

PRISCILA SEIXAS SABAINI

**MÉTODOS DE ANÁLISE E DETERMINAÇÃO DE
AMINAS LIVRES E CONJUGADAS EM UVAS E
VINHOS**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009**

PRISCILA SEIXAS SABAINI

**MÉTODOS DE ANÁLISE E DETERMINAÇÃO DE
AMINAS LIVRES E CONJUGADAS EM UVAS E
VINHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz Abreu Glória

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2009**

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Daisy e Sergio.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por todos os caminhos destinados.

Aos meus pais Daisy e Sergio, pelo exemplo, dedicação e amor incondicional.

Às minhas irmãs, Danielle e Mariana, pelo carinho e compreensão. Ao meu cunhado Alexandre pela amizade.

Aos meus amigos e familiares pela amizade e apoio constante.

À Professora Dr^a. Maria Beatriz Abreu Glória, pela amizade, exemplo, oportunidades e orientação em todas as etapas da realização deste trabalho.

Aos amigos do LBqA, Tarliane, Adriana, Juliana, Cecília, Kátia, Letícia, Aline, Warlley, Bruno Dala Paula, Bruno Botelho, Sílvia, Renata, Vívian, Rita, Guilherme, Thaíza, Fabiane, Tânia, Raquel, Marina e Lilian, pelos momentos agradáveis, amizade, sugestões.

Ao professor David Lee Nelson pelas sugestões na finalização da dissertação.

À pesquisadora Renata Vieira da Mota pela disponibilidade, pelo seu entusiasmo e por suas sugestões importantes na elaboração e finalização da dissertação.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo aprendizado.

Às funcionárias da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela atenção, esclarecimentos e auxílio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 VINHOS.....	14
2.1.1 VINIFICAÇÃO.....	16
2.1.2 COMPOSIÇÃO DO VINHO	20
2.2 AMINAS BIOATIVAS.....	21
2.2.1 DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA	21
2.2.2 SÍNTESE, METABOLISMO E SIGNIFICÂNCIA TOXICOLÓGICA	24
2.2.3 AMINAS CONJUGADAS	31
2.2.3.1 Formação.....	31
2.2.3.2 Relevância fisiológica.....	32
2.2.3.3 Métodos analíticos de aminas conjugadas.....	34
2.3 AMINAS BIOATIVAS EM VINHOS	35
2.3.1 UVAS.....	37
2.3.2 VINIFICAÇÃO	38
2.3.2.1 Maceração	39
2.3.2.2 Fermentação alcoólica	39
2.3.2.3 Fermentação malolática	40
2.3.2.4 Condições higiênico-sanitárias durante a vinificação	41
2.3.2.5 Outros fatores.....	41
2.3.3 AMINAS CONJUGADAS EM UVAS E VINHOS	43
2.3.4 PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE AMINAS EM VINHOS	44
2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	44
2.4.1 LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO.....	45
2.4.2 SELETIVIDADE	45
2.4.3 EXATIDÃO	46
2.4.4 PRECISÃO.....	46
2.4.5 LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 MATERIAL.....	48
3.1.1 AMOSTRAS.....	48
3.1.1.1 Validação do método de análise de aminas em uvas e vinhos	48
3.1.1.2 Otimização da hidrólise das aminas conjugadas em uvas e vinhos.....	48
3.1.1.3 Perfil e teores de aminas livres e conjugadas em vinhos do mercado de Belo Horizonte.	48
3.1.1.4 Perfil e teores de aminas livres e conjugadas em uvas.....	48
3.1.2 REAGENTES E SOLVENTES.....	49
3.1.3 SOLUÇÕES	50
3.1.3.1 Solução padrão de dez aminas.....	50

3.1.3.2	Solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio.....	50
3.1.3.3	Solução derivante.....	50
3.2	MÉTODOS	50
3.2.1	ANÁLISE DE AMINAS	50
3.2.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE AMINAS EM UVAS E VINHOS.....	52
3.2.2.1	Linearidade.....	53
3.2.2.2	Seletividade e efeito da matriz	53
3.2.2.3	Exatidão, precisão e limites.....	54
3.2.3	OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DAS AMINAS CONJUGADAS EM VINHOS E UVAS	55
3.2.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOOLICO, pH E AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS EM VINHOS DO MERCADO DE BELO HORIZONTE	57
3.2.5	DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS EM UVAS	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE AMINAS EM UVAS E VINHOS	58
4.1.1	LINEARIDADE.....	58
4.1.2	SELETIVIDADE E EFEITO DA MATRIZ.....	62
4.1.2.1	Uva.....	62
4.1.2.2	Vinho.....	66
4.1.3	PRECISÃO E EXATIDÃO	70
4.1.3.1	Uva.....	70
4.1.3.2	Vinho.....	72
4.1.4	LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E DETECÇÃO	73
4.2	OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DAS AMINAS CONJUGADAS EM VINHOS	74
4.3	OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DAS AMINAS CONJUGADAS EM UVAS	82
4.4	DETERMINAÇÃO DO pH, TEOR ALCOÓLICO E DOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS EM VINHOS DO MERCADO DE BELO HORIZONTE	83
4.4.1	TEOR ALCOÓLICO E pH	83
4.4.2	AMINAS BIOATIVAS LIVRES	83
4.4.3	AMINAS CONJUGADAS	87
4.5	DETERMINAÇÃO DO PERFIL E TEORES DE AMINAS LIVRES E CONJUGADAS EM UVAS	88
5	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE TABELAS

1	Produção de uvas e elaboração de vinhos no Brasil (2003 - 2008).....	15
2	Produção mundial de vinhos nos principais países produtores (2001-2007).....	16
3	Consumo per capita de vinhos nos principais países produtores.....	16
4	Composição química dos vinhos	20
5	Funções metabólicas e fisiológicas das amins bioativas	24
6	Efeitos tóxicos das amins bioativas	29
7	Parâmetros da hidrólise utilizados em diferentes estudos para análise de amins conjugadas.....	34
8	Tipos e teores de amins bioativas em vinhos.....	36
9	Amostras de vinhos adquiridas no mercado de Belo Horizonte, MG	49
10	Gradiente de eluição para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio utilizado na determinação das amins	51
11	Critérios de aceitabilidade do desvio padrão relativo (DPR) para cada nível de concentração.....	55
12	Primeiro planejamento experimental para otimização da hidrólise das amins conjugadas em vinhos e uvas.....	56
13	Segundo planejamento experimental para otimização da hidrólise das amins conjugadas em vinhos e uvas.....	56
14	Terceiro planejamento experimental para otimização da hidrólise das amins conjugadas em vinhos e uvas.....	56
15	Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das amins bioativas.....	60
16	Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das amins bioativas construídas em uvas	64
17	Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de calibração na matriz uva com as curvas no solvente para as amins na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L.....	66
18	Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das amins bioativas construídas em vinhos.....	67
19	Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de calibração na matriz vinho com as curvas no solvente para as amins na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L	69
20	Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de uva e vinho adicionadas de putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina e espermidina em diferentes níveis de concentração.....	71
21	Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de uva e vinho adicionadas de feniletilamina, espermina e triptamina em diferentes níveis de concentração	72
22	Faixas de aplicabilidade do método validado para análise das amins em uvas	72
23	Faixas de aplicabilidade do método validado para análise das amins em vinhos.....	73
24	Limites de detecção e de quantificação para as amins estudadas nas matrizes uva e vinho	74

25	Matriz do primeiro planejamento experimental realizado para otimização da hidrólise da espermidina conjugada em vinho.....	75
26	Efeitos padronizados, desvio padrão, valor de t e probabilidade das variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial para o teor de espermidina conjugada	75
27	Análise de variância referente ao primeiro planejamento para o teor de espermidina conjugada	76
28	Matriz do segundo planejamento experimental realizado para otimização da hidrólise da espermidina e feniletilamina conjugada em vinho	77
29	Análise de variância referente ao segundo planejamento para o teor de espermidina conjugada	77
30	Análise de variância referente ao segundo planejamento para o teor de feniletilamina conjugada	77
31	Matriz do terceiro planejamento experimental realizado para otimização da hidrólise da espermidina e feniletilamina conjugada em vinho	78
32	Efeitos padronizados, desvio padrão, valor de t e probabilidade do terceiro planejamento fatorial para o teor de espermidina conjugada	78
33	Efeitos padronizados, desvio padrão, valor de t e probabilidade do terceiro planejamento fatorial para o teor de feniletilamina conjugada.....	79
34	Análise de variância referente ao terceiro planejamento fatorial para o teor de espermidina conjugada	79
35	Análise de variância referente ao terceiro planejamento para o teor de feniletilamina conjugada	81
36	Condição ótima definida para hidrólise das aminas espermidina e feniletilamina conjugadas	82
37	Caracterização das amostras de vinho adquiridas no mercado de Belo Horizonte, MG	83
38	Teores totais de aminas e porcentagens de contribuição das aminas detectadas nos vinhos analisados	84
39	Faixas de concentração e médias das aminas detectadas conforme o tipo de vinho analisado.....	85
40	Teores totais de aminas conjugadas e porcentagens de contribuição das aminas detectadas nos vinhos analisados	87
41	Teores totais de aminas e porcentagens de contribuição das aminas detectadas nas uvas analisados.....	89

LISTA DE FIGURAS

1	Fluxograma da produção de vinho.....	18
2	Estrutura química de algumas aminas	23
3	Formação de aminas por descarboxilação de aminoácido	25
4	Vias metabólicas para formação de aminas bioativas.....	26
5	Esquema da absorção das aminas biogênicas pelo intestino em condições normais e na ausência das enzimas oxidases.....	28
6	Estruturas de algumas amidas de ácido hidroxicinâmico.....	31
7	Sistema CLAE com derivação pós-coluna e detector de fluorescência utilizado na análise das aminas bioativas.....	52
8	Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas das aminas analisadas em solvente.....	59
9	Curvas de calibração das aminas em solvente, na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L, com respectivas equações e coeficientes de determinação	61
10	Cromatogramas da solução padrão das dez aminas no solvente e adicionada à matriz vinho.....	63
11	Cromatogramas da solução padrão das dez aminas no solvente e adicionada à matriz uva	63
12	Curvas de calibração das aminas na matriz uva, na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L, com as respectivas equações e coeficientes de determinação ..	65
13	Curvas de calibração de dez aminas na matriz vinho, na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L, com as respectivas equações e coeficientes de determinação ..	68
14	Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para o teor de espermidina conjugada em função da temperatura de hidrólise e da concentração do HCl.....	80
15	Teores de feniletilamina conjugada em função da concentração de HCl... 81	
16	Perfil e teores de aminas bioativas livres de vinhos comerciais adquiridos no mercado de Belo Horizonte, MG	86
17	Perfil e teores de aminas conjugadas de vinhos comerciais adquiridos no mercado de Belo Horizonte, MG.....	88
18	Perfil e teores de aminas bioativas livres nas amostras de uvas	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGM	Agmatina
CAD	Cadaverina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	Coenzima A
DAO	Diaminoxidase
DCCR	Delineamento central composto rotacional
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
EPD	Espermidina
EPM	Espermina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEM	Feniletilamina
GL	Graus de liberdade
HCAAs	Amida de ácidos hidroxicinâmicos
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIM	Histamina
IEC	Comissão Eletrotécnica Internacional
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	Organização Internacional para Padronização
LAB	Bactérias ácido lácticas
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAO	Monoaminoxidase
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho
OPA	Orto-ftalaldeído
PAO	Poliaminoxidase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PUT	Putrescina
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
QM	Quadrados médios
RNA	Ácido ribonucléico
SAM	S-adenosilmetionina
SNC	Sistema nervoso central
SQ	Soma de quadrados
SRT	Serotonina
TIM	Tiramina
TRM	Triptamina
UVIBRA	União Brasileira de Vitivinicultura

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo validar o método para análise de aminas livres e otimizar o método de hidrólise de aminas conjugadas em uvas e vinhos. O método para a determinação de aminas bioativas livres por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica foi validado para uvas e vinhos. O método foi linear, preciso e exato para todas as aminas. Os limites de detecção e quantificação foram adequados para análise de aminas em uvas e vinhos. Foi observado efeito das matrizes uva e vinho na análise de algumas aminas. As condições ótimas para a hidrólise de aminas conjugadas em vinhos foram definidas como 5 h de hidrólise à 107 °C, com HCl 6 mol/L e temperatura de concentração a 60 °C. Não foi possível otimizar a hidrólise de aminas conjugadas em uvas, uma vez que somente a amina espermina foi encontrada na forma hidrolisada em quantidades detectáveis, porém não quantificáveis (< 0,4 mg/L). As amostras de vinhos comercializadas em Belo Horizonte foram caracterizadas pela presença das aminas livres putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e feniletilamina. Os teores totais de aminas variaram de não detectado (< 0,2 mg/L) a 18,46 mg/L. A putrescina foi a amina que mais contribuiu para o teor total de aminas. Dentre as amostras analisadas, quatro apresentaram teores de histamina acima de 2 mg/L e nenhuma ultrapassou 8 mg/L de tiramina. Os vinhos tintos apresentaram maiores teores e variedade de aminas. Foram encontradas também, nas amostras de vinho, as aminas feniletilamina e espermidina na forma conjugada. Os teores de aminas totais conjugadas em vinhos variaram de 0,11 a 2,26 mg/L, sendo a espermidina a amina predominante na forma conjugada. As amostras de uvas analisadas foram caracterizadas pela presença de putrescina, espermidina e espermina. Os teores de aminas livres totais em uvas variaram de 2,05 a 5,73 mg/L. As uvas viníferas da variedade Syrah apresentaram teores de aminas totais maiores que as uvas de mesa. Não foram encontradas aminas na forma conjugada nas amostras de uvas analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: aminas bioativas, aminas conjugadas, uvas, vinhos, validação.

ABSTRACT

ANALYTICAL METHODS AND QUANTIFICATION OF FREE AND CONJUGATED AMINES IN GRAPES AND WINES. The objective of this work was to validate a method for the analysis of free and conjugated amines in grapes and wines. The HPLC- ion pair method with post column derivatization with OPA and fluorimetric detection was validated for the determination of free amines in grapes and wines. The method was linear, precise and accurate for all the amines. Detection and quantification limits were appropriate for the analysis. There was significant effect of the matrices on the analysis of grape and wine. The optimum conditions for the hydrolysis of conjugated amines in wines were defined as 5 h hydrolysis at 107 °C, with 6 mol/L HCl and concentration temperature at 60 °C. It was not possible to optimize the hydrolysis of conjugated amines in grapes, since spermine was the only amine found in the hydrolysed form at trace levels (<0.4 mg/L). The samples of wines commercialized in Belo Horizonte, MG, Brazil, were characterized by the presence of putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine and phenylethylamine. The total level of amines ranged from not detected (< 0.2 mg/L) to 18.46 mg/L. Putrescine was the amine that most contributed to total amines levels. Four of the sample analyzed had histamine levels above 2 mg/L, and none had more than 8 mg/L of tyramine. Red wines contained higher levels and more types of amines. The wines also had spermidine and phenylethylamine in the conjugated form. Total levels of conjugated amines in wines ranged from 0.11 to 2.26 mg/L, spermidine was the predominant amine in conjugated form. The grapes analyzed were characterized by the presence of putrescine, spermidine and spermine. The total levels of free amines ranged from 2.05 to 5.73 mg/L. Wine grapes, from the variety Syrah presented higher levels of total amines than table grapes. Amines in the conjugated form were not found in grape samples.

KEYWORDS: bioactive amines, conjugated amines, grapes, wine, validation.

1 INTRODUÇÃO

A utilização do vinho pelo homem tem sido uma prática que data de mais de 2000 anos. Importantes civilizações do mundo ocidental como os egípcios, os gregos e os romanos, e do mundo oriental, como os hindus, utilizavam o vinho como um remédio para o corpo e para a alma (CHOCIAI et al., 2001).

Componentes presentes naturalmente no vinho, tais como os compostos fenólicos (catequina, resveratrol, quercetina, antocianina) e álcool contribuem para o efeito profilático protetor do vinho. Entre as várias propriedades medicinais atribuídas ao vinho, estão incluídas as suas ações antioxidantes, antiinflamatória e anticoagulante, resultando na redução de doenças coronarianas, de trombose (inibe a agregação de plaquetas), na diminuição do risco de câncer e no retardamento do envelhecimento celular e orgânico. O vinho, em especial o tinto, tem sido reconhecido como um alimento funcional, sendo recomendado o seu consumo moderado (YANG et al., 2001; BELLEVILLE, 2002; RUPASINGHE & CLEGG, 2007).

No Brasil, o consumo do vinho ainda é reduzido em relação a outros países (1,8 litros/habitante/ano). A produção de uvas no Brasil concentra-se nas regiões sul, sudeste e nordeste, com destaque para os estados do Rio Grande do Sul e Pernambuco (Vale do São Francisco). O Brasil não é um produtor tradicional de vinhos, sofrendo concorrência com vinhos de regiões mais tradicionais como a Europa e alguns vinhos da América Latina. Essa concorrência tem impulsionado o mercado de vinhos no Brasil. As vinícolas brasileiras têm se preocupado cada vez mais com a qualidade, diferenciação e identidade dos vinhos brasileiros (UVIBRA, 2009).

O uso de vinho pelo homem tem despertado interesse, mas também polêmica devido à presença de substâncias que promovem efeitos adversos à saúde, como as aminas biogênicas. Estas pertencem a um grupo maior, as aminas bioativas, que são bases orgânicas alifáticas, aromáticas ou heterocíclicas de baixo peso molecular, e estão presentes nas plantas na forma livre ou conjugada a moléculas de baixo peso molecular (ácidos fenólicos) ou a macromoléculas (proteínas). Algumas aminas são produzidas através do metabolismo normal de animais, plantas e microrganismos, e participam de importantes funções metabólicas e fisiológicas de organismos vivos. Outras podem ser formadas como metabólito de enzimas de microrganismos adicionados ou contaminantes. Estas correspondem, respectivamente, às poliaminas e aminas biogênicas (GLÓRIA & VIEIRA, 2007).

As poliaminas desempenham papel importante no crescimento e produtividade das uvas, enquanto as aminas biogênicas são neuro ou vasoativas. Estas últimas são importantes do ponto de vista tecnológico e toxicológico e podem, em altas concentrações, causar efeitos fisiológicos indesejáveis em indivíduos sensíveis. Em concentrações elevadas, podem ser também indicadoras de condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento e podem causar efeitos tóxicos ao homem, como o rubor facial, eritema, choque anafilático, enxaqueca e crise hipertensiva (GLÓRIA, 2005). As aminas conjugadas têm atraído atenção em diversos estudos que relatam o importante papel desses compostos no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos, no mecanismo de resistência aos insetos, nos processos de crescimento e desenvolvimento de plantas e como agentes antioxidantes (GLÓRIA & VIEIRA, 2007; SILVEIRA 2008).

O perfil de aminas no vinho sofre influência da variedade da uva, grau de maturação, condições edafoclimáticas, safra, práticas de cultivo, população microbiana e práticas enológicas, com destaque para maceração, fermentação malolática e estocagem. Uma aspiração da indústria do vinho é reduzir os teores de aminas biogênicas. Informações atualizadas estão relacionadas aos aspectos bioquímicos e fisiológicos das aminas biogênicas, sua formação e seu papel na produção de uvas e processamento de vinho, assim como maneiras de prevenir sua formação e acúmulo.

A definição do perfil de aminas em vinhos é de fundamental importância para a melhoria da qualidade e prevenção de problemas relacionados a altos teores de aminas biogênicas que podem ser observadas nesses produtos. Os teores de aminas bioativas em vinhos de diversas regiões do mundo vêm sendo definido através de pesquisas, bem como a interferência de diversos fatores da produção no teor e perfil dessas aminas (GLÓRIA & VIEIRA, 2007). São escassos os dados sobre a qualidade e o perfil e teores de aminas bioativas livres e conjugadas do vinho brasileiro.

Visando atender estas necessidades, o objetivo geral deste trabalho foi validar a análise de aminas livres e otimizar o método de hidrólise de aminas conjugadas em uvas e vinhos.

Como objetivos específicos, podem-se citar: (i) validar o método de análise de aminas livres em uvas; (ii) validar o método de análise de aminas livres em vinhos; (iii) otimizar o método de hidrólise de aminas conjugadas em uvas; (iv) otimizar o método de hidrólise de aminas conjugadas em vinhos; (v) analisar os teores de aminas livres e conjugadas em amostras de vinhos comerciais; (vi) analisar os teores de aminas livres e conjugadas em amostras de uvas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VINHOS

O vinho é definido, segundo a legislação brasileira, como uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura, sendo o mosto simples de uva o produto obtido pelo esmagamento ou prensagem desta, com a presença ou não de suas partes sólidas (BRASIL, 1988).

A utilização do vinho pelo homem é uma prática que data de mais de 2000 anos. Importantes civilizações do mundo ocidental como os egípcios, os gregos e os romanos, e do mundo oriental, como os hindus, utilizavam o vinho como um remédio para o corpo e para a alma (CHOCIAI et al., 2001).

Componentes presentes naturalmente no vinho, tais como os compostos fenólicos (catequina, resveratrol, quercetina, antocianina) e álcool contribuem para o efeito profilático protetor do vinho. Entre as várias propriedades medicinais atribuídas ao vinho, estão incluídas as suas ações antioxidantes, antiinflamatória e anticoagulante, resultando na redução de doenças coronarianas, de trombose (inibe a agregação de plaquetas), na diminuição do risco de câncer e no retardamento do envelhecimento celular e orgânico. O vinho, em especial o tinto, tem sido reconhecido como um alimento funcional, sendo recomendado o seu consumo moderado (YANG et al., 2001; BELLEVILLE, 2002; RUPASINGHE & CLEGG, 2007).

A viticultura brasileira nasceu com a chegada dos colonizadores portugueses do século XVI. Permaneceu como cultura doméstica no século XIX, tornando-se uma atividade comercial a partir do início do século XX, por iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no sul do país, a partir de 1875 (PROTAS et al., 2006).

Desde seu início até a década de 1960, a viticultura brasileira ficou restrita às regiões sul e sudeste, mantendo as características de cultura de clima temperado. A partir de então, o cultivo da uva Itália foi levado, com sucesso, para a região semi-árida do Vale do São Francisco, marcando o início da viticultura tropical no Brasil. A viticultura tropical expandiu-se rapidamente, com a consolidação do pólo do norte do Paraná, na década de 70, e dos pólos do nordeste de São Paulo e do norte de Minas Gerais, na década seguinte. A partir de 1990, surgiram diversos pólos vitícolas, alguns voltados para a produção de uvas para consumo *in natura*, outros direcionados à elaboração de vinho e suco (PROTAS et al., 2006).

No Brasil, a viticultura ocupa uma área de aproximadamente 71 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do país até regiões situadas mais próximas à linha do Equador. Em função da diversidade ambiental, existem pólos com viticultura característicos de regiões temperadas, com destaque para regiões no estado do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sudeste de São Paulo e sul de Minas Gerais; subtropicais, como a região norte do Paraná e tropicais, como as regiões nordeste de São Paulo, norte de Minas Gerais e Vale do Submédio do São Francisco (PROTAS et al., 2006).

A produção de uva brasileira é da ordem de 635 mil toneladas por ano. Deste volume, 45% são destinados ao processamento para elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, e 55% são comercializados como uva para o consumo *in natura*. Do total de produtos industrializados, 60% correspondem a vinhos de mesa e 21% suco de uva, ambos elaborados a partir de uvas de origem americana. Cerca de 10% são vinhos finos, elaborados com castas de *Vitis vinifera*; o restante (9%) dos produtos industrializados é destinado a outros produtos derivados da uva e do vinho. Grande parte da produção brasileira de uvas é destinada ao mercado interno. O principal produto de exportação, em volume, é o suco de uva, sendo cerca de 30% do total destinado ao mercado externo. Apenas 5% da produção de uvas para consumo *in natura* é destinada à exportação e menos de 1% do vinho produzido é comercializado fora do país (Tabela 1) (PROTAS et al., 2006).

TABELA 1. Produção de uvas e elaboração de vinhos no Brasil (2003 - 2008)

Produtos/anos	2003	2005	2006	2008 *
Uvas viníferas	43.367.979	70.609.245	56.596.447	83.801.966
Uvas comuns	339.744.071	422.637.749	367.039.121	550.462.367
Total uvas (em Kg)	383.112.050	493.246.994	423.635.568	634.264.333
Vinhos viníferas	23.918.885	45.496.898	32.193.976	47.334.502
Vinhos comuns	179.280.945	226.037.432	185.075.887	287.441.811
Total vinhos (em L)	203.199.830	271.534.330	217.269.863	334.776.313

Fonte: Adaptado de UVIBRA (2009).

*Dados parciais.

O mercado de vinho mundial é de, aproximadamente, 24 bilhões de litros por ano. A Europa detém 70% da produção mundial de vinhos, e também do consumo. Os principais países produtores são França e Itália, seguidos por Espanha, Estados Unidos e Argentina, sendo este o grande produtor da América do Sul, conforme pode ser observado na Tabela 2. O Brasil movimenta uma parcela reduzida desse mercado (UVIBRA, 2009).

O Brasil não é um produtor tradicional de vinhos, com uma produção pequena quando comparada à de outros países como França, Itália e Argentina. No entanto, o mercado brasileiro apresenta grande potencial de expansão, com crescimento de, aproximadamente, 12% no mercado de vinhos entre os anos de 2001 e 2007 (Tabela 2).

TABELA 2. Produção mundial de vinhos nos principais países produtores (2001-2007)

País	Produção (milhares de hectolitros)				
	2001	2002	2004	2006	2007
Itália	52.293	44.604	53.000	53.462	46.600
França	53.389	50.353	57.386	52.276	45.900
Espanha	30.500	33.478	42.988	38.173	34.700
Estados Unidos	19.200	20.300	20.109	19.621	20.000
Argentina	15.835	12.695	15.464	15.396	15.046
Alemanha	8.891	9.885	10.047	8.916	10.500
África do Sul	6.471	7.189	9.279	8.406	9.840
Portugal	7.789	6.651	7.481	7.532	5.762
Chile	5.658	5.623	6.301	8449	8.227
Brasil	2.968	3.212	3.925	2.372	3.337

Fonte: OIV (2009).

O consumo nos países tradicionalmente produtores de vinho é muitas vezes maior que o brasileiro (Tabela 3), exibindo assim o grande potencial de crescimento do mercado vinícola brasileiro. O Brasil sofre concorrência dos vinhos de regiões mais tradicionais como a Europa e de alguns vinhos da América Latina, impulsionando o mercado de vinhos no Brasil. As vinícolas brasileiras têm se preocupado cada vez mais com a qualidade, diferenciação e identidade dos vinhos brasileiros. (UVIBRA, 2009).

TABELA 3. Consumo per capita de vinhos nos principais países produtores

País	Consumo (L/pessoa/ano)			
	2002	2003	2004	2005
França	58,3	56,8	55,1	55,4
Portugal	45	51,2	47,1	46,7
Itália	47,9	50,6	48,8	46,5
Espanha	33,5	32,7	32,6	31,8
Argentina	31,8	32,5	29	28,3
Alemanha	24,6	23,9	24	24
Chile	14,6	16	15,8	16,2
Estados Unidos	7,8	8,1	8,2	8,4
África do Sul	8,3	7,4	7,4	7,3
Brasil	1,8	1,7	1,7	2

Fonte: OIV (2009).

2.1.1 VINIFICAÇÃO

O vinho começa a ser produzido no vinhedo, sendo importante o adequado manejo agrônomico e o acompanhamento da maturação de uvas, bem como o cuidado durante a colheita (AMORIM et al., 2006). A qualidade do vinho depende em grande parte da uva, do solo e da insolação, que provocam modificações no paladar, buquê e aroma. Para a colheita, fundamentalmente observa-se o estado sanitário e os critérios de maturação. Esses critérios podem ser a medida do teor de açúcar, a conjugação da medida de açúcares e ácidos ou de açúcares e pH (GUERRA, 2003a).

A vinificação formalmente inicia-se na colheita das uvas, que pode ser feita por máquinas ou manualmente. O fluxograma com os passos básicos para a obtenção de vinhos está exposto na Figura 1. Na vinícola, o primeiro passo envolve tipicamente a remoção das folhas e qualquer material estranho das uvas. A fruta é então esmagada para liberar o mosto e iniciar o processo de maceração, o qual facilita a extração dos diferentes compostos sólidos contidos nas partes sólidas das uvas. Inicialmente, a maceração é induzida pela ação de enzimas hidrolíticas liberadas a partir da ruptura das células durante o esmagamento (JACKSON, 2000; GUERRA, 2003b).

Para vinhos brancos, não ocorre a etapa de maceração. Para vinhos tintos, a maceração é prolongada e ocorre simultaneamente à fermentação alcoólica. O álcool gerado pela ação da levedura acentua a extração da antocianina e promove liberação de taninos das sementes e cascas. Após a fermentação parcial ou completa, é feita a separação do líquido permitindo que este escoe livremente sob ação da gravidade. Esta operação é denominada descuba. Após a descuba, realiza-se a prensagem do bagaço, que permite a extração de 10 a 15% de vinho retido nos interstícios das partes sólidas. O produto obtido pela prensagem pode ser incorporado ao vinho obtido livremente em proporções determinadas pelo tipo e estilo de vinho desejado (JACKSON, 2000).

A fermentação pode iniciar-se espontaneamente, devido à ação das leveduras nativas originadas das uvas ou dos equipamentos de esmagamento. Entretanto, mais comumente, o mosto é inoculado com leveduras selecionadas cujas características são conhecidas. Na vinificação do vinho tinto, a fermentação alcoólica pode ser dividida em duas fases: tumultuosa e lenta. A fermentação tumultuosa caracteriza-se pela grande atividade das leveduras, gerando elevação da temperatura e grande liberação de gás carbônico, que movimentam as partes sólidas para a superfície do recipiente. Na fase lenta, a intensidade da fermentação decresce gradativamente, devido à diminuição do

teor de açúcar e aos teores crescentes de álcool, que limitam o desenvolvimento das leveduras (GUERRA & BARNABÉ, 2005).

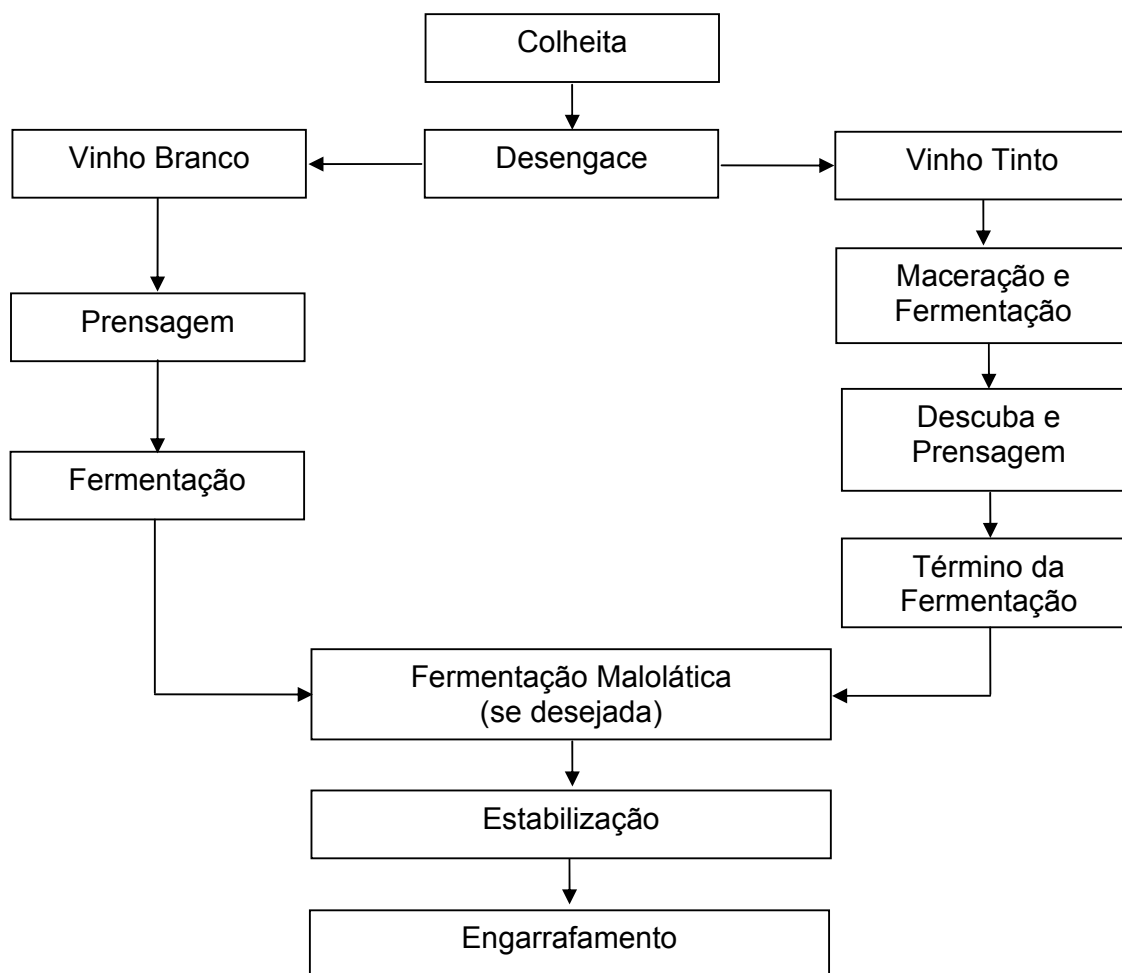


FIGURA 1. Fluxograma da produção de vinho.

Fonte: Modificado de JACKSON (2000).

A fermentação malolática é promovida pelo desenvolvimento de bactérias lácticas, que possuem a capacidade de transformar o ácido málico em ácido láctico e em outros compostos secundários, como ácido acético, ácido succínico, glicerol, manitol e outros poliálcoois, gás carbônico e outros (PEYNAUD, 1984).

As bactérias lácticas responsáveis pela fermentação malolática são geralmente dos gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. A fermentação malolática

apresenta três efeitos no vinho: i) promove a desacidificação, diminuindo a sensação ácida e a sensação de álcool; ii) provoca a modificação do aroma, removendo o aroma vegetativo/herbáceo e enriquecendo com aromas lácteos; e iii) contribui para a estabilidade microbiana, degradando o ácido málico e alguns açúcares residuais (HENICK-KLING, 1994).

Ao término da fermentação malolática, é realizada a trasfega do vinho. As trasfegas consistem na transferência do vinho de um recipiente para outro, visando separá-lo dos sólidos insolúveis que sedimentam no fundo do tanque ao final da fermentação. Podem servir também, em alguns casos, para a aeração do vinho, reequilibrando seu potencial de oxidação-redução (GUERRA & BARNABÉ, 2005).

A estabilização é a fase que sucede as fermentações alcoólica e malolática. Nesta etapa, diversos elementos originados da uva ou da autólise das leveduras são neutralizados e/ou induzidos à sedimentação via métodos químicos ou físicos (GUERRA & BARNABÉ, 2005). A clarificação consiste em retirar do vinho substâncias em suspensão. Além disso, após as fermentações ocorre a sedimentação, isto é, a autoclarificação. A clarificação do vinho pode ser melhorada pela adição de agentes clarificantes sucedida de uma filtração. Os agentes clarificantes se ligam ou absorvem os compostos a serem retirados; os mais comumente usados são bentonite, polivinilpolipirrolidona (PVPP), carvão ativado, caseína, gelatina, dióxido de silicone e clara de ovo (JACKSON, 2000).

Todo vinho produzido passa por um período de repouso, que tem por objetivo obter o ponto máximo qualitativo por meio da lenta oxidação, provocando alterações de cor, aroma e gosto das frutas para o vinho. O período varia de um vinho para outro, mesmo dentro de uma mesma categoria (AMORIM et al., 2006).

O armazenamento deve ocorrer em ambiente seco com temperatura amena e o mais uniforme possível. Durante o armazenamento, o vinho sofre muitas alterações químicas entre os seus diversos componentes, as quais são bastante complexas, promovendo uma sensível melhoria da qualidade do vinho. Normalmente, vinhos com muito corpo, necessitam de alguns anos para adquirir todo o seu buquê, máxima maturidade e melhor aspecto visual (AMORIM et al., 2006).

Os vinhos são comumente resfriados e filtrados para acentuar a clarificação e estabilidade. No engarrafamento, é adicionada uma pequena dose de dióxido de enxofre ao vinho para limitar oxidação e deterioração microbiana. A sulfitagem dos vinhos tintos deve atingir valores de SO₂ livre em torno de 30 mg/L e dos vinhos brancos, em torno de 40 mg/L (GUERRA & BARNABÉ, 2005).

2.1.2 COMPOSIÇÃO DO VINHO

O vinho é composto por água, açúcares, álcoois, ácidos, compostos fenólicos, substâncias nitrogenadas e outras substâncias (Tabela 4).

A água é o maior componente do vinho, contribuindo com cerca de 85 a 90% de seu volume. O álcool constituinte do vinho é basicamente o etílico e o segundo mais importante componente, representando, em volume, cerca de 7 a 15% do vinho (MACHADO & MINATTI, 2008).

Os ácidos contidos no vinho podem ser provenientes da uva (tartárico, málico e cítrico) ou da fermentação (succínico, láctico, acético, butírico, fórmico, propiônico e carbônico). A natureza e a concentração dos ácidos formados estão relacionadas com as diferentes técnicas de elaboração (MACHADO & MINATTI, 2008).

TABELA 4. Composição química dos vinhos

Componentes do vinho tinto	Intervalos e valores médios dos parâmetros
Água (%)	85 – 90
Álcool (% de etanol) a 20 °C	7 – 15
Ácidos (%)	1 – 8
tartárico	50-90
málico	10-40
cítrico	0-5
Acidez volátil (meq/L) (acético, butírico, fórmico, propiônico, carbônico)	20
Açúcares (g/L)	
secos	< 5
meio secos	5 a 20
suaves e doces	> 20
Cloretos totais (g/L cloreto de sódio)	0,2
Cinzas (g/L)	1,5
Fenóis (mg/L)	
brancos	< 350
tintos	3.000
Compostos nitrogenados (mg/L N ₂ total)	184 a 685

Fonte: MACHADO & MINATTI (2008); DAUDT et al. (2002).

Os compostos fenólicos possuem uma grande importância em enologia, pois atuam direta e indiretamente na qualidade dos vinhos. Essas substâncias são constituídas de cinco grupos químicos: antocianinas, flavonas, fenóis-ácidos, taninos condensados e taninos catéquicos. Elas conferem aos vinhos a coloração e grande

parte do sabor (CHEYNIER et al., 1994). Muitas pesquisas têm sido realizadas avaliando-se os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos presentes no vinho (MALACRIDA & MOTTA, 2005).

Os compostos nitrogenados em vinhos estão presentes na forma inorgânica, como amônia e nitratos, e em diversas formas orgânicas, incluindo, aminas, amidas, aminoácidos, pirazinas, bases nitrogenadas, pirimidinas, proteínas e ácidos nucleicos.

Os aminoácidos apresentam grande importância no sabor do vinho, além de serem precursores de diversos outros compostos, como, por exemplo, as aminas bioativas. A formação das aminas depende de diversas variáveis às quais o vinho pode ser submetido, como pH, temperatura, concentração de dióxido de carbono, exposição ao oxigênio e tempo de envelhecimento. Por isso, o controle das condições de processamento, bem como um entendimento dos caminhos metabólicos ocorrentes no processo da fabricação do vinho são extremamente importantes, pois um descontrole levaria à perda de qualidade da bebida (JACKSON, 2000; GLÓRIA & VIEIRA, 2007; MACHADO & MINATTI, 2008).

2.2 AMINAS BIOATIVAS

2.2.1 DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA

Aminas bioativas são bases orgânicas alifáticas, aromáticas ou heterocíclicas de baixo peso molecular, produzidas por meio do metabolismo normal de animais, plantas e microrganismos, que participam de importantes funções metabólicas e fisiológicas de organismos vivos. Elas estão presentes nas plantas na forma livre ou conjugada a moléculas e baixo peso molecular (ácidos fenólicos) ou a macromoléculas (proteínas). A maioria das aminas foi nomeada de acordo com o seu aminoácido precursor, como por exemplo, a histamina, que é originada da histidina, a tiramina da tirosina, a triptamina do triptofano, e assim por diante. No entanto, os nomes cadaverina e putrescina estão associados à decomposição e putrefação, assim como espermina e espermidina com fluidos seminais onde elas foram encontradas pela primeira vez (HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2005; GLÓRIA & VIEIRA, 2007). Na Figura 2 pode-se observar a estrutura química das principais aminas listadas acima.

As aminas bioativas podem ser classificadas com base no número de grupos aminas, estrutura química, biosíntese ou função fisiológica. A classificação mais

amplamente usada divide as amins em poliaminas e amins biogênicas. As poliaminas desempenham papel importante no crescimento, enquanto as amins biogênicas são neuro ou vasoativas (BARDÓCZ, 1995; GLÓRIA, 2005).

Um resumo da importância fisiológica das amins bioativas está descrito na Tabela 5. As poliaminas espermina e espermidina são componentes indispensáveis de todas as células vivas. Essas possuem várias interações eletrostáticas com macromoléculas, especialmente DNA (ácido desoxirribonucléico), RNA (ácido ribonucléico) e proteínas, e estão envolvidas na regulação e estimulação de suas sínteses. Estimulam a diferenciação celular, interagindo e moldando vários sistemas intracelulares. São importantes na permeabilidade e estabilidade das membranas celulares e reduzem a permeabilidade da mucosa a macromoléculas e proteínas alergênicas, prevenindo alergias alimentares (BARDÓCZ, 1995; DROLET et al., 1986; LÖSER 2000). De acordo com DROLET et al. (1986) e BARDÓCZ (1995), a espermina e espermidina, assim como as diaminas putrescina e cadaverina, são eficientes sequestradoras de radicais livres em numerosos sistemas enzimáticos, químicos e *in vitro*; podem inibir peroxidação de lipídeos e prevenir a senescência.

Em plantas de grande porte, as poliaminas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, incluindo morfogênese, enraizamento, floração e senescência (SHIOZAKI et al., 2000). As poliaminas podem ser usadas como fonte de nitrogênio orgânico e desempenhar um papel crítico em diversos processos, entre eles, crescimento da raiz, controle do pH intracelular, desenvolvimento de flor e fruto e resposta ao estresse abiótico, como por exemplo, deficiência de potássio, choque osmótico, estiagem e infecção patogênica. Poliaminas são também importantes na síntese de metabólitos secundários de interesse biológico, como por exemplo, nicotina e alcalóides (FLORES et al., 1989; WALTERS, 2003). Estão associadas com a parede celular e membranas; regulam a pectinesterase e a ligação com pectina, atrasando o amolecimento do fruto e seu envelhecimento (LEITING & WICKER, 1997). O efeito firmador das poliaminas é similar ao do cloreto de cálcio e pode estar relacionado à sua habilidade de ligação entre a parede celular e membranas, estabilizando-as, ou por tornar a parede celular menos acessível a enzimas responsáveis pelo amadurecimento (BOUCHEREAU et al., 1999).

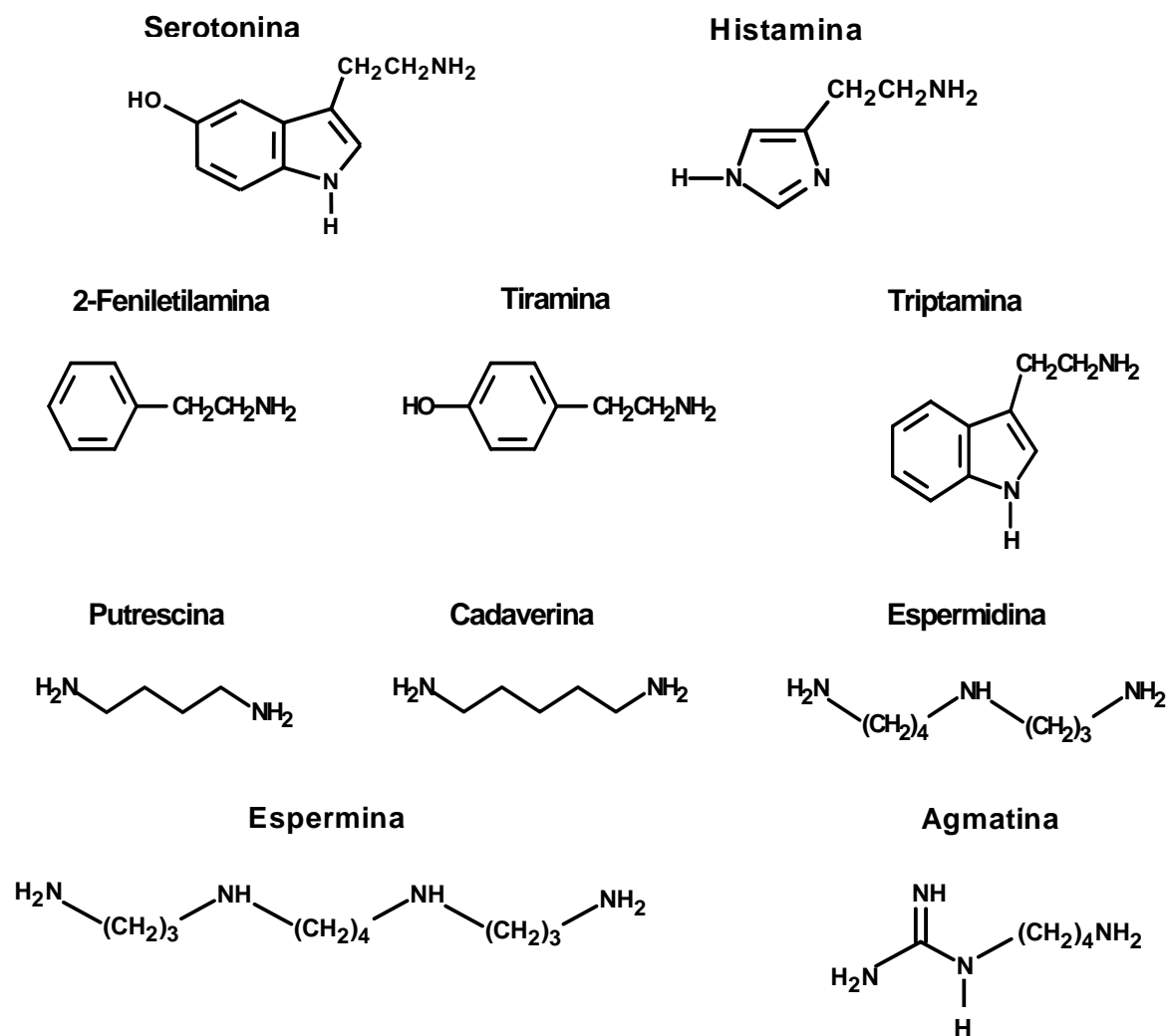


FIGURA 2. Estrutura química de algumas aminas.

As aminas biogênicas são neuro ou vasoativas. As aminas neuroativas, como a histamina e serotonina, afetam o sistema nervoso pela atuação na transmissão neural no sistema nervoso central. As aminas vasoativas atuam direta ou indiretamente no sistema vascular. Aminas vasoconstritoras – tiramina, triptamina e feniletilamina – causam aumento na pressão sanguínea pela constrição do sistema vascular e aumentam a frequência cardíaca e força de contração do coração. A histamina é um forte dilatador capilar e pode produzir efeitos hipotensivos. Ela também media, de maneira primária e imediata, sintomas em respostas alérgicas. A serotonina é um vaso e broncoconstritor, está envolvida na regulação de inúmeras funções importantes, incluindo sono, sede, fome, humor e atividade sexual (GLÓRIA, 2005).

Algumas aminas biogênicas podem ter papel protetor contra predadores intimidadores. Outras aminas são muito importantes como precursoras de

componentes biológicos importantes; por exemplo, o hormônio de plantas, ácido indol-3-acético, e o ácido fenilacético são derivados da triptamina e feniletilamina, respectivamente (COUTTS, 1986).

TABELA 5. Funções metabólicas e fisiológicas das aminas bioativas

Aminas Bioativas	Funções
Espermidina Espermina	<ul style="list-style-type: none"> - Regulação e estimulação da síntese de DNA, RNA e proteínas - Estimulação da diferenciação celular - Permeabilidade e estabilidade das membranas celulares - Recicladores de radicais livres - Manutenção da alta atividade metabólica de um intestino saudável funcionando normalmente - Redução da permeabilidade da mucosa a macromoléculas e prevenção de alergias alimentares - Processos fisiológicos em plantas superiores: crescimento da raiz, embriogênese somática, controle do pH intracelular, desenvolvimento da flor e fruto, resposta a estresse abiótico, síntese de metabolitos secundários, senescência, resposta da planta a patógenos
Putrescina Cadaverina	<ul style="list-style-type: none"> - Recicladores de radicais livres
Histamina	<ul style="list-style-type: none"> - Forte dilatador capilar - Efeito hipotensivo - Psicoativa - Efeito protetor em predadores intimidadores
Serotonina	<ul style="list-style-type: none"> - Vaso e broncoconstritor - Neurotransmissor - Efeito protetor em predadores intimidadores
Tiramina Triptamina Feniletilamina	<ul style="list-style-type: none"> - Aminas vasoconstritoras - Precursoras de compostos com significância biológica

Fonte: GLÓRIA & VIEIRA (2007).

2.2.2 SÍNTESE, METABOLISMO E SIGNIFICÂNCIA TOXICOLÓGICA

As aminas biogênicas podem ser formadas por hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos (Figura 3), sendo a última a principal via de formação (MAIJALA et al., 1993; BARDÓCZ, 1995).

A síntese das aminas biogênicas, histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina e cadaverina; ocorre por meio da descarboxilação dos aminoácidos precursores histidina,

tirosina, triptofano, fenilalanina e lisina, respectivamente (Figura 4). Na síntese da serotonina, o triptofano é transformado pela enzima triptofano hidrolase em 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado pela enzima aminoácido aromático descarboxilase em 5-hidroxitriptamina ou serotonina. A tirosina é o precursor de aminas fenólicas como octopamina e dopamina (GLÓRIA, 2005).

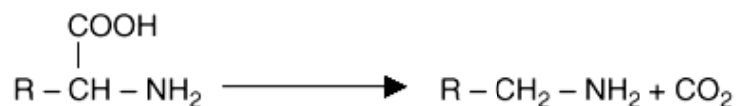


FIGURA 3. Formação de aminas por descarboxilação de aminoácido.
Fonte: GLÓRIA (2005).

A descarboxilação de aminoácidos pode ser resultado de altas temperaturas ou ação de enzimas microbianas. Microrganismos descarboxilase positivos podem ser parte constituinte da população microbiana ou ser introduzidos por contaminação antes, durante ou após o processamento. Os pré-requisitos para formação de aminas são a disponibilidade de aminoácidos livres, altas temperaturas de processamento, presença de microrganismos descarboxilase positivos e condições favoráveis para o crescimento microbiano e atividade descarboxilante. Aminoácidos livres ocorrem em alimentos, mas também podem ser liberados de proteínas como resultado de alguma atividade proteolítica ou degradação térmica (HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2005).

A produção de aminas por bactérias é influenciada pelo pH, temperatura, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e cofatores, disponibilidade de aminoácidos livres e açúcares fermentáveis. Em pH de 2,5 a 6,5 a produção de aminas por bactérias é estimulada como proteção contra a acidez do meio (LUCAS et al., 2003; GONZÁLEZ-MARCO & ANCÍN-AZPILICUETA, 2006b). A atividade descarboxilante depende da fase de crescimento dos microrganismos, sendo maior na fase estacionária. Com relação à temperatura, decarboxilases são mais ativas em temperaturas menores que 30 °C e não têm ação acima de 40 °C. No entanto, em temperaturas de 0 a 10 °C, a atividade dependerá do microrganismo presente (HALÁSZ et al., 1994).

A síntese de poliaminas é um processo mais complexo, apesar dos primeiros passos também incluírem reação de descarboxilação (Figura 4). Em plantas e alguns microrganismos, o primeiro passo envolve a descarboxilação da ornitina à putrescina pela ornitina descarboxilase. Uma via alternativa para a produção de putrescina é pela

arginina via agmatina pela arginina descarboxilase e pela citrulina. A putrescina é obrigatoriamente um intermediário na síntese de poliaminas (FLORES et al., 1989; BARDÓCZ, 1995; WALTERS, 2003; GLÓRIA, 2005).

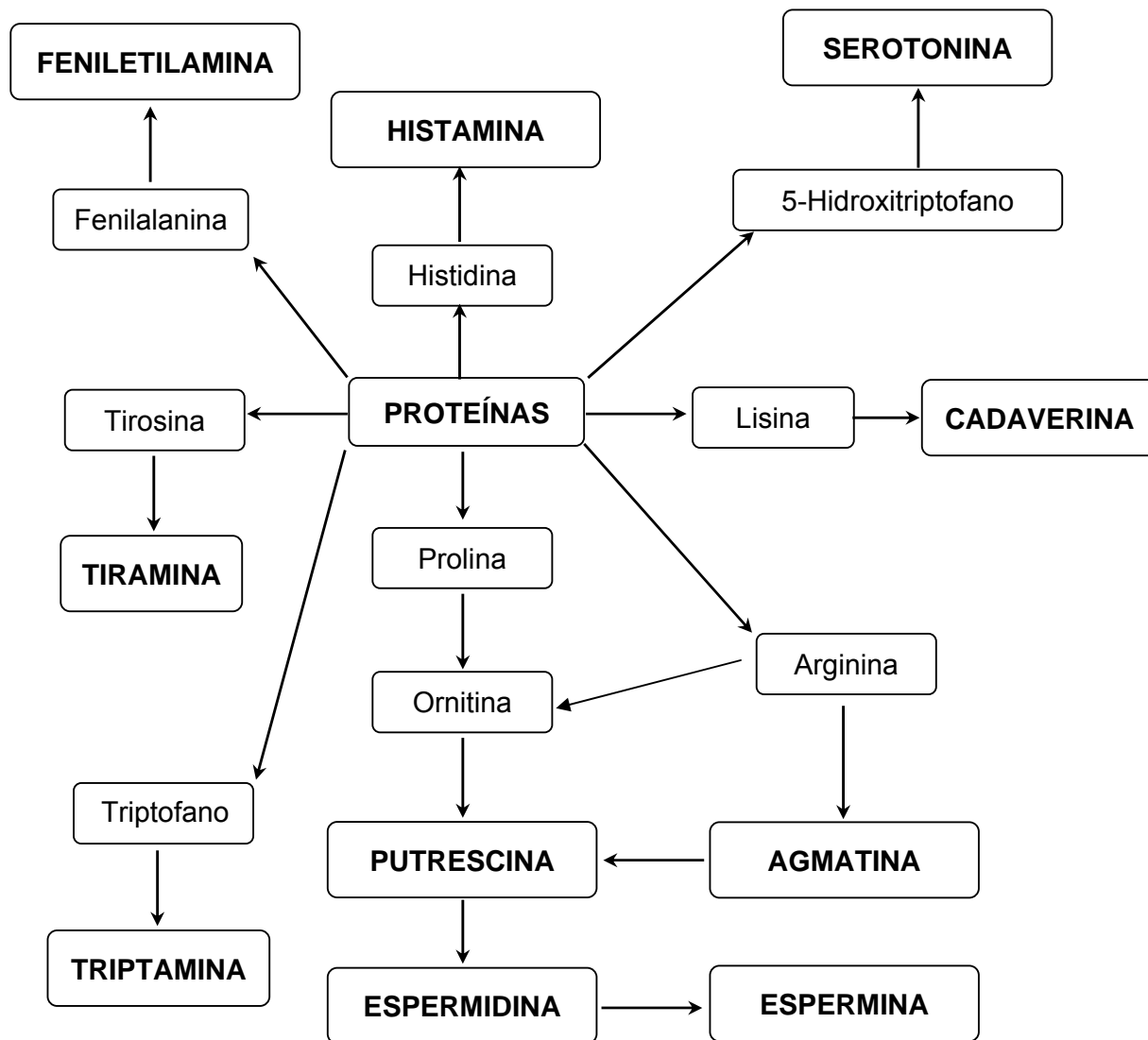


FIGURA 4. Vias metabólicas para formação de aminas bioativas.
 Fonte: SILVA (2008).

Na síntese da espermidina, um grupo aminopropil derivado da metionina é adicionado à putrescina, via S-adenosilmetionina (SAM), e este mesmo grupo é adicionado à espermidina para formar a espermina. As enzimas espermidina e espermina sintases e SAM descarboxilase participam destas reações (FLORES et al., 1989; WALTERS, 2003).

Indivíduos saudáveis podem metabolizar aminas presentes nos alimentos por acetilação e oxidação (Figura 5). Aminas biogênicas são oxidadas pelas monoaminooxidases (MAO) e diaminoxidases (DAO). Poliaminas em geral são primeiramente acetiladas e depois oxidadas pelas poliaminoxidases (PAO) (GLÓRIA, 2005).

Baixos níveis de aminas biogênicas em vinhos e alimentos geralmente não representam problemas de saúde para os indivíduos. No entanto, esses problemas podem ocorrer, caso uma quantidade excessiva seja ingerida, os mecanismos naturais para o catabolismo das aminas sejam geneticamente deficientes ou prejudicados por alguma doença ou ação de fármacos. Indivíduos com problemas respiratórios ou coronarianos, hipertensão, com deficiência em vitaminas B₁₂ e com problemas gastrintestinais (gastrite, síndrome do intestino irritado, doença de Crohn, úlcera de estômago) são um grupo de risco, uma vez que a atividade das aminooxidases em seus intestinos é geralmente menor do que em indivíduos saudáveis. Pacientes tomando medicamentos que são inibidores da MAO, DAO e PAO podem também ser afetados, pelo fato dessas drogas impedirem o catabolismo de aminas (Figura 5). Os inibidores de MAO e DAO são usados no tratamento de estresse, depressão, doença de Alzheimer e Parkinson, tuberculose, malária, síndrome do pânico e fobia social (FUZIKAWA et al., 1999; GLÓRIA, 2005).

Segundo BAUZA et al. (1995), o etanol também pode atuar como inibidor da MAO, intervindo no metabolismo das catecolaminas, tiramina e feniletilamina. As aminas putrescina e cadaverina também podem potencializar o efeito tóxico da histamina, por inibir as enzimas DAO, aumentando o seu transporte através da parede gastrintestinal (TAYLOR, 1986; BAUZA et al. 1995).

Altos níveis de aminas biogênicas estão relacionados a numerosos episódios de intoxicação (Tabela 6), particularmente por histamina e tiramina. A intoxicação por histamina se manifesta de poucos minutos a várias horas após a ingestão do alimento contendo esta amina. Primeiramente, um rubor facial e no pescoço é observado, acompanhado por uma sensação de calor, gosto metálico e desconforto. Frequentemente, observa-se uma intensa e pulsante dor de cabeça. Outros sintomas podem ser palpitações cardíacas, tontura e fraqueza, sede, inchaço dos lábios, urticária, pulsação rápida e fraca e distúrbios gastrointestinais. No entanto, os sintomas mais comuns são urticária, diarreia e dor de cabeça. Em casos severos, bronco espasmos, sufocação e respiração difícil são reportados. A recuperação, em

geral, ocorre 8 h após a ingestão (TAYLOR, 1986; SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005; LANDETE et al., 2007).

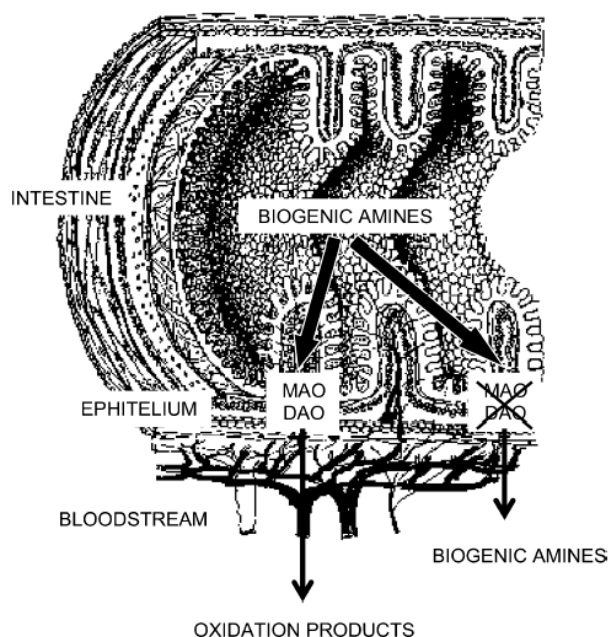


FIGURA 5. Esquema da absorção das aminas biogênicas pelo intestino em condições normais e na ausência das enzimas oxidases.

Fonte: ANCÍN-AZPILICUETA et al. (2008).

A tiramina é outra amina envolvida em intoxicação. Quando alimentos contendo tiramina em altos níveis são ingeridos, uma grande quantidade desta amina não metabolizada pode atingir a corrente sanguínea. Este fato leva à liberação de noradrenalina pelo sistema nervoso simpático, acarretando em uma variedade de reações fisiológicas (Tabela 6). Ocorre um aumento na pressão sanguínea pela vasoconstrição periférica e aumento da potência cardíaca. A tiramina pode também dilatar as pupilas, causando lacrimação, promover salivação, febre, vômito, dor de cabeça e aumento na taxa de respiração e teor de açúcar no sangue. Quando do consumo de alimentos ricos em tiramina, aproximadamente 30% dos indivíduos com enxaqueca clássica podem ter crise (GLÓRIA & VIEIRA, 2007).

TABELA 6. Efeitos tóxicos das aminas bioativas

Efeitos tóxicos	Aminas envolvidas	Sintomas
Intoxicação Histamínica	Histamina (efeito tóxico potencializado pela putrescina, cadaverina, espermina, triptamina, tiramina, feniletilanina e álcool)	Gastrintestinal: náusea, vômito, diarreia, cólica abdominal Neurológico: dor de cabeça pulsante, palpitação, rubor facial e no pescoço, coceira, pulsação rápida e fraca, tontura, fraqueza e formigamento Hemodinâmico: hipotensão, dilatação capilar Cutâneo: erupção, urticária, edema, inflamação localizada Casos severos: bronco espasmos, sufocação, respiração difícil
Intoxicação por Tiramina	Tiramina	Dor de cabeça, febre, aumento na pressão sanguínea, vômito, transpiração, dilatação da pálpebra e pupilas, salivação, lacrimação, respiração aumentada, palpitação e dispnéia
Reação com queijo ou crise hipertensiva (associada a pacientes medicados com MAOI ¹)	Tiramina Feniletilamina	Crise hipertensiva, dor de cabeça severa, hemorragia cerebral, deficiência cardíaca, edema pulmonar, alterações na visão, palpitação, náusea, sudação, vômito, contração muscular, excitação, confusão mental, pressão sanguínea alta, febre e transpiração
Enxaqueca	Tiramina Feniletilamina Triptamina Serotonina	Dor de cabeça pulsante e ataque de enxaqueca

¹ MAOI – inibidor da monoaminoxidase.

Fonte: GLÓRIA (2005).

A ingestão de alimentos ricos em tiramina por indivíduos sob ação de drogas inibidoras da monoaminoxidase pode resultar em crises de hipertensão. Vários casos foram reportados pela ingestão de queijos e bebidas alcoólicas. Os ataques duram de 10 minutos a 6 horas, durante os quais quadros de hipertensão e dor de cabeça variam. Podem ocorrer também alterações visuais, vômitos, contração muscular, confusão mental ou excitação. Dores no peito simulando angina pectorial, falha coronariana grave, edema pulmonar e hemorragia cerebral já foram também descritos. Incidentes fatais foram reportados na literatura (SHALABY, 1996; GLÓRIA & VIEIRA, 2007).

A triptamina possui ação farmacológica similar à tiramina. Altos níveis podem exercer efeitos diretos na musculatura lisa, causar dor de cabeça e aumentar a pressão sanguínea pela constrição do sistema vascular. Feniletilamina, assim como tiramina, causam um aumento na pressão sanguínea pela liberação de noradrenalina do tecido, podendo ser o causador de enxaqueca. Putrescina e cadaverina têm menor atividade farmacológica do que as aminas aromáticas; no entanto, podem potencializar o efeito tóxico da histamina, tiramina e feniletilamina (GLÓRIA, 2005).

A determinação da toxicidade das aminas biogênicas é uma tarefa difícil que depende da eficiência dos mecanismos de detoxificação dos diferentes indivíduos (KALAC & GLÓRIA, 2009). Limites máximos de 10 mg de histamina, 10 mg de tiramina e 3 mg de feniletilamina em 100 g de alimentos foram sugeridos (HALÁSZ et al., 1994). No entanto, a ingestão de alimentos contendo 6 mg/100 g de tiramina pode causar enxaqueca e de 10 a 25 mg/100 g pode levar a crises hipertensivas em indivíduos tomando medicamentos inibidores da MAO (FUZIKAWA et al., 1999).

Problemas de saúde relacionados à ingestão de vinhos foram relatados principalmente quanto à presença de histamina, tiramina e feniletilamina (LEHTONEN, 1996). Uma sensibilidade seletiva a vinhos tintos foi demonstrada em pacientes com enxaqueca e dor de cabeça tensa (GOLDBERG & CONFINO-COHEN, 2005; HOLZHAMMER & WÖBER, 2006).

Como a toxicidade das aminas biogênicas pode ser potencializada pela presença de etanol, acetaldeído e outras aminas, níveis de histamina acima 2 mg/L e de tiramina acima de 8 mg/L podem causar dor de cabeça quando uma grande quantidade de vinho é ingerida (TAYLOR, 1986; LEHTONEN, 1996; SOUFLEROS et al., 1998). Portanto, o conteúdo de aminas em vinhos poderá ser definido no futuro conforme a regulamentação adotada pelo FDA para peixes. Este fato demonstra a importância de se obterem dados dos teores de aminas em vinhos brasileiros, bem como observar a influência do processamento realizado no Brasil nestas aminas. Alguns países têm estabelecido limites para histamina em vinhos; a Suíça recomenda como nível máximo 10 mg/L, Alemanha 2 mg/L e França 8 mg/L (GLÓRIA & VIEIRA, 2007).

2.2.3 AMINAS CONJUGADAS

As aminas também estão presentes nas plantas na forma conjugada a moléculas de baixo peso molecular (ácidos fenólicos) ou a macromoléculas (proteínas) (RODRIGUEZ et al., 2000; FONTANIELLA et al., 2001; FONTANIELLA et al., 2003). A conjugação dos ácidos fenólicos consiste em uma ligação covalente entre o grupo amina e o grupo carboxílico dos ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos *p*-cumárico, ferúlico e caféico (FONTANIELLA et al., 2001). O resultado dessa conjugação é conhecido como amida de ácidos hidroxicinâmicos (HCAAs) (WALTERS, 2003). Na Figura 6 são apresentadas as estruturas de algumas amidas de ácidos hidroxicinâmicos.

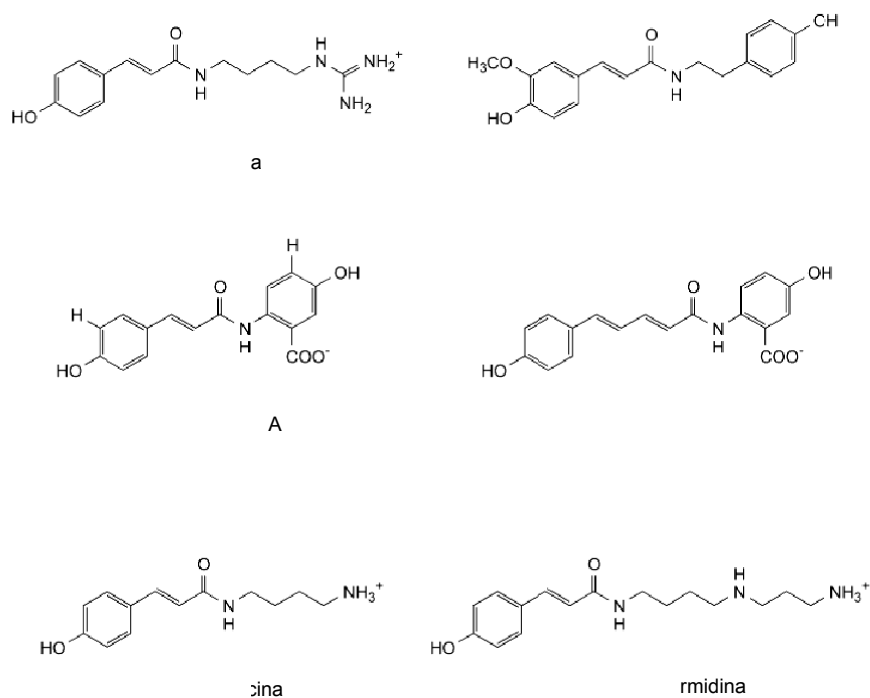


FIGURA 6. Estruturas de algumas amidas de ácido hidroxicinâmico.
Fonte: KRISTENSEN et al. (2004).

As poliaminas estão mais comumente conjugadas com ácidos hidroxicinâmicos, no entanto, outras aminas têm sido encontradas na forma conjugada, como a tiramina, cadaverina, serotonina, octopamina, triptamina, dopamina e noradrenalina (CASAL et al., 2004; KING & CALHOUN, 2005; KANG & BACK, 2006; LY et al., 2008). A proporção relativa entre as formas livre e conjugada pode variar de forma significativa

entre as diferentes espécies de plantas. No tabaco, por exemplo, mais de 90% da poliamina está na forma conjugada (BAGNI & TASSONI, 2001).

Amidas de ácidos hidroxicinâmicos básicas são constituídas tipicamente por aminas alifáticas, como a putrescina, espermidina e espermina, as quais são hidrossolúveis, enquanto as amidas de ácidos hidroxicinâmicos neutras, aquelas constituídas por aminas aromáticas, como a tiramina, octopamina e triptamina, são insolúveis em água (WALTERS, 2003). As poliaminas conjugadas solúveis em ácido parecem estar conjugadas com pequenas moléculas, como açúcares, fenóis e aminoácidos. Já as insolúveis em ácido estão associadas usualmente com macromoléculas (ARMAS et al., 1999).

2.2.3.1 Formação

As poliaminas são conjugadas por meio da formação de uma ligação amida, usando ésteres de coenzima A (CoA), os quais fornecem o grupo carboxil ativado. A putrescina e a espermidina são conjugadas por distintas transferases, que diferem em sua especificidade para os derivados hidroxicinamoil-CoA. Assim, a enzima putrescina hidroxicinamoil transferase catalisa a transferência de ácidos hidroxicinâmicos entre a CoA e a putrescina. Portanto, a reação entre cafeoil-CoA e a putrescina produz uma amida do ácido hidroxicinâmico denominada cafeoilputrescina (WALTERS, 2003). Segundo BAGNI & TASSONI (2001), as poliaminas também podem se ligar a alguns componentes da parede celular, como a hemicelulose e a lignina. A biossíntese de amidas de ácidos hidroxicinâmicos é frequentemente induzida por estresse e estas se acumulam nas raízes, tubérculos, caules, folhas e órgãos reprodutivos, podendo ser metabolizadas por peroxidases (KRISTENSEN et al., 2004).

As aminas aromáticas como a tiramina, triptamina, serotonina e dopamina são conjugadas aos ácidos hidroxicinâmicos por meio de condensação com a hidroxicinamoil-CoA tioéster, que podem ser cinamoil-CoA, p-cumaroil-CoA, cafeoil-CoA, feruloil-CoA e sinapoil-CoA. A biossíntese da tiramina conjugada é catalizada pela enzima tiramina-N-hidroxicinamoiltransferase e a conjugação da serotonina é catalizada pela enzima serotonina-N-hidroxicinamoiltransferase (KANG et al., 2006).

2.2.3.2 Relevância fisiológica

Muitos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de elucidar as funções das aminas conjugadas, no entanto estas ainda não estão totalmente claras. Aminas

conjugadas são vastamente relacionadas em uma variedade de processos de crescimento e desenvolvimento de plantas. Mais recentemente, amidas de ácido hidroxicinâmico têm atraído renovada atenção com diversos estudos sugerindo um importante papel para estes compostos no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos (SEN et al., 1994; MARTIN-TANGUY, 1997; FACCHINI et al., 2002; WALTERS, 2003). As amidas conjugadas têm sido descritas como fitolexinas, que são sintetizadas por plantas superiores em resposta a infecções por vírus e fungos (FONTANIELLA et al., 2003). Segundo SEN et al. (1994), as poliaminas conjugadas aos ácidos fenólicos fortalecem a parede celular de alguns cereais, contribuindo com o mecanismo de resistência aos insetos.

YINGYONGNARONGKUL et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de aminas conjugadas frente a cepas de *Staphylococcus aureus* metilina e vancomicina resistentes. A dihidrocafeoilputrescina e seus análogos apresentaram atividade antimicrobiana maior que antibióticos vancina e oxacilina frente às cepas testadas.

A capacidade das aminas conjugadas em inibir a produção de aflatoxina pelo *Aspergillus flavus* foi testada por MELLON & MOREAU (2004). Os autores investigaram uma mistura de diferuloilputrescina e p-cumaroilferuloilputrescina e evidenciaram um nível de inibição de 93% da produção de aflatoxina, porém estes compostos não inibiram o crescimento dos fungos.

Alguns autores têm reportado as aminas conjugadas como uma importante classe de compostos antioxidantes e agentes quimioterápicos (NAGATSU et al., 2000; PARK & SCHOENE, 2002). SON & LEWIS (2002) avaliaram a capacidade das amidas do ácido caféico em seqüestrar radicais livres e sua atividade antioxidante e concluíram que a atividade desse composto está relacionada à sua estrutura. As formas conjugadas do ácido caféico, como cafeoilfeniletilamina, cafeoiltiramina e cafeoldopamina, apresentaram maior atividade antioxidante. A atividade antioxidante das poliaminas conjugadas também foi estudada por CHOI et al. (2007). Os compostos *N*-dicumaroilputrescina, *N,N*-diferuloilputrescina e *p*-cumaroil-*N*-feruloilputrescina apresentaram elevada atividade antioxidante, além de uma forte atividade antimelanogênica, sugerindo que tais compostos pudessem ser utilizados como agentes antioxidantes naturais e agente protetores da pele. OKOMBI et al. (2006) avaliaram a atividade de algumas aminas conjugadas sobre os melanócitos humanos e demonstraram que a *trans-N*-cafeoiltiramina, *N*-dihidrocafeoiltiramina e *trans*-

N-dihidro-*p*-hidroxicinamoiltiramina apresentaram maior capacidade de inibição da formação de melanina.

O efeito anticolesterolêmico de algumas aminas também tem sido avaliado. LEE et al. (2004) concluíram que as aminas conjugadas possuem atividade antiaterosclerótica com forte inibição da oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade), inibição do acúmulo de colesterol celular e rearranjo das partículas de HDL (lipoproteína de alta densidade). KOYAMA et al. (2006) reportaram o efeito atenuante de *p*-cumaroilserotonina e feruloilserotonina no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em ratos.

2.2.3.3 Métodos analíticos

Para a análise das aminas conjugadas, as matrizes são submetidas a uma hidrólise ácida, após a etapa de extração das mesmas. Para mosto de uvas e vinhos não são realizadas etapas de extração, uma vez que estas se mostraram desnecessárias e ineficientes na análise de aminas em vinhos (SABAINI et al., 2009). Estudos foram realizados utilizando-se diferentes parâmetros de hidrólise para determinação de aminas conjugadas em diversas matrizes, conforme detalhado na Tabela 7.

TABELA 7. Parâmetros da hidrólise utilizados em diferentes estudos para análise de aminas conjugadas

Referência	Matriz	Concentração HCL (mol/L)	Tempo de hidrólise (h)	Temperatura (°C)	
				Hidrólise	Concentração
TIBURCIO et al.(1985)	pecíolos de plantas de tabaco	12	16-18	110	70
ESCRIBANO & LEGAZ (1988)	líquen	12	18	110	70
ARMAS et al. (1999)	cana de açúcar	12	18	25	40
SHIOZAKI et al. (2000)	flores e bagas de uvas	12	18	110	60
LIANG & LUR (2002)	grão de milho	12	24	110	80
GENY et al. (2003)	uvas	6	10	100	40
CASAL et al. (2004)	café	12	18	110	50

FONTANIELLA et al. (2001) otimizaram a análise de aminas conjugadas em líquen. Foram estudados os ácidos fórmico, acético e clorídrico, variando-se a temperatura e o tempo de hidrólise. O ácido clorídrico apresentou os melhores

resultados e a hidrólise foi mais eficiente quando realizada à temperatura ambiente, ao contrário das altas temperaturas, recomendadas por outros autores.

Tendo em vista as diferentes condições de hidrólise disponíveis na literatura, estudos são necessários para otimização dos parâmetros de análise para determinação de aminas conjugadas em mostos de uva e vinhos.

2.3 AMINAS BIOATIVAS EM VINHOS

Os vinhos, assim como outros alimentos fermentados, são o substrato ideal para a produção de aminas bioativas. Altos teores destas, além de tornar o produto inadequado ao consumo, devido a efeitos toxicológicos, podem afetar significativamente o sabor e aroma. Além disso, podem representar barreiras em transações comerciais (KALAC & GLÓRIA, 2009).

Algumas aminas são constituintes normais de uvas, com quantidades dependentes da variedade da uva, grau de maturação, assim como tipos e composição do solo, práticas de cultivo e condições climáticas (GLÓRIA & VIEIRA, 2007). O conteúdo total de aminas em vinhos varia de quantidades traço até 130 mg/L, dentre essas substâncias, a putrescina é normalmente a mais abundante (SOUFLEROS et al., 1998; ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2008).

Diversas pesquisas têm sido realizadas para avaliar os teores de aminas bioativas em vinhos em todo o mundo. No entanto, existem poucos dados sobre esses teores em vinhos brasileiros. Estudos exibem uma grande variabilidade de tipos e teores de aminas em diferentes vinhos, conforme pode ser visualizado na Tabela 8 (MARQUES et al., 2008; GLÓRIA & VIEIRA, 2007; KALAC & GLÓRIA, 2009).

A histamina foi primeiramente detectada em vinhos em 1954, e os primeiros dados sobre seu teor estavam disponíveis em 1965. Nos anos 80, o maior interesse era na presença e nos teores de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina, devido aos aspectos tecnológicos e toxicológicos associados a esses compostos (ZEE et al., 1983; BROQUEDIS et al., 1989; VIDAL-CAROU et al., 1989ab; VIDAL-CAROU et al., 1990ab). Recentemente, outros tipos de aminas começaram a atrair atenção, entre elas a espermidina, triptamina, feniletilamina (MO DUGO et al., 2006; MILLÁN et al., 2007; SOUFLEROS et al., 2007), agmatina e serotonina (GLÓRIA et al., 1998; SOUZA et al., 2005; YILDIRIM et al., 2007).

A grande variabilidade no conteúdo de amins em vinhos é fonte de preocupação em diversos países, assim como os efeitos adversos que as amins podem gerar em pessoas que são particularmente sensíveis à sua ação. Os parâmetros que influenciam a formação das amins biogênicas devem ser estudados, possibilitando melhor controle no processo de vinificação e estabelecimento, no futuro, de limites com relação ao conteúdo dessas substâncias em vinhos (ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2008).

TABELA 8. Tipos e teores de amins bioativas em vinhos

Vinho	Referência	Intervalo e valores médios dos teores de amins (mg/L)						
		EPD	EPM	PUT	CAD	HIM	TIM	TRM
Bordeaux								
ZEE et al. (1983)	---	---	4,03	0,88	4,91	7,31	---	---
Cabernet Franc								
SOUZA et al. (2005)	0,07 - 0,30	nd	0,77 - 1,43	nd	nd - 1,37	0,30 - 0,83	Nd	0,17 - 0,50
Cabernet Monreale								
MO DUGO et al. (2006)	0,2	0,2	0,4	0,5	0,1	0,1	0,2	0,2
Cabernet Sauvignon								
GLÓRIA et al. (1998)	nd - 4,03	nd - 1,17	3,15 - 23,6	nd - 1,51	nd - 10,10	nd - 7,53	Nd	nd - 0,14
SOUZA et al. (2005)	0,10 - 1,63	nd	1,27 - 4,33	Nd	0,23 - 1,73	0,40 - 1,07	Nd	0,20 - 1,37
MO DUGO et al. (2006)	0,1	0,1	0,2	0,4	nd	0,4	0,3	0,1
SOUFLEROS et al. (2007)	0,02	0,00	0,14	0,15	0,12	0,03	---	---
YILDIRIM et al. (2007)	---	---	4,38	0,49	1,25	nd	Nd	nd
Merlot								
SOUZA et al. (2005)	0,03 - 0,23	nd	0,97 - 1,10	nd	0,07 - 1,67	0,33 - 0,50	Nd	0,20 - 0,50
YILDIRIM et al. (2007)	---	---	4,54	nd	1,78	1,42	Nd	nd
MO DUGO et al. (2006)	0,1	0,2	0,3	0,2	nd	0,2	0,1	0,2
SOUFLEROS et al. (2007)	0,06	0,10	0,75	0,12	0,51	0,07	---	---
MANFROI et al., 2009	14,1 - 20,8	nd	nd - 1,72	nd - 0,89	nd	nd	Nd	nd
Petit Verdot								
MO DUGO et al. (2006)	nd	nd	0,7	0,4	0,1	0,1	0,2	0,1
Pinot noir								
GLÓRIA et al. (1998)	nd - 2,35	nd - 2,38	2,43 - 20,3	nd - 2,07	nd - 23,98	nd - 8,31	nd - 5,51	nd - 0,89
MO DUGO et al. (2006)	0,1-0,2	0,1 - 0,2	0,3 - 0,5	0,4-0,5	0,4 - 0,8	0,2-0,3	0,1 - 0,3	0,5 - 0,6
Vinho do Porto								
ZEE et al. (1983)	---	---	3,33	0,23	3,48	2,17	---	---
Rioja								
MILLÁN et al. (2007)	0,08 - 1,10	0,09 - 0,19	0,06 - 13,0	0,07 - 0,68	0,40 - 8,22	0,03 - 3,20	0,04 - 0,98	0,09 - 4,02
Syrah								
MO DUGO et al. (2006)	nd	nd	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1
SOUFLEROS et al. (2007)	0,62	0,36	2,06	0,78	0,61	0,76	---	---
Tannat								
MO DUGO et al., 2006	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2
Tempranillo								
HERNÁNDEZ-ORTE et al. (2006)	---	---	nd - 55,0	nd - 14,0	nd - 25,0	nd - 19,0	---	16,0
MO DUGO et al. (2006)	nd	nd	0,1	0,2	nd	nd	Nd	0,1

nd – não detectado; --- - não determinado

EPD - espermidina, EPM - espermina, PUT - putrescina, CAD - cadaverina, HIM - histamina, TIM - tiramina, TRM - triptamina, FEM - feniletilamina.

Fonte: Adaptado de GLÓRIA & VIEIRA (2007).

As amins estão entre os principais determinantes da qualidade de vinhos e outras bebidas fermentadas. Vários fatores podem afetar o nível de amins em vinhos, incluindo variedades, condições edafoclimáticas, práticas de cultivo, aminoácidos livres precursores, tratamento do mosto, tempo de contato entre o mosto e a casca,

população microbiana inicial no fruto, práticas enológicas, população microbiana fermentadora, conteúdo de álcool, dióxido de enxofre, nutrientes adicionados, pH, temperatura, possível contaminação microbiana durante as operações na vinícola, envelhecimento, tempo e condições de estocagem (GLÓRIA & VIEIRA, 2007).

2.3.1 UVAS

As aminas bioativas são inerentes aos organismos vivos e estão, conseqüentemente, presentes em uvas. São sintetizadas em diversas partes da uva, incluindo fruto e folhas (BROQUEDIS et al., 1989; ADAMS, 1991; MIKLÓS & SARJALA, 2002; MO DUGO et al., 2006). Além disso, estão presentes nas formas livre e conjugadas (SHIOZAKI et al., 2000).

Determinadas aminas são constituintes normais em uvas, como a poliamina espermidina, usualmente abundante no pericarpo, seguida pelo seu precursor obrigatório, putrescina. Outras aminas, como por exemplo, espermina, agmatina, cadaverina, histidina, tiramina e feniletilamina, foram também encontradas, em quantidades menores (OUGH, 1971; BROQUEDIS, et al., 1989; VIDAL-CAROU et al., 1990a.; RADLER & FATH, 1991; HAJÓS et al., 2000; SASS-KISS et al., 2000; LANDETE et al., 2005; KISS et al., 2006). As sementes de uvas também contêm espermina, putrescina e cadaverina, em altas concentrações (SHIOZAKI et al., 2000; KISS et al., 2006).

SASS-KISS et al. (2000) observaram variações significantes nos teores de espermidina, tiramina, histamina e feniletilamina em três variedades de uvas húngaras (Furmint, Hárslevelü e Muscat Ottonel) da safra de 1998. KISS et al. (2006) verificaram diferentes teores de espermidina e espermina em duas variedades de uvas húngaras – Furmint e Hárslevelü – da mesma vinícola. Contudo, os teores variaram amplamente para diferentes safras de uma mesma variedade. YILDIRIM et al. (2007) obtiveram diferenças significativas nos teores de histamina, tiramina e cadaverina entre as variedades de uvas cultivadas na Turquia. Conseqüentemente, a diferença de tipos e teores de aminas em uvas e vinhos não é somente dependente da variedade da uva, mas também da área cultivada.

Alguns estudos indicaram que a safra pode afetar significativamente os teores de aminas em uvas e vinhos. Entre safras, outras variações são observadas, como a concentração do aminoácido precursor, pH e complexidade da microbiota. MARTÍN-

ÁLVAREZ et al. (2006) concluíram que os tipos de microrganismos em vinhos, selecionados a cada ano, também desempenha um papel importante no perfil de aminas.

Apesar da influência do estresse hídrico no perfil de aminas em plantas ser amplamente descrito na literatura, não foi observada diferença significativa nos teores de aminas em uvas submetidas a quatro graus diferentes de estresse hídrico (BOVERCID et al., 2006). Segundo ANCÍN-AZPILICUETA et al. (2008), plantas em diferentes condições de estresse tendem a apresentar um padrão diferente no perfil de aminas, sugerindo que mais estudos devem ser realizados.

Quanto aos nutrientes presentes no solo, baixas concentrações de potássio (K) são apontadas como responsáveis por altos teores de putrescina em plantas. GENY et al. (1997) sugeriram que poliaminas podem ser usadas como marcadores bioquímicos sensíveis, para que se distingam teores ótimos de K para videiras antes de aparecerem os sintomas da deficiência nutricional.

De acordo com BELL & HENSCHKE (2005), o suprimento de nitrogênio aumenta o teor de aminoácidos e, conseqüentemente, o de aminas e nitrogênio assimiláveis por leveduras. Quantidades de 100 kg N/ha/ano dobraram a concentração de aminas em comparação com videiras nas quais nenhum fertilizante nitrogenado foi aplicado.

Outros fatores que podem afetar os teores de aminas em uvas são as práticas de cultivo e as condições climáticas. Teores mais baixos de aminas foram obtidos em uvas cultivadas em estações frias e chuvosas (SASS-KISS et al., 2000).

Quando YILDIRIM et al. (2007) compararam variedades de uvas orgânicas e não orgânicas, perceberam um aumento significativo no teor de putrescina em vinhos orgânicos; entretanto, como os vinhos foram produzidos utilizando-se diversos processos, a diferença observada não pôde ser somente atribuída ao método orgânico de cultivo de uvas.

Uvas intactas contêm menos aminas quando comparadas àquelas que estão infectadas por fungos. O conteúdo de aminas nas uvas intactas é, principalmente, de espermina e putrescina, com baixos teores (quando presentes) de outras aminas. Uvas desidratadas infectadas principalmente com *Botrytis cinerea* – uvas Aszú – apresentaram diferenças no perfil de aminas. Novas aminas apareceram, tais como tiramina e agmatina, e a concentração de espermidina e feniletilamina aumentou, quando comparadas com as uvas intactas. Esses resultados indicam que os microrganismos que se desenvolvem nas uvas possuem grande efeito na composição

e concentração de aminas. Conseqüentemente, o estudo de aminas pode ser usado para determinar a autenticidade de vinhos Aszú (KISS et al., 2006).

2.3.2 VINIFICAÇÃO

Os teores de aminas em uvas podem aumentar durante o processamento do vinho, afetados pelos microrganismos adicionados intencionalmente (culturas *starter*) ou contaminantes (KALAC & GLÓRIA, 2009). Pesquisadores têm questionado quais tipos de microrganismos são responsáveis pela produção de aminas biogênicas. É importante conhecer a habilidade de produção de aminas por microrganismos envolvidos na fermentação de alimentos, para se estabelecer o risco potencial de desordens toxicológicas aos consumidores (LANDETE et al., 2007).

2.3.2.1 Maceração

O tempo de maceração afeta a extração de alguns componentes presentes na casca e semente, tais como fenóis, proteínas, polissacarídeos, e também alguns aminoácidos. De acordo com MARTÍN-ÁLVAREZ et al. (2006), concentrações significativamente menores de histamina, tiramina e putrescina foram observadas em vinhos produzidos com menos de 10 dias de maceração, ao passo que em vinhos elaborados com tempos de maceração mais longos, 2 a 4 vezes maiores teores desta amina foram obtidos. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por BAUZA et al. (1995).

2.3.2.2 Fermentação alcoólica

Durante a fermentação, os teores de espermina e espermidina podem diminuir. Apesar das aminas já estarem presentes em uvas, várias delas podem ser formadas e acumuladas durante o processamento do vinho, como putrescina, tiramina, histamina e feniletilamina. Entretanto, informações a este respeito são contraditórias.

BOVER-CID et al. (2006) observaram que os teores de espermidina e espermina apresentaram-se nulos durante a fermentação alcoólica, o que pode ser explicado pelo consumo destas por leveduras álcool fermentativas. O teor de putrescina aumentou linearmente através do tempo, enquanto o de cadaverina diminuiu significativamente durante a maceração. Aminas aromáticas usualmente encontradas

em vinhos à venda não aparecem no mosto ou durante a fermentação alcoólica (ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2008).

Segundo MANFROI et al. (2009), o tipo de levedura usada na fermentação alcoólica afetou o teor de espermidina nos vinhos; maiores teores foram observados quando *Saccharomyces cerevisiae* foi empregada, sugerindo que as fermentações conduzidas com *Saccharomyces bayanus* e espontaneamente fossem capazes de utilizar a espermidina como substrato.

GARDE-CERDÁN & ANCÍN-AZPILICUETA (2007) investigaram a evolução de aminas bioativas durante a fermentação alcoólica espontânea e também durante a vinificação de mosto esterilizado inoculado com *Saccharomyces cerevisiae*. Durante a fermentação alcoólica espontânea, putrescina foi sintetizada após o consumo de 25% dos açúcares. No entanto, a formação de espermidina e feniletilamina ocorreu na última fase da fermentação alcoólica. Espermina, espermidina e feniletilamina foram formadas após o consumo de 50% dos açúcares. A presença de SO₂ não afetou a formação dessas aminas e a formação de aminas foi maior em fermentações inoculadas do que em espontâneas.

2.3.2.3 Fermentação malolática

Evidências da formação de aminas durante a fermentação malolática estão descritas na literatura. A maioria dos pesquisadores atribui a formação de aminas à fermentação malolática, especialmente tiramina e histamina, pela ação de bactérias envolvidas nesta fermentação. As taxas de formação e os teores dessas aminas variam amplamente de acordo com o tipo de microrganismo envolvido (ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2008; KALAC & GLÓRIA, 2009).

A fermentação malolática não resulta necessariamente em aminas. De fato, alguns estudos *in vitro* demonstraram que determinadas cepas de bactérias maloláticas comerciais não produzem histamina, tiramina e putrescina (MORENO-ARRIBAS et al., 2003). MARTÍN-ÁLVAREZ et al. (2006) verificaram que a inoculação do vinho com cepas comerciais de bactérias maloláticas foi útil para reduzir o conteúdo de histamina, tiramina e cadaverina, comparados com o vinho não inoculado.

Segundo LANDETE et al., (2007), uma correlação de 100% foi obtida entre a presença dos genes de histidina descarboxilase, tirosina descarboxilase e ornitina descarboxilase, e a produção de histamina, tiramina e putrescina, respectivamente. Conseqüentemente, *primers* de PCR (reação em cadeia da polimerase) e provas de

DNA podem ser usados como uma ferramenta genética útil na triagem de bactérias ácido lácticas (LAB) nocivas em alimentos.

MANFROI et al. (2009) investigaram a influência de diferentes microrganismos da fermentação malolática no perfil e teores de aminas em vinhos da variedade Merlot. Maiores teores de aminas totais e serotonina foram obtidos quando *Lactobacillus plantarum* foram usados na fermentação malolática, em detrimento da fermentação espontânea e a conduzida com *Oenococcus oeni*.

ROSI et al. (2009) estudaram 27 linhagens de *Oenococcus oeni* quanto a habilidade de formar tiramina e histamina durante a fermentação malolática. Os autores concluíram que a produção das aminas pelo *O. oeni* é dependente da linhagem da bactéria e da composição do vinho. A composição do vinho é, por sua vez, dependente da linhagem de levedura usada na fermentação alcoólica e da duração do contato bactéria-levedura após o final da fermentação malolática.

2.3.2.4 Condições higiênico-sanitárias durante a vinificação

Existem na literatura, dados que indicam a possibilidade de formação de aminas em vinhos pela ação de microrganismos contaminantes ou por aqueles não diretamente relacionados ao processo de fermentação, como, por exemplo, bactérias entéricas. Condições higiênicas das uvas afetam os teores de algumas aminas, por exemplo, uvas danificadas por algum agente contaminante possuem teores de aminas maiores, especialmente feniletilamina (ÉDER et al., 2002), tiramina e putrescina (KISS et al., 2006).

A diminuição do acúmulo de aminas biogênicas em vinhos durante o processamento está relacionada a condições de higiene apropriadas e controladas. Portanto, é possível produzir vinhos com teores de aminas extremamente baixos (BOVER-CID et al., 2006).

2.3.2.5 Outros fatores

Além da presença de microrganismos, outros fatores, durante o processo de vinificação, podem ser fontes de aminas em vinhos. Estes se relacionam à condição de estocagem, tratamento do mosto, conteúdo de álcool, concentração de dióxido de enxofre, nutrientes adicionados, pH, temperatura e quantidade e tipos de agentes clarificantes finalizadores (GLÓRIA & VIEIRA, 2007; ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2008).

A temperatura e o tempo de estocagem têm efeito decisivo na qualidade do vinho. Uma elevação da temperatura aumenta o número de reações que ocorrem no vinho. Estudos com vinhos Chardonnay mostraram que a formação e degradação de amins ocorriam principalmente nos primeiros 45 dias de estocagem para todas as temperaturas estudadas. Os teores de histamina, putrescina, cadaverina e tiramina aumentaram, ao passo que os de espermina diminuíram durante a estocagem (GONZÁLEZ-MARCO & ANCÍN-AZPILICUETA, 2006a).

O aumento dos teores de amins no início da estocagem está relacionado com a atividade descarboxilase de microrganismos remanescentes no produto. Um decréscimo na concentração de tiramina foi observado após 75 dias de estocagem. Este resultado está provavelmente relacionado à presença de tiramina oxidase em vinhos. Apesar dessas enzimas descarboxilantes apresentarem atividade ótima em pH neutro ou básico, elas também atuam em vinhos (GONZÁLEZ-MARCO & ANCÍN-AZPILICUETA, 2006a).

O pH pode influir no crescimento e atividade metabólica das bactérias ácido lácticas. De acordo com GERBAUX & MONAMY (2000), o pH parece ser um dos mais importantes fatores enológicos que influenciam a formação das amins biogênicas, particularmente de histamina, tiramina e putrescina.

A adição de leveduras hidrolisadas ao mosto fornece aminoácidos, no entanto, não ocorre um aumento de amins durante a fermentação, apesar do fato do consumo de nitrogênio-amino e alguns precursores de aminoácidos serem altos. Entretanto, após a fermentação malolática, observou-se que a concentração de amins biogênicas apresentava-se maior nos vinhos que tiveram o mosto suplementado (MARCO et al., 2006).

Enzimas pectinolíticas comerciais são utilizadas no processamento de vinhos para aumentar o rendimento do mosto, facilitar a prensagem, filtração, e proporcionar uma melhor clarificação do mosto e do vinho. Porém, notou-se que essas enzimas afetavam os teores de cadaverina e feniletilamina. Baixos teores destas amins foram obtidos em vinhos suplementados de pectinases (MARTÍN-ÁLVAREZ et al., 2006). Enzimas proteolíticas podem favorecer a formação de amins pela liberação de aminoácidos, que são os precursores das amins bioativas (SOUZA et al., 2005).

O tratamento de vinhos com bentonite (mineral de sílica) pode diminuir a concentração de algumas amins, como histamina e putrescina, da mesma forma uma aplicação combinada de agentes clarificantes e gelatina pode atenuar os teores de amins biogênicas em vinhos brancos (OUGH, 1971; RADLER & FATH, 1991). Outros

tratamentos, como a adição de carbonato de cálcio, carvão ativado ou ácido ascórbico também causam uma diminuição dos teores de amins biogênicas (RADLER & FATH, 1991). O uso desses agentes pode reduzir os teores de amins, embora seja preferível prevenir a formação destas substâncias (OUGH, 1971; ZEE et al., 1983).

De acordo com GARDE-CERDÁN & ANCÍN-AZPILICUETA (2007), a adição de SO₂ não afeta a formação de amins biogênicas em vinhos durante a fermentação alcoólica. Todavia, pode prevenir a formação de amins biogênicas durante o envelhecimento do vinho (VIDAL-CAROU et al., 1990b; MARCOBAL et al., 2006). YILDIRIM et al., 2007 sugeriram que baixos níveis de dióxido de enxofre podem ser uma razão para a grande quantidade de putrescina presente em vinhos.

2.3.3 AMINAS CONJUGADAS EM UVAS E VINHOS

A maioria dos trabalhos descritos na literatura investigou a presença e os teores de amins livres em uvas e vinhos. No entanto, GENY et al. (1997) avaliaram também os teores de amins conjugadas em uvas, verificando que o teor de poliaminas, especialmente as formas conjugadas e ligadas à parede celular em diversos órgãos de uvas Cabernet Sauvignon, foram fortemente afetadas pela nutrição com potássio antes da deficiência nutricional visual surgir nas folhas.

SHIOZAKI et al. (2000) quantificaram espermidina, putrescina e espermina nas formas conjugadas no pericarpo e sementes de uvas. A amina conjugada em maior concentração foi a putrescina, tanto no pericarpo quanto na semente. Nas sementes, durante o amadurecimento das uvas, o aumento do teor de amins livres foi acompanhado da diminuição das amins conjugadas e vice-versa. GENY et al. (2003) notaram um aumento no teor de poliaminas conjugadas em uvas, quando estas foram infectadas pelo fungo *Botrytis cinerea*.

Amins bioativas nas formas livres e conjugadas estão presentes em uvas e podem ser, conseqüentemente, encontradas em vinhos. Não foram obtidos relatos na literatura sobre investigações da presença destas amins em vinhos. Como as amins conjugadas estão presentes nas uvas, seria interessante analisar os vinhos, principalmente, tendo em vista as atividades atribuídas a esses compostos (SEN et al., 1994; MARTIN-TANGUY, 1997; NAGATSU et al., 2000; FACCHINI et al., 2002; PARK & SCHOENE, 2002; SON & LEWIS, 2002; WALTERS, 2003; MELLON & MOREAU, 2004; YINGYONGNARONGKUL et al., 2006).

2.3.4 PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM VINHOS

Baseado nas informações descritas acima é possível prevenir a formação de aminas em vinhos a níveis extremamente baixos. Na prevenção da formação de aminas biogênicas em vinhos, a duração dos processos que incorporam aminoácidos ao mosto ou ao vinho, tais como maceração, deve ser reduzida ao mínimo. Outra forma de se prevenir a formação de aminas biogênicas é a inibição do crescimento de bactérias ácido lácticas contaminantes e a inoculação de cepas de bactérias comerciais incapazes de produzir aminas biogênicas (GLÓRIA & VIEIRA, 2007; LANDETE et al., 2007).

Outros fatores, como pH e características da uva, relacionados à sua safra, podem também desempenhar um papel crítico na biogênese de aminas, e, portanto, devem ser levados em consideração (MARTÍN-ÁLVAREZ et al., 2006).

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade de se mostrar a qualidade de análises quantitativas e qualitativas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações seguras, exatas e interpretáveis sobre a amostra, este deve ser submetido a uma minuciosa avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

A International Organization for Standardization (ISO) define validação como a confirmação, por meio de exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos do método, para um uso pretendido, são atendidos (ABNT, 1994). Para métodos analíticos, a validação significa o processo de estabelecimento de características de desempenho e limitações de um método, identificando quais fatores podem afetar o seu desempenho e qual a extensão da influência destes fatores, além de demonstrar que o método é adequado ao propósito (EURACHEM, 1998).

No procedimento harmonizado pela AOAC *International*, THOMPSON et al. (2002) relacionam a validação como requisito para acreditação de laboratórios pela ISO/IEC 17025. O guia para a validação de métodos do EURACHEM (1998), por sua vez, sugere que mesmo para métodos normalizados, verificações de parâmetros de desempenho devem ser realizadas. Nos casos em que o controle de qualidade indicar alterações de um método com o tempo, deve-se também realizar a validação (SOUZA & BRITO, 2002; ABNT, 2005).

O laboratório deve decidir quais parâmetros de desempenho do método necessitam ser caracterizados a fim de validar o método (EURACHEM, 1998). Os parâmetros de desempenho analítico, também denominados de parâmetros analíticos, características de desempenho ou figuras analíticas de mérito, devem ser baseados na intenção do uso do método. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário. É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI et al., 2004).

Apesar da divergência quanto à inclusão dos parâmetros de desempenho em um processo de validação de um método analítico, são empregados, normalmente, os seguintes itens: exatidão, precisão, linearidade, limites de detecção e de quantificação, especificidade, recuperação, robustez e intervalo de aplicação (LANÇAS, 2004).

Todas as etapas devem ser minuciosamente avaliadas na estratégia de validação, desde a coleta e a preservação das amostras até a emissão do resultado final, com documentação dos resultados obtidos em cada etapa (SOUZA et al., 2001).

Os parâmetros de desempenho mais comumente utilizados na validação de métodos analíticos estão definidos a seguir.

2.4.1 LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (EURACHEM, 1998). A faixa de trabalho é o intervalo de padrões em que os requisitos de precisão, exatidão e linearidade são satisfeitos. O limite inferior da faixa de trabalho deve coincidir com o limite de quantificação.

Pode-se confirmar a linearidade e determinar a faixa de trabalho construindo-se curvas analíticas, da concentração do analito em função da resposta obtida no sistema de detecção, com replicatas em torno da concentração esperada do analito.

2.4.2 SELETIVIDADE

A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004). Se um método é específico, ele deve produzir resposta para um único analito. Um método seletivo produz resposta para vários

analitos que podem se distinguir entre si. Geralmente, a especificidade é considerada como 100% de seletividade (EURACHEM, 1998). Para garantir a especificidade do método, deve-se avaliar se o sinal medido pelo equipamento é devido exclusivamente ao analito ou resulta da soma das contribuições de múltiplos componentes.

2.4.3 EXATIDÃO

A exatidão é o grau de concordância entre a média de um conjunto de resultados obtidos experimentalmente e o valor verdadeiro ou reconhecido como tal. A exatidão indica a diferença entre o valor obtido e o valor real do analito na matriz, sendo geralmente expressa em termos de tendência (*bias*), ou seja, o desvio (positivo ou negativo) da média do valor obtido em relação ao valor real (EURACHEM, 1998).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI et al., 2004).

2.4.4 PRECISÃO

É o grau de dispersão dos resultados, obtidos sob condições especificadas, em torno do valor médio. A precisão pode ser avaliada em condições de repetibilidade ou reprodutibilidade, sendo expressa em termos de coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (SOUZA & BRITO, 2002). Tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito, e assim devem ser determinadas em um número de concentrações; se relevante, a relação entre precisão e concentração do analito deve ser estabelecida (EURACHEM, 1998).

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados obtidos por medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, denominadas condições de repetitividade, em intervalos curtos de tempo. A repetibilidade representa a variabilidade obtida pelo mesmo analista, aplicando o mesmo método, no mesmo dia, sobre replicatas da mesma amostra (RIBANI et al., 2004).

Se a mesma amostra é analisada sob condições variadas, a medida de precisão recebe o nome de reprodutibilidade. Esta é definida como sendo o grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação de um mesmo procedimento

analítico, ao mesmo material, sob condições preestabelecidas (como diferentes laboratórios, operadores, equipamentos) podendo ser avaliada parcialmente pela variação de um ou mais fatores (EURACHEM, 1998).

2.4.5 LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção é a menor concentração de um analito na matriz que pode ser identificada com nível de confiança especificado (EURACHEM, 1998); ou seja, corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, que se distinguem do zero, sem, contudo ser necessariamente quantificada como um valor exato (LANÇAS, 2004).

O limite de quantificação é a menor concentração do analito na matriz que pode ser determinada em níveis considerados aceitáveis de exatidão e precisão (EURACHEM, 1998). Comumente, para análises cromatográficas, emprega-se o método baseado nos parâmetros da curva analítica, a qual deve conter a concentração correspondente ao limite de quantificação (RIBANI et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 AMOSTRAS

3.1.1.1 Validação do método de análise de aminos em uvas e vinhos

Para a etapa de validação foram utilizadas amostras de uvas (*Vitis vinifera*) e vinho da variedade Syrah provenientes da Fazenda Experimental de Caldas, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizada na cidade de Caldas, MG.

3.1.1.2 Otimização da hidrólise das aminos conjugadas em uvas e vinhos

Amostras de uvas de mesa (*Vitis labrusca*) da variedade Niágara rosada e de vinho comercial da variedade Syrah foram utilizadas na etapa de otimização.

3.1.1.3 Perfil e teores de aminos livres e conjugadas em vinhos do mercado de Belo Horizonte

Foram coletadas amostras de vinho tinto, branco e espumante do mercado de Belo Horizonte, MG. Foram avaliados 14 vinhos, sendo dois (2) vinhos brancos, cinco (5) espumantes, um (1) rosé e seis (6) tintos de diferentes variedades de uvas (Tabela 9). De acordo com o tipo do vinho, as amostras foram divididas em B – brancos, E – espumantes, R – rosé e T – tintos, e, então numeradas.

3.1.1.4 Perfil e teores de aminos livres e conjugadas em uvas

Foram analisadas amostras de uvas de mesa, adquiridas no mercado de Belo Horizonte, MG, das variedades Niágara rosada e Rubi.

Foram analisadas amostras de uvas viníferas da variedade Syrah, provenientes das cidades de Três corações e Pirapora. As amostras foram cedidas pela EPAMIG, localizada na cidade de Caldas. As uvas foram obtidas de plantas da mesma variedade, com mesmo porta-enxerto, cultivadas em condições semelhantes nas duas localidades.

TABELA 9. Amostras de vinhos adquiridas no mercado de Belo Horizonte, MG

Código	Variedades das uvas	Safra	Região
B1	Sauvignon blanc	2007	Chile
B2	Moscato giallo	2007	RS/Brasil
E1	(não informado)	2007	Argentina
E2	Lambrusco	2006	Itália
E3	Moscatel	2007	BA/Brasil
E4	Chardonnay e Pinot noir	2008	RS/Brasil
E5	Chardonnay, Pinot noir e Merlot	2008	RS/Brasil
R1	Cabernet sauvignon	2007	PR/Brasil
T1	Cabernet sauvignon	2005	RS/Brasil
T2	Cabernet sauvignon	2006	Argentina
T3	Cabernet sauvignon	2005	Chile
T4	Syrah	2006	Argentina
T5	Cabernet sauvignon	2006	RS/Brasil
T6	Merlot	2006	RS/Brasil

3.1.2 REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que foram de grau cromatográfico. Os solventes orgânicos foram filtrados em membranas HVLP, com especificações de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Toda a água utilizada foi ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões das aminas bioativas histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), serotonina (SRT, cloridrato), agmatina (AGM, sal sulfato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O agente de derivação *orto*-ftalaldeído (OPA) também foi adquirido da Sigma.

3.1.3 SOLUÇÕES

Todas as soluções foram acondicionadas em tubos hermeticamente fechados, identificadas e armazenadas sob refrigeração para a realização das análises, exceto o tampão acetato de sódio: octanossulfonato de sódio, que foram mantidas a 22 °C.

3.1.3.1 Solução padrão das aminas

Para o preparo da solução padrão de cada amina considerou-se a massa da base livre (sem a utilização da massa de cloreto ou sulfato) para resultar numa concentração de 1 mg/mL em ácido clorídrico 0,1 mol/L. A partir de alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções individuais, obteve-se 10 mL de solução padrão contendo dez aminas.

3.1.3.2 Solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio

Como uma das fases móveis, empregou-se a solução tampão de acetato de sódio 0,2 mol/L e octanossulfonato de sódio 15 mmol/L, com ajuste de pH para 4,9 em potenciômetro digital (Digimed, SP, Brasil) por meio de ácido acético glacial. Esta solução foi filtrada em membrana HAWP, em éster de celulose, com especificações de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA) e desgaseificada em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil).

3.1.3.3 Solução derivante

A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água ultrapura, cujo pH foi ajustado para 10,5 com hidróxido de potássio.

A esta solução foram adicionados 0,2 g de *orto*-ftalaldeído dissolvido em 3 mL de metanol previamente filtrado, 1,5 mL de Brij 35 e 1,5 mL de mercaptoetanol. A solução derivante foi preparada imediatamente antes do uso, desgaseificada em aparelho ultra-som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil) e mantida sob abrigo da luz.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 ANÁLISE DE AMINAS

Amostras de dez bagas de uvas foram misturadas, prensadas, centrifugadas e o sobrenadante utilizado para análise após filtração. As amostras de 15 mL de vinhos foram homogeneizadas e filtradas. Foram injetados diretamente no cromatógrafo, após

filtração 20 µL da amostra. Para a separação das aminas, foram empregadas como fases móveis acetonitrila (fase A) e solução tampão acetato de sódio-octanossulfonato de sódio (fase B), utilizando o gradiente de eluição apresentado na Tabela 10 (MANFROI et al., 2009).

TABELA 10. Gradiente de eluição para as fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio utilizado na determinação das aminas

Tempo (min)	Solução tampão (%)	Acetonitrila (%)
0	85	15
1	94	6
14	94	6
16	74	26
22	84	16
25	84	16
26	67	33
27	82	18
29	82	18
30	62	38
31,5	85	15
68	85	15

Para a realização da análise cromatográfica, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu (Kioto, Japão), constituído por:

- 3 bombas com conjunto de lavagem automática do pistão, sendo 2 modelo LC-10 AD e 1 LC-10 ADvp acoplada a uma câmara de mistura,
- injetor automático modelo SIL-10 ADvp,
- detector espectrofluorimétrico modelo RF-10AXL, com comprimentos de onda de 340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente,
- unidade de controle CBM-20 A conectada a um microcomputador e a todos os módulos,
- coluna Nova-Pak C18 de fase reversa (3,9 x 300 mm, 5 µm) e pré-coluna µBondapak (Waters, Milford, MA, EUA).

Na Figura 7 está disposto um esquema representativo da análise por CLAE com derivação pós-coluna e detecção por fluorescência. A derivação pós-coluna foi realizada por meio de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna em um tubo de teflon de 2 m de comprimento conectando a câmara ao detector de fluorescência.

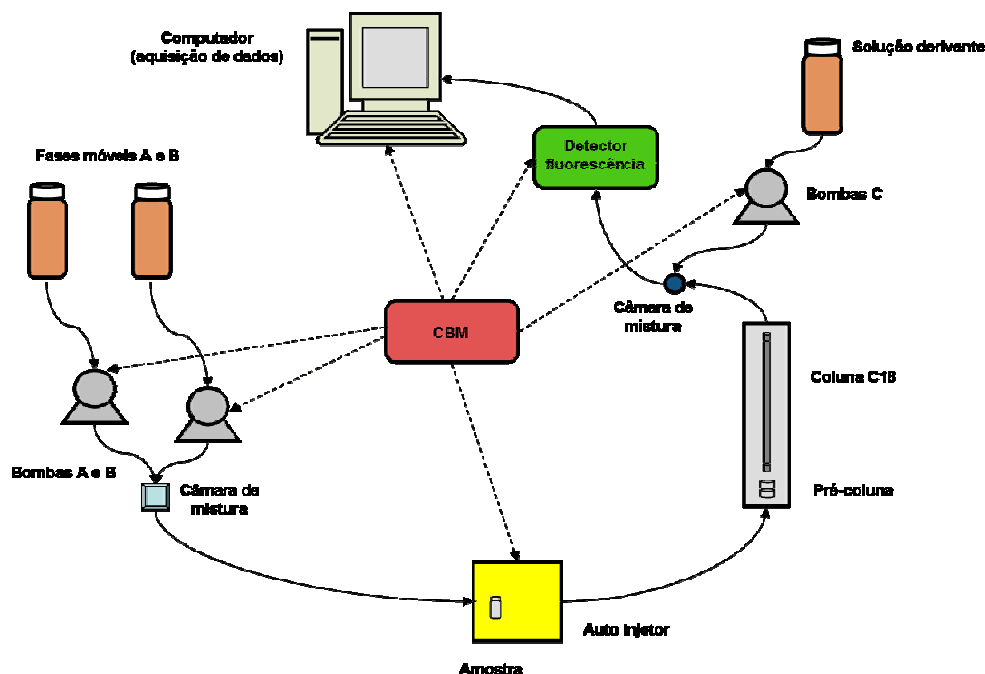


FIGURA 7. Sistema CLAE com derivação pós-coluna e detector de fluorescência utilizado na análise das aminas bioativas.
 Fonte: SILVA (2008).

A identificação das aminas foi feita por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os das aminas da solução padrão em HCl. As soluções padrão foram analisadas intercaladas às amostras. No caso de dúvida quanto aos picos correspondentes à determinada amina, a confirmação foi feita por meio da adição de quantidade conhecida de solução padrão da amina à amostra.

A quantificação das aminas foi realizada por interpolação em curva analítica externa e o valor encontrado na amostra multiplicado pelo fator de correção correspondente à amina.

3.2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE AMINAS EM UVAS E VINHOS

A adequação do método de análise de aminas para o uso em uvas e vinhos foi determinada com base nos resultados dos parâmetros estabelecidos (linearidade, seletividade, efeitos de matriz, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação experimentais), considerando os critérios de aceitabilidade determinados, conforme sugerido por SOUZA (2007). O nível de significância adotado nos testes de hipótese foi $\alpha = 0,10$ para os testes de normalidade e de independência e de 0,05 para os demais testes. Os cálculos foram feitos em planilhas comerciais, cujos resultados

foram previamente validados frente aqueles obtidos em diferentes *softwares* de análise estatística.

3.2.2.1 Linearidade

A curva de calibração foi preparada com níveis de concentração diferentes para as aminas estudadas. Para tiramina, agmatina, feniletilamina e espermina os níveis de concentração usados foram de 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; e 2,4 mg/L; para putrescina, histamina, serotonina e espermidina, 0,2; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; e 2,4 mg/L; para cadaverina, 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; e 2 mg/L e para triptamina, 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; e 2,4 mg/L. Para cada nível foram preparadas e analisadas três replicatas independentes, de forma aleatória.

Os parâmetros da regressão (interseção e inclinação) foram calculados pelo Método Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e os resíduos calculados por meio da diferença entre a concentração real e a concentração obtida pela regressão linear. Valores de resíduos dispersos foram diagnosticados e excluídos dos dados originais pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife; esse método foi aplicado sucessivamente até que novos valores dispersos não fossem mais detectados, sendo a exclusão máxima de 22,2% do número de dados originais (HORWITZ, 1995). As premissas relativas à análise da regressão foram verificadas: normalidade (RYAN & JOINER, 1976), homocedasticidade (LEVENE, 1960; BROWN & FORSYTHE, 1974) e independência dos resíduos da regressão (DURBIN & WATSON, 1951). A análise de variância foi adotada para verificar a adequação do ajuste do modelo linear por meio da significância da regressão e do desvio da linearidade avaliado contra o erro puro.

3.2.2.2 Seletividade e efeito da matriz

Perfis cromatográficos da matriz adicionada da solução padrão de aminas foram comparados com o perfil cromatográfico das aminas em solvente para análise da seletividade. Duas curvas de calibração foram construídas, com níveis de concentração na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L (exceto cadaverina – 0,2 a 2 mg/L), sendo uma curva construída em solução (HCl 0,1 mol/L) e a outra utilizando a matriz como solvente (uva e vinho). As duas curvas foram construídas com três replicatas independentes em cada nível e analisadas em ordem aleatória na mesma batelada de experimentos.

Os parâmetros da regressão foram calculados e as premissas relativas ao MMQO avaliadas para as curvas. Uma vez confirmado o ajuste ao modelo linear, foi verificada a homogeneidade ou heterocedasticidade entre as variâncias dos resíduos das curvas pelo teste de F (SNEDECOR & COCHRAN, 1989). A inclinação e a interseção obtidas para a curva do solvente foram comparadas com a inclinação e interseção estimadas para a curva na matriz, utilizando variâncias combinadas em caso de homogeneidade e variâncias distintas em caso de heterocedasticidade entre as variâncias dos resíduos das curvas.

3.2.2.3 Exatidão, precisão e limites

A exatidão, a precisão (sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial) e os limites de quantificação experimentais foram estabelecidos por ensaios com amostras cujos perfis de aminas eram bem estabelecidos e amostras adicionadas em níveis correspondentes a 0,2; 0,4; 0,8; 2,0; e 2,4 mg/L, em pelo menos nove replicatas independentes de cada nível. As amostras foram divididas em três lotes, os quais foram analisados em três dias diferentes por três analistas diferentes. Considerando os resultados dos testes de efeito da matriz, curvas na matriz foram preparadas para calcular as concentrações das aminas nas amostras.

Valores dispersos foram investigados nos resultados de recuperação aparente obtidos para cada nível de concentração pelo teste de Grubbs (GRUBBS, 1969; BARET & LEWIS, 1994; BURKE, 2001). Após a eliminação do valor disperso, o teste de Grubbs foi aplicado sucessivamente até que novos valores não fossem detectados ou até a exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (HORWITZ, 1995).

A exatidão foi investigada por meio da recuperação aparente obtida para as nove replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. Os critérios adotados para considerar os resultados satisfatórios foram recuperações de 80 a 110%, uma vez que as concentrações estudadas eram maiores que 10 µg/kg (EC, 2002).

A precisão, sob condição de repetitividade e de reprodutibilidade parcial, foram expressas em termos de desvio padrão relativo (DPR_r e DPR_R , respectivamente) obtidos para as replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. O DPR_r foi considerado aceitável quando dentro de dois terços (EC, 2002) do DPR_R calculado pela equação de HORWITZ (1982) modificado por THOMPSON (2000). Os

desvios máximos aceitáveis para cada nível de concentração, estimados pela equação de THOMPSON (2000), estão descritos na Tabela 11. O limite de quantificação experimental foi estabelecido como a menor concentração na qual o método pode operar com exatidão e precisão aceitáveis.

TABELA 11. Critérios de aceitabilidade do desvio padrão relativo (DPR) para cada nível de concentração

Concentração (mg/L)	DPR_R (%)	DPR_r (%)
0,20	20,38	13,59
0,40	18,36	12,24
0,80	16,54	11,03
2,00	14,41	9,61
2,4	14,02	9,35

Fonte: THOMPSON (2000).

Para a determinação de limite de detecção foram injetadas dez vezes alíquotas de solução de HCl 0,1 mol/L, usado na dissolução do padrão de aminas, uma vez que não existem amostras brancas de uva e vinho (ou seja, sem a presença de aminas). O limite de detecção foi calculado como sendo a média das concentrações da amina obtida para a solução de HCl adicionada de três vezes o desvio padrão entre as leituras (INMETRO, 2007).

3.2.3 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DAS AMINAS CONJUGADAS EM VINHOS E UVAS

A fim de se obter a melhor condição para hidrólise das aminas conjugadas em vinho e uva foi utilizada uma estratégia seqüencial de planejamentos fatoriais, segundo RODRIGUES & IEMMA (2005). Foram realizados três planejamentos fatoriais, cujas variáveis independentes e os níveis estudados foram definidos com base em trabalhos da literatura (TIBURCIO et al., 1985; ESCRIBANO & LEGAZ, 1988; ARMAS et al., 1999; SHIOZAKI et al., 2000; FONTANIELLA et al., 2001; LIANG & LUR, 2002; CASAL et al., 2004).

No primeiro planejamento fatorial completo realizado foi investigado o efeito das variáveis independentes (temperatura e tempo de hidrólise, concentração de HCl e temperatura do processo de concentração) na hidrólise de aminas conjugadas. Foram realizados 19 ensaios (2⁴ ensaios com um ponto central repetido três vezes), nos níveis apresentados na Tabela 12.

TABELA 12. Primeiro planejamento experimental para otimização da hidrólise das aminas conjugadas em vinhos e uvas

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0*	+1
Temperatura de hidrólise (°C)	50	80	110
Tempo de hidrólise (h)	10	17	24
Concentração HCl (mol/L)	6	9	12
Temperatura de concentração (°C)	40	60	80

* Ponto central.

Com base nos resultados do primeiro planejamento, um segundo planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) foi proposto. Foram realizados 17 ensaios (2^3 ensaios com 2 pontos axiais para cada nível independente e 1 ponto central repetido 3 vezes), sendo avaliadas as variáveis temperatura e tempo de hidrólise e concentração do ácido clorídrico (HCl), tendo como valor fixo em 60 °C a temperatura de concentração (Tabela 13).

TABELA 13. Segundo planejamento experimental para otimização da hidrólise das aminas conjugadas em vinhos e uvas

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0*	+1	+1,68
Temperatura de hidrólise (°C)	80	88	100	112	120
Tempo de hidrólise (h:min)	05:00	07:25	11:00	14:34	17:00
Concentração HCl (mol/L)	6,0	7,2	9,0	10,8	12,0

* Ponto central.

Um terceiro planejamento fatorial foi proposto tendo em vista os resultados dos planejamentos anteriores. O tempo de hidrólise foi fixado em 5 h e a temperatura de concentração em 60 °C. As variáveis temperatura de hidrólise e concentração do HCl foram avaliadas utilizando-se um DCCR, com os níveis apresentados na Tabela 14. Foram realizados 11 ensaios (2^2 ensaios, com 2 pontos axiais para cada nível independente e três repetições no ponto central).

TABELA 14. Terceiro planejamento experimental para otimização da hidrólise das aminas conjugadas em vinhos e uvas

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0*	+1	+1,41
Temperatura de hidrólise (°C)	73	78	90	102	107
Concentração HCl (mol/L)	3,0	3,9	6	8,1	9,0

* Ponto central.

Para análise das aminas conjugadas, 2 mL do mosto e do vinho foram misturados a 2 mL de solução de HCl, nos níveis de concentração definidos, em tubo

de reação fechado, e aquecidos em bloco de aquecimento pelos tempos e temperaturas definidos em cada ensaio pelo planejamento experimental. O hidrolisado foi filtrado em papel Whatman nº 1, concentrado na temperatura definida sob fluxo de ar, e ressuspenso em 1 mL de HCl 0,1 mol/L.

O mosto de uva, o vinho e os hidrolisados foram filtrados em membrana HAWP de éster de celulose, com especificações de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise por CLAE por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação pós-coluna com *orto*-ftalaldeído (MANFROI et al., 2009). O teor de aminas conjugadas foi obtido pela diferença entre o teor de aminas antes e após a hidrólise.

Após a definição da condição ótima, foram realizados ensaios na condição otimizada para confirmar experimentalmente os resultados obtidos pela análise de superfície de resposta.

Os resultados foram analisados no programa STATISTICA 8.0 (Statsoft, USA), adotando-se o nível de significância de 5%.

3.2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO, pH E AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS EM VINHOS DO MERCADO DE BELO HORIZONTE

As amostras de vinhos foram homogeneizadas e filtradas. Foram avaliados os teores de aminas bioativas livres e conjugadas presentes nestas amostras conforme o método validado e otimizado, respectivamente. O teor alcoólico, safra, tipo de uva e região de origem, relatados na garrafa foram anotados e o pH determinado em potenciômetro digital (Digimed, SP, Brasil) calibrado com padrões de pH 4,0 e 7,0. Foi calculado o coeficiente de correlação entre os teores de aminas livres e conjugadas e o tipo de vinho, variedade da uva, safra, pH e teor alcoólico (5% de probabilidade).

2.5 DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS EM UVAS

As bagas de uvas foram misturadas, prensadas, centrifugadas e o sobrenadante utilizado após filtração. Foram avaliados os teores de aminas bioativas livres e conjugadas presentes nestas amostras conforme o método validado e otimizado, respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE AMINAS EM UVAS E VINHOS

4.1.1 LINEARIDADE

Os gráficos exploratórios dos resíduos da regressão após tratamentos de valores dispersos pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife estão apresentados na Figura 8. Em nenhum dos casos foram observados mais do que quatro valores dispersos (três no caso da triptamina), correspondentes ao limite máximo de pontos passíveis de serem removidos, ou seja, 22,2% dos dezoito dados originais (quinze dados originais, no caso da triptamina). Os resíduos da regressão foram calculados por meio da diferença entre a concentração real e a concentração obtida pela equação da reta. A análise visual dos gráficos de resíduos demonstra que não houve tendências óbvias na distribuição dos resíduos.

As premissas de que os resíduos da regressão seguiram distribuição normal, são homocedásticos e independentes foram confirmadas, garantindo a aplicação dos testes de hipóteses F, para estimativa da significância da regressão e do desvio de linearidade (Tabela 15). Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$). A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de Levene modificado também não foi significativa ($p > 0,05$), sugerindo homocedasticidade. As estatísticas de Durbin-Watson demonstraram independência dos resíduos ($p > 0,10$).

Os dados obtidos foram avaliados como sendo bem ajustados ao modelo linear. Regressão significativa ($p < 0,001$) e desvios da linearidade não significativos ($p > 0,05$) indicaram que a faixa de 0,2 a 2,4 mg/L (faixa de 0,2 a 2,0 mg/L no caso da cadaverina) foi linear para as aminas analisadas. As curvas de solvente com as respectivas equações e coeficientes de determinação estão apresentadas na Figura 9.

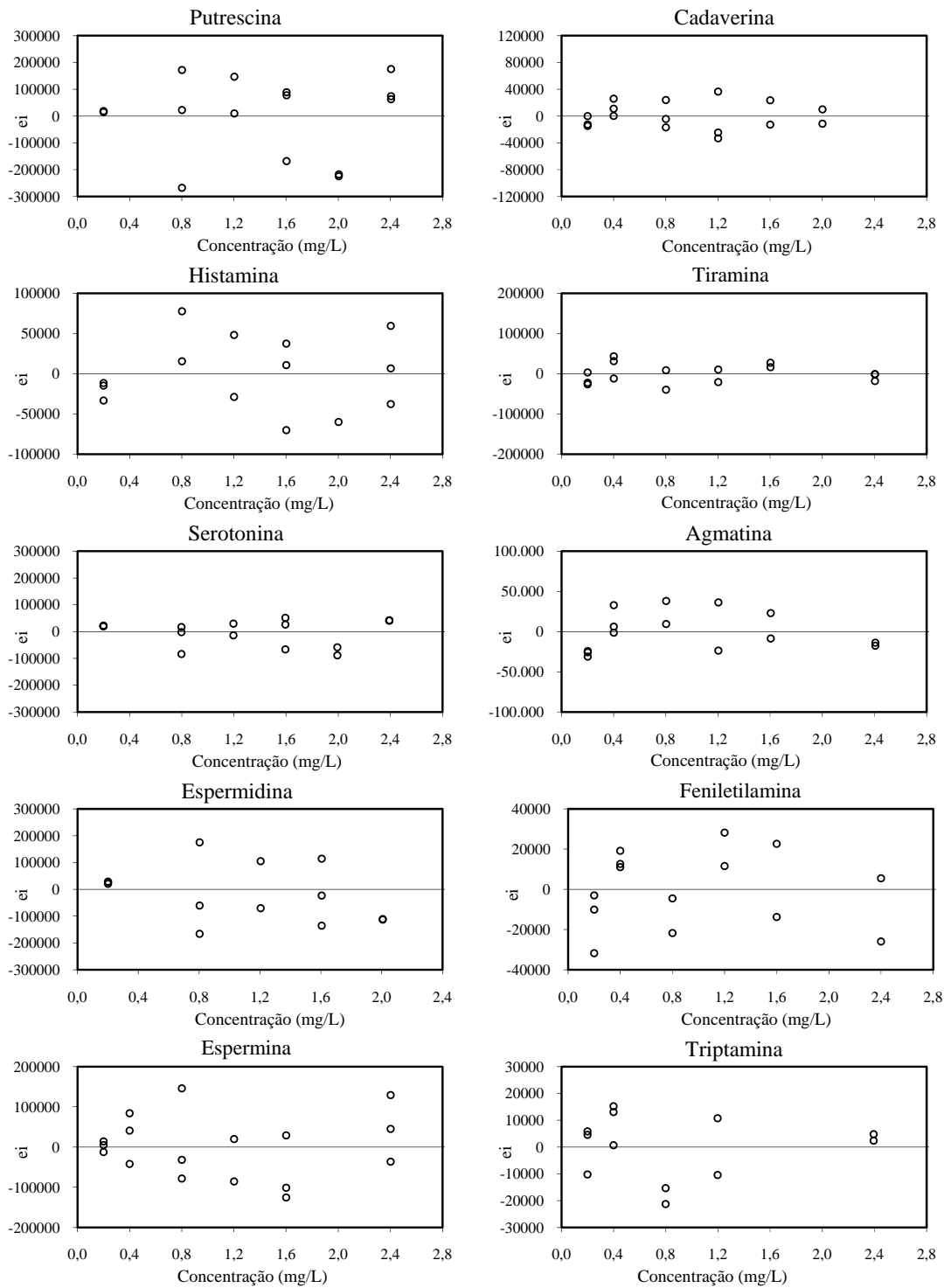


FIGURA 8. Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas das aminas analisadas em solvente. e_i = resíduo da regressão.

TABELA 15. Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das aminas bioativas

Estadística	PUT	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	EPD	FEM	EPM	TRM
<i>Número de observações</i>										
<i>n</i>	16	16	14	15	16	14	16	14	17	12
<i>Normalidade</i>										
<i>R</i>	0,9395	0,9831	0,9925	0,9925	0,9211	0,9636	0,9844	0,9873	0,9905	0,9702
<i>p</i>	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10
<i>Homocedasticidade</i>										
<i>t_L</i>	0,790	1,163	0,494	1,470	1,091	0,402	0,429	0,440	1,029	1,03
<i>p</i>	0,443	0,2641	0,630	0,165	0,294	0,695	0,675	0,668	0,320	0,327
<i>Independência</i>										
<i>d</i>	1,536	2,520	1,978	1,654	1,367	1,774	1,846	1,629	2,444	1,190
<i>p</i>	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10
<i>Regressão</i>										
<i>F</i>	4109,6	103254,4	11344,8	35118,4	4061,7	25837,7	2216,78	97297,6	1837,8	97440,11
<i>p</i>	1,09 x 10 ⁻¹⁸	1,76 x 10 ⁻²⁸	3,14 x 10 ⁻¹⁹	1,07 x 10 ⁻²³	1,18 x 10 ⁻¹⁸	2,26 x 10 ⁻²¹	8,05 x 10 ⁻¹⁷	7,93 x 10 ⁻²⁵	4,17 x 10 ⁻¹⁷	2,80 x 10 ⁻²¹
<i>Desvio da Linearidade</i>										
<i>F</i>	2,278	0,451	1,202	1,998	3,198	2,635	0,886	2,766	0,959	4,316
<i>p</i>	0,133	0,770	0,381	0,179	0,062	0,113	0,506	0,103	0,467	0,051

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *t_L* = estatística t de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão de variâncias. PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; SRT – serotonina; AGM – agmatina; EPD – espermidina; EPM – espermina; FEM – feniletilamina; TRM – triptamina.

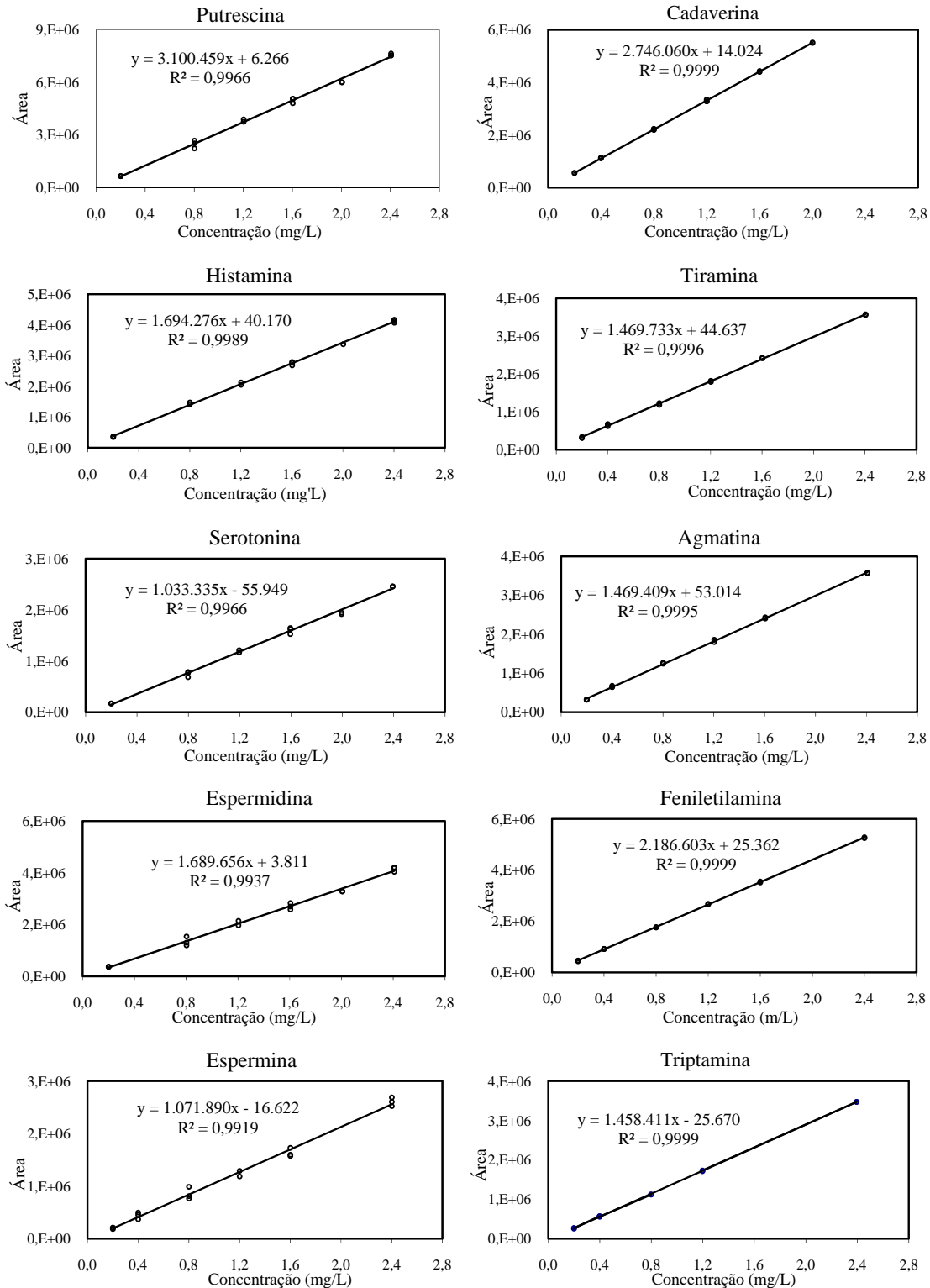


FIGURA 9. Curvas de calibração das aminas em solvente, na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L, com respectivas equações e coeficientes de determinação. Exceto cadaverina (0,2 a 2 mg/L). y = resposta em área dos picos, x = concentração da amina em mg/L, R^2 = coeficiente de determinação.

4.1.2 SELETIVIDADE E EFEITO DA MATRIZ

Os cromatogramas típicos obtidos para a solução padrão de aminas e para as amostras de uvas e vinho adicionadas de padrão encontram-se dispostos nas Figuras 10 e 11, respectivamente, indicando a seletividade do método. No mosto de uva usado nesta etapa estavam presentes a putrescina e espermidina; no vinho estavam presentes a putrescina, cadaverina, tiramina, agmatina e espermidina. Os picos apresentaram boa separação e os mesmos tempos de retenção, independente de estarem ou não na presença da matriz. A resolução dos picos indicou a capacidade do método em determinar as dez aminas, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, feniletilamina, espermina e triptamina, sem interferentes mútuos. A indisponibilidade de amostras brancas (ou seja, sem a presença de aminas) e o fato de a técnica para a análise de aminas em questão envolver a separação de multielementos similares, foram justificativas consideradas suficientes para determinação da seletividade.

4.1.2.1 Uva

As curvas de calibração das aminas foram construídas utilizando-se a matriz uva como solvente. Os valores extremos foram tratados e todas as premissas relativas ao MMQO (normalidade, homocedasticidade e independência) foram confirmadas para as curvas construídas na matriz relativas às dez aminas analisadas. A significância da regressão e os desvios de linearidade não significativos confirmaram o modelo linear e indicaram a possibilidade de comparação das inclinações e interseções pelo teste de t para avaliação do efeito da matriz (Tabela 16). As curvas de calibração das aminas construídas na matriz uva estão apresentadas na Figura 12. As curvas no solvente (dados apresentados na linearidade) e na matriz foram analisadas simultaneamente para evitar que efeitos temporais fossem interpretados como diferenças devido à matriz.

Para a espermidina, o teste de F indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas no solvente e matriz, possibilitando o uso do teste de t com variâncias combinadas para avaliação do efeito da matriz. Para o restante das aminas, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, feniletilamina, espermina e triptamina, não foi indicada a homogeneidade de variâncias entre os resíduos das curvas de solventes e matriz, sendo o teste de t com variâncias distintas o mais apropriado para a avaliação do efeito da matriz.

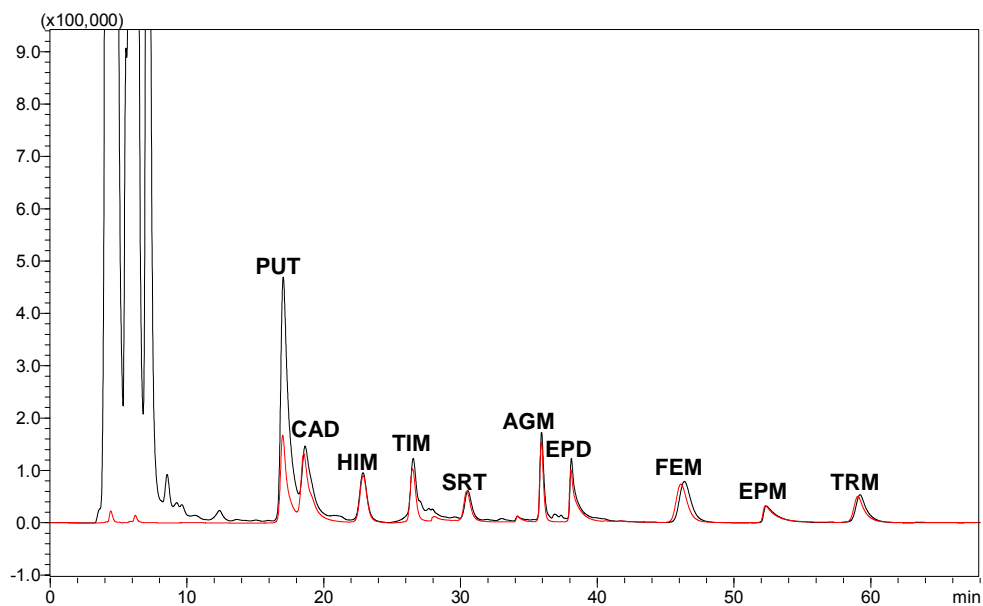


FIGURA 10. Cromatogramas da solução padrão das dez aminas no solvente (—) e adicionada à matriz vinho (—), na concentração de 2,0 mg/L. PUT - putrescina; CAD - cadaverina; HIM - histamina; TIM - tiramina; SRT - serotonina; AGM - agmatina; EPD - espermidina; EPM - espermina; FEM - feniletilamina; TRM - triptamina.

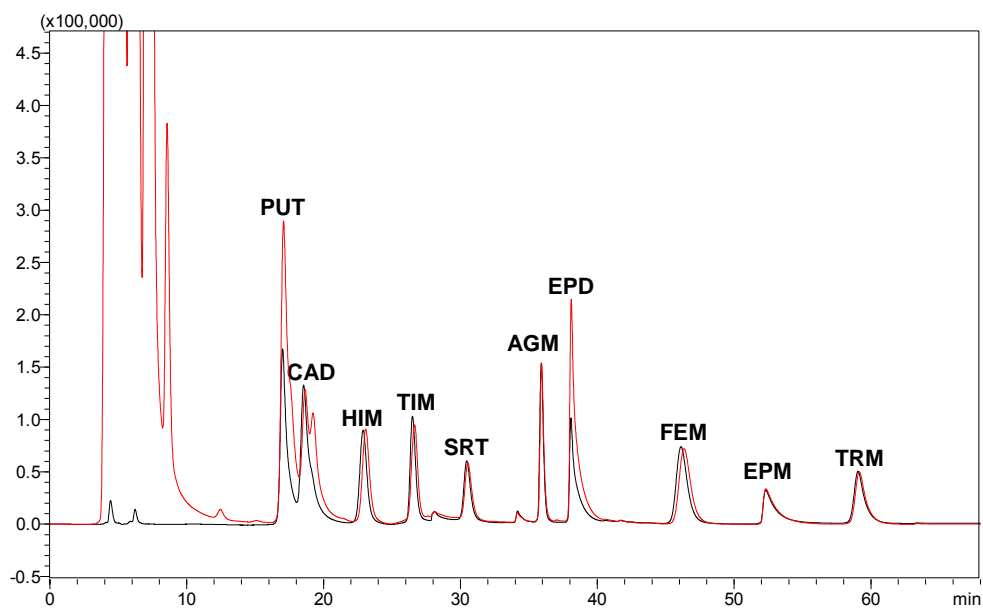


FIGURA 11. Cromatogramas da solução padrão das dez aminas no solvente (—) e adicionada à matriz uva (—), na concentração de 2,0 mg/L. PUT - putrescina; CAD - cadaverina; HIM - histamina; TIM - tiramina; SRT - serotonina; AGM - agmatina; EPD - espermidina; EPM - espermina; FEM - feniletilamina; TRM - triptamina.

TABELA 16. Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das aminas bioativas construídas em uvas

Estatística	PUT	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	EPD	FEM	EPM	TRM
<i>Número de observações</i>										
<i>n</i>	16	17	14	15	15	17	16	16	15	16
<i>Normalidade</i>										
<i>R</i>	0,988	0,9931	0,9750	0,986	0,9877	0,9733	0,981	0,985	0,969	0,994
<i>p</i>	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10
<i>Homocedasticidade</i>										
<i>t_L</i>	1,45	0,523	1,805	0,720	0,83	0,812	0,254	0,698	1,407	0,658
<i>p</i>	0,169	0,609	0,096	0,484	0,421	0,430	0,803	0,497	0,183	0,521
<i>Independência</i>										
<i>d</i>	2,355	1,173	2,854	1,606	2,184	1,320	1,627	2,214	2,128	2,468
<i>p</i>	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10
<i>Regressão</i>										
<i>F</i>	946,5	1509,89	38669,4	4969,7	9330,7	7809,0	875,9	11410,7	7255,8	10383,0
<i>p</i>	2,94 x 10 ⁻¹⁴	1,80 x 10 ⁻¹⁶	2,01 x 10 ⁻²²	2,90 x 10 ⁻¹⁹	5,88 x 10 ⁻²⁰	8,45 x 10 ⁻²²	5,03 x 10 ⁻¹⁴	8,70 x 10 ⁻²²	3,01 x 10 ⁻¹⁹	1,68 x 10 ⁻²¹
<i>Desvio da Linearidade</i>										
<i>F</i>	0,246	1,891	0,557	3,49	1,391	2,574	0,798	0,506	0,781	0,569
<i>p</i>	0,905	0,182	0,700	0,050	0,31	0,097	0,55	0,73	0,565	0,69

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *t_L* = estatística t de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão de variâncias. PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; SRT – serotonina; AGM – agmatina; EPD – espermidina; EPM – espermina; FEM – feniletilamina; TRM – triptamina.

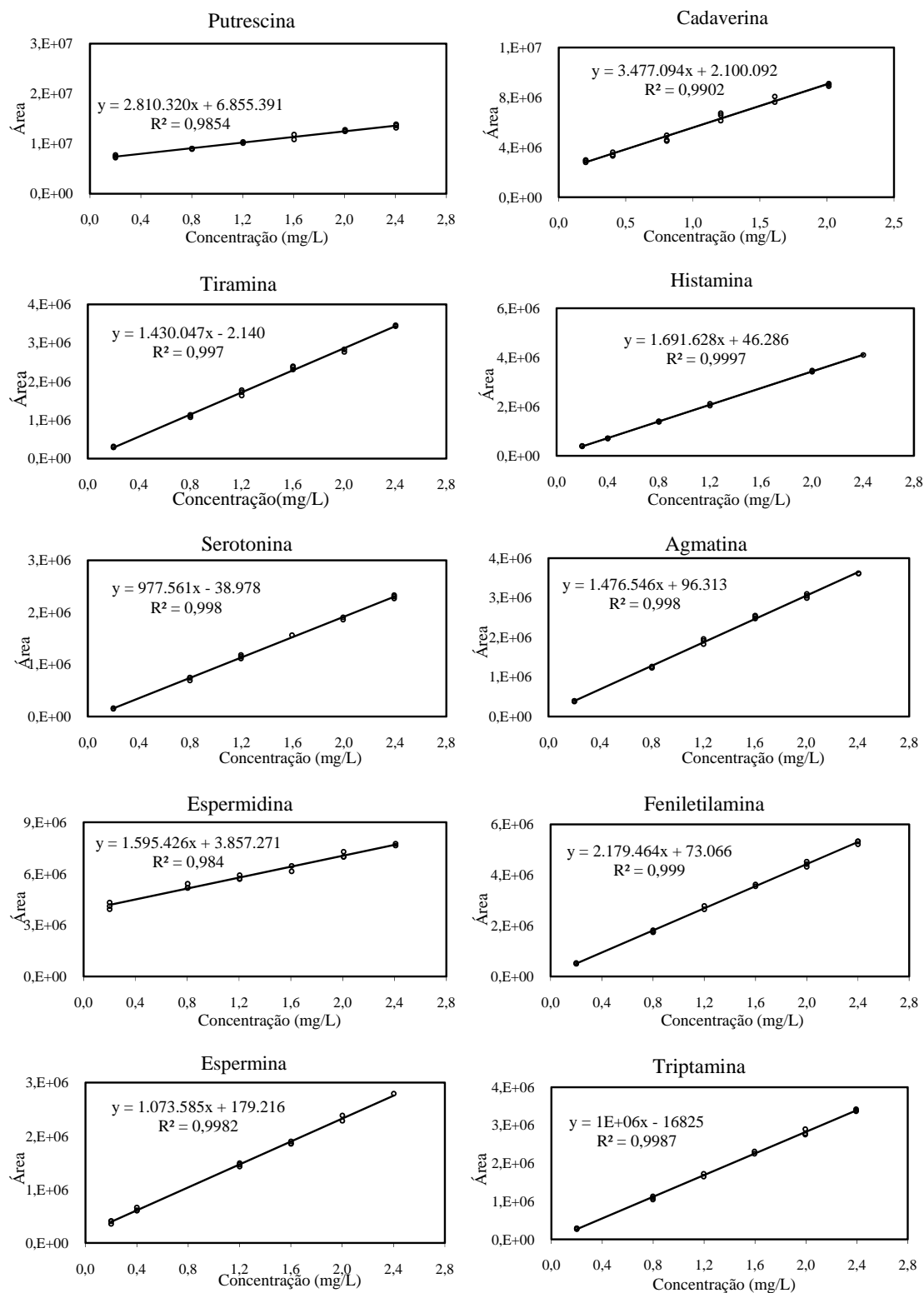


FIGURA 12. Curvas de calibração das aminas na matriz uva, na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L, com as respectivas equações e coeficientes de determinação. (Exceto cadaverina, de 0,2 a 2,0 mg/L). y = resposta em área dos picos, x = concentração da amina em mg/L, R^2 = coeficiente de determinação.

Na Tabela 17 estão expostos os resultados das comparações das inclinações e interseções das curvas de calibração construídas no solvente e na matriz. Houve diferença significativa, a 5% de probabilidade, entre as interseções das duas curvas para as aminas putrescina, cadaverina, espermidina e espermina. A inclinação foi significativamente diferente, a 5% de probabilidade, entre as duas curvas para as aminas putrescina, serotonina, espermina e triptamina. Com base nesses resultados, foi possível inferir que houve um efeito da matriz, ou seja, as curvas das aminas putrescina, cadaverina, serotonina, espermidina, espermina e triptamina no solvente não forneceram as mesmas respostas que as amostras de uvas contendo essas aminas nas mesmas faixas de concentração estudadas.

TABELA 17. Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de calibração na matriz uva com as curvas no solvente para as aminas na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L (exceto cadaverina, 0,2 a 2,0 mg/L)

Estatística	PUT	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	EPD	FEM	EPM	TRM
<i>Comparação entre as interseções</i>										
t_a	42,35	18,76	0,23	1,496	0,582	1,582	39,63	1,439	44,677	0,393
p	<<0,05	<<0,05	0,820	0,151	0,566	0,127	<<0,05	0,169	<<0,05	0,699
<i>Comparação entre as inclinações</i>										
t_b	2,080	0,197	0,146	1,825	2,918	0,375	1,47	0,331	8,810	2,412
p	0,011	0,846	0,885	0,084	0,008	0,711	0,15	0,745	<<0,05	0,028

t_a = estatística t para contrastes entre interseções, t_b = estatística t para contrastes entre inclinações, p = significância. PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; SRT – serotonina; AGM – agmatina; EPD – espermidina; EPM – espermina; FEM – feniletilamina; TRM – triptamina. Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade.

4.1.2.2 Vinho

As curvas de calibração das aminas foram construídas utilizando-se a matriz vinho como solvente. Os valores extremos foram tratados e todas as premissas relativas ao MMQO (normalidade, homocedasticidade e independência) foram confirmadas para as dez aminas analisadas em vinho. A significância da regressão e os desvios de linearidade não significativos confirmaram o modelo linear e indicaram a possibilidade de comparação das inclinações e interseções pelo teste de t para avaliação do efeito da matriz (Tabela 18). As curvas de calibração das aminas construídas na matriz vinho estão mostradas na Figura 13. Para a cadaverina, a curva de calibração na matriz foi construída com quatro pontos (0,2; 0,4;

TABELA 18. Avaliação das premissas do modelo e da linearidade para as curvas das aminas bioativas construídas em vinhos

Estatística	PUT	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	EPD	FEM	EPM	TRM
<i>Número de observações</i>										
<i>n</i>	15	10	17	16	14	14	14	16	15	16
<i>Normalidade</i>										
<i>R</i>	0,987	0,918	0,972	0,975	0,981	0,954	0,976	0,977	0,984	0,978
<i>p</i>	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10
<i>Homocedasticidade</i>										
<i>t_L</i>	0,389	0,628	2,117	1,439	1,100	1,014	1,948	0,286	0,542	1,10
<i>p</i>	0,704	0,547	0,051	0,172	0,294	0,331	0,075	0,779	0,596	0,285
<i>Independência</i>										
<i>d</i>	2,561	1,532	1,978	1,783	1,634	2,672	1,772	1,402	3,014	1,45
<i>p</i>	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10	p > 0,10
<i>Regressão</i>										
<i>F</i>	465,06	6485,01	6109,33	12143,64	17936,1	66066,1	3986,0	16141,2	5242,9	7674,8
<i>p</i>	1,46 x 10 ⁻¹¹	6,30 x 10 ⁻¹³	5,31 x 10 ⁻²¹	5,63 x 10 ⁻²²	2,02 x 10 ⁻²⁰	8,09 x 10 ⁻²⁴	1,65 x 10 ⁻¹⁶	7,69 x 10 ⁻²³	2,52 x 10 ⁻¹⁸	1,39 x 10 ⁻²⁰
<i>Desvio da Linearidade</i>										
<i>F</i>	0,176	0,297	2,302	3,213	0,859	1,092	3,212	3,470	0,395	3,086
<i>p</i>	0,910	0,827	0,124	0,061	0,527	0,422	0,075	0,0503	0,808	0,067

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *t_L* = estatística t de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão de variâncias.

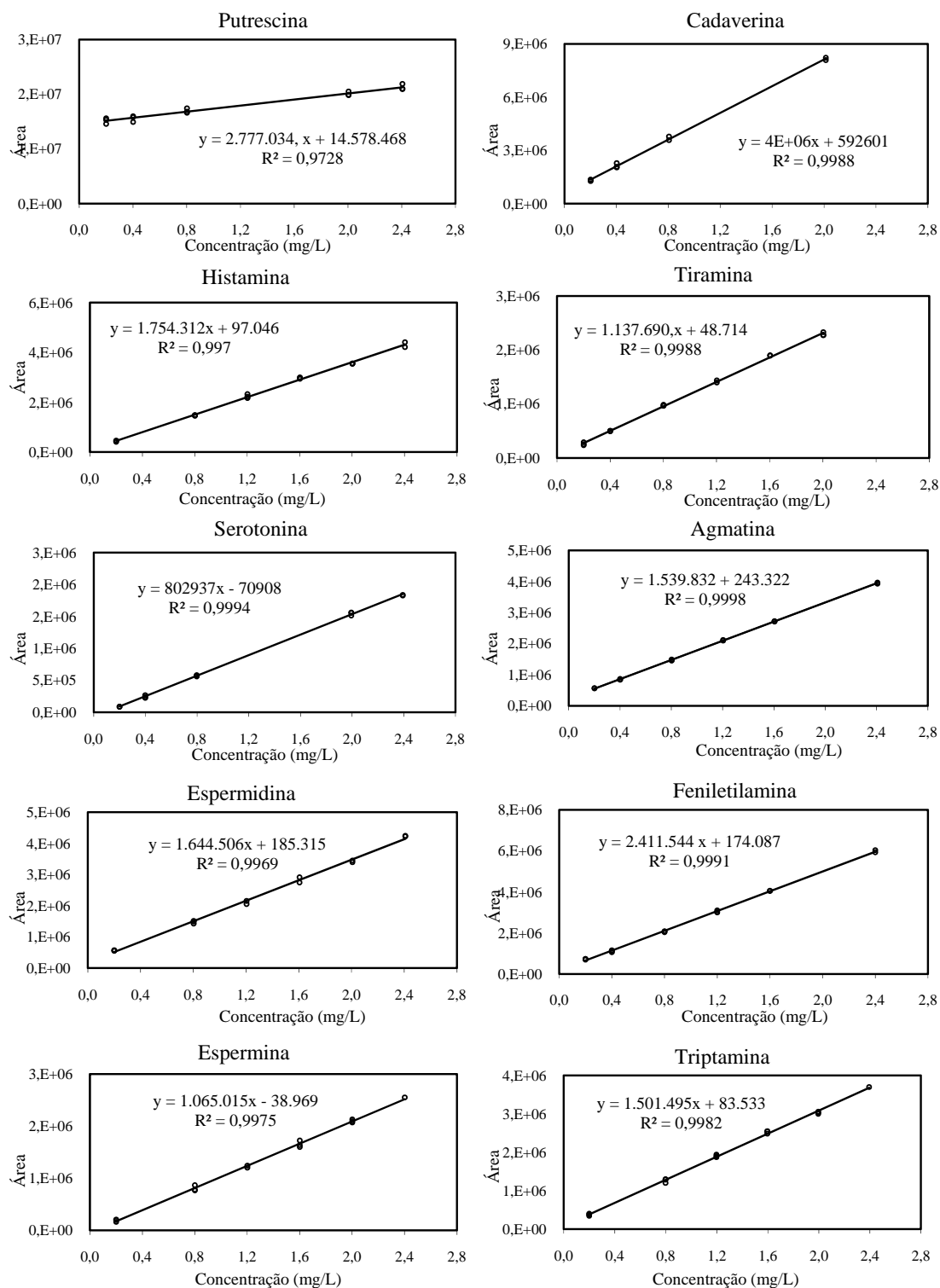


FIGURA 13. Curvas de calibração de dez aminas na matriz vinho, na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L, com as respectivas equações e coeficientes de determinação. (Exceto cadaverina e tiramina, de 0,2 a 2,0 mg/L). y = resposta em área dos picos, x = concentração da amina em mg/L, R^2 = coeficiente de determinação.

0,8; e 2,0 mg/L), uma vez que essa amina apresentou uma faixa de linearidade mais estreita que as outras aminas. No caso da tiramina, não foi possível identificar uma faixa linear na curva em vinho, incluindo o maior ponto da curva (2,4 mg/L), sendo este excluído, de forma que a faixa de linearidade ficou mais estreita (de 0,2 a 2,0 mg/L).

Para as aminas histamina, tiramina, agmatina e espermidina, o teste de F indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas de solventes e matriz, possibilitando o uso do teste de t com variâncias combinadas para avaliação do efeito da matriz. No entanto, para as aminas putrescina, cadaverina, serotonina, feniletilamina, espermina e triptamina não foram indicadas a homogeneidade de variâncias entre os resíduos das curvas de solventes e matriz pelo teste de F, indicando o uso do teste de t com variâncias distintas.

Na Tabela 19 estão expressos os resultados da comparação das inclinações e interseções das curvas de calibração construídas no solvente e matriz. Houve diferença significativa, a 5% de probabilidade, entre as interseções das duas curvas para as aminas putrescina, cadaverina, tiramina, agmatina, espermidina, feniletilamina e triptamina. A inclinação foi significativamente diferente, a 5% de probabilidade, entre as duas curvas para as aminas putrescina, cadaverina, histamina, serotonina, agmatina, feniletilamina e triptamina. Com base nesses resultados, foi possível inferir que houve um efeito da matriz, ou seja, as curvas no solvente de todas as aminas estudadas, exceto a espermina, não forneceram as mesmas respostas que as amostras de vinho contendo essas aminas nas mesmas faixas estudadas.

TABELA 19. Comparação entre as interseções e inclinações das curvas de calibração na matriz vinho com as curvas no solvente para as aminas na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L (exceto cadaverina e tiramina, 0,2 a 2,0 mg/L)

Estatística	PUT	CAD	HIM	TIM	SRT	AGM	EPD	FEM	EPM	TRM
<i>Comparação entre as interseções</i>										
t_a	72,080	10,471	1,339	26,200	0,426	13,819	2,653	6,052	0,566	4,420
p	<<0,05	<<0,05	0,192	<<0,05	0,675	<<0,05	0,013	<<0,05	0,577	<<0,05
<i>Comparação entre as inclinações</i>										
t_b	2,351	5,799	2,052	0,252	13,449	6,386	2,055	11,117	0,237	2,425
p	0,033	<<0,05	0,041	0,803	<<0,05	<<0,05	0,332	<<0,05	0,815	0,027

t_a = estatística t para contrastes entre interseções, t_b = estatística t para contrastes entre inclinações, p = significância. PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; SRT – serotonina; AGM – agmatina; EPD – espermidina; EPM – espermina; FEM – feniletilamina; TRM – triptamina. Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade.

4.1.3 PRECISÃO E EXATIDÃO

O teste de Grubbs não indicou mais do que dois valores dispersos (22,2% dos nove dados originais), a 5% de significância, entre os resultados de recuperação aparente obtidos para amostras adicionadas das dez aminas em todos os níveis de concentração estudados. Os resíduos obtidos pela diferença entre a recuperação aparente média e os valores individuais de recuperação aparente em cada dia, para cada nível de concentração, apresentaram distribuição normal ($p > 0,10$) e homocedasticidade ($p > 0,05$), permitindo a estimativa do desvio padrão relativo de repetitividade (DPR_r) e do desvio padrão relativo de reprodutibilidade (DPR_R) por análise de variância.

4.1.3.1 Uva

As médias de recuperação aparente alcançadas para amostras de uva adicionadas de 0,2 a 2,4 mg/L (0,2 a 2,0 mg/L para cadaverina) variaram entre 94,46 e 104,16% para as aminas estudadas. Médias de recuperação aparente aceitáveis foram atingidas na faixa de 0,2 e 2,0 mg/L para cadaverina e de 0,2 a 2,4 mg/L para o restante das aminas. Os valores de DPR_r variaram entre 0,62 e 20,76% para as aminas analisadas, valores de DPR_r acima dos aceitáveis foram observados para espermidina, nos níveis de 0,2 e 0,4 mg/L e no nível de 0,2 mg/L para cadaverina e espermina. Os valores de DPR_R estiveram entre 0,73 e 16,96% para as aminas estudadas, sendo que, valores de DPR_R acima dos critérios aceitáveis foram identificados para o nível 0,2 mg/L de cadaverina e espermidina. Valores de DPR_R e de DPR_r idênticos foram estimados quando a variância de repetitividade foi maior que a de reprodutibilidade, sendo atribuído o valor zero para variação entre ensaios (SOUZA, 2007) (Tabelas 20 e 21).

Estes resultados sinalizaram a faixa de aplicabilidade do método validado na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L para putrescina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, feniletilamina e triptamina; de 0,4 a 2,0 mg/L para cadaverina; de 0,4 a 2,4 para espermina; e de 0,8 a 2,4 mg/L para espermidina (Tabela 22).

TABELA 20. Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de uva e vinho adicionadas de putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina e espermidina em diferentes níveis de concentração

Concentração (mg/L)	Uva			Vinho		
	\bar{R} (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)	\bar{R} (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)
<i>Putrescina</i>						
0,2	102,05	12,89	12,89	106,23	20,46	25,45
0,4	99,66	10,72	10,72	85,63	42,30	42,30
0,8	98,69	4,43	5,82	93,98	10,55	12,40
2,0	100,35	3,05	3,05	98,81	5,28	5,28
2,4	99,37	4,16	4,16	102,32	9,32	9,32
<i>Cadaverina</i>						
0,2	100,98	14,96	16,96	94,51	4,20	4,84
0,4	94,46	10,73	10,73	98,77	2,96	7,13
0,8	98,18	6,58	8,60	101,51	4,40	6,44
2,0	98,33	1,01	2,44	99,57	1,19	1,45
2,4	-	-	-	-	-	-
<i>Histamina</i>						
0,2	101,45	2,55	3,15	96,57	10,37	10,37
0,4	98,71	2,75	2,75	98,05	4,89	4,89
0,8	100,38	1,81	1,81	100,77	2,41	3,36
2,0	100,22	0,73	0,73	98,52	2,07	2,51
2,4	99,63	2,17	2,17	100,76	2,66	2,66
<i>Tiramina</i>						
0,2	100,23	4,84	4,84	97,80	10,04	11,10
0,4	98,15	4,36	4,36	97,45	3,93	4,30
0,8	99,65	2,63	3,64	101,12	4,89	4,89
2,0	98,17	1,73	1,97	99,95	1,95	1,95
2,4	100,41	0,94	0,94	-	-	-
<i>Serotonina</i>						
0,2	101,75	3,12	4,33	113,52	6,70	12,54
0,4	97,87	1,83	1,83	97,88	5,47	5,47
0,8	100,50	0,80	0,80	98,33	1,90	4,71
2,0	99,22	1,30	1,30	100,50	1,08	1,08
2,4	100,71	2,15	2,15	101,97	2,11	2,87
<i>Agmatina</i>						
0,2	98,65	2,63	2,63	100,77	5,29	5,29
0,4	98,57	2,49	2,49	99,09	2,52	2,52
0,8	99,53	1,24	2,92	100,11	3,91	3,91
2,0	99,49	0,62	1,86	98,65	1,51	1,62
2,4	99,26	2,32	2,75	100,19	0,89	0,89
<i>Espermidina</i>						
0,2	104,16	20,76	20,76	104,66	7,01	11,61
0,4	97,88	13,74	13,74	102,25	2,86	2,86
0,8	99,85	4,18	4,18	97,02	3,10	7,25
2,0	98,51	2,51	2,51	102,21	5,20	5,20
2,4	97,50	5,15	5,15	102,48	4,01	4,01

\bar{R} (%)= média de recuperação aparente, DPR_r = desvio padrão relativo de repetitividade, DPR_R = desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial.

Critérios de aceitação de para \bar{R} : 80% a 110%.

Critérios de aceitação para DPR_r: 0,2 mg/L:13,59%; 0,4 mg/L; 12,24%; 0,8 mg/L:11,03%; 2,00 mg/L:9,61% e 2,4 mg/L: 9,35% (Tabela 10).

Critérios de aceitação para DPR_R: 0,2 mg/L:20,38%; 0,4 mg/L; 18,36%; 0,8 mg/L:16,53%; 2,00 mg/L:14,41% e 2,4 mg/L: 14,02% (Tabela 10).

Dados marcados em negrito: maiores que o critério de aceitabilidade para o nível estudado.

TABELA 21. Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de uva e vinho adicionadas de feniletilamina, espermina e triptamina em diferentes níveis de concentração

Concentração (mg/L)	Uva			Vinho		
	\bar{R} (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)	\bar{R} (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)
<i>Feniletilamina</i>						
0,2	102,47	2,83	2,83	98,42	6,08	9,94
0,4	97,59	1,02	1,02	97,15	6,25	6,25
0,8	100,77	0,91	0,91	100,39	1,60	3,16
2,0	99,46	1,92	1,92	98,69	1,81	2,87
2,4	100,16	1,88	1,88	100,64	2,91	3,01
<i>Espermina</i>						
0,2	98,25	14,23	14,23	111,83	8,56	16,58
0,4	99,76	10,53	11,19	96,69	10,76	10,76
0,8	100,74	8,02	8,02	100,25	6,45	6,45
2,0	100,28	3,18	3,18	100,28	1,58	1,58
2,4	100,65	4,76	7,14	102,80	4,48	4,48
<i>Triptamina</i>						
0,2	103,69	2,85	3,68	99,71	7,13	7,13
0,4	97,94	3,55	3,55	98,43	1,99	2,43
0,8	99,30	4,54	4,54	101,07	4,10	4,18
2,0	99,19	0,73	1,08	99,57	2,19	2,34
2,4	100,17	1,59	1,59	100,94	4,13	4,13

\bar{R} (%)= média de recuperação aparente, DPR_r = desvio padrão relativo de repetitividade, DPR_R = desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial.

Critérios de aceitação de para \bar{R} : 80% a 110%.

Critérios de aceitação para DPR_r: 0,2 mg/L:13,59%; 0,4 mg/L: 12,24%; 0,8 mg/L:11,03%; 2,00 mg/L:9,61% e 2,4 mg/L: 9,35% (Tabela 10).

Critérios de aceitação para DPR_R: 0,2 mg/L:20,38%; 0,4 mg/L: 18,36%; 0,8 mg/L:16,53%; 2,00 mg/L:14,41% e 2,4 mg/L: 14,02% (Tabela 10).

Dados marcados em negrito: maiores que o critério de aceitabilidade para o nível estudado.

TABELA 22. Faixas de aplicabilidade do método validado para análise das aminas em uvas

Aminas	Faixa de aplicabilidade do método (mg/L)
Putrescina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, feniletilamina e triptamina	0,2 a 2,4
Espermina	0,4 a 2,4
Cadaverina	0,4 a 2,0
Espermidina	0,8 a 2,4

4.1.3.2 Vinho

As médias de recuperação aparente alcançadas para amostras de vinho adicionadas entre 0,2 a 2,4 mg/L (0,2 a 2,0 mg/L para cadaverina e tiramina) variaram entre 85,63 e 118,83%; os valores de DPR_r variaram entre 0,89 e 42,30% e os valores de DPR_R estiveram entre 0,89 e 42,30% para as aminas analisadas. Médias de recuperação aparente aceitáveis não foram atingidas somente para o nível de

concentração 0,2 mg/L para as amins serotonina e espermina. Valores de DPR_r acima dos aceitáveis foram observados para putrescina nos níveis de 0,2 e 0,4 mg/L. Além disso, DPR_R acima dos critérios aceitáveis foram identificados para os dois primeiros níveis de concentração da amina putrescina (Tabelas 20 e 21). Estes resultados, bem como os demais, sinalizaram a faixa de aplicabilidade do método validado na faixa de 0,2 a 2,4 mg/L para histamina, agmatina, espermidina, feniletilamina e triptamina; de 0,2 a 2,0 mg/L para cadaverina e tiramina; de 0,4 a 2,4 para serotonina e espermina; e de 0,8 a 2,4 mg/L para putrescina (Tabela 23).

TABELA 23. Faixas de aplicabilidade do método validado para análise das amins em vinho

Amins	Faixa de aplicabilidade do método (mg/L)
Histamina, agmatina, espermidina, feniletilamina e triptamina	0,2 a 2,4
Serotonina e espermina	0,4 a 2,4
Cadaverina e tiramina	0,2 a 2,0
Putrescina	0,8 a 2,4

4.1.4 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E DETECÇÃO

Os limites de detecção calculados para cada amina estão mostrados na Tabela 24. Esses valores se referem a leitura da concentração de amins da solução HCl 0,1 mol/L acrescido de três vezes o desvio padrão. Tendo em vista a distribuição normal, a probabilidade de valores maiores que o limite de detecção serem confundidos com zero (ausência de amins) é de 0,26%. Os limites de detecção variaram de 0,013 a 0,146 mg/L para as amins avaliadas em uva e de 0,007 a 0,288 mg/L para as amins avaliadas em vinhos.

O limite de quantificação experimental do método variou conforme a amina validada, encontrando-se dispostos na Tabela 24. O limite de quantificação para as amins correspondeu ao menor nível de concentração estudado no qual os experimentos indicaram exatidão e precisão do método. Os limites de quantificação variaram de 0,2 a 0,8 mg/L para as amins avaliadas em uvas e vinhos

TABELA 24. Limites de detecção e de quantificação para as aminas estudadas nas matrizes uva e vinho

Aminas	Limite de detecção (mg/L)		Limite de quantificação (mg/L)	
	Uva	Vinho	Uva	Vinho
Putrescina	0,029	0,030	0,20	0,80
Cadaverina	0,013	0,007	0,40	0,20
Histamina	0,137	0,057	0,20	0,20
Tiramina	0,146	0,123	0,20	0,20
Serotonina	0,096	0,288	0,20	0,40
Agmatina	0,088	0,089	0,20	0,20
Espermidina	0,071	0,081	0,80	0,40
Feniletilamina	0,050	0,046	0,20	0,20
Espermina	0,033	0,235	0,40	0,40
Triptamina	0,099	0,105	0,20	0,20

4.2 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DAS AMINAS CONJUGADAS EM VINHOS

Para a otimização da hidrólise das aminas conjugadas foi utilizada uma estratégia seqüencial de planejamentos fatoriais. Na Tabela 25 estão expressos os resultados do primeiro planejamento fatorial realizado com o objetivo de se obter a condição ótima para a hidrólise das aminas conjugadas de vinhos. As variáveis independentes analisadas foram a temperatura e o tempo de hidrólise, a concentração do HCl e a temperatura do processo de concentração; sendo a variável de resposta, o teor de espermidina conjugada, que foi a única amina encontrada na forma conjugada. O teor de espermidina conjugada variou de 0,057 a 2,053 mg/L para as condições avaliadas.

Na Tabela 26 estão descritos os efeitos padronizados, bem como o desvio padrão e os valores de t e p para as variáveis principais. Somente a variável temperatura de hidrólise foi estatisticamente significativa, a 5% de probabilidade. As interações entre as variáveis principais também não foram significativas e, portanto, não estão dispostos na Tabela 26.

A análise dos efeitos padronizados para a variável temperatura de hidrólise permite concluir que esta possui um efeito positivo na variável de resposta, ou seja, um aumento da temperatura acarretaria em um aumento no teor de espermidina conjugada.

A influência da temperatura de hidrólise no teor de espermidina conjugada foi confirmada pela significância da regressão ($p < 0,05$) na análise de variância (Tabela 27). Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e

adicionados à falta de ajuste. O coeficiente de determinação (R^2) do modelo proposto foi de 70,6%. O baixo coeficiente de correlação e a significância da falta de ajuste demonstram um ajuste não adequado dos dados experimentais a um modelo não linear de primeira ordem. Com base neste resultado, um segundo experimento fatorial foi proposto com a adição dos pontos axiais, possibilitando a estimativa de um modelo de segunda ordem.

TABELA 25. Matriz do primeiro planejamento experimental realizado para otimização da hidrólise da espermidina conjugada em vinho

Tratamentos	Temperatura de hidrólise (°C)	Tempo de hidrólise (h)	Concentração de HCl (mol/L)	Temperatura de concentração (°C)	Espermidina conjugada (mg/L)
1	50	10	12	40	0,057
2	50	10	12	80	0,061
3	50	10	6	40	0,096
4	50	10	6	80	0,133
5	50	24	12	40	0,073
6	50	24	12	80	0,108
7	50	24	6	40	0,131
8	50	24	6	80	0,325
9	110	10	12	40	0,490
10	110	10	12	80	0,930
11	110	10	6	40	1,019
12	110	10	6	80	2,053
13	110	24	12	40	1,615
14	110	24	12	80	0,855
15	110	24	6	40	1,063
16	110	24	6	80	1,111
17	80	17	9	60	0,721
18	80	17	9	60	0,793
19	80	17	9	60	0,780

TABELA 26. Efeitos padronizados, desvio padrão, valor de t e probabilidade das variáveis independentes do primeiro planejamento fatorial para o teor de espermidina conjugada

	Efeitos padronizados	Desvio padrão	t(14)	p
Média	0,6534	0,0740	8,8272	0,0000
Temperatura de hidrólise	1,0190	0,1613	6,3167	0,0000
Tempo de hidrólise	0,0554	0,1613	0,3434	0,7364
Concentração HCl	- 0,2179	0,1613	1,3507	0,1982
Temperatura da concentração	0,1291	0,1613	0,8001	0,4370

Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade.

Como a temperatura de concentração não foi significativa no primeiro experimento, esta não foi analisada como variável independente no segundo planejamento, sendo a mesma fixada em 60 °C. Apesar do tempo de hidrólise não ter sido significativo, este foi mantido no planejamento com o objetivo de se reduzir o tempo de análise. A concentração do HCl também foi mantida como variável independente no experimento, buscando-se trabalhar com concentração de ácido mais branda.

TABELA 27. Análise de variância referente ao primeiro planejamento para o teor de espermidina conjugada

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	1	4,153	4,153	40,904	0,000
Resíduo	17	1,726	0,102		
Falta de ajuste	15	1,723	0,115	77,776	0,013
Erro puro	2	0,003	0,001		
Total	18	5,880			

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, QM: quadrados médios. Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade.

O DCCR proposto no segundo planejamento fatorial está descrito na Tabela 28, bem como os resultados obtidos. Para os novos níveis das variáveis independentes testadas foi possível também quantificar a feniletilamina conjugada na amostra de vinho. O teor de feniletilamina conjugada variou de não detectado a 0,181 mg/L e o de espermidina conjugada variou de 0,179 mg/L a 2,429 mg/L, para os diversos tratamentos propostos.

A análise de variância (Tabelas 29 e 30) demonstrou que as variáveis independentes analisadas, tempo e temperatura de hidrólise e concentração de HCl, não influenciaram significativamente as variáveis das respostas teores de espermidina e de feniletilamina conjugada ($p < 0,05$).

Tendo em vista que a variável tempo de hidrólise não foi significativa, o menor nível estudado foi fixado para o terceiro planejamento, ou seja, 5 horas. O nível mais alto de temperatura avaliado, 120 °C, não foi operacional, uma vez que provocou um pequeno derretimento da tampa do tubo de reação, optando-se por trabalhar com 107 °C como temperatura de hidrólise do nível mais alto no terceiro planejamento. Apesar da concentração de HCl não ter sido significativa para explicar os teores de aminas conjugadas, optou-se também por trabalhar com concentrações de ácido

menores, uma vez que os maiores teores de aminas conjugadas recuperados ocorreram quando concentrações de HCl entre 6 e 9 mol/L foram utilizadas.

TABELA 28. Matriz do segundo planejamento experimental realizado para otimização da hidrólise da espermidina e feniletilamina conjugada em vinho (Temperatura de concentração fixada em 60 °C)

Tratamentos	Temperatura de hidrólise (°C)	Tempo de hidrólise (h:min)	Concentração de HCl (mol/L)	Espermidina conjugada (mg/L)	Feniletilamina conjugada (mg/L)
1	88	07:25	7,2	0,662	0,163
2	88	14:34	7,2	0,781	0,166
3	88	07:25	10,8	0,368	0,118
4	88	14:34	10,8	0,596	0,142
5	112	07:25	7,2	0,488	0,111
6	112	14:34	7,2	0,179	0,000
7	112	07:25	10,8	0,778	0,153
8	112	14:34	10,8	0,769	0,148
9	80	11:00	9	0,543	0,137
10	120	11:00	9	0,944	0,000
11	100	11:00	6	2,429	0,177
12	100	11:00	12	1,988	0,000
13	100	05:00	9	0,508	0,125
14	100	17:00	9	1,903	0,119
15	100	11:00	9	0,607	0,109
16	100	11:00	9	1,079	0,121
17	100	11:00	9	0,609	0,181

TABELA 29. Análise de variância referente ao segundo planejamento para o teor de espermidina conjugada

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	9	2,3607	0,2623	3,5465	0,2393
Resíduo	7	3,1721	0,4532		
Falta de ajuste	5	3,0242	0,6048	8,1777	0,1125
Erro puro	2	0,1479	0,0740		
Total	16	6,1811			

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, QM: quadrados médios.

TABELA 30. Análise de variância referente ao segundo planejamento para o teor de feniletilamina conjugada

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	9	0,0323	0,0036	2,3927	0,3294
Resíduo	7	0,0245	0,0035		
Falta de ajuste	5	0,0215	0,0043	2,8582	0,2792
Erro puro	2	0,0030	0,0015		
Total	16	0,0569			

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, QM: quadrados médios.

O terceiro planejamento fatorial proposto, bem como os resultados em termos dos teores de espermidina e feniletilamina conjugadas, estão apresentados na Tabela 31. Tais teores variaram de 1,336 a 2,474 mg/L e de não detectado a 0,171 mg/L, para espermidina e feniletilamina, respectivamente.

TABELA 31. Matriz do terceiro planejamento experimental realizado para otimização da hidrólise da espermidina e feniletilamina conjugada em vinho (Temperatura de concentração fixada em 60 °C e tempo fixado em 5 horas)

Tratamentos	Temperatura de hidrólise (°C)	Concentração de HCl (mol/L)	Espermidina conjugada (mg/L)	Feniletilamina conjugada (mg/L)
1	78	3,9	1,579	0,141
2	78	8,1	1,409	0,115
3	102	3,9	2,474	0,000
4	102	8,1	1,855	0,124
5	73	6	1,336	0,112
6	107	6	2,291	0,146
7	90	3	2,158	0,000
8	90	9	1,738	0,160
9	90	6	2,073	0,155
10	90	6	2,077	0,167
11	90	6	2,027	0,171

A análise dos efeitos padronizados das variáveis independentes estudadas sobre os teores de espermidina conjugada recuperados pode ser observada na Tabela 32. As variáveis, temperatura de hidrólise e concentração do ácido, foram significativas tanto para o modelo linear quanto para o quadrático, bem como a interação entre estas foi significativa ($p < 0,05$).

TABELA 32. Efeitos padronizados, desvio padrão, valor de t e probabilidade do terceiro planejamento fatorial para o teor de espermidina conjugada

	Efeitos padronizados	Desvio padrão	t(5)	p
Média	2,059	0,028	74,832	0,000
Temperatura de hidrolise (L)	0,674	0,034	19,967	0,000
Temperatura de hidrolise (Q)	-0,272	0,040	-6,759	0,001
Concentração HCl (L)	-0,346	0,034	-10,265	0,000
Concentração HCl (Q)	-0,137	0,040	-3,404	0,019
Interação	-0,225	0,048	-4,715	0,005

L: modelo linear e Q: modelo quadrático. Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade

Os efeitos padronizados dispostos na Tabela 33 indicam que a concentração do ácido afetou os teores de feniletilamina conjugada, tanto para o modelo linear como para o quadrático.

TABELA 33. Efeitos padronizados, desvio padrão, valor de t e probabilidade do terceiro planejamento fatorial para o teor de feniletilamina conjugada

	Efeitos padronizados	Desvio padrão	t(5)	p
Média	0,165	0,021	7,925	0,000
Temperatura de hidrolise (L)	-0,021	0,025	-0,821	0,449
Temperatura de hidrolise (Q)	-0,040	0,030	-1,332	0,240
Concentração HCl (L)	0,081	0,025	3,191	0,024
Concentração HCl (Q)	-0,089	0,030	-2,949	0,032
Interação	0,075	0,036	2,072	0,093

L: modelo linear e Q: modelo quadrático. Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade.

A análise de variância para o teor de espermidina conjugada confirmou a significância das variáveis independentes analisadas para explicar as variações nos teores entre os diversos tratamentos testados, como pode ser observado na Tabela 34.

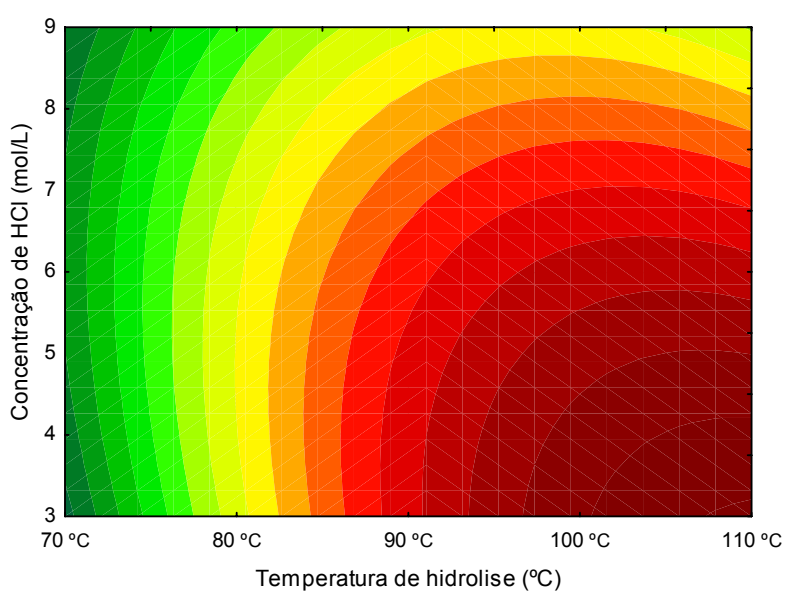
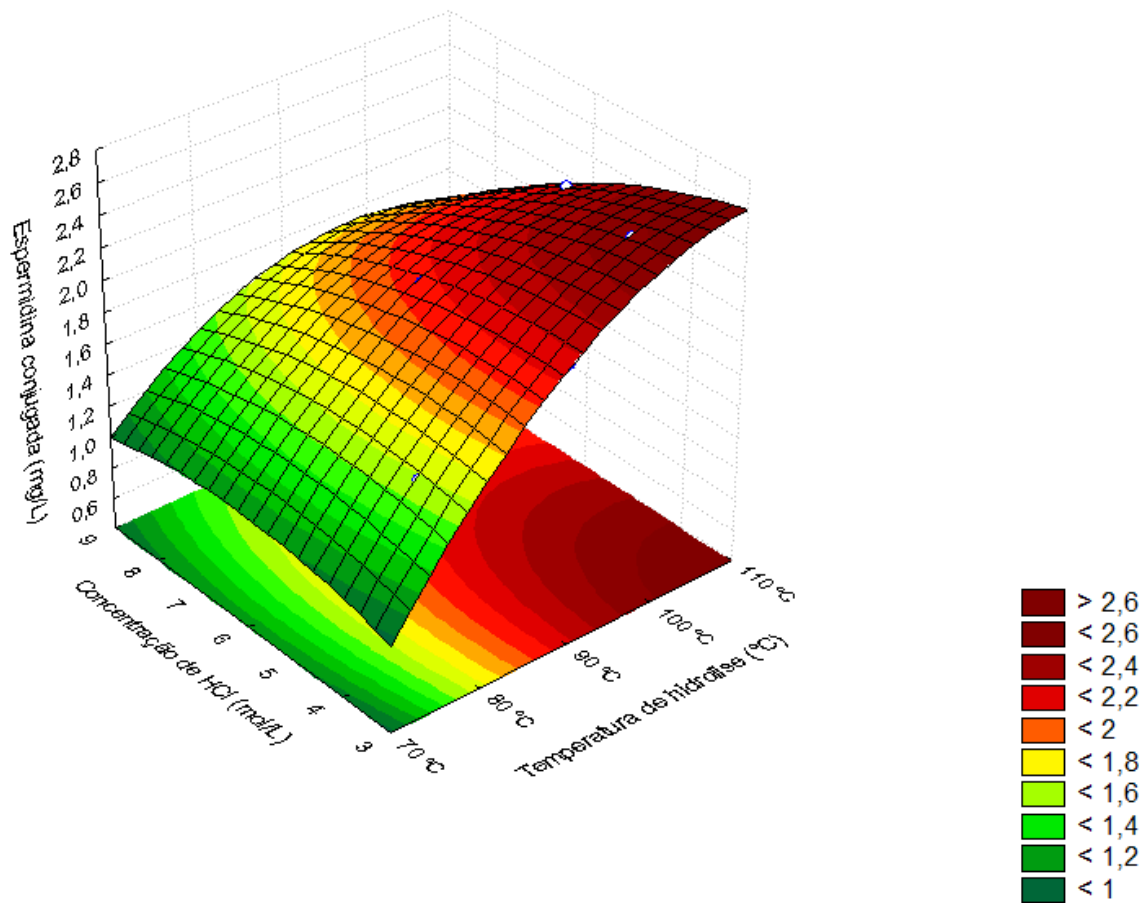
O coeficiente de determinação (R^2) de 99,14% para o modelo ajustado, a não significância da falta de ajuste e uma regressão significativa ($p < 0,05$) demonstraram que os dados estão bem explicados pelo modelo proposto. A equação do modelo codificado ajustado, que descreve as curvas de contorno e superfícies de resposta mostradas na Figura 14 é a que se segue:

$$\text{EPD conjugada (mg/L)} = 2,059 + 0,337 T(^{\circ}\text{C}) - 0,136 T(^{\circ}\text{C})^2 - 0,173 [\text{HCl}] - 0,068 [\text{HCl}]^2 - 0,112 T(^{\circ}\text{C}) [\text{HCl}]$$

TABELA 34. Análise de variância referente ao terceiro planejamento fatorial para o teor de espermidina conjugada

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	5	1,3042	0,2608	114,8488	0,000
Resíduo	5	0,0114	0,0023		
Falta de ajuste	3	0,0098	0,0033	4,2614	0,1959
Erro puro	2	0,0015	0,0008		
Total	10	1,3156			

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, QM: quadrados médios. Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade.



(b)

FIGURA 14. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para o teor de espermidina conjugada em função da temperatura de hidrólise e da concentração do HCl.

A significância da regressão ajustada confirmou o efeito da concentração de HCl no teor de feniletilamina conjugada. Após a remoção das variáveis não significativas do modelo ajustado, o R^2 calculado diminuiu de 82,82% para 59,64%, indicando que não houve um bom ajuste dos valores experimentais ao modelo, para esta amina (Tabela 35).

TABELA 35. Análise de variância referente ao terceiro planejamento para o teor de feniletilamina conjugada

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	2	0,022	0,011	5,910	0,027
Resíduo	8	0,015	0,002		
Falta de ajuste	6	0,015	0,003	37,173	0,026
Erro puro	2	0,000	0,000		
Total	10	0,038			

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, QM: quadrados médios. Valores em negrito são significativos a 5% de probabilidade.

A equação do modelo codificado ajustado está detalhada abaixo, bem como o gráfico que representa os teores de feniletilamina em função da concentração do ácido clorídrico exposto na Figura 15:

$$\text{FEM conjugada (mg/L)} = 0,146 + 0,406 [\text{HCl}] - 0,389 [\text{HCl}]^2$$

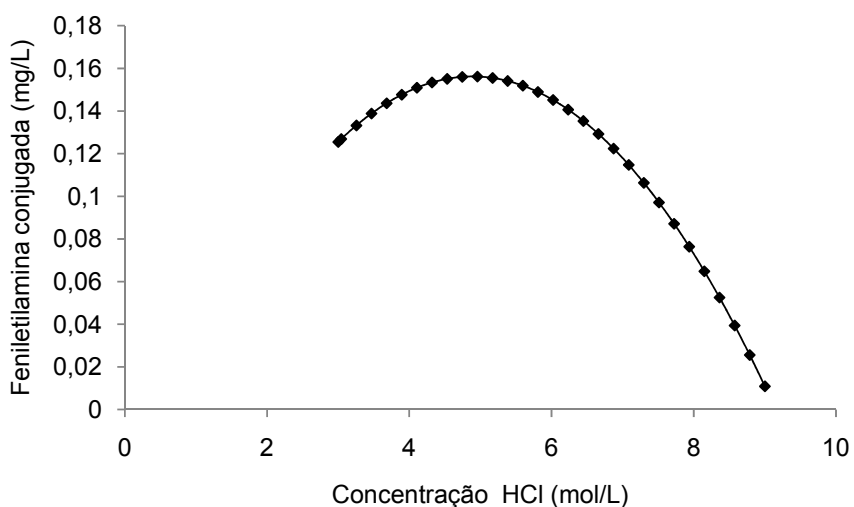


FIGURA 15. Teores de feniletilamina conjugada em função da concentração de HCl.

A análise dos resultados dos planejamentos fatoriais definiu a condição ótima de hidrólise das aminas conjugadas, para os delineamentos propostos, e está disposta na Tabela 36. Para a hidrólise da espermidina conjugada a condição que recuperou uma maior concentração desta amina foi utilizando-se 102 °C na hidrólise e HCl a 3,9 mol/L. No entanto, nesta mesma condição não foi quantificada feniletilamina conjugada. Optou-se, então, por trabalhar com a condição que ofereceu a segunda maior recuperação de espermidina conjugada, uma vez que nessa, a recuperação de feniletilamina conjugada aproximou-se da condição ótima estabelecida.

A condição ótima experimental foi confirmada por ensaios em triplicata realizados nas condições definidas no planejamento fatorial. Para a análise da espermidina conjugada os resultados obtidos foram de $2,13 \pm 0,14$ mg/L e para a feniletilamina de $0,13 \pm 0,02$ mg/L. Esses valores aproximam-se daqueles gerados pela análise de superfície de resposta, confirmando a condição definida como ótima.

TABELA 36. Condição ótima definida para hidrólise das aminas espermidina e feniletilamina conjugadas

Variável	Condição ótima
Temperatura de hidrólise (°C)	107
Tempo de hidrólise (h)	5
Concentração HCl (mol/L)	6
Temperatura de concentração (°C)	60

4.3 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DAS AMINAS CONJUGADAS EM UVAS

Amostras do mosto de uvas também foram submetidas aos tratamentos propostos nos delineamentos fatoriais, no entanto, somente a espermina foi encontrada na forma conjugada em quantidades detectáveis, porém não quantificáveis (< 0,4 mg/L). Sendo assim, a análise estatística tornou-se inviável para definição da condição ótima.

4.4 DETERMINAÇÃO DO pH, TEOR ALCOÓLICO E DOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS EM VINHOS DO MERCADO DE BELO HORIZONTE

4.4.1 TEOR ALCOÓLICO E pH

As amostras de vinhos foram codificadas quanto ao tipo (branco, espumante, rosé e tinto) e caracterizadas quanto às informações presentes nos rótulos – variedade da uva, safra, região proveniente, teor alcoólico; e a medida do pH (Tabela 37). O teor alcoólico variou de 8 a 14,5%, embora em quatro amostras, o teor alcoólico não tenha sido apresentado no rótulo. Os valores de pH variaram de 2,90 a 3,85, sendo os maiores valores de pH observados nos vinhos tintos.

TABELA 37. Caracterização das amostras de vinho adquiridas no mercado de Belo Horizonte, MG

Amostras	Variedades das uvas	Safra	Região	% álcool	pH
B1	Sauvignon blanc	2007	Chile	13	3,18
B2	Moscato giallo	2007	RS/Brasil	11	3,59
E1	(não informado)	2007	Argentina	11,9	3,17
E2	Lambrusco	2006	Itália	8	2,90
E3	Moscatel	2007	BA/Brasil	-	3,28
E4	Chardonnay e Pinot noir	2008	RS/Brasil	12	3,33
E5	Chardonnay, Pinot noir e Merlot	2008	RS/Brasil	-	3,43
R1	Cabernet sauvignon	2007	PR/Brasil	12,5	3,82
T1	Cabernet sauvignon	2005	RS/Brasil	14	3,85
T2	Cabernet sauvignon	2006	Argentina	13	3,69
T3	Cabernet sauvignon	2005	Chile	14,5	3,47
T4	Syrah	2006	Argentina	-	3,54
T5	Cabernet sauvignon	2006	RS/Brasil	-	3,70
T6	Merlot	2006	RS/Brasil	11,5	3,59

(-) : não informado.

4.4.2 AMINAS BIOATIVAS LIVRES

Dentre as dez aminos pesquisadas, seis foram encontradas: putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e feniletilamina. A presença destas aminos em vinhos foi descrita anteriormente por diversos autores (GLÓRIA et al., 1998; SOUZA et al., 2005; MO DUGO et al., 2006; SOUFLEROS et al., 2007; MANFROI et al., 2009). De acordo com SASS-KISS et al. (2000) e KISS et al. (2006) essas aminos

podem ocorrer naturalmente no pericarpo de uvas e, portanto, em vinhos, além de poderem ser formadas durante as etapas de vinificação das uvas (GLÓRIA & VIEIRA, 2007).

De acordo com GERBAUX & MONAMY (2000), o pH parece ser um dos mais importantes fatores enológicos que influenciam as aminas biogênicas, particularmente a formação de histamina, tiramina e putrescina. No entanto, não foi possível estabelecer correlação entre teores de aminas e variedade da uva, safra, pH e teor alcoólico (5% de probabilidade).

Os teores totais de aminas, bem como a contribuição de cada uma neste teor, estão descritos na Tabela 38. O teor total das aminas analisadas variou de não detectado a 18,46 mg/L. A putrescina foi a amina que mais contribuiu para o teor total de aminas; por outro lado, a espermidina e feniletilamina foram as que menos contribuíram.

TABELA 38. Teores totais de aminas e porcentagens de contribuição das aminas detectadas nos vinhos analisados

Amostras	Teor de aminas total (mg/L)	Contribuição das aminas (%)					
		PUT	CAD	HIM	TIM	EPD	FEM
B1	1,73	67,18	nd	16,31	nd	16,51	nd
B2	1,01	-	nd	100,00	nd	nd	nd
E1	5,50	45,11	nd	8,76	41,28	4,85	nd
E2	0,72	-	nd	38,22	nd	61,78	nd
E3	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
E4	2,10	59,68	nd	19,05	nd	21,27	nd
E5	2,10	61,52	nd	20,66	nd	17,82	nd
R1	2,87	63,89	39,75	-	12,33	nd	nd
T1	7,84	17,63	23,08	49,31	20,00	nd	7,98
T2	16,91	39,39	22,47	26,34	23,75	6,86	1,36
T3	18,46	44,41	30,54	27,81	12,94	11,99	nd
T4	1,80	63,91	nd	24,21	11,87	nd	nd
T5	6,40	53,32	29,55	16,37	22,35	nd	nd
T6	10,45	50,03	30,27	23,12	21,85	nd	nd

-:traços. nd não detectado. PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; EPD – espermidina; FEM – feniletilamina.

As concentrações das aminas detectadas nos vinhos analisados variaram muito, refletindo a grande diferença entre as amostras, as variações de manejo e práticas enológicas (Tabela 39 e Figura 16). De maneira geral, os vinhos tintos exibiram maiores variedades e teores de aminas bioativas. Esse dado pode ser explicado pelo fato dos vinhos tintos normalmente passarem por duas etapas que não ocorrem em vinhos brancos, a maceração e a fermentação malolática. Segundo GLÓRIA & VIEIRA (2007), a maioria dos pesquisadores atribui a formação de aminas à fermentação

malolática, especialmente tiramina e histamina, devido à ação de bactérias envolvidas nesta fermentação. De acordo com MARTÍN-ÁLVAREZ et al. (2006), concentrações significativamente menores de histamina, tiramina e putrescina foram observadas em vinhos produzidos com um período de maceração mais curto; em vinhos elaborados com tempos de maceração mais longos os teores destas amins apresentaram-se de 2 a 4 vezes maiores.

TABELA 39. Faixas de concentração e médias das amins detectadas conforme o tipo de vinho analisado

Aminas	(mg/L)	Todos (n=14)	Branco (n=2)	Tintos (n=6)	Rosé (n=1)	Espumante (n=5)
PUT	Faixa	1,16 - 8,20	nd - 1,16	1,21 - 8,20	-- 1,84	1,25- 2,48
	Média	3,10	1,16	4,35	-	1,68
CAD	Faixa	0,39 - 0,61	nd	0,39 - 0,53	0,69	nd
	Média	0,51	nd	0,47	nd	nd
HIM	Faixa	0,27 - 5,13	0,28 - 1,01	0,46 - 5,13	-	0,27 - 0,48
	Média	1,69	0,28	2,90	-	0,4
TIM	Faixa	0,23 - 4,01	nd	0,23 - 4,01	0,36	nd - 2,27
	Média	1,82	nd	1,98	nd	2,27
EPD	Faixa	0,27 - 2,21	nd - 0,29	1,16 - 2,21	nd	0,27 - 0,45
	Média	0,74	0,29	1,69	nd	0,38
FEM	Faixa	0,23 - 0,63	nd	0,23 - 4,01	nd	nd
	Média	0,43	nd	0,43	nd	nd

-: traços. nd: não detectado. PUT – putrescina; CAD – cadaverina; HIM – histamina; TIM – tiramina; EPD – espermidina; FEM – feniletilamina.

A putrescina esteve presente em todos os vinhos analisados, em três deles em concentrações detectáveis, mas não quantificáveis (< 0,80 mg/L). Além disso, a putrescina sobressai em relação às demais, contribuindo com 17,63 a 67,18% do total de amins quantificadas. Apesar de os maiores teores de putrescina observados serem para os vinhos tintos, a maior contribuição no teor total de amins foi para uma amostra de vinho branco.

A cadaverina esteve presente somente nos vinhos tintos e rosé e os teores variaram de não detectável (< 0,2 mg/L) a 0,69 mg/L. Os maiores teores de espermidina foram observados em dois vinhos tintos, porém esta amina foi encontrada

também em vinhos brancos e espumantes, em menores teores. Para a espermidina, os teores variaram de não detectável (< 0,2 mg/L) a 2,21 mg/L (Figura 16).

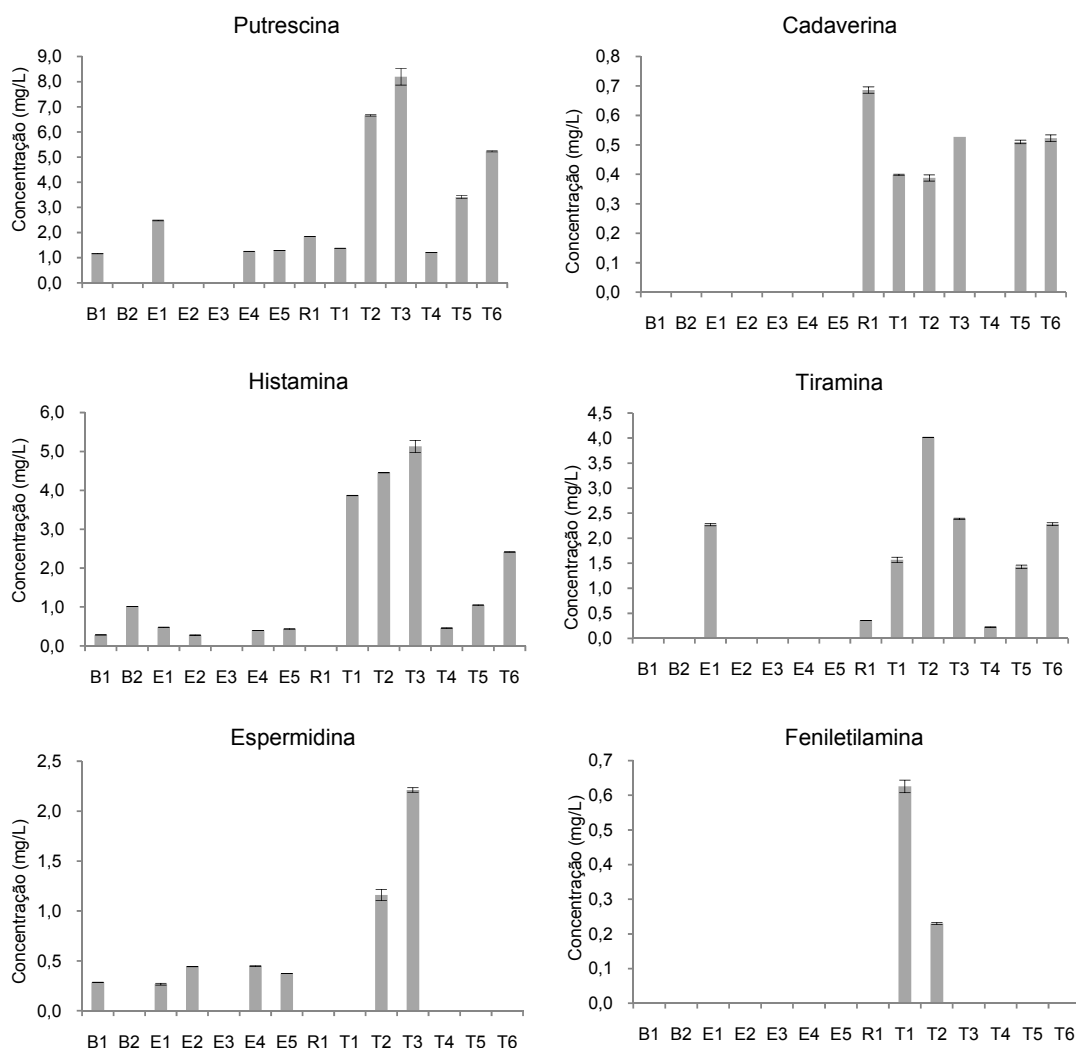


FIGURA 16. Perfil e teores de aminas bioativas livres de vinhos comerciais adquiridos no mercado de Belo Horizonte, MG. B – vinho branco, E – vinho espumante, R – rosé e T – vinho tinto.

As poliaminas espermina e espermidina estão envolvidas em diversos processos fisiológicos relevantes no desenvolvimento da planta. A putrescina é um intermediário obrigatório na síntese de espermidina. A cadaverina tem um importante papel no alongamento das células (GLÓRIA, 2005). Além disso, putrescina e cadaverina podem também ser formadas por microrganismos intencionalmente adicionados para as fermentações, ou contaminantes (SASS-KISS et al. 2000; ALCAIDE-HIDALGO et al., 2007; GLÓRIA & VIEIRA, 2007).

A histamina esteve presente em todos os vinhos analisados, com teores variando de não detectável (< 0,2 mg/L) a 5,13 mg/L. Os maiores teores de histamina

foram observados em vinhos tintos. A tiramina foi detectada nos vinhos tintos, rosé e uma das amostras de espumante, com teores que variaram de não detectável (< 0,2 mg/L) a 4,01 mg/L. Como a toxicidade das aminas biogênicas pode ser potencializada pela presença de etanol, acetaldeído e outras aminas, níveis de histamina acima de 2 mg/L e de tiramina acima de 8 mg/L podem causar dor de cabeça quando uma grande quantidade de vinho for ingerida (TAYLOR, 1986; LEHTONEN, 1996; SOUFLEROS et al., 1998). Dentre as amostras analisadas, quatro apresentaram teores de histamina maiores que 2 mg/L e nenhuma ultrapassou 8 mg/L de tiramina. A feniletilamina estava presente em duas amostras de vinhos tintos estudados, com teores variando de não detectável (< 0,2 mg/L) a 0,63 mg/L. A presença da histamina, tiramina e feniletilamina em vinhos não é desejável, uma vez que estas podem estar associadas a intoxicação histamínica, enxaquecas e crises hipertensivas (GLÓRIA & VIEIRA, 2007; ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2008).

4.4.3 AMINAS CONJUGADAS

O perfil e os teores de aminas conjugadas foram investigados em vinhos pela primeira vez. Dentre as dez aminas estudadas, somente a espermidina e a feniletilamina foram encontradas na forma conjugada. Não foi possível estabelecer correlação entre teores de aminas conjugadas, tipo de vinho, variedade da uva, safra, pH e teor alcoólico.

O teor total de aminas conjugadas nas amostras de vinho, assim como a contribuição percentual da espermidina e feniletilamina, estão dispostos na Tabela 40.

TABELA 40. Teor total de aminas conjugadas e porcentagem de contribuição das aminas detectadas nos vinhos analisados

Amostras	Teor de aminas conjugadas total (mg/L)	Contribuição das aminas (%)	
		Espermidina	Feniletilamina
B1	0,11	100,00	nd
B2	1,30	81,53	18,47
E5	0,19	100,00	nd
R1	0,33	100,00	nd
T1	0,25	100,00	nd
T4	2,26	94,37	5,63
T5	0,23	100,00	nd
T6	0,93	84,47	15,53

nd: não detectado.

Dentre as quatorze amostras de vinhos analisadas, foi encontrada espermidina na forma conjugada em oito delas. Além disso, a espermidina conjugada esteve presente em maiores concentrações, com teores variando de 0,10 a 2,13 mg/L. A feniletilamina conjugada foi encontrada em três das quatorze amostras de vinhos analisadas, com teores variando de 0,13 a 0,24 mg/L (Figura 17). Analisando-se os dados, pode-se notar que as três amostras de vinho contendo os maiores teores de espermidina conjugada, apresentaram também a amina feniletilamina na forma conjugada.

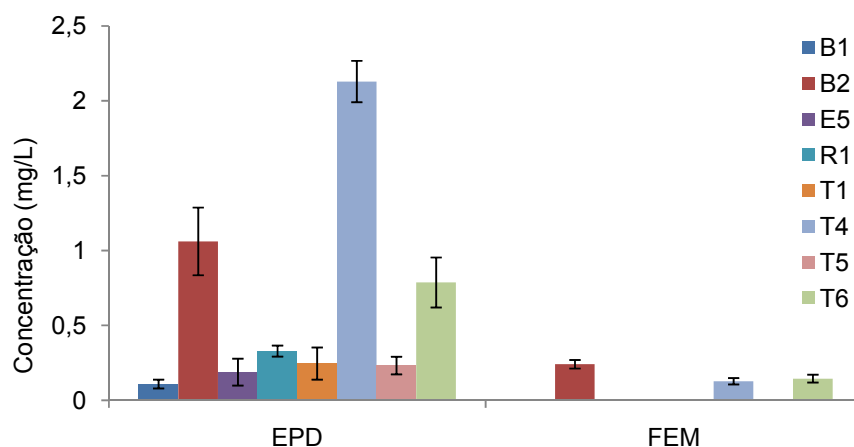


FIGURA 17. Perfil e teores de aminas conjugadas de vinhos comerciais adquiridos no mercado de Belo Horizonte, MG. B – vinho branco, E – vinho espumante, R – rose, e T – vinho tinto. EPD – espermidina e FEM – feniletilamina.

4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL E TEORES DE AMINAS LIVRES E CONJUGADAS EM UVAS

As amostras de uvas analisadas apresentaram teores de aminas totais variando de 2,05 a 5,73 mg/L. A uva Syrah apresentou teores de aminas totais maiores que as variedades de mesa, Niágara rosada e Rubi. O menor teor de aminas bioativas das variedades de mesa pode ser explicado pelo fato dessas variedades serem melhores adaptadas as condições climáticas do país do que as uvas Syrah, que são típicas de climas mais frios. Dentre as dez aminas investigadas três foram encontradas: putrescina, espermidina e espermina. A presença dessas aminas em uvas foi descrita anteriormente por diversos autores (BROQUEDIS et al., 1989; SASS-KISS et al., 2000; BOVER-CID et al., 2006; KISS et al., 2006). A espermidina foi a amina que mais

contribuiu para o teor total de aminos, exceto para a Syrah proveniente de Pirapora, que teve a putrescina com a maior contribuição. Essa diferença pode estar relacionada ao fato das condições climáticas de Pirapora serem mais drásticas para o cultivo de uvas (existe luz solar direta nas videiras e maior estresse hídrico). A planta em condições de estresse acumula putrescina ao invés de formar poliaminas que são responsáveis pelo crescimento. A espermina apresentou os menores teores entre as aminos presentes (Tabela 41).

TABELA 41. Teores totais de aminos e porcentagens de contribuição das aminos detectadas nas uvas analisados

Amostras	Teor de aminos total (mg/L)	Contribuição das aminos (%)		
		PUT	EPD	EPM
Syrah Três Corações	4,19	32,88	53,82	13,30
Syrah Pirapora	5,73	63,45	29,50	7,05
Niágara rosada	2,97	15,15	66,00	18,85
Rubi	2,05	38,11	48,25	13,64

PUT - putrescina; EPD - espermidina; EPM - espermina.

As uvas Syrah provenientes de Pirapora e Três Corações foram obtidas de plantas da mesma variedade, com o mesmo porta-enxerto e cultivadas em condições semelhantes nas duas localidades, portanto a variação nos teores de aminos entre as amostras pode ser atribuída as diferenças entre as regiões onde as mesmas foram cultivadas. Segundo GLÓRIA & VIEIRA (2007), o perfil e os teores de aminos em uvas podem variar conforme a fase de desenvolvimento e maturação da uva, variedade, safra, microbiota, tipo e composição do solo, fertilizantes e condições climáticas durante o crescimento.

O teor de putrescina variou de 0,45 a 3,63 mg/L e de espermidina de 0,99 a 2,25 mg/L para as amostras analisadas. A espermidina é geralmente abundante no pericarpo de uvas, seguido do seu precursor obrigatório, putrescina (KALAC & GLÓRIA, 2009). O teor de espermina variou de 0,28 a 0,56 mg/L (Figura 18). Teores menores de espermina, quando comparados aos teores de putrescina e espermidina também foram relatados por BROQUEDIS et al. (1989); outros autores que investigaram o teor e perfil de aminos em uvas, não encontraram espermina nas amostras analisadas (SASS-KISS et al., 2000; BOVER-CID et al., 2006; KISS et al., 2006).

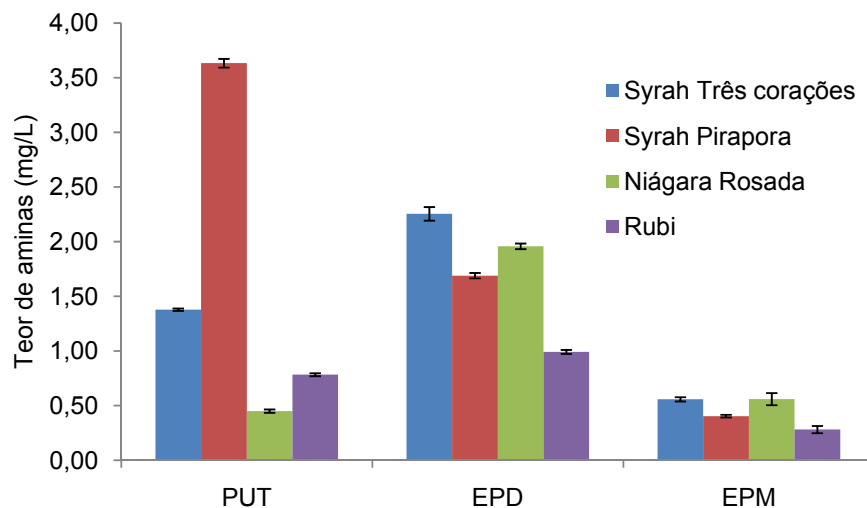


FIGURA 18. Perfil e teores de aminas bioativas livres nas amostras de uvas. PUT - putrescina; EPD - espermidina; EPM - espermina

De acordo com DROLET et al. (1986) e BARDÓCZ (1995), a espermina e espermidina, assim como a diamina putrescina, são eficientes sequestradoras de radicais livres em numerosos sistemas enzimáticos, químicos e *in vitro*; podem inibir peroxidação de lipídeos e prevenir a senescência. As poliaminas, espermina e espermidina, estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, incluindo morfogênese, enraizamento, floração e senescência (SHIOZAKI et al., 2000). Estas podem ser usadas como fonte de nitrogênio orgânico e desempenhar um papel crítico em diversos processos, entre eles, controle do pH intracelular, desenvolvimento do fruto e resposta ao estresse abiótico, como por exemplo, deficiência de potássio, choque osmótico, estiagem e infecção patogênica. Poliaminas são também importantes na síntese de metabólitos secundários de interesse biológico, como por exemplo, nicotina e alcalóides (FLORES et al., 1989; WALTERS, 2003).

Não foram encontradas aminas na forma conjugada nos mostos de uvas analisadas. No entanto, outros autores encontraram aminas na forma conjugada em uvas. SHIOZAKI et al. (2000) quantificaram espermidina, putrescina e espermina nas formas conjugadas no pericarpo e sementes de uvas. GENY et al. (2003) notaram um aumento na presença de poliaminas conjugadas em uvas, quando estas foram infectadas pelo fungo *Botrytis cinerea*

5 CONCLUSÕES

O método analítico para a determinação de aminas bioativas livres por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica foi validado para análise de amostras de uvas e vinhos. O método apresentou uma faixa linear para todas as aminas, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação adequados para análise de uvas e vinhos. Foi observado efeito da matriz, ou seja, as matrizes uvas e vinhos influenciaram a análise de aminas.

As condições ótimas para a hidrólise de aminas conjugadas em vinhos foram definidas como 5 horas de hidrólise a temperatura de 107 °C, com ácido clorídrico na concentração de 6 mol/L e temperatura de concentração de 60 °C. Não foi possível otimizar a hidrólise de aminas conjugadas em uvas, uma vez que nas condições estabelecidas, somente a espermina foi encontrada na forma hidrolisada em quantidades detectáveis, porém não quantificáveis (< 0,4 mg/L).

As amostras de vinhos comercializados em Belo Horizonte e utilizadas neste estudo foram caracterizadas pela presença das aminas livres putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e feniletilamina. Os vinhos tintos apresentaram maiores teores e variedade de aminas. A putrescina foi a amina presente em maior concentração. Foram encontradas também, nos vinhos analisados, as aminas feniletilamina e espermidina na forma conjugada.

As amostras de uvas foram caracterizadas pela presença das aminas putrescina, espermidina e espermina. As uvas viníferas da variedade Syrah apresentaram teores de aminas totais maiores que as uvas de mesa. Não foram encontradas aminas na forma conjugada nas amostras analisadas.

REFERÊNCIAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISO/IEC 8402:1994. Gestão da qualidade e garantia da qualidade. Terminologia. Rio de Janeiro. 15 p. 1994.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 31 p., 2005.
- ADAMS, D.O. Accumulation of putrescine in grapevine leaves showing symptoms of potassium deficiency or spring fever. In: Rantz J.M. (ed) International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. American Society of Enology and Viticulture, Davis, CA p.126-132, 1991.
- ALCAIDE-HIDALGO, J.M.; MORENO-ARRIBAS, M.V.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; PÓLO, M.C. Influence of malolactic fermentation, post fermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. *Food Chemistry*, v. 103, p. 572–581, 2007.
- AMORIM, D.A.; REGINA, M.A.; FÁVERO, A.C.; MOTA, R.V.; PEREIRA, G.E. Elaboração de vinho tinto. *Informe Agropecuário Epamig*, v. 27, n. 234, p. 65-76 set/out, 2006.
- ANCÍN-AZPILICUETA, C.; GONZÁLES-MARCO, A.; JIMÉNEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 48, p. 257-275, 2008.
- ARMAS, R.; MARTINEZ, M.; VICENTE, C.; LEGZ, M.E. Free and conjugated polyamines and phenols in raw and alkaline-clarified sugarcane juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 3086-3092, 1999.
- BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*, v. 20, p. 301-317, 2001.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends of Food Science and Technology*, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARET, V.; LEWIS, T. *Outliers in statistical data*. 3ed. New York: John Wiley, 1994. 604 p.
- BAUZA, T.; BLAISE, A.; TEISSEDRE, P.L.; CABANIS, J.C. Les amines biogènes du vin, métabolisme et toxicité. *Bulletin L'O.I.V.*, v.68, p. 42-67, 1995.
- BELL, S.J.; HENSCHKE, P.A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v. 11, p. 242-295, 2005.

- BELLEVILLE, J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition*, v. 18, p. 173-177, 2002.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, v. 140, p. 103-125, 1999.
- BOVER-CID, S.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONTE A., VIDAL-CAROU M.C. Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chemistry*, v. 96, p. 43-47, 2006.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e outras providências. Portaria n. 7678, de 08 de novembro de 1988.
- BROQUEDIS, M.; DRUMERY, B.; BOUCARD, J. Mise en évidence de polyamines (putrescine, cadaverine, nor-spermidine, spermidine et spermine) dans les feuilles et les grappes de *Vitis vinifera* L. *Connais. Vigne Vin*, v. 23, p. 1-6, 1989.
- BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for equality of variances. *Journal of the American Statistical Association*, v. 69, p. 364-367, 1974.
- BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods. *LC GC*, p. 19-24, 2001.
- CASAL, S.; MENDES, E.; ALVES, R.M.; ALVES, R.C. OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. Free and conjugated biogenic amines in green and roasted coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 6188-6192, 2004.
- CHEYNIER, V.; SOUQUET, J. M.; KONTEK, A.; MOUTOUNET, M. Anthocyanin degradation in oxidising grape musts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 66, p. 283-288, 1994.
- CHOCIAI, M.B.; CHOCIAI, J.G.; BONFIM, T.M.B.; SHITARA, G.M.; D'AMBRÓSIO, S.D.; JOCHEN, A.L. Qualidade do vinho produzido no município de Colombo na Safra 2000, *Revista Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 2, n. 1, p. 23-30, 2001.
- CHOI, S.W.; LEE, S.K.; KIM, E.O.; OH, H.; YOON, K.S.; PARRIS, N.; HICKS, K.B.; MOREAU, R.A. Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugated from corn bran and related hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 3920-3925, 2007.
- COUTTS, R.T.; BAKER, G.B.; PASUTTO, F.M. Foodstuffs as sources of psychoactive amines and their precursors: content, significance and identification. *Advances in Drug Research*, v. 15, p. 169-232, 1986.

- DAUDT, C.E.; LEVASSEUR, G.M.A.; SILVA, J.H. Nitrogênio total e amoniacal em mostos de Chardonnay e Cabernet Sauvignon e sua utilização durante a fermentação. *Higiene Alimentar*, v. 16 n. 10, p. 25-31, outubro, 2002.
- DROLET, G., DUMBROFF, E.B.; LEGGE, R.L.; THOMPSON, J.E. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, v. 25, p. 367-371, 1986.
- DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least square regression. *Biometrika*, v. 38, p.159-178, 1951.
- EC (European Commission), Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Concil Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8.
- ÉDER, R.; BRANDES, W.; PAAR, E. Influence of grape rot and fining agents on the contents of biogenic amines in musts and wines. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung* v. 52, p. 204-217, 2002
- ESCRIBANO, M.I.; LEGAZ, M.E. High performance liquid chromatography of the dansyl derivatives of putrescine, spermidine and spermine. *Plant Physiology*. v. 87, p. 519-522, 1988.
- EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 61 p., 1998.
- FACCHINI, P.J.; HAGEL, J.; ZULAK, K.G. Hydroxycinnamic amide metabolism: physiology and biochemistry. *Canadian Journal of Botany*, v. 80, p. 577-589, 2002.
- FLORES, H.E.; PROTACIO, C.M.; SIGNS, M.W. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. *Phytochemistry*, v. 23, p. 329-393, 1989.
- FONTANIELLA, B.; MATEOS, J.L.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Improvement of the analysis of dansylated derivatives of polyamines and their conjugates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 919, p. 283-288, 2001.
- FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E.; ARMAS, R.; RODRIGUEZ, C.W.; MOARINEZ, M.; PINON, D.; ACEVEDO, R.; SOLAS, M.T. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 1027-1036, 2003.
- FUZIKAWA, C.S.; HARA, C.; GLÓRIA, M.B.A.; ROCHA, F.L. Monoaminoxidase inhibitors and diet – Update and practical recommendations for clinical use. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, v. 48, p. 453-460, 1999.

- GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of SO₂ on the formation and evolution of volatile compounds in wines. *Food Control*, v. 18, p. 1501-1506, 2007.
- GENY, L.; BROQUEDIS, M.; MARTIN-TANGUY, J.; SOYER, J.P.; BOUARD, J. Effects of potassium nutrition on polyamine content of various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L cv. Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 48, p. 85-92, 1997.
- GENY, L.; DARRIEUMERLOU, A.; DONÈCHE, B. Conjugated polyamines and hydroxycinnamic acids in grape berries during *Botrytis cinerea* disease development: differences between "noble rot" and "grey mould". *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v. 9, p. 102-106, 2003.
- GERBAUX, V.; MONAMY, C. Biogenic amines in Burgundy wines. Contents and origin in wines. *Revue Française d'Oenologie*, v. 183, p. 25-28, 2000.
- GLÓRIA, M.B.A.; WATSON, B.T.; SIMON-SARKADI, L.; DAESCHEL, M.A. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 49, p. 279-282, 1998.
- GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Ed. Marcel Dekker, v. 4, p. 1-38, 2005.
- GLÓRIA, M.B.A.; VIEIRA, S.M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. *Food*, v.1, p. 258-270, 2007.
- GOLDBERG, A.; CONFINO-COHEN, R. And wine maketh glad the heart of man: Is it so? – Allergy to alcoholic drinks. *Harefuah*, v. 144, p. 739-741, 2005.
- GONZÁLEZ-MARCO, A.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Amine concentration in wine stored in bottles at different temperatures. *Food Chemistry*, v. 99, p. 680-685, 2006a.
- GONZÁLEZ-MARCO, A.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Influence of lees contact on evolution of amines in Chardonnay wine. *Journal of Food Science*, v. 71, p. C544-C548, 2006b.
- GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, v. 11, p. 1-21, 1969.
- GUERRA, C.C.; BARNABÉ, D. Vinho em: VENTURINI FILHO, W.G. *Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado*. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher, p. 423-451, 2005.
- GUERRA, C.C. *Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado*. Embrapa Uva e Vinho, Sistema de Produção, v. 2, 2003a.

- GUERRA, C.C. Influência de parâmetros enológicos da maceração na vinificação em tintos sobre a evolução da e a qualidade do vinho. X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, 2003b.
- HAJÓS, G.; SASS-KISS, A.; SZERDAHELYI, E.; BARDÓCZ, S. Changes in biogenic amine content of Tokaj grapes, wines, and Aszú-wines. *Journal of Food Science*, v. 65, p. 1142-1144, 2000.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, v. 5, p. 42-49, 1994.
- HENICK-KLING, T. Malolactic fermentation. In G.H. Fleet (ed.). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland, p. 289-326, 1994.
- HOLZHAMMER, J.; WÖBER, C. Alimentary trigger factors that provoke migraine and tension-type headache. *Schmerz*, v. 20, p. 151-159, 2006.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Analytical Chemistry*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.
- HORWITZ, W. Protocol for desing, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure and Applied Chemistry*, v. 67, p. 331-343, 1995.
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2007. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 02 Junho/2007, 25p.
- JACKSON, R.S. *Wine Science: principles, practice, perception*. 2 ed. San Diego: Academic Press, 2000. 645p.
- KALAC, P.; GLÓRIA, M.B.A. Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut. In D. Dandriosse (ed). *Biological aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates*, 2009, p. 267-309.
- KANG, S.; BACK, K. Enriched production of N-hydroxycinnamic amides and biogenic amines in pepper (*Capsicum annuum*) flowers. *Scientia Horticulturae*, v. 108, p. 337-341, 2006.
- KANG, S.; KANG, K.; CHUNG, G.C.; CHOI, D.; ISHIHARA, A.; LEE, D.S.; BACK, K. Functional analysis of amine substrate specificity domain of pepper tyramine and serotonin H-hydroxycinnamoyltransferases. *Plant Physiology*, v. 140, p. 704-715, 2006.
- KING, R.R.; CALHOUN, L.A. Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. *Phytochemistry*, v. 66, p. 2468-2473, 2005.

- KISS, J.; KORBÁZ, M.; SASS-KISS, A. Study of amine composition of botrytized grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 8909-8918, 2006.
- KOYAMA, N.; KURIBAYASHI, K.; SEKI, T. Serotonin derivatives, major safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed antioxidants, inhibit low-density lipoprotein (LDL) oxidation and atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 4970-4976, 2006.
- KRISTENSEN, B.K.; BURHENNE, K.; RASMUSSEN, S.K. Peroxidases and the metabolism of hydroxycinnamic acid amides in Poaceae. *Phytochemistry Reviews*, v. 3, p. 127-140, 2004.
- LANÇAS, F.M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos: Editora Rima, 2004. 62p.
- LANDETE, J.M.; FERRER, S.; PÓLO, L.; PARDO, I. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1119-1124, 2005.
- LANDETE, J.M.; FERRER, S.; PARDO, I. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*, v. 18, p. 169-174, 2007.
- LEE, S.; HAN, J.M.; KIM, H.; KIM, E.; JEONG, T.S.; LEE, W.S.; CHO, K.H. Synthesis of cinnamic acid derivatives and their inhibitory effects on LDL-oxidation, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 and 2-activity, and decrease of HDL-particle size. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, p. 4677-4681, 2004.
- LEHTONEN, P. Determination of amines and amino acids in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 47, p. 127-133, 1996.
- LEITING, V.A.; WICKER, L. Inorganic cations and polyamines moderate pectinesterase activity. *Journal of Food Science*, v. 62, p. 253-255, 1997.
- LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.) *Contributions to probability and statistics*. Stanford: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.
- LIANG, Y.L.; LUR, H.S. Conjugated and free polyamine levels in normal and aborting maize kernels. *Crop Science*, v. 42, p. 1217-1224, 2002.
- LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. *British Journal of Nutrition*, v. 84, p. S55-S58, 2000.
- LUCAS, P.; LANDETE, J.; COTON, M.; COTON, E.; LONVAUD-FUNEL, A. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB: characterization and

- conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 229, p. 65-71, 2003.
- LY, D.; KANG, K.; CHOI, J.; ISHIRAHA, A.; BACK, K.; LEE, S. HPLC analysis of serotonin, tryptamine, tyramine and the hidroxycinnamic acid amides of serotonin and tyramine in food vegetables. *Journal of Medicinal Food*, v. 11, p. 385-389, 2008.
- MACHADO, C.; MINATTI, E. A química do vinho. Artigo disponível Química da Web, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC online em <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/vinho/pagina1.html>, em março de 2008.
- MAIJALA, R.; EEROLA, S.H.; AHO, M.A.; HIRN, J.A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amine in meat. *Journal of Food Protection*, v. 56, p. 125-129, 1993.
- MALACRIDA, R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 25, p. 659-664, 2005.
- MANFROI, L.; SILVA, P.H.A.; RIZZON, L.A.; SABAINI, P.S.; GLÓRIA, M.B.A. Influence of alcoholic and malolactic starter cultures on bioactive amines in Merlot wines. *Food Chemistry*, v. 116, p. 208-213, 2009.
- MARCO, A.G.; MORENO, N.J.; AZPILICUETA, C.A. Influence of addition of yeast autolysate on the formation of amines in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, p. 2221-2227, 2006.
- MARCOBAL, A.; POLO, M.C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; POLO, M.C.; MUÑOZ, R.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 397-404, 2006.
- MARQUES, A.P.; LEITAO, M.C.; SAN ROMÃO, M.V. Biogenic amines in wines: influence of oenological factors. *Food Chemistry*, v. 107, p. 853-860, 2008.
- MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; MARCOBAL, A.; POLO, M.C.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *European Food Research and Technology*, v. 222, p. 420-424, 2006.
- MARTIN-TANGUY, J. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Plant Physiology*, v. 100, p. 675-688, 1997.
- MELLON, J.E.; MOREAU, R.A. Inhibition of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by diferuloylputrescine and p-coumaroylferuloylputrescine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 6660-6663, 2004.
- MIKLÓS, E.; SARJALA, T. Correlation between the levels of potassium and polyamines in the leaves of grapevine. *Acta Biologica Szegediensis*, v. 46, p. 203-204, 2002.

- MILLÁN, S.; SAMPEDRO, M.C.; UNCETA, N.; GOICOLEA, M.A.; BARRIO, R.J. Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 584, p. 145-152, 2007.
- MO DUGO, G.; VILASE, F.; LA TORRE, G.L.; PELLICANÒ, T.M. Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines. *Food Chemistry*, v. 95, p. 672-676, 2006.
- MORENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M.C.; JORGANES, F.; MUÑOZ, R. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, v. 84, p. 117-123, 2003.
- NAGATSU, A.; ZHANG, H.L.; MIZUKAMI, H.; OKUYAMA, H.; SAKAKIBARA, J.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Tyrosinase inhibitory and anti-tumor promoting activities of compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.) oil cake. *Natural Product Letters*, v. 14, p. 153-158, 2000.
- OIV. Organização Internacional do Vinho e da Vinha. Online em <http://www.oiv.int>, acesso em junho de 2009.
- OKOMBI, S.; RIVAL, D.; BONNET, S.; MARIOTTE, A.M.; PERRIER, E.; BOUMENDJEL, A. Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 2252-2255, 2006.
- OUGH, C.S. Measurement of histamine in California wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 19, p. 241-244, 1971.
- PARK, J.B.; SCHOENE, N. Synthesis and characterization of N-coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrest human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 292, p. 1104-1110, 2002.
- PEYNAUD, E. *Enología práctica: conocimiento y elaboracion del vino*. Tradução por Alfredo Gonzáles Salgueiro. Madrid: Mundi-Prensa, 1984, 405p.
- PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A.; MELLO, L.M.R. Viticultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. *Informe Agropecuário Epamig*, v. 27, n. 234, p. 7-15, set/out, 2006.
- RADLER, F.; FATH, K.P. Histamine and other biogenic amines in wines. In: J.M. Rantz. *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. American Society of Enology and Viticulture, Davies, CA, p. 185-195, 1991.

- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.
- RODRIGUEZ, C.W.; ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Change in free and conjugated polyamines during starvation of sugarcane juices as analyzed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 881, p. 531-541, 2000.
- ROSI, I.; NANNELLI F.; GIOVANI, G. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 525-530, 2009.
- RUPASINGHE, H. P.; CLEGG, S. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 133-137, 2007.
- RYAN, T.A.; JOINER, B.L. Normal probability plots and test for normality. The State College: Pennsylvania State University, 1976. 15 p.
- SABAINI, P.S.; EVANGELISTA, W.P.; GLÓRIA, M.B.A. Influência do método de extração na determinação de amins bioativas em vinhos. In: *Encontros Nacionais de Analistas de Alimentos*, 16, 2009, Belo Horizonte. Resumos... Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009.
- SASS-KISS, A.; SZERDAHELYI, E.; HAJÓS, G. Study of biologically active amines in grape and wines by HPLC. *Chromatographia Supplement*, v. 51, p. S316-S320, 2000.
- SEN, A.; BERGVINSON, D.; MILLER, S.S.; ATKINSON, J.; FULCHER, R.G.; ARNASON, J.T. Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids and phenolic acid amides in maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p. 1879-1883, 1994.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, v. 29, p. 675-690, 1996.
- SHIOZAKI, S.; OGATA, T.; HORIUCHI, S. Endogenous polyamines in the pericarp and seed of the grape berry during development and ripening. *Scientia Horticulturae*, v. 83, p. 33-41, 2000.

- SILVA, T.M. Otimização e validação do método para determinação de histamina em pescado. Faculdade de Farmácia da UFMG. 2008. 179 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- SILVEIRA, T.M.L. Aminas bioativas livres e conjugadas no café solúvel: metodologia de análise e influência do processamento. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2008. 179 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. Statistical methods. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.
- SON, S.; LEWIS, B.A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 468-472, 2002.
- SOUFLEROS, E.; BARRIOS, M.L.; BERTRAND, A. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 49, p. 266-278, 1998.
- SOUFLEROS, E.; BOULOUMPASI, E.; ZOTOU, A.; LOUKOU, Z. Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, v. 101, p. 704-716, 2007.
- SOUZA, S.V.C.; BRITO, R. B. Validação de métodos: aplicação em análises de resíduos em alimentos. In: Encontro para a Qualidade de Laboratórios. Anais. São Paulo: REMESP. p. 155-163, 2002.
- SOUZA, S.V.C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M, SANTOS, E. V.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C. Determinação de resíduos de nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina e tecidos de origem animal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n. 1, p. 34-38, 2001.
- SOUZA, S.C.; THEODORO, K.H.; SOUZA, É.R.; MOTTA, S.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in Brazilian wines: types, levels and correlation with physico-chemical parameters. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 53-62, 2005.
- SOUZA, S.V.C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 17, p. 91-128, 1986.

- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, v. 125, n. 3, p. 385-386, 2000.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- TIBURCIO, A.F.; KAUR-SAWHNEY, R.; INGERSOLL, R.B.; GALSTON, A.W. Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. *Plant Physiology*, v. 78, p. 323-326, 1985.
- UVIBRA, União Brasileira de Viticultura. Online em: <http://www.uvibra.com.br/>, acesso em junho de 2009.
- VIDAL-CAROU, M.C.; ISLA-GAVIN, M.J.; MARINÉ-FONT, A.; CODONY-SALCEDO, R. Histamine and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider, and vinegar. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 2, p. 210-218, 1989a.
- VIDAL-CAROU, M.C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; MARINÉ-FONT, A. Spectrofluorometric determination of histamine in wines and other alcoholic beverages. *Journal of the Association of Official and Analytical Chemists*, v. 72, p. 412-415, 1989b.
- VIDAL-CAROU, M.C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; MARINÉ-FONT, A. Histamine and tyramine in Spanish wines: their formation during the wine making process. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 41, p. 160-167, 1990a.
- VIDAL-CAROU, M.C.; CODONY-SALCEDO, R.; MARINÉ-FONT, A. Histamine and tyramine in Spanish wines: relationship with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malolactic fermentation intensity. *Food Chemistry*, v. 35, p. 217-227, 1990b.
- WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. *Photochemistry*, v. 64, p. 97-107, 2003.
- YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, v. 21, p. 381-406, 2001.
- YILDIRIM, H.K.; ÜREN, A.; YÜCEL, U. Evaluation of biogenic amines in organic and non-organic wines by HPLC OPA derivatization. *Food Technology and Biotechnology*, v. 45, p. 62-68, 2007.
- YINGYONGNARONGKUL, B.; APIRATIKUL, N.; AROONRERK, N.; SUKSAMRARN, A. Solid-phase synthesis and antibacterial activity of hidroxicinnamic acid amides and analogues against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-

resistant *S. aureus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 5870-5873, 2006.

ZEE, J.A.; SIMARD, R.E.; L'HEUREUX, L. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. *Journal of Food Protection*, v. 46, n. 12, p. 1044-1049, 1983.