

# A INFLUÊNCIA DA FERTILIZAÇÃO NA COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DE UVAS DA CASTA ARAGONEZ

Catarina PEREIRA <sup>(1)</sup>; Nuno MARTINS <sup>(2)</sup>; Marco D.R. GOMES DA SILVA <sup>(3)</sup>; Pedro ALPENDRE <sup>(4)</sup>; Maria João CABRITA <sup>(4)</sup>

## Resumo

A composição em aminoácidos dos mostos pode ser considerada não só como um marcador da origem varietal mas também da origem geográfica. O teor em aminoácidos dos mostos possui igualmente um papel fundamental na qualidade dos vinhos resultantes, não só por serem uma fonte de azoto para os microrganismos envolvidos nas fermentações, mas também por serem precursores de muitos compostos relacionados com o aroma dos vinhos.

O presente trabalho teve como objetivos detetar e quantificar os aminoácidos presentes nos mostos de uvas da casta Aragonez em função de regimes diferentes de fertilização, obtidas de um ensaio que decorreu em 2018 numa parceria com a **Magnesitas de Rubian, SA**, Lugo, Espanha.

Os resultados permitem concluir que a fertilização a que as videiras foram sujeitas possui influência na quantidade de aminoácidos livres dos mostos.

Palavras Chave: aminoácidos, mosto, Aragonez, fertilização

## 1 – INTRODUÇÃO

As principais preocupações dos viticultores são a optimização do rendimento e qualidade das uvas, como tal, as estratégias de manuseamento do solo, como por exemplo a cobertura do solo entre linhas e a utilização de fertilizantes são fundamentais para alcançar melhorias.

A fertilização do solo das vinhas é cada vez mais estudada de forma a aperfeiçoar o processo de fornecimento de nutrientes disponíveis no solo para os níveis óptimos necessários para um bom crescimento e um rendimento superior das vinhas.

Embora a grande maioria de solos contenha as quantidades necessárias de micronutrientes, alguns macronutrientes principais (azoto, fósforo e potássio) e secundários (magnésio, cálcio e enxofre) podem limitar a produção de uva. Um exemplo de deficiência de macronutrientes é, no caso de solos com pH baixo, observar-se uma deficiência de magnésio e, uma vez que este é um componente principal das moléculas de clorofila, um impacto grande nos processos metabólicos, influenciando a formação e amadurecimentos das uvas. Por outro lado, a deficiência de outros nutrientes pode levar a efeitos negativos nos processos de fermentação subsequentes. O azoto, por exemplo é um dos principais

<sup>(1)</sup> IIFA, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal; <sup>(2)</sup> Aix Marseille Univ, Univ Avignon, CNRS, IRD, IMBE, Marseille, France; <sup>(3)</sup> Dep. Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, LAQV, REQUIMTE, Universidade Nova de Lisboa, Campus da Caparica 2829-516 Caparica PORTUGAL; <sup>(4)</sup> Escola de Ciências e Tecnologia, ICAAM, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal. [mjbc@uevora.pt](mailto:mjbc@uevora.pt)

nutrientes necessários para o crescimento das videiras, com grande impacto na composição das uvas e na qualidade do vinho (Bell et al, 2005). A disponibilidade de azoto na vinha influencia o teor em amins biogénicas dos vinhos, porque afecta o teor em aminoácidos das uvas. Mas Garde-Cérdan et al (2017) demonstraram que a aplicação de azoto na vinha, sob a forma de ureia e fenilalanina em dois anos consecutivos, teve pouca influência no teor em aminoácidos das uvas, porque a vinha não tinha deficiência de azoto.

Os teores em aminoácidos das uvas têm um papel fundamental para a qualidade dos vinhos resultantes, pois para além de serem uma fonte de azoto para os microorganismos envolvidos nas fermentações, são também precursores de muitos compostos relacionados com o aroma dos vinhos (Swiegers, et al, 2005). O teor em aminoácidos das uvas varia com inúmeros factores incluindo a variedade, as condições climáticas e as práticas vitícolas, onde se inclui a fertilização.

O objectivo deste trabalho foi detetar e quantificar os aminoácidos presentes nos mostos de uvas da casta Aragonez em função de regimes diferentes de fertilização. A importância deste trabalho, é ajudar a colmatar a falta de informação existente sobre a aplicação de outros nutrientes que não o N, nas características das uvas e dos vinhos.

## **2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 – Mostos**

Foram analisados 39 mostos de uvas da casta Aragonez em função de regimes diferentes de fertilização na vinha. O ensaio na vinha foi concebido em blocos casualizados e com 3 repetições. Os nutrientes estudados foram o magnésio (Mg), azoto (N), fósforo (P), cálcio (Ca), enxofre (S) e potássio (K). Foram aplicadas duas doses diferentes de Mg (Mg1 e Mg2, sendo a dose 2 o dobro da dose 1), as doses dos restantes elementos foram iguais e foi considerada uma parcela controle (1-Sem Mg) sem adição de Mg e com N, P, Ca, S, K. Para cada uma das doses de Mg os tratamentos foram:

- com todos os nutrientes: 2- com todos (Mg1, N, P, Ca, S,K) e 8- com todos (Mg2, N, P, Ca, S, K)
- sem N e com todos os restantes: 3 – Mg1, P, Ca, S, K e 9 - Mg2, P, Ca, S, K
- sem S e com todos os restantes: 4 – Mg1, N, P, Ca, K e 10 - Mg2, N, P, Ca, K
- sem P e com todos os restantes: 5 – Mg1, N, Ca, S, K e 11 - Mg2, N, Ca, S, K
- sem Ca e com todos os restantes: 6 – Mg1, N, P, S, K e 12 - Mg2, N, P, S, K
- sem K e com todos os restantes: 7 – Mg1, N, P, Ca, S e 13 - Mg2, N, P, Ca, S

As uvas foram colhidas à maturação tecnológica e para cada tipo de tratamento foram recolhidas amostras de 200 bagos. O mosto extraído por esmagamento manual foi congelado até a sua análise.

## **2.2 – Detecção quantificação de aminoácidos**

A avaliação da composição em aminoácidos dos diferentes mostos realizou-se de acordo com a metodologia apresentada por GÓMEZ-ALONZO et al (2007), com algumas alterações. A análise foi realizada num HPLC Waters Alliance e2695 equipado com bomba quaternária de baixa pressão e injector automático acoplado a um detector de fotodiodos Waters 2998. A separação cromatográfica ocorreu numa coluna HPLC ACE 5 C18-HL, com tamanho de partícula 5µm (250 mm x 4.6 mm) termo estatizada a 20°C, com um gradiente de fases móveis A e B, sendo que a fase móvel A foi um tampão acetato 25 mM pH 5.8 com 0.02% azida de sódio, e a fase móvel B foi uma mistura de acetonitrilo-metanol (80:20 (v/v)). O gradiente de eluição foi o seguinte: 90% de A até aos 20 minutos, 90% de A até 83% de A em 10 minutos, 81% de A durante 1 minuto, 81% de A até 80.5% de A em 1.01 minutos, 80.5% de A até 77% de A em 9.5 minutos, 77% de A até 70.6% de A em 20.6 minutos, 70.6% de A até 18% de A em 13 minutos, 18% de A até 0% de A em 4 minutos, 100% de B durante 3 minutos, 90% de A em 5 minutos durante 5 minutos. O fluxo utilizado foi de 0.9 mL/min e a detecção foi feita a 280, 269 e 300 nm.

Utilizou-se o software Empower 4 para obtenção e tratamento dos dados cromatográficos, tendo os picos obtidos sido identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV-Vis das amostras com padrões. Os padrões de ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, serina, glutamina, histidina, glicina, treonina, arginina, GABA, tirosina, cistina, valina, metionina, triptofano, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina e prolina foram também utilizados para o estabelecimento de rectas de quantificação, limites de deteção e limites de quantificação. A análise foi efectuada em quintuplicado.

## **2.3 – Tratamento estatístico dos resultados**

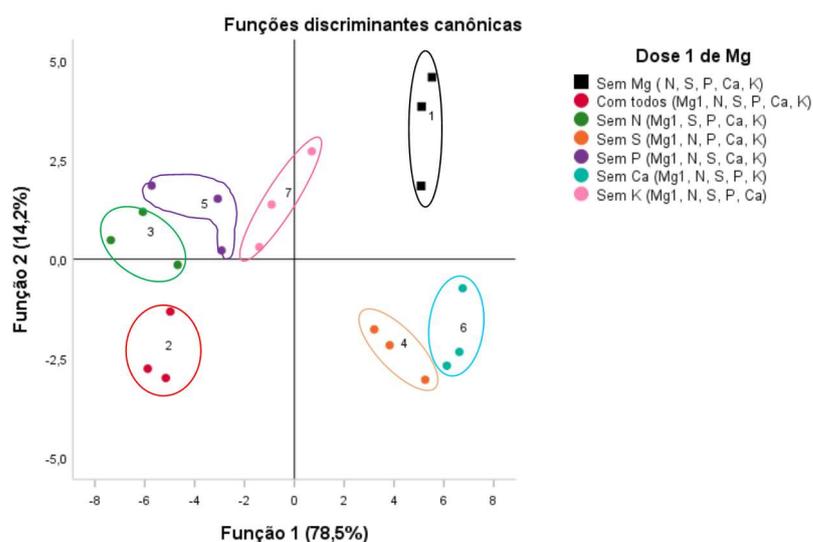
Para avaliar as diferenças entre os resultados obtidos a partir da análise cromatográfica dos diferentes mostos, efetuou-se uma análise canónica discriminante. O programa utilizado foi o SPSS v.22. A análise canónica discriminante é uma técnica da estatística multivariada utilizada para discriminar e classificar. A discriminação ou separação é a primeira etapa, sendo a parte exploratória da análise e consiste em procurar características capazes de

serem utilizadas para colocar amostras em diferentes grupos previamente definidos. A análise foi efectuada considerando o teor em aminoácidos como variáveis independentes para classificar as amostras de uvas de acordo com os tratamentos.

### 3 – RESULTADOS

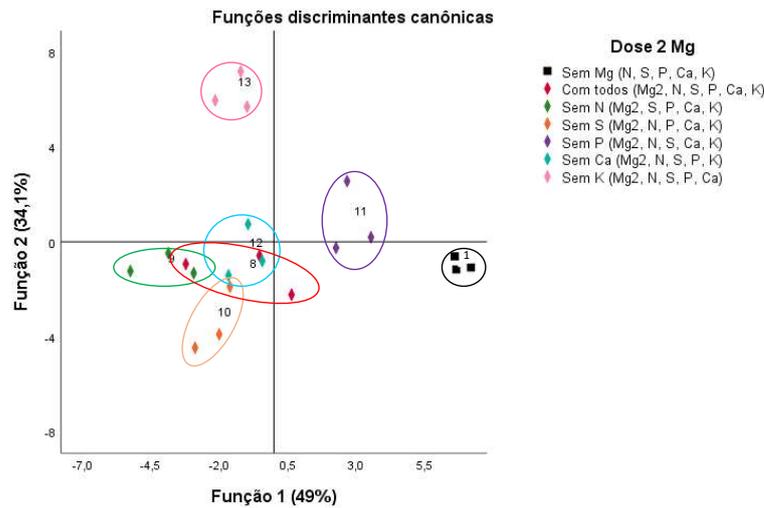
Para verificar se o teor em aminoácidos permite uma classificação das uvas de acordo com o tratamento de fertilização a que foram submetidas, uma análise canónica discriminante foi efectuada e os resultados da localização das amostras no plano definido pelas duas funções canónicas encontram-se na Figura 1, na Figura 2 e na Figura 3 a primeira referente às amostras com a dose 1 de Mg, a segunda referente às amostras com a dose 2 de Mg e a terceira referente a todas as amostras.

Na tabela 1 e na tabela 2 encontram-se os valores médios dos diferentes aminoácidos nas uvas para os diferentes tratamentos a que vinha foi sujeita com a dose 1 de Mg e com a dose 2 de Mg, respectivamente.



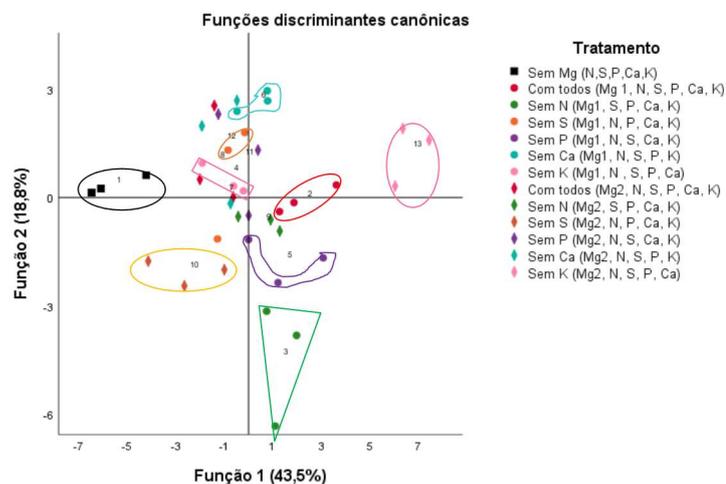
**Figura 1** – Representação das funções canónicas discriminantes canónicas para as uvas provenientes do tratamento com a dose 1 de Mg e sem Mg: 1- Sem Mg, 2- Com todos (Mg, N, S, P, Ca, K), 3- Sem N (Mg, S, P, Ca, K), 4- Sem S (Mg, N, P, Ca, K), 5- Sem P (Mg, N, S, Ca, K), 6- Sem Ca (Mg, N, S, P, K), 7- Sem K (Mg, N, S, P, Ca).

Relativamente à dose 1 de Mg (**Figura 1**) verifica-se uma boa separação entre os diferentes tratamentos, com a primeira e a segunda função a explicar 78,5% e 14,2%, respectivamente, da variabilidade entre as amostras.



**Figura 2** – Representação das funções canônicas discriminantes canônicas para as uvas provenientes do tratamento com a dose 2 de Mg e sem Mg: 1- Sem Mg, 8- Com todos (Mg, N, S, P, Ca, K), 9- Sem N (Mg, S, P, Ca, K), 10- Sem S (Mg, N, P, Ca, K), 11- Sem P (Mg, N, S, Ca, K), 12- Sem Ca (Mg, N, S, P, K), 13- Sem K (Mg, N, S, P, Ca).

Já relativamente à dose 2 de Mg (**Figura 2**) obtém-se uma boa separação apenas para os grupos sem K(13), sem P(11) e sem Mg(1), com a primeira e a segunda função a explicar 49% e 34,1%, respectivamente, da variabilidade entre as amostras.



**Figura 3** – Representação das funções canônicas discriminantes canônicas para as uvas provenientes de todos os tratamentos 1- Sem Mg, 2- Com todos (Mg1, N, S, P, Ca, K), 3- Sem N (Mg1, S, P, Ca, K), 4- Sem S (Mg1, N, P, Ca, K), 5- Sem P (Mg1, N, S, Ca, K), 6- Sem Ca (Mg1, N, S, P, K), 7- Sem K (Mg1, N, S, P, Ca), 8- Com todos (Mg2, N, S, P, Ca, K), 9- Sem N (Mg2, S, P, Ca, K), 10- Sem S (Mg2, N, P, Ca, K), 11- Sem P (Mg2, N, S, Ca, K), 12- Sem Ca (Mg2, N, S, P, K), 13- Sem K (Mg2, N, S, P, Ca).

Quando na análise canónica discriminante se consideram todos os tratamentos (**Figura 3**) obteve-se uma distinção clara entre o grupo sem Mg (1), do grupo CT(2) dos grupos com

apenas uma dose de Mg sem N(3) e sem P(5), e dos grupos com duas doses de Mg sem K(13) e sem S(10).

Da observação da tabela 1 verificamos que no tratamento Sem Mg o teor total de aminoácidos nos mostos destas uvas é o mais elevado e com a dose 1 de Mg e sem adição de S, os mostos apresentam o menor teor de aminoácidos totais. O mesmo se verifica na tabela 2, onde as uvas do tratamento sem Mg apresentam valores mais elevados do teor em aminoácidos e os tratamentos sem N e sem S apresentam os menores valores. Estes resultados parecem estar relacionados sobretudo com os menores teores encontrados para a arginina e a histidina, dois dos aminoácidos maioritariamente existentes nas uvas, quando comparamos estes tratamentos com o tratamento 1- Sem Mg.

Por outro lado, resposta observada nos tratamentos com a dose 2 de Mg deve ter a ver com a maior importância que o Mg passou a ter no complexo de troca catiónica (CTC) o que levou a um efeito de competição especialmente com o K que é o catião em menor percentagem no CTC, e com um efeito de sinergia com o fósforo potenciado pela maior dose e a disponibilidade de P, dado que os dados da análise de solos (dados não incluídos) mostraram que o solo era deficiente neste nutriente. De facto com a dose 2 de Mg o teor em aminoácidos no tratamento CT é inferior ao mesmo tratamento com a dose 1 de Mg.

#### **4 – CONCLUSÕES**

Os resultados parecem indicar que os diferentes regimes de fertilização do solo afectam a composição em aminoácidos das uvas, o que é visível através da análise canónica discriminante efectuada. A dose de Mg aplicada parece também influenciar a síntese de aminoácidos, uma vez que o teor total em aminoácidos no tratamento CT Mg2 é inferior ao encontrado para o tratamento CT Mg1.

Estes resultados, preliminares, permitem no entanto ressaltar a importância da fertilização da vinha para as características das uvas, e consequentemente dos vinhos.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao ICAAM Projecto UID/AGR/00115/2019 financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e a Rui Bicho do Laboratório de Enologia da Universidade de Évora pela assistência técnica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bell S.-J. and Henschke P.A. Implications of nitrogen nutrition for grapes fermentation and wine. Aust. J. Grape Wine Res. (2015) 11, 242-295

Teresa Garde-Cerdán, Gastón Gutiérrez-Gamboa, Javier Portu, José Ignacio Fernández-Fernández, Rocío Gil-Muñoz Impact of phenylalanine and urea applications to Tempranillo and Monastrell vineyards on grape amino acid content during two consecutive vintages. Food research International. (2017) 102, 451-457

Swiegers, J. H., Bartowsky, P. A., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. Australian Journal of Grape and Wine Research, 11, 139–173.

Sergio Gómez-Alonso, Isidro Hermeros-Gutiérrez and Esteban Garcia-tomero. Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone derivatives in Wine and Beer Samples. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 608-613

Tabela 1 – teores dos diferentes aminoácidos nas uvas dos tratamentos Sem Mg e dose 1 de Mg

(mg/L)	Sem Mg	Dose 1 de Mg					
		CT	Sem N	Sem S	Sem P	Sem Ca	Sem K
Asp	35,49±11,86	31,43±7,19	35,04±11,00	29,95±8,13	30,92±4,72	35,01±8,31	33,4±9,63
Glu	120,36±62,24	127,11±56,98	133,47±66,40	91,28±43,98	96,05±36,47	127,64±52,90	116,73±61,57
Asn	21,04±0,82	20,28±1,02	20,52±1,33	19,78±0,80	19,73±0,64	20,07±0,88	20,45±0,94
Ser	53,37±12,25	46,84±14,79	51,39±16,23	36,98±7,33	40,96±8,80	47,34±14,44	48,73±11,90
His	101,80±30,75	105,34±56,72	116,03±58,23	70,38±17,76	89,53±36,20	102,07±51,02	85,38±28,61
Gln	34,51±3,44	32,07±8,71	32,17±6,07	27,34±1,65	28,62±3,09	30,48±3,80	31,72±5,07
Gly	24,75±2,39	23,05±1,61	23,38±2,52	21,41±1,14	22,5±0,96	22,61±1,34	23,4±1,11
Thr	45,05±7,42	38,54±13,18	41,09±12,04	32,34±5,20	33,64±6,45	38,95±9,06	39,84±9,11
Arg	179,51±22,72	136,73±130,09	140,54±75,05	90,92±21,37	86,13±12,52	140,7±52,97	158,39±95,72
Ala	60,43 ± 7,49	54,67±20,22	57,82±17,45	42,61±10,82	46,54±10,84	53,41±10,49	58,28±17,81
Gaba	108,87±39,32	106,75±39,38	107,25±45,22	79,69±31,37	113,23±29,61	103,88±17,32	121,64±57,01
Pro	33,93±16,43	43,44±14,67	27,81±4,65	32,81±15,67	44,04±12,22	53,47±15,13	40,52±10,96
Tyr	27,92±6,34	24,77±11,21	25,48±10,06	18,88±4,20	19,73±3,91	22,98±6,07	24,47±7,94
Val	45,85±16,28	39,57±11,57	42,32±14,43	31,56±6,66	38,39±13,86	38,49±7,08	38,1±7,99
Met	22,44±1,41	22,27±2,43	21,79±1,58	20,76±2,43	21,38±1,81	21,61±1,15	21,71±0,86
Iso	35,96±13,36	29,46±4,80	30,08±6,94	26,63±5,11	29,84±9,53	29,34±2,62	29,23±4,13
Trp	60,63±22,62	46,58±12,05	51,92±24,04	43,26±15,05	43,59±10,54	47,46±13,26	47±13,58
Leu	38,85±13,08	32,93±7,42	35,06±10,85	28,53±5,18	32,37±10,83	32,43±4,89	32,31±5,80
Phe	31,24±4,55	29,12±3,73	30,92±6,32	26,23±1,83	29,05±4,81	28,13±3,98	28,01±2,39
Orn	20,67±0,85	19,98±0,45	20,2±0,51	19,71±0,30	19,84±0,21	20,09±0,27	20,52±0,18
Lys	22,32±1,66	21,92±2,07	22,06±2,17	20,88±1,28	20,96±1,64	22,22±0,83	23,17±2,44
TOT	1125,00	1032,86	1066,32	811,93	907,03	1038,40	1042,97

Asp - ácido aspártico; Glu - ácido glutâmico; Asn - asparagina; Ser - serina, Gln - glutamina; His - histidina; Gly - glicina; Thr - treonina, Arg - arginina; Tyr - tirosina, Val - valina; Met - metionina; Trp - triptofano; Phe - fenilalanina; Orn - ornitina; Iso - isoleucina; Leu - leucina; Lys - lisina e Pro - prolina.

Tabela 2 – teores dos diferentes aminoácidos nas uvas dos tratamentos Sem Mg e dose 2 de Mg

(mg/L)	Sem Mg	Dose 2 de Mg					
		CT	Sem N	Sem S	Sem P	Sem Ca	Sem K
Asp	35,49±11,86	28,55±5,66	26,88±3,68	31,82±7,88	35,29±7,87	28,59±5,46	37,02±2,97
Glu	120,36±62,24	82,71±35,05	65,5±17,45	97,73±47,01	103,79±31,33	92,5±43,34	129,85±14,09
Asn	21,04±0,82	19,95±1,15	19,58±0,33	19,68±0,70	19,94±0,81	20,31±0,86	20,73±1,04
Ser	53,37±12,25	39,6±12,69	36,02±5,90	40,16±11,41	44,26±10,68	48,31±12,78	52,98±12,59
His	101,80±30,75	77,68±37,82	69,82±24,98	69,19±26,75	92,52±41,11	99,54±37,85	131,91±50,52
Gln	34,51±3,44	29,27±5,53	27,42±2,34	26,68±1,90	29,58±4,41	32,74±4,97	34,18±7,12
Gly	24,75±2,39	22,04±1,91	22,17±1,33	21,32±1,05	23,2±2,09	23,43±2,07	24,03±2,38
Thr	45,05±7,42	33,87±9,19	29,81±3,51	32,39±6,99	35,47±9,42	41,08±10,35	42,03±11,03
Arg	179,51±22,72	109,86±72,00	53,35±12,05	70,5±16,55	92,44±52,80	145,67±64,75	173,75±93,95

Ala	60,43 ± 7,49	42,48±12,78	36,42±3,63	39,96±10,58	44,86±16,04	57,61±17,39	61,25±16,32
Gaba	108,87±39,32	72,86±32,88	55,03±5,22	66,66±29,48	86,99±56,28	107,84±47,33	147,79±58,87
Pro	33,93±16,43	31,82±4,32	30,26±6,40	24,11±3,16	43,79±19,93	39,47±7,13	50,54±13,38
Tyr	27,92±6,34	20,35±8,12	17,68±2,71	17,12±3,81	21,17±6,73	24,59±7,35	27,05±9,15
Val	45,85±16,28	31,41±8,92	32,29±6,03	30,26±7,01	38,36±14,17	42,97±12,25	48,43±17,53
Met	22,44±1,41	20,9±1,13	20,56±0,49	20,46±0,57	21,57±1,52	22,75±1,69	23,41±3,37
Iso	35,96±13,36	24,87±3,50	26,6±3,60	29,02±7,95	30,43±8,53	33±7,75	36,06±11,48
Trp	60,63±22,62	40,53±13,08	42,4±8,60	39,31±11,57	45,05±16,50	50,54±16,31	55,26±13,74
Leu	38,85±13,08	28,21±6,97	29,01±4,64	27,07±5,09	33,09±9,75	36,95±10,25	40,65±13,63
Phe	31,24±4,55	26,67±3,73	27,6±2,45	26,53±3,31	28,73±4,24	30,18±4,66	31,78±5,16
Orn	20,67±0,85	19,76±0,25	19,57±0,26	19,54±0,05	20,07±0,34	20,21±0,36	20,42±0,74
Lys	22,32±1,66	20,88±1,53	19,67±0,31	20,31±1,00	21,25±2,00	21,76±1,35	23,16±1,82
TOT	1125,00	824,27	707,64	769,81	911,86	1020,05	1212,30

Asp - ácido aspártico; Glu - ácido glutâmico; Asn - asparagina; Ser - serina, Gln - glutamina; His - histidina; Gly - glicina; Thr - treonina, Arg - arginina; Tyr - tirosina, Val - valina; Met - metionina; Trp - triptofano; Phe - fenilalanina; Orn - ornitina; Iso - isoleucina; Leu - leucina; Lys - lisina e Pro - prolina.