

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**NÍVEIS DE HISTAMINA EM DIFERENTES
MICROVINIFICAÇÕES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Simone Bertazzo Rossato

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

NÍVEIS DE HISTAMINA EM DIFERENTES MICROVINIFICAÇÕES

por

Simone Bertazzo Rossato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientador: Prof.^a Dr.^a Neidi Garcia Penna
Co-orientador: Luisa Helena Rychecki Hecktheuer

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

NÍVEIS DE HISTAMINA EM DIFERENTES MICROVINIFICAÇÕES

elaborada por
Simone Bertazzo Rossato

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Neidi Garcia Penna (Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Carlos Eugenio Daudt

Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2005

Dedico esta dissertação aos meus pais,
Por todo o amor que me dão,
Por todas as oportunidades de estudo,
Pelo apoio,
Pela base e princípios,
Pelo exemplo,

Obrigada por tudo!
Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o apoio e incentivo que sempre me concederam. Agradeço por terem sempre investido na minha formação profissional e pessoal. Sei que muitas vezes vocês deixaram de realizar seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Não tenho palavras para agradecer. Sempre tentarei ser motivo de orgulho para vocês.

Aos meus irmãos, Maurício e Vinício, agradeço por “agüentarem” meu mau-humor e por me ajudarem com o “Excel” e com o “Inglês”. Desculpem pelo “monopólio” do computador nos últimos meses.

Ao meu querido namorado Juarez, agradeço por seu carinho e compreensão, principalmente nos últimos meses. Obrigada por sempre tentar me fazer pensar positivo e para frente. Sua perseverança me serviu de exemplo e incentivo naquelas vezes em que eu desanimava. “ Amo tu “.

À professora Neidi Garcia Penna, por acreditar em mim e no meu trabalho e por me apresentar o mundo dos vinhos que hoje me encanta.

À professora Luisa Helena Rychecki Hecktheuer, também por acreditar em minha capacidade.

À Vinícola Velho Amâncio, por ceder gentilmente as uvas e o espaço para realização deste trabalho.

Aos proprietários da Vinícola Velho Amâncio, Rubens e Arilene Fogaça, pelo carinho e disposição com que me acolheram em sua empresa e em sua casa. Obrigada pela oportunidade de aprendizado!

À mestrande Aline de Oliveira Fogaça, por toda a paciência, boa vontade, disposição incansável em transmitir seus conhecimentos ilustrando da forma mais fiel o gosto pela pesquisa.

Às amigas da época de colheita e vinificação Elizette Maria Facco e Mariana Junquer, pela companhia e ajuda.

À Vinícola Chateau Lacave, pela gentileza em ceder bactéria malolática para meu experimento, contribuindo para a pesquisa.

Ao Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP), em especial ao professor Renato Zanella, por oportunizar a realização das análises cromatográficas recebendo-me com disposição e muito boa vontade em ensinar. Obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos!

Aos alunos de Pós-Graduação do LARP que me receberam com carinho, em especial Diana Ströher, Michele Presta, Karine Rhoden e Osmar Prestes, pela paciência em me “apresentar” ao sistema HPLC-Fluorescência! Obrigada por muitas vezes terem deixado suas tarefas para responderem minhas dúvidas! Adorei conhecer vocês. Nossas conversas, risadas e amizade foram imprescindíveis para a realização do trabalho, pois o tornaram muito mais agradável.

Ao “companheiro” Osmar, agradeço em especial por toda a paciência e disposição em me ajudar e incentivar. Sem você, “companheiro”, este trabalho não teria sido possível! Obrigada também pela oportunidade de conviver com uma pessoa tão alegre, entusiasmada e disposta.

Aos químicos Michele Presta e Osmar Prestes pelas sugestões no “exame de qualificação”. (se acharam, né?).

Às colegas de mestrado Rosiele Lappe, Nívia Streit e Liana P. Canterle, pelas experiências e desabafos trocados durante o período do mestrado.

Agradeço ao CNPq pelo auxílio concedido através da bolsa.

Agradeço a Deus por mais esta conquista!

“A constância não consiste em fazer sempre
as mesmas coisas, mas em sempre fazer
coisas que tendem para o mesmo fim”
(Luiz XV)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

NÍVEIS DE HISTAMINA EM DIFERENTES MICROVINIFICAÇÕES

AUTORA: Simone Bertazzo Rossato

ORIENTADOR: Prof. ^a Dr. ^a Neidi Garcia Penna

CO-ORIENTADOR: Luisa Helena Rychecki Hecktheuer
Santa Maria, 28 de fevereiro de 2005

A histamina é uma base orgânica que desempenha importante função fisiológica e metabólica nos organismos vivos. É formada durante processos metabólicos normais e através de atividade enzimática de microorganismos durante fermentação ou deterioração. A ingestão desta substância pode causar problemas quando for em grande quantidade, quando o mecanismo de eliminação for deficiente ou ainda quando potencializadores estiverem presentes. A quantidade de histamina em alimentos varia bastante, sendo dependente da natureza, origem, etapas do processamento e microorganismos presentes. Em vinhos, a histamina pode ter sua origem na própria uva ou então ser formada durante o processo de fabricação do vinho, durante a fermentação alcoólica e/ou malolática. O objetivo deste trabalho foi acompanhar a evolução dos níveis de histamina desde o último mês de maturação da uva até um período de estocagem do vinho por três meses. Foram realizadas microvinificações com inoculação de leveduras selecionadas (*Saccharomyce cerevisiae* variedade *bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae*) e sem inoculação de levedura selecionada. Ao final da fermentação alcoólica, os três tratamentos foram divididos em dois grupos: em um deles houve inoculação de bactéria láctica *Leuconostoc oenos* e no outro não foi inoculada a bactéria láctica. Após o término da fermentação malolática, os vinhos foram engarrafados e mantidos por três meses em temperatura ambiente. A histamina após derivatização química com orto-ftaldeído foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Fluorescência em uvas colhidas durante a maturação, após o esmagamento das uvas, no final da fermentação alcoólica, após a fermentação malolática e três meses após o engarrafamento. Durante a maturação da uva houve um aumento mais pronunciado na concentração de histamina próximo à data da colheita. Ao final da fermentação alcoólica houve uma redução dos níveis de histamina nos três tratamentos. Ao término da fermentação malolática observou-se que a concentração de histamina aumentou em todos os tratamentos independente de a fermentação ter ocorrido espontaneamente ou por indução, exceto para o mosto que realizou as duas fermentações sem inoculação de microorganismos selecionados. Em amostras coletadas três meses após o engarrafamento, a concentração de histamina encontrada nos vinhos não apresentou diferença significativa em relação à concentração ao final da fermentação malolática, exceto para o vinho que realizou as duas fermentações sem inoculação de cultura pura, onde houve um aumento significativo na concentração de histamina ($p < 0,05$). Não foi observada uma correlação forte entre os níveis de histamina e as características químicas de pH, acidez total, acidez volátil, teor alcoólico e SO_2 livre.

Palavras-chave: histamina, vinho, uva, fermentação alcoólica, fermentação malolática.

ABSTRACT

HISTAMINE LEVEL IN THE DIFFERENT MICROVINIFICATIONS

Author: Simone Bertazzo Rossato

Adviser: Dr^a Neidi Garcia Penna

Co-Adviser: Dr^a Luisa Helena Rychcki Hecktheuer

Santa Maria, February 28th, 2005

Histamine is an organic base that develops an important physiological and metabolic function in live organisms. It is formed in normal metabolic processes and through microorganisms enzymatic activity during the fermentation or deterioration. This substance may cause problems when ingested in large amounts, when the eliminating mechanism is inefficient or when potentializers are present. The level of histamine in food varies a lot and it depends on the nature, origin, processing stages and microorganisms present. In wine, histamine has its origin in the grape itself or can be formed by the wine elaborating process, during the alcoholic and/or malolatic fermentation. The objective of this paper was to accompany the histamine level increase since the last maturation month of the grape until the wine storage period for three months. Microvinifications were done with inoculation of selected yeast (*Saccharomyce cerevisiae* variety *bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*) and without inoculation of selected yeast. In the end of the alcoholic fermentation the three treatments were divided in two groups: one was inoculated with a lactic bacteria *Leuconostoc oenos* and the other was not inoculated with a lactic bacteria. After the malolatic fermentation ending the wine was bottled and maintained for three months in environment temperature. The histamine after chemical derivatization with orthophthaldehyde was quantificated by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection in grapes harvested during the maturation, after the grapes squashing, in the end of the alcoholic fermentation, after the malolatic fermentation and three months after the bottling. During the grape maturation, the histamine concentration increased in a higher proportion close to the harvest date. In the alcohol fermentation ending there was a reduction on the histamine level in all the three treatments. In the end of the malolatic fermentation it was noticed that the histamine concentration increased in all treatments in spite of fermentation been occurred spontaneously or by induction except to the must that realized both fermentations without the inoculation of selected organisms. In the samples collected three months after the bottling the histamine concentration found in the wine did not present a significant difference in relation to the final concentration of malolatic fermentation except to the wine that realized both fermentations without pure culture where a significant increase in the histamine concentration was found ($p < 0,05$). It was not observed a strong correlation between the histamine levels and the chemical characteristics of pH, total acidity, volatile acidity, alcohol content and free SO₂.

Key-words: histamine, wine, grape, alcoholic fermentation, malolatic fermentation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Rota metabólica para a formação de aminas biogênicas.....	09
FIGURA 2-	Reação de derivatização química entre a histamina e OPA.	24
FIGURA 3-	Representação do ruído da linha base, o LOD e o LOQ (adaptado por Mistura, 2003).....	27
FIGURA 4-	Fluxograma das microvinificações e coleta de amostras ...	32
FIGURA 5-	Curva analítica, equação da reta e coeficiente de determinação obtidos para a quantificação de histamina em mostos e vinhos.....	40
FIGURA 6-	Cromatograma obtido de padrões analíticos de histamina contendo as seguintes concentrações, em mg L^{-1} : A = 0,01; B = 0,05; C = 0,1; D = 0,15 e E = 0,2.....	41
FIGURA 7-	Cromatograma obtido no teste de estabilidade do padrão $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de histamina derivatizado com orto-ftaldeído por diferentes tempos, em minutos: A = 1; B = 2; C = 4; D = 10 e E = 20	45
FIGURA 8-	Evolução dos níveis de histamina (mg L^{-1}), °Brix, pH e acidez total (g% em ácido tartárico) no último mês de maturação da uva Cabernet Sauvignon	46
FIGURA 9-	Concentração de histamina (mg L^{-1}) encontrada nos vinhos obtidos após estocagem por três meses à temperatura ambiente.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Dados referentes ao cálculo de linearidade para a histamina	41
TABELA 2 -	Valores de recuperação encontrados após fortificação de uma amostra cuja concentração de histamina encontra-se abaixo do limite de detecção com padrões analíticos de histamina de concentrações 0,2 e 1,0 mg.L ⁻¹	43
TABELA 3 -	Resultados de precisão em termos de repetitividade (RSDri) e precisão intermediária (RSDpii) do instrumento para a resposta em termos de área da solução analítica de 0,1 mg L ⁻¹	44
TABELA 4 -	Concentração de histamina (mg L ⁻¹) encontrada nos tratamentos T1, T2 e T3 no início e final da fermentação alcoólica	48
TABELA 5-	Concentração de histamina (mg L ⁻¹) encontrada nos tratamentos T1, T2 e T3 com e sem bactéria láctica no início e final da fermentação malolática	54
TABELA 6-	Valores de pH nas etapas início e final da fermentação malolática para os tratamentos T1, T2 e T3 com e sem uso de bactéria láctica	58
TABELA 7-	Valores de histamina (mg L ⁻¹) dos tratamentos T1, T2 e T3 com e sem inoculação de bactéria láctica ao final da fermentação malolática e após o período de estocagem por três meses	59
TABELA 8-	Valores de pH dos vinhos obtidos nos tratamentos T 1, T2	

	e T3 com e sem bactéria láctica ao final da fermentação maloláctica e após três meses de estocagem.....	61
TABELA 9-	Valores de pH, teor alcoólico, acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre livre nos vinhos após três meses de estocagem à temperatura ambiente	65
TABELA 10	Resultados do teste de correlação “r” de Pearson e interpretação da correlação entre a histamina e as características químicas dos vinhos obtidos após estocagem por três meses à temperatura ambiente	66

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Cromatograma obtido na análise da amostra T1BC1	84
APÊNDICE B - Valores de acidez total e volátil (mEq L ⁻¹) encontradas nos vinhos obtidos após estocagem por três meses.....	85

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE APÊNDICES	xiii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Histórico da videira e do vinho	03
2.2 Produção e consumo de vinho no Brasil	05
2.3 Cultivar Cabernet Sauvignon	07
2.4 Aminas Bioativas.....	07
2.4.1 Conceito	07
2.4.2. Função e importância das Aminas Bioativas.....	10
2.4.3 Aminas Bioativas em Alimentos	11
2.4.4 Produção de aminas e atividade das descarboxilases	14
2.4.5 Microorganismos produtores	15
2.4.6 Toxicidade	17
2.4.7 Dose tóxica	18
2.4.8. Legislação	19

2.4.9 Histamina em vinhos	20
2.5 Métodos de análise	23
2.6 Validação de métodos cromatográficos	24
2.6.1 Curva analítica	25
2.6.2 Linearidade	25
2.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação	26
2.6.4 Recuperação	28
2.6.5 Precisão	28
2.6.5.1 Repetitividade	28
2.6.5.2 Precisão intermediária	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Microvinificação e amostras	30
3.1.1 Amostras coletadas durante a maturação da uva	30
3.1.2 Microvinificação e coleta de amostras	30
3.2 Controle da fermentação malolática	33
3.3 Determinações químicas	33
3.4 Metodologia utilizada	33
3.4.1 Determinações químicas.....	33
3.4.2 Determinação de histamina por HPLC- fluorescência	34
3.4.2.1 Instrumentação	34
3.4.2.2 Soluções analíticas	35
3.4.2.3 Condições cromatográficas	35
3.4.2.4 Preparo da amostra	36
3.4.2.5 Derivatização	36
3.5 Validação do procedimento para determinação de histamina em mostos e vinhos	37
3.5.1 Curva analítica	37
3.5.2 Linearidade	38
3.5.3 Limite de detecção e limite de quantificação	38
3.5.4 Recuperação	38
3.5.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	39

3.6 Análise estatística	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Validação do procedimento para determinação de histamina em mostos e vinhos	40
4.1.1 Curva Analítica	40
4.1.2 Linearidade	41
4.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação (LOD e LOQ).....	42
4.1.4 Recuperação	42
4.1.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	43
4.2 Teste de estabilidade	44
4.3 Histamina e maturação	46
4.4 Histamina e fermentação alcoólica	47
4.5 Histamina e fermentação malolática	53
4.6 Histamina e o período de estocagem	59
5 CONCLUSÕES	69
6 PERSPECTIVAS	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
8 APÊNDICES	83

1 INTRODUÇÃO

Há alguns anos, ouve-se falar muito sobre os benefícios do vinho para a saúde, os meios de comunicação nos bombardeiam com informações de que o vinho, preferencialmente o tinto, tomado moderadamente, pode ser considerado um alimento funcional, que possui capacidade antioxidante, antiinflamatória e anti-coagulante, atuando, dessa forma, na redução de doenças coronarianas, de trombose, na diminuição dos riscos de câncer, no retardamento do envelhecimento celular e orgânico e na ação antisséptica e antivirótica.

Com todos esses benefícios hoje conhecidos, o vinho está ganhando cada vez mais espaço à mesa nas refeições e não está somente sendo consumido em festas ou em ocasiões especiais, como acontecia há algum tempo atrás. Pode-se dizer que o vinho nunca obteve tanto destaque como obtém hoje. Dados de comercialização de vinhos tintos no Rio Grande do Sul, fornecido pela União de Viticultura Brasileira, UVIBRA (2004a), mostram que de 1990 a 1999, a comercialização de tintos flutuava, com números que não ultrapassavam 150.000.000 litros, exceto em 1993 em que foram comercializados 169.000.000 litros de vinho tinto. Entretanto, de 1999 até hoje, a comercialização vem crescendo, chegando a 193.642.265 litros em 2002 e 191.826.474 litros em 2003.

É claro que toda esta propaganda tem base científica, pois várias pesquisas foram e estão sendo realizadas a cerca deste assunto. Entretanto, além das substâncias benéficas, o vinho também contém substâncias tóxicas e capazes de causar, não benefícios, mas sim, problemas, como é o caso do álcool, como já se sabe, e também de substâncias fisiologicamente ativas no organismo humano.

Em anos recentes, novas tendências em segurança alimentar e exigências dos consumidores por alimentos saudáveis e de qualidade estão promovendo um aumento na pesquisa por constituintes presentes nos alimentos que podem afetar a saúde humana. Assim, a presença de substâncias que são fisiologicamente ativas no metabolismo humano têm sido extensivamente estudada em vinhos e alimentos. Interesse especial tem sido dedicado às Aminas Bioativas ou Biogênicas e, em particular à Histamina. Embora estas substâncias estejam presentes no vinho geralmente em baixas quantidades, elas exibem interação com o metabolismo humano, fato que justifica a pesquisa.

A histamina é uma amina biologicamente ativa formada por processos bioquímicos e participa de funções metabólicas importantes nos organismos vivos, desempenhando diversas atividades biológicas, tanto em animais como em vegetais. A histamina pode ser encontrada já na uva, sofrendo influência do grau de maturação, variedade e outros fatores, mas pode ser formada durante o processo de vinificação, sendo esta formação influenciada pela presença de aminoácidos livres, microbiota presente, presença de microorganismos contaminantes, teor alcoólico, concentração de dióxido de enxofre, desenvolvimento de bactéria ácido láctica, espécies que intervêm na fermentação, entre outros fatores. A presença de aminas, em especial a histamina, em vinhos, já está sendo relacionada a más condições higiênico-sanitárias no processo de produção, uma vez que esta substância é formada por algumas espécies de microorganismos. Alguns autores sugerem que um dos critérios para a escolha de bactérias lácticas utilizadas em algumas vinícolas para induzir a fermentação malolática deveria ser o seu potencial de formar aminas biogênicas, especialmente histamina. A histamina pode causar efeitos fisiológicos desagradáveis especialmente quando álcool e acetaldeído estão presentes, fato que torna o vinho e outras bebidas alcoólicas alvo maior de estudo. Dores de cabeça, vômito, diarreia, palpitações cardíacas, edema, baixa pressão sanguínea são típicos sintomas de intoxicação.

Alguns países já fixaram limites para histamina em vinhos, mostrando a preocupação com a presença desta substância e de outras aminas biogênicas em seus produtos. No Brasil, não existe limite estabelecido para a histamina em vinhos e os estudos sobre esta substância em vinhos brasileiros ainda são escassos.

Neste sentido, foi realizada esta pesquisa sobre a formação de histamina em vinhos produzidos com a cultivar vinífera tinta Cabernet Sauvignon, procurando avaliar:

- a concentração e evolução desta substância durante o último mês de maturação na uva;
- o efeito da inoculação de duas leveduras distintas na formação de histamina ao final da fermentação alcoólica;
- o efeito da inoculação de bactéria láctica na formação de histamina ao final da fermentação malolática;
- a concentração de histamina nos vinhos produzidos, engarrafados e estocados por três meses em temperatura ambiente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da videira e do vinho

A videira surgiu antes do homem, como comprovam pesquisas arqueológicas (Johnson, 1989 apud Souza, 2002).

O provável centro de origem paleontológico das videiras atuais é a Groenlândia. Lá encontram-se os fósseis mais antigos de suas ancestrais. Há 300 mil anos, durante a Era Cenozóica, no Período Terciário, surgiu a primeira espécie de videira. No final do Período Quaternário, devido à grande glaciação, esta extinguiu-se naquele local. De lá, a videira dispersou-se em duas direções: uma Américo-asiática e outra Euro-asiática. Durante a Idade Média, a viticultura na Europa manteve-se dentro dos mosteiros. Ao final desta era, com o início das grandes navegações, começou uma nova fase de expansão (Giovannini, 1999).

A origem da videira é a Ásia Ocidental, entre a Armênia e a Pérsia, entre os mares Negro e Cáspio, no final da idade do Bronze, de onde se propagou para o Oriente Médio e Ásia Menor. Mas a disseminação da videira ocorreu quando fenícios a levaram para Creta e para toda a Grécia. O cultivo da uva passou para todo o Império Romano e mesmo com as invasões bárbaras e queda do Império Romano, a viticultura foi preservada e desenvolvida nos mosteiros e abadias (Johnson, 1989 apud Souza, 2002).

A viticultura e a produção de vinhos assumiram importante papel na cultura ocidental. Aos povos antigos que deram origem às culturas européias, a videira e o vinho eram tidos como presentes de divindades. Também, na cultura hebraica, que originou o Cristianismo, o vinho tinha grande importância (Giovannini, 1999).

Em sua segunda viagem, em 1493, Cristóvão Colombo levou bacelos de videira às Antilhas. Destes foram propagadas as plantas que seriam introduzidas poucos anos depois no México. Para a difusão do Cristianismo era necessário o vinho, utilizado nos sacramentos. Deste modo, os missionários levaram a videira a praticamente todos os pontos do continente americano (Giovannini, 1999).

No Brasil, registros indicam que a videira foi introduzida em 1532, através de Martim Afonso de Souza, na Capitania de São Vicente. Posteriormente, durante o período colonial, foram realizadas novas introduções em diversos pontos do país por outros colonizadores portugueses (Camargo, 1994). Em 1535, a videira foi plantada na Bahia e em Pernambuco. Em 1551, Brás Cubas produziu o primeiro vinho em território brasileiro, no planalto de Piratininga, São Paulo (Giovannini, 1999).

Todas as castas cultivadas na época eram originárias de Portugal, portanto cultivares da espécie *Vitis vinifera*.

Entre os anos de 1830 e 1850, foram trazidas para o Brasil cultivares de origem americana, principalmente as pertencentes às espécies *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*. Com predominância da cultivar Isabel, essas videiras, rústicas e produtivas, difundiram-se rapidamente pelas áreas vitícolas do país disseminando as doenças fúngicas, como o míldio e o oídio, também originárias da América do Norte. Essas doenças dizimaram as videiras portuguesas, mudando o quadro vitícola do País, que passou a ter predomínio absoluto de castas americanas (Camargo, 1994).

No Rio Grande do Sul, videiras espanholas foram introduzidas em 1626 por jesuítas que se instalaram aqui e produziam o vinho para as missas. Uma nova introdução foi feita por açorianos e madeirenses, a partir de 1732, quando estes começaram a colonizar as terras do interior. Já no século XIX, em 1814, há registros de que o inglês Thomas Messier teria comprado terras na ilha dos Marinheiros e na serra dos Tapes, onde teria se tornado o pioneiro ao plantar uva Isabel, variedade proveniente dos Estados Unidos, mais resistentes a pragas e ao próprio clima (Guia do Vinho Gaúcho, 2004).

Em 1875, chegaram ao Rio Grande do Sul os primeiros colonos italianos. Nesta época, já existia a cultivar Isabel difundida em todo o Rio Grande do Sul (Giovannini, 1999). Os italianos, na sua maior parte provenientes da região do Vêneto, nordeste da Itália, trouxeram em suas bagagens mudas de parreiras com o objetivo de elaborar o vinho para seu consumo. Durante muito tempo, a produção de vinho no Rio Grande do Sul aconteceu desta forma (Camargo, 1994). No final do século XIX, ganha condição de mercadoria e chega ao comércio local. Aos poucos, foi conquistando espaço, apesar de sua rusticidade.

No início do século XX, foram fundadas as primeiras vinícolas gaúchas, algumas em forma de cooperativas. Outras variedades de uvas chegaram ao Estado e resultaram em vinhos de melhor qualidade (Guia do Vinho Gaúcho, 2004).

Em meados de 1900, as viníferas começaram a ser reintroduzidas pelos órgãos oficiais e, também, pela iniciativa privada, trazendo várias cultivares: portuguesas, francesas, italianas, espanholas e alemãs e coleções de novas cultivares híbridas criadas na Europa. Assim, a difusão de híbridas e viníferas começou a alterar a composição dos vinhedos. Em 1975, com a modernização da indústria vinícola, houve mudanças significativas no elenco varietal, especialmente no Rio Grande do Sul (Camargo, 1994).

De lá para cá, o Rio Grande do Sul tornou-se responsável pela produção de 90% do vinho brasileiro (Guia do Vinho Gaúcho, 2004).

O vinho nacional enfrentou muitos períodos de dificuldades desde o plantio das primeiras videiras até o reconhecimento obtido hoje no mercado mundial. Ainda assim, persistem resistências em reconhecer a qualidade do produto, mesmo que esta desconfiança esteja calcada em idéias preconcebidas ou julgamentos comparativos com produtos de outras regiões do mundo (Guia do vinho gaúcho, 2004).

Deve-se considerar que os produtores de uva e vinho estão cada vez mais conscientes da necessidade de oferecer uma bebida de qualidade, estando cada vez mais abertos à modernização das técnicas, plantio selecionado, preocupação com a matéria-prima e com o processo de elaboração do vinho.

Assim, deve-se considerar estes fatos e entender que nosso vinho tem características próprias e que um bom vinho é aquele que agrada ao paladar.

2.2. Produção e consumo de vinho no Brasil

O vinho é uma bebida conhecida milenarmente que sempre acompanhou pratos luxuosos e festas requintadas.

O consumo de vinhos vem crescendo entre os brasileiros, embora o consumo *per capita* ainda seja bastante inferior se comparado a outros países, ficando em torno de 1,68 litros em 2003 (Produção e comercialização de uvas e vinhos, 2003).

Mesmo assim, segundo especialistas, desde a década de 1970, a qualidade do vinho brasileiro vem melhorando devido a pesquisas, novas cultivares e tecnologias empregadas na vinificação. Conseqüentemente, hoje em dia, a

qualidade dos nossos vinhos se compara a dos vinhos mundiais (Behrens & Silva, 2000).

Atualmente, o vinho ganha espaço à mesa nas refeições principalmente por que cada vez mais pessoas buscam hábitos alimentares que garantam benefícios à saúde, sem deixar os prazeres de lado.

Sem dúvida, após estudos científicos e as descobertas das propriedades medicinais do vinho, o consumo desta bebida tende a aumentar em vista das inúmeras pesquisas em cima de seus benefícios. Para se ter uma idéia, entre os anos de 1970 e 1974, havia apenas 2% de publicações relacionando vinho e saúde. De 1995 a 1999, foi destacado um aumento percentual de 39% de publicações sobre vinho e saúde. (Souto et al., 1999 apud Splendor, 2003).

Segundo dados da União de Viticultura Brasileira (UVIBRA, 2004b), em 1990 foram comercializados no Rio Grande do Sul 132.298.465 litros de vinho tinto, incluindo vinhos de mesa, vinífera e especial. Já em 2002, a comercialização de tintos subiu para 193.642.265 litros. Durante este período, houve anos em que a comercialização caiu um pouco em relação ao ano anterior e outros em que a comercialização subiu um pouco. Entretanto, foi a partir de 1999 que houve um incremento maior nesta comercialização, quando se começou a observar números em torno de 165.000.000 litros. Em 2003, foram comercializados 191.826.474 litros de tintos, incluindo os de mesa, vinífera e especial. Deste total, 217.040.188 litros representam os vinhos tintos de mesa, 25.292.173, os tintos viníferas e o restante são de vinhos especiais.

Em 2003, foram produzidas 1.054.934 toneladas de uvas no país, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor com 489.012 toneladas sendo que 40,38% da uva produzida no país foi destinada à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados (Produção e comercialização de uvas e vinhos, 2003).

A área de uvas no Brasil em 2003, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi de 68.323 hectares. O Rio Grande do Sul figura como o principal produtor com área de 38.517 hectares, ou seja, 56,37 % da área total do país (Produção e comercialização de uvas e vinhos, 2003).

2.3 Cabernet Sauvignon

Esta casta é uma das mais nobres cultivares francesas para a elaboração de vinhos tintos. Originária da região de Bordeaux, participa com até 75% do volume de vinhos tintos produzidos nesta região (Camargo, 1994). Atualmente, esta variedade está difundida na maior parte dos países vitivinícolas (Slingsby et al., 1980), como Itália, Espanha, Grécia, Rússia, Estados Unidos, México, Chile, Argentina, África do Sul e Austrália.

Segundo Rizzon & Miele (2002), a cv. Cabernet Sauvignon foi introduzida no Brasil em 1921. Segundo Camargo (1994), registros indicam que esta cultivar foi introduzida no Rio Grande do Sul antes de 1913 pelo Instituto Agrônomo Veterinário de Porto Alegre. Várias tentativas foram feitas para difundir seu cultivo na Serra Gaúcha, especialmente nas décadas de 1930 e 1940. Entretanto, foi a partir de 1982 que se iniciou o cultivo comercial no Rio Grande do Sul. A produção aumentou rapidamente, atingindo, na safra de 1990, o importante volume de 2.915 toneladas de uvas vinificadas. Na safra de 1992, foram processadas 3.867 toneladas desta cultivar.

O vinho de Cabernet Sauvignon é rico em cor, extrato e tanino, e exige um período de envelhecimento para, então, ser consumido. Seu aroma e buquê característicos evoluem com o envelhecimento (Camargo, 1994).

2.4. Aminas bioativas

2.4.1 Conceito:

Aminas bioativas ou biologicamente ativas são bases orgânicas nitrogenadas de baixo peso molecular (Rice et al, 1976; Smith, 1980-81; Halász et al, 1994;), nos quais um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia são substituídos por grupos alquila ou arila (Shalaby,1996).

São compostos nitrogenados de importância biológica em células vegetais, microbiana e animais. (Santos, 1996) Elas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina, da estrutura química, da via biossintética (Smith, 1980-81; Bardócz, 1995, Santos, 1996) e ainda quanto ao grau de substituição do hidrogênio da amônia.

Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, podem ser classificadas em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermina, espermidina e agmatina). Quanto à estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) e heterocíclicas (histamina, triptamina). Ainda, com relação à estrutura química, podem ser classificadas de acordo com o grupo químico que apresentam em catecolaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina), indolaminas (serotonina) e imidazolaminas (histamina).

Quanto ao grau de substituição do hidrogênio, existem as aminas primárias, secundárias e terciárias, em que, respectivamente, ocorre substituição de um, dois e três hidrogênios.

Quanto à via biossintética, as aminas classificam-se em biogênicas e naturais. As biogênicas são formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas. Como exemplos deste grupo, podem ser citadas histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina (Lima & Glória, 1999). Também podem ser formadas por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas, hidrólise de compostos nitrogenados ou decomposição térmica (Halász et al., 1994; Bardócz, 1995). Segundo Shalaby (1996), elas são designadas como biogênicas porque são formadas por ação de organismos vivos.

As aminas naturais putrescina, agmatina, espermina e espermidina são formadas *in situ* nas células à medida que são requeridas e a histamina está armazenada nos mastócitos e basófilos (Bardócz, 1995). Interessante observar que a histamina poderia se encaixar nestes dois grupos.

Conforme a figura 1, pode-se observar que as aminas bioativas são, na sua maioria, denominadas em função dos aminoácidos precursores.

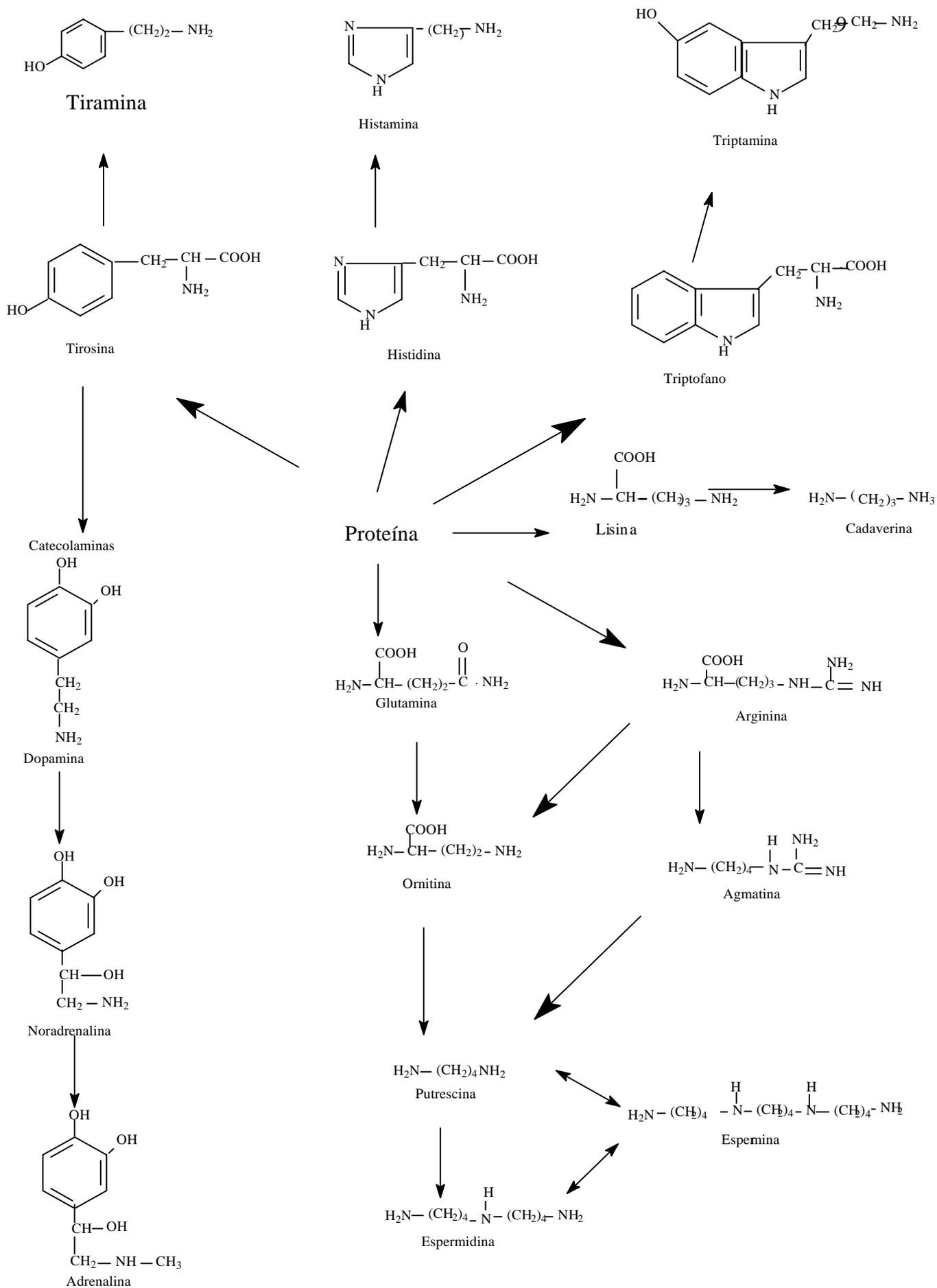


FIGURA 1- Rota Metabólica para a formação de aminas biogênicas
 Fonte: HALÁSZ et al., 1994.

2.4.2 Função e Importância das aminas bioativas

Além do seu papel biológico como fonte de nitrogênio e precursores na síntese de hormônios, alcalóides, ácidos nucléicos e proteínas (Pfundstein et al., 1991), sabe-se que aminas são compostos essenciais ao crescimento, renovação e metabolismo sendo, portanto, indispensáveis às células vivas. Apresentam diversas funções nas células, dentre elas, aumento na síntese do RNA, DNA e de proteínas, estabilização das membranas. Aminas como putrescina, espermina e espermidina estão presentes em elevadas concentrações nas células e têm seu conteúdo aumentado em tecidos com altas taxas de crescimento (Smith, 1980-81; Bardócz et al., 1995; Santos, 1996).

Segundo Shalaby (1996), aminas bioativas são fatores antinutricionais naturais e são hábeis a iniciar várias reações farmacológicas.

Elas são sintetizadas endogenamente por rotas metabólicas em células de mamíferos que usualmente envolvem descarboxilação de aminoácidos precursores. Similarmente, elas podem ser geradas exogenamente no trato intestinal por descarboxilação bacteriana de aminoácidos liberados por hidrólise enzimática de proteínas da dieta (Smith, 1980-81).

Algumas aminas são psicoativas ou vasoativas. As aminas psicoativas como histamina, serotonina, dopamina, adrenalina e noradrenalina atuam como neurotransmissores no sistema nervoso central. As vasoativas atuam diretamente ou indiretamente no sistema vascular, podendo ser vasoconstritoras (pressoras) ou vasodilatadoras (Rice et al., 1976; Taylor, 1986). Feniletilamina e tiramina são vasoconstritoras e causam um aumento na pressão sanguínea; ao contrário, histamina reduz a pressão sanguínea. Histamina possui uma poderosa ação biológica, servindo como mediador primário de sintomas imediatos notados em respostas alérgicas (Taylor, 1986; Stratton et al., 1991).

As aminas alifáticas são associadas com condições sanitárias deficientes, enquanto as aromáticas e heterocíclicas são suspeitas de causar efeitos tóxicos (Mafra et al., 1999).

Nos vegetais, além das funções de crescimento, renovação e metabolismo, participam da floração e desenvolvimento do fruto e da resposta ao estresse e inibem a produção de etileno e a senescência. São também importantes na síntese

de metabólitos secundários de interesse biológico como nicotina e alcalóides. (Smith, 1980-81; Flores et al., 1989).

Aminas secundárias como agmatina, espermina, espermidina podem formar nitrosaminas pela reação com nitrito a produzir compostos carcinogênicos (Smith, 1980-81; Halász et al., 1994). Em geral, compostos nitrosos podem ser formados por interação com reagentes nitrosantes como nitrito e óxidos de nitrogênio durante a estocagem, conservação e cozimento de alimentos (Hotchkiss, 1987).

Além destas funções, aminas biogênicas são importantes componentes do aroma dos alimentos (Pfundstein et al., 1991). Aminas bioativas em vinhos podem causar efeitos negativos no aroma. As aminas voláteis, ao pH do vinho, aparecem como substâncias inodoras, mas na boca, elas são parcialmente liberadas e seu flavor começa a aparecer (Lehtonen, 1996).

2.4.3 Aminas bioativas em alimentos:

Aminas biogênicas estão presentes numa larga variedade de alimentos de origem vegetal e animal, incluindo peixes, laticínios, carnes e bebidas fermentadas (Halász et al., 1994).

Segundo Halász et al. (1994), elas são geradas como resultado da atividade de aminoácido descarboxilases endógenas nas matérias-primas ou por desenvolvimento de microorganismos descarboxilase positivos sob condições favoráveis de atividade enzimática. Pode-se dizer que a produção de aminas é catalisada por enzimas aminoácido descarboxilases específicas (Bilic, 1996).

Normalmente, aparecem como resultado da degradação enzimática ou processos fermentativos (Vidal - Carou & Mariné, 1983). De acordo com Crespo & Lasa, (1994); Arce et al. (1998), aminas podem ser encontradas em quase todos os alimentos pois elas são produtos da degradação microbiana. A formação de aminas biogênicas poderia ser consequência da descarboxilação dos respectivos aminoácidos precursores por alguns microorganismos. Então, esta formação somente ocorreria quando o produto contém aminoácidos precursores livres. Produtos alimentícios freqüentemente associados com a presença de grandes quantidades de aminas bioativas são alimentos ricos em proteínas (peixes e

produtos cárneos) nos quais também existe atividade proteolítica microbiana que aumenta a quantidade de aminoácidos livres. (Rice et al., 1976; Eitenmiller et al., 1978). Portanto, os aminoácidos livres podem ocorrer normalmente ou serem liberados de proteínas, como resultado da atividade de microorganismos proteolíticos.

O acúmulo de aminas nos alimentos dependerá da disponibilidade de aminoácidos livres, da presença de microorganismos com atividade descarboxilante sobre aminoácidos, da existência de condições favoráveis para o crescimento de microorganismos e para a produção e ação das enzimas descarboxilantes (Rice et al., 1976; Maga, 1978; Halász et al., 1994).

Para se conhecer a origem das aminas biogênicas nos alimentos, inicialmente deve-se saber se o produto em questão é fermentado ou não, ou seja, deve-se conhecer a natureza do alimento. Segundo Santos et al. (1985) e Vidal-Carou et al. (1990b), em alimentos não fermentados, a presença de aminas biogênicas sob um certo nível é considerada como indicativo de atividade microbiológica indesejável. Isto por que microorganismos fermentativos não são requeridos na produção destes alimentos. Portanto, segundo os mesmos autores, o nível de aminas pode ser usado como um indicador de deterioração microbiana. Em relação a isso, Taylor (1986); Donhauser et al. (1993); Halász et al. (1994) afirmam que as aminas podem ser usadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênicas durante a fabricação de certos produtos.

Segundo Halász et al. (1994), isto se deve ao fato de que a degradação microbiana de alimentos pode ser acompanhada pelo aumento na produção de descarboxilases. Vidal-Carou et al. (1989a) destacam uma importância particular da histamina nesse sentido. Entretanto, a presença de aminas biogênicas em alimentos não necessariamente está correlacionada com o desenvolvimento de microorganismos deteriorantes porque nem todos eles são descarboxilase positivos (Taylor 1986; Donhauser et al., 1993; Halász et al., 1994).

Durante a preparação de alimentos fermentados, estes podem experimentar a presença de muitos tipos de microorganismos, alguns dos quais capazes de produzir aminas biogênicas. Muitos alimentos nos quais desenvolve-se bactéria ácido-lática, contêm quantidades consideráveis de putrescina, cadaverina, histamina e tiramina (Brink et al., 1990).

No caso de alimentos e bebidas fermentados, a introdução de culturas *starter* pode afetar a produção de aminas biogênicas direta ou indiretamente através de interação entre diferentes populações microbianas. Um dos critérios para a seleção da bactéria usada como cultura starter poderia ser sua capacidade de produzir aminas (Santos, 1996).

No caso de vinhos, quando espécies produtoras de aminas biogênicas estão presentes, o produtor de vinho pode inocular bactéria malolática selecionada para substituir a flora indígena selvagem (Lonvaud-Funel, 2001).

Segundo Halász et al. (1994), microorganismos com atividade descarboxilante sobre aminoácidos podem fazer parte da microbiota associada ao alimento, serem introduzidos para obter produtos fermentados, ou ainda aparecerem por contaminação antes, durante ou após o processamento.

Aminas biogênicas estão presentes em alimentos fermentados como, por exemplo, queijos, vinhos, cerveja, peixes, respectivamente em concentrações, em mg L^{-1} , de 5-4500; 5-130; 2,8-13 e 2400-5000 (Soufleros et al., 1998).

A histamina foi encontrada em vegetais como repolho, berinjela, jiló, tomate, beterraba e espinafre. Também foi detectada em broto de feijão (Smith, 1980-81).

Em carnes e produtos cárneos, é de se esperar a presença de histamina armazenada nos mastócitos e basófilos (Taylor, 1986). Além disso, por se tratar de um produto fundamentalmente protéico, a carne é susceptível à formação de outros tipos de aminas. As proteínas podem sofrer hidrólise por ação de enzimas endógenas ou microbianas, liberando aminoácidos, substrato para a formação de aminas. Ainda, a carne deteriora-se com relativa facilidade, existindo a possibilidade de que os microorganismos presentes tenham a capacidade de formar aminas (Vidal-Carou et al., 1990b).

À semelhança da carne, os músculos de peixes frescos contêm histamina sob condições fisiológicas normais e, por serem altamente protéicos, são susceptíveis à formação de outras aminas (Lima & Glória, 1999). A produção de aminas em peixes ocorre devido a ação de enzimas descarboxilantes de aminoácidos de origem bacteriana. Peixes da família Scombridae (atum, bonito, albacora, cavala) possuem níveis elevados de histidina livre no tecido muscular (Taylor, 1986), precursor da histamina.

Diversas aminas, tais como, histamina, tiramina, cadaverina, putrescina, triptamina e feniletilamina têm sido encontradas em leites e diferentes tipos de queijos (Stratton et al., 1991).

Estudos realizados com cervejas brasileiras indicaram a presença de putrescina, agmatina e tiramina em 100% das amostras. Histamina foi detectada em 40% das amostras. A histamina encontrada na cerveja pode ser proveniente da matéria-prima ou ser formada durante a produção e armazenamento. Também pode ser formada durante a fermentação por bactérias lácticas contaminantes (Lima & Glória, 1999).

Vidal-Carou et al. (2003) detectaram 1,10 e 0,74 mg L⁻¹ de histamina em vinho branco e Vermouth escuro, respectivamente. Neste mesmo trabalho, não foi detectada histamina em cidra e “cava”.

2.4.4 Produção de aminas e atividade das descarboxilases

Uma vez que aminas são formadas por atividade enzimática de alimentos ou descarboxilase ativa de bactérias, inibição de tais atividades e prevenção de crescimento bacteriano poderiam ser muito importante para controlar o conteúdo de aminas nos alimentos (Santos et al., 1995).

A produção de aminas por bactérias é influenciada pelo pH do meio, temperatura, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e coenzimas, concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis. Em meio ácido, pH 2,5 a 6,5, a produção de aminas é estimulada como um mecanismo de proteção da bactéria (Voigt & Eitenmiller, 1977; Halász et al., 1994), pois a reação de descarboxilação favorece o desenvolvimento e sobrevivência da bactéria em meio ácido, uma vez que induz um aumento no pH do alimento ou do vinho (Lonvaud-Funel, 2001).

A atividade das enzimas descarboxilases mostrou ser dependente da composição do meio e da fase de crescimento do microorganismo, sendo mais elevada na fase estacionária.

Com relação à temperatura, as descarboxilases são mais ativas em temperaturas inferiores a 30 °C e sem atuação acima de 40 °C. Na faixa de 0 a 10 °C, a atividade dependerá da microbiota presente. Em alimentos, a produção de

histamina é lenta a 10 °C e quase terminada a 5 °C, devido à destruição da bactéria produtora de histamina (Halász et al., 1994).

A presença de carboidratos fermentáveis como a glicose acentua o desenvolvimento e a atividade aminoácido descarboxilase nas bactérias. Concentrações de glicose entre 0,5 - 2,0% tem sido relacionado ser ótima, enquanto que níveis superiores a 3% inibiram a formação das enzimas (Halász et al., 1994).

O potencial redox do meio também influencia a produção de aminas. Condições de potencial redox reduzido estimularam a produção de histamina e a atividade da histidina descarboxilase parece ser inativada ou destruída na presença de oxigênio (Halász et al., 1994).

A produção de histamina em queijos têm sido relacionada a fatores como disponibilidade de substrato, pH, concentração de sal e temperatura. A própria temperatura de estocagem é provavelmente o mais importante método de prevenção (Stratton et al., 1991).

2.4.5 Microorganismos produtores

Embora aminoácido descarboxilases não estejam largamente distribuídas entre bactérias, espécies de alguns gêneros como *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*, e bactéria láctica *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* são capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos (Rice et al., 1976; Brink et al., 1990). Segundo Lima & Glória (1999) além dos gêneros citados, também são importantes os gêneros *Leuconostoc*, *Achromobacter* e *Propionibacterium*.

Um estudo realizado por Delfini (1989), comprovou que a formação de histamina e outras aminas biogênicas em vinhos foi devido à bactéria deteriorante, principalmente espécies *Pediococcus damnosus* e não a *Leuconostoc oenos* (*oenococcus oeni*). Em 1990, Choudhury et al., mostraram que uma espécie de *Leuconostoc Oenos* DSM 2025, a principal bactéria ácido láctica responsável pela fermentação malolática, foi capaz de produzir histamina. Em 1994, uma espécie de *Leuconostoc Oenos* (*Leuconostoc Oenos* 9204) capaz de produzir histamina, via histidina descarboxilase, foi isolada do vinho (Le Jeune et al., 1995).

Estudos de fermentação malolática de vinho não comprovaram a hipótese de que a histamina é formada por leveduras e bactérias envolvidas (Ough et al., 1987). Entretanto, investigações recentes indicaram que a bactéria de fermentação malolática *Pediococcus cerevisiae*, a qual suporta a presença de dióxido de enxofre melhor que *Leuconostoc oenos*, pode ser considerada como produtora de histamina em certos vinhos (Pogorzelski, 1992). Durante a fermentação de cervejas clássicas locais da Bélgica, concentrações de cadaverina, putrescina e espermina variaram com a evolução de diferentes espécies de leveduras as quais produzem e usam aminas biogênicas no seu metabolismo (Dumont et al., 1992 apud Loret et al., 2005). Entretanto, segundo Ough et al. (1987), parece que enzimas aminoácido descarboxilases não são bem distribuídas entre leveduras de cervejas e vinho e mais comumente entre as bactérias de fermentação malolática usadas. Trabalhos a respeito dos fatores que influenciam o tipo e quantidade de aminas em vinhos, particularmente biogênicas, indicam bactéria láctica como principal causa para uma geração significativa destas substâncias, particularmente algumas espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Moreno-Arribas et al., 2000). Espécies de *Saccharomyces* mostraram ser fracas produtoras de histamina por Lafon-Lafourcade & Joyeux, 1975, (apud Herbert et al., 2004). Entretanto, segundo Leitão et al. (2000), algumas espécies de *Oenococcus oeni* possuem atividade descarboxilase capazes de produzir aminas. Trabalho realizado por Abad & Gómez (1987), mostraram que algumas leveduras “não-*Saccharomyces*” (que podem proliferar nos primeiros estágios da fermentação alcoólica) foram capazes de produzir histamina a concentrações tão altas como 8,3 mg L⁻¹.

Certas espécies de bactéria ácido láctica pertencentes aos gêneros *Pediococcus* ou *Lactobacillus*, encontradas em algumas fermentações maloláticas espontâneas, tem a enzima descarboxilase e são capazes de sinteticamente produzir aminas na presença de seus precursores aminoácidos durante fermentações (Rice & Koehler, 1976). Segundo Farias et al. (1993), histidina-descarboxilase tem sido encontrada menos freqüentemente em algumas espécies de *Leuconostoc oenos*.

2.4.6 Toxicidade

As aminas presentes em alimentos são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação ou mediante reações de oxidação por enzimas aminooxidases (monoaminoxidase-MAO; diaminoxidase-DAO; poliaminoxidase-PAO) (Smith, 1980-91). Algumas aminas, antes de serem oxidadas por estas enzimas, sofrem uma reação. É o caso da histamina que é inativada pela histamina N-metil transferase (HMT), formando N-metilhistamina, que é oxidada pela MAO (Nagatsu, 1991) e também das poliaminas que são primeiro acetiladas e, em seguida, oxidadas pela DAO e PAO (Bardócz, 1995). Sob condições normais, aminas exógenas absorvidas de alimentos são rapidamente detoxificadas, não oferecendo riscos ao consumidor (Santos, 1996).

Embora aminas biogênicas como histamina, tiramina e putrescina sejam necessárias para muitas funções críticas em humanos e animais e sejam rapidamente detoxificadas, o consumo de alimentos que contenham altas concentrações pode causar efeitos tóxicos (Halász et al., 1994; Santos, 1996).

Além da ingestão de altas concentrações, pode ocorrer intoxicação se as aminooxidases são inibidas, se existem efeitos sinérgicos ou potencializadores ou se houver deficiência genética (Rice et al., 1976; Halász et al., 1994). O efeito tóxico de algumas aminas pode ser potencializado pela presença concomitante de outras aminas (Stratton et al., 1991). O álcool também é considerado um potencializador dos efeitos tóxicos da histamina e tiramina por inibir a MAO (Glória et al., 1998). Isto é importante para aqueles consumidores de vinho que são sensíveis a tais compostos (Romero et al., 2000). Lehtonen (1996) afirma que aminas podem causar efeitos fisiológicos quando, além do álcool, acetaldeído está presente.

Rice et al. (1976) afirmam que as aminas contidas em alimentos deteriorados ou uma “overdose” de aminas (talvez após uma festa de queijos e vinhos ou após uma festa na qual grande quantidade de salames e chucrutes foram servidos) podem representar risco a todos os indivíduos. Indivíduos com problemas respiratórios e coronarianos ou aqueles com hipertensão ou deficiência de vitamina B₁₂ são particularmente expostos a risco devido ao fato de serem sensíveis a mais baixas doses de aminas biogênicas. Pessoas com problemas gastrointestinais são também de risco pois a atividade das oxidases em seus intestinos é usualmente

mais baixa do que nos indivíduos saudáveis. Em mulheres, há um decréscimo pré-menstrual na atividade da MAO tipo-B e isto pode ser um problema (Bardócz, 1995).

Os mais notórios casos de intoxicações alimentares causados por amins biogênicas são relacionados à histamina. A histamina exerce seu efeito tóxico por interação com dois tipos de receptores (H1 e H2) nas membranas celulares de humanos e outras espécies, que são encontrados no sistema cardiovascular e em várias glândulas secretoras. Histamina causa dilatação dos vasos sangüíneos, capilares e artérias, assim, resultando em hipotensão, rubor e dor de cabeça (Stratton et al., 1991). Histamina pode induzir contração da musculatura lisa intestinal, mediada por receptores H1, fato que pode explicar dores abdominais, diarreia e vômito (Taylor, 1986). Também pode regular a secreção ácido gástrica por meio de receptores H2 no estômago (Soll & Wollin, 1977).

Podem ocorrer vários sintomas decorrentes da intoxicação histamínica: cutânea (urticária, coceira, inflamação localizada, edema), gastrointestinais (náusea, vômito, diarreia, dor abdominal), hemodinâmicos (hipotensão) e neurológicos (rubor, queimação, dor de cabeça, palpitação, taquicardia) (Lima & Glória, 1999).

Histamina é a mais tóxica amina detectada em alimentos, isto é, peixe, queijo, vinho e produtos cárneos (Brink et al., 1990). O efeito toxicológico depende da concentração de histamina ingerida, presença de outras amins diferentes, atividade da monoaminoxidase e fisiologia intestinal de cada indivíduo (Santos, 1996).

Certas drogas têm sido implicadas como fatores contribuintes nos casos de intoxicação histamínica (Brink et al., 1990; Stratton et al., 1991): é a chamada classe de medicamentos inibidores da monoaminoxidase (IMAO), que têm sido muito utilizados por serem eficazes no tratamento da malária, tuberculose, depressão, fobia social e transtorno do pânico (Marques et al., 1997; Fuzikawa et al., 1999).

2.4.7 Dose tóxica

A dose tóxica de amins é muito difícil de ser estabelecida pois isto depende das características individuais, da presença de outras amins e da eficiência do mecanismo de detoxificação de diferentes indivíduos (Halász, et al., 1994; Glória et

al., 1998). Geralmente, doses de 0,05 a 0,5 mg intravenosa e 3 a 6 mg subcutânea de aminas são consideradas tóxicas para uma pessoa adulta (Soufleros et al., 1998)

Alguns governos nacionais têm implementado regulamentos legais, ou, no mínimo, recomendam um conteúdo máximo de histamina em certos alimentos e bebidas. Um limite legal de 100 mg de histamina /kg de alimento e 2 mg de histamina por litro de bebidas alcoólicas tem sido sugerido. Valores de 100-800 mg/kg para tiramina e 30 mg/Kg para feniletilamina tem sido reportado como doses tóxicas em alimentos (Brink et al., 1990; Halász et al., 1994). Ienistea (1973 apud Lima & Glória 1999), reportou que níveis de histamina entre 5 e 10 mg em 100 g de alimento podem causar sintomas em indivíduos mais sensíveis; níveis entre 10 e 100 mg são potencialmente tóxicos e acima de 100 mg apresentam toxicidade elevada. Segundo Bataglia & Frölich (1978), uma concentração de 5 mg L⁻¹ de histamina pode provocar dores de cabeça após o consumo de 0,5 L de vinho. Segundo Bauza et al. (1995), se a concentração de histamina nos vinhos for próxima a 20 mg L⁻¹, é possível de ocasionar efeitos fisiológicos. Uma concentração de 8 mg L⁻¹ de histamina, segundo Glória et al. (1998), já pode provocar dores de cabeça quando grandes quantidades de vinho são ingeridas. Soufleros et al. (1998) colocam como 20 mg.L⁻¹ uma concentração de histamina capaz de causar riscos fisiológicos.

Sugere-se uma dose tóxica para a histamina de 100 mg/100g de alimento e 2 mg de histamina por litro de bebidas alcoólicas (Halász et al., 1994).

2.4.8 Legislação

Alguns países como Estados Unidos, Suécia, Áustria e Holanda estabeleceram regulamentos e requerimentos legais para um limite máximo de aminas biogênicas (principalmente histamina) em vários tipos de alimentos (Busto et al., 1996 apud Arce et al., 1998). A Suíça e a Suécia estabeleceram limites de 10 e 20 mg de histamina por 100 g de pescado, respectivamente (Taylor, 1986).

Certas regulamentações para vinhos já existem, em função de que este é um produto largamente consumido em muitos países. Com isso, o conteúdo de histamina pode vir a ser regulamentado no futuro, seguindo o recente regulamento

implementado pelo Food and Drug Administration (FDA) para peixes da família Scombridae (Glória et al., 1998).

Alguns países já fixaram limite para histamina em vinhos. É o caso da Suécia que recomenda 10 mg L⁻¹ como teor máximo, a Alemanha, 2 mg L⁻¹, a Bélgica recomenda de 5-6 mg L⁻¹ e a França que estabelece um valor máximo de 8 mg L⁻¹ (Lehtonen, 1996). Mesmo assim, ainda existe uma carência de legislação nos conteúdos tolerados de histamina em vinho, tornando difícil avaliar corretamente a importação e exportação deste produto (Busto et al., 1996 apud Arce et al., 1998).

2.4.9 Histamina em vinhos

Histamina é uma amina biogênica encontrada em muitos tecidos animais e vegetais bem como em vários alimentos e bebidas. A presença de aminas em mostos e vinhos é bem documentada na literatura, sendo as aminas biogênicas de particular importância (Bauza et al., 1995). Entretanto, os processos que geram estas aminas juntamente com os fatores que influenciam sua presença quantitativa e qualitativa não são bem definidos ainda e, algumas vezes, existe falta de concordância entre os resultados publicados (Herbert et al., 2004). É geralmente aceito que a presença de histamina em produtos alimentícios é devido à atividade microbiana sobre seu aminoácido precursor histidina. Esta atividade pode estar relacionada ao processo de fermentação envolvido na produção da bebida ou ao processo de deterioração.

Em vinhos, o aparecimento de histamina tem sido relacionado à levedura usada na fermentação alcoólica, à bactéria da fermentação malolática (Vidal-Carou, et al., 1990c) e, até mesmo, a microorganismos contaminantes, basicamente *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* e *Proteus*) (Buteau et al., 1984a).

Pode haver três possíveis origens para a presença de aminas biogênicas em vinhos: a) elas podem já estar presentes no mosto, b) elas podem ser formadas pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, e/ou c) elas podem ser formadas pela ação da bactéria envolvida na fermentação malolática (Vidal-Carou et al., 1990c). Entretanto, mostos e vinhos são meios muito seletivos, os quais podem

suportar o desenvolvimento de somente poucas espécies de bactérias ácido lácticas (LAB). (Moreno-Arribas et al., 2003)

A formação de histamina em vinhos é negativamente correlacionada a presença de ácidos málico e cítrico, sugerindo que esta produção ocorre durante a fermentação malolática devido à bactéria ácido láctica (Aerny, 1985 apud Rollan et al., 1995).

Male & Luong (2001) afirmam, ainda, que a histamina pode ser acumulada em alimentos e bebidas durante uma estocagem imprópria como resultado de degradação microbiana/enzimática da histidina. Cerutti & Remondi (1972) destacaram que “vinho produzido em ótimas condições de higiene deveriam ser quase livres de aminos”. Nesse contexto, Bataglia & Frölich (1978) mencionaram um interesse na histamina como indicador de condições higiênico-sanitárias durante a produção de vinho. Eles destacam que uma checagem de rotina do conteúdo de histamina em vinhos é interessante como método de detectar possíveis defeitos no processo de produção. Entretanto, a quantificação de rotina destas substâncias não é usada no controle de qualidade dos vinhos principalmente devido às dificuldades analíticas (Herbert et al., 2001).

Os tipos e teores de aminos em vinhos variam muito. Algumas aminos são constituintes naturais da uva, com teores que variam em função da variedade, grau de maturação e com o tipo e composição do solo, fertilização nitrogenada.

A histamina, bem como a enzima responsável por sua síntese pode ser encontrada em muitas plantas, inclusive videiras, embora suas funções não sejam claras (Radler & Fath, 1991 apud Soleas et al., 1999). Como em outras plantas, aminos biogênicas são sintetizadas in *Vitis* em várias partes da videira, incluindo bagas e folhas (Geny et al., 1997).

As aminos mais detectadas em uvas incluem putrescina e espermidina em maiores proporções, e etanolamina, agmatina, cadaverina, espermina e histamina em pequenas concentrações (Glória et al., 1998). Já, Vidal-Carou et al. (1990b) afirmam que em uvas são encontradas principalmente histamina e tiramina. Segundo Buteau et al. (1984), aminos como etanolamina tiramina e histamina já estão presentes no mosto a baixas concentrações, aproximadamente 3,5 mg L⁻¹. A presença de *Botritis cinerea* em uvas parece influenciar a quantidade e qualidade de aminos em vinhos (Hajos et al., 2000).

Durante a fabricação do vinho, vários tipos de aminas podem ser formadas e acumuladas. Dentre os fatores que afetam a formação de aminas, têm-se: o processo de vinificação, a presença de aminoácidos livres, a microbiota presente no vinho durante a fermentação, a duração da fermentação na presença da casca, a presença de microorganismos contaminantes, a qualidade e a quantidade de agentes clarificantes, teor alcoólico, concentração de dióxido de enxofre, pH, extensão da autólise, adição de nutrientes, tempo e temperatura de estocagem, duração do contato do vinho com leveduras mortas, entre outros (Buteau et al., 1984a; Glória et al., 1998; Vidal-Carou et al., 2003).

Alguns destes fatores aumentam a concentração de aminoácidos precursores das aminas biogênicas no meio enquanto outros favorecem o desenvolvimento de microorganismos com habilidade de formar aminas (Goñi & Azpilicueta, 2001).

Aceita-se que vinhos tintos contém concentrações mais altas de aminas do que vinhos brancos (Vidal-Carou et al., 1989a), devido a maior importância da fermentação malolática nos vinhos tintos (Vidal-Carou et al., 1990a), uma vez que seu processo de vinificação normalmente envolve fermentação malolática. Vinhos tintos mostram claramente ter maiores quantidades de histamina e outras aminas do que vinhos rosé e brancos, nos quais a fermentação malolática não ocorre ou ocorre em menor grau (Marcobal et al., 2004).

A habilidade da bactéria ácido láctica do vinho em descarboxilar aminoácidos tem sido bastante discutida (Zee et al., 1983) e considerada com um efeito indesejável da fermentação malolática, pois vinhos com mais alto pH suportam o desenvolvimento das espécies bacterianas durante a fermentação malolática ou mais tarde são mais suscetíveis a conter níveis indesejáveis de histamina (Davis et al., 1985).

Histamina, tiramina, putrescina e cadaverina são as mais significantes aminas encontradas em vinhos. Destas, histamina tem sido a mais estudada e diversas publicações reportam sua presença em vinhos (Zee et al., 1983), afirmação citada também por Maga (1978).

Busto et al. (1995) afirmam que ao pH do vinho, histamina e outras aminas são inodoras, mas ao pH da boca, ela é liberada e seu "flavor" pode ser percebido, podendo causar um impacto negativo no aroma do produto.

Hernandez (1975 apud Smith 1980-81) salienta que a adição de bentonite pode remover a histamina e outras amins dos vinhos. Outra forma de reduzir o conteúdo de histamina em vinhos seria através do controle da flora bacteriana inoculada nos vinhos.

Segundo Bauza (1995 apud Soufleros et al., 1998), a histamina está geralmente presente em vinhos em concentrações médias de 4,15 mg L⁻¹.

2.5 Métodos de análise

As técnicas de separação de amins incluem várias formas de cromatografia: camada fina, troca iônica, gasosa (GC, do inglês Gas Chromatography) e líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography), sendo que as duas últimas são mais seletivas e sensíveis, permitindo a detecção de pequenas quantidades de amins. A análise de amins bioativas em alimentos por HPLC tem aumentado, já que oferece a vantagem de separação e quantificação simultânea de amins (Bauza et al., 1995).

Quantificação de amins biogênicas em vinhos confronta com dois principais problemas: primeiro, os baixos níveis destes compostos presentes no vinho, e segundo, os efeitos interferentes causados pela complexidade de matrizes (Herbert et al., 2001).

A maioria das amins não apresenta absorção ultravioleta natural ou fluorescência. Por esta razão, a derivatização química é necessária para detectar os derivados das amins após a separação por HPLC. A derivatização pode ser feita pré ou pós-coluna, seguida de detecção por espectrofotometria ou fluorimetria (Glória et al., 1998).

Derivatização é um processo no qual o constituinte em análise é modificado quimicamente para torná-lo detectável ou para melhorar a resposta do detector. Os detectores de fluorescência são muito sensíveis, mas somente poucos constituintes fluorescem naturalmente (Harris, 2001). Muitas vezes, a simples mistura da substância com o reagente é suficiente para transformar um composto em um derivado fluorescente e, desta maneira, aumentar a sensibilidade do composto (Collins et al., 1995). Os agentes derivatizantes mais utilizados na determinação por

fluorescência de aminas bioativas são: cloreto de dansyl, orto-ftaldeído (OPA) e fluorescamine. Segundo Busto et al, (1997) a mais importante vantagem que o OPA apresenta em relação a outros reagentes derivatizantes é que reage com aminas rapidamente e possibilita a detecção de baixos níveis de aminas biogênicas. Derivatização pré-coluna, com formação de derivados fluorescentes, mostra um significativo ganho na sensibilidade e eliminação de muitos interferentes devido à complexidade da matriz (Lindroth & Mopper, 1979). Glória et al. (1998) afirmam que a derivatização pós-coluna com OPA, seguida pela quantificação por fluorescência é a mais indicada por ser simples, sensível e seletiva, requer menor quantidade de amostra e menos pré-tratamento, além de proporcionar maior estabilidade pelas condições padronizadas de derivatização. A Figura 2 representa a reação química entre a histamina e o reagente derivatizante OPA.

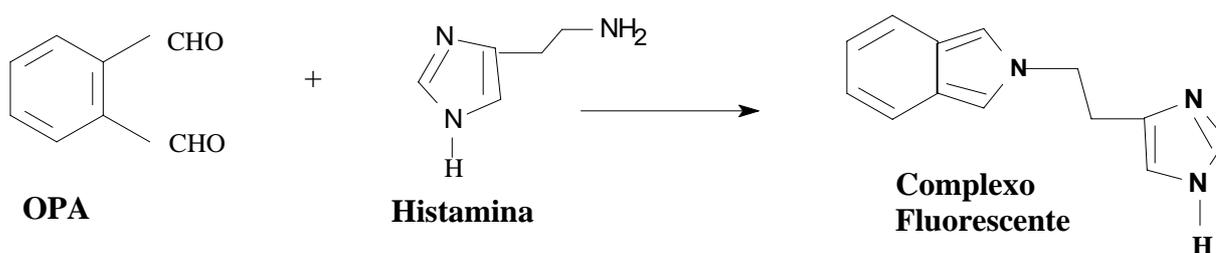


FIGURA 2 - Reação de derivatização química entre a histamina e OPA

FONTE: Douabalé et al., 2003

2.6 Validação de métodos cromatográficos

Uma vez desenvolvido um procedimento de análise cromatográfica, como em qualquer outra técnica analítica, torna-se importante fazer a validação do procedimento para avaliar se ele fornece resultados confiáveis, de forma a poder ser aplicado rotineiramente (Primel, 2000).

A validação de um procedimento analítico consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados compatíveis com a precisão e exatidão, consideradas, na prática, como satisfatórias. A variabilidade

associada a um método analítico deve levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo àquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente.

Os parâmetros geralmente envolvidos no procedimento de validação de métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (Primel, 2000; Zanella et al., 2000).

2.6.1 Curva Analítica

A obtenção da curva analítica é um dos estágios fundamentais na análise química. A curva analítica é o método de quantificação mais freqüentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo (Primel, 2000). Para a maioria das técnicas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do composto, podendo ser descrita pela equação da regressão linear: $y = ax + b$, onde b é a interseção da curva analítica com o eixo y , quando $x = 0$ e a é a inclinação da reta. A regressão linear deve também ter um coeficiente de determinação (r^2) $> 0,99$ (Ströher, 2004)

2.6.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, na qual é possível se relacionar o valor de uma variável dependente (medida) através da variável independente (concentração) (Chasin et al., 1998). A linearidade é determinada através da análise de uma série de soluções analíticas, de diferentes concentrações, variando estas de acordo com a finalidade da análise. Para verificar se os pontos encontram-se dentro da região linear da curva, utiliza-se o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q), definida pela equação (1):

$$(S/Q_i) \% = (S_i - b/Q_i) \times 100/a. \quad (1)$$

Os valores de S e Q são obtidos na construção da curva analítica, através dos parâmetros de área ou altura do pico e concentração do analito.

Na ausência de erros indeterminados, isto é, com $r^2 = 1$, e dentro da faixa linear, pode-se provar que $(S/Q)_i = a$ para todos os pares de valores experimentais usados para construir a curva. Na presença de erros indeterminados ($r^2 < 1$), que é o que ocorre na prática, e dentro da faixa linear, $(S/Q)_i \approx a$. Se $(S/Q)_i \ll a$ ou $(S/Q)_i \gg a$, então o resultado pode ser assumido como fora da faixa linear (Pinto, 1999). Conforme normas da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), são considerados dentro da faixa linear os pontos cujas razões sinal/concentração não ultrapassam mais de 5% do coeficiente angular da reta. Conclui-se que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha de 95 ou 105% (Ribani et al., 2004)

O parâmetro r^2 permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) um valor acima de 0,90 (Ribani et al., 2004).

2.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD, do inglês Limit of Detection) é a menor concentração da substância em análise que o procedimento analítico pode identificar, com confiança, ou ainda, que pode ser estatisticamente diferenciado do ruído. É geralmente expresso em unidades de concentração (Chasin et al., 1998).

O limite de quantificação (LOQ, do inglês Limit of Quantification) é a menor

concentração da substância em análise que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais e é geralmente expresso em unidades de concentração.

Neste trabalho, o LOD e LOQ foram determinados baseados na definição adotada pelo *Pesticides Laboratory Training Manual* (Clifton, 1996). Para determinar o LOD foi considerada a concentração cujo sinal cromatográfico obtido foi três vezes maior, em relação ao ruído da linha base, no tempo de retenção dos picos de interesse. Para determinar o LOQ, foi considerada a concentração cujo sinal cromatográfico obtido foi dez vezes maior, em relação ao sinal do ruído da linha base, no tempo de retenção dos picos de interesse.

A Figura 3 demonstra, de forma representativa, como são obtidos o LOD, o LOQ e o ruído da linha base (Clifton 1996, adaptado por Mistura, 2003).

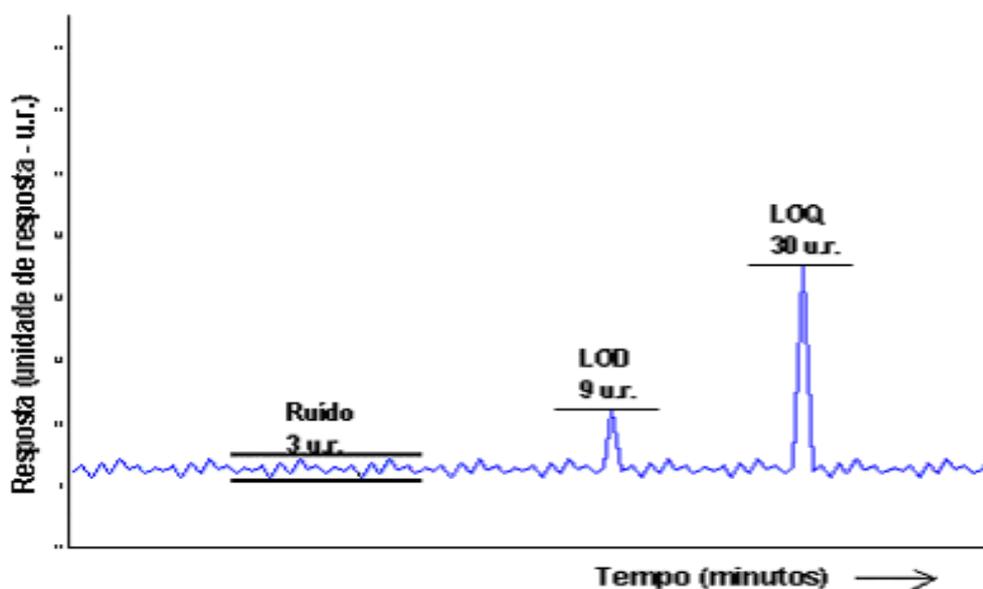


FIGURA 3 - Representação do ruído da linha base, o LOD e o LOQ. (adaptado por Mistura, 2003).

2.6.4 Recuperação

Recuperação é a medida da eficiência do procedimento de extração do analito, a partir da matriz (Primel, 2003). A recuperação (R) avalia a eficiência do procedimento de extração do analito de amostras fortificadas. A recuperação geralmente é dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra (Chasin et al., 1998).

A recuperação (R) é calculada pela equação (2) e é expressa em porcentagem:

$$R\% = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100 \quad (2)$$

2.6.5. Precisão

Precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade (Ribani et al., 2004).

2.6.5.1 Repetitividade

Repetitividade é o grau de concordância dos resultados de testes individuais quando o procedimento é aplicado repetitivamente a amostragens múltiplas de uma amostra homogênea ou a amostras artificialmente preparadas. A repetitividade é expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), ou pela estimativa do desvio padrão absoluto (s). A repetibilidade pode ser utilizada para definir a precisão intralaboratorial. Este teste é realizado empregando o mesmo procedimento para a mesma amostra em um único laboratório, pelo mesmo operador e usando o mesmo

equipamento em um curto intervalo de tempo (Primel, 2000). Para a repetitividade, o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ANVISA sugere que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (Ribani et al., 2004).

2.6.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados.

A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD). O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação da ANVISA para o cálculo da repetitividade descrita anteriormente (Ribani et al., 2004).

A precisão qualitativa expressa a repetibilidade do tempo de retenção/área do analito, sendo considerado um excelente resultado quando o desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) é menor que 5% (Causon, 1998).

A precisão pode ser calculada através da equação (3) (Chasin et al., 1998).

$$RSD = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto = $\left\{ \sum (x_i - x_m)^2 / N - 1 \right\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

x_m = média de uma série de valores;

N = número de medidas

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microvinificação e amostras

3.1.1 Amostras coletadas durante a maturação da uva

Foram coletadas amostras de grãos de uvas provenientes do vinhedo da Cantina Velho Amâncio, Santa Maria, RS, durante a última etapa de maturação da uva Cabernet Sauvignon no período compreendido entre 22/01/04 até 16/02/04. As coletas foram efetuadas nos seguintes dias: 22/01; 28/01; 30/01; 2/02; 05/02; 09/02; 12/02 e 16/02. As amostras foram coletadas de três locais de plantio: percorreram-se todas as fileiras de plantio de uvas dos três locais, retirando-se ao acaso grãos de diferentes áreas nas fileiras e de diferentes posições nos cachos. As amostras coletadas foram colocadas em baldes plásticos e foram levadas imediatamente ao laboratório da cantina, misturadas e esmagadas para extração do mosto, que foi congelado a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em frascos de 60 mL preenchidos até volume máximo.

3.1.2. Microvinificações e coleta de amostras

Foram coletadas 75 kg de uva da cultivar Cabernet Sauvignon, correspondente às três regiões de plantio, que foram misturadas e posteriormente esmagadas. Pesou-se 12,5 kg de uvas já esmagadas em seis caixas de plástico (3 microvinificações realizadas em duplicata). Após esmagamento, foi adicionado 30 ppm de SO_2 em cada caixa. Após 1 hora, foi adicionado 0,2 g levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*/kg de uva em duas caixas (T2-A e T2-B) e 0,2 g de levedura *Saccharomyces cerevisiae*/kg de uva em outras duas caixas (T3-A e T3-B). As quantidades inoculadas de leveduras seguiram a orientação dos fabricantes e sofreram uma hidratação prévia com água a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nas

duas caixas restantes, não foi adicionado levedura (T1-A e T1-B). Quando cada mosto atingiu 0 °Brix, foi realizada a descuba. Após a descuba, o líquido foi colocado em garrafões de 5 litros. De cada caixa de plástico, obteve-se 2 garrafões de 5 litros, sendo que em um deles foi inoculada 0,01 g de bactéria láctica (BL)/Litro de vinho, previamente hidratada em água a 25 °C conforme indicação do fabricante, (C= com BL) e no outro não foi inoculada bactéria malolática (S = sem BL). Vedaram-se os garrafões com sebo industrializado no qual conectou-se uma mangueira que foi inserida em uma garrafa de 750 mL com água em seu interior (batoque hidráulico).

Após degradação do ácido málico, acompanhada por cromatografia em papel, os vinhos foram engarrafados mediante adição de 30 ppm de SO₂ e deixados à temperatura ambiente. De cada garrafão foram preenchidas duas garrafas de 750 mL que permaneceram estocadas por um período de três meses na posição horizontal à temperatura ambiente.

As vinificações experimentais foram realizadas, parte na câmara fria e parte no laboratório da vinícola Velho Amâncio.

Foram coletadas amostras: logo após o esmagamento da uva; quando atingiram 0 ° Brix; antes da inoculação de bactéria láctica; ao final da fermentação malolática e após um período de estocagem por três meses.

A segunda coleta de amostra foi efetuada à medida que cada mosto atingia 0 ° Brix e à medida que isto acontecia, realizava-se a descuba e transferia-se o líquido para o garrafão de 5 litros. Por isso, foi realizada uma coleta de amostra antes da inoculação de bactéria láctica, pois os vinhos não foram inoculados imediatamente após o término da fermentação alcoólica.

Todas as amostras coletadas foram congeladas a -5° C em frascos de 60 mL preenchidos até volume máximo e armazenadas para posteriormente serem analisadas.

À medida que as garrafas foram abertas para as primeiras análises químicas, os vinhos foram transferidos para garrafas de 375 mL, para evitar alguma alteração devido ao espaço de ar formado à medida que o vinho ia sendo retirado.

O fluxograma das microvinificações, bem como as coletas de amostras, (representadas pela letra A), realizadas durante todo o experimento, podem ser visualizados na Figura 4.

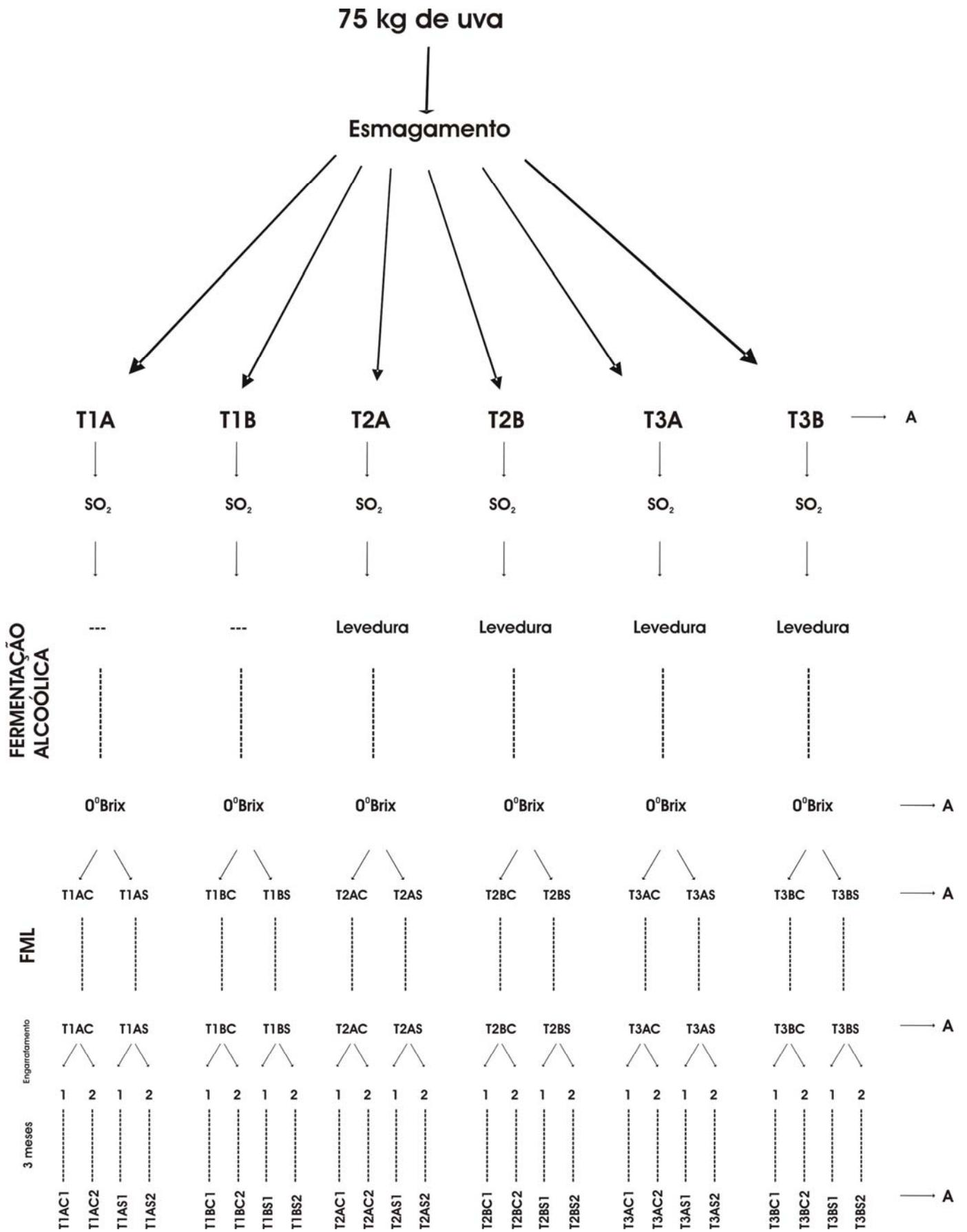


FIGURA 4: Fluxograma das microvinificações e coleta de amostras

3.2. Controle da fermentação malolática

A degradação do ácido málico foi acompanhada por cromatografia em papel, segundo método descrito por Zoecklein et al. (2001), no qual o solvente n-butanol é acrescido de ácido fórmico, água e corante verde de bromocresol. Este controle foi realizado antes da inoculação da bactéria malolática (BML) e de 4 em 4 dias após a inoculação da bactéria láctica.

3.3 Determinações químicas

Nas amostras de uva que foram coletadas durante a maturação, foram realizadas análise de pH, acidez total, ° Brix e histamina. As amostras que foram coletadas durante a microvinificação, sofreram análise de pH e histamina. Nos vinhos, ou seja, amostras coletadas após três meses de engarrafamento, foram realizadas as análises de pH, acidez total, acidez volátil, álcool, anidrido sulfuroso livre e histamina.

3.4 Metodologia utilizada

3.4.1. Determinações químicas

a) Sólidos Solúveis (°Brix)

Foi determinado com o uso de um mostímetro graduado em °Brix e corrigido para a temperatura (Amerine & Ough, 1980).

b) Acidez Total

Determinada por titulação potenciométrica de 10 mL de amostra com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até pH 8,2 (Amerine & Ough, 1980).

c) Acidez Volátil

A determinação de acidez volátil foi feita com aparelho Gibertini[®] para destilação dos ácidos voláteis e, a seguir, foi realizada uma titulação com hidróxido de sódio 0,1 N e indicador fenolftaleína.

d) pH

Determinado pelo método potenciométrico, utilizando um pHmetro equipado com um eletrodo de vidro combinado calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e pH 7,0.

e) Anidrido Sulfuroso livre

Esta análise seguiu o método de Ripper, conforme descrito em Amerine & Ough (1980), que consiste em uma titulação de amostra de vinho com solução de iodo e solução de amido como indicador.

f) Graduação Alcoólica

Foi realizada utilizando-se Ebulliômetro Dujardin-Salleron, conforme descrito em Amerine & Ough (1980).

3.4.2. Determinação de Histamina por HPLC - fluorescência

Para a determinação de histamina, utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e detecção por fluorescência.

3.4.2.1 Instrumentação:

Empregou-se cromatógrafo a líquido equipado com bomba Solvent Delivery System Varian 9002, com sistema de eluição isocrática; detector de fluorescência

Jasco modelo 821-FP Intelligent Spectrofluorometer (Japão), coluna analítica Phenomenex C-18 (250 x 4,6 mm; 4 μm). Utilizou-se um sistema de aquisição de dados Star Chromatography Workstation versão 4.5.

3.4.2.2 Soluções analíticas

A solução analítica estoque foi preparada através da dissolução do padrão analítico de histamina, Sigma, 98% de pureza. Preparou-se 10 mL de uma solução estoque em HCl 0,1 M com concentração de 1000 mg L⁻¹. A partir da solução estoque, prepararam-se soluções analíticas nas concentrações de 0,5/1,0/2,5/5,0/10,0/100,0 mg L⁻¹. Estes padrões foram utilizadas para os testes de otimização do sistema.

3.4.2.3 Condições cromatográficas

a) Comprimentos de onda

Foram adotados desde o início dos testes os comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, de 340 e 445 nm, conforme descrito por Vale & Glória (1997).

b) Volume da alça de injeção

Para a escolha do volume a ser injetado, utilizaram-se dados da literatura, adaptando-os às condições do laboratório. Escolheu-se uma alíquota de 20 μL como o volume ideal a ser injetado do composto já derivatizado.

c) Fase móvel

A fase móvel foi preparada de acordo com Soufleros et al. (1998): 2,72 g de acetato de sódio, 180 μL de trietilamina, 3,0 mL de tetrahidrofurano (THF), água Milli-Q qsp 400 mL e 600 mL de metanol, grau HPLC. O pH foi ajustado para 7,2 com

ácido acético glacial. A fase móvel foi ultrassonicada por 10 minutos, para eliminar os gases dissolvidos.

d) Vazão da Fase móvel

Foi escolhida uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Com esta vazão, obteve-se uma boa separação, rapidez na corrida, sem ultrapassar os limites de pressão do aparelho.

3.4.2.4 Preparo da amostra

A amostra foi previamente centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos em centrífuga para tubos Eppendorf, conforme descrito por Herbert et al. (2001). O sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf que foi congelado até o momento das análises.

No momento das análises, as amostras foram gradativamente retiradas do *freezer* para serem, então, diluídas cem vezes com a fase móvel.

3.4.2.5 Derivatização

a) Preparo do derivatizante

O derivatizante foi preparado da seguinte forma: 4,4 g de hidróxido de potássio, 5,0 gramas de ácido bórico, 0,04 gramas de OPA dissolvidos em 300 μL de metanol e 300 μL de mercaptoetanol, água Milli-Q qsp 100 mL. O mercaptoetanol é indispensável para a reação do OPA. O pH final deste reagente ficou em 11,0. Este reagente foi monitorado diariamente antes da injeção das amostras através da comparação da área com a área do dia anterior. Este reagente foi preparado conforme descrito por Souza (2002).

b) Reação de derivatização

500 μL da amostra, já diluída, foram colocados para reagir com 500 μL do derivatizante. Após exatamente 2 minutos, a mistura foi filtrada em filtro de membranas 0,2 μm , tipo ponteira, e, então, injetada manualmente no sistema. Este tempo de reação foi cuidadosamente obedecido em função de que o composto obtido da reação de histamina com OPA apresenta alta instabilidade.

3.5 Validação do procedimento de determinação de histamina em mostos e vinhos

Definidas as melhores condições de separação da histamina, a fase móvel, comprimento de onda e reação de derivatização, a etapa seguinte foi validar o procedimento para análise de histamina, conforme os seguintes parâmetros:

3.5.1 Curva analítica

A histamina foi quantificada utilizando-se o método de padronização externa.

Para a obtenção da curva analítica, 500 μL de padrões de diferentes concentrações (0,01/ 0,05/ 0,1/ 0,15/ 0,2 mg L^{-1}) foram derivatizados com 500 μL de OPA e 20 μL foram injetados no sistema, obtendo-se as áreas e o tempo de retenção de cada composto com auxílio do *software* Star[®] 4.5 (Varian). A curva analítica foi obtida colocando-se os valores de concentração do composto no eixo das abscissas e a média das áreas no eixo das ordenadas, com auxílio do programa Microsoft[®] Excel versão 7.0, que forneceu o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) da curva analítica.

3.5.2 Linearidade

Para verificar se os pontos encontram-se dentro da região linear da curva, utilizou-se o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q), definida por:

$$(S/Q_i) \% = (S_i - b/Q_i.) \times \frac{100}{a}$$

Os valores de S e Q foram obtidos na construção da curva analítica, através dos parâmetros de área do pico e concentração do analito.

3.5.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Na determinação do LOD do instrumento, foram feitas injeções em ordem crescente de concentração até que o sinal cromatográfico atingisse uma área referente a três vezes o ruído da linha base, no tempo de retenção do pico de interesse. Para a determinação do LOQ, as injeções foram feitas até que a área do pico fosse dez vezes superior ao ruído da linha base no tempo de retenção do pico de interesse.

3.5.4 Recuperação

A recuperação foi avaliada a partir da fortificação de uma amostra cuja concentração de histamina ficou abaixo do limite de detecção do instrumento com padrões analíticos de histamina de concentração 0,2 e 1,0 mg.L⁻¹.

Em um balão volumétrico de 10 mL, foi adicionado 100 µL da amostra branco e 1 mL de padrão, completou-se o volume para 10 mL com a fase móvel e realizou-se a derivatização conforme procedimento adotado para as amostras. Cada fortificação foi realizada em triplicata.

Paralelamente a isto, foi injetado no sistema, também em triplicata, somente os padrões diluídos cem vezes e derivatizados. A média das concentrações destes padrões representaram a massa real, ou seja, o valor de concentração que deve ser teoricamente encontrado.

3.5.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

O estudo da precisão do instrumento (repetitividade – RSD_{ri}) foi realizado efetuando-se oito injeções do padrão referente ao ponto médio da curva analítica ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$).

Para avaliar a precisão intermediária (RSD_{pji}) utilizaram-se apenas diferentes analistas, pois, conforme descrito anteriormente (item 2.6.5.2), pode-se optar por uma ou mais condições a variar. Foram realizadas oito injeções do padrão referente ao ponto médio da curva analítica ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) por dois analistas diferentes.

3.6 Análise estatística

Foi realizada ANOVA a 5% de significância, seguida de teste de Tukey (5%) nos casos em que houve diferença significativa entre amostras de tamanhos iguais. Nos casos de amostras de tamanhos diferentes, foi utilizado teste de Scheffé, precedido de análise de variância ANOVA a 5%.

Nos casos em que a comparação foi feita apenas entre dois tratamentos, foi utilizado teste “t”.

Para a análise de correlação, foi calculado o coeficiente “r” de Pearson.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação do procedimento para determinação de histamina em mostos e vinhos

4.1.1 Curva analítica

A curva analítica e a equação da reta estão representados na Figura 5. De acordo com a equação obtida, conclui-se que o modelo é adequado, pois o coeficiente de determinação (r^2) foi maior que 0,999, considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (Shabir, 2003 apud Ribani et al., 2004)

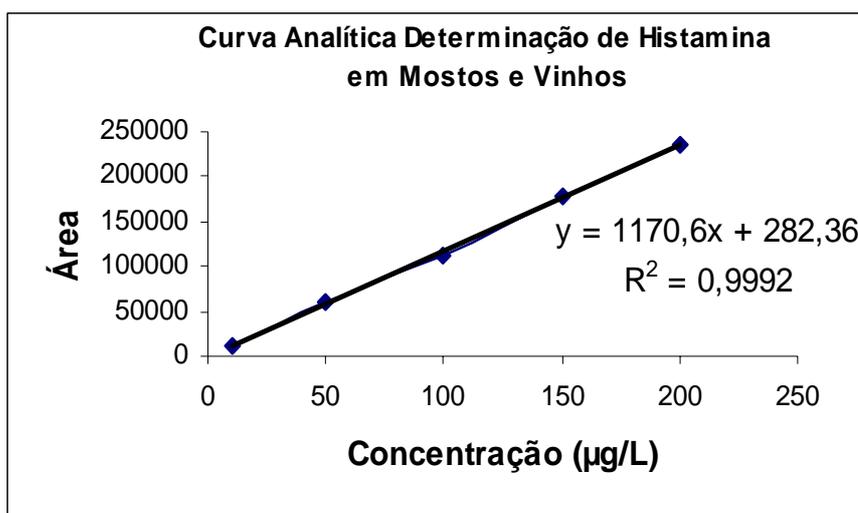


FIGURA 5 – Curva analítica, equação da reta e coeficiente de determinação obtidos para a quantificação de histamina em mostos e vinhos.

A seguir, na figura 6, está representado um cromatograma de padrões analíticos de histamina, cujas concentrações foram àquelas utilizadas na construção da curva analítica.

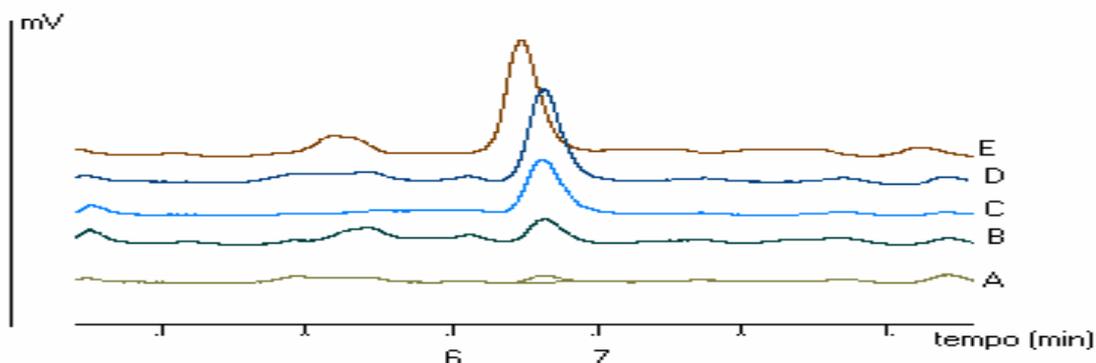


FIGURA 6- Cromatograma obtido de padrões analíticos de histamina contendo as seguintes concentrações, em mg L^{-1} : A = 0,01; B = 0,05; C = 0,1; D = 0,15 e E = 0,2.

No apêndice A, encontra-se representado o cromatograma obtido na análise da amostra T1-B-C-1, com o tempo de retenção da histamina.

4.1.2 Linearidade

No presente trabalho, considerou-se como faixa linear os pontos cujos valores de $(S/Q)_i$ estão no intervalo de $1,0 \pm 0,05$, ou seja, pontos cujas razões sinal/concentração não diferem mais de 5% do coeficiente angular da reta (a). Os valores obtidos para a curva analítica evidenciaram linearidade satisfatória para o analito avaliado na faixa entre 0,01 e 0,2 mg L^{-1} . A Tabela 1 contém os dados referentes ao cálculo de linearidade para os pontos da curva analítica da histamina.

TABELA 1. Dados referentes ao cálculo de linearidade para a histamina

<i>Histamina</i>	$y = 1170,6x + 282,36$					$r^2 = 0,9992$
Concentração ($\mu\text{g/L}$)	10	50	100	150	200	
Área média	12560	60656	112804	177240	235151	
S/Q (%)	104,8	103,1	96,1	100,8	100,3	

Através dos resultados, concluiu-se que a curva analítica apresentou linearidade satisfatória, uma vez que as razões S/Q para os pontos da curva analítica não desviaram mais do que 5% em relação ao coeficiente angular da reta.

4.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação (LOD e LOQ)

Os valores de LOD e LOQ para o instrumento foram de $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,005 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores foram obtidos conforme descrito no item 2.6.3. O LOD e LOQ do método foram de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, ou seja, cem vezes os valores dos limites para o instrumento, uma vez que as amostras foram diluídas cem vezes. Isto significa que somente serão quantificadas com segurança aquelas amostras que apresentarem uma concentração inicial (antes da diluição) de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

4.1.4 Recuperação

A Tabela 2 fornece os valores de recuperação (%) encontrados na etapa de validação do método cromatográfico através da fortificação de uma amostra “branco” cuja concentração de histamina estava abaixo do LOD. A fortificação foi realizada em dois níveis, $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

TABELA 2 - Valores de recuperação encontrados após fortificação de uma amostra cuja concentração de histamina encontra-se abaixo do limite de detecção com padrões analíticos de histamina de concentrações 0,2 e 1,0 mg L⁻¹

	Fortificação com padrão 0,2 mg L ⁻¹	Fortificação com padrão 1,0 mg L ⁻¹
Recuperação (em %)	93,7	84,6
	90,7	95,8
	102,2	89,4
Valor médio de recuperação (%)	95,5 ± 6,0	89,9 ± 5,6

n = 3 injeções para cada nível de fortificação

4.1.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Os estudos de precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária estão descritos no item 3.5.5. A Tabela 3 apresenta a precisão em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e precisão intermediária (RSD_{pii}) do instrumento para a resposta, em termos de área, da solução analítica referente ao ponto médio da curva analítica.

TABELA 3 - Resultados de precisão em termos de repetitividade (RSD_{ri}) e precisão intermediária (RSD_{pii}) do instrumento para a resposta, em termos de área, da solução analítica de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$.

	Faixa de variação (u.r.)	Média (u.r.)	SD	RSD (%)
Repetitividade (RSD_{ri})	121094 - 132923	128701	4753,4	3,7
Precisão intermediária (RSD_{pii})	128765 - 139993	133304	3854,0	2,9

n = 8 injeções para a solução analítica referente ao ponto médio da curva analítica

Os resultados, em termos de repetitividade e precisão intermediária obtidos para o instrumento são aceitáveis, uma vez que estão dentro do limite aceito para validação de métodos cromatográficos em termos de precisão que é de 5% (Causon, 1998).

4.2 Teste de estabilidade

A Figura 7 representa o cromatograma obtido de injeções no sistema cromatográfico do padrão de histamina de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ submetido a diferentes tempos de reação com o derivatizante ortoftaldeído.

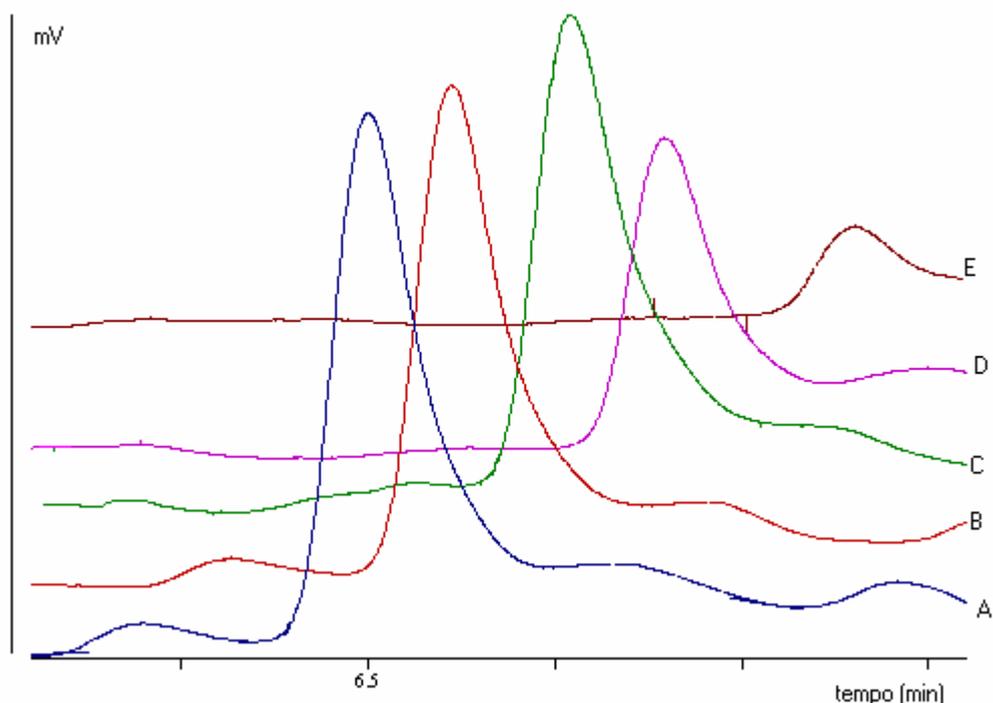


FIGURA 7 - Cromatograma obtido no teste de estabilidade do padrão 0,5 mg/L de histamina derivatizado com orto-ftaldeído por diferentes tempos, em minutos: A = 1; B = 2; C = 4; D = 10 e E = 20.

Percebe-se que a reação de derivatização é quase instantânea e que o complexo histamina-OPA é estável até 4 minutos de reação (as áreas são iguais quando a histamina reagiu por 1, 2 e 4 minutos). Entretanto, com 10 minutos de reação, já se observa uma degradação pronunciada do complexo fluorescente. Este fato foi também relatado por Buteau et al. (1984b); Male & Luong (2001).

Trabalho realizado por Douabalé et al. (2003), mostrou que o complexo fluorescente formado é inibido em meio ácido. Em meio alcalino, uma exaltação da fluorescência foi observada, mas o complexo histamina-OPA foi instável. Apesar disso, um estudo cinético mostrou que uma boa correlação linear entre a máxima fluorescência do complexo formado e a concentração de histamina poderia ser obtida em meio alcalino.

Referente à citação de Douabalé et al. (2003), que afirma a importância de um meio alcalino para a ocorrência da reação de derivatização, cabe ressaltar que o reagente derivatizante preparado para nossas análises apresentou um pH de 11,0 e mesmo após a mistura do derivatizante com amostra de vinho, o pH continuou alcalino, não baixando de pH 10,0.

4.3 Histamina e maturação

A Figura 8 mostra a evolução de valores de histamina (mg L^{-1}), do pH, do $^{\circ}$ Brix e da acidez total em oito coletas de amostras da uva Cabernet Sauvignon no último mês de maturação até o momento da colheita.

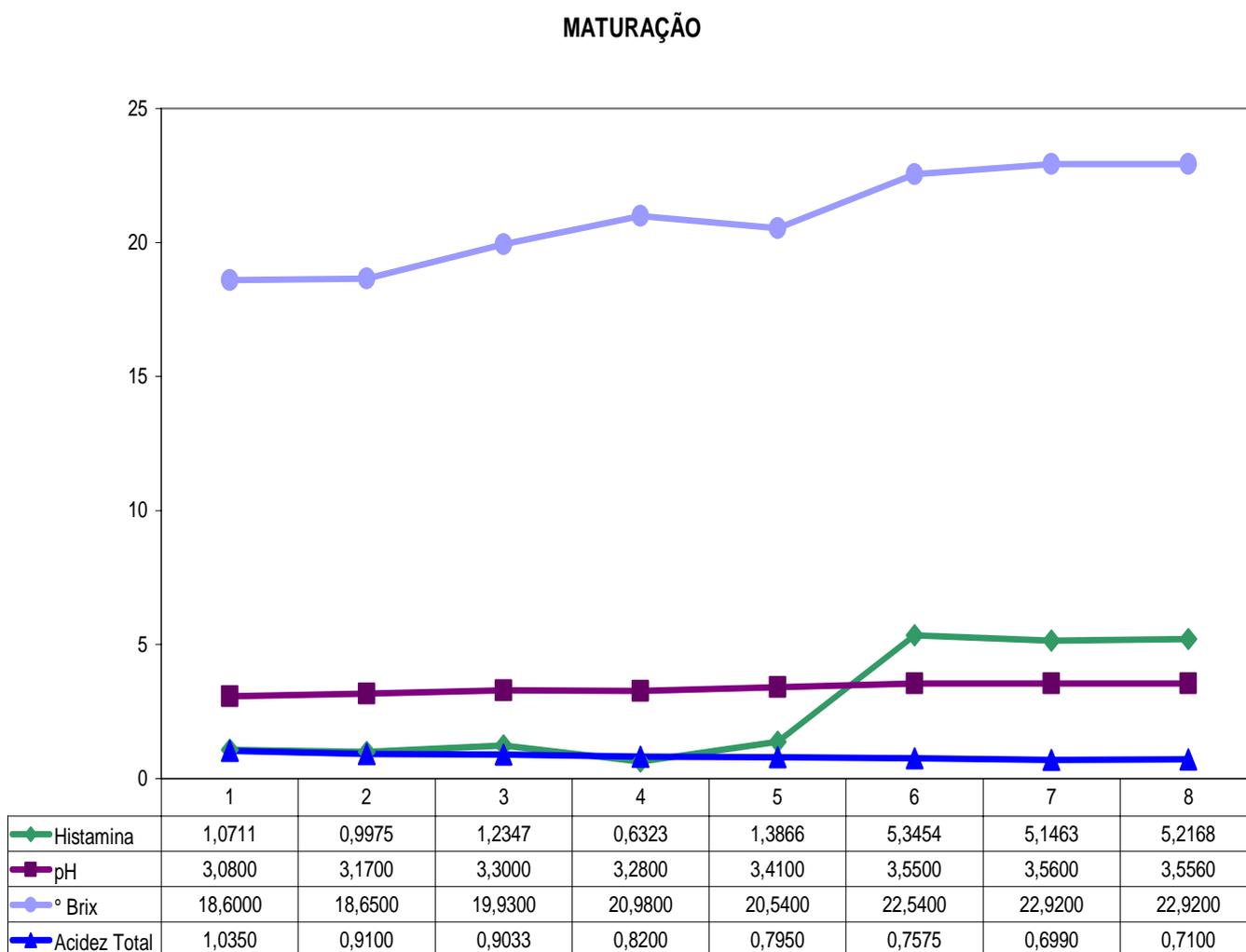


FIGURA 8 – Evolução dos níveis de histamina (mg L^{-1}), $^{\circ}$ Brix, pH e acidez total (g% em ácido tartárico) no último mês de maturação da uva Cabernet Sauvignon.

A amostra 1 foi coletada em 22/01/04. As coletas seguintes foram efetuadas nos dias 28/01; 30/01; 2/02; 5/02; 09/02 e 12/02, correspondendo às amostras de 2 a 7, sendo que em 16/02 foi coletada a amostra 8, coincidindo com a data da colheita.

Percebe-se, através dos valores apresentados na parte inferior do gráfico, que as amostras de 1 a 5 não apresentaram grande variação na concentração de histamina. Entretanto, da quinta para a sexta coleta houve um aumento na

concentração bastante representativo, de quase cinco vezes, e este valor manteve-se praticamente inalterado até o final do período considerado.

Glória et al. (1998) citam que o grau de maturação da uva interfere na concentração de aminas, entretanto, na literatura consultada não foi encontrado de que forma ocorre esta variação. É possível notar que da quinta coleta para a sexta, onde ocorreu um aumento da concentração de histamina, também ocorreu um aumento na concentração de açúcar no grão de uva, o que pode ser comprovado pelo aumento dos valores do ° Brix. A partir da sexta coleta até a oitava, o °Brix praticamente não se alterou. Assim, a concentração de histamina e o ° Brix apresentaram comportamento bastante semelhante quando próximo à colheita.

Em relação ao pH, percebe-se que quando o valor é maior que 3,3, começam a aparecer concentrações de histamina maiores que 1,2 mg L⁻¹. Quando o pH aumenta para valores de 3,5, a concentração de histamina atinge valores em torno de 5,0 mg L⁻¹.

Halász et al. (1994), afirmam que o baixo pH das frutas limita a associação microbiana a microorganismos ácido tolerantes tais como fungos e bactérias ácido lácticas. Isto leva a sugerir que a histamina foi formada por bactérias ácido lácticas que melhor toleram baixos valores de pH. Não existem referências, na literatura consultada, de que fungos, os quais também toleram baixo pH, possam formar histamina.

Poderia também ter ocorrido um favorecimento da transaminação de aldeídos e cetonas que constitui uma outra rota de formação de aminas. Ainda, estes resultados podem ser devido a problemas de amostragem.

No final da maturação da uva, os valores de acidez total permaneceram quase inalterados, o que pode ser comprovado na figura 8. Os maiores valores de histamina (5,0 mg L⁻¹) encontrados neste período de maturação coincidem com valores baixos de acidez total, em torno de 0,7 g% em ácido tartárico.

4.4 Histamina e fermentação alcoólica

A Tabela 4 fornece os valores de histamina (mg L⁻¹) logo após o esmagamento da uva e ao final da fermentação alcoólica (quando os mostos atingiram 0 ° Brix),

para os três tratamentos, ou seja, T1, sem adição de levedura e T2 e T3 com adição de levedura, respectivamente, *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae*.

TABELA 4 – Concentração de histamina (mg L^{-1}) encontrada nos tratamentos T1, T2 e T3 no início e final da fermentação alcoólica

Tratamento	Etapas da fermentação alcoólica		
	Início da fermentação		Final da fermentação
T 1	4,6989	a	< LOQ *
T 2	4,7427	a A	0,7591 B
T 3	6,1702	a	< LOQ *

* Dados não submetidos à análise estatística por encontrarem-se abaixo do limite de quantificação do procedimento que é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Letras Minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna (Tratamento). Letras Maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da linha (Etapas da Fermentação)

Podemos observar que os três tratamentos apresentaram concentrações de histamina estatisticamente iguais (média de $5,2 \text{ mg L}^{-1}$) no início da fermentação alcoólica. Isto era esperado, pois estes valores são resultado do esmagamento da mesma uva. Apesar de as concentrações logo após o esmagamento da uva serem estatisticamente iguais, percebe-se que T3 apresentou uma concentração um pouco maior. Isto pode ser resultado do fato de que a uva esmagada foi proveniente de três locais de plantio e estas foram misturadas para então, serem esmagadas, seguindo o que foi feito durante as coletas de maturação, quando as análises foram feitas após a homogeneização das uvas dos três locais de plantio. Entretanto, a média ($5,2 \text{ mg L}^{-1}$) coincide com o valor da oitava coleta de amostra na etapa de maturação ($5,2 \text{ mg L}^{-1}$) (Figura 8).

Herbert et al. (2001) encontraram valores de $2,4 \text{ mg}$ de histamina por litro de mostos de uvas da região do Alentejo. Buteau et al. (1984) encontraram uma concentração de histamina de $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ em mostos. Estes valores abaixo do

encontrado em nosso estudo podem ser resultado de vários fatores, como fertilização nitrogenada, tipo de solo e variedade da uva (Goñi & Azpilicueta, 2001).

Verifica-se também que a inoculação de diferentes leveduras selecionadas e a fermentação com leveduras selvagens tiveram influência na concentração de histamina ao final da fermentação alcoólica, pois ao final desta, foram encontrados valores diferentes quando se comparou o valor de histamina de T2 com T1 e T3. Neste contexto, cabe salientar que os três tratamentos apresentaram tempos de fermentação diferentes: o mosto controle (T1) levou 233 horas para finalizar sua fermentação alcoólica. Os mostos inoculados com *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus* (T2) e *Saccharomyces cerevisiae* (T3) levaram, respectivamente, 178 horas e 208 horas até atingirem 0 ° Brix. Percebe-se que o mosto T2, que levou o menor tempo para finalizar a fermentação alcoólica, apresentou uma concentração de histamina superior em relação ao mosto controle (T1) e ao tratamento T3 no final da fermentação alcoólica. Isto pode ser resultado de uma menor degradação da histamina pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* variedade *bayanus*. Outra explicação provável é que ao terminar a fermentação alcoólica, não “necessitou” mais de fonte de nitrogênio. Uma outra hipótese seria se leveduras selvagens presentes na casca tivessem sobrevivido à adição de dióxido de enxofre e estas estivessem consumindo a histamina como fonte de nitrogênio, então, ao realizar-se a descuba em menor tempo (178 horas) em relação a T1 e T3, estas leveduras teriam sido removidas e teria restado uma quantidade maior de histamina em T2 ($0,7591 \text{ mg L}^{-1}$) do que a histamina em T1 e T3 que levaram mais tempo para finalizarem a fermentação, sendo que a concentração de histamina nestas amostras chegou a valores não quantificáveis com segurança ($< 0,5 \text{ mg L}^{-1}$).

Devido a isso, não foi possível realizar uma análise estatística envolvendo T1 e T3 ao final da fermentação alcoólica. Ou seja, não foi possível afirmar que T2 apresentou um valor de histamina estatisticamente superior ao final da fermentação alcoólica em relação a T1 e T3, pois os resultados de concentração de T1 e T3 não apresentam um valor numérico. Entretanto, observou-se que em T2, onde a fermentação alcoólica finalizou antes, a histamina não foi reduzida a valores abaixo do limite de quantificação do procedimento, podendo ser quantificada com segurança neste tratamento, apresentando valor de histamina superior em relação a T1 e T3. Uma explicação provável para este fato é a menor extração de fenóis ou menor tempo para reagir com os fenóis extraídos.

Este fato sugere a influência da fermentação alcoólica e extração de fenóis, bem como o tempo de contato do mosto com a casca sobre a concentração de histamina, concordando com Burdaspal et al. (1979); Ough (1971), que afirmam, respectivamente que a duração da fase inicial da fermentação e o tempo de contato do mosto com a casca são fatores que influenciam a formação de histamina.

A influência da duração da fermentação na presença de polpa e casca sobre a formação de histamina também é citada por Buteau et al. (1984a); Glória et al. (1998).

Soleas et al. (1999) também citam a influência do tempo de contato com as cascas sobre a concentração de histamina e outras aminas. Em seu trabalho, eles encontraram níveis mais altos de histamina em vinhos Pinot Noir do que em vinhos Cabernet Franc. E explicam este resultado, ao menos em parte, pelo longo contato do mosto com a casca que é requerido na produção deste vinho, devido a baixa cor desta uva. No trabalho de Soleas et al. (1999) um tempo maior de contato com as cascas resultou em vinhos com mais alta concentração de histamina. Esta diferença em relação ao nosso estudo pode ser devido a diferentes cultivares, diferentes populações microbianas no momento da fermentação, quantidade de nitrogênio no mosto, entre outros fatores.

Ainda em relação à tabela 4, pode-se observar que nos três casos (T1, T2 e T3) houve uma redução da concentração de histamina do início para o final da fermentação alcoólica. Entretanto, somente em T2 pode-se dizer que esta redução foi significativa ($p < 0,05$).

Esta redução da concentração de histamina do início para o final da fermentação alcoólica pode ser resultado da utilização deste composto como fonte de nitrogênio pelas leveduras, concordando com Bisson (1991).

Os compostos nitrogenados das uvas desempenham um importante papel como nutriente dos microorganismos envolvidos na vinificação, representando um elemento nutricional básico das leveduras (Dukes et al., 1991 apud Dutra, 1997).

Alguns compostos são considerados melhor fonte de nitrogênio que outros e, assim, são degradados primeiro. Isto pode explicar o fato de a histamina ter sido degradada no lugar da histidina, seu aminoácido precursor que é mais comumente metabolizado, pois aminoácidos representam de 60 a 90 % do conteúdo de nitrogênio no mosto (Kliwer, 1968).

De acordo com Bisson (1991), qualquer composto que esteja em excesso pode ser degradado primeiro e seu nitrogênio pode ser utilizado para síntese de outros compostos nitrogenados, ou seja, se existia mais histamina que histidina, a histamina foi degradada primeiro e o nitrogênio usado para formar o aminoácido histidina.

Outra possibilidade seria a ausência do aminoácido histidina, o que teria levado à utilização de histamina pelas leveduras. Segundo Davis (1986 apud Dutra, 1997), na ausência de algum aminoácido, a sua via biossintética é ativada. Este fato pode ter formado histidina para ser descarboxilada na fermentação malolática, o que será visto a seguir. Ou ainda, pode ter ocorrido utilização de histidina e histamina pelas leveduras durante a fermentação.

A concentração de aminoácidos livres aumenta no fruto até um certo ponto da maturação, quando a concentração é reduzida pela participação destes compostos na síntese de moléculas mais complexas, como as proteínas (Catalina et al., 1982 apud Dutra, 1997). Pode ter ocorrido que a uva colhida não apresentava mais uma concentração muito alta de histidina, o que teria levado à utilização de histamina pelas leveduras como fonte de nitrogênio.

Outra consideração importante a respeito dos compostos utilizados pelas leveduras como fonte de nitrogênio é o fato de que nas uvas bastante maduras, as formas de nitrogênio menos utilizadas pelas leveduras tendem a aumentar (Amerine & Joslyn, 1951). Levando em conta que a uva Cabernet Sauvignon utilizada nas microvinificações apresentou um valor de aproximadamente 23 °Brix, existe a possibilidade de que a histamina, uma forma de nitrogênio não comumente utilizada pelas leveduras, tenha aumentado, conforme a afirmação de Amerine & Joslyn (1951).

Cooper & Sumrada (1975) afirmam que *Saccharomyces* não possui habilidade para utilizar os vinte aminoácidos como única fonte de nitrogênio, necessitando de outras fontes, o que poderia explicar a utilização de histidina e histamina pelas leveduras.

Ainda, segundo Ferreras apud Monteiro & Bisson (1991b), a concentração de etanol pode afetar a habilidade de *Saccharomyces* em utilizar aminoácidos. Uma concentração de 5 % de etanol já promove uma redução de 80% na capacidade da levedura em utilizar aminoácidos como fonte de nitrogênio. Dessa forma, as leveduras poderiam ter utilizado uma pequena parte de histidina e após a formação

de uma certa concentração de álcool, passariam a utilizar histamina como fonte de nitrogênio.

Um estudo realizado por Dutra (1997) mostrou que no mosto de Cabernet Sauvignon com 19 ° Brix, 100 % da histidina já havia sido consumida. Ao final da fermentação alcoólica, 48,66% da histidina reapareceu devido à autólise celular das leveduras. Isto pode sugerir que devido a histidina ser metabolizada rapidamente, as leveduras utilizaram também a histamina.

Glória et al. (1998) citam que a adição de nutrientes ao mosto exerce influência sobre a concentração de aminas. Esta influência poderia se refletir de duas formas: se fossem adicionados aminoácidos ao mosto, leveduras com enzima descarboxilase poderiam formar histamina a partir de histidina e teríamos concentrações de histamina superiores ao encontrado no mosto antes de fermentar. Outra possibilidade seria se as leveduras não tivessem poder histaminogênico, então, nesse caso, a concentração de histamina permaneceria semelhante àquela encontrada no mosto antes de fermentar.

O conteúdo de nitrogênio das uvas influi na produção de biomassa das leveduras, velocidade de fermentação, tempo para completar uma fermentação e pode influir sobre o espectro dos produtos finais do metabolismo das leveduras. (Bisson, 1991).

Um estudo realizado por Herbert et al. (2004) mostrou uma redução nos níveis de uma outra amina bioativa, a metilamina do início para o final da fermentação alcoólica. Este autor atribui este fato à metabolização desta amina pelas leveduras. Este mesmo trabalho mostrou que não houve diferença significativa nos níveis de histamina durante a fermentação alcoólica, sendo esta concentração mantida próximo aos valores inicialmente encontrados nos mostos (média de 1,2 mg L⁻¹). Talvez estas leveduras tenham metabolizado metilamina, sem a necessidade de metabolizarem histamina. No trabalho realizado por Herbert et al. (2004), a fermentação foi realizada sem inoculação de leveduras selecionadas.

Alguns autores consideram que a formação de histamina em vinhos é devido a algumas linhagens de leveduras da fermentação alcoólica (Buteau et al., 1984a; Vidal-Carou et al., 1990a), que possuem a enzima capaz de converter histidina a histamina. Entretanto, isto não foi observado neste trabalho, com o uso das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, variedade bayanus e *Saccharomyces*

cerevisiae, uma vez que não houve um aumento da concentração de histamina por ocasião da fermentação alcoólica, mas sim, uma redução.

Em relação a isso, Ough et al. (1987), afirmam que as enzimas aminoácido descarboxilases são pouco distribuídas entre as leveduras, o que limita a produção de histamina por estes microorganismos.

Um estudo realizado por Goñi & Azpilicueta (2001) com inoculação de diferentes linhagens de uma mesma espécie (*Saccharomyces cerevisiae*) em mostos de *Vitis vinifera* var. Garnacha mostrou que houve uma pequena diferença no conteúdo de histamina, dependendo da linhagem usada na fermentação, revelando que a levedura utilizada influencia a formação de histamina. Estes autores ressaltam em seu trabalho a importância do estudo de formação de aminas biogênicas por diferentes linhagens que pertencem a uma mesma espécie e não somente a comparação de diferentes espécies de leveduras quanto à capacidade de produzir aminas.

4.5 Histamina e fermentação malolática

Os valores de histamina (mg L^{-1}) no início e final da fermentação malolática, e a comparação destes valores entre os tratamentos podem ser visualizados na Tabela 5:

TABELA 5 – Concentração de histamina (mg L^{-1}) encontrada nos tratamentos T1, T2 e T3 com e sem bactéria láctica no início e final da fermentação maloláctica

Tratamento	Etapas da fermentação maloláctica			
	Início da fermentação		Final da fermentação	
T1 c/ BL	0,7	a B	4,3	a A
T1 s/ BL	1,2	a A	3,0	a A
T2 c/BL	< LOD*		3,9	a
T2 s/ BL	< LOD*		4,7	a
T3 c/ BL	< LOD*		3,2	a
T3 s/ BL	< LOD*		5,9	a

* Dados não submetidos à análise estatística por encontrarem-se abaixo do limite de detecção do procedimento, não podendo ser quantificados com segurança.

*Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna (tratamento).
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da linha (etapa da fermentação)*

Pode-se perceber que em T1 os valores de histamina são estatisticamente iguais no início da fermentação maloláctica antes da inoculação de bactéria láctica *Leuconostoc oenos*. Se compararmos os valores de histamina ao final da fermentação alcoólica e início da fermentação maloláctica, percebemos valores distintos.

Observa-se que ao final da fermentação alcoólica (Tabela 4), a amostra T3 apresentou um valor definido como abaixo do LOQ do procedimento ($<0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e ao início da fermentação maloláctica (Tabela 5), estas concentrações foram reduzidas a valores definidos como abaixo do LOD do procedimento ($< 0,25 \text{ mg L}^{-1}$).

Ao final da fermentação alcoólica, T2 apresentou uma concentração de 0,8 mg de histamina por litro e ao início da fermentação maloláctica, esta concentração foi reduzida a valores definidos como abaixo do LOD do procedimento ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$).

Esta diferença de concentração entre final de fermentação alcoólica e início de fermentação maloláctica pode ser decorrente de uma degradação da histamina no período entre a descuba e a inoculação de bactéria láctica, pois estes vinhos (T2 e

T3) finalizaram sua fermentação alcoólica em menor tempo que T1, sofreram descuba, foram divididos em 2 garrações de 5 litros e ficaram “aguardando” T1 finalizar sua fermentação alcoólica para todos receberem bactéria láctica ao mesmo tempo.

De acordo com Buteau et al. (1984a), algumas bactérias lácticas tem capacidade aminolítica e podem ter degradado a histamina em T 2 e T3.

Por outro lado, T1 apresentou um comportamento contrário em relação à concentração de histamina, passando de um valor definido como < LOQ ao final da fermentação alcoólica para valores de 0,7 e 1,2 mg L⁻¹ ao início da fermentação malolática. Em T1, percebe-se um aumento na concentração de histamina, que pode ser consequência da liberação deste composto durante autólise celular das leveduras.

Ao final da fermentação malolática, todos os tratamentos apresentaram concentrações estatisticamente iguais, independente de a fermentação ter ocorrido espontaneamente ou por indução. Portanto, neste trabalho não foi verificado diferenças significativas na concentração de histamina em vinhos que realizaram fermentação malolática espontânea e vinhos que receberam bactéria selecionada, o que discorda de Vidal-Carou et al. (1991), que sugere que o desenvolvimento de fermentação malolática espontânea durante a produção de vinhos tem sido sugerida como uma possível origem de aminas biogênicas.

É possível perceber que dos seis vinhos, todos apresentaram concentração de histamina superior ao final da fermentação malolática quando comparado ao início. Entretanto, somente em T1 c/ BL pode-se dizer que houve um aumento significativo. O vinho T1 s/ BL também apresentou um aumento na concentração de histamina, embora não significativo.

Estes resultados sugerem que as bactérias lácticas, ao encontrarem ambiente adequado, são capazes de produzir histamina. Quando se fala em ambiente adequado, refere-se ao fato de que as bactérias lácticas já presentes no mosto não conseguem competir com eficácia com as leveduras por açúcares fermentáveis e declinam em número durante a fermentação alcoólica, mas aumentam durante qualquer fermentação malolática subsequente (Varnam & Sutherland, 1997). Por isto, as bactérias selecionadas são normalmente adicionadas após a fermentação alcoólica.

Após alguns anos de controvérsia sobre a origem de histamina e outras aminas biogênicas em vinhos, muitos pesquisadores têm apresentado evidências de que aminas biogênicas são formadas principalmente durante a fermentação malolática (Marcobal et al., 2004).

A formação de histamina durante a fermentação malolática é favorecida pelo aumento do pH que acontece nessa etapa. Vale salientar que a maioria das bactérias lácticas que realizam fermentação malolática toleram acidez abaixo de valores de pH de 3,3 a 3,5. Entretanto, o aumento do pH que ocorre por ocasião desta fermentação pode propiciar o desenvolvimento de outros microorganismos que poderiam apresentar atividade descarboxilase positivo e formar histamina (Frazier & Westhoff, 1993).

Ainda a respeito do pH, este parâmetro enológico tem sido considerado um dos mais importantes fatores que influenciam a formação de aminas biogênicas, especialmente histamina, tiramina e putrescina (Marcobal et al., 2004), por influenciar o desenvolvimento de bactéria ácido-láctica e atividade metabólica (Lonvaud-Funel, 2001).

A formação de histamina durante esta etapa também sofre influência do potencial redox. Condições de potencial redox reduzido estimularam a produção de histamina. Além disso, a atividade da histidina descarboxilase parece ser inativada ou destruída na presença de oxigênio (Halász et al., 1994).

Este aparecimento de histamina ao final da fermentação malolática parece ser resultado da descarboxilação do aminoácido histidina. Entretanto, se durante a fermentação alcoólica, as leveduras metabolizaram além de histamina, também a histidina, provavelmente, este aminoácido foi liberado durante a autólise das leveduras. Se durante a fermentação alcoólica, foi metabolizado somente histamina, então o aminoácido precursor estaria disponível para ser descarboxilado pelas bactérias. Ainda, se a histidina estava ausente no mosto, então sua rota biossintética pode ter sido ativada e a formação deste aminoácido pode ter ocorrido.

Uma outra hipótese seria que esta histamina encontrada após o término da fermentação malolática pode ser a mesma histamina consumida pelas leveduras e que foi liberada após a fermentação alcoólica, por ocasião da autólise celular, o que segundo Monteiro & Bisson, (1991b) acontece com os aminoácidos, mas poderia ocorrer com outros compostos nitrogenados.

Trabalhos a cerca dos fatores que influenciam o tipo e quantidade de aminas em vinhos, particularmente biogênicas, indicam a bactéria ácido láctica como principal causa para uma geração significativa destas substâncias (Moreno-Arribas et al., 2000).

Trabalho realizado por Soufleros et al. (1998), avaliou a concentração de histamina e outras aminas biogênicas antes e após a fermentação malolática espontânea revelando comportamento semelhante ao encontrado neste estudo. Eles encontraram concentrações de histamina e outras aminas biogênicas após a fermentação malolática bastante superiores em relação à concentração antes de ocorrer esta fermentação. Este estudo foi realizado com 135 vinhos de várias procedências e os resultados revelam valores de histamina de 0,22 mg.L⁻¹ a 10,84 mg.L⁻¹ nas amostras analisadas após a ocorrência da fermentação malolática. Estes valores são diferentes daqueles encontrados neste trabalho e isto pode ser resultado de vários fatores como, por exemplo, a quantidade de aminoácido histidina disponível ao início da fermentação malolática e a flora bacteriana presente. Além disso, os valores de pH e anidrido sulfuroso podem propiciar ou não o desenvolvimento de bactérias lácticas.

Segundo Delfini (1989), a formação de histamina e outras aminas biogênicas é negativamente correlacionada à presença de ácido málico, sugerindo que esta produção ocorre durante a fermentação malolática, devido à bactéria ácido láctica. Por um longo tempo, acreditou-se que somente certas linhagens de *Pediococcus cerevisiae* poderiam formar histamina. Mais recentemente, Rollan et al. (1995), isolaram de vinhos com alta concentração de histamina uma linhagem de *Leuconostoc oenos* (*Leuconostoc Oenos* 9204) com capacidade de produzir esta amina.

Ainda, Bertrand et al. (1989 apud Lehtonen, 1996) verificaram em seu trabalho um pronunciado aumento na concentração de histamina durante a fermentação malolática. Estes autores também encontraram que todos os vinhos tintos que continham altas quantidades de histamina tiveram um pH superior a 3,7.

Se verificarmos na tabela 6, constatamos que ao final da fermentação malolática, todos os vinhos apresentaram valores de pH superiores a 3,7 e estatisticamente superiores aos valores de pH medidos no início da fermentação malolática.

TABELA 6– Valores de pH nas etapas início e final da fermentação malolática para os tratamentos T1, T2 e T3 com e sem uso de bactéria láctica.

Tratamento	Etapas da fermentação malolática			
	Início da fermentação		Final da fermentação	
T1 c/ BL	3,5978	a B	3,8395	a A
T1 s/ BL	3,5998	a B	3,8363	a A
T2 c/BL	3,5588	b B	3,7790	b A
T2 s/ BL	3,5330	c B	3,7775	bc A
T3 c/ BL	3,4883	d B	3,7498	bc A
T3 s/ BL	3,4855	d B	3,7438	bc A

*Letras Minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna (Tratamento).
Letras Maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da linha (Etapas da Fermentação).*

Vidal-Carou et al. (1990c), observaram a formação de histamina durante e/ou após fermentação malolática espontânea em dois dos três vinhos tintos analisados. Uma boa correlação foi estabelecida entre a formação de histamina e o aparecimento de ácido láctico no curso da fermentação malolática em um dos vinhos analisados ($r = 0,8459$).

Ao contrário, Ough (1971) não encontrou relação entre esta segunda fermentação e a formação de aminas biogênicas. Este fato pode ser resultado de diferente flora microbiana presente no vinho durante a fermentação malolática, ou ainda à disponibilidade de histidina.

Buteau et al. (1984a) mostraram um decréscimo na quantidade de histamina durante a fermentação malolática e atribuíram este resultado à capacidade de algumas bactérias metabolizarem histamina.

Vidal-Carou et al. (1990a), estudaram a relação da concentração de histamina em relação à intensidade de fermentação malolática nos vinhos e observaram que vinhos com mais altos valores de razão ácido láctico/málico também mostraram mais alto conteúdo de histamina, o que sugere a influência da fermentação malolática na formação de histamina.

Mayer et al. (1973 apud Daudt, 1980) estudaram cinquenta e seis vinhos suíços tintos e brancos e encontraram valores acima de 15 mg L⁻¹ de histamina. Um periódico controle feito em vinte e cinco vinhos confirmou a formação de histamina por *Pediococcus cerevisiae* no decorrer da fermentação malolática.

4.6 Histamina e o período de estocagem

A tabela 7 apresenta a comparação dos valores de histamina (mg L⁻¹) entre o final da fermentação malolática e após a estocagem por três meses para os tratamentos T1, T2 e T3 com e sem bactéria láctica.

TABELA 7- Valores de histamina (mg L⁻¹) dos tratamentos T1, T2 e T3 com e sem inoculação de bactéria láctica ao final da fermentação malolática e após o período de estocagem por três meses.

Tratamento	Etapas do processo			
	Final da fermentação malolática		Após estocagem por três meses	
T1 c/ BL	4,3161	A	2,4264	A
T1 s/ BL	3,0241	B	5,0415	A
T2 c/BL	3,8894	A	2,5463	A
T2 s/ BL	4,7062	A	2,7884	A
T3 c/ BL	3,2241	A	3,1392	A
T3 s/ BL	5,8676	A	4,2540	A

Letras diferentes indicam diferença estatística dentro da linha (etapas do processo)

Esta tabela mostra que a estocagem por três meses à temperatura ambiente não proporcionou uma alteração significativa na concentração de histamina em relação ao final da fermentação malolática, exceto para T1 s/ BL, que apresentou um aumento significativo na concentração de histamina.

Herbert et al. (2004) observaram que vinhos, inicialmente com uma concentração média de 1,2 mg de histamina por litro, chegaram a valores médios de 11,1 mg L⁻¹ após 18 meses de estocagem. Este resultado discorda daquele encontrado em nosso estudo. Esta discordância pode ser devido a vários fatores como o diferente período de estocagem, diferentes populações microbianas e possíveis diferenças na disponibilidade de aminoácidos livres.

Vidal-Carou et al. (1991) também não encontraram elevação na concentração de histamina após um período de estocagem em alguns vinhos submetidos à análise. Eles estudaram a formação de histamina em quatro vinhos, três tintos e um branco estocados sob condições para acelerar o processo de degradação. Dois dos vinhos tintos apresentaram inicialmente quantidades relativamente altas de histamina (9,60 e 7,50 mg L⁻¹) e o outro tinto continha níveis baixos (1,80 mg L⁻¹). O período de estocagem considerado neste estudo, que foi de quatro meses, demonstrou ser suficiente para produzir uma grande deterioração (isto é, película na superfície, sedimento e flocos suspensos). Nestes vinhos, foi observado um aumento nos valores de acidez volátil, chegando a valores maiores que aqueles estabelecidos pelo regulamento espanhol. Foi também observado um decréscimo nos valores de SO₂ e aumento do pH. Entretanto, mesmo com estas alterações, não foi observado aumento da concentração de histamina. Em alguns vinhos, foi inclusive observado um decréscimo na concentração de histamina. Este decréscimo poderia ser explicado pela atividade aminolítica microbiana, através de reações enzimáticas oxidativas, afetando o conteúdo de aminas.

No trabalho citado anteriormente, cabe ressaltar que o aumento da acidez volátil não representou aumento na concentração de histamina, provavelmente devido à baixa atividade aminogênica da bactéria acética, citada por Vidal-Carou et al. (1989).

Marcobal et al. (2004) estudaram a concentração de histamina em vinhos espanhóis de diferentes idades, a fim de avaliar um aumento ou degradação desta amina ao longo do período de estocagem. Eles encontraram que as idades dos vinhos não influenciaram significativamente a concentração de histamina, uma vez

que não houve diferença significativa no conteúdo de histamina em vinhos jovens ou velhos (*reserva e gran reserva*). A histamina variou de 0 a 10,77 mg L⁻¹ em 46 vinhos analisados no estudo, com uma média de 3,62 ± 3,28 (média ± desvio padrão).

Podemos observar na tabela 8 que em um dos vinhos que sofreram fermentação malolática espontânea (T2 s/ BL), o valor de pH após a estocagem aumentou significativamente em relação ao pH ao final da fermentação malolática, sugerindo a continuidade desta fermentação após o engarrafamento, fato indesejável e um dos inconvenientes de uma fermentação malolática espontânea e sem controle. Contudo, este aumento de pH não ocasionou um aumento na concentração de histamina. Entretanto, este aumento de pH pode estar relacionado com o potássio no meio que ao combinar-se com ácido tartárico, formando tartaratos, reduz a acidez, elevando o pH.

TABELA 8 –Valores de pH dos vinhos obtidos nos tratamentos T 1, T2 e T3 com e sem bactéria láctica ao final da fermentação malolática e após três meses de estocagem.

Tratamento	Etapas do processo			
	Final da fermentação malolática		Após estocagem por três meses	
T1 c/ BL	3,8395	a B	3,8493	a A
T1 s/ BL	3,8363	a B	3,8450	a A
T2 c/BL	3,7790	b A	3,7770	c A
T2 s/ BL	3,7775	bc B	3,8025	b A
T3 c/ BL	3,7498	bc A	3,7555	c A
T3 s/ BL	3,7438	c A	3,7623	c A

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna (tratamento).

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da linha (etapas do processo)

O outro vinho que sofreu fermentação malolática espontânea e apresentou continuidade no aumento de pH (T1 s/ BL) foi o único vinho que apresentou concentração de histamina significativamente superior em relação ao final da fermentação malolática (Tabela 7). Isto pode ser reflexo de uma continuação de fermentação malolática após o engarrafamento, o que elevou o pH e possibilitou a continuidade de a bactéria láctica formar histamina.

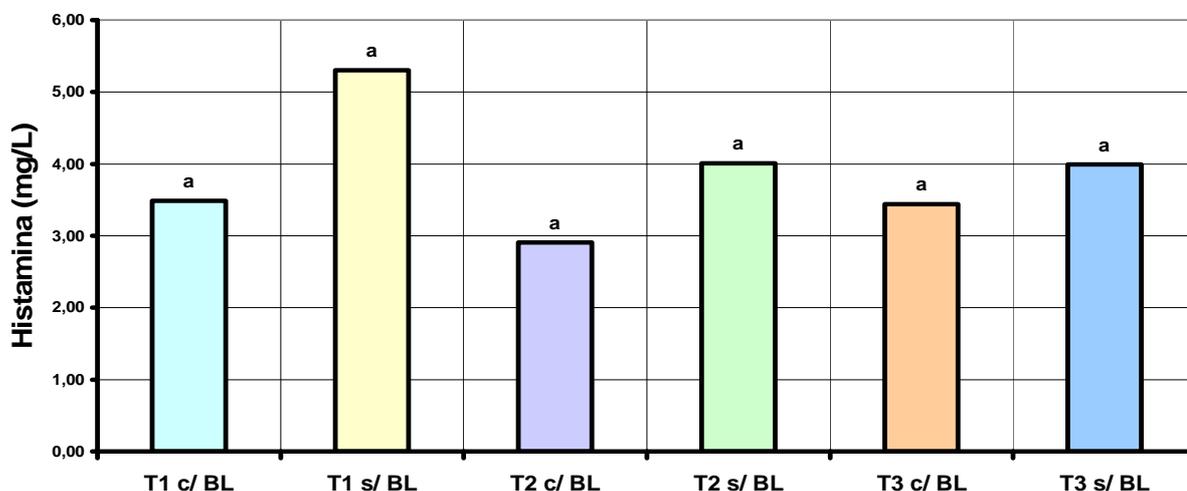
O outro vinho que realizou fermentação malolática espontânea (T 3 s/ BL) não apresentou alteração de pH entre final da fermentação e estocagem, nem alteração na concentração de histamina.

Cabe salientar que o vinho T1 s/ BL foi o único vinho que apresentou comportamento distinto em relação aos demais na evolução de histamina, tanto do início para o final da fermentação malolática (Tabela 5) quanto do final da malolática para o engarrafamento (Tabela 7). Do início para o final da fermentação malolática, (tabela 5), T1 s/ BL foi o único que não apresentou elevação significativa na concentração de histamina e do final da malolática para o período de estocagem (tabela 7), foi o único que apresentou aumento significativo na concentração de histamina. Sabe-se que T1 s/ BL, além de sofrer fermentação malolática espontânea, também realizou fermentação alcoólica espontaneamente e estes resultados podem ser devido à interação de diferentes populações microbianas pela falta de controle nestas fermentações.

É importante salientar que apesar das concentrações de histamina nos tratamentos T2 e T3 com e sem bactéria láctica não terem sido submetidas à análise estatística na evolução do início para o final da fermentação malolática, é óbvio o aumento significativo durante esta evolução, pois os resultados passaram de não detectados a valores em torno de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Dos vinhos que receberam bactéria láctica, um deles (T 1 c/ BL) apresentou aumento de pH após a estocagem e dois deles (T2 c/ BL e T3 c/ BL) mantiveram seu valor de pH estatisticamente igual. Estes três vinhos não apresentaram diferença significativa na concentração de histamina do final da fermentação malolática para o período de estocagem. A manutenção do valor de pH e da concentração de histamina em dois dos três vinhos que receberam *Leuconostoc oenos* poderia sugerir que a concentração de histamina não variou após a estocagem uma vez que o pH manteve-se inalterado, indicando a não continuidade da fermentação malolática na garrafa.

A Figura 9 mostra a concentração de histamina nos vinhos após uma estocagem de três meses à temperatura ambiente.



Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos

FIGURA 9- Concentração de histamina (mg L^{-1}) encontrada nos vinhos obtidos após estocagem por três meses à temperatura ambiente.

Neste figura, percebe-se que não houve diferença estatística significativa entre os vinhos T1, T2 e T3, com e sem bactéria láctica após um período de três meses de estocagem. Os vinhos apresentaram uma concentração que variou de 2,4 a 5,0 mg.L^{-1} , entretanto, não significativamente diferentes.

Na literatura consultada, apenas um trabalho foi realizado com vinhos Cabernet Sauvignon produzidos no Oregon, onde foi verificado aparecimento de histamina em 79 % das amostras analisadas, com concentrações variando de não detectados a 10,10 mg L^{-1} (Glória et al., 1998).

Um estudo realizado com vinhos portugueses de diferentes regiões mostrou que a histamina foi encontrada em 99% dos vinhos tintos analisados. Destes, 88% apresentaram concentração de histamina inferior a 8 mg L^{-1} (Leitão et al., 2005).

Marcobal et al. (2004) encontraram histamina em 75% dos 61 vinhos espanhóis analisados. Deste total de vinhos, apenas três contiveram concentração de histamina superior a 10 mg L^{-1} , limite máximo estabelecido por alguns países, segundo Lehtonen, (1996).

Anli et al., (2004) avaliaram a concentração de histamina em vinhos tintos da Turquia e observaram que a concentração variou de 0 a 1,965 mg L⁻¹, sendo que 83% das amostras apresentaram menos de 0,5 mg de histamina por litro de vinho. Esta baixa quantidade pode ser resultado de fatores relacionados a própria uva, região de plantio e processo de elaboração do vinho.

Crespo & Lasa (1994) encontraram uma média de 4,67 mg de histamina por litro em vinhos tintos jovens de Rioja.

Bauza et al. (1995) analisaram amostras de vinhos de Vallée du Rhône e observaram um valor médio de 3,7 mg de histamina por litro de vinho tinto. Somente 1,2% das amostras apresentaram mais que 10 mg L⁻¹ de histamina.

Segundo Bauza (1995 apud Soufleros et al., 1998), a histamina está geralmente presente em vinhos em concentrações médias de 4,15 mg L⁻¹.

Lehtonen (1996) encontrou concentrações de histamina desde 0,2 até 10,7 mg L⁻¹ em vinhos tintos.

Apesar das concentrações de histamina encontradas em nosso estudo estarem de acordo com os trabalhos citados acima, é inviável fazer uma comparação, uma vez que as uvas utilizadas são diferentes, o solo é diferente e estas e outras diferenças se refletem na disponibilidade de aminoácidos que por sua vez, influenciam na formação de histamina. Além desses fatores, muitos outros podem influenciar a formação de aminas.

A Tabela 9 representa os valores médios de algumas características químicas dos vinhos obtidos no experimento após estocagem por três meses.

TABELA 9 – Valores de teor alcoólico, acidez total, acidez volátil, dióxido de enxofre livre e pH nos vinhos após três meses de estocagem à temperatura ambiente.

Tratamento	Características químicas dos vinhos após estocagem por três meses				
	Teor Alcoólico (° GL)	Acidez Total (g% em ácido tartárico)*	Acidez Volátil (g% em ácido acético)*	SO ₂ Livre (mg/L)	pH
T1 c/ BL	10,6000 ^{ab}	0,7452 ^b	0,1013 ^{ab}	24,0000 ^a	3,8493 ^a
T1 s/ BL	10,9750 ^a	0,7258 ^b	0,1058 ^{ab}	27,2000 ^a	3,8450 ^a
T2 c/ BL	10,9000 ^a	0,7452 ^b	0,0900 ^b	25,6000 ^a	3,7770 ^c
T2 s/ BL	10,9000 ^a	0,7724 ^b	0,0968 ^{ab}	24,0000 ^a	3,8025 ^b
T3 c/ BL	9,9500 ^b	0,8616 ^a	0,1095 ^a	25,6000 ^a	3,7555 ^c
T3 s/ BL	10,0000 ^b	0,8927 ^a	0,0960 ^{ab}	25,6000 ^a	3,7623 ^c

Letras diferentes indicam diferença estatística dentro da coluna

* Os valores de acidez total e volátil em mEq L⁻¹ encontram-se no apêndice B

Os valores das características químicas encontram-se dentro do valor permitido pela legislação, que é de 55 a 130 meq L⁻¹ para acidez total, 0 a 20 meq L⁻¹ de acidez volátil, 10 a 13% (v/v) de grau alcoólico e um valor máximo de 50 mg L⁻¹ de dióxido de enxofre livre (Brasil, 1997).

Apesar de algumas diferenças nas características químicas entre os vinhos, não foi possível estabelecer uma correlação destas com a concentração de histamina nos vinhos, o que pode ser comprovado através da Tabela 10.

TABELA 10 – Resultados do teste de correlação “r” de Pearson e interpretação da correlação entre a histamina e as características físico-químicas dos vinhos obtidos após estocagem por três meses à temperatura ambiente.

Valores correlacionados	Coefficiente de correlação “r” de Pearson	Interpretação
Histamina x Teor alcoólico	0,257830165	Correlação fraca
Histamina x Acidez total	- 0,18402412	Correlação muito fraca
Histamina x Acidez volátil	0,426062849	Correlação fraca para média
Histamina x SO ₂ livre	0,54129825	Correlação média
Histamina x pH	0,491865048	Correlação média

Uma correlação fraca foi observada entre a concentração de histamina e o teor alcoólico dos vinhos.

Uma correlação muito fraca foi verificada entre a concentração de histamina e os valores de acidez total. Já para a acidez volátil, a correlação encontrada ficou de fraca para média.

Uma correlação média foi observada entre os níveis de histamina e a concentração de dióxido de enxofre e pH, ou seja, quanto maiores os valores de dióxido de enxofre livre e pH, maior a concentração de histamina. Entretanto, uma correlação forte é exigida para que se pudesse explicar a concentração de histamina em função destes parâmetros químicos.

Leitão et al. (2005), também não conseguiram estabelecer uma correlação efetiva entre alguns fatores externos diretamente associados com o processo tecnológico de produção do vinho (solo, pH e conteúdo de etanol) e os níveis de histamina detectados.

Mafrá et al. (1999) analisaram aminas biogênicas em vinhos portugueses de qualidade de diferentes regiões de origem e também não encontraram correlação efetiva entre grandes quantidades de histamina e pH. Outro estudo que apresenta concordância com o de Mafrá et al. (1999) e com nosso estudo é o trabalho de

Marcobal et al. (2004), que também não encontrou correlação significativa entre pH e conteúdo de histamina nos vinhos.

Trabalho realizado por Glória et al. (1998), mostra que vinhos Pinot Noir que apresentaram maiores valores de pH e conteúdo de álcool em relação aos vinhos Cabernet Sauvignon, também contiveram valores de histamina superiores aos observados em Cabernet Sauvignon. Um estudo de correlação linear mostrou que conteúdo de álcool e pH correlacionaram significativamente ($p = 99,5\%$) com acúmulo de algumas aminas em vinho Cabernet Sauvignon.

Estudos de correlação são importantes, pois diferenças na concentração de histamina podem ser reflexo da atividade da bactéria ácido láctica formadora de histamina em diferentes vinhos onde pH, acidez total e álcool podem influenciar seu desenvolvimento e habilidade metabólica.

A correlação de histamina e acidez volátil é importante porque bactérias lácticas atacam o ácido cítrico com a mesma facilidade que transformam o málico em ácido láctico e acidez volátil (Aquarone et al., 1983).

Uma fermentação malolática espontânea pode ocasionar uma elevação da acidez volátil dos vinhos através do ataque de algumas bactérias lácticas ao ácido cítrico, elevando a acidez volátil. Entretanto, não foi observado em nosso estudo que vinhos que realizaram fermentação malolática espontânea tiveram maiores valores de acidez volátil.

Ainda, é importante correlacionar a acidez volátil com o aparecimento de histamina devido à idéia de que a histamina é formada por microorganismos deterioradores.

A correlação da histamina com teor alcoólico é interessante, pois parece que etanol acima de 10% (v/v) aumenta a atividade enzimática da histidina-descarboxilase, por facilitar o transporte da histidina devido à fluidificação da membrana pelo etanol (Dombek & Ingran, 1984).

O estudo de correlação de histamina e pH tem importância não somente pela influência no desenvolvimento de bactérias lácticas, mas também por que a afinidade da enzima histidina descarboxilase de *Leuconostoc oenos* por histidina variou de acordo com o pH em um estudo realizado por Pishko & Robertus, (1993 apud Rollan et al., 1995).

Por fim, a correlação com dióxido de enxofre é importante devido à inibição de microorganismos que poderiam formar histamina.

Vidal-Carou et al. (1990a) estudaram a relação da concentração de histamina com níveis de dióxido de enxofre total. Os níveis de histamina foram mais altos nos vinhos com mais baixo nível de dióxido de enxofre total. Este mesmo autor, em outro trabalho, não encontrou o mesmo resultado, ou seja, não foi observada uma menor concentração de histamina nos vinhos com mais altos níveis de SO₂ e vice-versa. Estes autores sugerem que formação de histamina não é muito inibida por altos níveis de SO₂.

Desser & Bandion (1985 apud Vidal-Carou et al., 1991), estudaram as alterações de amins biogênicas em vinhos após dois anos de estocagem em garrafa, nas quais o nível de SO₂ livre foi avaliado em 50 mg.L⁻¹. Eles também não observaram variação no conteúdo de histamina após estocagem. Entretanto, é válido dizer que a quantidade de dióxido de enxofre livre foi quase o dobro da encontrada nesse estudo.

Rivas-Gonzalo et al. (1983), propuseram a hipótese que baixos níveis de SO₂ total poderia induzir a presença de mais altas quantidades de amins biogênicas em vinhos por proliferação de microorganismos com atividade descarboxilase. Vidal-Carou et al (1990a) demonstraram que os níveis de histamina foram mais altos em vinhos tintos com mais baixos níveis de SO₂ total.

Lafon-Lafourcade (1975 apud Vidal-Carou et al., 1991) encontrou baixos níveis de histamina em vinhos com contaminação microbiana, os quais tiveram produção aumentada de acidez volátil e acetato de etila. Foi também encontrado que histamina em vinagres foi mais baixa ou similar aos níveis de histamina em vinhos, sugerindo a baixa habilidade aminogênica da bactéria ácido-acética (Vidal-Carou et al., 1989b).

5 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos e as condições experimentais, pode-se concluir que:

- A concentração de histamina aumentou durante os últimos estágios de maturação da uva Cabernet Sauvignon, próximo a data da colheita, quando também ocorreu um aumento mais pronunciado do ° Brix;
- Durante a fermentação alcoólica, tanto o mosto fermentado naturalmente quanto aqueles em que houve inoculação de levedura selecionada, apresentaram uma concentração de histamina inferior àquela concentração encontrada no mosto antes de fermentar.
- Dos três tratamentos, o mosto inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* variedade *Bayanus* finalizou sua fermentação em menor tempo do que os demais e apresentou concentração de histamina superior ($0,7591 \text{ mg L}^{-1}$) à concentração dos demais (T1 e T3), que apresentaram o maior tempo de fermentação e valores de histamina definidos como abaixo do limite de quantificação do procedimento.
- Após a fermentação malolática, todos os vinhos apresentaram um valor de histamina superior àquela encontrada no início da fermentação. Entretanto, somente em T1 c/ BL, pode-se dizer que este aumento foi significativo.
- Ao final da fermentação malolática, todos os vinhos apresentaram concentração de histamina estatisticamente iguais entre si, independente da inoculação de bactéria láctica *Leuconostoc oenos*;
- As concentrações de histamina encontradas ao final da fermentação malolática mantiveram-se após um período de estocagem de três meses em temperatura ambiente, exceto para T1 sem BL, que apresentou um aumento significativo na concentração de histamina;

- Não houve uma correlação efetiva entre a concentração de histamina nos vinhos estocados por três meses e as características de pH, acidez total, acidez volátil, teor alcoólico e SO₂ livre;
- A concentração de histamina encontrada nos vinhos está abaixo dos limites estabelecidos por alguns países, exceto Alemanha, e abaixo da dose tóxica sugerida por alguns autores.

6 PERSPECTIVAS

Uma vez que a concentração de histamina varia com o tipo de uva e tipo de solo, seria bastante válido avaliar e comparar sua concentração em diferentes uvas de diferentes regiões.

Sabe-se que, além de histamina, outras aminas biogênicas podem estar presentes no vinho. Seria bastante relevante a determinação destas, uma vez que exibem um comportamento potencializador da toxicidade da histamina.

Sabendo-se que as conclusões deste estudo foram baseadas em vinificações experimentais, ressalta-se a importância de se fazer este mesmo estudo de evolução em fermentações industriais.

Estudar a comportamento de outras leveduras e bactérias lácticas em relação à concentração de histamina e outras aminas bioativas, no processo de elaboração do vinho.

Sabe-se que a maior parte da histamina é formada por descarboxilação do aminoácido histidina. Entretanto, poderia ser realizado um estudo onde se verificaria se um aumento da concentração de histamina é correlacionada a uma diminuição da histidina. Poderia ser descoberta uma outra via de formação para histamina.

Uma vez que o álcool é um potencializador dos efeitos tóxicos da histamina e outras aminas, seria importante estudar os níveis destas substâncias em outros tipos de bebidas alcoólicas.

Alguns países já estabeleceram limites legais ou uma recomendação de dose tóxica de histamina em alimentos e bebidas alcoólicas. Salienta-se a importância da continuidade de estudos a cerca desta substância para, quem sabe, sugerir para órgãos competentes uma concentração segura de histamina em alimentos e bebidas produzidos em nosso país.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, B. F.; GÓMEZ, G. E. Selección de microorganismos para la producción de vinos higiênicos I. Producción de sulfuroso de hidrogeno e histamina durante la fermentación vínica. **Aliment.**, 24, 103-108, 1987.
- AMERINE, M. A.; JOSLYN, M. A. **Table wines**. Califórnia, 250-255, 1951, 997p.
- AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Methods for analysis of musts and wines**. Wiley-Interscience, New York, 1980, 341 p.
- ANLI, R. E. et al. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. **J. Food Comp. Anal.** 17, 53-62, 2004.
- AQUARONE, E.; ALMEIDA, U; BORZANI, W. **Biotecnologia – Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1983.
- ARCE, L., RÍOS, A., VALCÁRCEL, M. Direct determination of biogenic amines in wine by integrating continuous flow clean-up and capillary electrophoresis with indirect UV detection. **J. Chromatogr. A**, 803 , 249-260,1998.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol.** 6, 341-346, 1995.
- BAUZA, T. et al. Determination of biogenic amines and their precursors amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. **J. Chromatogr. A** 707, 373-379, 1995.
- BATAGLIA, R.; FRÖLICH, D. HPLC determination of histamine in wine. **J. High Resolut. Chromatogr. Commun.** 2, 100-1,1978.
- BEHRENS, J. H., SILVA, M. A. A. P. Perfil sensorial de vinhos brancos varietais brasileiros através de análise descritiva quantitativa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 20(11), 60-67, 2000.

- BILIC, N. Rapid identification of biogenic amine-producing bacterial cultures using isocratic high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A** 719, 321-326, 1996.
- BISSON, L. F. Influence of nitrogen yeast and fermentation of grapes. In: International Symposium on nitrogen in grapes and wine, 1991, Washington. **Anais...** Washington: The American Society for Enology and Viticulture, 1991, 78-89, 323p.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Decreto n.º 2.314, de 4 de setembro de 1997, regulamenta a Lei n.º 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.
- BRINK, B. et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **Int. J. Food Microbiol.** 11, 73-84, 1990.
- BURDASPAL, P. A.; CABALLO, C.; PINILLA, I. Estudio sobre la determinación analítica y la incidencia de histamina em vinos españoles. **Aliment.** 16(106), 31-3, 1979.
- BUSTO, O. et al. Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. **J. Chromatogr. A** 757, 311-318, 1997.
- BUSTO, O.; GUASH, J.; BORRUL, F. Improvement of a solid-phase extraction method for determining biogenic amines in wine. **J. Chromatogr. A** 718, 309-317, 1995.
- BUTEAU, C.; DUTSCHAEVER, C. L.; ASHTON, G. C. A study of the biogenesis of amines in a Villard noir wine. **Am. J. Enol. Vitic.** 35(4), 228-236, 1984a.
- BUTEAU, C.; DUTSCHAEVER, C. L.; ASHTON, G. C. High-performance liquid chromatographic detection and quantitation of amines in must and wine. **J. Chromatogr.** 284, 201-210, 1984b.
- CAMARGO, U. A. **Uvas do Brasil**. EMBRAPA-CNPUV, Brasília, EMBRAPA-SPI, 1994. 90 p.

- CAUSON, R.. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, 689,175-180, 1998.
- CERUTTI, G.; L. REMONDI. Istamina, tiramina ed alter ammine fisse nei vini italiani. **Riv. Vitic. Enol. Conegl.** 2, 66-78, 1972.
- CHASIN, A. A.. et al.. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Brasil. Toxicol.**, 11(1), 1-6, 1998.
- CHOUDHURRY, N. et al. Formation of histamine and tyramine by lactic acid bactéria in descarboxylase assay medium. **Lett. Appl. Microbiol.** 11, 278-281, 1990.
- CLIFTON, E.M. **Pesticides Laboratory Training Manual**, AOAC International, Gaithersburg, Maryland USA, 1996, 484 p.
- COLLINS, C.; BRAGA, G.L., BONATO, P.S., **Introdução a Métodos Cromatográficos**, Campinas, Editora Unicamp, 1995. 279 p.
- COOPER, T. G.; SUMRADA, R. Urea transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** 121 (2), 571-576, 1975.
- CRESPO, M. I.; LASA, B. V. Determination of biogenic amines and other amines in wine by an optimized HPLC method with polarity gradient elution. **Am. J. Enol. Vitic.** 45(4), 460-463, 1994.
- DAUDT, C. E. **Amines, Grapes and Wines**. Dissertação (Doutorado in Agricultural and Environmental Chemistry) - University of California, Davis, 1980, 124p.
- DAVIS, C. R. et al Practical Implications of Malolatic Fermentation: A Review. **Am. J. Enol. Vitic.** 36(4), 290-301, 1985.
- DELFINI, C. Ability of wine malolatic bacteria to produce histamine. **Sci. Alim.** 9,413-416, 1989.
- DOMBEK, K. M.; INGRAN, L. O. Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. **J. Bacteriol.** 157, 233-239, 1984.

- DONHAUSER, S., WAGNER, D., GEIGER, E. Biogenic amines: significance, occurrence and assessment. **Brauwelt. Int.** 11, 100-107, 1993.
- DOUABALÉ, S. E. et al. Contributions to the determinations of histamine rate by measuring out the histamine-orthophthalaldehyde complex in the absorption and fluorescence. **Talanta** 60, 581-590, 2003.
- DUTRA, S.V. **Aminoácidos livres e uréia em mostos e vinhos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 1997, 129p.
- EITENMILLER, R. R., P. E. KOEHLER, and J. O. REAGEN. Tyramine in fermented sausages: factors affecting formation of tyramine and tyrosine descarboxylase. **J. Food Sci.** 43, 689-93, 1978.
- FARIAS, M. et al. Histidine descarboxylase activity in lactic acid bacteria from wine. **J. Int. Sci. Vigne Vin** 27,191-199, 1993.
- FLORES, H. E.; PROTACIO, C. M.; SIGNS, M. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. **Rec. Adv. Phytochem.** 23, 329-393, 1989.
- FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos**, 4.a. edição, Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1993, 681p.
- FUZIKAWA, C.S.et al. IMAO e dieta-atualização e orientações práticas para o uso clínico.**J.Bras.Psiq.**, 1999.
- GENI, L. et al. Free, conjugated, and wall-bound polyamines in various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. CV. Cabernet Sauvignon. **Am. J. Enol. Vitic.** 48, 80-84, 1997.
- GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Ed. Renascença, Porto Alegre, 1999. 364 p.
- GLÓRIA, M.B.A.; IZQUIERDO-PULIDO, M. Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers. **J. Food Comp. Anal.** 12(2), 129-136, 1999.
- GLÓRIA, M. B. A et al. A survey of biogenic amines on Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. **Am. J. Enol. Vitic.** 49(3), 280-282, 1998.

- GÕNI, D. T.; AZPILICUETA, C. A. Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines: Relationship with the utilization of amino acids during fermentation. **Am. J. Enol. Vitic.** 52(3), 185-190, 2001.
- GUIA DO VINHO GAÚCHO. A história, as variedades e as vinícolas. Zero Hora Editora Jornalística S. A., Rio Grande do Sul, Brasil, 2004, 159 p.
- HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Sci. Technol.** 5, 42-49, 1994.
- HAJOS, G. et al. Changes in biogenic amines content of Tokai grapes, wines and aszu-wines. **J. Food Sci.** 65(7), 1142-1144, 2000.
- HARRIS, D.C., **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro, Editora LTC, 2001. 895 p.
- HERBERT, P.; SANTOS, L.; ALVES, A. Simultaneous Quantification of Primary, Secondary Amino Acids, and Biogenic Amines in Musts and Wines Using OPA/3-MPA/FMOC-Cl Fluorescent Derivates. **J. Food Sci.** 66(9), 1319-1325, 2001.
- HERBERT, P. et al. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. **J. Food Engineering**, 66(3), 315-322, 2004.
- HOTCHKISS, J. H. A review of current literature on N-nitroso compound in foods. **Adv. Food Res.** 31, 53-115, 1987.
- KLIEWER, W. M. Changes in the concentration of free amino acids in grape berries during maturation. **Am. J. Enol. Vitic.** 19, 166-174, 1968.
- LE JEUNE, C. et al. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. **J. Appl. Bacteriol.** 78,316-326, 1995.
- LEHTONEN, P. Determination of Amines and Amino Acids in Wine – A Review. **Am. J. Enol. Vitic.**, 47 (2), 127-133, 1996.

- LEITÃO, M. C. et al. Biogenic Amines Occurrence in Wine. Amino Acid Descarboxylase and Proteolytic Activities Expression by *Oenococcus oeni*. **J. Agric. Food Chem.**, 48(7), 2780-2784, 2000.
- LEITÃO, M. C., MARQUES, A.P., SAN ROMÃO, M.V. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. **Food Control** 16, 199-204, 2005.
- LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. Aminas bioativas em alimentos. **Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment.** 33(1), 70-79, 1999.
- LINDROTH, P.; MOPPER, K. High-performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-fhthaldialdeyde. **Anal. Chem.** 51(11):1667-1674, 1979.
- LONVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Letters**, 199, 9-13, 2001.
- LORET, S.; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. **Food Chem.** 89, 519-525, 2005.
- MAFRA, I. et al. Evaluation of Biogenic Amines in Some Portuguese Quality Wines by HPLC Fluorescence Detection of OPA Derivates. **Am. J. Enol. Vitic.** 50(1), 128-132, 1999.
- MAGA, A. J. Amines in foods. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut.** 10, 373-399, 1978.
- MALE, K. B.; LUONG, J. H. T. Derivatization, stabilization and detection of biogenic amines by cyclodextrin-modified capillary eletrophoresis-laser-induced fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, 926, 309-317, 2001.
- MARCOBAL, A. et al. Biogenic amines content of red Spanish wines: comparison of direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. **Food Res. Int.** 38(4), 387-394, 2004.
- MARQUES,C.; ANDRADE, Y.; NARDI, A.E. Crise hipertensiva espontânea durante o uso de IMAO: relato de caso e revisão da literatura. **J. Bras. Psiq.** 46, 43-47, 1997.

- MISTURA, C. M. **Validação de método para determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em sedimento do lago da barragem do Capingüí, RS, empregando GC-ECD e GC-MS.** Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Santa Maria, 2003, 208 p.
- MONTEIRO, F. F.; BISSON, L. F. Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. **Am. J. Enol. Vitiic.** 42(3), 199-208, 1991a.
- MONTEIRO, F. F.; BISSON, L. F. Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentation. **Am. J. Enol. Vitic.** 42 (1), 1-10, 1991b.
- MORENO-ARRIBAS, M. V. et al. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. **Int. J. Food Microbiol.**, 84, 117-123, 2003.
- MORENO-ARRIBAS, V. et al, Isolation, properties and behaviour of tyramine producing lactic acid bacteria from wine. **J. Appl. Microbiol.**, 88, 584-593, 2000.
- NAGATSU, T. Application of high-performance liquid chromatography to study of biogenic amine-related enzymes. **J. Chromatogr.** 566, 287-307, 1991.
- OUGH, C. S. et al. A study of histamine production by various wine bacteria in model solutions and in wine. **J. Food Process. Preserv**, 12, 63-70, 1987.
- OUGH, C. S. Measurement of histamine in California wines. **J. Agric. Food Chem.** 19, 241-4, 1971.
- OUGH, C. S.; DAUDT C. E. Quantitative determination of volatile amines in grapes and wines. I. Effect of fermentation and storage temperature on amine concentration. **Am. J. Enol. Vitic.** 32,185-188, 1981.
- PFUNDSTEIN, B. et al. Mean daily intake of primary and secondary from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. **Fd. Chem. Toxic.** 29, 733-739, 1991.
- PINTO, G.M.F., **Determinação de Resíduos de Herbicidas em Águas utilizando Extração em Fase Sólida seguida de Separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência,** Dissertação de Mestrado – Universidade de Campinas, Campinas, 1999, 93p.

- PRIMEL, E.G., **Aplicação de extração em fase sólida e técnicas cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório**. Dissertação (Doutorado em Química)- Universidade Federal de Santa Maria, 2003, 170f.
- PRIMEL, E.G., **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação do Herbicida Clomazone em Água de Superfície utilizando SPE e HPLC-UV**, Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2000, 86f.
- PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE UVAS E VINHOS – Panorama 2003. Disponível em <<http://www.vinhosnet.com.br>>. Acesso em: 13 jan. 2005.
- POGORZELSKI, E. Studies on the formation of histamine in must and wines from elderberry fruit. **J. Sci. Agric.**, 60, 239-244, 1992.
- RIBANI, M. et al, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, 27(5),771-780, 2004.
- RICE, S.; EITENMILLER, R. R.; KOEHLER, P. E. Biologically active amines in food: a review. **J. Milk Food Technol.** 39, 353-358, 1976.
- RICE, S. L.; KOEHLER, P. E. Tyrosine and histidine descarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* sp and the production of tyramine in fermented sausages. **J. Milk Food Technol.** 39,166-169, 1976.
- RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-HERNÁNDEZ, J. F. and MARINÉ-FONT, A. Study of tyramine content during the vinification process. **J. Food Sci.** 48(2), 417-428, 1983.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciênc. e Tecnol. Aliment.** 22(2), 192-198, 2002.
- ROLLAN, G. C.; COTON, E.; LONVAUD-FUNEL, A. Histidine decarboxylase activity of *Leuconostoc oenos* 9204. **Food Microbiol.**, 12, 455-461, 1995.
- ROMERO, R. et al. Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, 871, 75-83, 2000.

- SANTOS, C., JALÓN, M. and MARINÉ, A. Contenido de tiramina en alimentos de origen animal. I. carne, derivados cárnicos y productos relacionados. **Agroquim. Tecnol. Alim.** 25, 362-368, 1985.
- SANTOS, S. M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **Int. J. Food Microb.** 29(2/3), 213-231, 1996.
- SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health **Food Res. Int.**, 29(7), 675-690, 1996.
- SLINGSBY, R. W. et al. Some volatile components of *Vitis vinifera* variedade Cabernet sauvignon wine. **Am. J. Vitic. and Enol.** 31(4), 360-363, 1980.
- SMITH, T. A. Amines in food. **Food Chem.** 6, 169-299, 1980-81.
- SOLEAS, G. J.; CAREY, M.; GOLDBERG, D. M. Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines. **Food Chem.** 64, 49-58, 1999.
- SOLL, A. H.; WOLLIN, A. The effects of histamine postglanding E₂ and secreting on cyclic AMP in separated canine fundic mucosal cells. **Gastroenterology**, 72, 1166, 1977.
- SOUFLEROS, E.; BARRIOS, M. L.; BERTRAND, A. Correlation Between the Content of Biogenic Amines and Other Wine Compounds. **Am. J. Enol. Vitic.** 49(3), 266-278, 1998.
- SOUZA, S. C. **Teores de metanol, aminos bioativas, uréia e outros parâmetros físico-químicos em vinhos tintos brasileiros Cabernet sauvignon, Cabernet Franc e Merlot.** Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 78 p.
- SPLENDOR, F. **Vinhos: degustação e serviço, saúde, enoturismo. Licores.** Coleção Hotelaria. EDUCS editora, Caxias do Sul, RS, 2003, 387 p.
- STRATTON, J. E., HUTKINS, R.W and TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review. **J. Food Prot.** 54, 460-470, 1991.

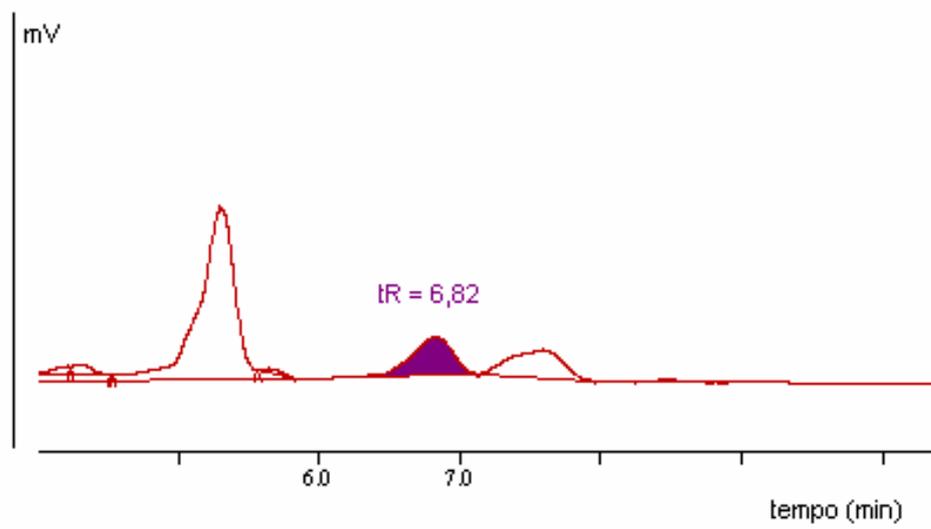
- STRÖHER, D.I. **Desenvolvimento e validação de procedimento analítico empregando HPLC-Fluorescência para investigação de resíduos de abamectina e ivermectina em leite bovino.** Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Santa Maria , Santa Maria, 2004, 91p.
- TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Crit. Rev. Toxicol.** 17(2), 91-128, 1986.
- UVIBRA. Comercialização de vinhos por tipo e espécie (litros) de 1990 a 1999. Bento Gonçalves: 2004a.
- UVIBRA. Comercialização de vinhos por tipo e espécie (litros) de 1996 a 2002. Bento Gonçalves: 2004b.
- VALE, S. R.; GLÓRIA, M. B. A. Methodology for the determination of biogenic amines in cheeses. **J. AOAC. Int.** 80(5),1006-1012, 1997.
- VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas, Tecnologia, Química y Microbiología.** Série Alimentos Básicos, vol. 2, Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1997, 487p.
- VIDAL-CAROU, M.C.; CODONY-SALCEDO, R., and MARINÉ-FONT, A. Histamine and tyramine in Spanish wines: relationships with total sulfúur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. **Food Chem.** 35, 217-227, 1990a.
- VIDAL - CAROU , M. C. et al. Histamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage. **Food Chem.** 37, 239-249, 1990b.
- VIDAL- CAROU, M.C. and MARINÉ, A. **Agroquím. Tecnol. Aliment.**, 25, 59-63, 1983.
- VIDAL -CAROU, M. C. et al. Spectrofluorometric determination of histamine in wines and othet alcoholic beverages. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 72(3), 412-415, 1989a.
- VIDAL-CAROU, M. C. et al. Histamine and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider and vinegar. **J. Food Comp. Anal.** 2, 210-8, 1989b.

- VIDAL-CAROU, M. C. et al. Histamine and Tyramine in Spanish Wines: their formation during the winemaking process. **Am. J. Enol. Vitic.** 41(2), 160-167, 1990c.
- VIDAL-CAROU, M. C. et al. Ion-pair high-performance liquid chromatography determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. **J. Chromatogr. A**, 998, 235-241, 2003.
- VIDAL- CAROU, M. C. V., SALCEDO, R.C. Changes in the Concentration of Histamine and Tyramine During Spoilage at Various Temperatures. **Am. J. Enol. Vitic.** 42(2), 145-149, 1991.
- VOIGT, M. N.; EITENMILLER, R. R. Production of tyrosine and histidine decarboxylase by dairy-related bacteria. **J. Food Prot.** 40(4), 241-245, 1977.
- ZANELLA, R. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. **J. Chromatogr. A**, 904, 257-262, 2000.
- ZEE, J. A. et al. Biogenic amines in wines. **Am. J. Enol. Vitic.** 34(1), 6-9, 1983.
- ZOECKLEIN, B. et al. **Análisis y Producción de Vino**. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España, p. 468-471, 2001.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A

Cromatograma obtido na análise da amostra T- 1- B- C-1.



APÊNDICE B

Valores de acidez total e volátil em mEq L^{-1} para os vinhos produzidos e estocados por três meses.

<i>Tratamento</i>	<i>Acidez total (mEq L^{-1})</i>	<i>Acidez volátil (mEq L^{-1})</i>
T1 c/ BL	99,36	16,88
T1 s/ BL	96,77	17,63
T2 c/BL	99,36	15,0
T2 s/ BL	102,98	16,13
T3 c/ BL	114,88	18,25
T3 s/ BL	119,02	16,0