10,5 | 4,0 | 39,7 | 3,4 | 13,2 | 1060,2 |
| **Trincadeira** | **Évora** | 24,6 | 32,3 | 13,5 | 57,4 | 90,1 | 46,0 | 4,5 | 80,6 | | 252,1 | 103,8 | 76,5 | 21,8 | 38,0 | 8,5 | 21,5 | 0,8 | 13,0 | 35,9 | | 14,3 | 1295,9 |
| **Trincadeira** | **Borba** | 41,3 | 50,6 | 7,1 | 40,8 | 109,0 | 11,7 | 1,6 | 53,0 | 4,7 | 267,0 | 17,9 | 26,7 | 9,8 | 21,8 | 4,3 | 7,6 | 4,3 | 13,1 | 15,5 | | 3,3 | 638,0 |
| **Trincadeira** | **Redondo** | 30,6 | 31,3 | 11,6 | 43,1 | 91,6 | 33,6 | 3,1 | 62,1 | 5,8 | 231,7 | 57,0 | 20,6 | 17,7 | 22,8 | 0,7 | 7,9 | 6,0 | 12,2 | 14,8 | | 6,3 | 934,8 |
| **Trincadeira** | **Reguengos** | 26,8 | 28,9 | 13,1 | 44,3 | 69,1 | 38,2 | 3,7 | 65,3 | 6,1 | 238,3 | 63,3 | 27,1 | 23,2 | 34,7 | 2,2 | 8,8 | 6,5 | 18,2 | 21,7 | | 8,1 | 1014,1 |
| **Trincadeira** | **Portalegre** | 37,9 | 38,2 | 68,6 | 56,2 | 117,9 | 97,2 | 8,3 | 82,5 | 9,9 | 312,5 | 80,1 | 44,4 | 45,9 | 87,1 | 18,5 | 18,3 | 15,0 | 45,9 | 56,6 | 0,2 | 15,5 | 1141,0 |
| **Moreto** | **Évora** | 20,8 | 33,7 | 17,6 | 56,3 | 93,1 | 55,4 | 1,5 | 66,2 | | 347,1 | 141,6 | 68,5 | 4,7 | 43,9 | 8,5 | 13,7 | 0,8 | 23,1 | 55,8 | | 10,1 | 891,5 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C6.** Concentração de aminoácidos livres nas amostras de mostos das diversas microvinificações de 1999 (mg/L).

| Casta | Proveniência | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mostos 1999** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Roupeiro** | **Reguengos** | 23,6 | 28,4 | 12,8 | 37,1 | 109,9 | 41,2 | | 72,9 | | 192,1 | 130,2 | 29,0 | 1,3 | 20,4 | 9,5 | | 5,2 | 10,5 | 13,9 | | 8,4 | 612,1 |
| **Trincadeira** | **Vidigueira** | 28,0 | 29,9 | 44,1 | 61,9 | 122,0 | 72,3 | 2,3 | 102,9 | | 236,8 | 124,3 | 35,4 | 27,4 | 24,4 | 23,5 | | 0,4 | 12,2 | 21,0 | | 11,8 | 1043,9 |
| **Trincadeira** | **Redondo** | 28,0 | 29,9 | 12,9 | 48,3 | 92,2 | 22,5 | | 69,4 | | 189,2 | 86,0 | 22,2 | 8,2 | 18,1 | 1,3 | 1,1 | | 5,1 | 7,8 | | 5,8 | 732,4 |
| **Trincadeira** | **Évora** | 29,0 | 34,6 | 32,2 | 65,4 | 114,4 | 75,7 | 3,9 | 112,3 | | 232,5 | 120,2 | 59,7 | 33,7 | 43,7 | 11,5 | 11,2 | 1,2 | 17,0 | 28,0 | | 13,3 | 1175,6 |
| **Trincadeira** | **Portalegre** | 22,4 | 28,6 | 2,8 | 36,6 | 67,0 | 10,9 | | 38,0 | | 95,9 | 52,8 | 28,9 | 3,8 | 15,9 | 0,4 | 5,5 | | 6,2 | 8,7 | | 0,7 | 791,0 |
| **Roupeiro** | **Borba** | 28,6 | 31,0 | 7,4 | 38,1 | 81,9 | 22,2 | | 61,8 | | 260,3 | 63,2 | 41,7 | | 17,6 | | 3,6 | 4,5 | 4,7 | 9,3 | | 3,9 | 747,3 |
| **Antão Vaz** | **Évora** | 28,5 | 3 | 17,0 | 60,4 | 75,3 | 105,2 | 1,6 | 76,0 | 0,4 | 327,9 | 103,6 | 26,3 | 4,0 | 42,7 | 7,8 | 3,9 | 16,8 | 26,6 | 49,5 | 6,1 | 14,4 | 917,5 |
| **Perrum** | **Évora** | 16,8 | 23,5 | 5,3 | 44,7 | 90,9 | 38,7 | | 63,5 | | 264,3 | 87,1 | 36,3 | 8,1 | 33,1 | 2,0 | 3,7 | 13,1 | 24,1 | 46,8 | | 4,8 | 194,6 |
| **Rabo de Ovelha** | **Évora** | 31,9 | 37,6 | 48,9 | 68,2 | 113,9 | 12 | 7,9 | 88,7 | 2,9 | 346,0 | 196,4 | 49,6 | 32,4 | 103,6 | 17,4 | 9,3 | 46,3 | 62,1 | 106,0 | 0,5 | 14,9 | 1131,5 |
| **Roupeiro** | **Vidigueira** | 28,1 | 32,6 | 21,1 | 54,0 | 100,5 | 72,6 | 0,5 | 76,1 | | 284,9 | 100,4 | 24,4 | 8,8 | 38,3 | 6,3 | 4,4 | 7,4 | 15,4 | 43,4 | | 8,4 | 963,4 |
| **Roupeiro** | **Portalegre** | 27,6 | 35,0 | 14,4 | 50,7 | 89,7 | 53,4 | | 67,6 | | 231,7 | 98,6 | 41,7 | 8,7 | 41,8 | 5,6 | 4,5 | 11,2 | 18,1 | 41,5 | | 5,3 | 787,4 |
| **Arinto** | **Évora** | 38,0 | 35,0 | 18,7 | 85,1 | 126,0 | 106,9 | 14,6 | 121,1 | 7,9 | 932,3 | | 33,0 | 49,1 | 101,6 | 20,9 | | 36,4 | 61,2 | 92,2 | | 14,9 | 1349,3 |
| **Roupeiro** | **Redondo** | 33,5 | 39,2 | 10,8 | 51,0 | 151,5 | 49,8 | | 72,1 | | 373,4 | 52,2 | 21,5 | 4,2 | 31,1 | 2,2 | | 5,5 | 11,5 | 25,6 | | 7,4 | 811,1 |
| **Roupeiro** | **Évora** | 31,9 | 34,2 | 22,5 | 56,0 | 106,6 | 67,2 | 1,0 | 89,4 | | 463,6 | 78,2 | 23,0 | 6,6 | 43,4 | 2,8 | | 1 | 17,5 | 22,9 | | 10,2 | 887,8 |
| **Trincadeira** | **Reguengos** | 29,5 | 31,3 | 13,2 | 62,8 | 110,9 | 39,3 | 1,5 | 83,0 | | 370,5 | 45,5 | 53,1 | 19,4 | 37,4 | 2,8 | 17,9 | 0,5 | 14,7 | 17,7 | | 7,6 | 1107,7 |
| **Aragonez** | **Évora** | 32,4 | 35,9 | 1 | 64,8 | 121,2 | 51,2 | 0,8 | 83,5 | 2,6 | 408,8 | 84,4 | 37,0 | 16,2 | 60,1 | 7,8 | 4,1 | 4,5 | 34,6 | 34,6 | | 7,1 | 929,1 |
| **Trincadeira** | **Borba** | 26,3 | 28,2 | 3,2 | 32,9 | 72,4 | 12,1 | | 37,4 | | 214,1 | 21,4 | 33,5 | | 12,8 | 0,1 | 3,9 | | 4,8 | 5,0 | | 1,9 | 612,2 |
| **Moreto** | **Évora** | 19,6 | 29,1 | 49,0 | 51,2 | 105,0 | 23,3 | 0,3 | 67,4 | 8,5 | 387,7 | 81,2 | 38,0 | 6,7 | 83,3 | 19,1 | 3,9 | 8,0 | 71,3 | 81,6 | | 8,5 | 753,3 |
| **Periquita** | **Évora** | 27,5 | 33,1 | 53,8 | 54,7 | 85,1 | 89,9 | 1,7 | 75,3 | | 393,7 | 96,6 | 34,2 | 22,3 | 87,4 | 16,2 | 5,4 | 11,3 | 63,0 | 70,1 | | 14,4 | 957,9 |
| **Tinta Caiada** | **Évora** | 18,9 | 26,7 | 11,7 | 58,7 | 104,0 | 25,0 | 0,5 | 70,1 | | 310,6 | 59,7 | 76,3 | 10,7 | 54,8 | 8,4 | 14,3 | 5,7 | 39,5 | 58,4 | | 7,5 | 961,5 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C7.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Aragonez (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Aragonez – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| arag 1-9-98 | 38,6 | 36,5 | 28,4 | 60,2 | 87,2 | 118,4 | 13,5 | 79,8 | 28,4 | 278,4 | 1,0 | 93,3 | 56,3 | 99,0 | 23,7 | 17,1 | 13,3 | 58,6 | 90,2 | 9,3 | 24,3 | 1378,5 |
| arag 2-9-98 | 69,0 | 48,0 | 2,0 | 55,1 | 81,9 | 113,5 | 15,2 | 60,9 | 25,1 | 276,5 | 1,0 | 99,7 | 48,6 | 73,7 | 4,4 | 23,7 | 5,7 | 28,2 | 15,9 | 11,6 | 5,1 | 1253,9 |
| arag 3-9-98 | 11,5 | 32,0 | 9,7 | 0,4 | 28,9 | 28,5 | 11,0 | 4,4 | 11,8 | 93,6 | 55,1 | 12,7 | 1,1 | 2,8 | | 4,0 | | 0,7 | 0,6 | 6,1 | 12,7 | 903,9 |
| arag 4-9-98 | 3,9 | 20,2 | 17,7 | 2,3 | 21,2 | 8,5 | 9,2 | 3,2 | 2,3 | 11,8 | 45,9 | 16,8 | | 2,1 | | 6,9 | | | 0,2 | 5,4 | 4,1 | 637,6 |
| arag 5-9-98 | 13,4 | 28,0 | 23,9 | 7,3 | 24,6 | 21,6 | 13,6 | 5,8 | 5,3 | 47,5 | 65,7 | 26,5 | 2,7 | 4,2 | | 5,2 | 1,9 | 1,3 | 4,6 | 7,8 | 8,0 | 481,5 |
| arag 6-9-98 | 1,6 | 25,1 | 17,7 | 10,6 | 21,4 | 25,1 | 13,9 | 6,7 | 2,3 | 158,0 | 1,5 | 36,0 | 3,9 | | | 8,9 | | 1,4 | 5,3 | 7,6 | 8,3 | 765,6 |
| arag 8-9-98 | 6,7 | 25,4 | 16,2 | 1,8 | 26,5 | 16,2 | 16,3 | 7,2 | 1,3 | 63,0 | 66,6 | 38,5 | 4,8 | 2,2 | 1,1 | 9,5 | | 2,7 | 6,3 | 8,9 | 9,2 | 786,2 |
| arag 15-9-98 | 20,6 | 3,0 | 14,6 | 13,5 | 26,2 | 33,7 | 20,6 | 1,0 | 6,3 | 190,6 | 0,9 | 52,1 | 5,6 | 8,4 | 1,5 | 7,0 | 3,8 | 4,1 | 17,3 | 11,4 | 15,1 | 883,0 |
| arag 6-10-98 | 13,4 | 36,6 | 42,9 | 7,0 | 19,5 | 21,3 | 24,3 | 15,9 | 9,1 | 106,6 | 1,5 | 60,8 | 9,9 | 13,1 | 2,2 | 14,0 | 2,2 | 7,4 | 19,1 | 24,9 | 28,3 | 856,0 |
| arag 13-10-98 | 14,3 | 36,1 | 44,2 | 8,4 | 20,2 | 22,6 | 25,3 | 17,3 | 9,6 | 99,9 | 1,5 | 63,8 | 14,3 | 13,3 | 2,3 | 14,2 | 2,3 | 7,6 | 19,6 | 17,7 | 27,4 | 861,9 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C8.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Tinta Caiada (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tinta Caiada – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| tc 1-9-98 | 38,3 | 46,0 | 14,2 | 60,3 | 80,6 | 75,6 | 14,7 | 78,3 | 1,0 | 280,5 | 1,0 | 103,2 | 53,5 | 59,5 | 15,9 | 23,1 | 13,0 | 35,7 | 75,9 | 8,2 | 24,4 | 1162,1 |
| tc 2-9-98 | 21,6 | 35,0 | 10,2 | 50,1 | 69,3 | 67,2 | 19,3 | 65,8 | 1,0 | 258,8 | 1,0 | 103,5 | 49,3 | 53,8 | 3,4 | 26,0 | 7,1 | 23,4 | 25,2 | 11,1 | 3,3 | 1217,7 |
| tc 3-9-98 | 4,1 | 10,6 | 6,0 | 2,5 | 4,8 | 3,0 | 5,0 | 10,6 | 4,6 | | 12,8 | 2,1 | | 1,2 | | 3,4 | | 0,3 | 0,5 | | 11,4 | 1152,8 |
| tc 4-9-98 | 4,6 | 12,7 | 6,7 | 3,0 | 6,4 | 3,5 | 7,4 | 12,6 | 4,9 | | 18,2 | 3,0 | 0,2 | 1,7 | | 3,5 | | 0,4 | 0,7 | | 11,0 | 1244,7 |
| tc 15-9-98 | 1,7 | 8,6 | 12,4 | 4,3 | 6,3 | 2,0 | 8,3 | 4,5 | 0,9 | | 32,9 | 22,3 | 1,5 | 3,9 | | 6,6 | | 2,0 | 9,7 | 1,1 | 12,4 | 670,3 |
| tc 22-9-98 | 3,6 | 16,2 | 4,7 | 6,2 | 7,1 | 7,2 | 14,4 | 7,8 | 4,1 | 15,4 | 53,9 | 34,9 | | 8,0 | 1,8 | 6,0 | 4,6 | 4,8 | 15,8 | 2,8 | 21,2 | 966,3 |
| tc 29-9-98 | 9,3 | 18,2 | 22,8 | 11,1 | 4,9 | 11,0 | 16,7 | 9,4 | 4,7 | 105,8 | 0,9 | 36,4 | 7,2 | 0,7 | | 5,6 | 5,3 | 5,7 | 23,7 | 6,0 | 26,1 | 1185,3 |
| tc 6-10-98 | 6,7 | 15,8 | 19,1 | 9,4 | 6,8 | 3,9 | 14,6 | 8,1 | 2,0 | 53,8 | 1,5 | 31,1 | 4,5 | 7,9 | 1,1 | 8,1 | 0,7 | 4,9 | 21,5 | 9,3 | 26,2 | 776,4 |
| tc 13-10-98 | 6,9 | 16,2 | 18,9 | 9,2 | 6,2 | 3,5 | 14,7 | 8,1 | 1,8 | 52,5 | 1,5 | 29,5 | 2,2 | 7,8 | 1,3 | 7,8 | 0,6 | 4,3 | 22,8 | 8,3 | 27,1 | 759,0 |
| tc 20-10-98 | 7,7 | 15,4 | 25,5 | 14,3 | 2,5 | 9,1 | 19,0 | 15,5 | | 76,3 | 5,3 | 22,4 | | 7,7 | 0,5 | 3,5 | | 3,1 | 13,1 | 4,5 | 29,3 | 1345,3 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C9.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Moreto (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Moreto – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| mor 29-9-98 | 39,9 | 45,7 | 8,3 | 34,7 | 74,9 | 48,7 | 7,2 | 40,9 | 8,1 | 254,3 | 0,9 | 84,9 | 13,7 | 37,7 | 4,1 | 15,3 | 6,4 | 18,0 | 31,8 | 3,7 | 3,5 | 702,4 |
| mor 1-10-98 | 43,2 | 33,3 | 10,7 | 44,5 | 69,0 | 56,5 | 6,6 | 48,0 | 8,1 | 251,4 | 0,9 | 83,2 | 14,7 | 39,8 | 6,6 | 15,2 | 7,3 | 21,0 | 42,9 | 3,8 | 5,6 | 1026,2 |
| mor 2-10-98 | | 3,5 | 0,5 | 1,1 | 3,7 | 1,9 | 2,1 | 5,1 | 4,9 | | 6,9 | 2,0 | | 0,9 | | 3,6 | 0,9 | | 0,2 | 0,8 | 4,7 | 997,0 |
| mor 3-10-98 | | 2,3 | | 0,1 | 2,3 | 0,1 | 0,8 | 3,1 | 4,3 | | 4,3 | 1,8 | | 0,8 | | 3,6 | 0,8 | | 0,1 | 0,6 | 1,7 | 864,4 |
| mor 4-10-98 | | 11,1 | 0,9 | 1,1 | 5,0 | 1,7 | 4,2 | 7,3 | 5,8 | | 10,4 | 2,2 | | 0,9 | | 3,8 | 0,9 | | 0,2 | 0,7 | 2,6 | 905,7 |
| mor 5-10-98 | | 7,7 | 1,0 | 0,5 | 5,4 | 2,6 | 3,2 | 5,7 | 5,3 | | 12,5 | 2,8 | | 0,9 | | 3,7 | 1,0 | | 0,2 | 0,8 | 3,7 | 833,5 |
| mor 6-10-98 | 2,9 | 21,0 | 0,4 | 0,6 | 8,2 | 7,6 | 8,3 | 10,4 | 7,1 | | 37,1 | 4,2 | 1,6 | 2,3 | | 3,9 | 1,7 | | 1,2 | 1,2 | 9,3 | 844,6 |
| mor 7-10-98 | 0,9 | 1,0 | 0,2 | 1,0 | 4,6 | 6,3 | 4,0 | 4,2 | 5,1 | | 21,1 | 5,3 | 0,9 | 2,2 | | 3,4 | 1,6 | 0,1 | 2,2 | 0,9 | 6,0 | 810,4 |
| mor 8-10-98 | 0,1 | 7,0 | | 0,9 | 3,0 | 5,0 | 3,1 | 2,8 | 4,4 | | 16,2 | 5,0 | 1,0 | 2,5 | | 3,4 | 1,6 | | 1,8 | 1,0 | 5,2 | 823,2 |
| mor 15-10-98 | | 1,6 | 0,4 | | 1,5 | 1,0 | 0,9 | 1,1 | 3,5 | | 5,9 | 3,1 | 0,3 | 1,4 | | 3,6 | 1,4 | | 1,6 | 0,6 | 3,7 | 797,9 |
| mo 22-10-98 | 1,8 | 4,6 | 2,8 | 0,2 | | 3,2 | 4,1 | | | | | 2,6 | | 1,0 | | | | | 1,0 | | 10,2 | 1058,1 |
| mo 29-10-98 | 2,7 | 5,5 | 3,4 | 1,6 | | 6,3 | 5,6 | 1,7 | | | | 4,4 | | 2,3 | | | | | 2,7 | | 10,6 | 1036,4 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C10.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Trincadeira (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Trincadeira – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| trinc 1-9-98 | 36,8 | 36,9 | 19,3 | 0,2 | 77,5 | 31,6 | 6,3 | 64,8 | 2,4 | 112,3 | 79,2 | 68,4 | 32,9 | 10,4 | 5,9 | 27,2 | 2,5 | 14,5 | 21,8 | 1,5 | 11,3 | 813,5 |
| trinc 2-9-98 | 35,5 | 34,3 | 7,4 | 45,4 | 82,0 | 39,8 | 1,0 | 59,6 | 3,9 | 254,1 | 2,4 | 88,2 | 34,1 | 30,8 | 4,4 | 10,4 | 3,9 | 12,2 | 24,1 | 0,8 | 1,1 | 1462,1 |
| trinc 3-9-98 | 2,4 | 15,1 | 3,7 | 0,7 | 8,5 | 4,6 | 6,8 | 1,0 | 2,7 | 4,9 | 19,5 | 2,3 | | 1,2 | | 3,4 | | | | | 13,1 | 1025,4 |
| trinc 4-9-98 | 0,4 | 13,6 | 2,7 | | 7,8 | 1,3 | 5,6 | 8,3 | 2,0 | | 23,2 | 1,2 | | 1,3 | | 3,4 | | | | | 7,9 | 975,8 |
| trinc 8-9-98 | 2,3 | 13,7 | 12,7 | 4,8 | 6,9 | 3,4 | 8,5 | 4,1 | 0,3 | | 26,3 | 2,6 | 1,6 | 2,0 | | 3,7 | | 1,0 | 7,0 | 0,3 | 12,7 | 770,8 |
| trinc 15-9-98 | 4,0 | 16,9 | 7,6 | 2,2 | 9,4 | 5,1 | 12,3 | 5,5 | 1,3 | | 39,2 | 12,2 | 4,7 | 4,7 | | 3,4 | 0,3 | 1,5 | 11,3 | 0,2 | 20,1 | 981,4 |
| trinc 22-9-98 | 9,4 | 26,0 | 10,8 | 4,6 | 10,2 | 6,7 | 18,5 | 7,3 | 0,5 | 5,8 | 60,6 | 23,0 | 7,6 | 7,7 | 1,7 | 3,4 | 2,4 | 4,0 | 24,4 | 0,5 | 31,9 | 914,6 |
| trinc 29-9-98 | 8,1 | 24,6 | 10,1 | 5,2 | 8,3 | 1,8 | 22,2 | 0,6 | 1,9 | | 68,4 | 22,8 | 5,3 | 6,8 | 1,0 | 3,4 | 2,1 | 3,9 | 25,9 | | 27,2 | 887,2 |
| trinc 6-10-98 | 12,5 | 24,2 | 24,3 | 11,3 | 7,5 | | 18,8 | 8,9 | 1,9 | 52,3 | 10,9 | 10,5 | | 8,9 | 2,0 | 8,1 | 1,0 | 4,9 | 25,7 | 8,4 | 39,1 | 839,1 |
| trinc13-10-98 | 12,5 | 28,8 | 23,0 | 8,8 | 9,9 | 8,1 | 19,7 | 9,6 | 4,7 | 54,7 | 1,5 | 10,4 | | 8,4 | 2,2 | 7,3 | 1,3 | 5,4 | 27,8 | 7,3 | 41,8 | 975,9 |
| trinc20-10-98 | 12,7 | 22,5 | 28,1 | 19,1 | 5,1 | 18,9 | 25,6 | 10,5 | | 100,5 | 6,4 | 10,1 | | 8,0 | 1,3 | 1,9 | 0,5 | 3,2 | 16,6 | 2,7 | 44,9 | 1410,9 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C11.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Castelão (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Castelão – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| peri 16-9-98 | 48,6 | 42,6 | 29,5 | 31,3 | 72,0 | 20,4 | 3,1 | 55,7 | 2,9 | 122,6 | 81,4 | 69,1 | | 29,7 | 6,4 | 15,9 | 4,2 | 21,8 | 35,7 | 0,7 | 6,5 | 483,7 |
| peri 18-9-98 | 0,6 | 5,3 | 4,0 | 1,6 | 12,1 | 2,6 | 1,9 | 4,1 | 1,8 | 27,0 | 10,9 | 2,7 | | 1,2 | | 3,4 | | | | | 4,7 | 616,4 |
| peri 19-9-98 | 1,9 | 2 | 4,4 | | 5,8 | 0,9 | 3,8 | 10,4 | 2,8 | | 15,4 | | | 1,3 | | 3,4 | | | 0,1 | | 8,3 | 675,3 |
| peri 22-9-98 | | 11,7 | 7,8 | | 5,6 | 2,5 | 5,3 | 7,3 | 0,9 | | 23,9 | 3,2 | 0,6 | 2,3 | | 3,4 | | | 3,1 | | 6,1 | 512,5 |
| peri 23-9-98 | | 5,5 | 5,1 | | 4,0 | 1,5 | 3,9 | 1,7 | | | 17,6 | 4,2 | 1,0 | 2,1 | | 3,4 | | | 2,9 | | 4,1 | 508,5 |
| peri 30-9-98 | | 6,1 | 7,1 | | 3,5 | 1,4 | 5,1 | 2,1 | | | 21,5 | 6,3 | 1,3 | 2,5 | | 4,1 | | 0,2 | 5,3 | | 7,2 | 494,0 |
| peri 7-10-98 | 4,1 | 14,4 | 14,9 | 0,7 | 5,1 | 3,7 | 10,3 | 4,9 | 1,5 | | 45,3 | 13,8 | 3,4 | 5,2 | 0,3 | 5,5 | | 2,2 | 1 | 0,1 | 15,1 | 653,3 |
| peri 14-10-98 | 4,7 | 14,7 | 15,0 | 0,8 | 5,7 | 3,8 | 10,8 | 5,3 | 1,8 | | 46,1 | 14,8 | 3,8 | 5,3 | 0,3 | 5,1 | | 2,7 | 10,7 | 0,1 | 16,9 | 649,6 |
| peri 21-10-98 | 5,6 | 13,2 | 17,6 | 6,0 | 1,2 | 9,7 | 12,5 | 4,8 | | 57,0 | 2,5 | 8,9 | | 6,1 | | | | 0,4 | 7,5 | | 22,2 | 1104,2 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C12.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Roupeiro (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Roupeiro – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| rou 31-8-98 | 35,2 | 38,6 | 18,2 | 6,2 | 82,7 | 41,4 | 9,0 | 49,5 | 4,7 | 123,3 | 88,3 | 65,4 | 19,1 | 10,4 | 1,5 | 28,5 | 13,2 | 14,3 | 5,0 | 2,0 | 1,5 | 662,0 |
| rou 2-9-98 | 26,4 | 35,8 | 7,7 | | 66,5 | 29,0 | 9,6 | 11,4 | 2,7 | 102,5 | 78,4 | 60,1 | 14,2 | 4,1 | 0,7 | 18,4 | 0,6 | 1,4 | | 4,1 | 2,5 | 660,5 |
| rou 4-9-98 | 32,8 | 38,7 | 44,6 | 8,6 | 76,1 | 25,4 | 15,6 | 10,5 | 4,6 | 112,1 | 88,3 | 65,3 | 14,5 | 3,2 | 0,8 | 18,4 | | 1,0 | 0,1 | 5,2 | 7,6 | 706,2 |
| rou 6-9-98 | 35,5 | 29,8 | 64,4 | 13,5 | 104,4 | 49,8 | 20,2 | 12,1 | 4,6 | 333,4 | 108,4 | 68,3 | 12,6 | 14,7 | 1,7 | 17,3 | 1,8 | 1,1 | 2,2 | 6,5 | 9,3 | 1075,7 |
| rou 8-9-98 | 26,0 | 31,3 | 63,8 | 14,7 | 91,0 | 53,6 | 20,4 | 12,0 | 3,7 | 330,8 | 104,8 | 69,3 | 13,3 | 15,6 | 1,6 | 12,9 | 2,5 | 1,8 | 5,2 | 7,4 | 9,7 | 1167,4 |
| rou 10-9-98 | 32,8 | 31,8 | 66,5 | 15,7 | 109,6 | 53,5 | 21,4 | 5,2 | 5,3 | 265,1 | 92,0 | 63,0 | 13,4 | 16,2 | 2,3 | 17,2 | 2,6 | 1,9 | 5,9 | 7,6 | 9,7 | 1063,5 |
| rou 16-9-98 | 29,1 | 33,1 | 65,0 | 16,5 | 107,9 | 47,5 | 22,2 | 19,0 | 3,2 | 208,2 | 112,3 | 61,6 | 15,6 | 18,4 | 2,3 | 16,5 | 3,2 | 2,5 | 10,8 | 8,4 | 10,5 | 1040,3 |
| rou 18-9-98 | 33,7 | 36,4 | 62,4 | 14,7 | 83,9 | 24,2 | 21,7 | 13,3 | 5,4 | 104,9 | 97,3 | 68,6 | 15,9 | 3,6 | 1,1 | 17,7 | 1,9 | 3,0 | 6,4 | 8,3 | 10,6 | 705,2 |
| rou 22-9-98 | 31,2 | 32,5 | 63,9 | 17,1 | 105,7 | 48,8 | 22,1 | 20,3 | 4,5 | 313,5 | 129,0 | 64,5 | 14,4 | 15,1 | 5,7 | 13,5 | 3,6 | 3,2 | 15,5 | 8,0 | 12,9 | 1076,3 |
| rou 24-9-98 | 25,6 | 30,2 | 57,7 | 13,8 | 79,9 | 52,3 | 20,1 | 12,4 | 2,5 | 136,1 | 104,3 | 54,1 | 12,7 | 17,0 | 3,3 | 10,9 | 3,6 | 3,4 | 17,2 | 6,2 | 11,6 | 645,4 |
| rou 26-9-98 | 29,4 | 37,4 | 60,8 | 18,3 | 82,6 | 58,7 | 25,2 | 19,6 | 5,0 | 318,9 | 102,5 | 70,1 | 18,8 | 21,3 | 4,7 | 14,2 | 6,0 | 5,9 | 26,5 | 9,4 | 18,2 | 1181,2 |
| rou 28-9-98 | 25,4 | 29,5 | 64,3 | 19,2 | 85,9 | 53,8 | 25,1 | 16,1 | 4,2 | 307,3 | 13 | 68,8 | 18,1 | 20,5 | 4,9 | 12,6 | 5,9 | 6,2 | 25,2 | 9,9 | 20,4 | 1108,2 |
| rou 2-10-98 | 34,1 | 33,7 | 69,7 | 10,4 | 86,9 | 23,1 | 23,7 | 18,6 | | 278,3 | | 70,8 | 20,5 | 5,2 | 2,3 | 21,8 | 4,6 | 7,0 | 17,0 | 10,5 | 22,4 | 938,1 |
| rou 4-10-98 | 24,9 | 27,7 | 62,8 | 21,2 | 79,2 | 53,7 | 29,8 | 18,9 | 3,7 | 335,3 | 120,3 | 68,8 | 20,5 | 23,0 | 6,1 | 12,1 | 7,5 | 8,6 | 37,6 | 11,0 | 27,1 | 1156,5 |
| rou 6-10-98 | 28,7 | 32,9 | 69,9 | 21,4 | 84,1 | 56,3 | 26,8 | 21,7 | 3,9 | 333,0 | 114,0 | 71,9 | 21,4 | 24,1 | 6,7 | 15,1 | 8,1 | 9,5 | 43,6 | 10,7 | 27,6 | 1195,8 |
| rou 14-10-98 | 28,6 | 32,5 | 67,7 | 20,9 | 80,1 | 53,0 | 26,9 | 22,2 | 3,3 | 335,6 | 118,5 | 73,6 | 22,3 | 24,8 | 7,0 | 14,0 | 8,5 | 10,1 | 45,5 | 11,2 | 29,6 | 1176,6 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C13.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Rabo de Ovelha (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Rabo de Ovelha – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ro 29-8-98 | 64,9 | 53,2 | 46,0 | 46,6 | 87,7 | 116,7 | 17,4 | 63,0 | 13,1 | 230,2 | 28,9 | 79,8 | 57,0 | 95,2 | 23,1 | 15,3 | 50,7 | 61,0 | 69,8 | 5,7 | 19,8 | 1005,5 |
| ro 31-8-98 | 51,2 | 75,3 | 29,9 | 37,8 | 72,9 | 82,8 | 18,3 | 54,3 | 12,9 | 197,7 | 112,3 | 1,9 | 51,9 | 80,8 | 10,6 | 10,7 | 41,9 | 41,2 | 36,1 | 5,9 | 4,7 | 843,2 |
| ro 2-9-98 | 36,5 | 44,5 | 39,8 | 51,5 | 110,6 | 141,7 | 25,0 | 75,0 | 13,7 | 378,0 | 72,7 | 43,8 | 53,9 | 71,4 | 2,8 | 13,2 | 30,4 | 25,0 | 19,4 | 5,8 | 3,6 | 1105,0 |
| ro 4-9-98 | 75,5 | 64,5 | 51,3 | 38,2 | 80,3 | 85,2 | 24,3 | 64,3 | 13,6 | 243,7 | 105,5 | 18,1 | 41,4 | 51,0 | 4,5 | 16,6 | 24,3 | 18,4 | 10,9 | 8,9 | 8,4 | 986,2 |
| ro 6-9-98 | 32,9 | 36,5 | 72,8 | 48,5 | 113,0 | 104,2 | 29,5 | 68,8 | 10,3 | 448,2 | 146,9 | 74,5 | 45,2 | 59,5 | 3,3 | 14,7 | 24,1 | 19,1 | 16,8 | 10,5 | 8,3 | 1291,9 |
| ro 8-9-98 | 31,2 | 35,0 | 71,0 | 46,4 | 106,1 | 113,1 | 32,9 | 71,4 | 12,2 | 170,8 | 13 | 76,3 | 49,6 | 65,0 | 3,5 | 14,6 | 27,0 | 21,4 | 14,3 | 11,1 | 7,5 | 1190,8 |
| ro 10-9-98 | 30,1 | 35,1 | 69,3 | 46,2 | 104,4 | 93,4 | 3,0 | 69,0 | 10,5 | 390,9 | 145,5 | 69,1 | 45,5 | 59,4 | 3,3 | 14,6 | 24,6 | 19,5 | 15,5 | 11,1 | 7,3 | 1207,3 |
| ro 12-9-98 | 29,0 | 33,7 | 66,9 | 44,7 | 104,5 | 102,5 | 30,7 | 65,4 | 1,0 | 162,8 | 113,7 | 72,3 | 43,6 | 56,8 | 3,2 | 13,1 | 23,5 | 18,5 | 16,4 | 10,4 | 7,4 | 1125,0 |
| ro 14-9-98 | 29,0 | 33,8 | 69,2 | 49,2 | 82,7 | 108,9 | 31,0 | 71,9 | 10,2 | 160,9 | 150,5 | 75,7 | 45,0 | 56,6 | 2,6 | 13,1 | 24,1 | 19,0 | 14,9 | 10,3 | 7,5 | 1223,0 |
| ro 18-9-98 | 31,4 | 36,3 | 75,6 | 51,6 | 88,2 | 119,4 | 35,4 | 79,8 | 12,6 | 186,2 | 160,6 | 85,3 | 53,0 | 66,5 | 3,6 | 13,5 | 28,7 | 22,8 | 20,5 | 11,9 | 8,8 | 1338,4 |
| ro 20-9-98 | 29,6 | 32,3 | 64,2 | 48,6 | 97,4 | 93,7 | 28,9 | 63,7 | 9,0 | 356,7 | 159,2 | 69,4 | 43,5 | 55,9 | 2,7 | 14,4 | 23,5 | 18,8 | 2 | 10,9 | 8,2 | 1156,6 |
| ro 22-9-98 | 29,0 | 32,3 | 62,9 | 42,2 | 101,5 | 90,9 | 27,0 | 61,7 | 9,3 | 207,2 | 250,5 | 66,7 | 43,7 | 56,3 | 4,0 | 13,2 | 23,6 | 18,9 | 21,9 | 11,2 | 8,9 | 1110,8 |
| ro 24-9-98 | 77,5 | 74,5 | 41,1 | 41,9 | 86,9 | 92,3 | 29,1 | 63,6 | 10,2 | 230,9 | 129,8 | 1,9 | 46,3 | 56,2 | 6,0 | 11,6 | 26,4 | 20,9 | 19,5 | 10,1 | 9,2 | 1021,5 |
| ro 28-9-98 | 32,0 | 37,4 | 78,4 | 60,4 | 92,0 | 123,9 | 38,0 | 83,1 | 7,5 | 172,0 | 165,2 | 89,8 | 53,7 | 61,0 | 5,1 | 13,0 | 29,6 | 24,0 | 27,1 | 12,2 | 11,7 | 1431,6 |
| ro 30-9-98 | 57,3 | 85,5 | 32,5 | 4,0 | 79,9 | 64,5 | 27,2 | 60,5 | 9,6 | 235,0 | 148,3 | 1,9 | 48,6 | 54,7 | 6,1 | 15,4 | 25,7 | 20,2 | 17,5 | 10,6 | 10,7 | 924,4 |
| ro 2-10-98 | 36,5 | 52,8 | 78,2 | 61,0 | 90,2 | 129,0 | 36,1 | 52,9 | 8,8 | 371,4 | 70,6 | 47,1 | 53,1 | 68,1 | 5,5 | 14,7 | 28,4 | 23,2 | 27,9 | 10,2 | 10,5 | 1319,0 |
| ro 4-10-98 | 32,0 | 34,1 | 72,6 | 47,4 | 96,7 | 106,2 | 29,5 | 67,9 | 11,4 | 346,3 | 193,7 | 77,3 | 53,4 | 68,0 | 4,2 | 14,1 | 29,1 | 24,2 | 33,8 | 13,6 | 14,8 | 1194,6 |
| ro 6-10-98 | 64,3 | 91,3 | 32,9 | 41,2 | 91,7 | 59,8 | 27,2 | 55,8 | 11,7 | 242,5 | 143,0 | 1,9 | 46,7 | 50,9 | 6,2 | 15,4 | 24,4 | 19,8 | 17,3 | 1 | 12,1 | 829,7 |
| ro 14-10-98 | 34,3 | 4 | 77,0 | 54,0 | 83,7 | 113,3 | 35,1 | 68,6 | 13,9 | 622,9 | | 85,8 | 57,9 | 71,6 | 6,2 | 16,7 | 30,2 | 25,6 | 33,5 | 11,9 | 13,8 | 1276,8 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C14.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Arinto (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Arinto – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| a 17-9-98 | 26,2 | 29,3 | 25,7 | 68,6 | 84,6 | 113,0 | 33,9 | 88,9 | 18,0 | 241,0 | 217,8 | 50,1 | 61,3 | 138,5 | 34,2 | 16,9 | 53,9 | 89,3 | 66,2 | 1,0 | 18,5 | 1324,0 |
| a 19-9-98 | 39,7 | 56,8 | 16,3 | 56,3 | 79,5 | 98,6 | 36,7 | 81,3 | 19,3 | 591,8 | | 69,2 | 48,6 | 97,2 | 12,1 | 9,9 | 35,9 | 54,7 | 29,8 | 5,3 | 4,4 | 1217,0 |
| arin 21-9-98 | 29,7 | 45,4 | 25,2 | 23,9 | 61,5 | 51,5 | 31,8 | 23,8 | 19,3 | 234,9 | 105,5 | 9,5 | 19,3 | 14,2 | 3,0 | 9,7 | 4,5 | 4,9 | 3,4 | 8,8 | 10,3 | 1203,5 |
| arin 26-9-98 | 27,5 | 39,9 | 38,9 | 23,9 | 60,3 | 47,9 | 32,4 | 18,2 | 19,0 | 226,1 | 101,8 | 1,9 | 18,4 | 12,3 | 3,0 | 11,4 | 4,4 | 4,6 | 4,7 | 14,8 | 9,3 | 1207,5 |
| a 28-9-98 | 23,4 | 49,5 | 45,9 | 26,1 | 71,2 | 62,5 | 40,4 | 2 | 17,2 | 561,1 | | 54,9 | 17,8 | 11,3 | 0,7 | 11,4 | 0,5 | 1,2 | 2,9 | 15,8 | 9,7 | 1049,9 |
| a 4-10-98 | 25,4 | 50,1 | 46,9 | 27,5 | 72,5 | 61,3 | 41,2 | 2 | 17,0 | 596,7 | | 59,0 | 19,1 | 13,2 | 1,0 | 11,5 | 1,2 | 1,9 | 7,2 | 16,8 | 11,6 | 1085,3 |
| a 6-10-98 | 25,4 | 46,3 | 48,8 | 30,1 | 67,3 | 67,3 | 40,7 | 22,9 | 17,5 | 531,8 | | 61,2 | 20,1 | 15,8 | 0,6 | 11,7 | 2,5 | 2,8 | 6,0 | 16,8 | 12,5 | 1137,6 |
| arin 8-10-98 | 23,3 | 46,2 | 38,0 | 22,1 | 54,9 | 38,2 | 35,2 | 14,5 | 14,0 | 221,2 | 42,8 | 27,9 | 18,8 | 12,9 | 4,0 | 1 | 5,2 | 5,0 | 7,6 | 10,9 | 8,2 | 1235,7 |
| a 10-10-98 | 26,2 | 49,2 | 49,9 | 29,2 | 84,4 | 62,5 | 42,9 | 22,1 | 19,6 | 352,5 | 144,4 | 65,1 | 17,3 | 14,4 | 0,6 | 11,4 | 2,1 | 2,5 | 6,3 | 18,0 | 13,6 | 1172,2 |
| a 12-10-98 | 22,1 | 40,6 | 44,6 | 25,9 | 62,3 | 60,1 | 37,4 | 24,8 | 16,2 | 568,4 | | 55,1 | 18,4 | 13,3 | 1,4 | 9,9 | 1,7 | 2,4 | 6,0 | 16,3 | 14,2 | 1085,5 |
| a 14-10-98 | 27,1 | 46,7 | 47,7 | 28,2 | 58,3 | 63,9 | 39,6 | 29,2 | 18,7 | 540,5 | | 66,5 | 20,7 | 13,4 | 2,9 | 1 | 2,5 | 2,9 | 7,7 | 17,7 | 16,8 | 1183,1 |
| arin 16-10-98 | 26,2 | 40,8 | 42,7 | 25,3 | 50,8 | 48,1 | 36,4 | 16,8 | 15,7 | 227,7 | 91,0 | 18,4 | 22,0 | 15,0 | 4,7 | 11,4 | 6,2 | 6,0 | 10,4 | 14,4 | 12,2 | 1243,4 |
| a 18-10-98 | 19,3 | 25,5 | 59,1 | 35,3 | 75,8 | 72,8 | 44,4 | 23,7 | 19,2 | 238,6 | 253,9 | 49,8 | 23,3 | 15,7 | | 16,5 | 0,5 | 1,5 | 8,7 | 19,6 | 18,7 | 1439,1 |
| arin 20-10-98 | 18,7 | 30,9 | 32,2 | 17,8 | 38,3 | 40,6 | 26,8 | 14,1 | 14,2 | 208,1 | 84,6 | 7,8 | 15,4 | 11,2 | 4,3 | 9,5 | 5,2 | 5,3 | 8,8 | 12,3 | 10,5 | 1006,1 |
| arin 22-10-98 | 27,2 | 41,7 | 44,2 | 25,0 | 51,8 | 46,2 | 31,4 | 20,4 | 19,7 | 241,7 | 122,7 | 1,9 | 22,4 | 15,9 | 5,2 | 10,8 | 6,9 | 7,1 | 12,9 | 16,0 | 14,6 | 1193,5 |
| arin 26-10-98 | 25,1 | 44,1 | 43,7 | 25,1 | 46,2 | 45,0 | 31,9 | 20,8 | 19,9 | 247,8 | 113,5 | 1,9 | 24,9 | 16,4 | 5,5 | 10,2 | 7,4 | 7,6 | 14,7 | 16,2 | 16,9 | 1230,1 |
| a 28-10-98 | 18,5 | 26,8 | 62,4 | 38,9 | 64,7 | 75,2 | 45,3 | 32,2 | 17,8 | 615,9 | | 55,4 | 24,2 | 17,7 | 1,2 | 16,2 | 2,5 | 3,6 | 15,6 | 20,8 | 26,4 | 1409,6 |
| arin 30-10-98 | 14,3 | 48,3 | 40,4 | 26,2 | 45,7 | 45,1 | 31,8 | 22,0 | 20,6 | 257,6 | 119,6 | 1,9 | 25,8 | 17,7 | 6,1 | 10,1 | 8,3 | 8,5 | 17,5 | 17,0 | 20,7 | 1239,4 |
| a 6-11-98 | 37,1 | 53,7 | 57,7 | 35,6 | 60,2 | 69,6 | 45,7 | 24,6 | 21,0 | 364,6 | 8 | 5 | 25,0 | 19,2 | 4,5 | 10,3 | 5,8 | 6,5 | 32,1 | 19,2 | 27,1 | 1192,6 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C15.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Perrum (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Perrum – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| per 25-9-98 | | | 4,0 | 1,8 | 9,0 | 8,8 | 2,7 | 3,7 | 3,9 | 133,6 | 24,3 | 16,0 | 7,0 | 3,0 | 3,0 | 10,6 | 2,5 | 2,4 | 2,3 | 5,1 | 3,6 | 439,0 |
| perr 29-9-98 | | | 19,6 | 0,2 | 58,4 | 1,3 | 7,9 | 1,9 | | 75,8 | 16,7 | 23,6 | 4,2 | 1,5 | | 5,7 | | | | 4,1 | 6,3 | 335,7 |
| perr 1-10-98 | | | 20,5 | 1,0 | 51,9 | | 7,3 | 1,8 | | 87,2 | 11,4 | 16,3 | 1,1 | 1,4 | | 4,6 | | | | 3,8 | 6,7 | 340,8 |
| perr 3-10-98 | 1,0 | 6,9 | 22,6 | 3,3 | 42,3 | 5,0 | 8,3 | 4,7 | 3,6 | 52,2 | | 9,9 | 8,0 | 4,1 | 3,0 | 6,8 | 3,0 | 2,7 | 2,9 | 5,1 | 6,4 | 281,0 |
| perr 4-10-98 | 3,7 | 10,9 | 33,3 | 4,5 | 4 | 3,9 | 11,6 | 3,3 | | 53,0 | 25,8 | 8,8 | 7,7 | 5,5 | 2,0 | 3,3 | 2,1 | 1,9 | 9,7 | 4,0 | 10,2 | 647,9 |
| perr 5-10-98 | | | 23,8 | 4,2 | 40,3 | 5,0 | 9,1 | 4,7 | 4,7 | 6,6 | 75,6 | 8,8 | 8,0 | 3,9 | 3,0 | 6,8 | 3,1 | 2,6 | 3,7 | 5,7 | 6,9 | 256,9 |
| perr 7-10-98 | | 7,1 | 22,9 | 3,6 | 36,7 | 4,9 | 8,6 | 4,7 | 3,6 | 74,2 | | 7,6 | 7,6 | 3,8 | 3,0 | 6,8 | 3,1 | 2,5 | 4,1 | 5,7 | 6,9 | 187,2 |
| per 9-10-98 | 3,4 | 8,5 | 23,4 | 3,4 | 36,2 | 5,2 | 8,3 | 4,8 | 3,7 | 75,7 | 0,6 | 5,7 | 8,3 | 4,0 | 3,0 | 6,8 | 3,3 | 2,9 | 4,1 | 4,6 | 6,8 | 359,7 |
| per 11-10-98 | | 2,8 | 26,3 | 1,8 | 48,5 | | 8,4 | 1,9 | | 73,6 | 11,5 | 6,1 | 4,6 | 2,3 | | 3,1 | | | 1,1 | 2,9 | 5,3 | 477,7 |
| per 13-10-98 | 4,7 | 11,1 | 25,7 | 7,4 | 33,8 | 6,2 | 9,3 | 5,0 | 3,8 | 84,2 | 3,7 | 5,3 | 9,7 | 5,7 | 3,6 | 7,7 | 4,0 | 3,7 | 6,3 | 4,7 | 7,1 | 328,7 |
| per 15-10-98 | | 5,1 | 29,2 | 2,5 | 48,2 | | 10,3 | 2,2 | | 83,1 | 8,1 | 7,0 | 4,9 | 2,6 | | 3,0 | | | 1,9 | 4,1 | 6,1 | 463,7 |
| per 17-10-98 | 3,3 | 10,4 | 24,8 | 6,4 | 34,0 | 5,5 | 10,5 | 4,5 | 3,1 | 82,3 | 3,6 | 5,2 | 9,8 | 4,1 | 4,1 | 6,8 | 3,6 | 3,1 | 5,5 | 4,7 | 6,2 | 298,9 |
| per 19-10-98 | | 4,7 | 28,1 | 2,1 | 44,7 | | 9,2 | 2,2 | | 90,4 | | 7,5 | 3,9 | 2,8 | 0,2 | 2,9 | | 0,1 | 2,9 | 3,8 | 6,6 | 461,7 |
| per 21-10-98 | 7,8 | 11,4 | 26,5 | 6,8 | 29,7 | 6,2 | 9,1 | 4,9 | 3,5 | 82,6 | 12,7 | 1,9 | 9,8 | 4,8 | 4,2 | 6,8 | 4,1 | 3,8 | 7,2 | 5,0 | 7,7 | 497,6 |
| per 23-10-98 | 9,2 | 13,8 | 27,8 | 7,2 | 31,0 | 6,9 | 14,8 | 5,3 | 4,4 | 90,6 | 1,6 | 8,1 | 10,8 | 4,9 | 4,1 | 6,8 | 4,3 | 4,1 | 7,9 | 5,6 | 8,5 | 532,4 |
| per 25-10-98 | 7,8 | 12,2 | 26,9 | 6,2 | 29,3 | 6,1 | 11,2 | 5,6 | 5,0 | 83,7 | 17,7 | 1,9 | 10,5 | 4,4 | 3,5 | 7,0 | 4,3 | 3,9 | 7,8 | 5,2 | 8,6 | 479,9 |
| per 27-10-98 | 14,3 | 13,6 | 29,3 | 9,7 | 29,7 | 9,5 | 11,1 | 5,2 | 4,2 | 116,0 | 13,5 | 2,6 | 11,4 | 7,3 | 4,2 | 7,2 | 5,2 | 5,0 | 13,9 | 5,3 | 9,7 | 534,1 |
| per 29-10-98 | 6,2 | 1 | 26,6 | 6,3 | 28,5 | 2,8 | 10,6 | 5,0 | 4,4 | 87,3 | 3,4 | 6,4 | 9,2 | 4,9 | 3,0 | 6,8 | 4,5 | 4,0 | 10,4 | 7,1 | 11,6 | 194,6 |
| per 31-10-98 | 1,7 | 9,0 | 31,6 | 4,1 | 39,1 | 3,6 | 11,2 | 2,3 | | 119,1 | 0,7 | 9,3 | 5,7 | 4,9 | 1,5 | 2,9 | 1,4 | 1,2 | 7,7 | 5,1 | 10,6 | 501,7 |
| perr 2-11-98 | 2,7 | 9,2 | 32,3 | 4,4 | 36,7 | 3,6 | 12,0 | 2,4 | | 115,6 | 2,7 | 7,8 | 7,3 | 5,4 | 1,1 | 2,9 | 1,5 | 1,3 | 8,2 | 5,0 | 11,3 | 482,3 |
| per 12-11-98 | 0,9 | 13,8 | 26,6 | 6,1 | 23,7 | 3,8 | 11,5 | 4,9 | 3,2 | 99,5 | 16,1 | 1,9 | 10,4 | 6,1 | 3,4 | 6,8 | 5,6 | 5,3 | 16,4 | 7,1 | 15,5 | 284,9 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C16.** Evolução da concentração de aminoácidos livres nas amostras da microvinificação da casta Antão Vaz (mg/L).

| Data de amostragem | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | His | Gly | Thr | Cit | Arg | Ala | Gaba | Tyr | Val | Met | Trp | Phe | Ile | Leu | Orn | Lys | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Antão Vaz – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| av 98 | 49,6 | 51,4 | 31,6 | 54,9 | 98,6 | 139,0 | 8,6 | 82,4 | 19,8 | 33,0 | 0,1 | 10 | 6 | 94,3 | 6,7 | 6,6 | 46,9 | 50,4 | 73,4 | 13,5 | 21,4 | 1077,8 |
| av 5-9-98 | 38,1 | 47,8 | 27,7 | 50,7 | 96,4 | 129,0 | 10,4 | 71,1 | 14,1 | 251,5 | 115,9 | 83,4 | 59,1 | 80,7 | 16,6 | 15,4 | 34,2 | 45,5 | 87,1 | 14,3 | 7,3 | 945,2 |
| av 7-9-98 | 18,6 | 60,4 | 8,8 | 6,2 | 77,4 | 91,4 | 10,5 | 9,0 | 17,1 | 197,4 | 143,3 | 1,9 | 17,5 | 5,5 | 3,0 | 10,5 | 3,0 | 3,0 | 2,9 | 11,7 | 4,4 | 933,5 |
| av 11-9-98 | 14,6 | 36,1 | 52,3 | 7,4 | 76,9 | 74,1 | 2 | 5,4 | 15,3 | 298,2 | 28,9 | 42,4 | 6,5 | 1,8 | 0,5 | 13,4 | | 0,8 | 0,8 | 31,0 | 10,4 | 1069,9 |
| av 13-9-98 | 13,7 | 43,2 | 45,5 | 8,2 | 54,5 | 49,8 | 16,7 | 6,2 | 15,9 | 189,4 | 88,4 | 16,9 | 9,8 | 4,6 | 3,2 | 10,3 | 3,2 | 3,5 | 4,8 | 23,9 | 6,8 | 984,5 |
| av 15-9-98 | 12,2 | 49,8 | 46,2 | 9,2 | 57,8 | 41,7 | 17,3 | 6,0 | 16,1 | 193,3 | 94,7 | 7,5 | 4,8 | 5,0 | 3,6 | 11,3 | 3,5 | 3,8 | 6,1 | 25,8 | 7,1 | 1026,1 |
| av 17-9-98 | 14,3 | 37,2 | 52,8 | 6,4 | 67,4 | 72,5 | 21,6 | 4,5 | 15,4 | 276,6 | 33,3 | 38,3 | 7,4 | 3,0 | 1,7 | 14,2 | 0,4 | 1,7 | 6,1 | 32,0 | 9,0 | 1013,1 |
| av 19-9-98 | 13,8 | 37,2 | 51,0 | 6,4 | 65,5 | 70,4 | 21,5 | 4,1 | 15,1 | 262,8 | 37,1 | 34,6 | 7,4 | 3,3 | 2,1 | 13,5 | 0,8 | 1,9 | 7,5 | 31,2 | 9,2 | 1028,4 |
| av 21-9-98 | 10,5 | 30,2 | 38,3 | 5,6 | 55,7 | 56,0 | 16,9 | 2,8 | 10,7 | 265,1 | 28,6 | 25,0 | 6,0 | 2,9 | 1,6 | 11,4 | 0,5 | 1,2 | 6,6 | 24,2 | 8,2 | 871,5 |
| av 23-9-98 | 13,6 | 36,2 | 47,3 | 8,5 | 61,0 | 65,8 | 21,1 | 3,4 | 14,4 | 279,9 | 37,3 | 32,0 | 8,7 | 3,9 | 2,4 | 12,7 | 1,2 | 2,6 | 10,1 | 28,8 | 10,4 | 974,4 |
| av 25-9-98 | 12,0 | 48,8 | 41,8 | 10,1 | 53,8 | 37,3 | 17,5 | 4,9 | 15,3 | | 230,8 | 1,9 | 11,6 | 6,5 | 4,5 | 11,0 | 4,5 | 5,2 | 11,1 | 24,6 | 9,4 | 917,5 |
| av 27-9-98 | 20,9 | 37,7 | 55,8 | 9,7 | 63,9 | 71,4 | 23,9 | 3,5 | 15,2 | 259,6 | 41,9 | 35,8 | 12,0 | 6,4 | 3,9 | 13,6 | 2,4 | 4,2 | 17,0 | 32,4 | 15,1 | 1010,7 |
| av 3-10-98 | 26,3 | 50,4 | 47,1 | 11,0 | 48,5 | 53,3 | 19,3 | 8,7 | 14,8 | 222,5 | 20,3 | 31,7 | 12,2 | 8,7 | 6,0 | 13,6 | 5,9 | 7,1 | 17,7 | 27,3 | 15,9 | 1165,8 |
| av 5-10-98 | 19,8 | 56,7 | 53,1 | 14,6 | 52,6 | 46,3 | 21,8 | 10,3 | 16,5 | 199,7 | 105,9 | 1,9 | 14,8 | 10,7 | 6,6 | 11,2 | 6,6 | 8,5 | 18,8 | 28,7 | 16,9 | 1015,7 |
| av 14-10-98 | 24,1 | 57,5 | 57,9 | 16,4 | 49,4 | 46,8 | 22,9 | 12,3 | 16,3 | 187,1 | 97,3 | 1,9 | 16,0 | 13,9 | 8,4 | 11,0 | 8,3 | 11,3 | 23,4 | 30,2 | 23,6 | 1024,6 |

Legenda: Asp – aspartato; Glu – glutamato; Asn – asparagina; Ser – serina; Gln – glutamina; His – histidina; Gly – glicina; Thr – treonina; Cit – citrulina; Arg – arginina; Ala – alanina; Gaba – ácido γ-aminobutírico; Tyr – tirosina; Val – valina; Met – metionina; Trp – triptofano; Phe – fenilalanina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Lys – lisina; Pro – prolina.

**Tabela C17.** Concentração de aminas nas amostras de mostos das diversas microvinificações de 1998 (mg/L).

| Casta | Proveniência | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mostos 1998** | | | | | | | | | | | |
| **Roupeiro** | **Redondo** | 18,0 | | 5,7 | 2,2 | | 4,2 | | 0,9 | 0,3 | |
| **Roupeiro** | **Reguengos** | 13,2 | | 2,6 | 1,4 | | 4,0 | | | 0,4 | |
| **Roupeiro** | **Portalegre** | 16,1 | | 4,6 | 1,8 | | 4,3 | | | | |
| **Roupeiro** | **Évora** | 26,2 | | 8,1 | 2,6 | 0,1 | 4,7 | | | 1,0 | |
| **Roupeiro** | **Borba** | 13,2 | | 2,2 | | | 0,5 | | | 0,2 | |
| **Perrum** | **Évora** | 12,1 | | 3,3 | 4,9 | | 0,8 | | | 0,9 | |
| **Periquita** | **Évora** | 11,5 | | 2,3 | 1,2 | | 2,0 | | | | |
| **Roupeiro** | **Vidigueira** | 18,5 | | 6,4 | 3,8 | 0,2 | 6,7 | | | 3,6 | |
| **Rabo de Ovelha** | **Évora** | 20,9 | | 9,4 | 1,1 | 0,4 | 5,6 | | | 0,2 | |
| **Arinto** | **Évora** | 20,2 | | 13,2 | 1,0 | 0,4 | 3,8 | | | 0,1 | |
| **Antão Vaz** | **Évora** | 17,3 | | 7,0 | 1,9 | | 4,1 | | | 0,1 | |
| **Tinta Caiada** | **Évora** | 21,8 | 2,4 | 5,1 | 3,8 | | 7,3 | | | 0,7 | |
| **Aragonez** | **Évora** | 16,4 | | 6,6 | 1,1 | | 2,4 | 1,3 | | 0,1 | |
| **Trincadeira** | **Évora** | 19,0 | | 2,6 | 6,0 | | 6,7 | | | | |
| **Trincadeira** | **Borba** | 9,4 | | 3,0 | | | 1,2 | | 0,5 | 0,3 | |
| **Trincadeira** | **Redondo** | 16,8 | | 4,3 | 1,6 | | 4,6 | 0,8 | | 0,1 | |
| **Trincadeira** | **Reguengos** | 7,8 | | 4,2 | 3,3 | | 6,8 | 0,9 | | 0,2 | |
| **Trincadeira** | **Portalegre** | 25,0 | | 6,7 | 2,6 | | 7,4 | | | 0,2 | |
| **Moreto** | **Évora** | 10,8 | | 2,1 | 1,2 | | 2,3 | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C18.** Concentração de aminas nas amostras de mostos das diversas microvinificações de 1999 (mg/L).

| Casta | Proveniência | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mostos 1999** | | | | | | | | | | | |
| **Roupeiro** | **Reguengos** | 14,6 | | 1,7 | 1,5 | | 1,9 | | | | |
| **Trincadeira** | **Vidigueira** | 17,2 | | 3,4 | 1,5 | | 8,2 | | | | |
| **Trincadeira** | **Redondo** | 14,7 | | 2,7 | 2,0 | | 4,1 | | | | |
| **Trincadeira** | **Évora** | 18,6 | | 5,2 | 1,9 | | 5,3 | | | | |
| **Trincadeira** | **Portalegre** | 14,7 | | 2,7 | 2,6 | | 6,5 | | | | |
| **Roupeiro** | **Borba** | 11,1 | | 1,3 | 0,2 | | 0,2 | | | | |
| **Antão Vaz** | **Évora** | 14,1 | | 6,4 | 0,6 | | 1,5 | | | | |
| **Perrum** | **Évora** | 12,6 | | 3,4 | 0,8 | | | | | | |
| **Rabo de Ovelha** | **Évora** | 12,5 | | 3,9 | 1,5 | | 4,4 | | | | |
| **Roupeiro** | **Vidigueira** | 14,2 | | 3,7 | 1,4 | | 4,1 | | | | |
| **Roupeiro** | **Portalegre** | 14,4 | | 3,8 | 1,3 | | 5,2 | | | | |
| **Arinto** | **Évora** | 16,5 | | 8,5 | 1,8 | | 2,0 | | | | |
| **Roupeiro** | **Redondo** | 13,0 | | 3,3 | 2,4 | | 3,6 | | | | |
| **Roupeiro** | **Évora** | 14,5 | | 3,5 | 1,7 | | 2,0 | | | | |
| **Trincadeira** | **Reguengos** | 15,9 | | 3,1 | 1,2 | | 5,8 | | | | |
| **Aragonez** | **Évora** | 12,8 | | 5,3 | 2,5 | | 1,1 | | | | |
| **Trincadeira** | **Borba** | 8,6 | | 3,6 | 1,7 | | 1,1 | | | | |
| **Moreto** | **Évora** | 10,7 | | 3,0 | 0,9 | | 2,0 | | | | |
| **Periquita** | **Évora** | 14,6 | | 4,9 | 0,8 | | 3,1 | | | | |
| **Tinta Caiada** | **Évora** | 17,3 | | 3,2 | 1,8 | | 4,4 | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C19.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Aragonês (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Aragonês – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| arag 1-9-98 | 28,4 | 2,5 | 10,2 | 0,7 | | 3,5 | | | | |
| arag 2-9-98 | 22,6 | 2,4 | 7,4 | 0,7 | | 2,9 | | | 0,1 | |
| arag 3-9-98 | 25,8 | 2,6 | 0,3 | 3,4 | | 3,1 | | | 0,1 | |
| arag 4-9-98 | 9,4 | 2,7 | | 11,1 | | 3,2 | | | | |
| arag 5-9-98 | 26,7 | | 1,5 | 0,5 | | 2,9 | 1,2 | | | |
| arag 6-9-98 | 29,3 | 2,8 | 0,4 | 10,9 | | 2,2 | | | | |
| arag 8-9-98 | 28,5 | 2,8 | 0,2 | 9,9 | | 1,6 | | | | |
| arag 15-9-98 | 31,1 | | 1,8 | 0,4 | | 3,0 | 1,0 | | | |
| arag 6-10-98 | 4,2 | 4,0 | 0,4 | 15,0 | | 18,3 | | | | |
| arag 13-10-98 | 5,3 | 4,5 | 0,5 | 11,6 | | 28,9 | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C20.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Tinta Caiada (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tinta Caiada – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| tc 1-9-98 | 30,4 | 2,4 | 6,5 | 3,5 | | 9,7 | | | | |
| tc 2-9-98 | 30,4 | 2,5 | 5,0 | 3,8 | | 9,2 | | | 0,1 | |
| tc 3-9-98 | 27,4 | | 0,1 | 5,7 | | 8,5 | | | 0,1 | |
| tc 4-9-98 | 41,2 | 2,4 | 0,1 | 8,1 | | 10,7 | | | 0,1 | |
| tc 15-9-98 | 12,9 | 2,5 | | 21,0 | | 8,0 | | | | |
| tc 22-9-98 | 31,8 | 2,5 | 1,3 | | | 8,4 | 0,1 | | | |
| tc 29-9-98 | 28,5 | | 1,4 | | | 7,9 | 0,1 | | | |
| tc 6-10-98 | 14,0 | 2,7 | 0,1 | 20,1 | | 10,5 | | | | |
| tc 13-10-98 | 12,6 | 2,7 | 0,1 | 18,8 | 0,5 | 12,0 | | | | |
| tc 20-10-98 | 32,0 | 1,9 | | 12,9 | 1,8 | 13,9 | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C21.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Moreto (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Moreto – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| mor 29-9-98 | 18,9 | | 4,3 | | | 3,9 | 0,5 | | | 2,1 |
| mor 1-10-98 | 19,6 | | 4,6 | | | 3,8 | 0,4 | | | 2,3 |
| mor 2-10-98 | 12,2 | | 0,9 | | | 1,1 | 0,1 | | | |
| mor 3-10-98 | 11,7 | | 0,8 | | | 0,7 | 0,1 | | | |
| mor 4-10-98 | 11,6 | | 0,9 | | | 0,2 | 0,1 | | | |
| mor 5-10-98 | 12,7 | | 0,9 | | | 0,6 | 0,1 | | | |
| mor 6-10-98 | 12,8 | | 1,0 | | | 0,5 | 0,1 | | | |
| mor 7-10-98 | 15,5 | | 1,0 | | | 0,9 | 0,1 | | | |
| mor 8-10-98 | 15,2 | | 1,0 | | | 0,9 | 0,1 | | | |
| mor 15-10-98 | 11,6 | | 0,9 | | | 0,5 | 0,1 | | | |
| mo 22-10-98 | 15,1 | 1,6 | | 1,6 | | | | | | |
| mo 29-10-98 | 13,5 | 1,6 | | 1,6 | | | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C22.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Trincadeira (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Trincadeira – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| trinc 1-9-98 | 23,2 | 2,6 | 3,0 | | | 5,8 | | | | |
| trinc 2-9-98 | 23,7 | 2,4 | 3,4 | | | 4,6 | | | | |
| trinc 3-9-98 | 19,7 | | 0,1 | 0,1 | | 5,9 | | | | |
| trinc 4-9-98 | 19,7 | | 0,1 | | | 3,2 | | | | |
| trinc 8-9-98 | 29,2 | 2,8 | 0,1 | 13,0 | | 7,4 | | | | |
| trinc 15-9-98 | 11,0 | 2,4 | 0,5 | | | 5,6 | | | | |
| trinc 22-9-98 | 12,0 | 2,7 | 0,4 | | | 4,7 | | | | |
| trinc 29-9-98 | 10,8 | 2,8 | 0,4 | | | 1,7 | | | | |
| trinc 6-10-98 | 30,2 | 3,1 | | 11,0 | 3,8 | 10,4 | | | | |
| trinc 13-10-98 | 3 | 2,8 | 0,1 | 22,7 | | 14,8 | | | | |
| trinc 20-10-98 | 31,3 | 3,0 | | 7,9 | 4,5 | 18,3 | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C23.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Castelão (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Castelão – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| peri 16-9-98 | 17,2 | 2,5 | 3,4 | | | 3,0 | | | | |
| peri 18-9-98 | 20,2 | 2,4 | | | | 2,5 | | | | |
| peri 19-9-98 | 22,0 | | | | | 2,9 | | | | |
| peri 22-9-98 | 24,7 | | | 0,8 | | 2,8 | | | | |
| peri 23-9-98 | 22,3 | | | 0,7 | | 2,5 | | | | |
| peri 30-9-98 | 20,1 | | | 0,1 | | 2,2 | | | | |
| peri 7-10-98 | 25,9 | 2,5 | | 0,8 | | 2,7 | | | | |
| peri 14-10-98 | 25,9 | 2,4 | | 0,8 | | 2,6 | | | | |
| peri 21-10-98 | 26,6 | 1,8 | | 2,8 | | 2,9 | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C24.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Roupeiro (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Roupeiro – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| rou 31-8-98 | 22,8 | 2,5 | 1,5 | 1,5 | | 3,1 | | | | |
| rou 2-9-98 | 22,1 | 2,5 | 1,3 | 1,7 | | 2,9 | | | | |
| rou 4-9-98 | 20,4 | 2,6 | 0,8 | 1,1 | | 2,9 | | | | |
| rou 6-9-98 | 18,3 | 2,9 | 1,9 | 0,7 | | 3,9 | | | | |
| rou 8-9-98 | 20,2 | 3,1 | 2,1 | 1,0 | | 4,1 | | | | |
| rou 10-9-98 | 19,1 | 2,9 | 2,0 | 1,1 | | 3,7 | | | | |
| rou 16-9-98 | 20,3 | 2,9 | 2,0 | 1,1 | | 3,7 | | | | |
| rou 18-9-98 | 23,0 | 2,7 | 1,1 | 1,6 | | 2,9 | | | | |
| rou 22-9-98 | 19,5 | | 1,8 | 1,0 | | 3,5 | | | | |
| rou 24-9-98 | 14,9 | 3,2 | 1,4 | 0,8 | | 3,1 | | | | |
| rou 26-9-98 | 21,5 | 3,5 | 2,1 | 1,5 | | 4,1 | | | | |
| rou 28-9-98 | 22,7 | 3,2 | 2,1 | 0,8 | | 4,1 | | | | |
| rou 2-10-98 | 23,7 | 2,6 | 1,0 | 1,8 | | 2,9 | | | | |
| rou 4-10-98 | 23,2 | 3,3 | 2,1 | 1,0 | | 4,2 | | | | |
| rou 6-10-98 | 22,7 | 3,5 | 2,1 | 1,9 | | 4,1 | | | | |
| rou 14-10-98 | 23,4 | 4,0 | 2,1 | 1,7 | | 4,2 | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C25.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Rabo de Ovelha (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Rabo de Ovelha – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| ro 29-8-98 | 14,8 | 3,0 | 3,7 | 2,0 | 0,7 | 5,8 | 0,9 | | 0,8 | |
| ro 31-8-98 | 16,9 | 3,0 | 2,2 | 0,9 | 0,6 | 4,9 | 0,4 | | 0,7 | |
| ro 2-9-98 | 17,5 | 2,3 | 3,0 | | | 6,1 | | | | |
| ro 4-9-98 | 15,5 | 3,3 | 0,8 | 1,7 | 0,4 | 6,0 | 0,6 | | 0,7 | |
| ro 6-9-98 | 18,4 | 2,6 | 3,8 | 0,1 | | 6,4 | | | | |
| ro 8-9-98 | 18,4 | 2,4 | 3,7 | | | 6,1 | | | | |
| ro 10-9-98 | 17,9 | 2,7 | 3,7 | 0,3 | | 6,1 | | | | |
| ro 12-9-98 | 16,3 | 2,4 | 3,3 | | | 5,1 | | | | |
| ro 14-9-98 | 17,4 | 2,5 | 3,4 | | | 5,3 | | | | |
| ro 18-9-98 | 20,6 | 2,6 | 3,8 | | | 6,0 | | | | |
| ro 20-9-98 | 17,5 | | 3,3 | | | 6,1 | | | | |
| ro 22-9-98 | 18,0 | 2,8 | 3,3 | | | 6,1 | | | | |
| ro 24-9-98 | 13,1 | 3,4 | 1,8 | 1,3 | 0,4 | 4,9 | 0,4 | | 0,7 | |
| ro 28-9-98 | 21,6 | 2,7 | 3,7 | | | 5,9 | | | | |
| ro 30-9-98 | 13,9 | 3,4 | 1,2 | 1,1 | 0,5 | 4,9 | 0,4 | | 0,7 | |
| ro 2-10-98 | 19,1 | 2,8 | 3,2 | 0,3 | | 5,1 | | | | |
| ro 4-10-98 | 22,0 | 4,6 | 3,6 | | | 6,9 | | | | |
| ro 6-10-98 | 16,6 | 3,4 | 1,1 | 1,0 | 0,4 | 4,4 | 0,4 | | 0,7 | |
| ro 14-10-98 | 20,7 | 3,9 | 3,3 | 0,6 | | 5,7 | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C26.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Arinto (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Arinto – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| a 17-9-98 | 18,8 | 2,3 | 8,9 | 3,0 | 0,2 | 3,5 | | | | |
| a 19-9-98 | 15,7 | 2,2 | 6,8 | 2,0 | 0,2 | 3,9 | | | | |
| arin 21-9-98 | 13,4 | 3,1 | 2,2 | 1,0 | 0,4 | 3,4 | 0,4 | | 0,7 | |
| arin 26-9-98 | 15,8 | 3,3 | 1,9 | 1,4 | 0,4 | 3,9 | 0,4 | | 0,7 | |
| a 28-9-98 | 18,7 | 2,4 | 3,4 | 2,2 | 0,1 | 3,9 | | | | |
| a 4-10-98 | 20,2 | 2,5 | 3,3 | 2,2 | 0,1 | 4,1 | | | | |
| a 6-10-98 | 20,3 | 2,4 | 3,3 | 2,2 | 0,1 | 4,2 | | | | |
| arin 8-10-98 | 13,1 | 3,2 | 0,8 | 1,2 | 0,4 | 2,5 | 0,4 | | 0,7 | |
| a 10-10-98 | 21,1 | 2,4 | 3,3 | 1,1 | 0,1 | 4,3 | | | | |
| a 12-10-98 | 18,7 | 2,3 | 2,9 | 1,9 | 0,1 | 3,8 | | | | |
| a 14-10-98 | 20,8 | 2,4 | 3,1 | 2,1 | 0,1 | 4,1 | | | | |
| arin 16-10-98 | 16,4 | 3,5 | 1,1 | 1,3 | 0,4 | 3,2 | 0,4 | | 0,7 | |
| a 18-10-98 | 23,2 | 1,9 | 2,7 | 0,5 | | 3,7 | | | | |
| arin 20-10-98 | 10,7 | 3,1 | 0,4 | 1,0 | 0,4 | 2,6 | 0,4 | | 0,7 | |
| arin 22-10-98 | 17,3 | 3,6 | 1,1 | 1,0 | 0,4 | 3,4 | 0,4 | | 0,7 | |
| arin 26-10-98 | 17,1 | 3,3 | 1,0 | 1,2 | 0,4 | 3,4 | 0,4 | | 0,7 | |
| a 28-10-98 | 22,8 | 2,6 | 2,4 | 0,3 | | 3,4 | | | | |
| arin 30-10-98 | 18,3 | 3,9 | 1,1 | 1,3 | 0,4 | 3,5 | 0,4 | | 0,9 | |
| a 6-11-98 | 17,1 | 2,5 | 2,8 | 2,2 | 0,1 | 4,2 | | | | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C27.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Perrum (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Perrum – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| per 25-9-98 | 11,9 | | | 1,5 | 0,6 | 1,8 | 0,5 | | 0,8 | |
| perr 29-9-98 | 10,2 | | 0,5 | 1,7 | 0,1 | 1,2 | | | | |
| perr 1-10-98 | 9,7 | | 0,5 | 1,5 | 0,1 | 1,0 | | | | |
| perr 3-10-98 | 9,5 | | | 1,0 | 0,4 | 2,0 | 0,5 | | 0,7 | |
| perr 4-10-98 | 10,3 | 2,2 | 0,3 | 1,6 | 0,1 | 0,9 | | | | |
| perr 5-10-98 | 9,9 | | | 1,0 | 0,4 | 1,9 | 0,4 | | 0,7 | |
| perr 7-10-98 | 9,3 | | | 0,8 | 0,4 | 1,8 | 0,4 | | 0,7 | |
| per 9-10-98 | 9,6 | | | 1,5 | 0,4 | 1,5 | 0,4 | | 0,7 | |
| perr 11-10-98 | 9,7 | | 0,3 | 1,6 | 0,1 | 1,0 | | | | |
| per 13-10-98 | 1 | | | 1,4 | 0,4 | 1,5 | 0,4 | | 0,7 | |
| perr 15-10-98 | 10,6 | 2,1 | 0,3 | 1,5 | 0,1 | 1,1 | | | | |
| per 17-10-98 | 9,8 | | | 1,2 | 0,4 | 1,5 | 0,4 | | 0,7 | |
| perr 19-10-98 | 10,6 | | 0,3 | 1,5 | 0,1 | 0,9 | | | | |
| per 21-10-98 | 9,8 | | | 1,1 | 0,4 | 1,0 | 0,4 | | 0,7 | |
| per 23-10-98 | 1 | | | 1,2 | 0,4 | 1,3 | 0,4 | | 0,7 | |
| per 25-10-98 | 9,6 | | | 1,0 | 0,4 | 0,9 | 0,4 | | 0,7 | |
| per 27-10-98 | 7,5 | 3,1 | | 0,9 | 0,4 | 1,6 | 0,4 | | 0,7 | |
| perr 29-10-98 | 9,5 | | | 0,6 | 0,4 | 1,7 | 0,4 | | 0,7 | |
| perr 31-10-98 | 11,3 | 2,1 | 0,3 | 1,4 | 0,1 | 0,9 | | | | |
| perr 2-11-98 | 10,6 | | 0,3 | 1,4 | 0,1 | 0,9 | | | | |
| perr 12-11-98 | 11,6 | | | 0,7 | 0,4 | 1,7 | 0,4 | | 0,7 | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

**Tabela C28.** Evolução da concentração de aminas nas amostras da microvinificação da casta Antão Vaz (mg/L).

| Data de amostragem | Eta | Hista | Metila | Etila | Tira | Put | Cad | Try | Fen | Iso |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Antão Vaz – amostras recolhidas durante a fermentação (1998)** | | | | | | | | | | |
| av 98 | 17,3 | | 7,0 | 1,9 | | 4,1 | 0,6 | | 0,1 | |
| av 5-9-98 | 16,9 | 2,6 | 5,5 | 3,3 | 0,4 | 5,4 | | 0,1 | | |
| av 7-9-98 | 11,4 | | 0,7 | 1,8 | 1,0 | 3,3 | 1,0 | | 1,1 | |
| av 11-9-98 | 20,1 | 2,8 | 1,8 | 3,8 | 0,2 | 4,7 | | 0,1 | | |
| av 13-9-98 | 14,1 | 3,1 | | 1,7 | 0,8 | 3,7 | 0,5 | | 0,7 | |
| av 15-9-98 | 15,4 | 3,2 | 0,1 | 2,0 | 0,7 | 3,9 | 0,5 | | 0,7 | |
| av 17-9-98 | 20,7 | 2,9 | 1,8 | 3,4 | 0,1 | 4,7 | | 0,1 | | |
| av 19-9-98 | 20,7 | 2,9 | 1,8 | 3,2 | 0,1 | 4,7 | | 0,1 | | |
| av 21-9-98 | 16,0 | 2,7 | 1,5 | 2,9 | 0,1 | 3,6 | | 0,1 | | |
| av 23-9-98 | 19,8 | 2,9 | 1,8 | 3,2 | 0,1 | 4,3 | | 0,1 | | |
| av 25-9-98 | 15,4 | 3,2 | 0,1 | 1,8 | 0,6 | 3,7 | 0,5 | | 0,8 | |
| av 27-9-98 | 21,8 | 2,9 | 1,9 | 3,2 | 0,1 | 4,6 | | 0,1 | | |
| av 3-10-98 | 16,3 | 3,3 | 0,2 | 3,0 | 0,4 | 4,2 | 0,4 | | 0,7 | |
| av 5-10-98 | 17,2 | 3,2 | 0,2 | 1,8 | 0,7 | 4,0 | 0,4 | | 0,8 | |
| av 14-10-98 | 17,5 | 3,2 | 0,3 | 1,4 | 0,4 | 4,1 | 0,4 | | 0,8 | |

Legenda: Eta – etanolamina; Hista – histamina; Metila – metilamina; Etila – etilamina; Tira – tiramina; Put – putrescina; Cad – cadaverina; Try – triptamina; Fen – β-feniletilamina , Iso – isoamilamina.

BIBLIOTECA F.E. PORTO

FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
0000060148