



AMANDA GONÇALVES DA SILVA



**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE TIRAMINA EM
AMOSTRAS DE VINHO TINTO UTILIZANDO
ELETRODOS DE BAIXO CUSTO**

PATOS DE MINAS

2020



AMANDA GONÇALVES DA SILVA



**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE TIRAMINA EM
AMOSTRAS DE VINHO TINTO UTILIZANDO
ELETRODOS DE BAIXO CUSTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Líbia Diniz Santos

Coorientador: Prof. Dr. Diego Leoni Franco

PATOS DE MINAS

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 Silva, Amanda Gonçalves da, 1995-
2020 Determinação eletroanalítica de tiramina em amostras de vinho
tinto utilizando eletrodos de baixo custo [recurso eletrônico] /
Amanda Gonçalves da Silva. - 2020.

Orientadora: Líbia Diniz Santos.

Coorientador: Diego Leoni Franco.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.362>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Alimentos - Indústria. I. Santos, Líbia Diniz, 1978-, (Orient.). II.
Franco, Diego Leoni, 1983-, (Coorient.). III. Universidade Federal
de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. IV.
Título.

CDU: 664

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Patos
 de Minas

Av. Getúlio Vargas, 230 - Bairro Centro, Patos de Minas-MG, CEP 38700-103
 Telefone: (34) 3823-3714 - www.ppgea.feq.ufu.br - coordppgea@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia de Alimentos				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico n. 01/2020 - PPGEA				
Data:	Dezesseis de março de dois mil e vinte	Hora de início:	09:12	Hora de encerramento:	12:30
Matrícula do Discente:	41812EAL001				
Nome do Discente:	Amanda Gonçalves da Silva				
Título do Trabalho:	Determinação eletroanalítica de tiramina em amostras de vinho tinto utilizando eletrodos de baixo custo				
Área de concentração:	Engenharia de Alimentos				
Linha de pesquisa:	Desenvolvimento de Processos e Produtos				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reúne-se na Sala 110 do Prédio Palácio de Cristais, Universidade Federal de Uberlândia - *campus* Patos de Minas, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, assim composta: Profa. Dra. Líbia Diniz Santos (Orientadora - FEQUI/UFU), Profa. Dra. Djenaine de Souza (IQ/UFU) e Dra. Renata Vieira da Mota (EPAMIG). Ressalta-se que a Dra. Renata Vieira da Mota participou da defesa por vídeoconferência da cidade de Caldas/MG e os demais membros da banca e a discente participaram *in loco*.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Líbia Diniz Santos, apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da mesma se deu em conformidade às normas do Programa.

A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra às examinadoras, que passaram a arguir a discente. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos legais, a Banca Examinadora, em sessão secreta, atribuiu o conceito final, considerando a discente:

Aprovada.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico integra os requisitos à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme será assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Libia Diniz Santos, Presidente**, em 16/03/2020, às 12:39,



conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Djenaine de Souza, Membro de Comissão**, em 16/03/2020, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Vieira da Mota, Usuário Externo**, em 16/03/2020, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1897516** e o código CRC **D6B2F815**.

Dedico este trabalho a Deus por estar ao meu lado em todos momentos, aos meus pais Vicente José de Paulo e Elaine Maria de Silva e ao meu marido Guilherme Rodrigues Silva pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar ao meu lado em todos momentos difíceis, dando-me fé, e iluminando meu caminho durante mais esta caminhada da minha vida, e agradeço especialmente por todas graças recebidas.

À meu pais, Vicente José de Paulo e Elaine Maria da Silva, que com todo carinho e apoio, não mediram esforços para que eu alcançasse mais esta etapa de minha vida. A minhas irmãs, Aline Gonçalves e Silva e Ana Paula Gonçalves Silva, pelos conselhos e pelos momentos de alegrias

À meu marido, Guilherme Rodrigue Silva, que com todo o amor esteve sempre comigo, me dando forças para vencer e atenuando os momentos difíceis. Você é a minha fonte de força e esperança. Amo você!

À toda minha família, por acreditarem em mim e pela compreensão nos momentos que não conseguir estar com vocês.

As minhas amigas Isadora e Jaqueline, pela atenção, por estarem sempre dispostas a me ouvir, ajudar e alegrar. Com vocês senti que não estou sozinha nesta caminhada.

À Prof.^a Dr.^a Líbia e ao Prof. Dr. Diego, meus queridos orientadores, meus mais sinceros agradecimentos. Líbia agradeço por todos os ensinamentos, pelas oportunidades concedidas, pela amizade e por sonhar e tornar concreto a realização deste trabalho. Diego agradeço por estar comigo desde o início, com certeza sem você minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma, obrigada pela paciência, pelos ensinamentos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e construção da minha carreira.

À Prof.^a Dr.^a Djenaine de Souza, Prof.^a Dr.^a Letícia Guidi e Prof.^a Dr.^a Milla Alves Baffi, pela avaliação e contribuição do desenvolvimento deste trabalho no Exame de Qualificação. Agradeço imensamente a Prof.^a Dr.^a Djenaine de Souza pelos ensinamentos importantes para o avanço do trabalho.

À Dr.^a Renata Vieira da Mita e a Prof.^a Dr.^a Djenaine de Souza por aceitarem integrar a banca examinadora de defesa do Mestrado.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas gerais (EPAMIG) - Caldas MG e a todos os funcionários da empresa, pela contribuição para o desenvolvimento da pesquisa, pelo acolhimento e ensinamentos essenciais para o aprimoramento deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro concedido a durante a realização do trabalho. Código de Financiamento 001.

A sabedoria não vem automaticamente com a idade. Nada vem - exceto rugas. É verdade, alguns vinhos melhoram com o tempo, mas apenas se as uvas eram boas em primeiro lugar.

(Abigail Van Buren)

RESUMO

O vinho tinto é uma bebida obtida da fermentação do mosto de uvas, em que as principais etapas de fabricação consistem na maceração e nas fermentações alcoólica e malolática. A tiramina é uma amina biogênica que pode estar presente naturalmente ou ser formada durante a vinificação, podendo exercer efeitos tóxicos e farmacológicos ao organismo. Devido à importância para a saúde, é crescente o número de países que estabelecem limites máximos para o teor de tiramina nos alimentos, sendo importante o desenvolvimento de metodologias rápidas e de baixo custo para a sua quantificação. Desta forma, os objetivos do trabalho foram desenvolver um sensor eletroanalítico utilizando eletrodos de carbono de grafite de lapiseira (ECGL) descartáveis e de baixo custo para determinação de tiramina em amostras comerciais de vinho tinto e durante a fermentação uvas *Vitis vinifera*, utilizando as técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ). Foram definidas as melhores condições experimentais e escolhidos os parâmetros de cada técnica, de acordo com a maior sensibilidade e seletividade de resposta de detecção da tiramina. Além disso, realizou-se estudos do mecanismo de oxidação da tiramina sobre os ECGL. Curvas analíticas para a oxidação da tiramina utilizando VPD e VOQ foram construídas, validadas analiticamente quanto a linearidade, faixa linear, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, robustez e especificidade. O estudo do mecanismo da reação de oxidação da tiramina sobre os ECGL mostrou ser irreversível, adsorptivo e envolvendo a troca de 3 elétrons e 3 prótons. As melhores condições experimentais e voltamétricas foram obtidas utilizando o tampão fosfato salino (PBS) 0,1 mol L⁻¹, pH 7. Para a VPD foi utilizada a amplitude 50 mV e velocidade de varredura 16 mV s⁻¹ e para VOQ foi utilizada a amplitude de 50 mV e velocidade de varredura de 16,14 mV s⁻¹. Partindo dessas condições, as faixas lineares obtidas para VPD e VOQ foram de 0,6 a 200 µmol L⁻¹ (r² = 0,9985) e 0,6 a 1000 µmol L⁻¹ (r² = 0,9969), LD de 0,52 e 0,77 µmol L⁻¹ e LQ de 1,74 e 2,36 µmol L⁻¹, respectivamente. Na validação analítica não houve diferença significativa entre respostas no estudo de precisão, de robustez (exceto para a temperatura) e especificidade (exceto para o ácido gálico); os desvios padrão relativo (DPR) foram na maioria menores que 5%, com faixas pequenas de intervalos de confiança IC (95%). As recuperações para tiramina em amostras de vinho tinto comerciais variaram entre 94,4 ± 7,6 e 106,0 ± 2,4% com erro relativo (%BIAS) ≤ 6% e durante a vinificação variaram 89,2 ± 1,2 a 109,2 ± 7,6% com (%BIAS) ≤ 10,8%. Durante a vinificação foi observado também uma tendência de aumento de concentração de tiramina durante o processo fermentativo realizado com uvas Syrah. Durante as 4 fermentações observou-se o consumo dos açúcares e formação de etanol e glicerol em quantidades variadas dependendo da uva e da sua localização geográfica. De acordo com os resultados, pode-se concluir que as metodologias desenvolvidas aliadas ao uso dos ECGL é uma alternativa, simples, rápida para a determinação de tiramina em vinhos, tendo em vista a utilização de materiais descartáveis, de baixo custo e altamente reprodutivos.

Palavras-chave: Tiramina. Vinho tinto. Fermentações. Vinificação. Voltametria de Pulso Diferencial. Voltametria de Onda Quadrada. Eletrodos de carbono de grafite de lapiseira.

ABSTRACT

Red wine is a drink obtained from the fermentation of grape must, in which the main stages of manufacture consist of maceration, alcoholic and malolactic fermentations. Tyramine is a biogenic amine that can be naturally present or formed during winemaking, which can have toxic and pharmacological effects on the body. Due to the importance of health, the number of countries that establish maximum limits for the tyramine content in food is increasing, being important the development of fast and low cost methodologies for the quantification of tyramine. Therefore, the objectives of the study were to develop an electroanalytical sensor using disposable and inexpensive pencil's graphite carbon electrodes (PGCE) for determining tyramine in commercial red wine samples and during fermentation of *Vitis Vinifera* grapes, using Differential pulse voltammetry (DPV) and Squarewave voltammetry (SWV). The best experimental conditions were defined and the parameters of each technique were chosen, according to the greater sensitivity and selectivity of tyramine detection response. In addition, studies were carried out on the oxidation mechanism of tyramine with the PGCE. Analytical curves for tyramine oxidation using DPV and SWV were made, analytically validated in relation to linearity, linear range, limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ), precision, accuracy, robustness and specificity. The study of the tyramine oxidation reaction mechanism with the PGCE proved to be irreversible, adsorptive and involving the exchange of 3 electrons and 3 protons. The best experimental and voltammetric conditions were obtained using the 0.1 mol L⁻¹ Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7, for the DPV the amplitude was 50 mV and the scan rate was 16 mV s⁻¹ and in the SWV method the amplitude was 50 mV and the scan rate was 16,14 mV s⁻¹. Based on these conditions, the linear ranges obtained for VPD and VOQ were from 0.6 to 200 μmol L⁻¹ ($r^2 = 0,9985$) and 0.6 to 1000 μmol L⁻¹ ($r^2 = 0,9969$), LoD of 0.52 and 0.77 μmol L⁻¹ and LoQ of 1.74 and 2.36 μmol L⁻¹, respectively. In the analytical validation there was no significant difference between responses in the study of precision, robustness (except for temperature) and specificity (except for gallic acid), the relative standard deviation (RSD) were mostly less than 5%, with low confidence interval (CI) was 95%. The tyramine recoveries in commercial red wine samples varied between 94.4 ± 7.6 and 106.0 ± 2.4% with relative error (% BIAS) ≤ 6% and during vinification they varied 89.2 ± 1.2 to 109.2 ± 7.6% with (% BIAS) ≤ 10.8%. During the vinification it was also noted an increasing trend of tyramine concentration during the fermentation process made with *Syrah* grapes. Throughout the 4 fermentations, the consumption of sugars and formation of ethanol and glycerol were observed in varying amounts depending on the grape and its geographical location. According to the results, it can be concluded that the methodologies developed combined with the use of PGCE is a simple and fast alternative for the determination of tyramine in wines, in view of the use of disposable materials, with low cost and high reproducibility.

Keywords: Tyramine. Red wine. Fermentations. Winemaking. Differential Pulse Voltammetry. Squarewave Voltammetry. Pencil's Graphite Carbon Electrodes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Produção de vinhos e derivados em milhões de litros no estado do Rio Grande do Sul, 2006 a 2019.30
- Figura 2** - Etapas do processo de elaboração de vinho tinto.....31
- Figura 3** - Fermentação alcoólica.33
- Figura 4** - Conversão de ácido málico em ácido láctico durante a fermentação malolática.35
- Figura 5** - Estrutura do 1-hidroxi-4-etilaminobenzeno. Nome usual: Tiramina.....43
- Figura 6** - Esquema da célula eletroquímica utilizada para os experimentos com eletrodos de carbono de grafite de lapiseira (ECGL) como trabalho (A), eletrodos de prata e cloreto de prata como referência (B) e eletrodos de platina como auxiliar (C).58
- Figura 7** - Voltamogramas cíclicos obtidos após a limpeza dos ECGL em solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo (A) ferrocianeto de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) cloreto de hexaaminorutênio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ à 100 mV s^{-1} . ..67
- Figura 8** - Voltamogramas de (A) pulso diferencial (duração de pulso de 60 ms, amplitude 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1}) e (B) onda quadrada (amplitude de 50 mV e velocidade de $16,14 \text{ mV s}^{-1}$) em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 obtidos utilizando ECGL após a limpeza.....68
- Figura 9** - Voltamogramas de pulso diferencial de oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando ECGL para concentrações de $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ (-----); $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ (----); $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (---); $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (---); $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (---); $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (---) e 1 mol L^{-1} (---) de tampão PBS pH 7, amplitude de 50 mV e velocidade de 10 mV s^{-1}69
- Figura 10** - Perfis (A) de (•) corrente e (•) potencial de pico (E_p) e (B) (•) corrente e (•) variação da largura de meia altura do pico ($\Delta E_{p/2}$) da oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre ECGL, variando as concentrações de tampão PBS de $0,001$; $0,005$; $0,01$; $0,05$; $0,1$; $0,5$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7.....70
- Figura 11** - (A) Voltamogramas de pulso diferencial e (B) relação de potencial de pico versus pH do meio para a oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando VPD e ECGL em soluções de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH, 10 mV s^{-1}71

- Figura 12** - (A) Voltamogramas (varredura direta, reversa e resultante) de onda quadrada, amplitude 50 mV e velocidade de 108 mV s⁻¹ e (B) Voltamograma cíclico com velocidade de 200 mV s⁻¹, da oxidação de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7 sobre ECGL.72
- Figura 13** - (A) Relação entre a velocidade de varredura *versus* corrente de pico e (B) relação da raiz da velocidade de varredura *versus* corrente de pico, ambos obtidos de voltamogramas cíclicos em solução de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7, utilizando ECGL.73
- Figura 14** - Relação entre o logarítmico da velocidade de varredura *versus* potencial de pico obtidos de voltamogramas cíclicos em solução de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0.1 M pH 7 sobre os ECGL.74
- Figura 15** - Relação entre logarítmico da velocidade de varredura *versus* potencial de pico obtidos de voltamogramas de onda quadrada em solução de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0.1 M pH 7, sobre os ECGL.75
- Figura 16** - Reação de oxidação da tiramina sobre eletrodos de minas de grafite. ...76
- Figura 17** - (A) Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 utilizando ECGL, variando o tempo de duração dos pulsos de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 ms e mantendo a amplitude de 25 mV e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. (B) Relação entre corrente de pico *versus* tempo de duração dos pulsos de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) ΔE_{p/2} *versus* a variação do tempo de duração dos pulsos de acordo com A.77
- Figura 18** - (A) Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 utilizando ECGL, variando a amplitude de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mV e mantendo o tempo de duração dos pulsos de 60 ms e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. (B) Relação entre corrente de pico *versus* amplitude de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) ΔE_{p/2} *versus* a variação da amplitude de acordo com A.78
- Figura 19** - (A) Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7 utilizando ECGL, variando o incremento de potencial de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mV e mantendo o tempo de duração dos pulsos de 60 ms, a amplitude de 50 mV e o intervalo de tempo de 0,5 s. (B) Relação entre corrente de pico *versus* o incremento de

potencial de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) $\Delta E_{p/2}$ versus a variação do incremento de potencial de acordo com A.79

Figura 20 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, utilizando ECGL, variando incremento de potencial/intervalo de tempo de 1/0,0625; 2/0,125; 3/0,1875; 4/0,25, 5/0,3125; 6/0,375; 7/0,4375; 8/0,5; 9/0,5625; 10/0,625 mV s^{-1} , mantendo o tempo de duração dos pulsos de 60 ms e a amplitude de 50 mV. (B) Relação entre corrente de pico versus incremento de potencial de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) $\Delta E_{p/2}$ versus a variação do incremento de potencial de acordo com A.80

Figura 21 - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, utilizando ECGL, variando o incremento de potencial de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mV e mantendo a amplitude de 50 mV e a frequência 50 s^{-1} (B) Relação entre corrente de pico versus o incremento de potencial de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) $\Delta E_{p/2}$ versus a variação do incremento de potencial de acordo com A. ...82

Figura 22 - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, sobre ECGL, variando a amplitude de 1; 5; 15; 25; 37,5; 50; 62,5; 75 mV, mantendo o incremento de potencial de 6 mV e a frequência de 50 s^{-1} . (B) Relação entre corrente de pico versus amplitude de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) $\Delta E_{p/2}$ versus a variação da amplitude de acordo com A.83

Figura 23 - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, sobre ECGL, variando a frequência de 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 25 s^{-1} , mantendo o incremento de potencial de 6 mV e a amplitude de 50 mV. (B) Relação entre corrente de pico versus frequência de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) $\Delta E_{p/2}$ versus a variação da frequência de acordo com A.84

Figura 24 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de tiramina tiramina $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-----); $0,8$ (- - - - -); $1,0$ (- - - - -); $2,0$ (- - - - -); $4,0$ (- - - - -); $6,0$ (- - - - -); $8,0$ (- - - - -); 10 (- - - - -); 20 (- - - - -); 40 (- - - - -); 60 (- - - - -); 80 (- - - - -); 100 (- - - - -) e $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (- - - - -) em meio de tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 utilizando ECGL tempo de duração de pulso 60 ms, amplitude 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1} .

- (B) Curva analítica de corrente de pico versus a concentração de tiramina86
- Figura 25** - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina 4,0 (-----); 6,0 (-----); 8,0 (-----); 10 (-----); 20 (-----); 40 (-----); 60 (-----); 80 (-----) e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-----) em meio de tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7 utilizando ECGL, amplitude 50 mV e velocidade de 108 mV s^{-1} . (B) Curva analítica de corrente de pico versus a concentração de tiramina87
- Figura 26** - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina 0,6 (-----); 0,8 (-----); 1,0 (-----); 2,0 (-----); 4,0 (-----); 6,0 (-----); 8,0 (-----); 10 (-----); 20 (-----); 40 (-----); 60 (-----); 80 (-----); 100 (-----), 200 (-----);400 (-----), 600 (-----); 800 (-----) e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-----) em meio de tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7 utilizando ECGL, amplitude 50 mV e velocidade de 16,14 mV s^{-1} . (B) Curva analítica de corrente de pico versus a concentração de tiramina ..88
- Figura 27** - Voltamogramas de pulso diferencial (A) e onda quadrada (B) da oxidação de tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7 utilizando os ECGL novos a cada leitura.....90
- Figura 28** - Relação entre corrente de pico versus 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina (1) e de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina na presença de: (2) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose, (3) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de frutose, (4) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sacarose dissociada, (5) 0,037 mol L^{-1} de etanol, (6) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sacarose, (7) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de histamina, (8) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido gálico e (9) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ catequina utilizando VPD (A) e (B) VOQ.....95
- Figura 29** - Perfis de correntes de pico versus a concentração de tiramina (5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7 sobre os ECGL (●) em eletrólito suporte (■) contendo amostra de vinho tinto de mesa: (A) para VPD, amplitude de 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1} e (B) para VOQ, amplitude de 50 mV e velocidade de 16,14 mV s^{-1}97
- Figura 30** - Perfis de correntes de pico versus a concentração de tiramina (5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7¹ sobre os ECGL, (■) para VPD, amplitude de 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1} (●) para VOQ, amplitude de 50 mV e velocidade de 16,14 mV s^{-1} : (A) amostra de vinho tinto de mesa e (B) amostra de vinho tinto fino.99
- Figura 31** - Tanques de aço inoxidável utilizados para as fermentações. 109

- Figura 32** - Teores de glicose quantificados durante o tempo em dias na (-■-) Fermentação 1 (Syrah - Itobi), (-●-) Fermentação 2 (Syrah - Três Corações), (-▲-) Fermentação 3 (Cabernet - Itobi) e (-▼-) Fermentação 4 (Cabernet - São Bento do Sapucaí). 116
- Figura 33** - Teores de frutose quantificados durante o tempo em dias na (-■-) Fermentação 1 (Syrah - Itobi), (-●-) Fermentação 2 (Syrah - Três Corações), (-▲-) Fermentação 3 (Cabernet - Itobi) e (-▼-) Fermentação 4 (Cabernet - São Bento do Sapucaí). 117
- Figura 34** - Teor de etanol quantificado durante o tempo em dias na (-■-) Fermentação 1 (Syrah - Itobi), (-●-) Fermentação 2 (Syrah - Três Corações), (-▲-) Fermentação 3 (Cabernet - Itobi) e (-▼-) Fermentação 4 (Cabernet - São Bento do Sapucaí). 120
- Figura 35** - Teor de glicerol quantificado durante o tempo em dias na (-■-) Fermentação 1 (Syrah - Itobi), (-●-) Fermentação 2 (Syrah - Três Corações), (-▲-) Fermentação 3 (Cabernet - Itobi) e (-▼-) Fermentação 4 (Cabernet - São Bento do Sapucaí). 123
- Figura 36** - Curvas de adição padrão de tiramina de correntes de pico versus a concentração de tiramina (amostra, 5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7 sobre os ECGL utilizando VPD amplitude de 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1} , para a (A) Fermentação 1, (B) Fermentação 2, (C) Fermentação 3 e (D) Fermentação 4 do sendo: (■) em 0 dias, (●) ao final da fermentação alcoólica e (▲) ao final da fermentação malolática. 126
- Figura 37** - Curvas de adição padrão de tiramina de correntes de pico versus a concentração de tiramina (amostra, 5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7 sobre os ECGL utilizando VOQ amplitude de 50 mV e velocidade de 16,14 mV s^{-1} , 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variedades de uvas mais utilizadas para produção de vinhos tintos nacionais.	28
Tabela 2 - Informações de algumas aminas biogênicas.	39
Tabela 3 - Efeitos tóxicos da tiramina.	43
Tabela 4 - Técnicas para determinação de tiramina em amostra de alimentos e bebidas.	47
Tabela 5 - Variação e escolha dos parâmetros para VPD.	81
Tabela 6 - Variação e escolha dos parâmetros para VOQ.	85
Tabela 7 - Faixa linear e LD obtidos para diferentes sistemas de detecção eletroanalítica de tiramina.	89
Tabela 8 - Medidas de precisão para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de VPD sobre os ECGL.	91
Tabela 9 - Medidas de precisão para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de VOQ sobre os ECGL.	91
Tabela 10 - Medidas de robustez para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de VPD sobre os ECGL.	93
Tabela 11 - Medidas de robustez para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de VOQ sobre os ECGL.	93
Tabela 12 - Medidas de especificidade para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos interferentes utilizando as técnicas de VPD e VOQ sobre os ECGL.	95
Tabela 13 - Resultados para métodos de adição padrão de tiramina a volume variável e constante para amostra de vinho tinto de mesa utilizando VPD e VOQ.	98
Tabela 14 - Estudo adição e recuperação para duas amostras comerciais de vinho tinto por VPD e VOQ.	99
Tabela 15 - Quatro fermentações realizadas, variedade de uvas, procedência das uvas, precipitação e temperatura média anual do local, microrganismos utilizados nas fermentações alcoólica e malolática.	110

Tabela 16 - Dados dos valores de pH, acidez total, densidade e sólidos solúveis totais dos mostos após o esmagamento para as variedades de uva Syrah e Cabernet Sauvignon.....	113
Tabela 17 - Teores iniciais de glicose e frutose durante as fermentações e razões glicose/frutose.	118
Tabela 18 - Teores máximos de etanol produzido durante as fermentações.	121
Tabela 19 - Equações lineares para as curvas de adição padrão de tiramina para as amostras durante as Fermentações 1, 2, 3 e 4 utilizando VPD e VOQ..	128
Tabela 20 - Estudo adição e recuperação para as Fermentações 1, 2, 3 e 4 por VPD.	129
Tabela 21 - Estudo adição e recuperação para as Fermentações 1, 2, 3 e 4 por VOQ.	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQC: Tampão borato e carbamato de 6-aminoquinolil- *N* -hidroxi-succinimidil

AuNP-PANSA: Nanopartículas de ouro modificados com ácido poli (8-anilino-1-naftaleno sulfônico)

Ben-Cl: Cloreto de benzoíla

BSE: Biossensor enzimático

BR: Britton - Robinson

CNBT: 1- fluoro – 2 – nitro – 4 – (trifluorometil) benzeno

CG: Cromatografia gasosa

CL: Cromatografia líquida

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE – DFL: Cromatografia Líquida de alta eficiência com detector de fluorescência

CLAP: Cromatografia líquida de alta pressão

Dns-Cl: Cloreto de dansila

DPR: Desvio padrão relativo

EAC: Cloreto de etil-acridina-sulfonil

EC: Eletroforese capilar

ECGL: Eletrodo de carbono de grafite de lapiseira

ECV: Eletrodos de carbono vítreo

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Européia para a Segurança dos Alimentos)

EIE: Espectroscopia de impedância eletroquímica.

EG: Eletrodo de grafite

EGV: Eletrodo de grafite vítreo

E_p : Potencial de pico

$\Delta E_{p/2}$: Largura de maia altura

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organização para Alimentação e Agricultura)

FIA: *Flow Injection Analysis* (Análise de injeção em fluxo)

FLD: Fluorescência

FNBT: 2- cloro – 1,3 – dinitro - 5 – (trifluorometil) benzeno

FR: Fase reversa

g: Grama

hL: Hectolitro

IBCF: Cloroformato de isobutil

IBRAVIN: Instituto Brasileiro do Vinho

(ITO / APTES / ErGO): Eletrodos de oxido índio estanho modificado com 3-aminopropiltriethoxissilano e oxido de grafeno reduzido

Kg: Quilograma

L: Litro

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

m: Mili

MAO: Monoamina oxidase

MS: Espectroscopia de massa

MWCNT: *Multi-walled carbon nanotube* (nanotube de carbon com paredes múltiplas)

MWCNT-AuNP: Compósitos de nanopartículas de nanotubos de carbono com múltiplas camadas de ouro

NAD: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

OIV: Organização Internacional da Uva e do Vinho

PBS: *Phosphate – bufferid saline* (Tampão fosfato salino)

PDA: Detector de arranjo diôdo

PDDA: Poli - (cloreto de dialildimetilamónio)

Q/MWCNT/MGCE: Eletrodo de carbono vítreo modificado por eletrodeposição de queratina em nanotubo de carbono funcionalizado com paredes múltiplas.

R: Recuperação

SA: Sensores amperométricos

r^2 : Coeficiente de determinação

SE: Sensores eletroanalíticos

SPCE: Screen-printed carbon electrode (Eletrodo de carbon impresso)

UV: Ultravioleta sintonizável

VC: Voltametria cíclica

VOQ: Voltametria de onda quadrada

VPD: Voltametria de pulso diferencial

μ : Micro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	22
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 Vitivinicultura: aspectos gerais	26
2.2 O vinho	28
2.3 Produção do vinho tinto.....	30
2.4 Composição química do vinho tinto.....	37
2.5 Aminas biogênicas em uvas e vinhos	39
2.6 Tiramina	42
2.7 Determinação de tiramina em alimentos e bebidas.....	45
2.8 Métodos eletroanalíticos.....	51
CAPÍTULO II	54
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 Amostras, reagentes e soluções	57
2.2 Aparato experimental	57
2.2.1 Montagem da célula eletroquímica.....	57
2.2.2 Preparo e limpeza dos eletrodos.....	58
2.2.3 Medidas eletroquímicas.....	59
2.2 Condições experimentais para determinação eletroquímica de tiramina	59
2.3 Estudo do mecanismo de reação de oxidação da tiramina sobre os ECGL.....	60
2.4 Otimização da técnica de voltametria de pulso diferencial	61
2.5 Otimização da técnica de voltametria de onda quadrada.....	61
2.6 Validação analítica	62
2.6.1 Linearidade e faixa linear	62

2.6.2 Limite de detecção e quantificação	62
2.6.3 Precisão	63
2.6.4 Exatidão	63
2.6.5 Robustez	64
2.6.6 Especificidade	64
2.7 Determinação eletroanalítica da tiramina e recuperação em amostra de vinho tinto.....	64
2.8 Análises estatísticas	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1 Limpeza e preparo dos eletrodos de minas de grafite.....	67
3.2 Estudo das melhores condições experimentais para determinação de tiramina .	68
3.3 Estudo do mecanismo de oxidação da tiramina sobre os eletrodos de minas de grafite	71
3.4 Otimização dos parâmetros da técnica de VPD para determinação de tiramina.	76
3.5 Otimização dos parâmetros da técnica de VOQ para determinação de tiramina	81
3.6 Validação analítica para determinação de tiramina utilizando VPD e VOQ	85
3.6.1 Estudo da linearidade e faixa linear	85
3.6.2 Análise da precisão	90
3.6.3 Análise de robustez	92
3.6.4 Especificidade (estudo de interferentes)	94
3.7 Determinação de tiramina em amostra de vinho tinto utilizando VPD e VOQ	96
4 CONCLUSÕES PARCIAIS	101
CAPÍTULO III	102
1 INTRODUÇÃO	103
2 MATERIAL E MÉTODOS	107
2.1 Aparato experimental	107
2.1.1 Medidas de pH, acidez total, densidade e sólidos solúveis totais (°Brix)	107

2.1.2 Medidas cromatográficas	108
2.1.3 Medidas eletroquímicas.....	108
2.1.4 Procedimentos empregados na vinificação	108
2.2 Determinação eletroanalítica de tiramina durante as fermentações e cálculo das recuperações.....	112
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
3.1 Determinação do pH, acidez total, densidade e sólidos solúveis totais no mosto.....	113
3.2 Quantificação de açúcares durante as fermentações de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon	115
3.3 Quantificação de etanol durante as fermentações de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon	119
3.4 Quantificação de glicerol durante as fermentações de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon	122
3.5 Determinação eletroanalítica de tiramina durante a fermentações de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon.....	124
4 CONCLUSÕES PARCIAIS	133
5 CONCLUSÕES FINAIS	134
REFERÊNCIAS.....	135

CAPÍTULO I

Revisão bibliográfica

1 INTRODUÇÃO

Segundo a legislação brasileira o vinho é a bebida proveniente da fermentação alcoólica de uvas frescas, sãs e maduras (BRASIL, 1988). É muito apreciado por apresentar características únicas obtidas durante a vinificação e o envelhecimento. As atividades de cultivo de uvas e produção de vinhos têm desenvolvimento histórico e estão amplamente difundidas em todo mundo, com mais de 50 países cuja produção é reconhecida pela Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV). Apesar de não ser a bebida mais consumida do mundo, o vinho ocupa um lugar de destaque, estando entre as mais consumidas (STANDAGE, 2015).

A principal matéria-prima para indústria vinícola é a uva, da qual se extrai o mosto para a produção do vinho. A qualidade e características da bebida começam a ser definidas no vinhedo, sendo importante a seleção do tipo de uva, o manejo agrônomo, o grau de maturação das uvas e os cuidados no momento da colheita.

O processo de elaboração consiste em duas etapas de fermentação: a fermentação alcoólica e a fermentação malolática, etapas cruciais para obtenção da bebida. No caso de vinhos tintos, a maceração é uma etapa extremamente importante, que ocorre concomitantemente a fermentação alcoólica. A fermentação é um processo bioquímico realizado por microrganismos de ocorrência natural ou inoculados ao mosto. Durante a fermentação alcoólica e maceração (contato do líquido com as cascas e sementes das uvas tintas), os açúcares presentes no mosto são convertidos em etanol, ácidos e ésteres pela ação das leveduras e compostos fenólicos e taninos presentes nas cascas e sementes são transferidos ao vinho dando cor e características organolépticas próprias à bebida (STOCKLEY *et al.*, 2012).

A presença de amins em vinhos tintos é também muito importante tanto do ponto de vista tecnológico quanto toxicológico. As amins biogênicas são bases nitrogenadas de baixo peso molecular que exercem efeito biológico no organismo e podem estar naturalmente presentes em vinhos tintos sendo produzidas através do metabolismo das videiras ou serem formadas no processo de vinificação pela ação de microrganismos ou também durante o período de estocagem da bebida (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2018).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) a ocorrência de amins biogênicas em alimentos vem causando grandes preocupações em relação aos efeitos de toxicidade quando encontradas em altas

quantidades (FAO, 2014). A ingestão de alimentos que contém quantidades elevadas de aminas biogênicas pode desencadear várias reações farmacológicas e toxicológicas, como dor de cabeça, palpitações cardíacas, vômitos e diarreia (TABANELLI, MONTANARI e GARDINI, 2018).

Recentemente, vários estudos vêm sendo desenvolvidos para determinação e identificação de aminas biogênicas em vinhos tintos, contudo, as aminas podem ser encontradas em diversos tipos de alimentos. A crescente demanda por alimentos mais seguros impulsionou o estudo destes compostos em alimentos, como soja fermentada (JEON, LEE e MAH, 2018), tofu (GU *et al.*, 2018), salsicha fermentada (EKICI e OMER, 2018), queijo (MAYER e FIECHTER, 2018), carne suína (NGAPO e VACHON, 2017), vinagre (ORDÓÑEZ *et al.*, 2013), cerveja (REDRUELLO *et al.*, 2017), entre outros.

Segundo a Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos (*European Food Safety Authority* - EFSA) a tiramina e a histamina são as aminas biogênicas mais tóxicas (EFSA, 2011), sendo que a tiramina exerce efeitos citotóxicos mais fortes que a histamina principalmente em pessoas com deficiência na enzima monoamina oxidase (MAO) (LINARES *et al.*, 2016). A tiramina é uma monoamina derivada da descarboxilação da tirosina e é encontrada principalmente em alimentos e bebidas fermentadas, como o vinho tinto. Logo, a determinação deste composto nesta bebida é de extrema importância diante de seus efeitos tóxicos ao organismo, bem como o desenvolvimento de métodos que possibilite o monitoramento de tiramina durante a produção de vinhos tintos para garantir a qualidade do produto final.

Diversas metodologias vêm sendo desenvolvidas para detectar e monitorar tiramina em vinhos (ORDÓÑEZ *et al.*, 2017; KE *et al.*, 2018; PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2018). A cromatografia é muito utilizada para detecção de tiramina em alimentos, contudo, a maioria das metodologias requerem procedimentos como pré-tratamento de amostras, maior tempo de análise, além do alto custo por demandarem reagentes específicos, bem como mão de obra especializada. A eletroanalítica por outro lado, vem se destacando das demais por envolver técnicas simples e apresenta propriedades analíticas vantajosas, tais como a alta sensibilidade, baixo custo e curtos tempos de análise (SHENG *et al.*, 2016).

Pesquisas mostram que a determinação de tiramina utilizando a eletroanalítica apresentou limites de detecção muito sensíveis, que podem ser comparados às técnicas instrumentais (LI *et al.*, 2017a; KHAN *et al.*, 2018). Dentre as técnicas

utilizadas na eletroquímica, a Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) são excelentes ferramentas que podem ser utilizadas para detecção da tiramina. Além da escolha das técnicas, um dos fatores importantes para a construção de um sensor eletroquímico para detecção de tiramina em vinhos tintos é a escolha do material utilizado para fabricação do sensor ou também chamado eletrodo de trabalho. Diversos materiais são utilizados para construção de sensores eletroquímicos para detecção de tiramina, dentre eles, eletrodos de carbono vítreo, eletrodos modificados, entre outros (APETREI e APETREI, 2013; KÜÇÜK e TORUL, 2018; LÓPEZ, GÓMEZ e RUIZ, 2017).

Sensores eletroquímicos baseados em carbono, em particular, oferecem inúmeras vantagens, pois são de baixo custo e quimicamente inertes. Dentre eles, eletrodos de carbono de grafite de lapiseira (ECGL) também denominados minas de grafite apresentam alta reprodutibilidade, sensibilidade, e principalmente, são mais baratos e mais acessíveis. Alves *et al.* (2017) obtiveram excelentes propriedades eletroquímicas utilizando eletrodos de minas de grafite para construção de um biossensor.

Conciliar a eletroanalítica juntamente com a utilização de materiais baratos e acessíveis, como os ECGL, na construção de sensores para detecção e quantificação de tiramina em vinhos tintos é uma opção para o controle de qualidade da bebida e para segurança alimentar da população. Desta forma, o objetivo deste capítulo é realizar uma revisão bibliográfica sobre vinhos tintos, incluindo as uvas como matéria-prima, produção e composição, bem como a formação de amins biogênicas em especial a tiramina, além de citar os diferentes métodos de detecção de tiramina em alimentos e as vantagens da utilização das técnicas voltamétricas frente a outras técnicas principalmente quando se utiliza eletrodos elaborados com materiais de baixo custo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vitivinicultura: aspectos gerais

A vitivinicultura é uma atividade de importância econômica e cultural para diversas regiões do mundo. Aproximadamente uma superfície mundial de 7,4 milhões de hectares foi destinada ao cultivo de videiras no ano de 2018, e cerca de 77,8 milhões de toneladas de uvas foram colhidas neste mesmo ano, sendo 57% destinada a produção de vinho (OIV, 2019). No Brasil, quando comparado aos países tradicionalmente produtores, observa-se melhorias na qualidade das uvas e vinhos relacionados ao emprego de técnicas agrônomicas e enológicas.

Dentre os países produtores, a Espanha representava a maior área de cultivo com 13% da área cultivada no mundo em 2018, seguida pela China, França, Itália e Turquia. O Brasil ocupava o vigésimo segundo lugar com uma área de aproximadamente 82 mil hectares cultivados (OIV, 2019). O cultivo em diferentes regiões permite obter efeitos distintos na uva devido a influência de fatores naturais como o clima, o solo e o ambiente biológico e humanos, como manejo, determinando o potencial vitícola de uma área em relação às exigências de determinadas cultivares de uvas e do mercado (OLIVEIRA *et al.*, 2019b (?)). Padronizar o uso do “DE” no texto e na relação das referências

Entre os 28 países responsáveis por 85% da produção mundial de vinhos em 2018 e 2019, produziu-se em média 263 milhões de hectolitros em 2019 sendo 10% inferior ao ano anterior, fator relacionado a alterações climáticas principalmente no hemisfério norte (OIV, 2019).

As principais espécies de uvas cultivares no mundo são as *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca* e estão entre as de maior importância econômica. A primeira é de origem europeia, conhecida como uma espécie produtora de uvas finas, geralmente utilizadas para a elaboração de vinhos finos, enquanto a *Vitis labrusca* dá origem a uvas americanas e cultivares híbridas que são denominadas “uvas comuns” (MAIA e CAMARGO, 2005).

A primeira espécie introduzida no Brasil foi a *Vitis vinifera*. Posteriormente no século XIX foram introduzidas as cultivares americanas *Vitis labrusca*. A adaptação das uvas americanas proporcionou a expansão da viticultura brasileira. A diversidade climática do Brasil, aliada ao investimento em inovações possibilitou o cultivo de uvas finas tintas, como a Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Tannat, Ancellota,

Pinot Noir e Egiodola, Syrah e Alicante Bouschet (BOTELHO e PIRES, 2009). A composição da baga de uvas pode variar em concentração de açúcares, ácidos orgânicos, minerais, compostos fenólicos e aromáticos que são alguns dos principais compostos presentes nas uvas e nos vinhos (PANCERI *et al.*, 2015).

Algumas características da composição das uvas devem ser observadas no momento da colheita. O teor de sólidos solúveis totais é importante para determinar o ponto de maturação das uvas, mas principalmente para elaboração do vinho, já que sólidos solúveis do mosto são compostos em grande maioria por açúcares fermentescíveis. A glicose e frutose são os principais açúcares presentes em uvas. Outros açúcares presentes em pequenas quantidades são a ramnose e maltose (COELHO *et al.*, 2018).

Os compostos fenólicos são encontrados em maior quantidade na casca e desempenham um papel muito importante atribuindo características sensoriais de sabor e cor na uva e, conseqüentemente, no vinho (BRUNETTO *et al.*, 2009). As antocianinas são uma classe dos compostos fenólicos responsáveis pela cor nas uvas tintas. Os polifenóis são transferidos ao vinho durante a vinificação na etapa de maceração (contato com a casca e sementes), ou no envelhecimento, pelo contato com a madeira. Estudos recentes envolvem a aplicação de técnicas para extração e obtenção destes compostos de subprodutos da vinificação, como do bagaço de uvas (NAYAK *et al.*, 2018).

Os ácidos orgânicos também são responsáveis por características sensoriais em uvas e vinhos como o sabor e aroma. Além disso, auxiliam na estabilização e controle microbiológico em vinhos. No mosto de uva os principais ácidos orgânicos são o ácido tartárico e o málico e os provenientes da fermentação são o láctico, succínico e acético (LIMA *et al.*, 2014; COELHO *et al.*, 2018).

A seleção de uvas para produção de vinhos dependerá de inúmeros fatores, especialmente da composição da uva que influencia diretamente nas características organolépticas do vinho. Diferenças na composição são influenciadas pelas características do solo, manejo e clima e principalmente a cultivar utilizada. Desta forma, a adaptação da videira às condições de clima e solo, aplicações tecnológicas e métodos de produção de vinho são essenciais para escolha da cultivar a ser utilizada para obtenção de vinhos de boa qualidade.

Algumas variedades de uvas mais utilizadas para a produção de vinhos tintos nacionais são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Variedades de uvas mais utilizadas para produção de vinhos tintos nacionais.

Variedades (espécies)	Características
Cabernet Franc (<i>Vitis vinifera</i>) - tinta	Produz vinhos com ótima qualidade e com aroma pronunciado. É a base de vinhos frutados que dispensam envelhecimento prolongado, mas podem ser envelhecidos conforme a safra. Pode ser utilizada em combinação com outras uvas.
Cabernet Sauvignon (<i>Vitis vinifera</i>) - tinta	Produz vinhos bem encorpados, frutados, e que podem ser adstringentes devido ao alto valor de taninos. Seu potencial de maturação é elevado, origina vinhos tintos com coloração vermelho-rubi intenso, aromas herbáceos que evoluem com o envelhecimento, dependendo da safra.
Isabel (<i>Vitis labrusca</i> e <i>Vitis vinifera</i>) - tinta	É utilizada como uva de mesa, para produção de suco, vinhos, geleias e vinagres. Para vinhos, origina um típico vinho colonial, com aromas frutados, mas não aporta muita cor tinta ao vinho.
Melort (<i>Vitis vinifera</i>) - tinta	Possui baixo teor de taninos, produz vinhos levemente encorpados, pouco ácidos e de cor intensa e vinhos mais “macios”
Syrah (<i>Vitis vinifera</i>) - tinta	Produz bons vinhos, que muitas vezes possuem um excesso de acidez e presença de taninos potentes.
Bordo (<i>Vitis labrusca</i>) - tinta	Produz vinhos ricos em aroma e sabor “foxado”. A principal característica é a intensa coloração violácea. É utilizada muito em conjunto com a uva Isabel.

Fonte: Botelho e Pires (2009); Fraige (2012)

2.2 O vinho

De acordo com a legislação brasileira, “vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto resultante do esmagamento ou da prensagem de uvas sãs, frescas e maduras, contido ou não de suas partes sólidas”. A denominação vinho é vedada e não deve ser utilizada para quaisquer bebidas obtidas de outras matérias-primas que não a uva. Os vinhos podem ser classificados quanto à classe (vinho de mesa, vinho espumante, vinho licoroso e vinho composto) e quanto à cor (vinho tinto, vinho rosado e vinho branco) (BRASIL, 1988).

Os compostos formados durante a fabricação dos vinhos dão a esta bebida sabores variados dependendo do tipo de uva utilizada, fazendo com que seja apreciada por diferentes tipos de populações. A origem do cultivo de videiras iniciou em áreas da Ásia e do Cáucaso, onde encontraram as primeiras marcas da

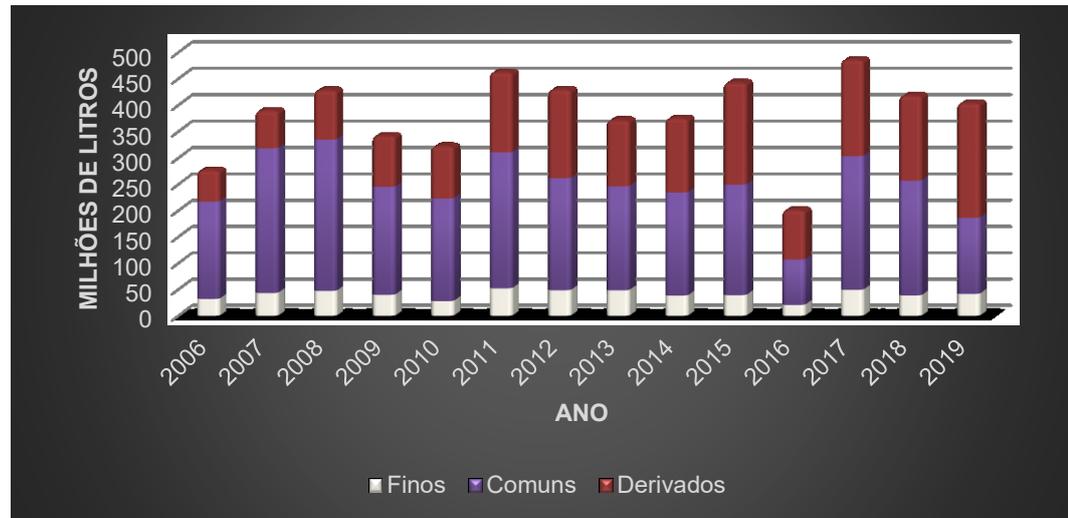
domesticação da *Vitis vinifera*. Há relatos que os primeiros consumidores de vinho foram os egípcios a cerca de 3000 a.C. e que o uso medicinal da bebida foi realizado pelo homem há mais de 2000 anos (LOVATO e WAGNER, 2014).

Segundo a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2019), o vinho é amplamente consumido no mundo. Em 2016 o consumo global de vinho foi de 241 milhões de hectolitros, com um aumento de 7% em relação ao ano de 2000. Em 2017 o consumo foi estimado em 244 milhões de hectolitros e, em 2018, 246 milhões de hectolitros.

Dentre os países que mais consomem vinho, Estados Unidos destaca-se em primeiro lugar desde 2011, com consumo estimado de 33 milhões de hectolitros no ano de 2018, um aumento de 1,1% em relação a 2017 (OIV, 2019). No Brasil, o consumo médio foi estimado em 1,9 litros por pessoa e o país ocupou o décimo oitavo lugar como consumidor e vigésimo como produtor mundial (CONAB, 2019).

A maior parte da produção de vinhos no Brasil ocorre no estado do Rio Grande do Sul. Segundo o Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN, 2019), em 2019, o volume de vinhos comuns produzidos por empresas do Rio Grande do Sul foi de 144,67 milhões de litros, enquanto o volume produzido dos vinhos finos, no mesmo período, foi de 41,61 milhões de litros, cerca de 3 vezes menor que a produção de vinhos comuns. A produção de vinhos comuns, finos e derivados de uva e vinho de empresas do Rio Grande do Sul é apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Produção de vinhos e derivados em milhões de litros no estado do Rio Grande do Sul, 2006 a 2019.



Fonte: Adaptado IBRAVIN (2019).

Apesar da redução da produção de vinhos comuns no ano de 2019 em relação a 2017 em ambos os anos e ao longo deles, entre os vinhos comuns e finos, os comuns se destacam, sendo os mais produzidos. Da totalidade dos vinhos de mesa (comuns) e finos produzidos no país por empresas do Rio Grande do Sul, em 2018, 88,2% e 75,3%, respectivamente, eram tintos (IBRAVIN, 2019). A maior comercialização de vinhos tintos está diretamente relacionada com maior consumo deste tipo de vinho em relação aos demais tipos.

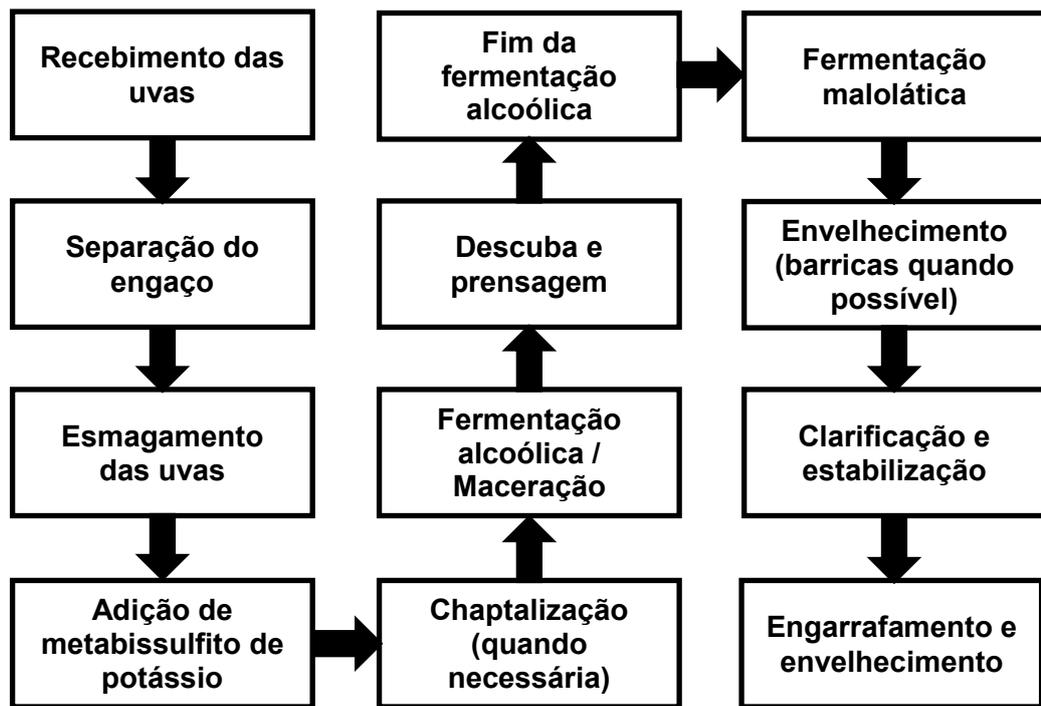
O vinho tinto é elaborado com uvas tintas, responsáveis pela coloração da bebida. Diversos compostos químicos podem ser transferidos das uvas para o vinho, outros podem ser formados durante a fermentação, e cada um é responsável por conferir características específicas. Contudo, a presença de compostos indesejados, as aminas bioativas, pode prejudicar a qualidade do vinho tinto (AQUARONE *et al.*, 2014). Desta forma, é importante compreender as etapas de elaboração para obter produtos de qualidade.

2.3 Produção do vinho tinto

Os vinhos diferem pelos fatores enológicos, incluindo o tipo e a estrutura da uva, fatores edafoclimáticos e técnicas de fermentação. A produção de vinho tinto compreende um conjunto de etapas e o avanço da tecnologia resultou em um progresso significativo do conhecimento da bioquímica e das interações de

microrganismos no decorrer do processo de vinificação (ALCAIDE-HIDALGO *et al.*, 2008). As etapas do processo de elaboração de vinhos tintos são mostradas na Figura 2.

Figura 2 - Etapas do processo de elaboração de vinho tinto.



Fonte: Adaptado (RIZZON, 2006).

A primeira etapa de elaboração de vinho tinto é o recebimento das uvas. Nesta etapa, avalia-se o estado sanitário das frutas, confirma-se o cultivar utilizado e pesam-se as uvas. Também são retiradas amostras para determinação de compostos presentes no mosto. A etapa de separação dos engaços (eixo da inflorescência) é um processo mecânico muito importante realizado durante a produção, pois os engaços possuem baixo teor de açúcares e elevado teor de potássio e causam o surgimento de gosto amargo e sensação de adstringência em vinhos tintos, afetando diretamente a qualidade do produto (RIZZON, 2006).

Após a separação dos engaços é realizado o esmagamento das uvas que tem como finalidade liberar o suco contido na polpa para fermentação. Para isso, a película da baga é rompida e o mosto entra em contato com as leveduras presentes na película. O processo mecânico auxilia para a dispersão das leveduras no mosto e propicia a aeração do meio que favorece a multiplicação de células, colaborando para

o início da fermentação alcoólica (RIZZON, 2006). No entanto, o esmagamento das uvas deve ser realizado de forma suave, reduzindo danos nas sementes para evitar a liberação de taninos herbáceos de cadeia pequena, que transferem sabor amargo ao vinho (SCOLLARY, 2015).

Normalmente, o equipamento de esmagamento é conjugado com o desengaçamento, denominado esmagadeira-desengaçadeira. Provoca o rompimento das bagas por compressão ou por choque liberando mosto, sem provocar o esmagamento das sementes e dos engaços (AQUARONE *et al.*, 2014).

Um dos principais aspectos nesta etapa é a liberação de compostos responsáveis pela coloração dos vinhos tintos. A pele da uva é responsável pela liberação de taninos, antocianinas e polifenóis, que dão ao mosto a acidez, cor vermelha e potencial efeito antioxidante (HASEEB *et al.*, 2018). Os flavonoides são componentes importantes que podem ser encontrados nos pigmentos que dão a cor às cascas das uvas. Eles são essenciais para a qualidade do vinho e responsáveis pela cor e adstringência dos vinhos tintos (GRANATO *et al.*, 2018).

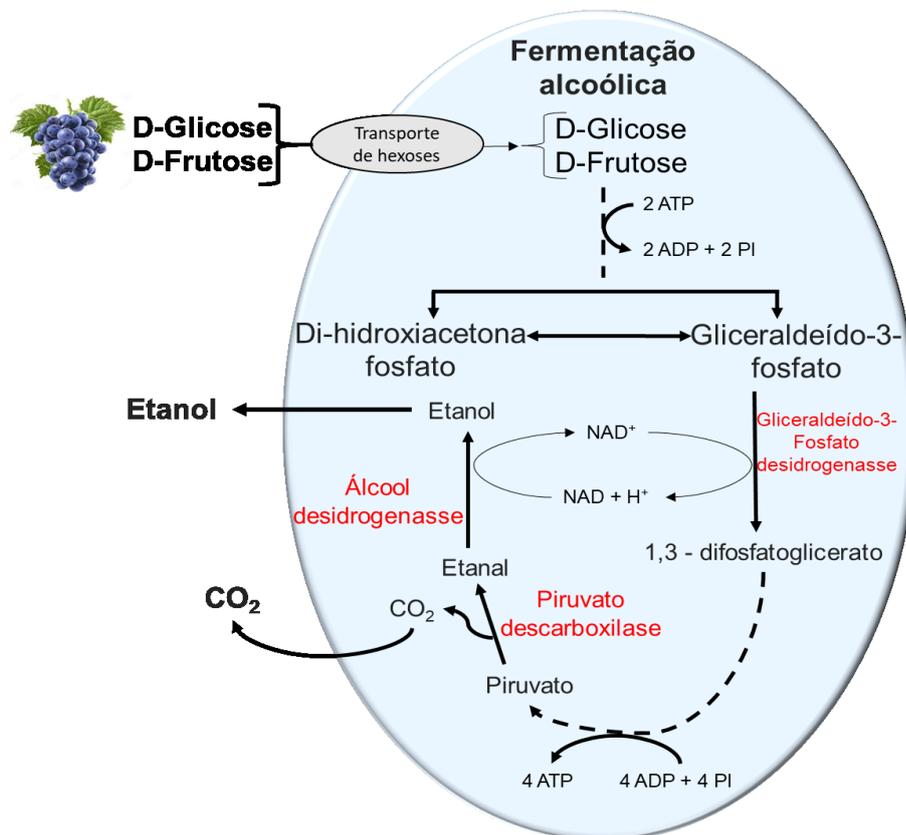
A seleção de microrganismos presentes no mosto é feita pela adição de conservantes. O metabissulfito de potássio é uma das principais substâncias utilizadas para esta finalidade. Sua atuação como desinfetante e anti-séptico favorece a ação de leveduras, e inibe a ação de bactéria acéticas, lácticas e leveduras que produzem pouco álcool. Além disso, o metabissulfito de potássio atua como agente antioxidante prevenindo a oxidação de compostos responsáveis pela coloração de vinhos tintos, como solubilizante, facilitando a dissolução de corantes e como coagulante por ter a capacidade de aglomerar e precipitar inúmeras substâncias encontradas no mosto que provocam a turvação (RIZZON, 2006).

A adição de conservantes e o processo de chaptalização (correção do açúcar do mosto) são realizados logo após o esmagamento da uva. A chaptalização é permitida em diversos países e é necessária para atingir o teor alcoólico estabelecido quando as condições naturais de cultivo das videiras não permitem o acúmulo de teores de açúcares fermentescíveis necessários, sendo assim muito importante para o processo de fermentação alcoólica. O ideal para o processo de fermentação é que o mosto apresente cerca de 200 g L⁻¹ de açúcar (GUERRA *et al.*, 2005). O processo de chaptalização é realizado de forma gradual no início da fermentação para evitar que as leveduras sofram inibição pelo substrato e para garantir que o vinho atinja pelo menos 12°GL (Gay Lussac) (RIZZON, 2006; AQUARONE *et al.*, 2014). A legislação

brasileira permite o aumento da graduação alcoólica em apenas 1% para vinhos elaborados com *Vitis vinifera* e até 2% para variedades híbridas ou americanas (Brasil, 2014)

Na fermentação alcoólica os açúcares fermentescíveis do mosto são transformados principalmente em álcool etílico e gás carbônico. Esta reação é exotérmica e a fermentação deve ser realizada sob temperatura controlada, na qual a faixa ideal é de 25 a 30°C (GENC, GENC e GOKSUNGUR, 2017). A reação bioquímica celular da fermentação alcoólica realizada pela ação de leveduras sobre os açúcares fermentescíveis é mostrada na Figura 3.

Figura 3 - Fermentação alcoólica.



Fonte: Adaptado de Zamora (2009).

A fermentação alcóolica é realizada por leveduras, principalmente as da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que pode ser adicionada ou estar presente naturalmente na uva, e a energia utilizada para o crescimento é fornecida por reações de oxidação parcial das hexoses com produção de etanol e dióxido de carbono.

Embora a fermentação possa ser realizada utilizando a microflora natural contida nas uvas, alguns autores recomendam a utilização de leveduras selecionadas para manter a uniformidade da fermentação alcoólica e, conseqüentemente, da bebida (HU *et al.*, 2018; KONG *et al.*, 2019).

A primeira etapa da fermentação alcoólica, que ocorre com a maceração na elaboração de vinhos tintos, é chamada de fermentação tumultuosa e caracteriza-se pela grande atividade de leveduras, elevação da temperatura, grande liberação de gás carbônico e, principalmente, pela formação do “chapéu” do bagaço, em que as partes sólidas vão para parte superior do recipiente de fermentação (GUERRA *et al.*, 2005).

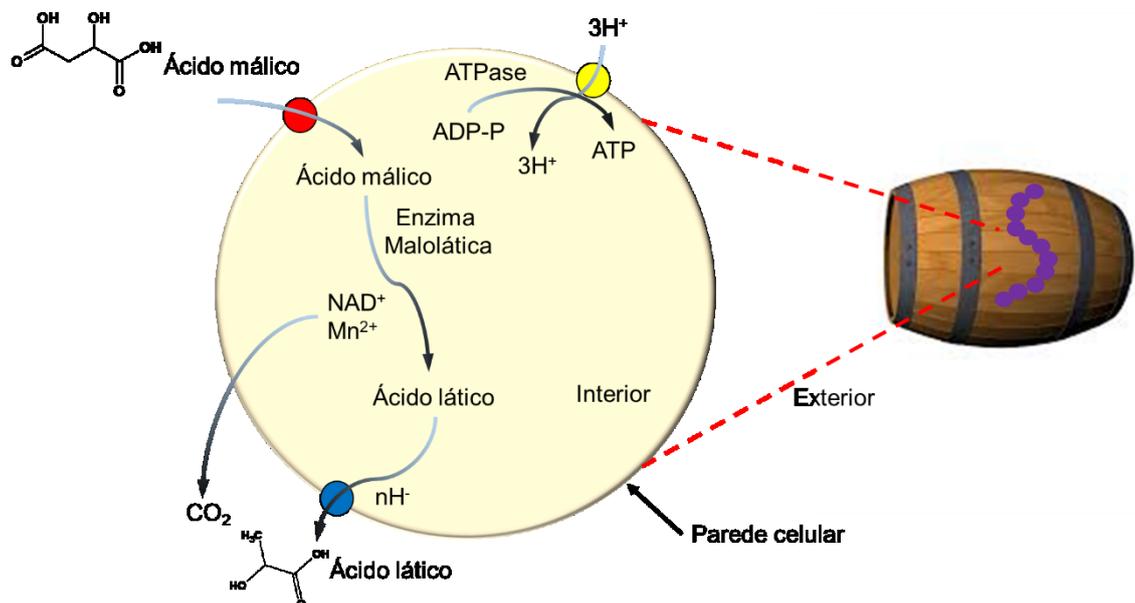
A fermentação tumultuosa ocorre durante o período de maceração. Nesta etapa, o mosto fica em contato com as cascas das uvas e ocorre a solubilização dos componentes das partes sólidas, entre os quais se destacam as antocianinas e compostos fenólicos (SACCHI, BISSON E ADAMS, 2005). A maceração é finalizada quando se retira o mosto das partes sólidas das uvas. Esta etapa é chamada de descuba e prensagem. A descuba é a retirada do vinho da parte inferior do recipiente de fermentação e a prensagem consiste na retirada de parte do vinho que fica impregnado nas partes sólidas das uvas com auxílio de prensas. O vinho retirado, então, entra na etapa de fermentação lenta, em que o conteúdo restante de açúcar é consumido pelas leveduras. Este processo é lento devido ao elevado teor alcoólico presente no vinho dificultando a ação das leveduras. A etapa termina quando o desprendimento de gás carbônico é cessado e o conteúdo de açúcares for inferior a 3 g L^{-1} (RIZZON, 2006).

Concluída a fermentação alcoólica se inicia a fermentação malolática. A principal característica desta etapa é a transformação de ácido málico em láctico pela ação de bactérias lácticas (GENC, GENC e GOKSUNGUR, 2017). Para vinhos tintos a fermentação malolática é muito importante e responsável pela diminuição da acidez total, isso porque, a transformação do ácido málico em láctico provoca a desacidificação com um aumento do pH inicial e conseqüentemente a suavização do vinho (GUERRA *et al.*, 2005). Além disso, os precursores de aroma no vinho podem ser ainda mais hidrolisados em voláteis de forma livre sob fermentação malolática (WANG *et al.*, 2018).

A reação química fundamental na conversão do ácido málico em láctico é realizada pela enzima malolática oriunda das bactérias láctica. Nesta reação, ocorre

a descarboxilação enzimática do ácido málico formando o ácido láctico que é conduzido para fora da célula, e é necessário a presença de NAD^+ e Mn^{2+} como cofatores (BETTERIDGE, GRBIN E JIRANEK, 2015). A conversão do ácido málico em láctico na célula com liberação de dióxido de carbono na fermentação malolática é apresentada na Figura 4.

Figura 4 - Conversão de ácido málico em ácido láctico durante a fermentação malolática.



Fonte: Adaptado de Betteridge, Grbin e Jiraneck (2015).

Assim como na fermentação alcoólica, as bactérias lácticas utilizadas na fermentação malolática podem estar presentes naturalmente nas uvas ou serem selecionadas e adicionadas ao processo para garantir uma melhor uniformidade na fermentação. As espécies de bactérias lácticas mais relevantes são as dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Oenococcus*, elas são capazes de produzir uma ampla gama de enzimas importantes, além de atuarem diminuindo a acidez do vinho, auxiliam na formação de aroma e sabor (PÉREZ-MARTÍN *et al.*, 2013).

Os cuidados nesta etapa são extremamente importantes pois, além da conversão benéfica do ácido málico em láctico, principalmente pela via enzima descarboxilase (enzima malolática), outros compostos como as aminas biogênicas podem ser formados. As aminas biogênicas vêm sendo utilizadas como indicadores de qualidade em alimentos, por sua formação estar relacionada a presença de

microrganismos. Muitos gêneros bacterianos, incluindo as produtoras de ácido láctico em vinhos, são capazes de descarboxilar aminoácidos precursores para formação de aminas biogênicas, as bactérias lácticas autóctones foram relacionadas a formação destes compostos (HENRÍQUEZ-AEDO *et al.*, 2016).

Encerrada a fermentação alcoólica e malolática, o vinho tinto ainda não deve ser engarrafado. Neste momento, processos de clarificação e estabilização são necessários, pois não possui limpidez e estabilidade suficiente para ser conservado adequadamente. Um dos processos que podem ser realizados para esta finalidade é a trasfega que consiste na transferência do vinho de um recipiente para outro. A transferência ajuda a eliminar a borra que fica sedimentada no recipiente e assim contribui para clarificação do vinho tinto e na estabilização tartárica, processo a frio que permite a precipitação de sais tartáricos que tornariam o vinho turvo (GENC, GENC E GOKSUNGUR, 2017).

A filtração também pode ser utilizada para clarificação e estabilização de vinhos tintos. Neste processo, partículas indesejadas podem ser removidas. Alguns processos de produção de vinho tinto utilizam também a prática de adquirir a estabilidade por meio do armazenamento do vinho em barricas de madeira que favorece a oxigenação lenta e gradativa e a liberação de taninos da madeira para o vinho, além do fato que a estabilização neste armazenamento é muito importante nas características sensoriais de formação de “corpo” da bebida (RIZZON, 2006).

O engarrafamento consiste na última etapa de processamento de vinhos tintos. Na maioria das vezes é realizado em garrafas de vidro não transparentes que são adequadamente vedadas para evitar a oxidação de compostos pela ação da luz e oxigênio. O envelhecimento do vinho tinto engarrafado permite o desenvolvimento de características sensoriais únicas ao produto devido a uma série de reações químicas que ocorrem de forma natural e lenta (GUERRA *et al.*, 2005).

Durante o armazenamento do vinho tinto engarrafado, são observados o clareamento espontâneo, estabilização de cor e reações químicas que levam a formação de compostos mais complexos (VENTURI *et al.*, 2017). O conteúdo de aminas biogênicas já foi também observado durante diferentes condições de armazenamento de vinhos tintos (PALOMINO-VASCO *et al.*, 2019).

Todas as etapas de elaboração do vinho tinto são responsáveis pelo conjunto de componentes químicos presentes no produto final. Recentemente, estudos da formação e presença de aminas biogênicas durante as etapas de produção e

envelhecimento de vinhos tintos foram realizados devidos aos efeitos toxicológicos que estes compostos podem causar ao organismo (LORENZO *et al.*, 2017; TUBEROSO *et al.*, 2018; MILHEIRO *et al.*, 2019). A presença destes compostos em vinhos tintos está diretamente relacionada com a composição das uvas e, principalmente, com o processo de vinificação. Desta forma, é importante conhecer a composição química do vinho tinto.

2.4 Composição química do vinho tinto

Os vinhos tintos são constituídos de água, álcoois, açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e produtos de constituição, polifenóis, compostos aromáticos e minerais. O componente majoritário em vinhos tintos é a água, seguido pelo etanol produzido durante a fermentação alcoólica. O etanol é muito importante, e atua na estabilização e desenvolvimento de características sensoriais, por inibir a ação de microrganismos indesejáveis e agir como um solvente para a extração de pigmentos e taninos durante a vinificação de uvas tintas, além de ser capaz de dissolver compostos voláteis evitando as perdas (JACKSON, 2008).

Parte dos açúcares presentes nas uvas, glicose e frutose, são convertidos durante a fermentação em etanol, e parte permanecem no vinho, e estes são responsáveis pela doçura da bebida. Para vinho tinto seco, de acordo com a legislação brasileira o limite não pode ultrapassar 4 g L^{-1} de açúcares residuais (BRASIL, 2014), sendo recomendável apresentar menos de 3 g L^{-1} (RIZZON, 2006).

Assim como o etanol, os ácidos orgânicos também são importantes para a estabilidade, sendo necessário um controle durante todo o processo de vinificação. Estão fortemente ligados a características sensoriais de aroma e sabor. Existem diferentes ácidos, livres ou compostos, alguns podem ser derivados da uva (ácidos málico, tartárico e cítrico) e outros (ácidos succínico, acético e láctico) que surgem dos processos de fermentação (ROBLES *et al.*, 2019). Os ésteres mais comuns em vinhos são os etílicos, formados pela esterificação enzimática ou química de ácidos e álcoois orgânicos, formados principalmente durante o envelhecimento e contribuem para a melhora do aroma (TREDoux *et al.*, 2008).

Os principais minerais encontrados no vinho tinto são o potássio, sódio e cálcio. Estes compostos migram do solo para as uvas e são transferidos ao vinho no processo de vinificação. O potássio representa quase 50% do total de minerais presentes nas

uvas e é encontrado principalmente na casca (MOTA *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos no vinho tinto incluem compostos naturais conhecidos como polifenóis. Eles podem ser oriundos da própria uva, do metabolismo de microrganismos e até serem formados durante o envelhecimento da bebida, e podem ser divididos em dois grupos: compostos não flavonóides e flavonóides. Os flavonóides mais encontrados são catequinas, epicatequinas, antocianinas, taninos, quercetina, campfenol e miricetina. Os compostos não flavonóides correspondem aos ácidos fenólicos, como os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, e estilbenos (resveratrol) (JACKSON, 2008; MIERCZYNSKA-VASILEV E SMITH, 2016).

Os polifenóis desempenham papel fundamental nas propriedades sensoriais e na formação da cor característica do vinho tinto (LI *et al.*, 2017). Além disso, alguns possuem atividade antioxidante, como é o caso do resveratrol, que vem sendo foco de pesquisas, pois acredita-se que tenha efeitos positivos na saúde humana. Foram atribuídas a ele atividades antitumorígenas, antidiabéticas e antienvhecimento (EDWARDS *et al.*, 2011). Dentre os compostos fenólicos, as antocianinas são extremamente importantes para a coloração de vinhos tintos. Esses compostos são transferidos para o mosto desde o início do processamento da uva por esmagamento, e são responsáveis pelas cores azul, vermelho e combinação destes tons.

Assim, cada composto tem função importante para obtenção de vinhos de qualidade. Os aminoácidos influenciam os aromas durante a maturação, os açúcares são consumidos durante a fermentação para formação do etanol, responsável pela estabilidade da bebida. Os ácidos orgânicos são de grande importância, pois influenciam as propriedades sensoriais e colaboram no controle microbiológico. Finalmente, os compostos fenólicos estão associados à aparência, sabor e atividade antimicrobiana (ROBLES *et al.*, 2019).

A presença de alguns compostos, como as aminas bioativas, entretanto, podem acarretar em características ruins aos vinhos tintos. Diversos fatores podem influenciar na formação de compostos indesejáveis, incluindo as diferenças no processo de vinificação, o tempo e as condições de armazenamento e a qualidade da matéria-prima. As aminas biogênicas podem causar reações adversas em alguns indivíduos, além de serem utilizadas como indicativo da qualidade de alimentos quando em concentrações elevadas (HENRÍQUEZ-AEDO *et al.*, 2016). Desta forma, é importante estudar a origem e presença destes compostos na matéria prima (uvas) e vinhos tintos.

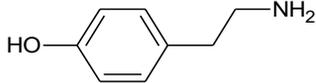
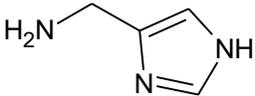
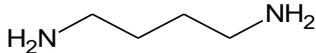
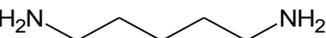
2.5 Aminas biogênicas em uvas e vinhos

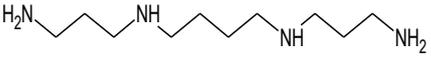
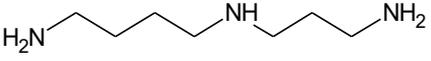
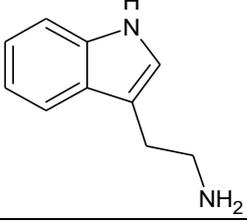
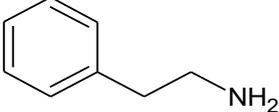
As aminas biogênicas são aminas bioativas, e podem estar naturalmente presentes ou serem formadas durante a vinificação, sendo muito difícil, ou mesmo impossível, obter um vinho que não contenha nenhuma amina biogênica. Tratam-se de bases nitrogenadas de baixo peso molecular e são obtidas principalmente pela descarboxilação de seus respectivos aminoácidos precursores livres, através da ação catalítica de descarboxilases de bactérias e leveduras autótonas, que removem o grupo α -carboxila de aminoácidos para formar as aminas correspondentes, ou pela aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (LIU *et al.*, 2018).

As aminas bioativas em geral podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina, da estrutura química, da biossíntese e das funções fisiológicas. Quanto ao grupamento amina, podem ser classificadas em monoaminas (tiramina e feliletilamina), diaminas (histamina, serotonina, triptamina, putrescina e cadaverina) ou poliaminas (espermidina, espermina e agmatina). Quanto a estrutura química, classificam-se em alifática (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina, triptamina e serotonina) (BARDÓCZ, 1995; GLÓRIA, 2005).

A classificação mais utilizada divide as aminas em poliaminas que desempenham papel importante no crescimento, e aminas biogênicas que possuem atividades neuro e vasoativas. Os nomes de algumas aminas biogênicas, as estruturas e classificação quanto à estrutura são listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Informações de algumas aminas biogênicas.

Nomes	Estrutura	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Classificação
Tiramina		137,18	Amina aromática
Histamina		111,15	Amina heterocíclica
Putrescina		88,15	Amina alifática
Cadaverina		102,18	Amina alifática

Espermina		202,34	Amina alifática
Espermidina		145,25	Amina alifática
Triptamina		160,21	Amina heterocíclica
Feniletilamina		121,18	Amina aromática

Fonte: Adaptado Zhang *et al.* (2019).

As aminas biogênicas são encontradas principalmente em alimentos, pois podem ser formadas durante processos metabólicos normais em organismos vivos. A presença destes compostos em alimentos fermentados é muito comum e podem ser utilizados como indicadores de qualidade por estarem associados a atividades bacterianas. É de relevância também os fatores toxicológicos associados a elas, principalmente em altas concentrações. A demanda por alimentos mais seguros promoveu o desenvolvimento de diversas pesquisas sobre a presença de aminas biogênicas em alimentos nos últimos anos em diversos países, inclusive no Brasil (MOLOGNONI *et al.*, 2018).

Há relatos de aminas biogênicas em peixes (BILGIN e GENÇCELEP, 2015), carne (LÁZARO *et al.*, 2015), leite fermentado (COSTA *et al.*, 2015), frutas (KELLY, BLAISE e LARROQUE, 2010), café (RESTUCCIA *et al.*, 2015), cervejas (PRADENAS *et al.*, 2016), vinhos (COTON *et al.*, 2010; MARTUSCELLI *et al.*, 2013; RAMOS, VALENTE E RODRIGUES, 2014, RIBEIRO *et al.*, 2019), dentre outros. A ocorrência destes compostos no vinho constitui uma preocupação crescente dentro do setor vinícola, podendo exercer efeitos tóxicos. Neste sentido, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para determinar ou monitorar a presença de aminas biogênicas em vinhos durante a elaboração, envelhecimento e no produto final (KE *et al.*, 2018; ORDÓÑEZ *et al.*, 2017; PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2018). Inclusive estudos realizados no Brasil (SABAINI, 2009; FRAGA, 2010)

Em geral, em vinhos tintos, as aminas biogênicas (histamina, putrescina, cadaverina, agmatina, tiramina e triptamina) são formadas pela descarboxilação dos aminoácidos precursores. Desta forma, os níveis presentes dependem da abundância dos precursores no meio (SMIT *et al.*, 2013). A presença destes compostos pode também estar relacionada com outros fatores. As origens podem ser provenientes das uvas, podendo serem formadas pelo próprio metabolismo das plantas. As variedades de uvas também podem afetar nos teores e tipos de aminas biogênicas formadas, de acordo com estudo realizado por Restuccia *et al.* (2017). O conteúdo total de aminas biogênicas variou de acordo com os cultivares de uvas, com diferentes perfis e concentração. O estágio de maturação é outro fator que pode influenciar, afetando os teores de aminas conjugadas, ligadas ou livres (FRAGA, 2010).

Também podem ser formadas no processo de vinificação, segundo Moreno-Arribas e Polo (2009). A fermentação malolática é a principal etapa responsável pela origem de aminas biogênicas em vinhos tintos, devido a ação das bactérias envolvidas nesta fermentação. As taxas de formação e os teores destas aminas variam de acordo com o tipo de microrganismo envolvido e a capacidade de descarboxilação varia de acordo com a cepa utilizada. As leveduras autóctones também podem atuar na produção de aminas biogênicas em vinhos tintos. Caruso *et al.* (2002) estudou a produção de aminas biogênicas em leveduras isoladas de uvas e vinhos e observou que as leveduras *Brettanomyces bruxellensis* e *Saccharomyces cerevisiae* produziram as maiores concentrações de aminas biogênicas totais.

Outras etapas do processo podem também contribuir para o surgimento destes compostos, principalmente por contaminantes introduzidos no meio devido a condições higiênico-sanitárias inadequadas ou durante o período de estocagem da bebida. Microrganismos descarboxilase positivos podem ser introduzidos por contaminação antes, durante ou após o processamento (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2018). Segundo estudos, o mosto de uva pode conter aminas biogênicas e o conteúdo tende a aumentar ao longo da produção e envelhecimento de vinhos tintos (GARCÍA, TRIGUEROS e ESCRIBANO-BAILÓN, 2010).

As principais aminas biogênicas encontradas em vinhos tintos em concentrações mais elevadas são a tiramina, histamina e putrescina. Outras como metilamina, etilamina, feniletilamina, isoamilamina e cadaverina também podem estar presentes em baixas concentrações (MARQUES, LEITÃO e ROMÃO, 2008; BACH *et al.*, 2012). A maioria dos estudos de aminas biogênicas em vinhos tintos estão mais

voltados para determinação de tiramina e histamina em relação as demais, e alguns mostram que a tiramina pode exercer efeitos citotóxicos mais fortes que a histamina levando a necrose celular. Além disso, ao contrário da histamina que tem atividade vasodilatadora, a tiramina é a amina biogênica mais ativa no aumento da pressão sanguínea (LINARES *et al.*, 2016; MARTUSCELLI *et al.*, 2013).

As aminas biogênicas são necessárias para várias funções críticas do ser humano, mas altas concentrações destas aminas podem causar efeitos fisiológicos indesejáveis em seres humanos sensíveis, especialmente quando álcool e acetaldéido estão presentes (CARUSO *et al.*, 2002).

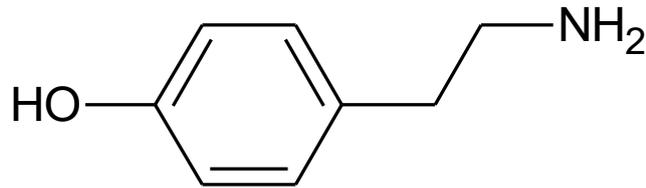
Os limites recomendáveis pela Comissão Europeia para tiramina em alimentos variam entre de 100 a 800 mg Kg⁻¹ (EC, 2003). A recomendação de doses tóxicas de ingestão de aminas biogênicas é de 10 mg/100 g de alimento, e para bebidas alcoólicas este valor diminui para 6 mg/100 g, devido a potencialização dos efeitos pela presença do etanol (HALÁSZ *et al.*, 1994).

Desta forma, a determinação e monitoramento de tiramina em vinhos é de grande relevância, já que não há uma regulamentação específica que estabelece um nível aceitável deste composto. O surgimento de novas metodologias para determinação de tiramina é de extrema importância para Indústria de Alimentos para estimular a legislação e o controle de qualidade de alimentos.

2.6 Tiramina

A tiramina ou 1-hidroxi-4-etilaminobenzeno é uma monoamina derivada da descarboxilação da tirosina pela ação da enzima tirosina descarboxilase e é degradada pela enzima monoaminaoxidase (MAO) (CONNIL *et al.*, 2002). É encontrada em tecidos de plantas e animais, também existindo naturalmente na maioria de alimentos fermentados como queijos (LÓPEZ, GÓMEZ e RUIZ, 2017; KÜÇÜK e TORUL, 2018), camarões (SAELAO *et al.*, 2018), iogurtes (YILMAZ e GÖKMEN, 2017), salsichas (MORATALLA *et al.*, 2017), cervejas (PRADENAS *et al.*, 2016), chucrutes (PEÑAS *et al.*, 2010), vinhos (WASYLKA *et al.*, 2018), entre outros. A estrutura química da tiramina é mostrada na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura do 1-hidroxi-4-etilaminobenzeno. Nome usual: Tiramina.



Fonte: Própria autora.

Por se tratar de uma amina biogênica, o consumo de alimentos que contenham uma grande quantidade de tiramina ou a deficiência do mecanismo natural de catabolismo pode acarretar o surgimento de doenças, como hipertensão e doenças cardíacas, pois estimula a liberação de catecolaminas como a dopamina, que atua no sistema nervoso central, e pode levar ao aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (CANTARINI *et al.*, 2004). Além disso, o álcool, presente no vinho tinto, é considerado um potencializador dos efeitos tóxicos da tiramina, uma vez que inibe a ação da enzima MAO que atua na metabolização da tiramina.

Pacientes em tratamento com drogas, como antidepressivos, medicamentos para o tratamento de doenças de Alzheimer e Parkinson, tuberculose, malária, síndrome do pânico e fobia podem ser sensíveis a baixas doses de tiramina pela inibição da enzima MAO (GLÓRIA, 2005; FISAR, 2016). Na Tabela 3 encontram-se descritos os principais efeitos tóxicos causados pela tiramina e em conjunto com outras aminas.

Tabela 3 - Efeitos tóxicos da tiramina.

Efeitos tóxicos	Aminas envolvidas	Sintomas
Intoxicação por tiramina	Tiramina	Dor de cabeça, febre, aumento da pressão sanguínea, vômito, transpiração, dilatação da pálpebra e pupila, salivação, lagrimação, respiração aumentada, palpitação e dispnéa
Intoxicação por tiramina e feniletilamina (Reação do queijo) ou crise hipertensiva	Tiramina e feniletilamina	Crise hipertensiva, dor de cabeça severa, hemorragia cerebral, seqüela neurológica, deficiência cardíaca, edema pulmonar, alterações na visão, palpitação, náusea, sudação, vômito, contração muscular, excitação, confusão mental, pressão sanguínea alta, febre e transpiração.

		Associada a pacientes medicados com MAOI ¹
Enxaqueca	Tiramina	Dor de cabeça pulsante e ataque de enxaqueca

1: Inibidor da enzima monoamina oxidase

Fonte: Adaptado GLÓRIA (2005).

A intoxicação se manifesta de maneira geral como crise hipertensiva, enxaquecas, problemas gástricos e intestinais e reações alérgicas. Segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, 2011), 15% da população é afetada por intoxicação pela ingestão de tiramina. E quando alimentos ricos em tiramina são consumidos, aproximadamente 30% dos indivíduos que sofrem de enxaqueca podem apresentar crise (GLÓRIA, 2005).

Não há uma legislação específica que regule a concentração de tiramina em alimentos e bebidas fermentadas, como vinhos tintos. Neste sentido, é muito importante o desenvolvimento de novos estudos e metodologias mais simples na tentativa de detectar e quantificar tiramina nessas bebidas. Ordóñez *et al.* (2017) determinaram aminas biogênicas em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com um detector de fluorescência e observaram que os vinhos tintos apresentaram maiores concentrações de tiramina que vinhos brancos. Além disso, as amostras de vinho tinto de qualidade padrão apresentaram o dobro da concentração de aminas biogênicas do que as amostras de vinho tinto de alta qualidade.

A maior presença de tiramina em vinhos tintos pode estar relacionada principalmente a incorporação de aminoácidos ao mosto durante o processo de maceração, pois a casca de uva permanece em contato direto com o mosto. O processo de prensagem, em vinhos tintos, é outra etapa que também podem contribuir para as maiores concentrações de aminas biogênicas. Além disso, a fermentação malolática não é muito realizada em vinhos brancos, e ela está relacionada também com a formação aminas biogênicas (GLÓRIA E VIEIRA, 2007; GARCÍA, TRIGUEROS E ESCRIBANO-BAILÓN, 2010; ORDÓÑEZ *et al.*, 2017).

Considerando que os vinhos tintos apresentam normalmente maiores concentrações de tiramina que os demais vinhos (ORDÓÑEZ *et al.*, 2017), é muito relevante o desenvolvimento de métodos sensíveis, seletivos e baratos para determinação de tiramina neste tipo de alimento, devido aos efeitos indesejáveis causados pela sua ingestão e tendo em vista que a maioria dos métodos utilizados

para detecção de tiramina são onerosos, demandam um grande tempo para preparação de amostras e realização de análises e necessitam de mão de obra especializada.

2.7 Determinação de tiramina em alimentos e bebidas

Inúmeras técnicas têm sido desenvolvidas para determinação de tiramina em diversos tipos amostras de alimentos, principalmente em fermentados como vinhos. A matriz complexa dos alimentos aumenta as dificuldades de análises de determinação e estudos de interferentes presentes nas amostras. Estas características devem ser levadas em consideração, e a obtenção de recuperações adequadas é extremamente importante.

As metodologias desenvolvidas para determinação analítica de tiramina em alimentos utilizam, na maioria dos casos, métodos cromatográficos. Uma variedade de métodos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em fase gasosa (CG), cromatografia a gasoso com espectrômetro de massa (CG-MS), eletroforese capilar (EC), sensores eletroanalíticos (SE) e sensores amperométricos (SA), entre outros, têm sido utilizados para determinação de aminas biogênicas de modo geral em alimentos (ORDÓÑEZ *et al.*, 2016).

A maioria destas metodologias empregam etapas de pré-tratamentos de amostras utilizando etapas de filtração, desgaseificação, adição de compostos, como soluções derivantes. A reação de derivatização é um dos principais tratamentos realizados em alimentos para determinação de tiramina, que tem como função transformar a tiramina através de uma reação química em um derivado com propriedades mais passíveis de serem determináveis. Consiste na reação do grupo amino com reagentes específicos, sendo que os mais utilizados nos últimos anos são o cloreto de dansila (Dns-Cl), o-ftaldeído (OPA) e cloreto de benzoíla (Ben-Cl) (PEÑA *et al.*, 2012).

Em análises cromatográficas, a derivatização pode ser realizada pré-coluna ou pós-coluna. Embora os métodos pré-coluna tenham sido mais utilizados, eles são mais suscetíveis ao efeito da matriz dos alimentos. Em vinhos, na derivatização pré-coluna os componentes da matriz, os produtos de reação lateral e o excesso de reagentes podem produzir picos de interferentes. Desta forma, pode ser necessário

uma etapa de limpeza pós-reação, especialmente com detectores de ultravioleta-visível (UV) e fluorescência (HERNÁNDEZ E SAURINA 2011).

Embora a tiramina tenha sido determinada em vinhos a muito tempo, novos avanços permitiram aumentar a precisão, simplicidade e sensibilidade dos métodos analíticos. Algumas técnicas utilizadas para a determinação de tiramina em alimentos e bebidas realizadas na última década, além dos limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), eficiência em percentual de recuperação (R) e reagentes de derivatização são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Técnicas para determinação de tiramina em amostra de alimentos e bebidas.

Alimento	Técnica	Derivatização	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)	R (%)	Referência
Peixe	CLAE com detector UV	Derivatização com Ben-Cl	0,011	0,029	99,05 - 103,48	Molaeia et al. (2020)
	CLAE com detector UV	Derivatização com Dns-Cl	0,016	0,053	94,8 - 97,9	Cao et al. (2019a)
	CL- MS com detector fluorescência	-	0,02	0,05	90,9 - 91,6	Ochi (2019)
	Amperometria - BSE	-	0,085	0,28	98,1 - 102	Apetrei e Apetrei (2015)
	CLAE com detector FLD	Derivatização com EAC	0,38*		100,38	Li et al. (2014)
	CL - MS com detector de fluorescência	Derivatização com Dns-Cl	0,12	0,45	90 - 91	Sagrati et al. (2012)
Queijo	Amperometria - BSE	-	0,097	Nc	97,1	Silva et al. (2019)
	Cronoamperometria - BSE	-	0,0027	Nc	93,44 - 99,61	Erdogan et al. (2018)
	VPD - SE	-	0,18	0,60	99,1 - 101,7	Küçük e Torul (2018)
	CLAP com detector UV	Derivatização com AQC e kit de reagente Waters AccQ.Fluor™	2,50	9,60	90 - 101	Mayer e Fiechter (2018)
	Amperometria - BSE		0,0066		95,5 - 96,9	López et al. (2017)
	CLAE com detector FLD	Derivatização com EAC	0,38*		94,98	Li et al. (2014)
iogurte	CLAE – FR com detector de PDA	Derivatização com Ben-Cl	4,01	5,00	95,5 - 111,9	Vieira et al. (2020)

	Amperometria - BSE	-	0,097	Nc	96,8	Silva <i>et al.</i> (2019a)
	EIE - AuNP-PANSA	-	0,005	Nc	97,7	Silva <i>et al.</i> (2019b)
	VPD utilizando (Q/fMWCNT/MGCE)		0,09	Nc	100,05	Raof <i>et al.</i> (2012a)
	Amperometria – ECV modificados com (MWCNT-AuNP) e quitosana	-	0,0078	Nc	92,1 - 109,3	Huang <i>et al.</i> (2011)
Chucrute	CLAE com detector de PDA	Derivatização com Ben-Cl	0,16	0,53	nc	Majcherczyk e Surówka (2019)
	Amperometria - BSE	-	0,07	Nc	96,07 - 103,42	Apetrei e Apetrei (2013)
Carne	CG - MS	Derivatização com IBCF	0,007	0,023	87	Wojnowski <i>et al.</i> (2019)
	CLAE com detector UV	Derivatização com Dns-Cl	0,11	0,35	91 - 92,2	Liu <i>et al.</i> (2018)
		Derivatização com Ben-Cl	0,25	0,83	89,8 - 91,2	
	CLAE com detector UV	Derivatização com cloreto de dabsil	0,96	3,21	96,50 - 94,06	Mey <i>et al.</i> (2012)
Cerveja	CLAE com detector UV	Derivatização com Dns-Cl	0,03	0,10	91,25 – 94,99	Anguloa <i>et al.</i> (2020)
	EIE - AuNP-PANSA	-	0,005	Nc	101,9	Silva <i>et al.</i> (2019b)
	VPD com (ITO / APTES / ErGO)	-	0,01*	Nc	101,3	Khan <i>et al.</i> (2018)
	CLAE com detector FLD	Derivatização com EAC	0,38*	Nc	99,53	Li <i>et al.</i> (2014)

Vinho	CLAE com detector UV	Derivatização com Dns-Cl	0,03	0,10	91,25 – 94,99	Anguloa <i>et al.</i> (2020)
	EIE - AuNP-PANSA	-	0,005	Nc	98,0	Silva <i>et al.</i> (2019b)
	Amperometria - BSE	-	0,097	Nc	93,1	Silva <i>et al.</i> (2019a)
	CG - MS	Derivatização com IBCF	0,009*	0,028*	84	Papageorgiou <i>et al.</i> (2018)
	CLAE com detector FLD	Derivatização com Dns-Cl	0,1	0,2		Tuberoso <i>et al.</i> (2018)
	CLAE com detector de PDA	Derivatização com FNBT	0,001	0,036	99-100	Jastrzebska <i>et al.</i> (2016)
		Derivatização com CNBT	0,008	0,03	99-100	
	CG - MS	Derivatização com IBCF	0,003	0,006	95-105	Wasyłka <i>et al.</i> (2016)
	CLAE com detector de PDA	Derivatização com Dns-Cl	0,06	0,20	90-92	Manetta <i>et al.</i> (2016)
	CLAE com detector FLD	Derivatização com Dns-Cl	0,03	0,10	96,97-98,25	Tuberoso <i>et al.</i> (2015)
	EC - MS	-	0,002	0,006	830-109	Daniel <i>et al.</i> (2015)
	Fotometria com detector de UV	-	0,37	0,55	95,5	Ginterová <i>et al.</i> (2012)
CLAE com detector UV	Derivatização com Dns-Cl	0,09	0,30	99,0	Pineda <i>et al.</i> (2012)	

-: não realizado; nc: não consta; *: (*10⁻³).

Fonte: Própria autora (2020).

Técnicas cromatográficas, como CL e CG, estão entre os métodos instrumentais mais importantes para a quantificação de tiramina em alimentos e bebidas. A utilização de CG – MS para determinação de tiramina permitiu obter ótimas sensibilidades, com limites de detecção na faixa de micro e nano gramas por litro (WASYLKA *et al.* 2016; PAPAGEORGIOU *et al.* 2018; WOJNOWSKI *et al.* 2019). Por outro lado, esse método assim como os demais métodos cromatográficos, geralmente demandam tempo e exigem habilidades específicas de manuseio. Outra desvantagem é a utilização, na maioria das metodologias, de solvente orgânicos, que além de apresentarem alto custo necessitam de cuidados no descarte para não serem agentes de poluição (PAPAGEORGIOU *et al.* 2018).

A utilização de sensores analíticos e biossensores são uma ótima alternativa aos métodos cromatográficos, pois não requerem a utilização de instrumentos sofisticados, e na maioria dos casos não precisam de procedimentos de preparação e derivatização de amostras, o que em geral diminui o custo e período de análise (ÖNAL, 2007). Além disso, em comparação a outros métodos instrumentais como os citados, a eletroanalítica destaca-se devido a suas propriedades analíticas vantajosas, tais como a alta sensibilidade e baixo custo. A sensibilidade dos sensores para determinação de tiramina em alimentos já pode ser comparada à das técnicas convencionais (KHAN *et al.* 2018).

Muitos estudos eletroanalíticos para detecção de tiramina em alimentos e bebidas têm sido realizados como mostra a Tabela 4. Biossensores utilizam o reconhecimento biológico como a especificidade de enzimas como uma alternativa para os métodos tradicionais. López *et al.* (2017) prepararam um biossensor eletroanalítico utilizando a enzima tirosinase para detecção de tiramina em queijos. Para isso, a enzima foi imobilizada por adsorção em eletrodos a base de fosfato de cálcio com glutaraldeído como agente reticulante. O processo de adsorção da enzima aumentou a sensibilidade da técnica.

Khan *et al.* (2018) desenvolveram um sensor eletroanalítico à base de óxido de grafeno reduzido (ErGO) ligado à superfície do eletrodo de óxido de índio-estanho (ITO) através de uma monocamada de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) (ITO / APTES / ErGO), para detecção de tiramina em amostras de urina, cerveja comercial e leite utilizando VPD. Neste estudo, o sensor desenvolvido obteve um limite de detecção de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, muito sensível para detectar tiramina em amostras de alimentos e comparável a limites de detecção obtidos para técnicas cromatográficas.

O desenvolvimento de um sensor eletroanalítico para a detecção de tiramina também foi realizado por Li *et al.* (2017a), utilizando um eletrodo de carbono impresso, modificado com 1-metil-4-mercaptopiridina e com eletrodeposição de nanopartículas de ouro. As análises foram realizadas utilizando VPD em amostras de leite e soro de leite e o limite de detecção obtido foi de $0,31 \mu\text{g L}^{-1}$.

Apesar da existência de estudos para o desenvolvimento de técnicas eletroanalíticas cada vez mais sensíveis, algumas inclusive com limites de detecção tão baixos que já podem ser comparados aos das técnicas tradicionais, o que permite a utilização na detecção em amostras de alimentos, o processo de modificação da superfície de eletrodos e a utilização de enzimas aumentam o tempo de preparação e execução de análise e principalmente o custo do processo. Uma das alternativas para empregar a eletroanalítica sem aumento de custo e tempo seria desenvolver uma nova metodologia para detecção de tiramina sem o processo de modificação ou utilização de enzima, buscando utilizar eletrodos preparados à partir de materiais de baixo custo, como os eletrodos de carbono de grafite de lapiseira (ECGL).

2.8 Métodos eletroanalíticos

A elaboração de procedimentos analíticos altamente sensíveis e simples para determinação de contaminantes é extremamente importante na segurança de alimentos e análises ambientais. A popularização e o aperfeiçoamento das técnicas eletroanalíticas possibilitaram seu uso e a aplicação têm se tornado uma excelente alternativa para a identificação e quantificação de diversos compostos químicos em alimentos (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003; RAPINI e MARRAZZA, 2017). Uma das principais vantagens da eletroanalítica é a possibilidade de realizar a medida diretamente na amostra, sem a necessidade de pré-tratamentos complexos ou purificação. Estas vantagens aliadas ao curto tempo de realização da análise e ao baixo custo quando comparada às técnicas cromatográficas e espectroscópicas, fizeram com que os métodos eletroanalíticos sejam cada vez mais utilizados.

Na eletroanalítica, as técnicas voltamétricas envolvem reações com transferência de elétrons. Neste processo, as reações químicas geram respostas mensuráveis como corrente e potencial, e os sinais são medidos a partir das reações que ocorrem na interface eletrodo/solução. Estas propriedades elétricas podem ser relacionadas de forma direta com a concentração do analito. Assim, a detecção é

realizada com base nas propriedades do analito e nas especificidades da técnica utilizada. Através das técnicas voltamétricas é possível obter informações quantitativas e qualitativas de uma espécie química a partir do registro de curvas potencial-corrente (WANG, 1985).

Dentre as técnicas voltamétricas, a Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) envolvem a aplicação de pulsos de potencial enquanto a Voltametria Cíclica (VC) envolve a varredura através de uma rampa de potencial com o tempo na forma triangular (sentido direto e inverso).

A voltametria cíclica (VC) geralmente é utilizada para analisar a reprodutibilidade de eletrodos, para observar o comportamento de reações químicas (como a cinética), para estudo de formação e caracterização de filmes poliméricos e é a técnica mais utilizada para a obtenção de informações qualitativas sobre as propriedades e características dos processos eletroquímicos. Alves *et al.* (2018) utilizaram VC para modificação de eletrodos de carbono grafite com 2-hidroxibenzamida. Alves *et al.* (2017) também utilizaram VC para modificação eletroquímica de ECGL com material polimérico derivado do ácido 4-mercaptobenzóico. As vantagens da voltametria cíclica melhoraram quando as técnicas de pulso foram introduzidas, pois a partir delas foi possível obter informações quantitativas do analito de interesse.

Na voltametria de pulso diferencial (VPD), se aplica potenciais de pulsos não constantes, mas de igual amplitude em uma rampa de potencial linear, e a corrente é medida antes do pulso ser aplicado e após o final do pulso. Então, é realizada a diferenciação das duas correntes obtendo-se o voltamograma de pulso diferencial, onde a resposta de corrente é diretamente proporcional à concentração do analito. Desta forma, com o passar do tempo do primeiro pulso, a contribuição da chamada corrente capacitiva (gerada por processos na superfície do eletrodo chamados de dupla camada elétrica, que geram um capacitor) é diminuída, enquanto a contribuição da corrente faradaica (responsável pela transferência de elétrons) é considerada. A diferenciação entre as duas no final do pulso e no início do pulso permite um aumento da sensibilidade relativa à maior contribuição da corrente de interesse, a faradaica, e/ou a diminuição na corrente de carga não-faradaica (SKOOG *et al.*, 2005).

A voltametria de onda quadrada (VOQ) também é bastante utilizada para determinação de compostos em alimentos, com vantagens de permitir utilizar altas velocidades e conseguir elevada sensibilidade. Na técnica, a variação do potencial é

realizada na forma de escadas considerando uma variação de potenciais para valores negativos e o sinal é obtido pela superposição da sequência de pulsos. Para uma reação reversível de redução, o tamanho do pulso é suficientemente elevado para que a oxidação do produto formado no pulso direto ocorra durante o pulso inverso. Assim, as correntes produzidas no sentido direto e inverso são somadas e dão origem à corrente resultante, e o pico de corrente resultante é proporcional à concentração do analito. Em virtude da velocidade, a medida de corrente realizada antes e após a aplicação dos pulso e a contribuição da corrente inversa, a técnica atinge baixos limites de detecção (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003; SKOOG et al., 2005; HOYOS-ARBELÁEZ, VÁZQUEZ e CONTRERAS-CALDERÓN, 2017).

A escolha da técnica e do material do eletrodo de trabalho está diretamente relacionada às características químicas do analito de interesse. Na escolha do material para construção do eletrodo, é importante observar o intervalo de potencial de cada eletrodo, bem como a geometria do eletrodo, a condutividade elétrica, a reprodutibilidade da superfície, as propriedades mecânicas, o custo de fabricação, a disponibilidade e a toxicidade (MARTINS et al., 2017).

Eletrodos de diversos materiais são utilizados para as técnicas voltamétricas, como eletrodos de platina, ouro, prata e diamante dopado com boro, entre outros. Os eletrodos baseados em carbono, em particular, oferecem inúmeras vantagens, pois são de baixo custo e quimicamente inertes (VELOSO, FULTHORPE E KERMAN, 2013). Dentre os eletrodos de carbono, recentemente eletrodos de grafite de lapiseira (ECGL) vêm apresentando vantagem, como alta reprodutibilidade, sensibilidade e, principalmente, são mais baratos e mais acessíveis. OS ECGL não são eletrodos comerciais, entretanto apresentaram excelentes propriedades eletroquímicas observadas em trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, além disso, podem ser utilizados como descartáveis (ALVES *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2019). Portanto, conciliar a eletroquímica com a utilização de eletrodos de boa qualidade e de baixo custo como os ECGL para determinação de tiramina em vinhos tintos é uma maneira promissora de desenvolver um novo dispositivo com diversas vantagens para o controle de alimentos.

CAPÍTULO II

**Desenvolvimento do sensor
eletroanalítico de baixo custo, visando
a determinação de tiramina**

1 INTRODUÇÃO

As aminas biogênicas são bases orgânicas com baixo peso molecular formadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos precursores por meio de atividade enzimática ou por bactérias ativas que possuem a descarboxilase (SANTOS, 1996). As aminas biogênicas podem estar presentes naturalmente em alimentos além de muitos fatores influenciarem na sua produção. Fatores físico-químicos dos alimentos (pH e temperatura), as condições de armazenamento e distribuição do alimento, a presença de microrganismos sintetizadores da enzima descarboxilase, a qualidade da matéria-prima e a disponibilidade de aminoácidos livres (SUZZI e TORRIANI, 2015). A histamina, tiramina, cadaverina, 2-feniletilamina, espermina, espermidina, putrescina, triptamina e agmatina são as mais comuns estudadas em alimentos (NAILA *et al.* 2010).

Apesar de algumas aminas biogênicas serem benéficas aos seres humanos, atuando como antioxidantes e estimulante do sistema nervoso, grandes quantidades delas podem ser perigosas para a saúde humana. A tiramina é produzida pela descarboxilação da tirosina. É uma das aminas biogênicas produzidas como produto de degradação resultante da atividade microbiológica, e é encontrada em alimentos e bebidas fermentadas, como nos vinhos. Em estudos, a tiramina em altas concentrações está envolvida com crise hipertensiva, diarreia, problemas intestinais, intoxicação, entre outros, por isso, é importante a determinação deste composto em alimentos (YEN e HSIEH, 1997; SHIMAZU e MIKLYA, 2004; GLÓRIA, 2005).

A tiramina já foi determinada por várias técnicas, como cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (LAPAINIS *et al.*, 2007; GIANOTTI *et al.*, 2008; MANETTA *et al.*, 2016; WOJNOWSKI *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2020). Embora estes métodos ofereçam boa seletividade, geralmente requerem pessoal especializado, algumas metodologias envolvem complexas etapas de pré-tratamento o que eleva o custo e tempo de análise. Por isso, o desenvolvimento de metodologias simples e de baixo custo para determinação de tiramina em alimentos é muito importante.

Em comparação aos métodos tradicionais os sensores eletroanalíticos são amplamente utilizados como alternativa para detecção de diversas amostras devido a sensibilidade, simplicidade e portabilidade (LABIB *et al.*, 2016). Além disso, os métodos eletroanalíticos provaram ser eficientes na determinação direta ou indireta

de tiramina (RAOOF *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2018; KÜÇÜK e TORUL 2018). A facilidade nos procedimentos faz com que a determinação de aminas biogênicas, principalmente as que apresentam eletroatividade, possam ser determinadas diretamente sobre a superfície do eletrodo. O eletrodo de trabalho é um dos componentes mais importante no sistema eletroquímico. Ele é utilizado como meio para a transferência de elétrons, ou seja, a transferência de elétrons ocorre na interfase do eletrodo de trabalho. Estes eletrodos podem ser construídos a partir de diversos materiais como ouro, platina, diamante dopado com boro, e materiais de baixo custo como o carbono (CAO *et al.*, 2019a; CARDOSO *et al.*, 2020).

Dentre os eletrodos de carbono, os eletrodos de carbono de grafite de lapiseira (ECGL) apresentam inúmeras vantagens, são de fácil aquisição, apresentam baixo custo e excelentes propriedades eletroquímicas (ALVES *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2019). Desta forma conciliar eletroanalítica com utilização de eletrodos construídos com materiais de baixo custo com os ECGL para determinação de tiramina é uma excelente alternativa aos métodos de determinação convencionais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sensor eletroanalítico para determinação direta e simples de tiramina em amostras de vinho utilizando os ECGL e as técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de onda Quadrada (VOQ), bem como realizar a validação intralaboratorial para as metodologias propostas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos eletroquímicos foram realizados no Laboratório de Eletroanalítica Aplicada à Biotecnologia e Engenharia de Alimentos (LEABE) da Universidade Federal de Uberlândia campus Patos de Minas.

2.1 Amostras, reagentes e soluções

As soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida por osmose reversa a partir de um equipamento de modelo 0550 LX da Gehaka para os experimentos eletroquímicos. Foram preparadas soluções aquosas padrões de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato salino (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, soluções contendo apenas o eletrólito suporte de tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, soluções de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão *Britton-Robinson* (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, soluções aquosas de ferrocianeto de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, soluções aquosas de cloreto de hexaaminorutênio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ soluções de sacarose, glicose, frutose, histamina, ácido gálico e catequina $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, e solução alcoólica 14% também em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7.

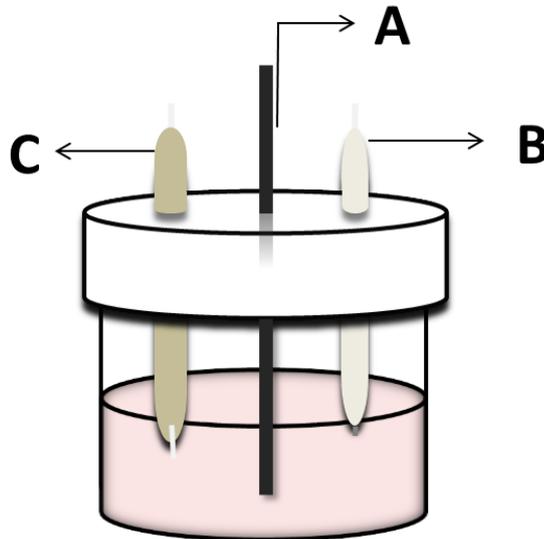
As amostras utilizadas foram de vinho tinto, sendo um de mesa suave elaborado com uvas americanas (não especificadas no rótulo) e outro vinho fino elaborado com uvas Syrah da safra de inverno de 2017. As amostras de vinho tinto comercial foram adquiridas no comércio local em Patos de Minas, MG. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Aparato experimental

2.2.1 Montagem da célula eletroquímica

Os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica convencional de compartimento único (Figura 6), que foi limpa quimicamente com etanol e lavada com abundância de água deionizada antes de cada experimento.

Figura 6 - Esquema da célula eletroquímica utilizada para os experimentos com eletrodos de carbono de grafite de lapiseira (ECGL) como trabalho (A), eletrodos de prata e cloreto de prata como referência (B) e eletrodos de platina como auxiliar (C).



Fonte: Própria autora (2020).

O eletrodo de prata/cloreto de prata em solução de cloreto de potássio $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{Ag/AgCl/KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) foi utilizado como referência e o eletrodo de platina foi utilizado como auxiliar. Ambos foram limpos com abundância com água deionizada antes de serem utilizados. Grafites de lapiseira (minas de grafite) $0,9 \text{ mm}$ de diâmetro da marca Pentel®, dureza HB, foram utilizados como eletrodos de trabalho. A cada experimento, 1 cm do eletrodo foi imerso em solução resultando em uma área geométrica utilizada de $0,2891 \text{ cm}^2$ e este padrão foi utilizado em todos experimentos eletroquímicos.

2.2.2 Preparo e limpeza dos eletrodos

A limpeza dos ECGL é bastante simples e consiste na remoção da parafina superficial que é adicionada durante a fabricação do grafite. Neste trabalho a metodologia de limpeza foi adaptada, sendo apenas realizada mecanicamente. Para isso, antes de cada experimento os ECGL foram lixados com lixas d'água n° 400. Após cada etapa de limpeza realizada, foram lavados com água deionizada, levados a banho de ultrassom por 20 minutos para remoção de impurezas residuais e foram secos usando uma corrente de $\text{N}_2 (\text{g})$ (ALVES et al., 2017).

O eletrodo de referência foi preparado com um fio de prata coberto com um filme de cloreto de prata eletroquimicamente depositado e foi imerso em solução de cloreto de potássio $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ para estabilização do potencial de referência conhecido de $0,199 \text{ V}$ (SKOOG et al, 2005) e o eletrodo auxiliar foi composto por um fio de platina ligado a um contato elétrico. Os eletrodos de referência e auxiliar foram lavados com abundância de água deionizada antes de cada experimento. Para verificar a limpeza e padronização dos ECGL foram realizadas medidas utilizando soluções aquosas de ferrocianeto de potássio e cloreto hexaaminorutênio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, ambas contendo cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando Voltametria Cíclica (VC) e solução do “branco” (eletrólito suporte) tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 utilizando Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ).

2.2.3 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato PGSTAT101 da Metrohm Autolab acoplado ao software Nova versão 2.1.2. Após o procedimento de preparo de soluções, limpeza da célula eletroquímica e dos eletrodos, a célula foi montada com os três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) e as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando inicialmente a técnica de voltametria cíclica (VC) para avaliar a reprodutibilidade dos eletrodos que eram trocados a cada medida. Posteriormente, as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ) foram utilizadas para detecção de tiramina. Estudos referentes à determinação de tiramina também foram realizados utilizando a técnica de VC. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

2.2 Condições experimentais para determinação eletroquímica de tiramina

A obtenção das melhores condições para determinação da tiramina foi avaliada observando o perfil de oxidação da tiramina considerando a posição do pico, a intensidade e largura de meia altura. Foi avaliada a concentração das soluções de tampão PBS pH 7, que foram analisadas para os valores de $0,001$; $0,005$; $0,01$; $0,05$; $0,1$; $0,5$; 1 mol L^{-1} em um intervalo de potencial de $0,3$ a $1,0 \text{ V}$.

2.3 Estudo do mecanismo de reação de oxidação da tiramina sobre os ECGL

O estudo do mecanismo de reação de oxidação da tiramina foi realizado para determinar a reversibilidade, o número de elétrons envolvidos e se a cinética da reação é controlada pela adsorção ou difusão. O estudo de pH foi realizado para obter uma relação entre o número elétrons e prótons envolvidos na reação de oxidação da tiramina, para isso, foram realizadas determinação utilizando VPD em solução de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão *Britton-Robinson* (BR) 0,04 mol L⁻¹ variando o pH na faixa de 2 à 12 e a relação foi obtida por meio da aplicação da equação de Nernst (GALUS, 1994).

A reversibilidade foi avaliada analisando os perfis das curvas diretas e reversas de determinação da tiramina utilizando a técnica VOQ e também foi avaliado o perfil de oxidação por VC. A VC também foi utilizada para avaliar se a cinética da reação é controlada pela adsorção ou difusão. O número de elétrons envolvidos foi calculado utilizando a equação de Laviron para sistemas irreversíveis e pico anódico (Equação 1) variando a velocidade de varredura de 5 a 1000 mV s⁻¹ para a VC (Laviron, 1979). O número de elétrons envolvidos na reação de oxidação da tiramina também foi determinado por VOQ utilizando a Equação de Lovric (Equação 2), a variação da frequência foi realizada na faixa de 2 a 30 s⁻¹ (Komorsky-Lovric, 1998).

$$E_p = \left(\frac{2,303RT}{(1-\alpha)nF} \right) \log v \quad (1)$$

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log f} = - \frac{2,3RT}{\alpha nF} \quad (2)$$

Para ambas as equações o E_p é o potencial de pico, R a constante dos gases, T é a temperatura, α é o coeficiente de transferência eletrônica, n o número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica e F a constante de Faraday, para Equação 1 v é a velocidade de varredura de potencial, para Equação 2 f é a frequência de aplicação dos pulsos de potencial.

2.4 Otimização da técnica de voltametria de pulso diferencial

O tampão PBS foi utilizado para a otimização da técnica de VPD, o pH 7 foi definido para os experimentos e a melhor concentração foi selecionada foi de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, de acordo com estudos das melhores condições experimentais para a determinação de tiramina. Foi realizada a otimização dos parâmetros de tempo de duração do pulso de potencial, amplitude de pulso, incremento de potencial e intervalo de tempo para a técnica de VPD. A escolha de cada parâmetro foi realizada conforme a avaliação em relação ao valor máximo de pico de corrente que determina a sensibilidade e a mínima largura de meia altura que determina a seletividade. Para isso, foi utilizada uma solução padrão de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato salino (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 para se obter as melhores respostas frente a variação dos parâmetros individualmente, mantendo-se fixo os demais, exceto o incremento de potencial e intervalo de tempo que foram avaliados concomitantemente.

Os valores de tempo de duração do pulso de potencial foram variados de 10 a 100 ms, amplitude de pulso de 1 a 60 mV, incremento de potencial de 1 a 10 mV em intervalo de tempo fixo de 0,5 segundos. Definida a melhor velocidade de varredura, alterou-se o intervalo de tempo de 0,0625 a 0,625 s, e os parâmetros de incremento de potencial e intervalo de tempo foram avaliados juntamente para se obter a velocidade de varredura otimizada.

2.5 Otimização da técnica de voltametria de onda quadrada

Utilizando as melhores condições de detecção da tiramina (pH e concentração do tampão PBS) foi realizada a otimização dos parâmetros de detecção para a técnica de VOQ também conforme a avaliação em relação ao valor máximo de pico de corrente (sensibilidade) e a mínima meia altura (seletividade). Os parâmetros otimizados foram amplitude de potencial, a frequência de aplicação dos pulsos e o incremento de potencial. Nesta técnica foi utilizada uma solução padrão de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato salino (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 para se obter as melhores respostas frente aos parâmetros específicos presentes em cada *setup* e cada parâmetro foi avaliado individualmente, mantendo-se os demais fixos. Os valores de incremento de potencial foram variados de 1 a 10 mV, a amplitude de pulso de 1 a 75 mV e frequência de 2 a 25 s^{-1} .

2.6 Validação analítica

Para demonstrar que o método analítico de determinação de tiramina é aceitável foi realizada a validação intralaboratorial realizando estudos de linearidade, faixa linear, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão, robustez e especificidade.

2.6.1 Linearidade e faixa linear

Após a otimização de todos os parâmetros das técnicas de VPD e VOQ e estudo da oxidação da tiramina sobre os ECGL foram construídas curvas analíticas (ou curvas de calibração) em triplicata pelo método de adição de solução padrão de tiramina (SKOOG et al, 2005). A faixa linear foi definida de acordo com o mínimo e o máximo de corrente em que as curvas perderam a linearidade e foram calculados os coeficientes de determinação ou linearidade.

2.6.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (também chamado de limite inferior de detecção) é a menor quantidade de analito que é “significativamente diferente de um branco”, ou seja, é a menor quantidade mensurável que pode ser detectada, mas não necessariamente detectada com um grau de incerteza aceitável, normalmente 95%. Já o limite de quantificação de um método de medição é a menor quantidade mensura presente na amostra que pode ser quantificada com um grau de incerteza aceitável (PRICHARD e BARWICK, 2008).

Utilizando os dados das curvas de calibração foram calculados os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ), que foram obtidos pelo desvio padrão da média aritmética da corrente medida no potencial de oxidação da tiramina de dez voltogramas do branco para cada técnica e pela inclinação da curva de calibração de acordo com as Equações 3 e 4:

$$LD = \frac{3s_b}{a} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{10s_b}{a} \quad (4)$$

Onde s_b é o desvio padrão da média aritmética das correntes dos voltamogramas dos brancos e a é o coeficiente angular da curva de calibração (HARRIS, 2008).

2.6.3 Precisão

A precisão é a reprodutibilidade de um resultado, assim, a precisão das metodologias desenvolvidas para determinação de tiramina de acordo com parâmetros escolhidos para cada técnica foi avaliada por repetidas medidas independentes de determinação de tiramina em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7, utilizando os ECGL. Foram realizadas medidas intradia (mesmo dia) nas concentrações de 10, 50 e 90 µmol L⁻¹, medidas interdia (3 dias diferentes) na concentração de 50 µmol L⁻¹, medidas utilizando diferentes potenciostatos (Metrohm Autolab 101 N, Metrohm Autolab 204 N e Metrohm µAutolab) na concentração de 50 µmol L⁻¹ e medidas realizadas por operadores diferentes (3 operadores) na concentração de 50 µmol L⁻¹. Todas as medidas foram realizadas com $n = 10$ e foram calculados os percentuais do desvio padrão relativo (%) DPR ou também conhecido como coeficiente de variação, dados pela Equação 5 (HARRIS, 2008), para cada caso e técnica.

$$(\%) \text{ DPR} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (5)$$

O termo \bar{x} corresponde à média das correntes de pico e s o desvio padrão das medidas das correntes de pico.

2.6.4 Exatidão

A exatidão dos métodos propostos para VPD e VOQ também foi calculada, utilizando as medidas de recuperação nas amostras de vinho tinto, ou seja, pela contaminação proposital com 2,5 µmol L⁻¹ de tiramina nas amostras. A exatidão representa o grau de concordância entre os valores obtidos pelas metodologias e os valores reais, expressa pelo parâmetro %BIAS, calculado pela Equação 6.

$$\%BIAS = \frac{\bar{X} - X_0}{X_0} \times 100 \quad (6)$$

Onde \bar{X} é o valor da média das concentrações recuperadas e X_0 é o valor da concentração adicionada (PRICHARD e BARWICK, 2007).

2.6.5 Robustez

A robustez das metodologias foi avaliada realizando a detecção de tiramina na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ variando os métodos de limpeza dos ECGL (somente polindo, polindo e um cíclico em solução aquosa de ácido sulfúrico usando VC, polindo e uma varredura em solução aquosa de ácido sulfúrico usando cronoamperometria), variando o tempo de equilíbrio para estabilização da dupla camada elétrica (0, 5, 10, 15, 20 e 25 s) e variando a temperatura dos experimentos (10, 15, 20, 25 e 30°C). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e foram calculados os (%) DPR e intervalos de confiança (IC).

2.6.6 Especificidade

A especificidade das metodologias foi realizada através de estudo de alguns interferentes que podem estar presentes nos vinhos tintos, que podem ser consumidos e formados durante o processo de vinificação, as concentrações utilizadas neste estudo foram maiores que as normalmente encontradas em vinhos. A resposta eletroanalítica da tiramina (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi analisada na presença de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de frutose, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sacarose dissociada, 0,037 mol L^{-1} de álcool etílico, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sacarose, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de histamina, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido gálico, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de catequina e na presença de todos os interferentes associados utilizando as técnicas otimizadas de VPD e VOQ. Para cada medida foram calculados os (%) DPR e intervalos de confiança (IC).

2.7 Determinação eletroanalítica da tiramina e recuperação em amostra de vinho tinto

A determinação eletroanalítica de tiramina nas amostras de vinho tinto foi realizada utilizando as técnicas otimizadas de VPD e VOQ. Para isso, as amostras

foram diluídas de 1:40 em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7 e medidas foram realizadas apenas nas amostras e após sucessivas adições de solução padrão de tiramina 1 mmol L⁻¹, para construção das curvas de adição-padrão com volume variável. Também foram realizados testes utilizando volumes constantes, ou seja, preparando diferentes soluções para construção da curva de adição-padrão. A partir do aumento de sinal de corrente, foi deduzido o quanto de tiramina estava presente nas amostras e nenhum processo de pré-tratamento foi realizado (HARRIS, 2008).

As eficiências dos métodos de quantificação de tiramina foram avaliadas pela adição e recuperação utilizando as curvas de adição-padrão, para isso, uma concentração conhecida de solução padrão de tiramina 2,5 μmol L⁻¹ foi adicionada as amostras e foram calculadas as recuperações de acordo com Equação 7.

$$\%R = \frac{[\text{Tiramina}]_{\text{recuperada}}}{[\text{Tiramina}]_{\text{adicionada}}} \times 100 \quad (7)$$

Onde $[\text{Tiramina}]_{\text{encontrada}}$ é a concentração de tiramina calculada a partir da equação da curva de adição-padrão após a fortificação das amostras e $[\text{Tiramina}]_{\text{adicionada}}$ é a concentração adicionada intencionalmente nas amostras (real adicionado) (HARRIS, 2008).

2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Tukey para avaliar a variabilidade entre as metodologias, também foi calculado o intervalo de confiança (IC) com 95% de confiança com base no teste t-Student (Equação 8).

$$(\text{IC}) = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

Onde IC é o intervalo de confiança, \bar{x} corresponde à média das correntes de pico, s o desvio padrão das medidas das correntes de pico, n é o número de observações e t é o valor do teste de t-Student para 95% de confiança, com valor tabelado (grau de liberdade igual a 10) de 2,228 e (grau de liberdade de 3) de 3,182

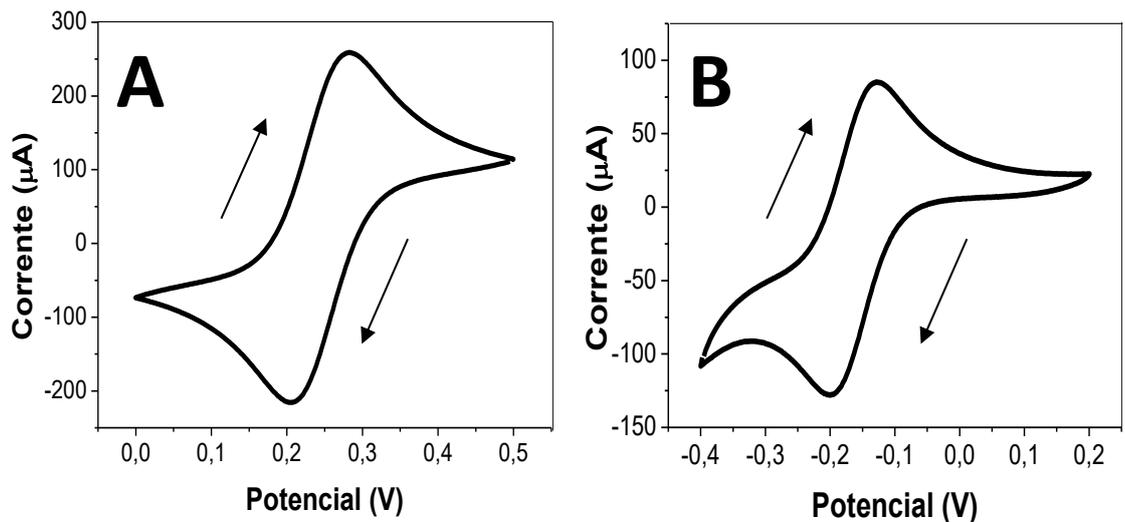
(HARRIS, 2008). O (IC) com 95% de confiança foi calculado para todas as medidas de validação das metodologias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Limpeza e preparo dos eletrodos de minas de grafite

Anteriormente a cada análise, foi realizada a limpeza dos eletrodos ECGL com o objetivo de remover a parafina que é comumente adicionada ao material do eletrodo e que pode vir a interferir na resposta e na obtenção de padrões eletroquímicos (Figura 7). Os eletrodos devem apresentar respostas semelhantes antes de cada experimento para garantir a reprodutibilidade do sistema. Para isso, os padrões eletroquímicos foram obtidos empregando voltametria cíclica (VC) em uma sonda aniônica e catiônica.

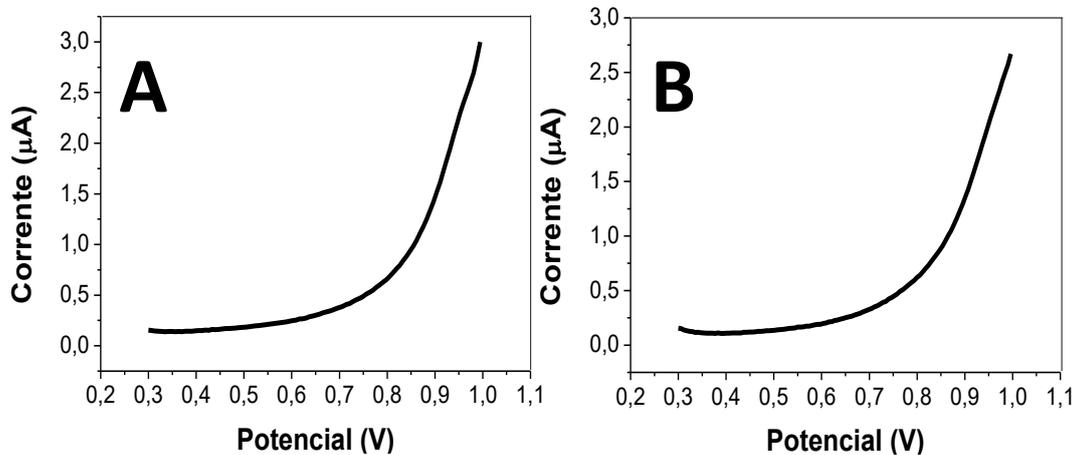
Figura 7 - Voltamogramas cíclicos obtidos após a limpeza dos ECGL em solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo (A) ferrocianeto de potássio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) cloreto de hexaaminorutênio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ à 100 mV s^{-1} .



Fonte: Própria autora.

As medidas realizadas sobre os eletrodos limpos em solução de ferrocianeto de potássio e cloreto de hexaaminorutênio ambos contendo cloreto de potássio, foram utilizadas como um indicativo de qualidade da resposta eletroquímica. A diferença entre picos anódicos e catódicos obtidos foram menores que 100 mV sendo este um indicativo de qualidade e limpeza adequada das superfícies dos eletrodos. Após esta constatação, voltamogramas foram obtidos em solução de eletrólito suporte, tampão PBS pH 7, utilizando VPD e VOQ, (Figura 8).

Figura 8 - Voltamogramas de (A) pulso diferencial (duração de pulso de 60 ms, amplitude 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1}) e (B) onda quadrada (amplitude de 50 mV e velocidade de $16,14 \text{ mV s}^{-1}$) em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 obtidos utilizando ECGL após a limpeza.



Fonte: Própria autora.

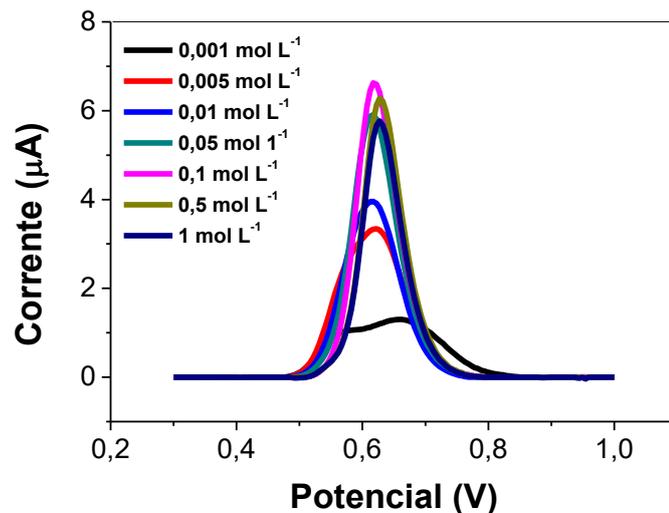
Na faixa de estudo para oxidação da TIM, observou-se a ausência de picos de oxidação e redução de interferentes que poderiam estar presentes nos eletrodos e/ou solução do eletrólito suporte. Estes padrões foram utilizados para todos os experimentos para garantir a limpeza dos eletrodos e a reprodutibilidade dos experimentos. Além disso, respostas padrões (ferrocianeto de potássio, cloreto de hexaaminorutênio e tampão) foram escolhidas para que todas as respostas provenientes de outros eletrodos em outros dias de análise pudessem ser sobrepostas para comparação. O intervalo de varredura de potencial para os experimentos foi de 0,3 a 1,0 V, e a escolha foi realizada com base na região de potencial de pico de oxidação da tiramina sobre os ECGL.

3.2 Estudo das melhores condições experimentais para determinação de tiramina

As melhores condições experimentais para detecção de tiramina utilizando os ECGL foram analisadas variando a concentração do eletrólito suporte (tampão PBS). O pH 7 foi estabelecido para os experimentos por ser um valor próximo ao fisiológico, além disso, boas respostas de corrente foram observadas. Khan *et al.* (2018) utilizaram o valor de pH 7 para detecção eletroanalítica de tiramina em amostras de cerveja, leite e urina humana.

O estudo da concentração do tampão PBS pH de 7,0 (Figura 9) foi realizado para observar a resposta de oxidação da tiramina com a mudança da força iônica do meio.

Figura 9 - Voltamogramas de pulso diferencial de oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando ECGL para concentrações de $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ (-----); $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ (-----); $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (-----); $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (-----); $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (-----); $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (-----) e 1 mol L^{-1} (-----) de tampão PBS pH 7, amplitude de 50 mV e velocidade de 10 mV s^{-1} .



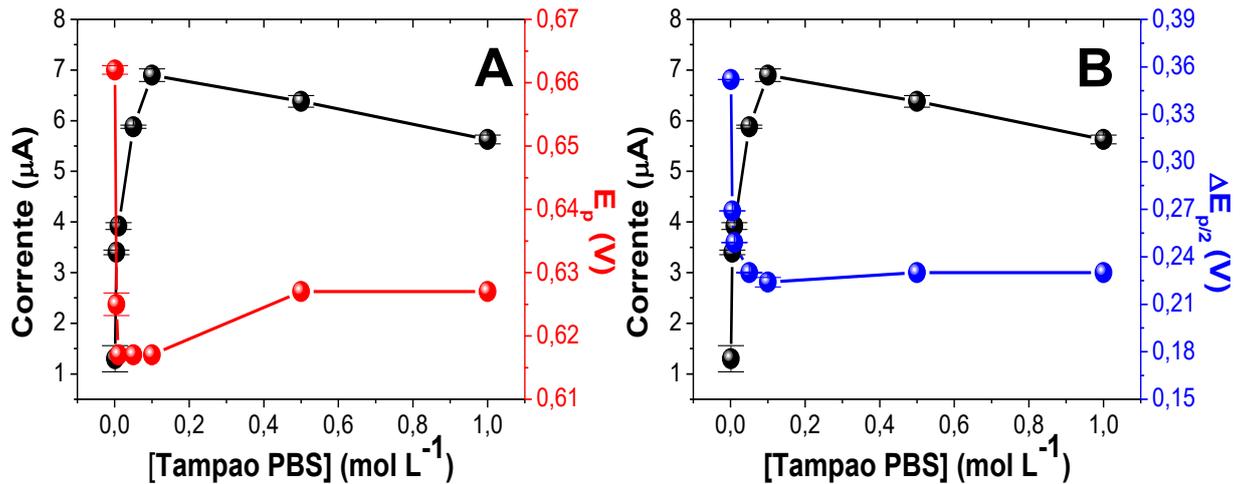
Fonte: Própria autora.

Soluções tampão em baixas concentrações não são práticas, pois não apresentam robustez. Pequenas variações no meio podem variar drasticamente o valor de pH e o tampão perde, assim, sua eficiência. Com baixa força iônica, não há garantias da minimização da alteração do coeficiente de atividade da tiramina e nem de termos apenas o controle difusional, mas também podendo ter o efeito de migração entre eletrodo/solução. Mesmo assim, o experimento foi feito para avaliarmos as melhores respostas de corrente esperando que concentrações elevadas do tampão pudessem fornecer as melhores respostas, pois, o aumento da concentração eleva a condutividade de solução.

A maior intensidade de corrente observada variando as concentrações do tampão PBS pH 7 foi para concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para a menor concentração estudada ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$), pode-se observar nitidamente que o voltamograma apresenta dois picos de oxidação da tiramina em regiões levemente espaçadas. Com aumento da força iônica do meio, os dois picos se sobrepõem na mesma região de

potencial. Além de analisar a intensidade de corrente é importante observar o potencial de pico (E_p) e a variação da largura de meia altura ($\Delta E_{p/2}$) (Figura 10).

Figura 10 - Perfis (A) de (•) corrente e (•) potencial de pico (E_p) e (B) (•) corrente e (•) variação da largura de meia altura do pico ($\Delta E_{p/2}$) da oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre ECGL, variando as concentrações de tampão PBS de $0,001$; $0,005$; $0,01$; $0,05$; $0,1$; $0,5$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7.



Fonte: Própria autora.

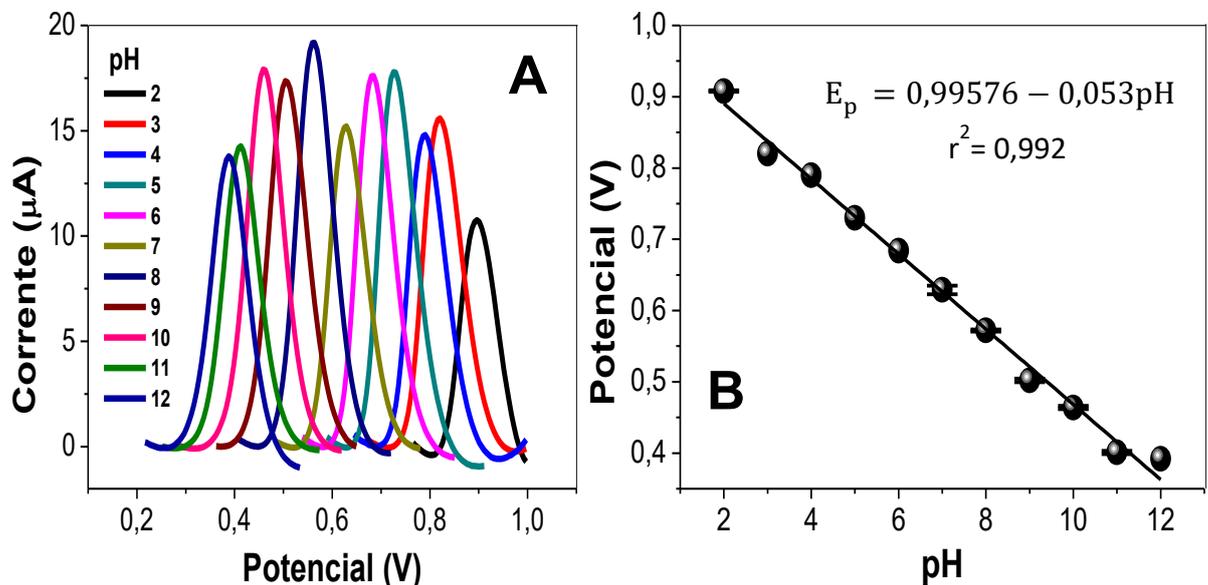
Na Figura 10 (A), observa-se uma diminuição do potencial de pico até exatamente a concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ que permanece praticamente constante até $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Nesta concentração, o sinal de corrente é máximo o que indica que a tiramina está mais acessível para oxidação devido a condutividade da solução e o menor potencial de pico indica a maior facilidade que isso ocorre. Após a concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, o sinal de corrente passa a diminuir e o potencial de pico a aumentar.

A mesma situação ocorre na Figura 10 (B), onde na concentração do tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tem o maior sinal de corrente e menor variação da largura de meia altura. Desta forma, com boa força iônica a concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhida para os experimentos seguintes. Zhu *et al.* (2019) compararam o desempenho de eletrodo modificado com grafeno-ciclodextrina para determinação de tiramina, no estudo utilizando VPD e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 como eletrólito suporte. O mesmo eletrólito suporte foi utilizado por Khan *et al.* (2018) no estudo de determinação de tiramina utilizando eletrodo de óxido de índio-estanho modificado.

3.3 Estudo do mecanismo de oxidação da tiramina sobre os eletrodos de minas de grafite

No estudo do mecanismo de oxidação da tiramina sobre os eletrodos de minas de grafite avaliou-se inicialmente a variação do pH do meio. Os voltamogramas obtidos pela variação do pH e a relação de potencial de pico *versus* pH do meio para oxidação da tiramina sobre os eletrodos de minas de grafite é mostrado na Figura 11.

Figura 11 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial e (B) relação de potencial de pico *versus* pH do meio para a oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando VPD e ECGL em soluções de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH, 10 mV s^{-1} .



Fonte: Própria autora.

É possível observar na Figura 11 que o aumento do valor de pH promoveu uma alteração do potencial de pico para valores de potencial menos anódico. Este deslocamento indica que a transferência eletrônica depende do pH do meio e mostra uma facilidade (menor energia necessária) para se promover a oxidação do composto. Além disso, é evidente que há uma relação direta entre potencial e pH, ou seja, a oxidação é dependente do pH. Este deslocamento indica que a transferência eletrônica depende do pH do meio e a linearidade entre pH 2 e 12 caracteriza que a reação de oxidação da tiramina envolveu a transferência de prótons.

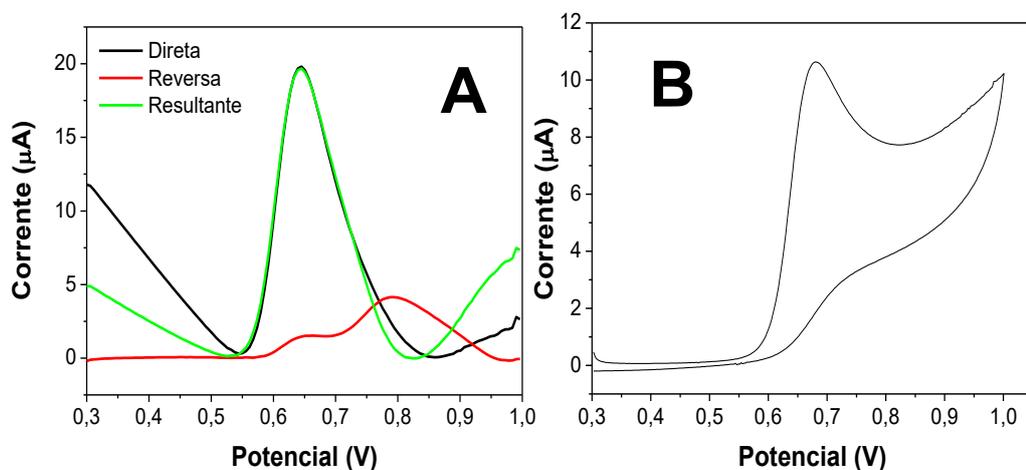
A relação de número de elétrons e prótons pode ser calculada utilizando os valores experimentais do estudo do pH e a equação de Nernst (Equação 9):

$$E_p = E^\circ - 0,0592 \left(\frac{H^+}{n} \right) \text{pH} \quad (9)$$

Onde H^+ é o número de prótons envolvidos na reação, n o número de elétrons, E° é o potencial padrão e E_p é o potencial de equilíbrio (GALUS, 1994). O coeficiente angular obtido pela regressão linear dos dados experimentais foi de 0,053 V com coeficiente de determinação de 0,992, próximo ao valor teórico da equação de Nernst, o que indica que o mesmo número de prótons e elétrons estão envolvidos na reação de oxidação da tiramina.

Foi analisada também a reversibilidade da reação. Avaliando as correntes diretas, reversa e resultante para VOQ (Figura 12 A), observou-se que não houve contribuição significativa da corrente reversa, ou seja, a resposta da oxidação da tiramina para a corrente resultante foi semelhante à obtida para corrente direta. Além disso, analisando o perfil de oxidação de tiramina utilizando VC observa-se que não houve o surgimento de pico de redução da tiramina (Figura 12 B).

Figura 12 - (A) Voltamogramas (varredura direta, reversa e resultante) de onda quadrada, amplitude 50 mV e velocidade de 108 mV s^{-1} e (B) Voltamograma cíclico com velocidade de 200 mV s^{-1} , da oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 sobre ECGL.

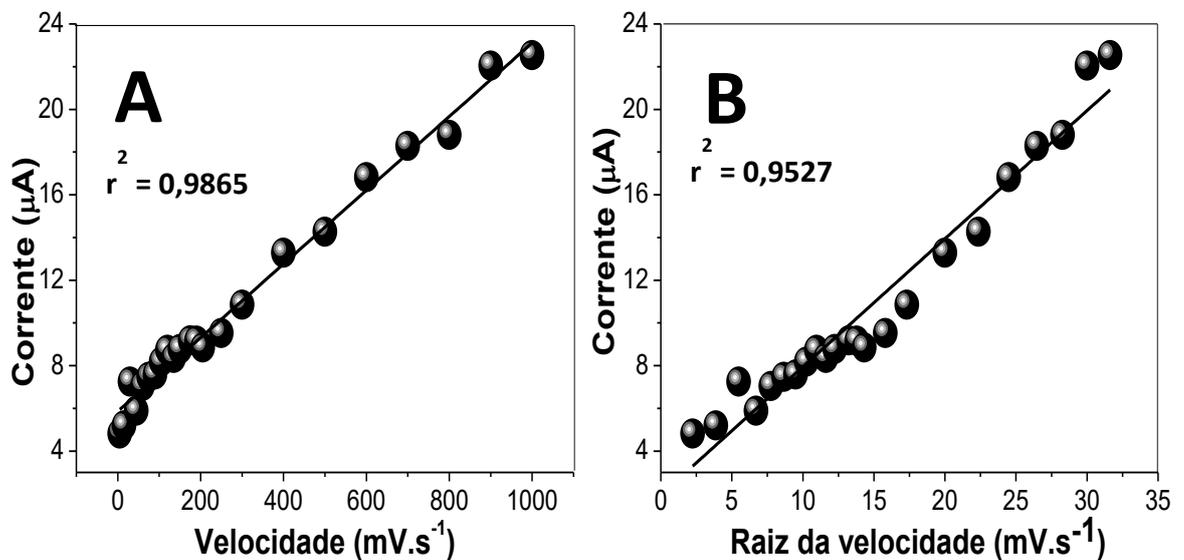


Fonte: Própria autora.

A influência da velocidade de varredura na resposta voltamétrica da tiramina foi

investigada utilizando VC para verificar se o processo é controlado pela cinética de adsorção ou difusional. Os perfis obtidos através da variação da velocidade de varredura na faixa de 5 a 1000 mV s^{-1} para a oxidação da tiramina utilizando a técnica de VC podem ser observados na Figura 13.

Figura 13 – (A) Relação entre a velocidade de varredura *versus* corrente de pico e (B) relação da raiz da velocidade de varredura *versus* corrente de pico, ambos obtidos de voltamogramas cíclicos em solução de tiramina 0,1 mmol L^{-1} em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7, utilizando ECGL.



Fonte: Própria autora.

A regressão linear realizada para os dados de corrente de pico *versus* variação da velocidade de varredura para a oxidação da tiramina utilizando VC (Figura 13 A) possibilitou a obtenção de um r^2 de 0,9865. Este valor foi maior que o obtido para a Figura 13 B ($r^2=0,9527$). O aumento linear na corrente de pico *versus* a velocidade de varredura indica que a cinética da reação é controlada por adsorção. Já o aumento linear da corrente de pico *versus* a raiz quadrada da velocidade indica que o processo é controlado pela difusão (SILVA *et al.*, 2019b).

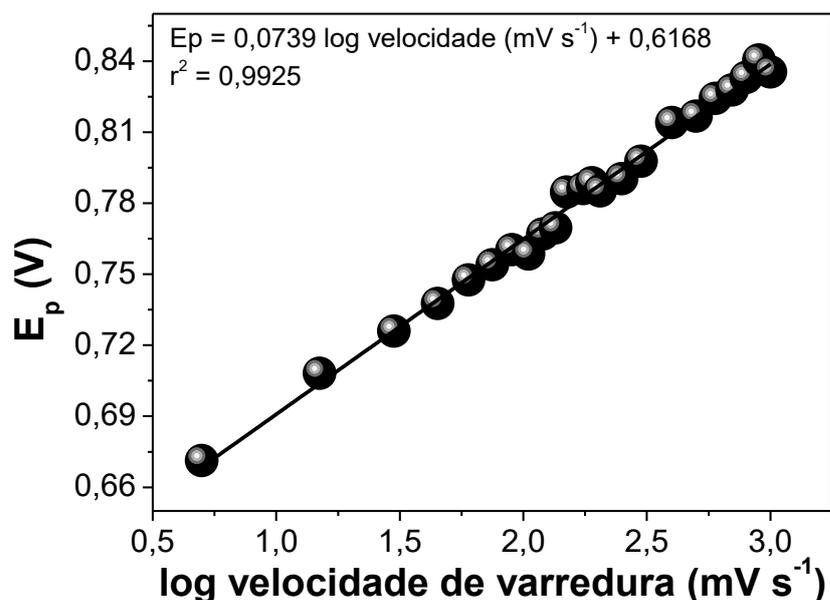
Desta forma, o processo de oxidação da tiramina sobre os eletrodos de minas de grafite é controlado pela adsorção, como já era esperado, já que a estrutura já havia sido polimerizada em eletrodos de grafite em estudos anteriores (TRAN *et al.*, 2003; TENREIRO *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2008). Ao realizar varreduras consecutivas de VC, foi observado um decréscimo na corrente de pico a cada

varredura, consistente com sistemas adsorptivos. Além disso, os resultados já apresentados no tópico posterior da otimização de frequência por VOQ mostraram uma proporcionalidade entre a frequência e a corrente de pico, características de processos envolvendo adsorção de reagente.

Isso é importante para o trabalho, porque há a necessidade de renovação da superfície do eletrodo de trabalho ou a substituição do eletrodo utilizado por um novo. A grande vantagem de usarmos os eletrodos à base de grafites de lapiseira, é que eles são descartáveis. Não há a necessidade de renovação de superfície (que no caso de processos envolvendo polimerização, podem ser mais desafiadores). Com isso, o processo de otimização das técnicas deve ser realizado com uma medida a cada eletrodo.

Determinadas as características da reação, foram realizados estudos utilizando VOQ e VC para determinar o número de elétrons envolvidos na oxidação da tiramina sobre os eletrodos de minas de grafite. De acordo com a equação de Laviron, o E_p anódico varia linearmente com o logarítmico da velocidade de varredura (Laviron, 1979). Na Figura 14 é mostrado o perfil do logarítmico da velocidade de varredura versus o E_p para oxidação da tiramina utilizando VC.

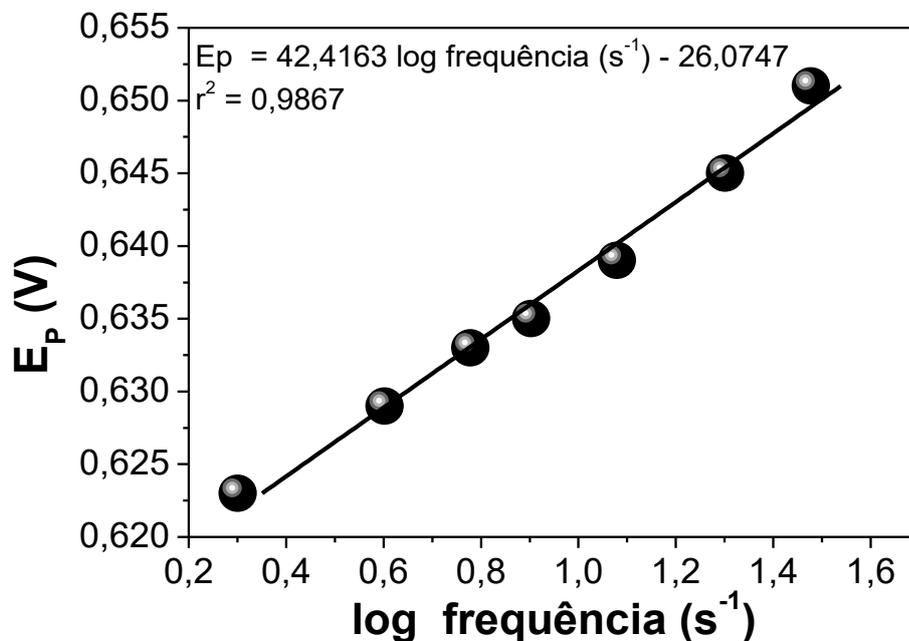
Figura 14 - Relação entre o logarítmico da velocidade de varredura versus potencial de pico obtidos de voltamogramas cíclicos em solução de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0.1 M pH 7 sobre os ECGL.



Fonte: Própria autora.

A partir dos dados experimentais e da equação de Laviron (Equação 1), o número de elétrons calculado para a oxidação da tiramina sobre os eletrodos de minas de grafite foi de 2,81. A equação de Lovric (Equação 2) também foi utilizada para determinar o número de elétrons envolvidos na reação. Para sistemas totalmente irreversíveis de acordo com a equação de Lovric, deve existir uma relação linear entre E_p e o logaritmo da frequência através de dados obtidos da VOQ. O perfil do logaritmo da frequência *versus* o E_p pode ser observado na Figura 15.

Figura 15 - Relação entre logaritmo da velocidade de varredura *versus* potencial de pico obtidos de voltamogramas de onda quadrada em solução de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0.1 M pH 7, sobre os ECGL.

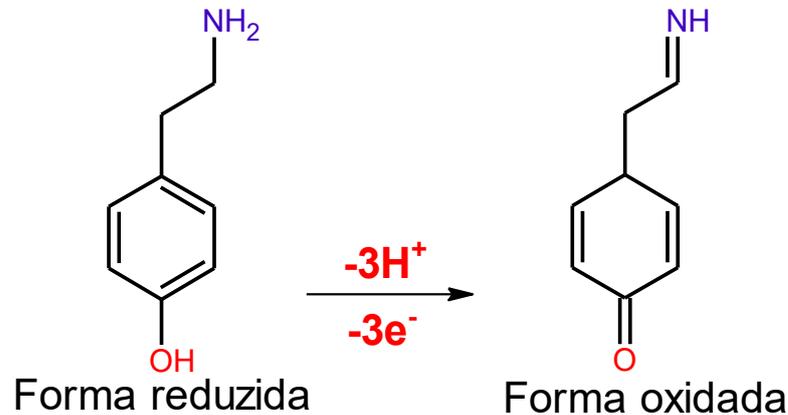


Fonte: Própria autora.

Utilizando o valor de α igual a 0,71 e comparando os dados experimentais com os reais para equação de Lovric, o número de elétrons calculado para oxidação da tiramina sobre os eletrodos de minas de grafite foi 2,78. Assim, de acordo com os resultados obtidos do estudo de pH, velocidade de varredura por VC e variação de frequência por VOQ, aproximadamente 3 elétrons e 3 prótons estão envolvidos na reação de oxidação da tiramina, o mesmo número foi observado na literatura (RAOOF *et al.*, 2012a; ZHANG *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2018). A estrutura da forma reduzida

e oxidada da tiramina é mostrada na Figura 16, de acordo com os resultados obtidos para o possível mecanismo da reação de oxidação da tiramina sobre ECGL.

Figura 16 - Reação de oxidação da tiramina sobre eletrodos de minas de grafite.



Fonte: Própria autora.

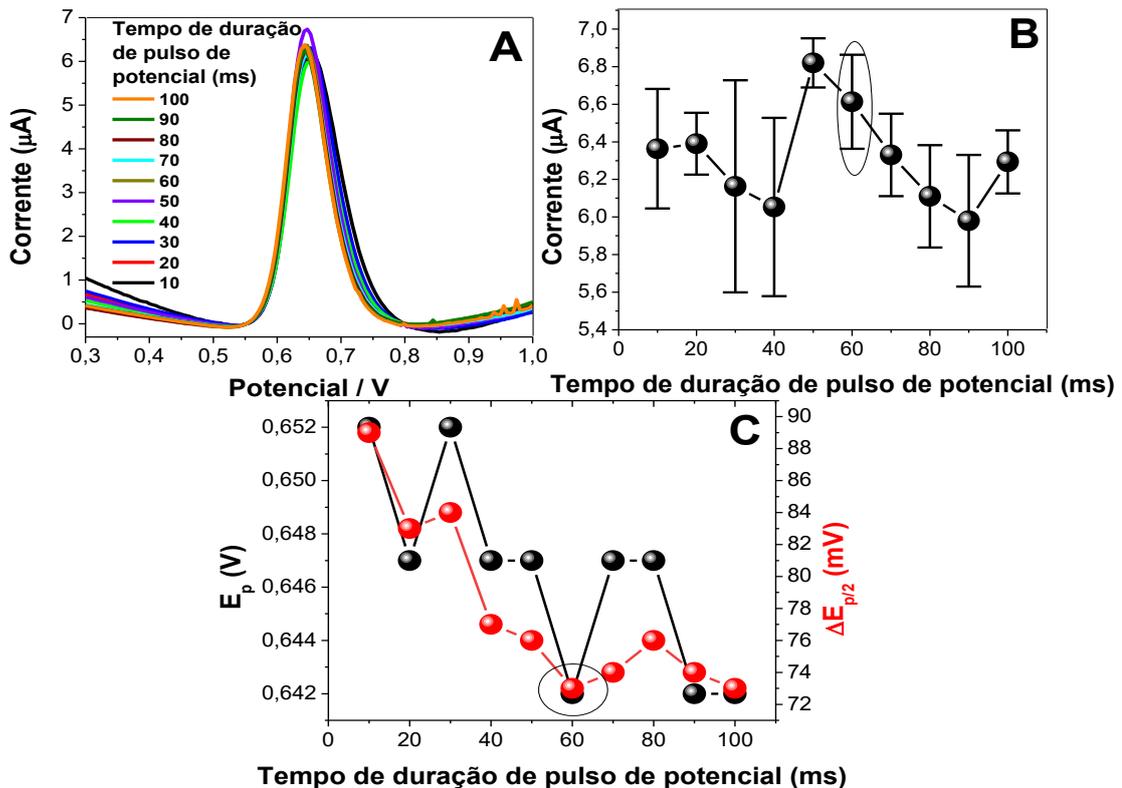
A eletroreatividade da tiramina é semelhante à de grupos fenólicos em termos do grupo funcional hidroxila. A oxidação da tiramina envolve o grupo fenol, os cátions radicais são formados pela remoção de dois elétrons do grupo fenil e um elétron do grupo hidroxila, e ocorre a remoção de prótons (HAMMERICH e SVENSMARK, 1991). Embora seja esperado o surgimento de dois picos de oxidação da molécula, devido os dois grupos funcionais, estes dois picos se sobrepõem devido a força iônica do meio (eletrolito suporte), como já foi mencionado anteriormente. Após o estudo do mecanismo de oxidação da tiramina sobre os ECGL, foram realizados os estudos para otimização das técnicas.

3.4 Otimização dos parâmetros da técnica de VPD para determinação de tiramina

A otimização dos parâmetros da técnica de VPD (tempo de duração do pulso de potencial, amplitude de pulso, incremento de potencial e intervalo de tempo) foram realizados para se obter as melhores respostas do método analítico. Assim, o efeito de cada parâmetro sobre a intensidade de corrente, E_p e $\Delta E_{p/2}$ para oxidação da tiramina foram estudados e selecionados. Inicialmente o tempo de duração do pulso foi avaliado para uma faixa de 10 a 100 ms mantendo-se constante a amplitude e a

velocidade de varredura de 25 mV e 10 mV s⁻¹, respectivamente. Os voltamogramas e perfis mostrados na Figura 17 foram obtidos para cada valor estudado.

Figura 17 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 utilizando ECGL, variando o tempo de duração dos pulsos de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 ms e mantendo a amplitude de 25 mV e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. (B) Relação entre corrente de pico *versus* tempo de duração dos pulsos de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) ΔE_{p/2} *versus* a variação do tempo de duração dos pulsos de acordo com A.

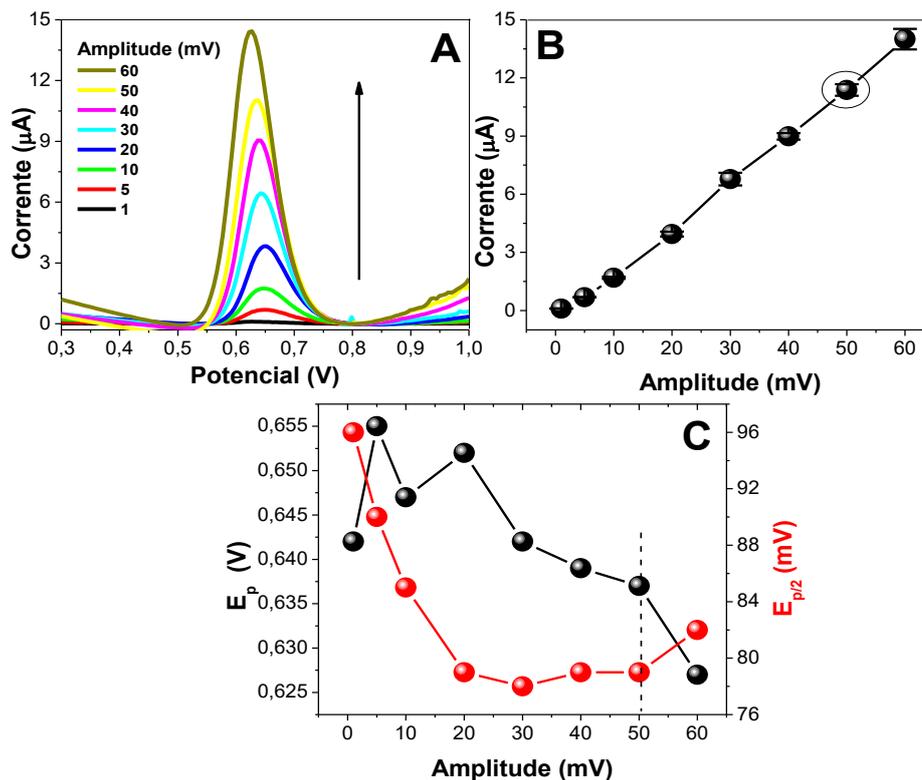


Fonte: Própria autora.

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que os melhores valores de tempo de modulação são de 50 e 60 ms. Porém, o tempo de 50 ms sofre com mais altos valores de E_p e ΔE_{p/2} quando comparados aos de 60 ms. Desta forma, 60 ms foi o tempo de modulação selecionado para análises subsequentes. O próximo parâmetro avaliado foi a amplitude de pulso em um intervalo de 1 a 60 mV, mantendo-se constante o tempo de modulação em 60 ms e a velocidade de varredura 10 mVs⁻¹. Na Figura 18 (A e B), pode-se observar que houve um aumento linear do sinal de

corrente à medida que o valor da amplitude de pulso foi aumentado e na Figura 18 (C) observa-se os perfis de E_p e $\Delta E_{p/2}$ com a variação da amplitude.

Figura 18 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando ECGL, variando a amplitude de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mV e mantendo o tempo de duração dos pulsos de 60 ms e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . (B) Relação entre corrente de pico *versus* amplitude de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) $\Delta E_{p/2}$ *versus* a variação da amplitude de acordo com A.



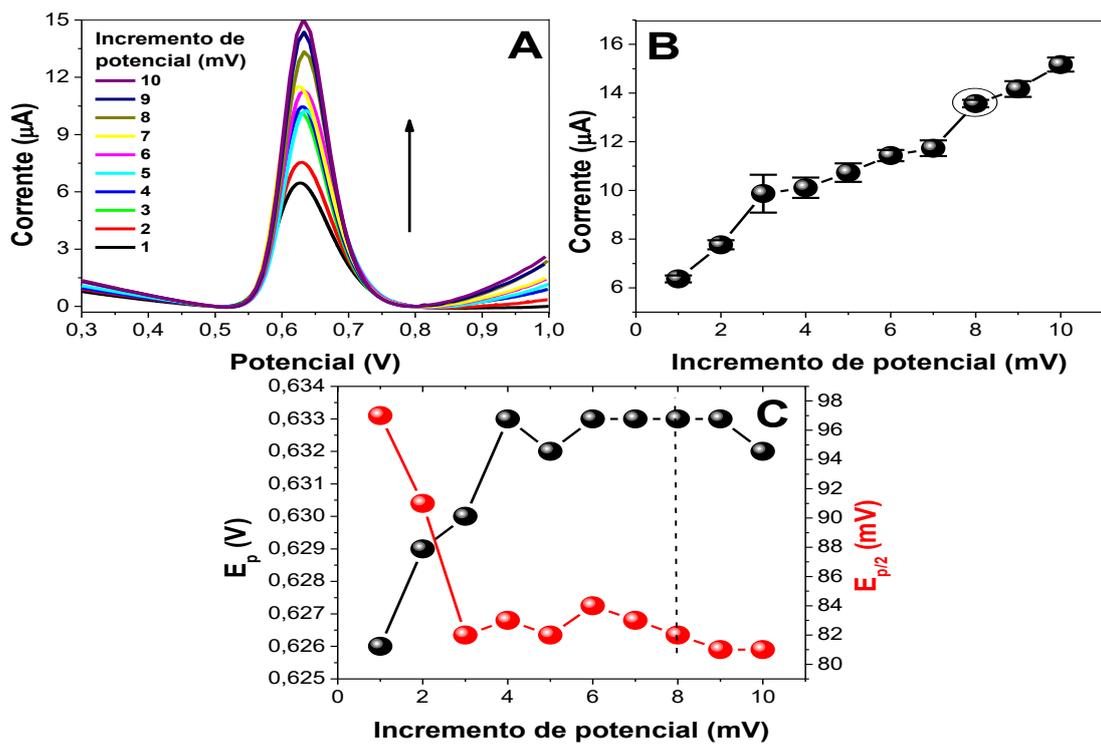
Fonte: Própria autora.

Pode-se observar que a amplitude de pulso afeta o pico de corrente e um leve deslocamento para potenciais menos anódicos, sendo maior a sensibilidade com aumento da amplitude. Entretanto, o aumento da amplitude de pulso provocou inicialmente uma diminuição no $\Delta E_{p/2}$ que a partir de 60 mV tende a aumentar o que pode reduzir a seletividade. Assim optou-se por utilizar a amplitude de pulso de 50 mV para os próximos experimentos, devido ao mais alto valor de corrente, baixo E_p e mais baixo $\Delta E_{p/2}$.

O último parâmetro a ser avaliado é a velocidade de varredura, que é composta por outros dois parâmetros, o incremento de potencial e intervalo de tempo.

Inicialmente, o intervalo de tempo foi fixado em 0,5 s e variou-se o incremento de potencial em uma faixa de 1 a 10 mV para observar em qual velocidade de varredura encontrava-se a melhor resposta analítica para assim variar concomitantemente ambos os parâmetros. Novamente, os efeitos de intensidade de corrente, E_p e $\Delta E_{p/2}$ foram analisados para os perfis obtidos pelos voltamogramas de pulso diferencial para cada valor estudado mostrados na Figura 19.

Figura 19 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 utilizando ECGL, variando o incremento de potencial de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mV e mantendo o tempo de duração dos pulsos de 60 ms, a amplitude de 50 mV e o intervalo de tempo de 0,5 s. (B) Relação entre corrente de pico *versus* o incremento de potencial de acordo com A. (C) Perfis (\bullet) E_p e (\bullet) $\Delta E_{p/2}$ *versus* a variação do incremento de potencial de acordo com A.

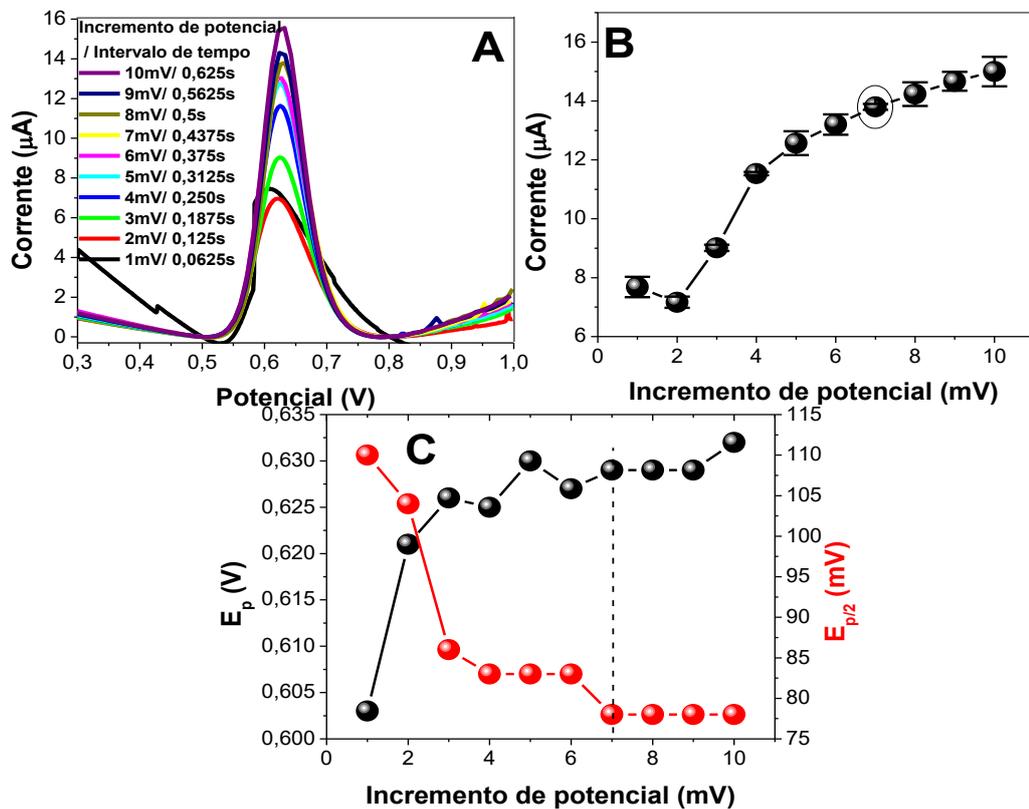


Fonte: Própria autora.

O aumento no sinal de corrente devido ao aumento do incremento de potencial e consequentemente da velocidade de varredura pode ser observado na Figura 19 (A e B). Embora as velocidades de varredura de 18 e 20 mV s^{-1} apresentaram os maiores valores de corrente, a velocidade de varredura 16 mV s^{-1} (incremento de potencial de 8 mV mantendo a intervalo de tempo de 0,5 s) mostrou melhor resolução do pico de

oxidação da tiramina e o aumento da velocidade acima deste valor ocasionou uma perda significativa de sinal (picos menos definidos, com perda de sinal). Assim, variou-se concomitantemente o incremento de potencial e intervalo de tempo para resultar na velocidade de varredura de 16 mV s^{-1} (Figura 20) que foi selecionada para os próximos experimentos.

Figura 20 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, utilizando ECGL, variando incremento de potencial/intervalo de tempo de $1/0,0625$; $2/0,125$; $3/0,1875$; $4/0,25$; $5/0,3125$; $6/0,375$; $7/0,4375$; $8/0,5$; $9/0,5625$; $10/0,625 \text{ mV s}^{-1}$, mantendo o tempo de duração dos pulsos de 60 ms e a amplitude de 50 mV . (B) Relação entre corrente de pico *versus* incremento de potencial de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) $\Delta E_{p/2}$ *versus* a variação do incremento de potencial de acordo com A.



Fonte: Própria autora.

O aumento do incremento de potencial e intervalo de tempo provocou um aumento na intensidade de corrente, pois quanto maior o incremento maior a diferença de potencial entre os pontos no intervalo de tempo e menor o número de pontos armazenados durante o experimento. Entretanto, pode-se observar na Figura 20 (A)

que para valores de incremento de potencial muito alto ocorre uma perda na resolução do pico de oxidação da tiramina. Além disso, em incrementos acima de 7 mV há uma tendência em atingir um valor constante de corrente. Optou-se então, em utilizar o incremento de potencial de 7 mV e o intervalo de tempo de 0,4375 s para as posteriores análises por mostrar uma melhor resposta levando em consideração resolução de pico, intensidade de corrente, E_p e $\Delta E_{p/2}$.

A escolha da velocidade de varredura é muito importante, pois na voltametria de pulso diferencial geralmente utilizam-se velocidades mais baixas. Entretanto deve-se observar principalmente a perda da resolução do pico estudado, neste caso para velocidade de 16 mV s⁻¹ utilizando o incremento de potencial e intervalo de tempos selecionados não houve perda da resolução de pico. Velocidades acima deste valor podem resultar perda de resolução de modo que poderá não ocorrer registros eficientes de corrente o que afetará na forma e definição do pico.

Na Tabela 5 são mostrados as variações e escolha dos parâmetros para técnica VPD.

Tabela 5 – Variação e escolha dos parâmetros para VPD.

Parâmetros para VPD	Variação	Selecionados
Tempo de duração dos pulsos de potencial (ms)	10 à 100	60
Amplitude (mV)	1 à 60	50
Incremento de potencial (mV)	1 à 10	7
Intervalo de tempo (s)	0,0625 à 0,625	0,4375

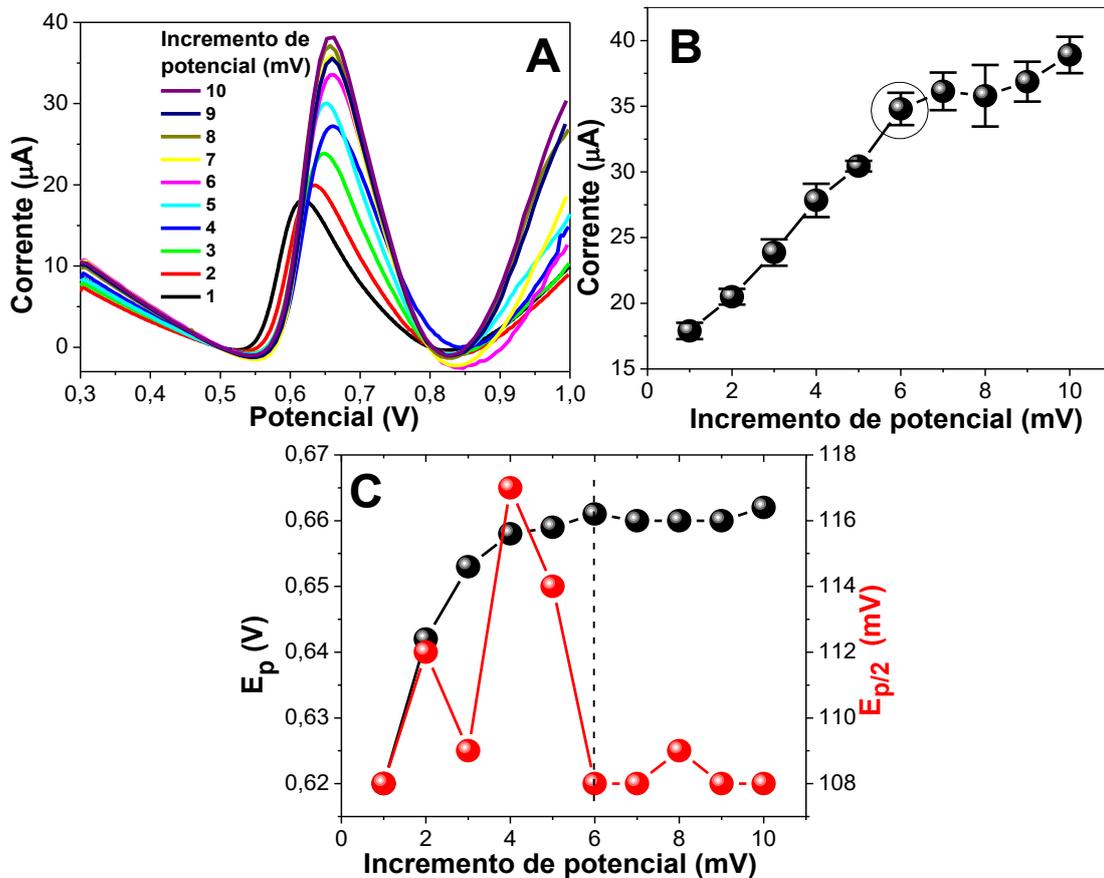
Fonte: Própria autora.

3.5 Otimização dos parâmetros da técnica de VOQ para determinação de tiramina

Para o desenvolvimento do método analítico para a determinação de tiramina utilizando VOQ, foi necessário avaliar a influência dos parâmetros da técnica (amplitude de pulsos de potencial, a frequência de aplicação dos pulsos e o incremento de varredura de potencial) para obtenção das melhores respostas. Primeiramente avaliou-se o incremento de potencial, no intervalo de 1 a 10 mV, sendo os parâmetros de amplitude e frequência mantidos fixos em 50 mV e 50 s⁻¹. O incremento de varredura de potencial e a frequência são responsáveis pela velocidade

de varredura e principalmente pela sensibilidade da técnica. Na Figura 21, são mostrados os voltamogramas de onda quadrada e os perfis obtidos para os diferentes valores de incremento de potencial estudado.

Figura 21 - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, utilizando ECGL, variando o incremento de potencial de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mV e mantendo a amplitude de 50 mV e a frequência 50 s^{-1} (B) Relação entre corrente de pico *versus* o incremento de potencial de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) $\Delta E_{p/2}$ *versus* a variação do incremento de potencial de acordo com A.



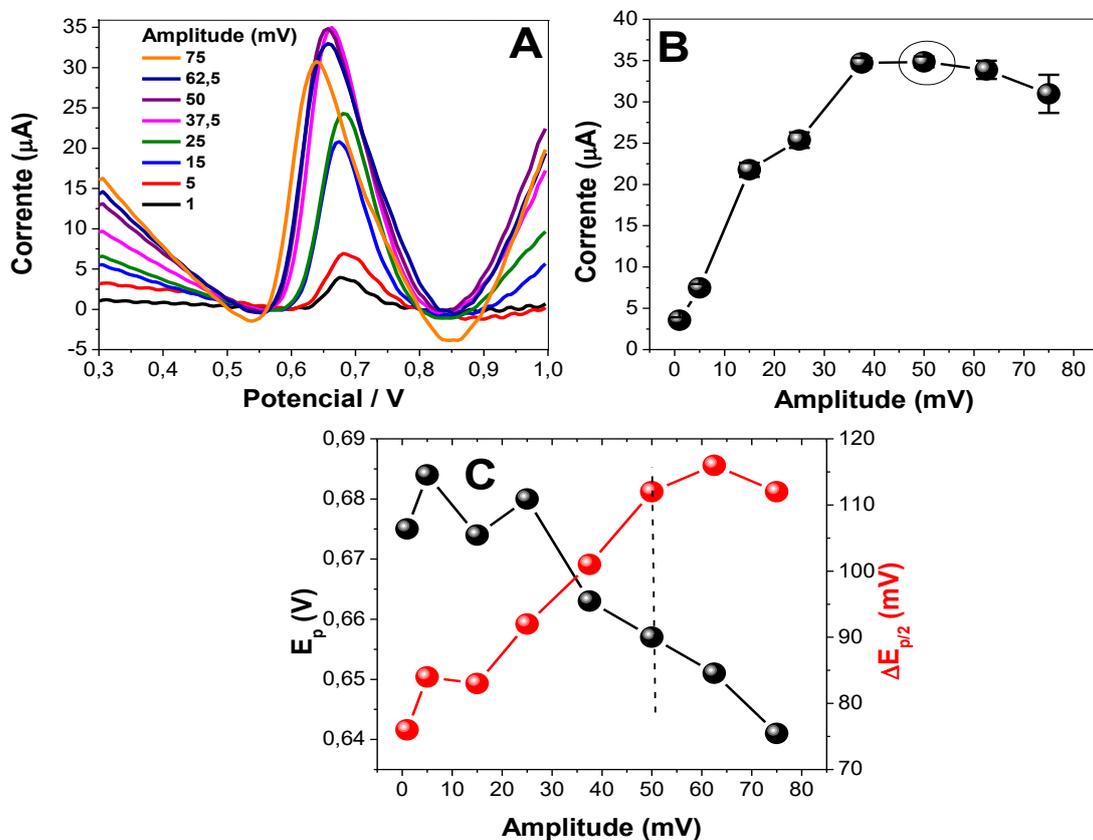
Fonte: Própria autora.

Pode-se observar na Figura 21 que a intensidade de corrente de pico não tem um aumento significativo acima de 6 mV de incremento de potencial e também acima deste valor houve uma perda de resolução dos picos. Assim, 6 mV foi o valor selecionado para os próximos experimentos levando também em consideração a relação corrente de pico e baixos E_p e $\Delta E_{p/2}$.

A amplitude de pulso de potencial é a altura do pulso de potencial aplicado no sentido direto e reverso de cada degrau da escada de potencial e pode ter efeito na

resposta analítica da VOQ (SKOOG *et al.*, 2005). Este parâmetro foi estudado num intervalo de 1 a 75 mV, mantendo-se constante o incremento de potencial em 6 mV e a frequência em 50 s⁻¹. A Figura 22 mostra o efeito da variação da amplitude na oxidação da tiramina utilizando VOQ.

Figura 22 - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7, sobre ECGL, variando a amplitude de 1; 5; 15; 25; 37,5; 50; 62,5; 75 mV, mantendo o incremento de potencial de 6 mV e a frequência de 50 s⁻¹. (B) Relação entre corrente de pico versus amplitude de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) ΔE_{p/2} versus a variação da amplitude de acordo com A.



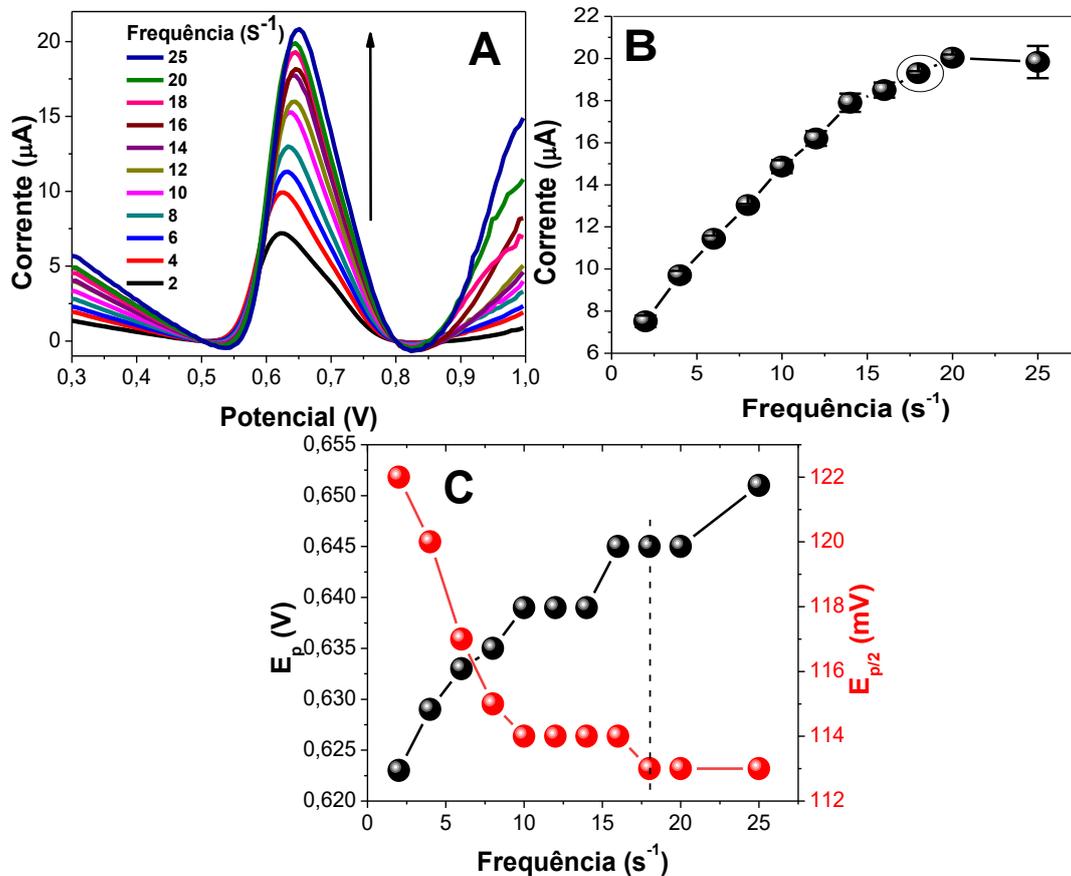
Fonte: Própria autora.

Observou-se um aumento na intensidade de corrente de pico entre a amplitudes 1 e 50 mV. Acima deste valor, a corrente de pico passou a diminuir tendendo a atingir um valor constante. Apesar de uma maior sensibilidade ter sido observada para a amplitude de 37,5 mV, optou-se em utilizar a amplitude de 50 mV para os próximos experimentos por se tratar de um valor tipicamente mais utilizado na técnica de VOQ. Valores relativamente baixos de E_p e ΔE_{p/2} também foram

observados para a amplitude de 50 mV e, assim, como na VPD para a VOQ utilizou-se o mesmo valor de amplitude.

Por fim, o último parâmetro avaliado foi a frequência. Este parâmetro é responsável pela determinação da velocidade de varredura afetando diretamente na sensibilidade da técnica. Os valores foram estudados na faixa de 1 a 25 s⁻¹ mantendo os demais parâmetros da técnica de VOQ selecionados anteriormente fixos. Na Figura 23 (A) são mostrados os voltamogramas de onda quadrada obtidos variando a frequência e na Figura 23 (B e C) os perfis de corrente, E_p e ΔE_{p/2} com a variação da frequência.

Figura 23 - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina 0,1 mmol L⁻¹ em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7, sobre ECGL, variando a frequência de 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 25 s⁻¹, mantendo o incremento de potencial de 6 mV e a amplitude de 50 mV. (B) Relação entre corrente de pico versus frequência de acordo com A. (C) Perfis (•) E_p e (•) ΔE_{p/2} versus a variação da frequência de acordo com A.



Fonte: Própria autora.

O aumento da frequência promoveu um aumento na intensidade de pico acompanhado um pequeno deslocamento do E_p para sentido o menos anódico e baixo $\Delta E_{p/2}$ entre os experimentos. Na Figura 23 (B) observa-se que houve uma linearidade entre a corrente de pico e a faixa de frequência 2 a 20 s^{-1} . Acima desta faixa a corrente tendeu a atingir um valor constante.

A frequência de 18 s^{-1} apresentou um menor E_p quando comparado a 20 s^{-1} e, como o aumento de corrente de pico entre estes valores foi baixo, optou-se em utilizar a frequência de 18 s^{-1} para os experimentos seguintes. Desta forma, a velocidade de varredura resultante da escolha dos parâmetros foi de 108 $mV s^{-1}$. Na Tabela 6 são mostrados as variações e escolha dos parâmetros para técnica VOQ.

Tabela 6 – Variação e escolha dos parâmetros para VOQ.

Parâmetros para VOQ	Varição	Selecionados
Incremento de potencial (mV)	1 à 10	6
Amplitude (mV)	1 à 75	50
Frequência de aplicação dos pulsos de potencial (s^{-1})	2 à 25	18

Fonte: Própria autora.

3.6 Validação analítica para determinação de tiramina utilizando VPD e VOQ

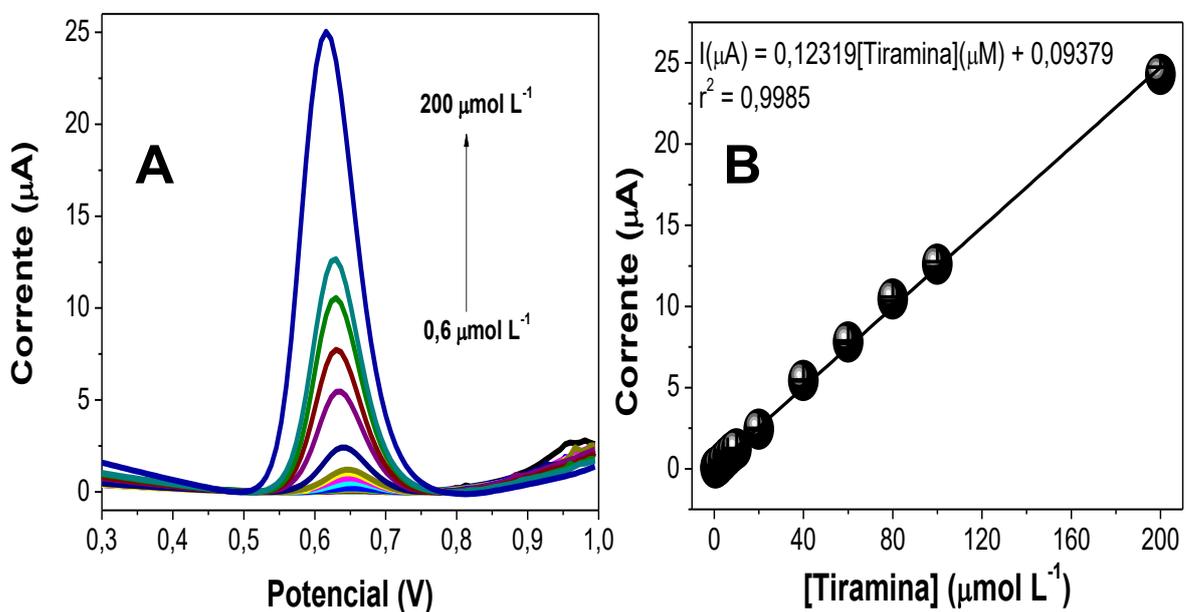
3.6.1 Estudo da linearidade e faixa linear

Depois de estabelecidas as melhores condições experimentais para a determinação de tiramina, da otimização dos parâmetros das técnicas de VPD e VOQ e estudo do mecanismo de oxidação sobre os ECGL, foram elaboradas as curvas de calibração em triplicata utilizando solução padrão de tiramina em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7.

Para a técnica de VPD foram construídas três curvas analíticas no intervalo de concentração de 0,6 a 1200 $\mu mol L^{-1}$ de tiramina. A faixa linear obtida foi 0,6 a 200 $\mu mol L^{-1}$, sendo 0,6 $\mu mol L^{-1}$ o mínimo detectado pela técnica e a partir 200 $\mu mol L^{-1}$ perdeu-se a linearidade. Na Figura 24 (A) são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial no intervalo de concentração da faixa linear. Por meio dos voltamogramas mediu-se a intensidade de corrente de pico para cada concentração estudada e a

curva analítica de corrente de pico em função da concentração da tiramina é mostrada na Figura 24 (B).

Figura 24 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de tiramina $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ (-----); $0,8$ (---); $1,0$ (---); $2,0$ (---); $4,0$ (---); $6,0$ (---); $8,0$ (---); 10 (---); 20 (---); 40 (---); 60 (---); 80 (---); 100 (---) e $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (---) em meio de tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 utilizando ECGL tempo de duração de pulso 60 ms, amplitude 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1} . (B) Curva analítica de corrente de pico versus a concentração de tiramina.

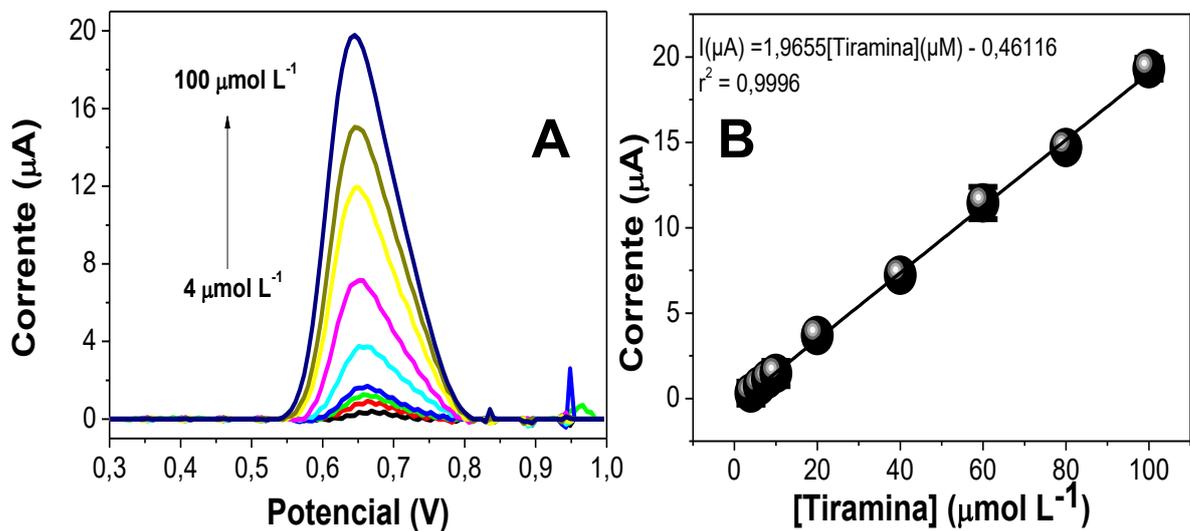


Fonte: Própria autora

Na Figura 24 (A) observou-se que as correntes de pico aumentaram proporcionalmente com a adição de tiramina. De acordo com a curva mostrada na Figura 24 (B), houve um aumento da linearidade entre corrente de pico e concentração de tiramina com r^2 de 0,9985. O valor de r^2 deve estar o mais próximo de 1 para representar um verdadeiro ajuste linear, contudo, valores de r^2 acima de 0,995 corresponde um bom ajuste dos dados (HARRIS, 2008). O LD (Equação 3) e LQ (Equação 4) foram calculados e os valores foram de $0,52$ e $1,74 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos são comparáveis aos da literatura (APETREI e APETREI, 2015; SILVA et al., 2019a). A faixa linear obtida para a curva foi de $0,6$ a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Para a técnica de VOQ as curvas de calibração foram construídas no intervalo de concentração de 4 a 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina. A faixa linear obtida foi de 4 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando os parâmetros otimizados. Na Figura 25 (A), são mostrados os voltamogramas de onda quadrada registrados na faixa de concentração linear e na Figura 25 (B) é mostrada a curva analítica de corrente de pico *versus* concentração de tiramina obtida pela média dos dados extraídos dos voltamogramas.

Figura 25 - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina 4,0 (-----); 6,0 (- - - -); 8,0 (- - - -); 10 (- - - -); 20 (- - - -); 40 (- - - -); 60 (- - - -); 80 (- - - -) e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (-----) em meio de tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7 utilizando ECGL, amplitude 50 mV e velocidade de 108 mV s^{-1} . (B) Curva analítica de corrente de pico *versus* a concentração de tiramina.



Fonte: Própria autora.

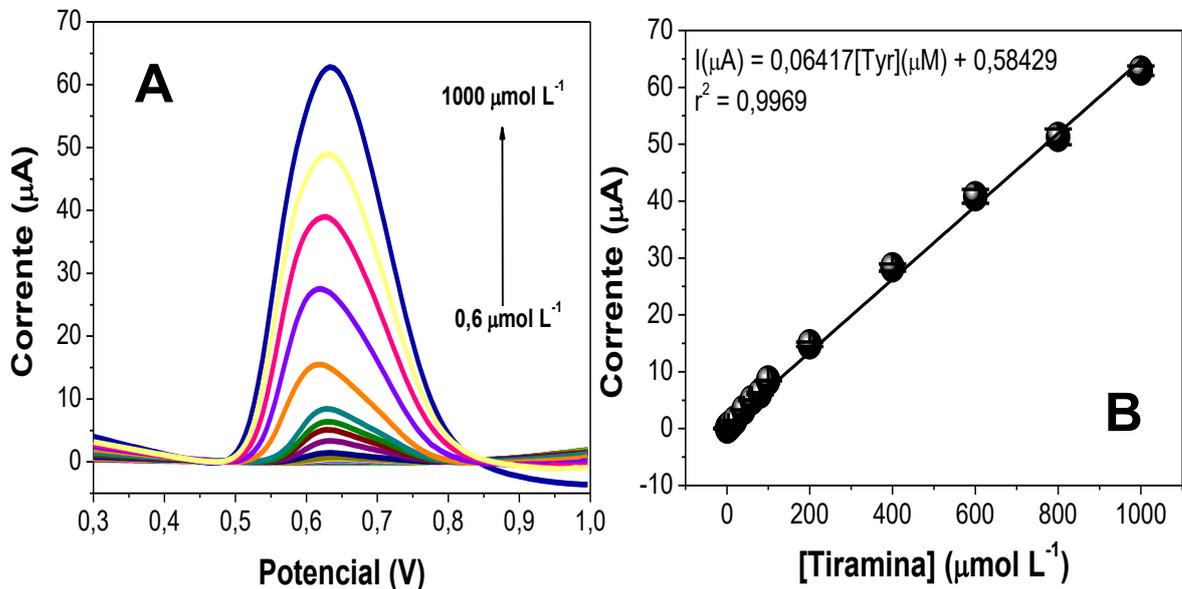
A equação para curva de calibração (Figura 25 B) o r^2 foi de 0,9996. Para avaliar a sensibilidade da técnica foram calculados os LD (Equação 3) e LQ (Equação 4), seus valores foram de 1,72 e 5,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Observa-se na Figura 25 (A) que não foi possível determinar a tiramina em concentrações inferiores a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a VOQ. A utilização da velocidade de varredura de 108 mV s^{-1} estabelecida anteriormente na otimização dos parâmetros da técnica é superior a velocidade de varredura de 16 mV s^{-1} utilizada para a VPD. O que pode estar ocorrendo neste caso, é que a oxidação da tiramina deve apresentar uma cinética lenta, necessitando de um tempo maior para que o processo de oxidação possa ocorrer com eficiência. Sendo assim, um experimento foi realizado em baixa frequência para se aproximar a uma velocidade comparável à utilizada na VPD.

Novas curvas analíticas foram construídas para a técnica de VOQ mantendo a amplitude de potencial de 50 mV, o incremento de potencial de 6 mV e modificando a frequência para $2,69 \text{ s}^{-1}$, resultando em uma velocidade de varredura de $16,14 \text{ mV s}^{-1}$, valor próximo a velocidade de varredura utilizada para VPD, afim que as duas técnicas pudessem ser comparadas.

O intervalo de concentração estudado foi $0,6$ a $1200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para elaboração de novas curvas. A faixa linear obtida neste caso foi de $0,6$ a $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo $0,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ o mínimo detectado pela técnica e a partir $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ perdeu-se a linearidade. Na Figura 26 (A), são mostrados os novos voltamogramas de onda quadrada para a velocidade de $16,14 \text{ mV s}^{-1}$ e na Figura 26 (B) é mostrada a curva analítica de corrente de pico *versus* concentração de tiramina.

Figura 26 - (A) Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de tiramina $0,6$ (-----); $0,8$ (-.-.-); $1,0$ (-.-.-); $2,0$ (-.-.-); $4,0$ (-.-.-); $6,0$ (-.-.-); $8,0$ (-.-.-); 10 (-.-.-); 20 (-.-.-); 40 (-.-.-); 60 (-.-.-); 80 (-.-.-); 100 (-.-.-), 200 (-.-.-); 400 (-.-.-), 600 (-.-.-); 800 (-.-.-) e $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (-----) em meio de tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 utilizando ECGL, amplitude 50 mV e velocidade de $16,14 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Curva analítica de corrente de pico *versus* a concentração de tiramina.



Fonte: Própria autora.

A resposta de corrente de pico para a curva de calibração por VOQ na velocidade de varredura de $16,14 \text{ mV s}^{-1}$ foi linearmente proporcional à faixa de

concentração com r^2 de 0,9969, valores de r^2 acima de 0,995 correspondem a um bom ajuste linear (HARRIS, 2008).

Observando as equações para as duas curvas de calibração para VOQ, verifica-se que são diferentes. Isto ocorre porque, apesar de estar sendo utilizada a mesma técnica, as velocidades de varredura são diferentes e, conseqüentemente, a resposta analítica pode ser diferentes mesmo para análises utilizando a mesma concentração de tiramina. Velocidades maiores possibilitam um aumento na sensibilidade da técnica em relação a intensidade de corrente, porém a tiramina apresenta uma cinética lenta. Assim, optou-se em utilizar a velocidade de 16,14 mV s⁻¹ para os próximos experimentos. Os LD (Equação 3) e LQ (Equação 4) também foram calculados e seus valores foram de 0,77 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os valores de LD e LQ obtidos são comparáveis aos obtidos por técnicas cromatográficas (MANETTA *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2017).

A Tabela 7 mostra a comparação do LD e faixa linear obtidos neste trabalho com os obtidos para outros sistemas de determinação da tiramina por meio de técnicas eletroanalíticas. Como pode ser visto, bons LD e faixa linear foram obtidos neste trabalho, sem qualquer etapa de pré-tratamento ou modificação dos eletrodos, os ECGL, são uma excelente alternativa, simples, rápida e de baixo custo para a determinação de tiramina.

Tabela 7 - Faixa linear e LD obtidos para diferentes sistemas de detecção eletroanalítica de tiramina.

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
MAO/GE	Amperometria	10 - 500	2,0	Bóka <i>et al.</i> (2012)
GE/TiO ₂ /CMK-3/Náilon/PDDA	VC	6 - 130	1,5	Kochana <i>et al.</i> (2016)
SPCE/MnO ₂	FIA/ Amperometria	10 - 300	3,0	Telsnig <i>et al.</i> (2012)
Modificado MWCNT/GCE	VPD	1 - 17 e 17-85	0,8	Raooof <i>et al.</i> (2012)
Polipirrol/Pt	Amperometria	4 - 80	0,547	Apetrei e Apetrei (2013)
ECGL	VPD	0,6 - 200	0,52	Este trabalho
ECGL	VOQ	0,6 -1000	0,77	Este trabalho

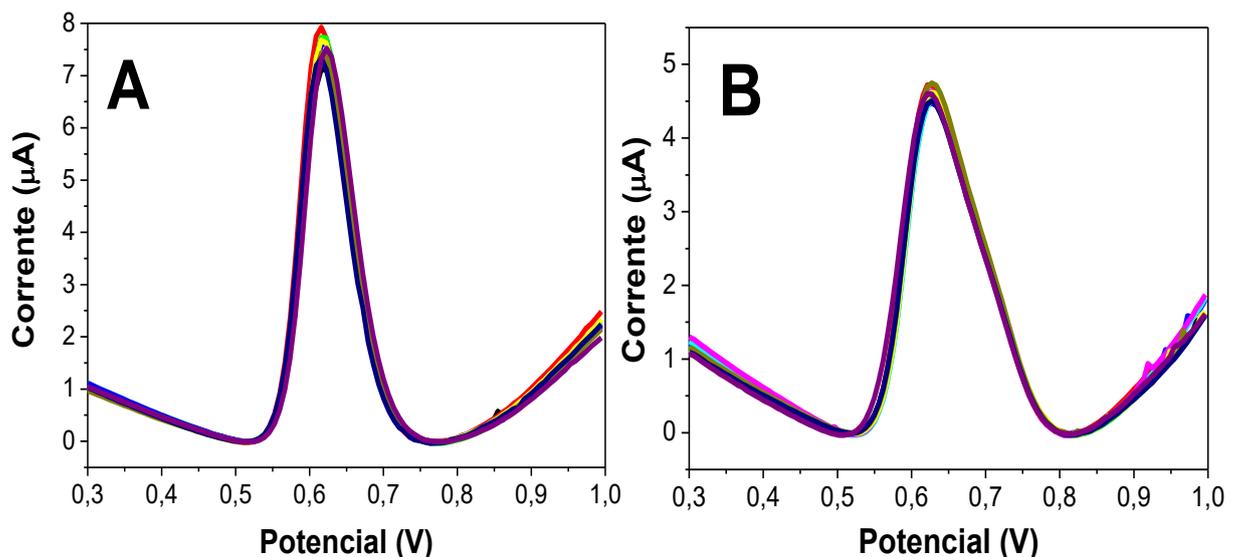
MAO: Monoamina oxidase; EG: Eletrodo de grafite; PDDA: Poli - (cloreto de dialildimetilamônio; MWCNT: *Multi-walled carbon nanotube* (nanotube de carbon com paredes múltiplas); SPCE: Screen-printed carbon electrode (Eletrodo de carbon impresso); ECGL: Eletrodo de carbono de grafite de lapiseira; VC: Voltametria cíclica; FIA: *Flow Injection Analysis* (Análise de injeção em fluxo); VOQ: Voltametria de onda quadrada e VPD: Voltametria de pulso diferencial.

Fonte: Própria autora.

3.6.2 Análise da precisão

A precisão das metodologias foi avaliada realizando 10 medidas de detecção de tiramina intradia, entredia, em equipamentos diferentes e realizada por operadores diferentes. As medidas foram realizadas utilizando as técnicas otimizadas. Para cada medida os eletrodos eram descartados, pois, a tiramina tende a polimerizar na superfície dos eletrodos, diminuindo o sinal de corrente, como já foi relatado anteriormente. As análises intradia foram realizadas em três concentrações diferentes, tiramina a 10, 50 e 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7. As demais medidas foram realizadas na concentração 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores de concentrações estudados (maioria 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram selecionados de acordo com o conteúdo de tiramina presente em vinhos tintos, em trabalhos presentes na literatura a concentração de tiramina em vinhos geralmente é menor que 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para mostrar a excelente repetitividade dos eletrodos para a determinação da tiramina utilizando as técnicas VPD e VOQ são apresentados os voltamogramas na Figura 27 A e B.

Figura 27 - Voltamogramas de pulso diferencial (A) e onda quadrada (B) da oxidação de tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7 utilizando os ECGL novos a cada leitura.



Fonte: Própria autora.

As Tabelas 8 e 9 mostram os resultados para a validação da precisão de

detecção da tiramina para VPD e VOQ, respectivamente. Foram calculados para cada medida a média aritmética (\bar{x}), o desvio padrão (s), o desvio padrão relativo DPR e o intervalo de confiança (IC) com 95% de confiança para as medidas de corrente de pico.

Tabela 8 - Medidas de precisão para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de VPD sobre os ECGL.

Precisão	Medidas	\bar{x} (μA)	s (μA)	DPR (%)	IC (95%)
Intradia (n = 10)	[Tiramina] 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,30	0,048	3,69	0,034
	[Tiramina] 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	7,24	0,221	3,05	0,158
	[Tiramina] 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$	11,4	0,267	2,34	0,191
Diferentes equipamentos (n=10)	Metrohm Autolab 101N	(7,22) ^a	0,232	3,21	0,166
	Metrohm Autolab 204N	(7,12) ^a	0,194	2,73	0,139
	Metrohm μ Autolab	(7,33) ^a	0,162	2,21	0,116
Entredia (n = 10)	Dia 1	(7,34) ^a	0,200	2,71	0,143
	Dia 2	(7,33) ^a	0,200	2,73	0,143
	Dia 3	(7,33) ^a	0,119	1,62	0,085
Diferentes operadores (n = 10)	Operador 1	(7,36) ^a	0,199	2,71	0,143
	Operador 2	(7,34) ^a	0,201	2,73	0,144
	Operador 3	(7,33) ^a	0,142	1,94	0,102

Teste de TuKey. A mesma letra sobrescrita aponta que não há, estatisticamente, variabilidade significativa entre as metodologias.

Fonte: Própria autora.

Tabela 9 - Medidas de precisão para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de VOQ sobre os ECGL..

Precisão	Medidas	\bar{x} (μA)	s (μA)	DPR (%)	IC (95%)
Intradia (n = 10)	[Tiramina] 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,651	0,008	1,23	0,005
	[Tiramina] 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,30	0,088	2,04	0,063
	[Tiramina] 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$	7,48	0,015	2,00	0,107
Diferentes equipamentos (n=10)	Metrohm Autolab 101N	(4,33) ^a	0,096	2,23	0,069
	Metrohm Autolab 204N	(4,30) ^a	0,130	3,02	0,093
	Metrohm μ Autolab	(4,34) ^a	0,124	2,85	0,089
Intredia (n = 10)	Dia 1	(4,30) ^a	0,112	2,60	0,080
	Dia 2	(4,32) ^a	0,082	1,90	0,059
	Dia 3	(4,31) ^a	0,095	2,21	0,068
Diferentes operadores (n = 10)	Operador 1	(4,30) ^a	0,111	2,59	0,080
	Operador 2	(4,28) ^a	0,099	2,31	0,071
	Operador 3	(4,22) ^a	0,067	1,60	0,048

Teste de TuKey. A mesma letra sobrescrita aponta que não há, estatisticamente, variabilidade significativa entre as metodologias.

Fonte: Própria autora.

De acordo com os resultados, todas as medidas utilizadas nas duas técnicas apresentaram baixos desvios padrões, bons intervalos de confiança e DPR menor que 5%, considerados aceitáveis para as metodologias desenvolvidas (ANVISA, 2003). Pode-se observar que os experimentos foram realizados com grande reprodutibilidade, mesmo com eletrodos diferentes para cada medida. As respostas

para os dados intradia e entredia, mostram a precisão dos métodos em relação a várias medidas e medidas realizadas em dias diferentes.

Para as medidas utilizando diferentes equipamentos, não foi observada diferença significativa entre as respostas. Nas medidas utilizando diferentes operadores com conhecimentos básicos de eletroanalítica, eles foram responsáveis por realizar o todo experimento, desde a limpeza do eletrodo até a determinação da tiramina, as respostas também não apresentaram diferença significativa, comprovando a precisão das metodologias.

3.6.3 Análise de robustez

A robustez foi avaliada usando três métodos diferentes de limpeza do eletrodo. O primeiro método consistiu no polimento em lixa d' água, o segundo consistiu no mesmo polimento seguido por um voltamograma cíclico em uma solução aquosa de ácido sulfúrico, enquanto para o terceiro método foi utilizada cronoamperometria em vez de VC. O propósito de utilizar o ácido sulfúrico é remover contaminantes residuais indesejados inseridos pelo fabricante do grafite de lapiseira. Também foram avaliados diferentes tempos de acondicionamento da célula. O tempo de equilíbrio para estabilização da dupla camada elétrica é um comando que força o procedimento eletroquímico a esperar um tempo definido pelo operador antes do início da execução do experimento. Dependendo do sistema, o tempo de acondicionamento pode alterar a espessura da dupla camada elétrica, e assim, a resposta.

Para análise de robustez também foram avaliadas diferentes temperaturas da solução para detecção de tiramina, foi utilizando uma célula encamisada ligada a um banho termostático, simulando a análise em diferentes ambientes, como a determinação *in situ*. Nas Tabelas 10 e 11 são mostradas as medidas de robustez para determinação de tiramina na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 para as técnicas VPD e VOQ, respectivamente. Todas as medidas foram realizadas com $n = 3$ e foram calculados para cada medida a média aritmética (\bar{x}), o desvio padrão (s), o desvio padrão relativo DPR e o IC com 95% de confiança para as medidas de corrente de pico.

Tabela 10 - Medidas de robustez para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de VPD sobre os ECGL.

Robustez	Medidas	\bar{x} (μA)	s (μA)	DPR (%)	IC (95%)
Limpeza dos eletrodos (n = 3)	Método 1	(7,13) ^a	0,125	1,76	0,311
	Método 2	(7,21) ^a	0,228	3,16	0,567
	Método 3	(6,94) ^a	0,015	0,22	0,038
Tempo de equilíbrio (n = 3)	0 s	(7,29) ^a	0,135	1,86	0,336
	5 s	(7,40) ^a	0,121	1,63	0,300
	10 s	(7,19) ^a	0,147	2,04	0,364
	15 s	(7,62) ^a	0,163	2,14	0,405
	20 s	(7,59) ^a	0,105	1,38	0,260
	25 s	(7,06) ^a	0,239	3,39	0,594
	30 s	(7,54) ^a	0,369	4,90	0,918
Temperatura (n = 3)	10°C	(5,76) ^a	0,053	0,93	0,133
	15°C	(5,77) ^a	0,077	1,33	0,191
	20°C	(6,55) ^b	0,186	2,84	0,462
	25°C	(7,29) ^c	0,079	1,08	0,195
	30°C	(7,66) ^d	0,139	1,81	0,344

Teste de TuKey. A mesma letra sobrescrita aponta que não há, estatisticamente, variabilidade significativa entre as metodologias.

Fonte: Própria autora.

Tabela 11 - Medidas de robustez para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de VOQ sobre os ECGL.

Robustez	Medidas	\bar{x} (μA)	s (μA)	DPR (%)	IC (95%)
Limpeza dos eletrodos (n = 3)	Método 1	(4,24) ^a	0,014	0,34	0,035
	Método 2	(4,26) ^a	0,025	0,58	0,062
	Método 3	(4,27) ^a	0,063	1,48	0,157
Tempo de equilíbrio (n = 3)	0 s	(4,65) ^a	0,128	2,75	0,318
	5 s	(4,52) ^a	0,035	0,77	0,086
	10 s	(4,42) ^a	0,035	0,78	0,086
	15 s	(4,42) ^a	0,016	3,57	0,392
	20 s	(4,54) ^a	0,189	4,15	0,468
	25 s	(4,34) ^a	0,318	7,31	0,789
	30 s	(4,39) ^a	0,243	5,53	0,602
Temperatura (n = 3)	10°C	(3,17) ^a	0,098	3,09	0,243
	15°C	(3,36) ^a	0,111	3,32	0,277
	20°C	(3,82) ^b	0,122	3,20	0,303
	25°C	(4,30) ^c	0,129	3,01	0,322
	30°C	(4,72) ^d	0,189	4,01	0,470

Teste de TuKey. A mesma letra sobrescrita aponta que não há, estatisticamente, variabilidade significativa entre as metodologias.

Fonte: Própria autora.

As medidas de robustez apresentaram baixos desvios padrões, bons intervalos de confiança e na maioria DPR menores que 5%, indicando a confiabilidade dos resultados. A partir dos dados apresentado nas Tabelas, fica claro que o sistema é robusto para determinação de tiramina em relação a limpeza dos eletrodos e ao tempo de equilíbrio, para ambas as técnicas. Não houve variabilidade estatística entre as medidas para de limpeza dos eletrodos e medidas para a tempos de equilíbrio.

Entretanto, as mudanças de temperatura geraram mudanças na resposta com diferença significativa para as técnicas, exceto para as temperaturas de 10 e 15°C.

Embora seja indesejável a diferença estatística entre as temperaturas estudadas, os resultados eram esperados, assim como a falta de robustez com a variação do pH, já que, muitos sistemas eletroquímicos têm dependência do pH e temperatura, e a oxidação da tiramina utilizando VPD e VOQ não é uma exceção. Para todas finalidades, valores de pH de 7 e temperatura de 25°C foram utilizados em todos os outros experimentos. O método 1 de limpeza foi utilizado devido à sua simplicidade e 5 s foi escolhido como tempo de equilíbrio (valor que é padrão do equipamento).

3.6.4 Especificidade (estudo de interferentes)

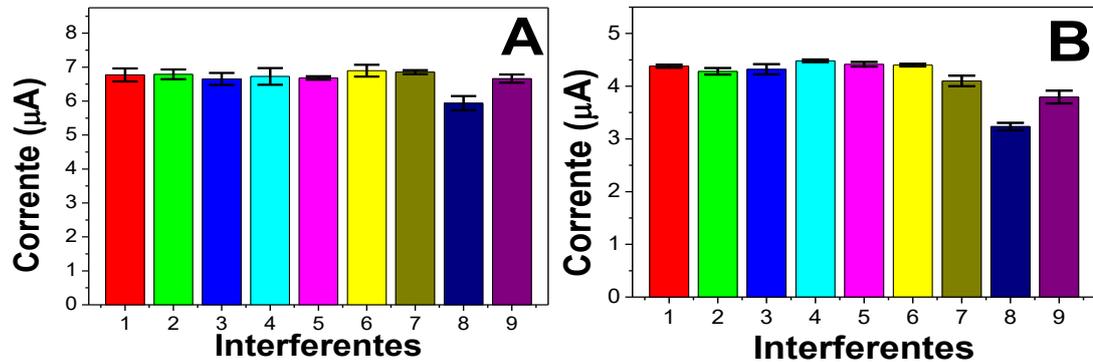
A composição de vinhos tintos é muito complexa. Compostos como antocianinas, taninos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, entre outros podem ser encontrados nos vinhos tintos (LUKIĆ et al., 2019; SANTOS et al., 2019). A presença de interferentes que estejam em abundância com a tiramina pode influenciar na determinação por VPD e VOQ.

Diversas aminas biogênicas podem ser encontradas em vinhos tintos, contudo, a medição eletroquímica direta de aminas biogênicas alifáticas é desfavorável em meios aquosos sobre eletrodos de carbono, como no caso da putrescina, cadaverina, agmatina, espermina e espermidina. As reações requerem a transferência do oxigênio da água, o que é possível em diferentes eletrodos de ânodo, como ouro, óxido de platina, óxido de cobre ou óxido de níquel (KOPPANG *et al.*, 1999). Entretanto a histamina é uma amina biogênica aromática que pode interferir na determinação eletroanalítica da tiramina. Outros componentes principais do vinho que podem interferir são os compostos fenólicos, como o ácido gálico e catequina.

Desta forma, investigou-se a influência da resposta eletroanalítica da tiramina na presença de algumas substâncias mais comumente presentes em vinhos (glicose, frutose, sacarose e etanol) e na presença dos potenciais interferente, como a histamina, o ácido gálico e a catequina. As concentrações de estudo foram definidas de utilizando valores acima do geralmente encontrados em vinhos, para estudar uma maior interferência. A intensidade das respostas de correntes para a oxidação da tiramina sobre os ECGL utilizando VPD e VOQ na presença de cada interferentes é

mostrada na Figura 28 (A) e (B), respectivamente.

Figura 28 - Relação entre corrente de pico *versus* 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina (1) e de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina na presença de: (2) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose, (3) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de frutose, (4) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sacarose dissociada, (5) 0,037 mol L^{-1} de etanol, (6) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sacarose, (7) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de histamina, (8) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido gálico e (9) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ catequina utilizando VPD (A) e (B) VOQ.



Fonte: Própria autora.

Na Tabela 12 são mostrados os resultados para a validação da especificidade de determinação da tiramina para VPD e VOQ, e os calculados para cada medida da média aritmética (\bar{x}), o desvio padrão (s), o desvio padrão relativo DPR e o intervalo de confiança com 95% de confiança (IC) para as medidas de corrente de pico.

Tabela 12 - Medidas de especificidade para validação da determinação da tiramina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos interferentes utilizando as técnicas de VPD e VOQ sobre os ECGL.

Especificidade	Medidas	\bar{x} (μA)	s (μA)	DPR (%)	IC (95%)
Interferentes para VPD (n = 3)	Tiramina	(6,82) ^a	0,225	3,30	0,559
	Tiramina + glicose	(6,78) ^a	0,136	2,00	0,337
	Tiramina + frutose	(6,75) ^a	0,194	2,87	0,481
	Tiramina + sacarose 24 h	(6,79) ^a	0,269	3,97	0,669
	Tiramina + etanol*	(6,56) ^a	0,145	2,21	0,359
	Tiramina + sacarose 0 h	(6,92) ^a	0,068	0,99	0,169
	Tiramina + histamina	(6,92) ^a	0,100	1,44	0,248
	Tiramina + catequina	(6,69) ^a	0,110	1,65	0,274
	Tiramina + ácido gálico	(5,96) ^b	0,196	3,28	0,486
Interferentes para VOQ (n = 3)	Tiramina	(4,39) ^a	0,037	0,849	0,092
	Tiramina + glicose	(4,32) ^a	0,081	1,89	0,202
	Tiramina + frutose	(4,30) ^a	0,135	3,14	0,335
	Tiramina + sacarose 24 h	(4,48) ^a	0,036	0,81	0,090
	Tiramina + etanol*	(4,43) ^a	0,061	1,38	0,152
	Tiramina + sacarose 0 h	(4,38) ^a	0,032	0,72	0,079
	Tiramina + histamina	(4,10) ^a	0,146	3,55	0,362

Tiramina + catequina	(3,80) ^a	0,075	1,98	0,187
Tiramina + ácido gálico	(3,24) ^b	0,084	2,59	0,208

Teste de TuKey. A mesma letra sobrescrita aponta que não há, estatisticamente, variabilidade significativa entre as metodologias.
* 0,037 mol L⁻¹

Fonte: Própria autora.

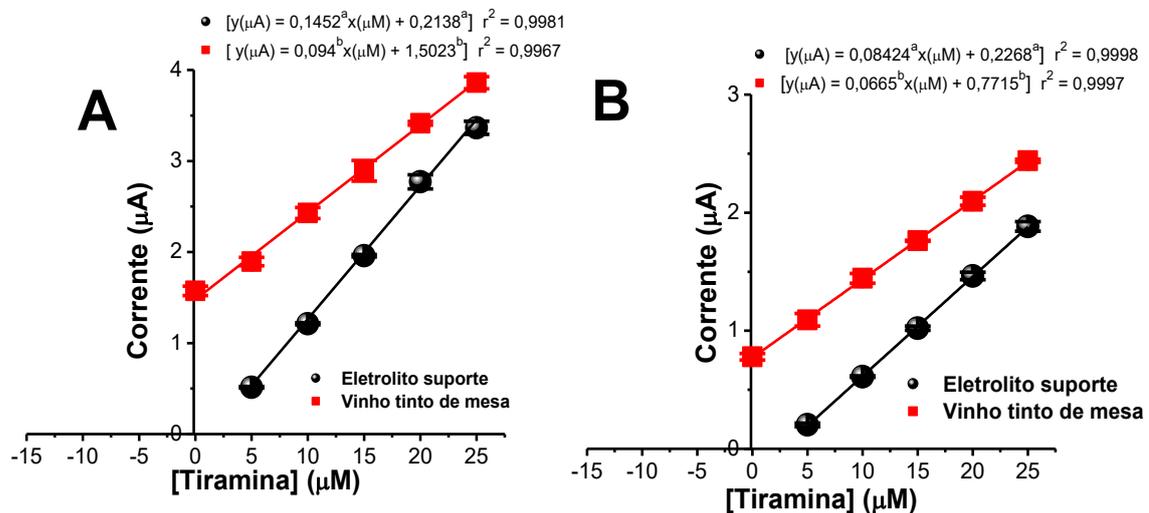
Como pode ser visto na Tabela 12, apenas o ácido gálico promoveu uma diminuição relevante estatisticamente no sinal de oxidação da tiramina nas duas técnicas. No entanto, a concentração de ácido gálico utilizada neste experimento após a diluição é alta comparada a concentração usual encontrada nos vinhos tintos considerando também a mesma diluição de 40 vezes, a concentração para em vinhos seria de 12,62 μmol , valor menor que o estudado (FRANKEL *et al.*, 1995). Os outros interferentes exerceram pouca influência na resposta eletroquímica da tiramina para ambas as técnicas, não apresentando variação significativa nas respostas de corrente de pico.

A análise de interferentes permite observar a seletividade dos métodos propostos, característica muito importante para aplicação das técnicas eletroanalíticas em amostras reais. Na presença dos interferentes estudados ambas as metodologias mostraram ótima seletividade, com exceção do ácido gálico. Outros interferentes como dopamina, cisteína, ácido ascórbico, já foram estudados na determinação eletroanalítica da tiramina, e também não foi observado diferença significativa na resposta de pico de oxidação da tiramina na presença dos interferentes, embora cada resposta varie com o tipo de metodologia utilizada (KHAN *et al.*, 2018).

3.7 Determinação de tiramina em amostra de vinho tinto utilizando VPD e VOQ

Para aplicação das metodologias desenvolvidas, foram realizadas detecções utilizando amostra de vinho tinto. Como a maioria dos alimentos, os vinhos apresentam uma matriz muito complexa, e infelizmente uma das principais desvantagens das técnicas de VPD e VOQ é garantir a seletividade. Desta forma, inicialmente avaliou-se o efeito da matriz comparando a curva de adição padrão de tiramina contendo a amostra de vinho tinto de mesa com a curva de adição padrão somente no eletrólito para as técnicas de VPD e VOQ (Figura 29 A e B). Para o teste, as amostras de vinho tinto foram diluídas na proporção de 1: 40 em tampão PBS pH 7 sem qualquer pré-tratamento.

Figura 29 – Perfis de correntes de pico *versus* a concentração de tiramina (5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7 sobre os ECGL (●) em eletrólito suporte (■) contendo amostra de vinho tinto de mesa: (A) para VPD, amplitude de 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1} e (B) para VOQ, amplitude de 50 mV e velocidade de 16,14 mV s^{-1} .



Teste de t-Student. A mesma letra sobrescrita aponta que não há, estatisticamente, variabilidade significativa entre as equações. y: corrente de pico e x: concentração de tiramina.

Fonte: Própria autora.

As curvas apresentadas na Figura 29 ilustram bons coeficientes de determinação. Para ambas as técnicas houve diferença estatística entre as equações, indicando o efeito da matriz do vinho tinto de mesa durante a detecção da tiramina. A adição padrão é apropriada quando a composição da amostra é desconhecida ou complexa e afeta o sinal analítico. Existem dois métodos de realizá-la, utilizando volumes iguais, ou seja, preparando diversas soluções com volumes iguais da amostra e aumentando a concentração do analito, e com volumes variáveis, preparando uma só solução contendo a amostra e realizando adições do analito entre cada medida, em ambos os métodos a partir do aumento do sinal, deduzimos quanto de analito estava presente na amostra original (HARRIS, 2008). Tendo em vista o efeito da matriz, os dois métodos de adição padrão foram testados. Na Tabela 13 são mostrados a equação linear, o coeficiente de determinação e a concentração original de tiramina presente na amostra de vinho tinto de mesa.

Tabela 13 - Resultados para métodos de adição padrão de tiramina a volume variável e constante para amostra de vinho tinto de mesa utilizando VPD e VOQ.

Técnica	Método Adição padrão	Equação linear	r ²	[Tiramina] _{original} na amostra (μM)
VPD	1	$y(\mu A) = 0,094x(\mu M) + 1,5023$	0,9967	15,98
	2	$y(\mu A) = 0,0863x(\mu M) + 1,5429$	0,9915	17,87
VOQ	1	$y(\mu A) = 0,0665x(\mu M) + 0,7715$	0,9997	11,60
	2	$y(\mu A) = 0,0632x(\mu M) + 0,6973$	0,9985	11,03

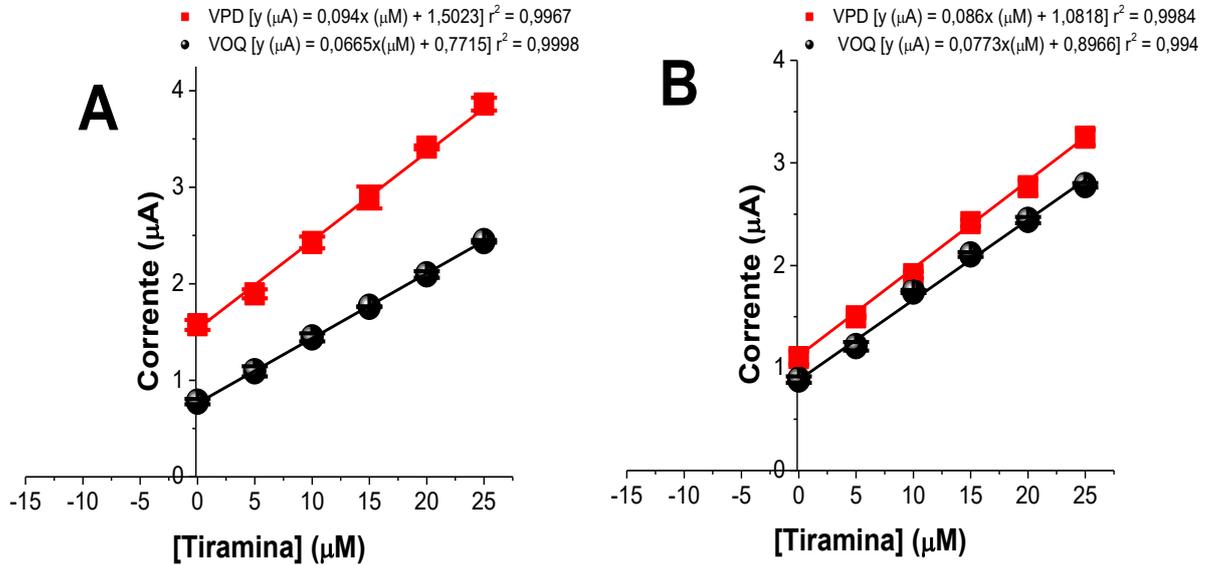
1: volume variável e 2: volume constante.

Fonte: Própria autora.

De acordo com os resultados na Tabela 13, os dois métodos diferentes de adição padrão usando vinho tinto de mesa resultaram em comportamentos lineares, com excelentes coeficientes de determinação e para cada técnica a concentração original de tiramina na amostra foi muito similar. A diferença entre as concentrações originais presentes nas amostras para VPD e VOQ pode estar relacionada à características específicas de determinação de cada técnica, estas características estão associadas a diferenças na otimizações e sensibilidade. Entretanto, ambos os métodos de adição padrão são válidos, as duas técnicas são eficientes. Entretanto, é necessário executar para cada amostra um dos métodos devido ao efeito da matriz. Devido a facilidade o método utilizando o volume variável foi utilizado para as análises posteriores.

Para avaliar o desempenho do sensor aplicado às metodologias desenvolvidas para as técnicas de VPD e VOQ, foram realizados estudos de adição e recuperação em eletrólito suporte e para dois vinhos comerciais brasileiros, sendo um vinho tinto de mesa elaborado com uvas americanas e o outro vinho tinto fino elaborado com uvas Syrah. As curvas para as amostras foram construídas em triplicata utilizando as amostras diluídas (1:40) em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7. Nenhum processo de pré-tratamento das amostras foi realizado. Na Figura 30 A e B são mostradas as curvas de adição padrão para as amostras de vinho tinto de mesa e vinho tinto fino, respectivamente.

Figura 30 - Perfis de correntes de pico *versus* a concentração de tiramina (5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7¹ sobre os ECGL, (■) para VPD, amplitude de 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1} (●) para VOQ, amplitude de 50 mV e velocidade de 16,14 mV s^{-1} : (A) amostra de vinho tinto de mesa e (B) amostra de vinho tinto fino.



y: corrente de pico e x: concentração de tiramina.

Fonte: Própria autora.

Para as amostras de vinho, ambas as técnicas possibilitaram a obtenção de curvas de adição com excelentes coeficientes de determinação e com aumento linear da corrente de pico com o aumento da concentração de tiramina. Os resultados para o estudo de adição, recuperação e *BIAS* (%) para o eletrólito suporte e amostras são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 – Estudo adição e recuperação para duas amostras comerciais de vinho tinto por VPD e VOQ.

Técnica	Amostra	[TIM] _{original} na amostra (μM)	[TIM] _{adicionada} (μM)	[TIM] _{recuperada} (μM)	R (%)	BIAS (%)
VPD	1	15,98	2,5	$2,46 \pm 0,25$	$98,4 \pm 10$	-1,6
	2	12,57	2,5	$2,36 \pm 0,19$	$94,4 \pm 7,6$	-5,6
	3	-	5,0	$5,13 \pm 0,09$	$102,6 \pm 1,8$	2,6
VOQ	1	11,60	2,5	$2,46 \pm 0,18$	$98,4 \pm 7,2$	-1,6
	2	11,59	2,5	$2,65 \pm 0,06$	$106,0 \pm 2,4$	6
	3	-	5,0	$5,02 \pm 0,03$	$100,4 \pm 0,6$	0,4

[TIM]: concentração de tiramina; 1: vinho tinto de mesa; 2: vinho tinto fino e 3: eletrólito suporte.

Fonte: Própria autora.

De acordo com os resultados obtidos, as recuperações em eletrólito suporte para VPD e VOQ foram de $102,6 \pm 1,8$ e $100,4 \pm 0,6\%$, respectivamente. As recuperações em eletrólito suporte mostram a eficiência das técnicas, com valores bem próximos a 100%. Já as recuperações para as amostras de vinho variaram entre $94,4 \pm 7,6$ e $106,0 \pm 2,4\%$, para ambas as técnicas os valores são aceitáveis para metodologias analíticas que podem variar entre 80 a 120% (PRICHARD E BARWICK, 2007).

As medidas de exatidão estão na faixa satisfatória de -10 a 10% (HARRIS, 2008). O emprego da técnica de VOQ apresentou valores de *BIAS* na faixa de -1,6 a 6%, e para a VPD os valores de *BIAS* ficaram entre -5,6 e 2,6%, resultados que indicam que os valores medidos estão próximos aos valores adicionados. Para ambas as técnicas a exatidão calculada para o eletrólito suporte apresentou sinal positivo, ou seja, as concentrações medidas foram maiores que os valores das concentrações adicionados. Contudo, todos os valores de exatidão (% *BIAS*) para as técnicas de VPD e VOQ são satisfatórios para metodologias analíticas que varia entre 80 a 120% (PRICHARD E BARWICK, 2007).

Desta forma, as validações juntamente com as taxas de recuperação provam que as metodologias eletroanalíticas desenvolvidas utilizando ECGL de baixo custo são uma ótima alternativa para determinação de tiramina em amostra de vinho tinto.

4 CONCLUSÕES PARCIAIS

De acordo com os resultados apresentados, os ECGL de baixo custo foram utilizados com sucesso para determinação de tiramina utilizando as técnicas de VPD e VOQ. A escolha das melhores condições experimentais e voltamétricas para as técnicas resultaram na obtenção de picos bem definidos para a tiramina, possibilitando o estudo do mecanismo de reação sobre os eletrodos de minas de grafite. O processo eletroquímico de oxidação a tiramina mostrou ser controlado pela adsorção e de caráter irreversível, envolvendo 3 elétrons e 3 prótons.

A utilização das condições otimizadas para determinação de tiramina utilizando técnicas de VPD e VOQ também possibilitou a obtenção de metodologias adequadas em termos de linearidade e faixa linear, com LD e LQ baixos e r^2 próximos a 1. A validação das metodologias mostrou que os métodos analíticos foram aceitáveis quanto aos estudos de precisão, robustez em relação a limpeza dos eletrodos e tempo de acondicionamento, especificidade, exceto para o ácido gálico, e exatidão nas análises de adição e recuperação em vinho tinto.

A partir da sensibilidade alcançada para VPD e VOQ, foram desenvolvidas novas metodologias de determinação de tiramina em amostras de vinho tinto, proporcionando análises rápidas, de baixo custo, simples, com boa exatidão, e recuperações que variaram entre $94,4 \pm 7,6$ e $106,0 \pm 2,4\%$ para as técnicas, indicando a aplicabilidade para determinação de tiramina.

CAPÍTULO III

Análises das fermentações de uvas ***Vitis viniferas***

1 INTRODUÇÃO

A utilização do vinho pelo homem tem sido uma prática antiga, há relatos que os primeiros consumidores de vinho formam os egípcios a cerca de 3000 a.C. e que o uso medicinal do vinho foi feito pelo homem há mais de 2000 anos. Antigas civilizações como a dos romanos, egípcios, gregos e hindus utilizavam o vinho como um remédio para o corpo e para a alma (LOVATO e WAGNER, 2014).

Diversos fatores influenciam a composição química e bioquímica do vinho que o caracterizam como um produto único e atraente sendo apreciado por diferentes populações. O vinho é influenciado pelos fatores naturais e humanos presentes durante sua formação, relacionado a propriedades biológicas que são diretamente associadas a características sensoriais (SAURINA, 2010). Uma das etapas responsáveis pela formação desses diversos compostos em vinho é a fermentação alcoólica e a maceração, no caso dos vinhos tintos, onde a maioria dos componentes majoritários em vinhos são formados.

Na fermentação alcoólica os açúcares presentes no mosto são convertidos em etanol e gás carbônico. Nesta etapa são utilizadas leveduras, principalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, as quais podem estar presentes naturalmente nos mostos, oriundas das próprias uvas, ou podem ser adicionadas ao processo. Na produção industrial para se garantir uma qualidade e uniformidade nos vinhos elaborados, geralmente leveduras comerciais são adicionadas ao processo, isso garante um melhor controle da fermentação, já que a relação da microbiota utilizada está intimamente relacionada a maior capacidade de produção de etanol e as características de aroma e sabor do vinho (STOCKLEY et al., 2012; ORTIZ et al., 2013). A fermentação espontânea é realizada por microrganismos nativos presentes no suco das uvas, sem adição de cepas comerciais ao meio e geralmente envolve muitos tipos de leveduras, o que sem dúvida aumentará a complexidade e a diversificação do aroma de vinho (VARELA, 2016; XU et al., 2020).

Compostos secundários podem ser formados na fermentação alcoólica, dentre eles, o glicerol, por ser um composto não volátil não contribui com o aroma do vinho, mas promove a suavidade da bebida, e a sua quantidade é influenciada por diversos fatores, como a variedade de uva, grau de maturação, pH do mosto e dos níveis de inoculação de leveduras durante a fermentação alcoólica. Parte da fermentação alcoólica em vinhos tintos ocorre durante o período de maceração, em que as cascas

e sementes das uvas ficam em contato com o mosto e na qual ocorre a extração de nutrientes, aromáticos e compostos fenólicos responsáveis pela aparência, sabor e aromas (ŠEHOVIĆ *et al.*, 2004; BEROVIC *et al.*, 2007; STOCKLEY *et al.*, 2012).

Os açúcares, etanol e glicerol são compostos muito importantes na formação das características sensoriais em vinhos. Além disso, o etanol atua também como conservante, sendo inibidor de alguns microrganismos. De acordo com a legislação brasileira, nos vinhos de mesa e finos a graduação alcoólica varia de 8,6 a 14%; em 2018, a legislação foi alterada com a inclusão da classe dos vinhos nobres elaborados exclusivamente com uvas da espécie *Vitis vinifera* podendo apresentar teor alcoólico de 14,1 a 16%. Os vinhos licorosos devem apresentar teor alcoólico de 14 a 18% (BRASIL, 2018).

Outra etapa de fabricação de vinhos é a fermentação malolática, responsável pela estabilização, desacidificação, e impactos sensoriais como suavidade e maciez gustativa (GUERRA *et al.*, 2005; BETTERIDGE, GRBIN E JIRANEK, 2015). A desacidificação é resultado da ação de bactérias lácticas responsáveis pela descarboxilação do ácido málico com a consequente formação do ácido láctico. Diferentes cepas de bactérias são utilizadas na fermentação malolática, a espécie *Oenococcus oeni* ocorre naturalmente nas uvas e, portanto, é comum na realização de fermentações espontâneas. Outros gêneros encontrados em vinhos são os *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*, contudo, o gênero *Oenococcus* tem capacidade de aumentar durante a fermentação alcoólica, se tornando dominante, pois tem uma faixa ideal de crescimento entre 20 e 30°C e pH entre 4,8 e 5,5 (FUGELSANG, 1997, BETTERIDGE, GRBIN E JIRANEK, 2015).

Da mesma forma da fermentação alcoólica, a fermentação malolática pode ser realizada espontaneamente ou com a inoculação de bactérias lácticas. A fermentação malolática espontânea pode não ser garantida devido às duras condições ambientais presentes em vinhos, podendo ocorrer meses após a fermentação alcoólica, prejudicando o processo e também pode causar depreciação do vinho associada à ocorrência de deterioração ou a produção de compostos tóxicos (MOTA *et al.*, 2018).

Compostos indesejáveis podem também estar presente em vinhos, é o caso das aminas biogênicas, que quando consumidas em altas concentrações podem causar efeitos prejudiciais à saúde. A formação destes compostos depende de diversos fatores, como o teor de aminoácidos na fase inicial e final das fermentações, técnicas de vinificação, variedades de uvas utilizadas, condições higiênico sanitárias,

entre outros (MORENO-ARRIBAS e POLO 2009; SMIT *et al.*, 2013; RESTUCCIA *et al.*, 2017).

Dentre as aminas biogênicas, a tiramina é encontrada na maioria dos vinhos tintos, ela atua no organismo exercendo atividade neuro e vasoativa, elevadas concentrações podem causar efeitos tóxicos, sendo os mais comuns o aumento da pressão sanguínea a enxaqueca, causando dor de cabeça pulsante e ataque de enxaqueca e (GLÓRIA, 2005). Os efeitos tóxicos são agravados quando associada a ingestão de álcool, pois este age como um potencializador, interferindo da degradação da amina no organismo. Não há uma regulamentação específica para tiramina em vinhos tintos, assim os parâmetros que influenciam na formação de tiramina em vinho devem ser estudados, possibilitando o controle no processo e o estabelecimento de futuros limites do conteúdo em vinhos, devido os efeitos tóxicos que pode causar e pela garantia de qualidade destas bebidas.

Nos últimos anos, a qualidade de vinhos produzidos no Brasil vem se destacando devido a tecnologias aplicadas no cultivo de uvas e elaboração de vinhos. O emprego de técnicas agrônômicas possibilitou a produção de vinhos finos no Brasil, inicialmente o cultivo de uvas finas (*Vitis viniferas*) foi realizado na região Sul. No entanto, a região sudeste do Brasil emergiu como uma nova região vitivinícola, e no sul de Minas Gerais a qualidade dos vinhos finos vem se destacando, principalmente pelo emprego de cultivares finas e de técnicas enológicas. Através da técnica da dupla poda foi possível realizar um deslocamento das épocas de produção de uvas para períodos mais favoráveis à colheita de uvas para a fabricação de vinhos finos (AMORIM *et al.*, 2005; FAVERO *et al.*, 2008; REGINA *et al.*, 2011; FRAIGE *et al.*, 2015).

As uvas Syrah adaptadas nos estados do sudeste e nordeste e Cabernet Sauvignon mais adaptadas na região sul, estão entre as uvas *Vitis viniferas* cultivadas no Brasil, destinadas a produção de vinhos de alta qualidade (FRAIGE *et al.*, 2015). A expansão do setor vitivinícola brasileiro é notável e merece atenção, sendo necessários estudos que possam melhorar o processo de vinificação, a produção e qualidade de vinhos. O objetivo desta etapa do trabalho foi quantificar o teor de tiramina durante o processo de vinificação de uvas Syrah provenientes das regiões de Itobi-SP e Três Corações-MG e de uvas Cabernet Sauvignon provenientes das regiões de Itobi-SP e São Bento do Sapucaí-SP, utilizando as técnicas de VPD e VOQ otimizadas no capítulo II com os eletrodos de carbono grafite de lapiseira (ECGL) de

baixo custo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As fermentações das uvas foram realizadas nas dependências do Núcleo Tecnológico Uva e Vinho da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) situado em Caldas - MG. Os experimentos eletroanalíticos foram realizados no Laboratório de Eletroanalítica Aplicada à Biotecnologia e Engenharia de Alimentos (LEABE) e os experimentos cromatográficos foram realizados nos Laboratórios didáticos do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Patos de Minas.

Durante os processos de vinificação realizados em parceria com a EPAMIG foram utilizados metabissulfito de potássio, ácido tartárico, Fermoplus® Integrateur e Superstart® Rouge.

Todos os reagentes utilizados para as medidas eletroanalíticas foram de grau analítico e as soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida por osmose reversa a partir de um equipamento de modelo 0550 LX da Gehaka. Foram preparadas soluções de eletrólito suporte de tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7, soluções de tiramina 1 mmol L⁻¹ em PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7 e soluções das amostras diluídas (1:40) em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7. Para as análises cromatográficas todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida por um ultrapurificador modelo Master System All 220 V da Gehaka. Soluções diluídas das amostras foram preparadas com água ultrapura para injeção no cromatógrafo.

2.1 Aparato experimental

2.1.1 Medidas de pH, acidez total, densidade e sólidos solúveis totais (°Brix)

As medidas de pH, acidez total, densidade e sólidos solúveis totais (°Brix) foram realizadas no mosto, após o esmagamento das uvas. Para a determinação do pH foi utilizado o método potenciométrico utilizando um pHmêtro digital. O método titulométrico foi utilizado para determinação da acidez total, a neutralização dos ácidos foi realizada com solução padronizada de NaOH 0,1N até o ponto de equivalência da fenolftaleína ou potenciômetro até pH = 8,2. A densidade relativa 20°C foi analisada utilizando um densímetro e os sólidos solúveis totais foram determinados pelo método direto utilizando um refratômetro (BRASIL, 1896).

2.1.2 Medidas cromatográficas

As medidas cromatográficas foram realizadas para determinação de etanol, açúcares e glicerol nas amostras durante a vinificação. Para isso, foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Shimadzu, modelo Prominece LC - 20AT, com bomba modelo CTO - 20A, com forno modelo LC - 20AT e um sistema de injeção acoplado a um detector de índice de refração. Foi utilizada a coluna analítica Hi – Plex Ca 300 x 7,7 mm para os experimentos, fixada a uma temperatura de 85°C, utilizando fase móvel água ultrapura filtrada a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. As curvas de calibração foram obtidas com os padrões analíticos grau cromatográficos para cada componente (HARRIS, 2008), os parâmetros cromatográficos foram definidos de acordo com já estabelecidos no laboratório didático de Engenharia de Alimentos.

2.1.3 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato PGSTAT101 da Metrohm Autolab acoplado ao software NOVA versão 2.1.2. Os experimentos foram conduzidos em uma célula eletroquímica de compartimento único, os eletrodos de prata/cloreto de prata em solução de cloreto de potássio 3 mol L⁻¹ foi utilizado como referência, o eletrodo de platina foi utilizado como auxiliar e os eletrodos de carbono de grafite de lapiseira (ECGL) 0,9 mm de diâmetro da marca Pentel®, dureza HB, foram utilizados como eletrodos de trabalho. As técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) foram utilizadas na determinação da tiramina durante o processo de fermentação, nas condições otimizadas apresentadas no capítulo II.

2.1.4 Procedimentos empregados na vinificação

Os processos de vinificação foram conduzidos na EPAMIG, utilizando as uvas das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon, espécies *Vitis vinifera* do ciclo de outono – inverno de 2019. Foram realizadas quatro fermentações em tanques de aço inoxidável mostrados na Figura 31, sendo duas com uvas Syrah (Fermentação 1 com volume de 4400 L e Fermentação 2 com volume de 56L) e duas com uvas Cabernet Sauvignon (Fermentação 3 e 4 com volumes de 170 L).

Figura 31 - Tanques de aço inoxidável utilizados para as fermentações.



Fonte: Própria autora.

Na tabela 15 estão apresentadas as especificidades das quatro fermentações realizadas, especificando a procedência das uvas e os microrganismos utilizados durante as fermentações alcoólica e malolática.

Tabela 15 – Quatro fermentações realizadas, variedade de uvas, procedência das uvas, precipitação e temperatura média anual do local, microrganismos utilizados nas fermentações alcoólica e malolática.

Experimentos	Uvas	Local	Coordenadas	Altitude	Precipitação média anual*	Temperatura média anual*	Fermentação Alcoólica	Fermentação malolática
Fermentação 1	Syrah	Itobi - SP	21° 42' Sul e 46° 55'Oeste	840 m	1351 mm	20,6°C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fermol® super 16) 30 g hL ⁻¹	<i>Oenococcus oeni</i> (Lactoenos® 450 Preac) 1 g hL ⁻¹
Fermentação 2	Syrah	Três Corações- MG	21° 36' Sul e 45° 7' Oeste	865 m	1401 mm	20,2°C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Zymaflore® FX10) 30 g hL ⁻¹	<i>Oenococcus oeni</i> (Uvaferm AlphaTM) 2 g hL ⁻¹
Fermentação 3	Cabernet Sauvignon	Itobi - SP	21° 42' Sul e 46° 55'Oeste	840 m	1351 mm	20,6°C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fermol® Méditerranée) 30 g hL ⁻¹	Espontânea
Fermentação 4	Cabernet Sauvignon	São Bento do Sapucai- SP	22° 41' Sul e 45° 43'Oeste	886 m	1581 mm	18,7°C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Zymaflore® FX10) 30 g hL ⁻¹	Espontânea

*CLIMATE, 2019.

Fonte: Própria autora.

Inicialmente, realizou-se o desengace e esmagamento das uvas utilizando uma desengaçadeira industrial, neste momento foi adicionado metabissulfito na proporção de 5 g para cada 100 Kg de uvas, para controle de microrganismos, assim os mostos foram então conduzidos aos tanques de fermentação. As leveduras utilizadas na fermentação alcoólica foram comerciais, e foram inoculadas na forma hidratada em mosto juntamente Superstart® Rouge 30 g hL⁻¹. As concentrações iniciais de leveduras foram de 30 g hL⁻¹ mosto.

Durante a fermentação alcoólica, foram realizadas remontagens durante o período de maceração, nesta etapa também foi adicionado o Fermoplus® Integrateur, nas concentrações que variaram entre 10 e 20 g hL⁻¹, e em alguns casos ácido tartárico 0,55 g L⁻¹. Diariamente foi acompanhada a densidade e temperatura dos vinhos em fermentação. A temperatura nestas etapas não foi mantida constante e variou entre 10 a 28°C entre tanques. Após o período de maceração, que foi de 10, 12, 18, 14 dias para os tanques 1 a 4, respectivamente, foi realizada a descuba e prensagem do bagaço.

Encerrada a fermentação alcoólica, iniciou-se a fermentação malolática com a inoculação de bactéria lácticas, nas concentrações que variaram entre 1 a 2 g hL⁻¹. Nos vinhos elaborados com as uvas Cabernet Sauvignon a fermentação malolática foi espontânea.

As amostras foram coletadas nos primeiros 10 dias de fermentação alcoólica para todos os experimentos, ao final da fermentação alcoólica e ao final da fermentação malolática. Elas foram mantidas congeladas até o momento das análises.

A quantificação dos teores de etanol, açúcares (glicose e frutose) e glicerol foram realizados nos períodos de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias iniciais da fermentação alcoólica, ao final da fermentação alcoólica (Fermentação 1 com 41 dias, Fermentação 2 com 41 dias, Fermentação 3 com 38 dias, Fermentação 4 com 39 dias) e ao final da fermentação malolática (Fermentação 1 com 85 dias, Fermentação 2 com 100 dias, Fermentação 3 com 59 dias, Fermentação 4 com 60 dias). As análises foram realizadas utilizando CLAE, como descrito no item 2.1.2 neste capítulo, e as medidas foram feitas em triplicata.

2.2 Determinação eletroanalítica de tiramina durante as fermentações e cálculo das recuperações

A determinação eletroanalítica de tiramina nas amostras durante as fermentações de uvas tintas foi realizada utilizando as técnicas otimizadas de VPD e VOQ, com a metodologia descrita no Capítulo II. As análises foram feitas nos mostos (tempo 0 dias de fermentação) e também ao final das fermentações alcoólica e malolática.

As amostras foram diluídas de 1:40 em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7 e medidas foram realizadas apenas nas amostras e após sucessivas adições de solução padrão de tiramina 1 mmol L⁻¹, para construção das curvas de adição-padrão com volume variável. A partir do aumento de sinal de corrente, foi deduzido o quanto de tiramina estava presente nas amostras e nenhum processo de pré-tratamento foi realizado (HARRIS, 2008).

As eficiências dos métodos de quantificação de tiramina foram avaliadas pela adição e recuperação utilizando as curvas de adição-padrão, para isso, uma concentração conhecida de solução padrão de tiramina 2,5 μmol L⁻¹ foi adicionada as amostras e foram calculadas as recuperações de acordo com Equação 7 apresentada no capítulo II (HARRIS, 2008). A exatidão foi avaliada pelo cálculo do %BIAS, que mede a concordância entre os valores reais e os obtidos de acordo com a Equação 6 mostrada no capítulo II.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do pH, acidez total, densidade e sólidos solúveis totais no mosto

A caracterização do mosto de uvas é extremamente importante pois a concentração de açúcares, valores de pH, acidez total e a densidade são fatores que podem afetar o desenvolvimento da fermentação e as características finais do vinho. Altas concentrações de açúcares e valores de pH podem influenciar no aumento dos níveis de etanol e no sinergismo, mutualismo ou competição entre leveduras durante o processo de fermentação (MATURANO *et al.*, 2019).

Dentre as características do mosto estudadas no trabalho, o pH pode ter efeito sobre o crescimento de leveduras, velocidade de fermentação e formação de substrato. Por isso, no mosto, os valores de pH menores auxiliam na redução microbiana do meio, e mesmo que estas condições sejam estressantes para a levedura, há uma redução significativa do número de contaminantes (AMORIM *et al.*, 1996).

Do teor de sólidos solúveis totais na amostra expresso em °Brix, quase 90% são compostos por açúcares, e os mais predominantes nas uvas e conseqüentemente no mosto são a glicose e frutose (GUERRA *et al.*, 2005, BRASIL, 2018). Já os principais ácidos orgânicos predominantes nas uvas são o tartárico e málico, a acidez total representa a soma da acidez fixa (ácidos não voláteis) e da acidez volátil (ácidos voláteis), e seu valor é expresso em g de ácido tartárico L⁻¹.

As análises de pH, acidez total, densidade e sólidos solúveis totais foram realizadas no mosto após o esmagamento das uvas, os resultados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 – Dados dos valores de pH, acidez total, densidade e sólidos solúveis totais dos mostos após o esmagamento para as variedades de uva Syrah e Cabernet Sauvignon.

Fermentações	pH	Acidez total (g de ácido tartárico L ⁻¹)	Densidade (20°C)	Sólidos solúveis totais (°Brix)
1	3,98	5,44	1,102	24,15
2	3,57	6,35	1,101	23,98
3	3,89	5,53	1,101	24,18
4	3,28	6,98	1,093	22,31

1: Syrah Itobi; 2: Syrah Três Corações; 3: Cabernet Sauvignon Itobi; 4: Cabernet Sauvignon São Bento do Sapucaí.

Fonte: Própria autora.

Os valores de pH obtidos para os mostos das uvas estudadas variaram entre 3,28 a 3,98, a acidez total entre 5,44 e 6,98 g L⁻¹, a densidade entre 1,093 a 1,102 Kg L⁻¹ e os sólidos solúveis totais entre 22,31 a 24,18 °Brix. Todos os valores encontrados estão de acordo com a legislação para mosto de uvas, utilizadas para elaboração de vinhos, sendo eles: mínimo de pH 2,9; acidez total maior que 4 g.L⁻¹ e Brix de, no mínimo, 14° (BRASIL, 2018).

Observa-se que as uvas de Itobi, de altitude 840 m, Syrah da Fermentação 1 e Carbenet Sauvignon da Fermentação 3 apresentaram pH, acidez, densidade e Brix bem próximos, sendo valores bem relacionados com o clima e altitude do local.

As uvas analisadas no presente trabalho foram cultivadas em altitudes de 840 (1 e 3) , 865 (2) e 886 m (4), sendo que os resultados foram próximos aos obtidos no trabalho de Oliveira *et al.* (2019b) que estudaram a composição físico-química de uvas Syrah cultivadas em locais de baixa altitude (Lagoa Grande município de Pernambuco - 350 m de altitude) e alta altitude (Morro do Chapéu município da Bahia - 1100 m de altitude), os valores de pH variaram de 3,66 a 3,76 para a região de alta altitude e 3,44 a 4,29 para a região de baixa de altitude, a acidez total obtida variou 5,14 a 5,80 g L⁻¹ para a região alta altitude e 5,58 a 6,42 g L⁻¹ para a região de baixa altitude, os teores de sólidos solúveis totais foram pouco menores que os obtidos neste trabalho, e variaram entre 21,17 e 21,73 °Brix para região de alta altitude e 18,20 e 20,87 °Brix para a região de baixa altitude. .

Na Fermentação 2 das uvas Syrah que ocorreu na região de Três Corações o mosto apresentou valores de pH de 3,57, acidez total de 6,35 g L⁻¹, densidade de 1,101 e para sólidos solúveis de 23,98°Brix, observa-se valores próximos e um maior valor de sólidos solúveis na uva da Fermentação 2 se comparado aos estudos realizados nesta região. Como no trabalho de Amorim *et al.* (2005) que avaliaram a produção da videira cultivar Syrah em Três Corações, na região do sul de Minas Gerais no ano de 2002, a produção atingiu 8,45 toneladas por hectare com 21,75 °Brix e 7,5 g L⁻¹ de acidez total na colheita. Favero *et al.* (2008) que estudaram na mesma região a variabilidade de produção da videira Syrah no ciclo de outo-inverno nos anos de 2005 e 2006, e obtiveram valores de pH que variaram entre 3,55 a 3,32, a acidez total 6,57 a 7,31 g L⁻¹ e sólidos solúveis totais entre 18,84 a 21,48 °Brix. Ainda na região de Três Corações, Dal'Osto (2012) avaliou a composição química do mosto de uva Syrah da safra de outono-inverno no ano de 2009, e o conteúdo de sólidos solúveis totais foi 21,80 °Brix, densidade 1,0948 à 20°C, acidez total 6,23 g L⁻¹ e pH

3,66.

Também foi observada uma coerência e os resultados obtidos para o mosto da variedade Cabernet Sauvignon (Fermentações 3 e 4) e os dados presentes na literatura. Fraige *et al.* (2015), avaliaram as alterações no metabolismo e no proteoma durante o amadurecimento de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas em São Carlos região de São Paulo, os pH para as uvas maduras foram de 3,94 e 3,91, respectivamente. Felippeto, Alebrandtr e Ciotta (2016) caracterizaram a maturação e composição das uvas Cabernet Sauvignon da região de São Joaquim - SC entre os anos de 2010 e 2013, na colheita o mosto apresentou pH médio 3,16 e sólido solúvel total médio de 21,91 °Brix.

Segundo Pereira *et al.*, (2018), valores de pH entre 3,60 a 4,50 podem ser atribuídos ao uso de fertilizantes, como de potássio ou a níveis naturalmente altos de potássio no solo da região de plantação das uvas. A maior acidez total pode estar relacionada ao vigor dos porta enxertos de acordo com estudo realizado por Dias *et al.* (2017). Desta forma, apesar dos resultados estarem próximos aos da literatura, há uma diferença atribuída as características relacionadas às regiões, ao ano do cultivo, ao vigor dos cultivares e às condições climáticas de cada região.

3.2 Quantificação de açúcares durante as fermentações de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon

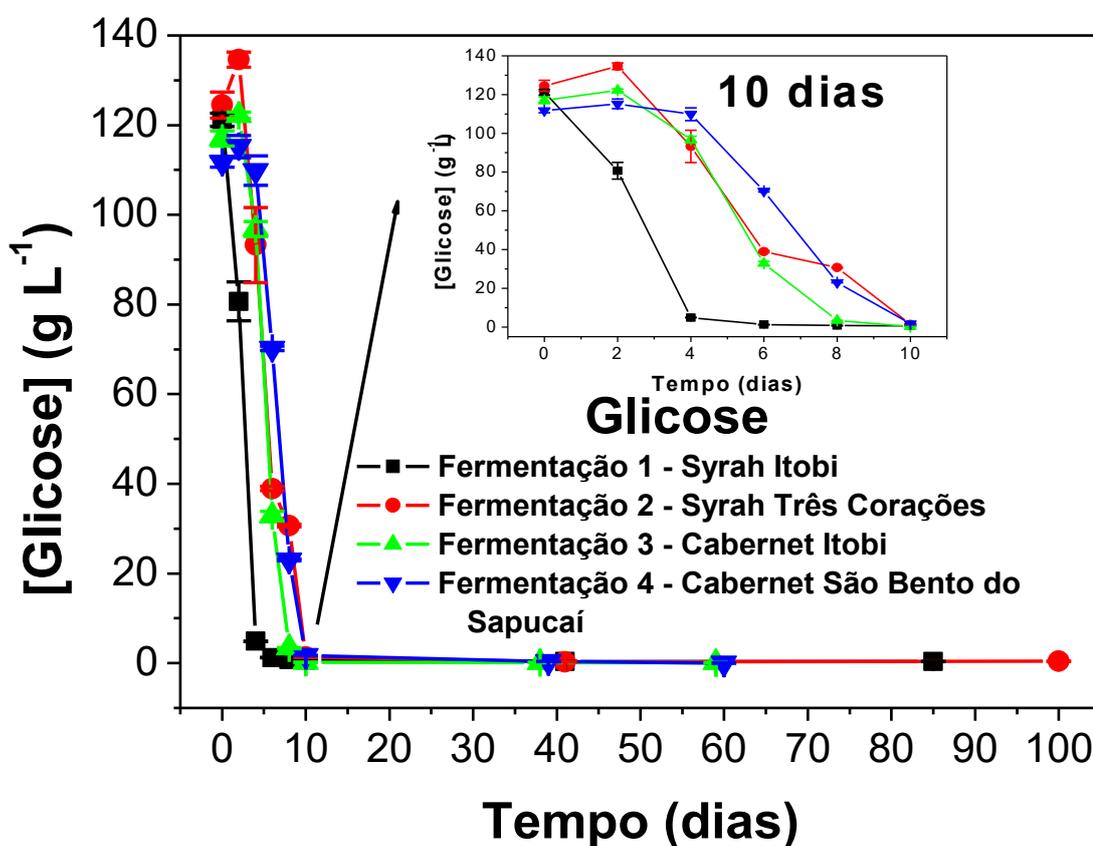
Dentre os compostos presentes nas uvas, os açúcares são extremamente importantes para produção de vinho, e também para diversos derivados. A concentração de açúcares é um dos critérios analisados no momento da colheita das uvas, e é fundamental, pois os açúcares servem como substrato para as leveduras durante a fermentação alcoólica para a produção de etanol. Para a obtenção de 10 °GL de álcool em vinho é necessário 180 g L⁻¹ de açúcares no mosto, pois para a obtenção de 1 °GL de álcool, são necessárias aproximadamente 18 g L⁻¹ de açúcares no mosto (RIZZON, 2006).

Tendo em vista a importância dos açúcares na produção de vinhos, foi realizada a quantificação de açúcares durante as Fermentações 1, 2, 3 e 4 de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon. As cinéticas das fermentações foram acompanhadas por análises cromatográficas pelo CLAE, e a quantificação foi realizada com tempo de fermentação, variando de acordo com a especificidade de cada processo. Na

Fermentação 1 e 2 o período de fermentação foi superior aos da Fermentação 3 e 4. Como a produção foi realizada em parceria com a EPAMIG, os pontos para análise foram selecionados de acordo com a produção industrial durante a vinificação.

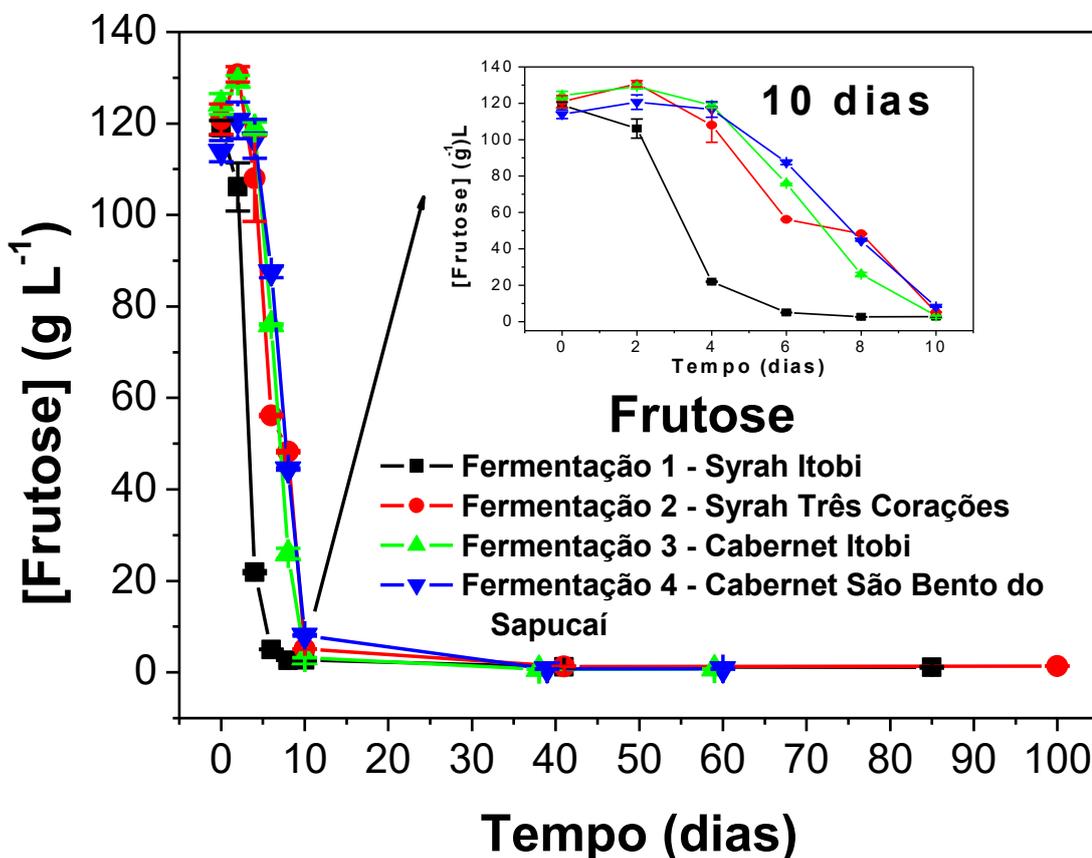
Os açúcares encontrados durante as fermentações foram a glicose (Figura 32) e frutose (Figura 33).

Figura 32 – Teores de glicose quantificados durante o tempo em dias na (-■-) Fermentação 1 (Syrah - Itobi), (-●-) Fermentação 2 (Syrah - Três Corações), (-▲-) Fermentação 3 (Cabernet - Itobi) e (-▼-) Fermentação 4 (Cabernet - São Bento do Sapucaí).



Fonte: Própria autora.

Figura 33 - Teores de frutose quantificados durante o tempo em dias na (-■-) Fermentação 1 (Syrah - Itobi), (-●-) Fermentação 2 (Syrah - Três Corações), (-▲-) Fermentação 3 (Cabernet - Itobi) e (-▼-) Fermentação 4 (Cabernet - São Bento do Sapucaí).



Fonte: Própria autora.

As uvas utilizadas são consideradas uvas de inverno, no qual a colheita ocorre no inverno, por isso apresentam altas concentrações de sólidos solúveis (°Brix de 22,31 (4) à 24,18 (3) (Tabela 16)), resultados estes que foram comprovados com as análises dos açúcares por cromatografia apresentados nas Figuras 32 e 33. Concentrações altas de glicose e frutose foram observadas em todas as fermentações e variando de 115,22 g/L (4) a 134,63 g/L (2) quanto a glicose e 119,03 g/L (1) a 130,73 g/L (2) quanto a frutose. Os açúcares presentes na uva variam em função de vários fatores, como o clima, o solo, o estágio de maturação e a variedade. De acordo com Conde *et al.* (2007), a sacarose é formada como resultado da fotossíntese das folhas, é transportada às bagas, onde sofre quebra pela ação da invertase e libera glicose e frutose, e o acúmulo de glicose e frutose inicia-se principalmente na fase de

maturação das uvas. Na Tabela 17 são mostrados os teores iniciais de glicose e frutose obtidos para as fermentações e a os valores das razões de glicose/frutose.

Tabela 17 - Teores iniciais de glicose e frutose durante as fermentações e razões glicose/frutose.

Fermentações	°Brix mosto	Glicose (g L ⁻¹)	Frutose (g L ⁻¹)	Razão glicose/frutose
1	24,15(0 dias)	121,20 (0 dias)	119,03 (0 dias)	1,02
2	23,98(0 dias)	124,49 (0 dias)	120,91 (0 dias)	1,03
3	24,18(0 dias)	117,04 (0 dias)	124,27 (0 dias)	0,94
4	22,31(0 dias)	111,73 (0 dias)	113,92 (0 dias)	0,98

1: Syrah Itobi; 2: Syrah Três Corações; 3: Cabernet Sauvignon Itobi; 4: Cabernet Sauvignon São Bento do Sapucaí.

Fonte: Própria autora.

Como mostra a Tabela 17 a maior concentração de glicose inicial foi de 124,49 ± 2,90 g L⁻¹, obtida para a Fermentação 2 com uvas Syrah (Três Corações). A maior concentração de frutose inicial foi de 124,27 ± 2,27 g L⁻¹ para a Fermentação 3 com uvas Cabernet Sauvignon de Itobi. Apesar das concentrações iniciais de glicose e frutose variarem com cada fermentação, as concentrações desses dois açúcares foram próximos. Aplin *et al.* (2019) também observaram concentrações próximas de glicose e frutose no mosto de uvas Chardonnay. Fraige *et al.* (2015) relataram que a razão entre glicose e frutose foi próxima a 1 no mosto de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon das regiões de Água Vermelha.

Dias *et al.* (2012) estudaram as características agrônômicas de uvas Syrah provenientes da região de Três Corações cultivadas em diferentes porta-enxertos, os teores de glicose foram 111,88 g L⁻¹ e frutose 92,75 g L⁻¹ para um dos estudos e para outro foram 109,61 e 97,05 g L⁻¹, resultando em razões de glicose e frutose próximos a 1. Esta proximidade ocorre, pois, fase de crescimentos das bagas, quando as uvas ainda estão verdes predomina a presença de glicose, na fase de maturação das uvas, geralmente a glicose e frutose se encontra presentes em quantidades semelhantes e na fase de sobrematuração, a frutose excede a glicose (AMERINE e OUGH, 1976).

As concentrações de açúcares ao longo das fermentações diminuem significativamente nos 10 primeiros dias (Figuras 32 e 33), pois durante este período a fermentação alcoólica é mais intensa, e as leveduras utilizam os açúcares como fonte de energia gerando principalmente etanol e gás carbônico.

Após este período os níveis de açúcares diminuíram consideravelmente. Para a Fermentação 1 os níveis residuais de glicose e frutose foram de $0,33 \pm 0,03$ e $1,12 \pm 0,16$ g L⁻¹, respectivamente, aos 85 dias de fermentação. Para a Fermentação 2 aos 100 dias, os níveis de glicose e frutose residuais foram de $0,41 \pm 0,04$ e $1,40 \pm 0,01$ g L⁻¹, respectivamente. Para a Fermentação 3 aos 59 dias, os níveis de glicose e frutose residuais foram de $0,11 \pm 0,01$, $0,74 \pm 0,06$ g L⁻¹, respectivamente e para a Fermentação 4 aos 60 dias, os níveis de frutose residual foi de $0,79 \pm 0,08$ g L⁻¹. Não foram observados níveis finais de glicose para a Fermentação 4.

Mota *et al.* (2018) estudaram os potenciais inibidores de bactérias lácticas nativas na vinificação de uvas oriundas da região sudeste do Brasil, no estudo analisaram a composição do vinho após a completa degradação do ácido málico, as concentrações finais de açúcares para vinhos de uvas Syrah das regiões de Itobi (56 dias de fermentação) e Três Corações (82 dias de fermentação) na colheita de inverno foram de 2,8 e 8,8 g L⁻¹, respectivamente. Para o vinho de uvas Cabernet Sauvignon de inverno da região Baependi (70 dias de fermentação) os açúcares residuais foram de 2,06 g L⁻¹.

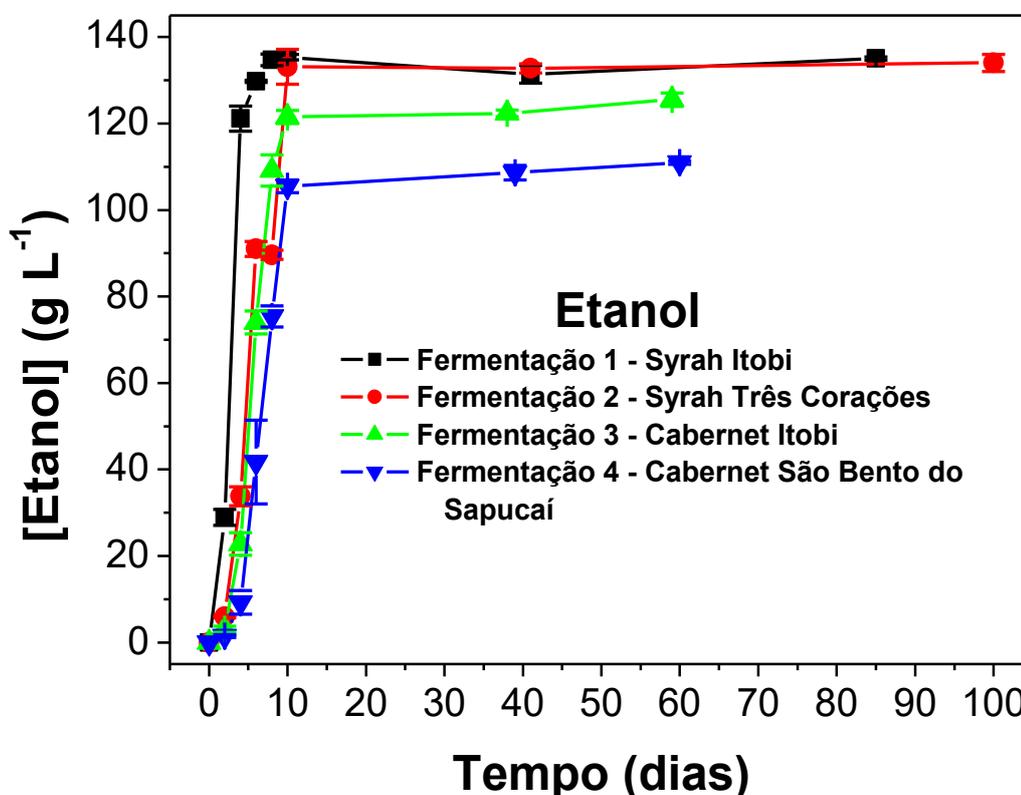
O conteúdo final de açúcares na produção de vinhos é muito importante, pois de acordo com a legislação brasileira os vinhos podem ser designados de acordo com este conteúdo. Os vinhos de mesa, finos e nobres podem ser designados como secos, meio secos, doce ou suaves, de acordo com o teor de açúcares totais, calculados em g L⁻¹ de glicose. O vinho seco deve apresentar teor de açúcar de até a 4 g L⁻¹, o meio seco entre 4 a 25 g L⁻¹ e o doce ou suave acima de 25 g L⁻¹ de glicose. No caso de vinhos produzidos com uvas *Vitis vinifera* (finos e nobres) o vinho suave ou doce passa a ter uma limitação de até 80 g L⁻¹ de glicose. Os vinhos licorosos podem ser designados de seco e doces também de acordo com teor de açúcares. O vinho licoroso seco deve possuir um teor menor ou igual a 20 g L⁻¹ de glicose enquanto no licoroso doce o teor deve ser igual ou superior a 20,1 g L⁻¹ de glicose (BRASIL, 2014).

3.3 Quantificação de etanol durante as fermentações de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon

Além dos açúcares, outro principal constituinte dos vinhos é o etanol formado durante a fermentação alcoólica. O etanol é responsável por parte do controle microbiológico em vinhos e está relacionado às características sensoriais da bebida.

Desta forma, também foi realizada a quantificação de etanol durante as Fermentações (1 e 2) das uvas Syrah e Fermentações (3 e 4) das uvas Cabernet Sauvignon. Foi utilizando CLAE e a quantificação foi realizada de acordo com o tempo de fermentação em dias, sendo que o tempo da análise variou dependendo da fermentação. Os teores de etanol produzido durante as fermentações são mostrados na Figura 34.

Figura 34 – Teor de etanol quantificado durante o tempo em dias na (-■-) Fermentação 1 (Syrah - Itobi), (-●-) Fermentação 2 (Syrah - Três Corações), (-▲-) Fermentação 3 (Cabernet - Itobi) e (-▼-) Fermentação 4 (Cabernet - São Bento do Sapucaí).



Fonte: Própria autora.

Uma elevação na concentração de etanol nos 10 primeiros dias de fermentação é observada na Figura 34, após este período, há uma tendência a atingir valores constantes na concentração de etanol conforme cada fermentação. Este resultado está relacionado a diminuição dos açúcares nos 10 primeiros dias de fermentação (Figuras 32 e 33), pois neste período a fermentação alcoólica é mais intensa, ocorrendo o consumo pelas leveduras da maior parte de açúcares presentes no meio,

e assim, aumentando da produção de etanol. Após este período, já não há açúcares suficientes e disponíveis para ação das leveduras, além de ocorrer inibição pela alta concentração de etanol. A Tabela 18 mostra as concentrações máximas de etanol produzido durante as fermentações em (g/L) e também a conversão para °GL (v/v).

Tabela 18 – Teores máximos de etanol produzido durante as fermentações.

Fermentações	Etanol máximo (g L ⁻¹)	Etanol máximo (°GL)
1	135,03 (85 dias)	17,15
2	134,03 (100 dias)	16,99
3	125,55 (59 dias)	15,90
4	110,97 (60 dias)	14,07

1: Syrah Itobi; 2: Syrah Três Corações; 3: Cabernet Sauvignon Itobi; 4: Cabernet Sauvignon São Bento do Sapucaí.

Fonte: Própria autora.

Apesar de ter sido utilizado as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* em todas fermentações alcoólicas, variando apenas as marcas comerciais, nas Fermentações 1 e 2, utilizando uvas Syrah, a produção de etanol foi maior em relação as Fermentações 3 e 4, das uvas Caberbet Sauvignon (Tabela 18). Ao final das Fermentações 1 e 2 as concentrações de etanol foram de $135,03 \pm 0,37$ e $134,03 \pm 1,92$ g L⁻¹, respectivamente. Já ao final das Fermentações 3 e 4 as concentrações de etanol foram de $125,55 \pm 1,55$ e $110,97 \pm 0,39$ g L⁻¹, respectivamente. Sendo os rendimentos das fermentações alcoólicas variando de 92 à 99%, nas Fermentações 1 e 4, respectivamente.

Como são uvas de inverno as altas concentrações iniciais de açúcares contribuíram para altas concentrações volumétricas de etanol após as fermentações alcoólica e malolática, que variaram de 14,07°GL à 17,15°GL (Tabela 18), sendo a concentração máxima permitida pela legislação Brasileira de 16°GL para vinhos nobres, de 8,6 à 14% para vinho de mesa e de 14 à 18% para vinho licoroso (BRASIL, 2018). De acordo com dados da EPAMIG, a classificação dos vinhos que serão elaborados pelas fermentações deste trabalho são: para Fermentação 1 vinho nobre, para a Fermentação 2 vinho licoroso, para a Fermentação 3 vinho nobre e para Fermentação 4 vinho de mesa. Assim, como a última amostragem foi realizada antes do final da produção dos vinhos, as últimas concentrações de etanol determinadas

serão homogeneizadas para estarem nos perfis de classificação segundo a legislação brasileira.

Oliveira *et al.* (2019a) avaliaram a composição química e o perfil sensorial de vinhos Syrah produzidos no município de Lagoa Grande em Pernambuco, o teor alcoólico variou de 11 a 12,9 % nos vinhos estudados entre os anos de 2014 a 2017. Segundo os autores, um dos fatores para menor teor alcoólico nos vinhos, foi a utilização de uvas provenientes de videiras mais jovens.

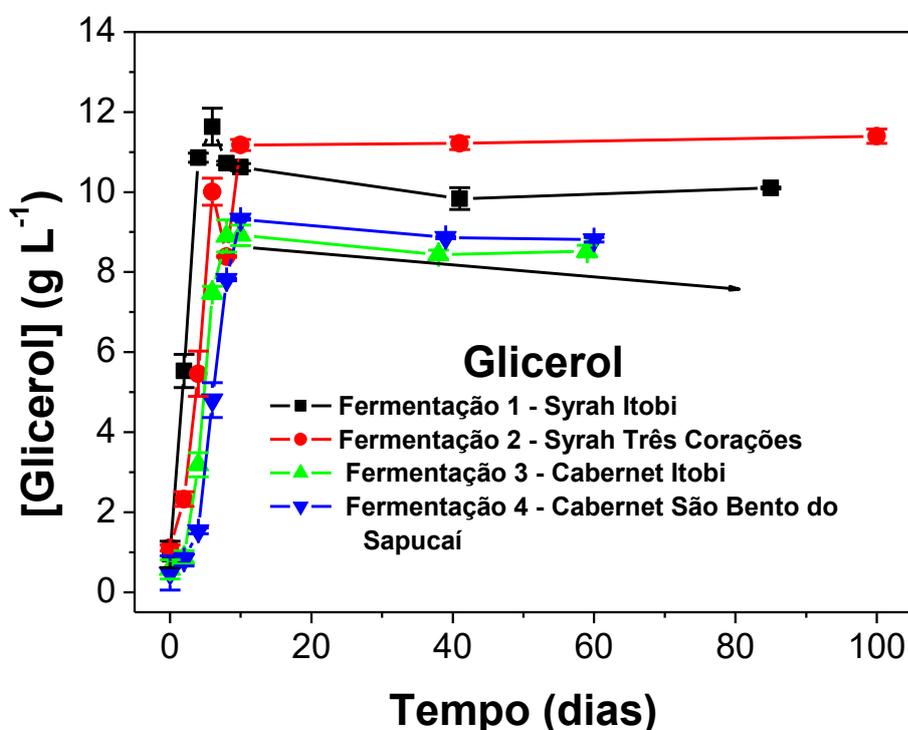
Boas (2017) realizou a caracterização físico-química de vinhos de inverno produzidos no sul de Minas Gerais, o teor alcoólico encontrado para os vinhos tinto de uvas Syrah da região de Três Corações foi de 14,2 % v/v e vinhos tintos de uvas Cabernet Sauvignon da região de Cordislândia o teor alcoólico foi de 15,35 % v/v, valores próximos aos determinados neste trabalho ao final das fermentações.

No estudo realizado por Mota *et al.* (2018), ao final da degradação completa do ácido málico após a fermentação malolática espontânea o teor alcoólico para vinhos de uvas Syrah das regiões de Itobi (56 dias de fermentação) e Três Corações (82 dias de fermentação) na colheita de inverno foram de 15,2 e 15% v/v, respectivamente. Para o vinho de uvas Cabernet Sauvignon de inverno da região Baependi (70 dias de fermentação) o teor alcoólico foi de 14,6% v/v.

3.4 Quantificação de glicerol durante as fermentações de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon

A produção de glicerol também foi avaliada por CLAE ao longo das fermentações 1, 2, 3 e 4 de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon. Os teores de glicerol determinados durante as fermentações são mostrados na Figura 35.

Figura 35 - Teor de glicerol quantificado durante o tempo em dias na (-■-) Fermentação 1 (Syrah - Itobi), (-●-) Fermentação 2 (Syrah - Três Corações), (-▲-) Fermentação 3 (Cabernet - Itobi) e (-▼-) Fermentação 4 (Cabernet - São Bento do Sapucaí).



Fonte: Própria autora.

Inicialmente todas as fermentações apresentaram concentrações iniciais baixas de glicerol porém, após aos 10 dias de fermentação alcoólica, as concentrações atingiram valores em torno de 10 g L⁻¹. As leveduras principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*, durante a fermentação alcoólica, produzem além de etanol e gás carbônico, compostos secundários como o glicerol que é um componente importante do ponto de vista quantitativo e qualitativo para vinhos (GUTIERREZ, 1991). A quantidade de glicerol formado durante a fermentação é cerca de 1:10 de etanol formado e é influenciada por vários fatores, como a variedade da uva, grau de maturação, pH do mosto e níveis de inoculação das levedura (ŠEHOVIĆ *et al.*, 2004).

O glicerol é muito importante pelas características sensoriais de sabor e suavidade de vinhos. Para vinhos secos o glicerol é encontrado nas concentrações que variam entre 4 a 10 g L⁻¹, e no caso dos vinhos com colheita tardia os níveis podem ser superiores a 20 g L⁻¹. (GAMELLA *et al.*, 2008). Neste trabalho, as concentrações finais foram maiores para as Fermentações 1 e 2 (com uvas Syrah),

com concentrações de $10,10 \pm 0,02$ e $11,39 \pm 0,17$ g L⁻¹ e para as Fermentações 3 e 4 as concentrações foram de $8,52 \pm 0,14$ e $8,81 \pm 0,05$ g L⁻¹, respectivamente. Gomes (2015), analisou a concentração de glicerol de vinhos elaborados com uvas Syrah do Vale do Rio São Francisco utilizando linhagens nativas e comerciais de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, além da fermentação espontânea, as concentrações de glicerol variaram entre $9,6 \pm 3,2$ a $8,3 \pm 0,4$ g L⁻¹ para as linhagens nativas, entre $8,8 \pm 0,4$ a $8,3 \pm 0,2$ g L⁻¹ para as linhagens comerciais e $9,2 \pm 0,3$ g L⁻¹ para a fermentação espontânea.

Berovič *et al.* (2007) analisaram a influência da temperatura de fermentação de uvas Sauvignon Blanc na formação de glicerol e observaram que a aplicação de choques térmicos rápidos, até 35°C, durante a fermentação induz um aumento de glicerol de até 65%. Segundo os autores, a maior concentração analisada foi de 11 g L⁻¹, indicando que a temperatura estimula a síntese do glicerol e a aplicação de choques térmicos durante a fermentação é um método simples para aumentar a concentração de glicerol em vinhos. Manfroi *et al.* (2006) obtiveram produção média de glicerol de 9,3 g L⁻¹ em vinhos elaborados com uvas Cabernet Franc produzidas nos municípios de Bento Gonçalves e Monte Belo do Sul. Gabbardo (2009) encontrou a concentração de glicerol de 8,98 g L⁻¹ em vinho tinto elaborado com uvas Cabernet Sauvignon provenientes da região de Bento Gonçalves, valor próximo aos obtidos no final das Fermentações 3 e 4 com uvas Cabernet Sauvignon.

Apesar da última amostragem ter sido realizada antes da finalização dos vinhos, de maneira geral, a quantificação de açúcares, etanol e glicerol foram próximas aos valores encontrados na literatura, e mostram resultados esperados no processo de vinificação.

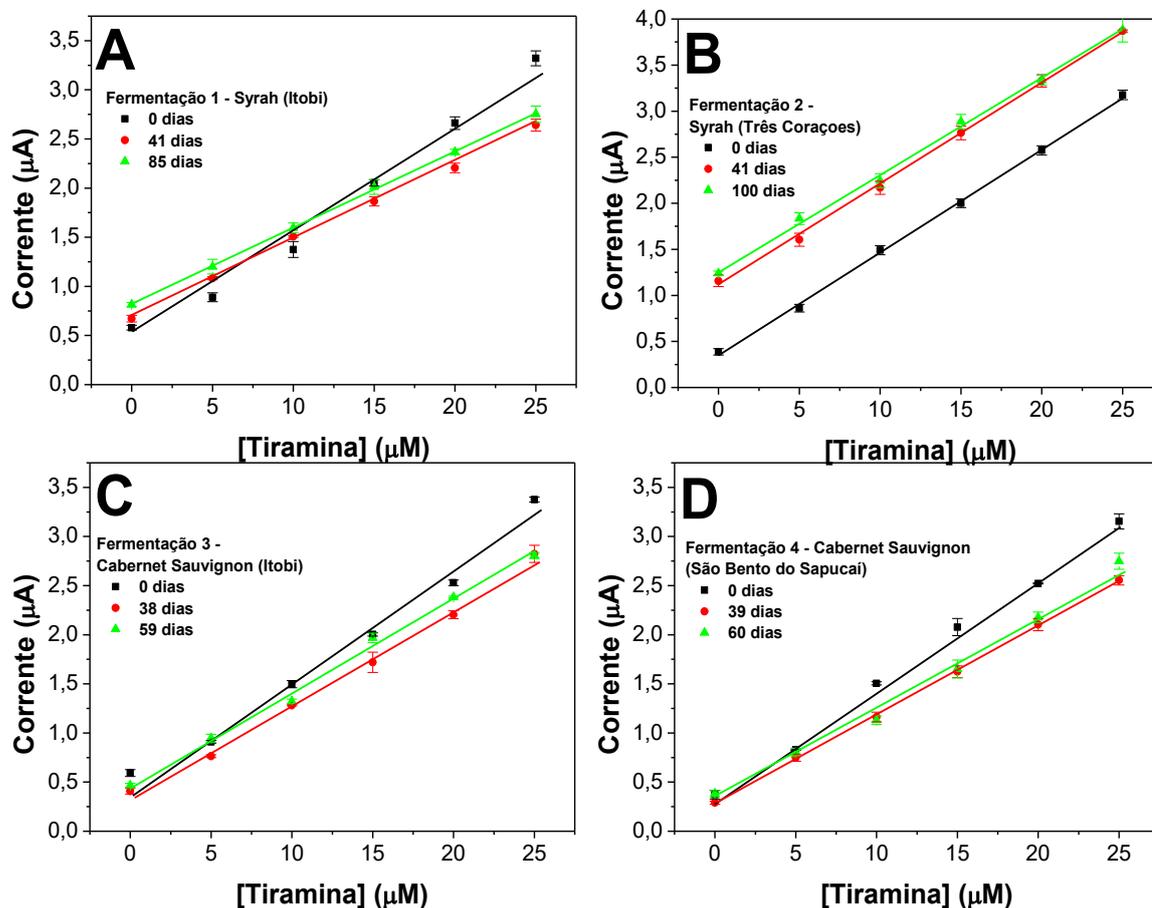
3.5 Determinação eletroanalítica de tiramina durante a fermentações de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon

Buscando entender a formação de tiramina em vinhos, foram realizadas determinações durante o processo fermentativo. A determinação foi realizada utilizando as técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), otimizadas com os eletrodos de carbono de grafite de lapiseira (ECGL), de acordo com as condições otimizadas no capítulo II.

Para isso, foram realizadas três amostragens durante quatro processos de vinificação de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon. Para a Fermentação 1 (Syrah-Itobi) a amostragem foi realizada nos tempos 0, 41 e 85 dias, para a Fermentação 2 a amostragem foi realizada nos tempos 0, 41 e 100 dias, para a Fermentação 3 a amostragem foi realizada nos tempos 0, 38 e 59 dias e para a Fermentação 4 nos tempos 0, 39 e 60 dias. O penúltimo dia de amostragem para as fermentações foram selecionados ao final da fermentação alcoólica e o último ao final da fermentação malolática.

Como nos vinhos, as matrizes das amostras fermentadas são complexas, sendo necessário levar em consideração o efeito da matriz no momento de análise. Então, foram elaboradas curvas de adição padrão de tiramina para cada uma das amostras de fermentação, considerando a metodologia para volume variável (HARRIS, 2008). Para isso, as amostras foram diluídas na proporção de 1:40 em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7 sem qualquer pré-tratamento, e foram realizadas medidas apenas nas amostras e após sucessivas adições de solução de tiramina 1 mmol L⁻¹ preparada também em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7 para a construção das curvas. A partir do aumento do sinal corrente é possível deduzimos quanto de tiramina está presente na amostra. As curvas de adição padrão de tiramina para as Fermentações (1, 2, 3 e 4) para a técnica de VPD são mostradas na Figura 36.

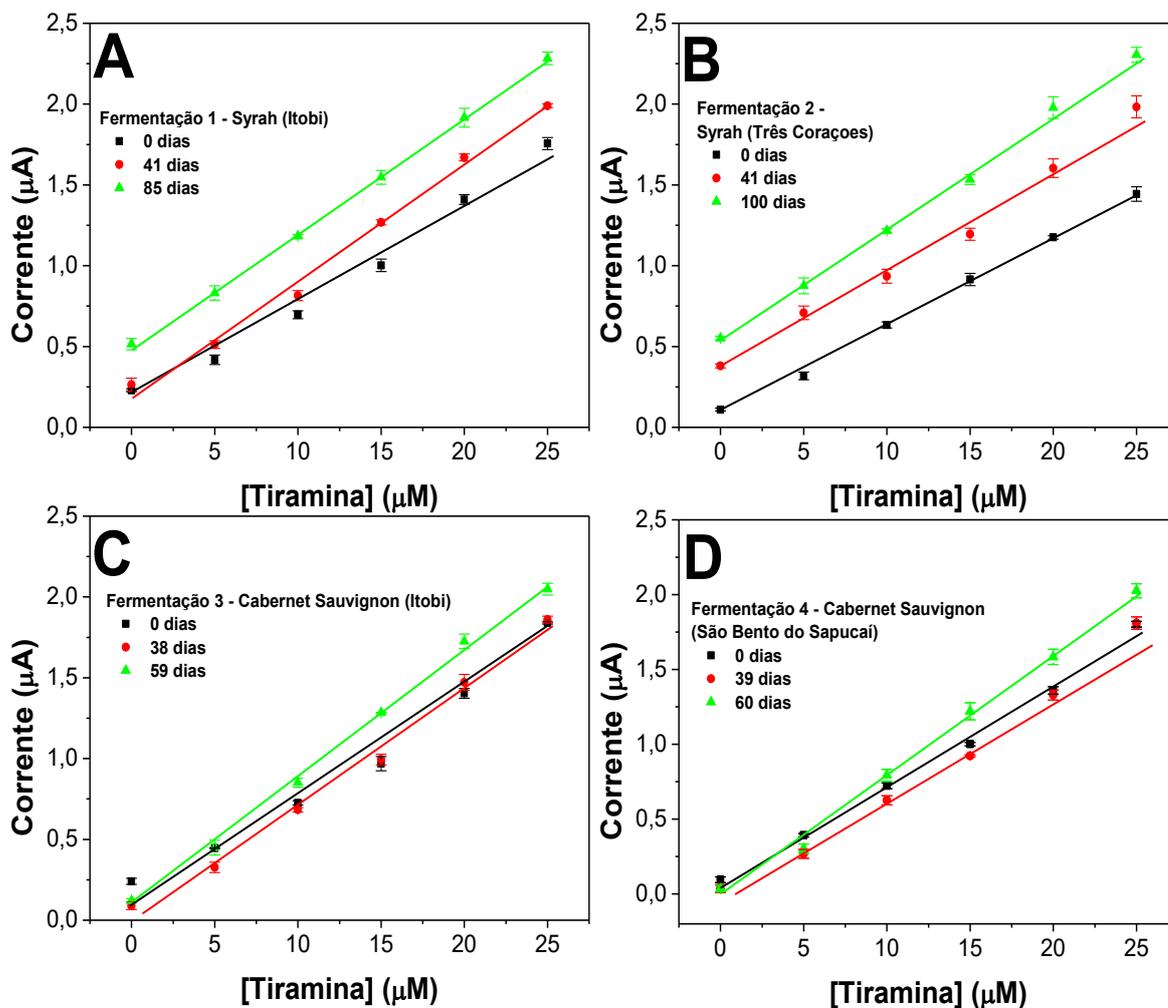
Figura 36 – Curvas de adição padrão de tiramina de correntes de pico *versus* a concentração de tiramina (amostra, 5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7 sobre os ECGL utilizando VPD amplitude de 50 mV e velocidade de 16 mV s^{-1} , para a (A) Fermentação 1, (B) Fermentação 2, (C) Fermentação 3 e (D) Fermentação 4 do sendo: (■) em 0 dias, (●) ao final da fermentação alcoólica e (▲) ao final da fermentação malolática.



Fonte: Própria autora.

De acordo com as curvas de adição padrão de tiramina obtidas para as fermentações utilizando VPD (Figura 36), houve um aumento linear de corrente de pico com o aumento da concentração da tiramina para todas as amostras analisadas. A diferença entre as inclinações das curvas para cada fermentação está relacionada às concentrações de tiramina em cada ponto de amostragem, desta forma, pode-se notar que ao longo dos dias de fermentação o conteúdo de tiramina tende a variar, levando em mudanças nas inclinações de cada curva obtida. Para as técnicas de VOQ as curvas de adição padrão de tiramina para as Fermentações (1, 2, 3 e 4) são mostradas na Figuras 37.

Figura 37 – Curvas de adição padrão de tiramina de correntes de pico *versus* a concentração de tiramina (amostra, 5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7 sobre os ECGL utilizando VOQ amplitude de 50 mV e velocidade de 16,14 mV s^{-1} , para a (A) Fermentação 1, (B) Fermentação 2, (C) Fermentação 3 e (D) Fermentação 4 do sendo: (■) em 0 dias, (●) ao final da fermentação alcoólica e (▲) ao final da fermentação malolática.



Fonte: Própria autora.

Para as curvas construídas para as amostras das fermentações utilizando VOQ também houve um aumento linear da corrente de pico com aumento da concentração de tiramina. Também é possível notar que as inclinações das curvas variam para cada fermentação, como na VPD, a variação está relacionada ao conteúdo de tiramina que tende a variar ao longo das fermentações, levando em mudanças nas inclinações das curvas obtidas. As equações lineares de corrente de pico *versus* concentração de tiramina para curvas mostradas nas Figuras 36 e 37 são mostradas na Tabela 19.

Tabela 19 - Equações lineares para as curvas de adição padrão de tiramina para as amostras durante as Fermentações 1, 2, 3 e 4 utilizando VPD e VOQ.

Fermentações	Tempo (dias)	Equação linear VPD	r ²	Equação linear VOQ	r ²
1	0	$y = 0,1126x + 0,4055$	0,9879	$y = 0,0624x + 0,1388$	0,9869
	41	$y = 0,0776x + 0,6921$	0,9987	$y = 0,0718x + 0,1894$	0,9923
	85	$y = 0,0778x + 0,8182$	0,9997	$y = 0,0712x + 0,4889$	0,9993
2	0	$y = 0,1119x + 0,3492$	0,9989	$y = 0,0544x + 0,0854$	0,9982
	41	$y = 0,1105x + 1,1008$	0,9986	$y = 0,0626x + 0,3514$	0,9896
	100	$y = 0,1049x + 1,2589$	0,9979	$y = 0,0708x + 0,5244$	0,9976
3	0	$y = 0,1102x + 0,4412$	0,9841	$y = 0,0635x + 0,1437$	0,9777
	38	$y = 0,0962x + 0,3313$	0,9947	$y = 0,072x + 0,0036$	0,9903
	59	$y = 0,0952x + 0,4585$	0,9960	$y = 0,0794x + 0,0865$	0,9977
4	0	$y = 0,1118x + 0,3467$	0,9973	$y = 0,0669x + 0,0585$	0,9942
	39	$y = 0,0906x + 0,2815$	0,9996	$y = 0,0706x + 0,0514$	0,9877
	60	$y = 0,0941x + 0,3055$	0,9916	$y = 0,0813x + 0,0231$	0,9962

1: Fermentação (Syrah Itobi); 2: Fermentação (Syrah Três Corações); 3: Fermentação (Cabernet Sauvignon Itobi), 4: Fermentação (Cabernet Sauvignon São Bento do Sapucaí); y: corrente de pico (µA) e x: [tiramina] (µM).

Fonte: Própria autora.

Pode-se observar que nas medidas realizadas apenas nas amostras, de acordo com as Figuras 36 e 37, há a presença de pequenos sinais de corrente, oriundos de picos no mesmo local de oxidação da tiramina para as técnicas. Um aumento linear da corrente de pico com aumento da concentração também foi observado, este fato, pode indicar que os sinais de corrente obtidos apenas na amostra podem ser provenientes da oxidação da tiramina. Outro fato que pode evidenciar esta indicação, são os bons coeficientes de linearidade obtidos na maioria das equações das curvas de adição padrão de tiramina nas amostras durante as fermentações (Tabela 19).

Para avaliar o desempenho da determinação de tiramina nas amostras utilizando as técnicas de VPD e VOQ, foram realizados estudos de adição e recuperação para cada ponto das fermentações. Foram utilizadas as curvas de adição padrão e uma concentração conhecida de solução padrão de tiramina 2,5 µmol L⁻¹ foi adicionada nas amostras. Os resultados para o estudo de adição, recuperação e *BIAS* (%) para as amostras durante as Fermentações 1 a 4 utilizando as técnicas de VPD e VOQ são mostrados nas Tabelas 20 e 21, respectivamente.

Tabela 20 - Estudo adição e recuperação para as Fermentações 1, 2, 3 e 4 por VPD.

Amostra	Tempo (dias)	[TIM] _{original} na amostra (μM)	[TIM] _{adicionada} (μM)	[TIM] _{recuperada} (μM)	R (%)	BIAS (%)
1	0	3,60	2,5	2,39 \pm 0,09	95,6 \pm 3,6	-4,4
	41	8,92	2,5	2,76 \pm 0,03	110,4 \pm 1,2	10,4
	85	10,52	2,5	2,60 \pm 0,20	104,0 \pm 8,0	4,0
2	0	3,12	2,5	2,74 \pm 0,03	109,6 \pm 1,2	9,6
	41	9,96	2,5	2,54 \pm 0,17	101,6 \pm 6,8	1,6
	100	12,00	2,5	2,31 \pm 0,20	92,4 \pm 8,0	-7,6
3	0	4,00	2,5	2,23 \pm 0,03	89,2 \pm 1,2	-10,8
	38	3,44	2,5	2,32 \pm 0,04	92,8 \pm 1,6	-7,2
	59	4,82	2,5	2,27 \pm 0,12	90,8 \pm 4,8	-9,2
4	0	3,10	2,5	2,27 \pm 0,07	90,8 \pm 2,8	-9,2
	39	3,11	2,5	2,69 \pm 0,07	107,6 \pm 2,8	7,6
	60	3,25	2,5	2,65 \pm 0,12	106,0 \pm 4,8	6,0

[TIM]: Concentração de tiramina; 1: Fermentação (Syrah Itobi); 2: Fermentação (Syrah Três Corações); 3: Fermentação (Cabernet Sauvignon Itobi) e 4: Fermentação (Cabernet Sauvignon São Bento do Sapucaí).

Fonte: Própria autora.

Tabela 21 - Estudo adição e recuperação para as Fermentações 1, 2, 3 e 4 por VOQ.

Amostra	Tempo (dias)	[TIM] _{original} na amostra (μM)	[TIM] _{adicionada} (μM)	[TIM] _{recuperada} (μM)	R (%)	BIAS (%)
1	0	2,22	2,5	2,33 \pm 0,16	93,2 \pm 6,4	-6,8
	41	2,64	2,5	2,57 \pm 0,17	102,8 \pm 6,8	2,8
	85	6,87	2,5	2,35 \pm 0,15	94,0 \pm 6,0	-6,0
2	0	1,57	2,5	2,63 \pm 0,09	105,2 \pm 3,6	5,2
	41	5,61	2,5	2,59 \pm 0,10	103,6 \pm 4,0	3,6
	100	7,41	2,5	2,66 \pm 0,05	106,4 \pm 2,0	6,4
3	0	2,26	2,5	2,61 \pm 0,18	104,4 \pm 7,2	4,4
	38	0,05	2,5	2,38 \pm 0,30	95,2 \pm 12	-4,8
	59	1,09	2,5	2,73 \pm 0,19	109,2 \pm 7,6	9,2
4	0	0,87	2,5	2,25 \pm 0,07	90,0 \pm 2,8	-10,0
	39	0,73	2,5	2,34 \pm 0,27	93,6 \pm 10,8	-6,4
	60	0,28	2,5	2,58 \pm 0,16	103,2 \pm 6,4	3,2

[TIM]: Concentração de tiramina; 1: Fermentação (Syrah Itobi); 2: Fermentação (Syrah Três Corações); 3: Fermentação (Cabernet Sauvignon Itobi) e 4: Fermentação (Cabernet Sauvignon São Bento do Sapucaí).

Fonte: Própria autora.

Diferenças nos conteúdos iniciais foram observados para as mesmas amostras utilizando técnicas diferentes (VPD e VOQ), a diferença está associada a sensibilidade das técnicas, que variam principalmente de acordo com a otimização de cada técnicas. Contudo, o estudo de adição e recuperação nas amostras durante as fermentações apresentaram excelentes taxas de recuperações, que variaram entre 89,2 \pm 1,2 a 110,4 \pm 1,2% para a técnica de VPD (Tabela 20), e para a VOQ (Tabela

21) a variação foi entre $90,0 \pm 2,8$ a $109,2 \pm 7,6\%$. Para ambas as técnicas os valores são aceitáveis para metodologias analíticas que podem variar entre 70 a 130% (PRICHARD E BARWICK, 2007)

As medidas de exatidão nas amostras foram satisfatórias, com os valores de *BIAS* entre - 10,8 a 10,4% e entre - 10,0 a 9,2% para as técnicas de VPD e VOQ, respectivamente. Para ambas as técnicas foram obtidos valores positivos e negativos de *BIAS*, os valores positivos indicam que o resultado da medida foi maior que o real adicionado de tiramina, e o negativo indica que resultado da medida foi menor que o valor real adicionado de tiramina. Apesar de alguns valores de *BIAS* estarem acima de 10%, os resultados ainda são satisfatórios e os valores medidos estão próximos aos valores reais adicionados de tiramina (HARRIS, 2008).

Todas amostras apresentaram conteúdo inicial de tiramina no mosto (0 dias), este conteúdo pode ter sido liberado nos mostos como consequência da hidrólise de compostos amida hidroxicinâmicos presentes principalmente no pericarpo nas uvas e hidrolisados por ação de leveduras (RESTUCCIA *et al.*, 2017). Para as fermentações 3 e 4 os períodos de maceração foram maiores que os realizados nas fermentações 1 e 2, apesar de se esperar uma maior concentração de tiramina para maiores períodos de maceração, levando em consideração que as aminas biogênicas podem ser oriundas da própria casca da uva, este resultado não foi observado. Contudo, em alguns casos, foi possível observar tendências nas concentrações de tiramina presentes nas amostras originais durante os processos fermentativos.

Nas Fermentações 1 e 2, de acordo os resultados apresentados nas Tabelas 20 e 21 para VPD e VOQ, ocorreu o aumento da concentração de tiramina ao longo do processo de fermentação. Contudo, para as Fermentações 3 e 4, as medidas não apresentaram resultados sequenciais de elevação ou diminuição da concentração de tiramina nas amostras ao longo das fermentações. Estes resultados podem estar relacionados a variedade de uvas utilizadas, já que as Fermentações 1 e 2 foram realizadas com uvas Syrah e as Fermentações 3 e 4 foram utilizadas uvas Cabernet Sauvignon. Yildirim *et al.* (2007) observaram diferenças significativas nos teores de tiramina entre variedades de *Vitis vinifera* cultivadas na Turquia. Restuccia *et al.* (2017) estudaram o perfil de aminas biogênicas em uvas tintas cultivadas na Calábria durante a vinificação, na cultivar Arvino o mosto apresentou 5 mg L^{-1} de tiramina e este valor passou a $5,3 \text{ mg L}^{-1}$ no vinho, segundo os autores o conteúdo total de aminas biogênicas aumentou 79% (cultivar Arvinos) após a fermentação alcoólica o

que indica que nas amostras estudadas a presença de amins biogênicas estava ligada principalmente a fermentação alcoólica com valores diferentes de tiramina conforme a variedade das uvas.

Segundo Wang *et al.* (2014), durante a fermentação alcoólica, as amins biogênicas são formadas como consequência dos processos metabólicos normais das leveduras. Outro fato que pode ter contribuído para os resultados são que nas Fermentações 3 e 4 de uvas Cabernet Sauvignon a fermentação malolática ocorreu de forma espontânea, sem inoculação de bactérias lácticas. Já para as Fermentações 1 e 2 foram utilizados bactéria lácticas comerciais de *Oenococcus oeni*.

Oenococcus oeni está entre as espécies mais utilizadas nas fermentações maloláticas, entretanto as espécies *Pediococcus* e *Lactobacillus* estão geralmente mais associadas a deterioração e formação de compostos indesejáveis, e podem sobreviver e crescer durante a fermentação malolática, principalmente se o pH do vinho estiver acima de 3,5 (DU TOIT *et al.*, 2011). Além disso, a fermentação malolática espontânea pode não ocorrer de maneira eficiente, pois o crescimento de *Oenococcus oeni* pode ser inibido por várias propriedades físico-químicas do vinho. Os principais parâmetros do vinho que afetam a fermentação malolática e crescimento de *Oenococcus oeni* são o etanol (superior a 16%v/v), pH baixo (tipicamente menos do que 3,5) SO₂ (maior que 10 mg L⁻¹) e baixas temperaturas (inferior a 12°C) (BETTERIDGE, GRBIN E JIRANEK, 2015).

Mota *et al.* (2018) avaliaram os potenciais inibidores da fermentação malolática em vinhos de uvas da região Sudeste do Brasil e concluíram que temperaturas menores que 12°C diminuem o metabolismo de bactérias lácticas e, quando associadas com pH abaixo de 3,2 e concentração de SO₂ maior que 15 mg L⁻¹ pode prejudicar o crescimento e atividade. Por este motivo, o conhecimento da composição do mosto e o controle da temperatura de fermentação alcoólica é muito importante para diminuir a fase latente das bactérias lácticas, principalmente em fermentações malolática espontâneas.

Gardini *et al.* (2005) estudaram os fatores que influenciam a produção de amins biogênicas por cepas de *Oenococcus oeni* isoladas de vinho tinto da Itália submetido a uma fermentação espontânea, no estudo observaram que a produção de tiramina foi reduzida em altas concentrações de etanol (cerca de 12%) e pH baixos (em torno de 3), este fato deve ser atribuído aos efeitos dessas variáveis na atividade e viabilidade metabólico celular das bactérias lácticas.

O estudo da produção de tiramina por cepas de *Enterococcus faecium* em vinho tinto foi realizado por Capozzi *et al.* (2011) durante a fermentação espontânea. Os autores observaram que a tiramina aumentou cerca de quatro vezes a mais que a concentração inicial presente no início da fermentação, quando a concentração de etanol foi de 10% v/v, porém quando a concentração de etanol foi de 12% v/v não foi observado produção significativa. Rosi *et al.* (2009) avaliaram a capacidade de produção de aminas biogênicas através da utilização de linhagens selvagens de *Oenococcus oeni* na produção de vinhos de uvas Sangiovese, as cepas passaram a produzir tiramina após a conclusão da fermentação malolática (15 dias), quando a população bacteriana estava diminuindo, a produção foi de 10 mg L⁻¹ tiramina.

A fermentação malolática espontânea propiciada provavelmente pelo menor teor alcoólico dos vinhos para as uvas Cabernet Sauvignon podem ter contribuído para os resultados obtidos. Vale ressaltar que a presença da tiramina nos diferentes períodos de fermentações pode estar relacionada a diversos fatores, como a disponibilidade de aminoácido, serem formadas nas próprias fermentações e devido as variedades de uvas utilizadas como já foi mencionado, ou devido as condições de vinificação. Desta forma, neste trabalho foi possível observar a presença de tiramina e realizar a quantificação para diferentes fermentações durante a etapa de elaboração de vinhos tintos, aliada a utilização de técnicas simples, utilizando eletrodos de material de baixo custo e com excelentes taxas de recuperações.

4 CONCLUSÕES PARCIAIS

De acordo com os resultados apresentados, as características físico-químicas para os mostos analisados foram influenciadas pelas regiões de cultivos e variedade das uvas.

As concentrações de glicose e frutose iniciais encontradas para todas as amostras foram bem próximas, indicando que as uvas estavam maduras. Os teores de açúcares diminuíram significativamente ao longo dos 10 primeiros dias de fermentação alcoólica, concomitante com o aumento no teor de etanol tendendo a atingir valores constantes após este período. A fermentação das uvas Syrah apresentaram maiores produção de etanol e glicerol comparadas às realizadas com uvas Cabernet Sauvignon.

Houve um aumento linear da corrente de pico com o aumento das concentrações de tiramina para todas as amostras, com coeficientes bons de linearidade. As concentrações de tiramina utilizando VPD e VOQ nas amostras originais tenderam a aumentar para as fermentações com uvas Syrah, e não apresentaram tendências a diminuição e aumento para as fermentações com uvas Cabernet Sauvignon que realizaram a fermentação malolática de forma espontânea. Além disso, a fermentação malolática para fermentações com uvas Syrah mostrou ser a principal etapa de formação de tiramina nos vinhos, porém a fermentação alcoólica também contribuiu para o aumento de tiramina.

No estudo de adição e recuperação foram obtidas taxas de recuperação das técnicas de VPD e VOQ que variaram de $89,2 \pm 1,2$ a $110,4 \pm 1,2\%$ e entre $90,0 \pm 2,8$ a $109,2 \pm 7,6\%$, respectivamente. Boas exatidões também foram obtidas, com valores de BIAS (%) que variaram entre - 10,8 a 10,4% e entre - 10,0 a 9,2% para as técnicas de VPD e VOQ, respectivamente.

5 CONCLUSÕES FINAIS

Com os estudos realizados neste trabalho foi possível quantificar o conteúdo de tiramina presente em vinhos tintos e durante as fermentações utilizando as técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial e Voltametria de Onda Quadrada. A utilização das metodologias desenvolvidas, possibilitaram a determinação direta e sem a utilização de qualquer etapa de pré-tratamento de amostras. Em comparação a outras metodologias de determinação de tiramina a utilização das técnicas eletroanalíticas aliadas a utilização dos eletrodos de carbono de grafite de lapiseira Pentel, dureza HB de baixo custo é uma excelente alternativa para fornecer uma determinação rápida, confiável e simples da tiramina em vinhos.

REFERÊNCIAS

- ALANÓN, M. E.; SCHUMACHER, R.; DÍAZ-MAROTO, M. C.; GÓMEZ-ALONSO, S.; PÉREZ-COELLO, M. S. Alternative amendment for vineyards from by-products of pyro-bituminous shale: Effect on wine amino acids and biogenic amines. **Food Research International**, v.101, p. 239-248, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.008>
- ALVES, M. DE F.; CORRÊA, R. A. M. DE S.; CRUZ, F. S. DA; FRANCO, D. L.; FERREIRA, L. F. Electrochemical enzymatic fenitrothion sensor based on a tyrosinase/poly(2-hydroxybenzamide)-modified graphite electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 553, p. 15-23, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.05.014>
- ALVES, R. DA F.; SILVA, A. G. DA; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L. Synthesis and characterization of a material derived from 4-mercaptobenzoic acid: A novel platform for oligonucleotide immobilization. **Talanta**, v.165, p. 69-75, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.025>
- AMERINE, M.A., OUGH, C.S. Análisis de vinos y mostos. **Zaragoza: Editorial Acribia**, 1976. 157 p.
- AMORIM, D. A. DE; FAVERO, A. C.; REGINA, M. DE A. Produção extemporânea da videira, cultivar Syrah, nas condições do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 327–331, 2005.
<https://doi.org/10.1590/S0100-29452005000200036>
- AMORIM, H. V; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. Processo de produção de álcool – controle e monitoramento. FERMENTEC, Piracicaba, 1996.
- ANGULO M. F.; FLORESA M.; ARANDAB M.; AEDOA K. H. Fast and selective method for biogenic amines determination in wines and beers by ultra high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125-689, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125689>
- ANVISA-BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**, 2003.
- ALCAIDE-HIDALGO, J.M. et al., Partial characterization of peptides from red wines. Changes during malolactic fermentation and ageing with lees. **Food Chemistry, Barking**, v. 107, p.622-630, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.054>
- APETREI, I. M.; APETREI, C. Amperometric biosensor based on polypyrrole and tyrosinase for the detection of tyramine in food samples. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v.178, p. 40-46, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.064>

APETREI, I. M.; APETREI, C. The biocomposite screen-printed biosensor based on immobilization of tyrosinase onto the carboxyl functionalised carbon nanotube for assaying tyramine in fish products. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 1–8, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.036>

APLIN, J. J.; WHITE, K. P.; EDWARDS, C. G. Growth and metabolism of non-Saccharomyces yeasts isolated from Washington state vineyards in media and high sugar grape musts. **Food Microbiology**, v. 77, p. 158–165, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.004>

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. Biotecnologia Industrial- Biotecnologia na produção de alimentos. **São Paulo: E. Blücher**, 2014.

BACH, B.; QUERE, S. LE; VUCHOT, P.; GRINBAUM, M.; BARNAVON, L. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. **Analytica Chimica Acta**, v.732, p. 114 –119, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.036>

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.

[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89169-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89169-4)

BEROVIČ, M.; PIVEC, A.; KOŠMERL, T.; WONDRA, M.; ČELAN, Š. Influence of heat shock on glycerol production in alcohol fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, p. 135–139, 2007.

<https://doi.org/10.1263/jbb.103.135>

BETTERIDGE, A.; GRBIN, P.; JIRANEK, V. Improving Oenococcus oeni to overcome challenges of wine malolactic fermentation. **Trends in Biotechnology**, 2015.

BILGIN, B.; GENÇCELEP, H. Determination of biogenic amines in fish products. **Food Science and Biotechnology**, 2015.

<https://doi.org/10.1007/s10068-015-0251-4>

BOAS, A. C. V. Caracterização físico-química, atividade antioxidante e perfil de compostos fenólicos em vinhos de inverno produzidos e comercializados no sul de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de Lavras**, 2017.

BÓKA, B.; ADÁNYI, N.; VIRÁG, D.; SEBELA, M.; KISS, A. Spoilage Detection with Biogenic Amine Biosensors, Comparison of Different Enzyme Electrodes. **Electroanalysis**, v. 24, p. 181-186, 2012.

BOTELHO, R. V.; PIRES, E. J. P. Viticultura como opção de desenvolvimento para os Campos gerais. **II Encontro de fruticultura dos Campos Gerais**, p. 1-16, 2009.

BRASIL. Lei nº 7.678, 8 de novembro de 1988. **Diário da República**, 1ª série - nº 116, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. Aprovar as Normas referentes a “Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1988. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso: 07 de out. de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2018. Aprovar as Normas referentes a “Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2018. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso: 07 de jan. de 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2014. Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 18 set. 2019.

BRASIL. DECRETO Nº 8.198, DE 20 DE FEVEREIRO DE 2014. **Diário da República, 1ª série - nº 116**, 2014.

BRUNETTO, G.; CERETTA, C. A.; KAMINSKI, J.; GIROTTI, E.; TRENTIN, E. E.; LOURENZI, C. R.; MELO, G. W. DE; VIEIRA, R. C. B.; GATIBONI, L. C. Grapes yield and chemistry composition in Cabernet Sauvignon grapevine with nitrogen fertilization. **Ciencia Rural**, v. 39, p. 2035–2041, 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000162>

CANTARINI, M. V.; PAINTER, C. J.; GILMORE, E. M.; BOLGER, C.; WATKINS, C. L.; HUGHES, A. M. Effect of oral linezolid on the pressor response to intravenous tyramine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2004.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02186.x>

CAO, D.; XU, X.; XUE, S.; FENG, X.; ZHANG, L. An in situ derivatization combined with magnetic ionic liquid-based fast dispersive liquid-liquid microextraction for determination of biogenic amines in food samples. **Talanta**, v. 199, p. 212–219, 2019A.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.065>

CAO, Q.; HENSLEY, D. K.; LAVRIK, N. V.; VENTON, B. J. Carbon nanospikes have better electrochemical properties than carbon nanotubes due to greater surface roughness and defect sites. **Carbon**, v. 133, p. 107–480, 2019B.
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.08.064>

CARDOSO, R. M.; SILVA, P. R. L.; LIMA, A. P.; et al. 3D-Printed graphene/polylactic acid electrode for bioanalysis: Biosensing of glucose and simultaneous determination of uric acid and nitrite in biological fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, p. 250–257, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127621>

CARUSO, M.; FIORE, C.; CONTURSI, M.; SALZANO, G.; PAPARELLA, A.; ROMANO, P. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 159–163, 2002.

<https://doi.org/10.1023/A:1014451728868>

CASTRO, C. M. DE; VIEIRA, S. N.; GONÇALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine. **Journal of Materials Science**, v. 43, p. 475 - 482, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s10853-007-1880-7>

CAPOZZI, V.; LADERO, V.; BENEDUCE, L.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A.; BENOIT, B.; LAURENT, B.; GRIECO, F.; SPANO, G. Isolation and characterization of tyramine-producing *Enterococcus faecium* strains from red wine. **Food Microbiology**, v. 228, p. 434–439, 2011.

COELHO, E. M.; SILVA PADILHA, C. V. DA; MISKINIS, G. A.; SÁ, A. G. B. DE; PEREIRA, G. E.; AZEVÊDO, L. C. DE; SANTOS LIMA, M. DOS. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160–167, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>

CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A. C. P.; TAVARES, R. M.; SOUSA, M. J.; AGASSE, A.; DELROT, S.; GERÓS, H. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Food**, v. 1, p. 1–22, 2007.

COSTA, D. J. E.; MARTÍNEZ, A. M.; RIBEIRO, W. F.; et al. Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry. **Talanta**, v. 154, p. 134–140, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.063>

CHERAGHI, S.; TAHER, M. A.; KARIMI-MALEH, H. Highly sensitive square wave voltammetric sensor employing CdO/SWCNTs and room temperature ionic liquid for analysis of vanillin and folic acid in food samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 62, p. 254-259, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.06.006>

CIRILO, M. P. G.; COELHO, A. F. S.; ARAÚJO, C. M.; GONÇALVES, F. R. B.; NOGUEIRA, F. D.; GLÓRIA, M. B. A. Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee. **Food Chemistry**, v. 82, p.397-402, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00560-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00560-5)

CLIMATE. Dados climáticos para cidade mundiais. Disponível em: <https://pt.climate-data.org/>. Acesso em: 10 de janeiro de 2020.

COELHO, E. M.; SILVA PADILHA, C. V. DA; MISKINIS, G. A.; SÁ, A. G. B. DE; PEREIRA, G. E.; AZEVÊDO, L. C. DE; SANTOS LIMA, M. DOS. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160–167, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. **Monitoramento agrícola- Safra 2018/2019. 5º Levantamento**, 2019.

CONNIL, N.; BRETON, Y. LE; DOUSSET, X.; AUFRAY, Y.; RINCÉ, A.; PRÉVOST, H. Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3537–3544, 2002.

<https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3537-3544.2002>

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; RODRIGUES, B. L.; LAZARO, C. A.; SILVA, A. C. O.; CRUZ, A. G.; CONTE JUNIOR, C. A. Determination of biogenic amines by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) in probiotic cow's and goat's fermented milks and acceptance. **Food Science & Nutrition**, v. 3, p. 172-178, 2015.

<https://doi.org/10.1002/fsn3.200>

COTON, M.; ROMANO, A.; SPANO, G.; ZIEGLER, K.; VETRANA, C.; DESMARAIS, C.; LONVAUD-FUNEL, A.; LUCAS, P.; COTON, E. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1078-1085, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.012>

DANIEL, D.; DOS SANTOS, V. B.; VIDAL, D. T. R.; DO LAGO, C. L. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1416, p. 121–128, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.065>

DAL'OSTO, M. C. Emprego da marcação a frio na extração e estabilização de compostos fenólicos em vinhos de Syrah cultivada em ciclo de outono-inverno. Dissertação de Mestrado, **Universidade de São Paulo**, 2012.

DIAS, F. A. N.; MOTA, R. V. DA; FÁVERO, A. C.; PURGATTO, E.; SHIGA, T. M.; SOUZA, C. R. DE; PIMENTEL, R. M. DE A.; REGINA, M. DE A. Videira “Syrah” sobre diferentes porta-enxertos em ciclo de inverno no sul de Minas Gerais.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 47, p. 208–2015, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000200009>

DIAS, F. A. N.; MOTA, R. V. DA; SOUZA, C. R. DE; PIMENTEL, R. M. DE A.; SOUZA, L. C. DE; SOUZA, A. L. DE; REGINA, M. DE A. Rootstock on vine performance and wine quality of ‘syrah’ under double pruning management. **Scientia Agricola**, v. 74, p. 134–141, 2017.

<https://doi.org/10.1590/1678-992x-2015-0384>

EDWARDS, J. A.; BECK, M.; RIEGGER, C.; BAUSCH, J. Safety of resveratrol with examples for high purity, trans-resveratrol, resVida». **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 131–137, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05855.x>

EFSA, *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos), 2011.

EKICI, K.; OMER, A. K. The determination of some biogenic amines in Turkish fermented sausages consumed in Van. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 639-643, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.05.008>

ERDOGAN, Z. O.; AKIN, I.; KUCUKKOLBASI, S. A new non-enzymatic sensor based on TiO₂-Ag/polypyrrole for electrochemical detection of tyramine. **Synthetic Metals**, v. 246, p. 96–100, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2018.10.006>

EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Directive 2003/11/EC. **Official Journal of the European Union**, 2003.

FAO. O Estado Da Segurança Alimentar E Nutricional No Brasil. Um retrato Multidimensional. **Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO)**, 2014.

FAVERO, A. C.; AMORIM, D. A. DE; MOTA, R. V. DA; SOARES, Â. M.; REGINA, M. D. A. Viabilidade de produção da videira “Syrah”, em ciclo de outono inverno, na região sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 685–690, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000300021>

FELIPPETO J.; ALEMBRANDT R.; CIOTTA N. M. Maturação e composição das uvas Cabernet Sauvignon e Merlot produzidas na região de São Joaquim, SC. **Agropecuária Catarina, Florianópolis**, v.29, p.74-79, 2016.

FISAR, Z. Drugs related to monoamine oxidase activity. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 69, p.112-124, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.02.012>

FRAIGE, K. Estudo comparativo do perfil metabolômico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera*) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bioanalíticas. **Tese de Doutorado apresentada a Universidade de São Paulo**, 2012.

FRAIGE, K.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; CARRILHO, E.; JORRÍN-NOVO, J. V. Metabolite and proteome changes during the ripening of Syrah and Cabernet Sauvignon grape varieties cultured in a nontraditional wine region in Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 113, p. 206 – 225, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.021>

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDRE, P. L. Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 890–894, 1995.

<https://doi.org/10.1021/jf00052a008>

FRAGA, K. F. Aminas bioativas durante a maturação de uvas syrah produzidas em diferentes regiões e sistemas de condução. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

FUGELSANG, K. C.; FUGELSANG, K. C. The Lactic Acid Bacteria. *In: Wine Microbiology*. [s.l: s.n.]. , 1997.

<https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6970-8>

GABBARDO M. Borrás finas e manoproteínas na maturação de vinho tinto cabernet sauvignon. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de Pelotas**, 2009.

GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Integrated multienzyme electrochemical biosensors for the determination of glycerol in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 609, p. 201–209, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.12.036>

GARCÍA, M.; TRIGUEROS, Á.; ESCRIBANO-BAILÓN TERESA, T. Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, p.455–462, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.02.003>

GARDINI, F.; ZACCARELLI, A.; BELLETTI, N.; FAUSTINI, F.; CAVAZZA, A.; MARTUSCELLI, M.; MASTROCOLA, D.; SUZZI, G. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. **Food Control**, v. 16, p. 609–616, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.06.023>

GALUS Z. Fundamentals of Electrochemical Analysis, 1994.

GENC, M.; GENC, S.; GOKSUNGUR, Y. Exergy analysis of wine production: Red wine production process as a case study. **Applied Thermal Engineering**, v. 117, p.511-521, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2017.02.009>

GIANOTTI, V.; CHIUMINATTO, U.; MAZZUCCO, E.; et al. A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, p. 296–300, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.038>

GINTEROVÁ, P.; MARÁK, J.; STAŇOVÁ, A.; MAIER, V.; ŠEVČÍK, J.; KANIANSKY, D. Determination of selected biogenic amines in red wines by automated on-line combination of capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.904, p. 135-139, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.018>

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. *In: Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - 4 Volume Set.* [s.l: s.n.]. p. 38, 2005.

GLÓRIA, M. B. A.; VIEIRA, S. M. Technological and Toxicological Significance of Bioactive Amines in Grapes and Wines. **Global Science Books**, v. 1, p. 258–270, 2007.

GOMES, C. M. P. B. S. P. Linhagens de *saccharomyces cerevisiae* isoladas de uvas do vale do são francisco como produtoras de vinhos. Dissertação de Mestrado. **Universidade Estadual de Feira de Santana**, 2015.

GRANATO, T. M.; FERRANTI, P.; IAMETTI, S.; BONOMI, F. Affinity and selectivity of plant proteins for red wine components relevant to color and aroma traits. **Food Chemistry**, v.256, p. 235-243, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.085>

GU, J.; LIU, T.; HOU, J.; PAN, L.; SADIQ, F. A.; YUAN, L.; YANG, H.; HE, G. Analysis of bacterial diversity and biogenic amines content during the fermentation processing of stinky tofu. **Food Research International**, v.111, p. 689-698, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.065>

GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGOS, U. A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinho. Documento n. 48, Bento Gonçalves, 2005. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Doc48_000fr0xs4b002wyiv80084arltly8ck45.pdf>. Acesso em junh. 2019.

GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 48, p. 55–69, 1991.

<https://doi.org/10.1590/S0071-12761991000100005>

HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. **Biogenic amines and their production by microorganisms in food** *Trends in Food Science and Technology*, v.5, p.42-49,1994.

HAMMERICH, H.L.O.; SVENSMARK, B. Anodic oxidation of oxygen-Containing compounds. *Organic Electrochemistry An Introduction and a Guide*, **Marcel Dekker, New York**, p. 589-620, 1991.

HARRIS, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, **LTC**, Rio de Janeiro, 7^a edição, 2008

HASEEB, S.; ALEXANDER, B.; SANTI, R. L.; LIPRANDI, A. S.; BARANCHUK, A. What's in wine? A clinician's perspective,. **Trends in Cardiovascular Medicine**, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2018.06.010>

HENRÍQUEZ-AEDO, K.; DURÁN, D.; GARCIA, A.; HENGST, M. B.; ARANDA, M. Identification of biogenic amines-producing lactic acid bacteria isolated from spontaneous malolactic fermentation of chilean red wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 183–189, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.003>

HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, p. 1270–1281, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.020>

HOYOS-ARBELÁEZ, J.; VÁZQUEZ, M.; CONTRERAS-CALDERÓN, J. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. **Food Chemistry**, v. 221, p.1371-1381, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.017>

HU, K.; JIN, G. J.; XU, Y. H.; TAO, Y. S. Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v.108, p.119-127, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.037>

HUANG, J.; XING, X.; ZHANG, X.; HE, X.; LIN, Q.; LIAN, W.; ZHU, H. A molecularly imprinted electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube-gold nanoparticle composites and chitosan for the detection of tyramine. **Food Research International**, v. 44, p. 276-281, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.020>

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. Disponível em: <https://www.ibravin.org.br/>.
Aceso em: 04 de novembro de 2019.

JACKSON, R. S. Wine science: principles and applications. 3 ed. San Diego: **Academic Press**, p. 751, 2008.

JASTRZEBSKA, A.; PIASTA, A.; KOWALSKA, S.; KRZEMIŃSKI, M.; SZŁYK, E. A new derivatization reagent for determination of biogenic amines in wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 111–119, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.02.012>

JEON, A. R.; LEE, J. H.; MAH, J. H. Biogenic amine formation and bacterial contribution in Cheonggukjang, a Korean traditional fermented soybean food. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 282-289, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.047>

JIAN, J. M.; FU, L.; JI, J.; LIN, L.; GUO, X.; REN, T. L. Electrochemically reduced graphene oxide/gold nanoparticles composite modified screen-printed carbon electrode for effective electrocatalytic analysis of nitrite in foods. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 262, p.125-136, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.164>

JOHN D. C., BIRGIT N., HERBERT B., OLIVIER A., SAVA B., JOHN G.T.; HALD, A. H., JAMES H., GÜNTER K., KOSTAS K., JAMES M., CHRISTOPHE N., LUISA P., MIGUEL P. M., ANTONIA R., JOHN S., JOHN T. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, 2011.

KAUR, N.; KAUR, M.; CHOPRA, S.; SINGH, J.; KUWAR, A.; SINGH, N. Fe(III) conjugated fluorescent organic nanoparticles for ratiometric detection of tyramine in aqueous medium: A novel method to determine food quality. **Food Chemistry**, v. 245, p. 1257-1261, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.097>

KE, R.; WEI, Z.; BOGDAL, C.; GÖKTAŞ, R. K.; XIAO, R. Profiling wines in China for the biogenic amines: A nationwide survey and pharmacokinetic fate modelling. **Food Chemistry**, v. 250, p. 268-275, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.040>

KELLY, M. T.; BLAISE, A.; LARROQUE, M. Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 7385-7392, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.047>

KHAN, M. Z. H.; LIU, X.; ZHU, J.; MA, F.; HU, W.; LIU, X. Electrochemical detection of tyramine with ITO/APTES/ErGO electrode and its application in real sample analysis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 108, p. 76-81, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.042>

KOCHANA, J.; WAPIENNIK, K.; KNIHNICKI, P.; et al. Mesoporous carbon-containing voltammetric biosensor for determination of tyramine in food products. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 5199–5210, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s00216-016-9612-y>

KOMORSKY-LOVRIC, S. A simple method for detection of manganese in marine sediments. **Croatica Chemica Acta**, v.195, p. 778-784, 1998.

KONG, C. L.; LI, A. H.; SU, J.; WANG, X. C.; CHEN, C. Q.; TAO, Y. S. Flavor modification of dry red wine from Chinese spine grape by mixed fermentation with *Pichia fermentans* and *S. cerevisiae*. **LWT**, v. 109, p. 83-92, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.101>

KOPPANG, M. D.; WITEK, M.; BLAU, J.; SWAIN, G. M. Electrochemical oxidation of polyamines at diamond thin-film electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 1188–1195, 1999.

<https://doi.org/10.1021/ac980697v>

KÜÇÜK, A.; TORUL, O. Voltammetric sensor based on poly(3-methylthiophene) synthesized in dichloromethane for tyramine determination in moldy cheese. **Synthetic Metals**, v. 237, p. 23-28, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2018.01.009>

LABIB, M.; SARGENT, E. H.; KELLEY, S. O. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. **Chemical Reviews**, v. 116, p. 9001–9090, 2016.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00220>

LAPAINIS, T.; SCANLAN, C.; RUBAKHIN, S. S.; SWEEDLER, J. V. A multichannel native fluorescence detection system for capillary electrophoretic analysis of neurotransmitters in single neurons. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 97–105, 2007.

<https://doi.org/10.1007/s00216-006-0775-9>

LATORRE-MORATALLA, M. L.; COMAS-BASTÉ, O.; BOVER-CID, S.; VIDAL-CAROU, M. C. Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. **Food and Chemical Toxicology**, v. 99, p.78-85, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.011>

LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 101, p. 19-28, 1979.

[https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(79\)80075-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(79)80075-3)

LÁZARO, C. A.; CONTE-JÚNIOR, C. A.; CANTO, A. C.; MONTEIRO, M. L. G.; COSTA-LIMA, B.; CRUZ, A. G. DA; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M. Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p.15-21, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.025>

LI, G.; DONG, L.; WANG, A.; WANG, W.; HU, N.; YOU, J. Simultaneous determination of biogenic amines and estrogens in foodstuff by an improved HPLC method combining with fluorescence labeling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 355–361, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.028>

LIU, S. J.; XU, J. J.; MA, C. L.; GUO, C. F. A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC. **Food Chemistry**, v. 266, p. 275–283, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.001>

LI, Y.; HSIEH, C. H.; LAI, C. W.; CHANG, Y. F.; CHAN, H. Y.; TSAI, C. F.; HO, J. AN A.; WU, L. CHEN. Tyramine detection using PEDOT:PSS/AuNPs/1-methyl-4-mercaptopyridine modified screen-printed carbon electrode with molecularly imprinted polymer solid phase extraction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 142-149, 2017A.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.006>

LI, Y.; LI, L.; CUI, Y.; ZHANG, S.; SUN, B. Separation and purification of polyphenols from red wine extracts using high speed counter current chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1054, p. 105–113, 2017B.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.006>

LIMA, M. D. S.; SILANI, I. D. S. V.; TOALDO, I. M.; CORRÊA, L. C.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. E.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; NINOW, J. L. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food Chemistry**, v. 161, p. 94–103, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.109>

LINARES, D. M.; RIO, B. DEL; REDRUELLO, B.; LADERO, V.; MARTIN, M. C.; FERNANDEZ, M.; RUAS-MADIEDO, P.; ALVAREZ, M. A. Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. **Food Chemistry**, v. 197, p.658-663, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.013>

LIU, S. J.; XU, J. J.; MA, C. L.; GUO, C. F. A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC. **Food Chemistry**, v.266, p. 275-283, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.001>

LÓPEZ, M. S. P.; GÓMEZ, E. R.; RUIZ, B L. Electrochemical enzyme biosensors based on calcium phosphate materials for tyramine detection in food samples.

Talanta, v. 1, p. 209-216, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.033>

LORENZO, C.; BORDIGA, M.; PÉREZ-ÁLVAREZ, E. P.; TRAVAGLIA, F.; ARLORIO, M.; SALINAS, M. R.; COÏSSON, J. D.; GARDE-CERDÁN, T. The impacts of temperature, alcoholic degree and amino acids content on biogenic amines and their precursor amino acids content in red wine. **Food Research International**, v. 99, p. 328 – 335, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.016>

LUKIĆ, K.; VUKUŠIĆ, T.; TOMAŠEVIĆ, M.; ĆURKO, N.; GRACIN, L.; KOVAČEVIĆ GANIĆ, K. The impact of high voltage electrical discharge plasma on the chromatic characteristics and phenolic composition of red and white wines. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 53, p. 70–77, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.11.004>

LOVATO, M. A.; WAGNER, R. Avaliação da qualidade do vinho de mesa suave por análises físico-químicas. **Caderno da Escola de Saúde**, v. 8, p.168-178, 2014.

MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A. Sistema de Produção de Uvas Rústicas para Processamento em Regiões Tropicais do Brasil. **Embrapa Uva e Vinho**, 2005.

MANETTA, A. C.; GIUSEPPE, L. DI; TOFALO, R.; MARTUSCELLI, M.; SCHIRONE, M.; GIAMMARCO, M.; SUZZI, G. Evaluation of biogenic amines in wine: Determination by an improved HPLC-PDA method. **Food Control**, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.009>

MANFROI, L.; MIELE, A.; RIZZON, L. A.; BARRADAS, C. I. N. Composição físico-química do vinho Cabernet Franc proveniente de videiras conduzidas no sistema lira aberta. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 290–296, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200010>

MAJCHERCZYK, J.; SURÓWKA, K. Effects of onion or caraway on the formation of biogenic amines during sauerkraut fermentation and refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 298, p. 125– 083, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125083>

MARQUES, A. P.; LEITÃO, M. C.; SAN ROMÃO, M. V. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. **Food Chemistry**, v. 107 p. 853–860, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.004>

MARTINS, F. C. O. L.; FRANCO, D. L.; MUÑOZ, R. A. A.; SOUZA, D. DE. Compostos orgânicos e inorgânicos contendo selênio: Revisão de métodos analíticos e perspectivas para análises químicas. **Quimica Nova**, 2017.

<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170151>

MARTUSCELLI, M.; ARFELLI, G.; MANETTA, A. C.; SUZZI, G. Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo. **Food Chemistry**, v.140 p. 590–597, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.008>

MATURANO, Y. P.; MESTRE, M. V.; KUCHEN, B.; TORO, M. E.; MERCADO, L. A.; VAZQUEZ, F.; COMBINA, M. Optimization of fermentation-relevant factors: A strategy to reduce ethanol in red wine by sequential culture of native yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 289, p. 40–48, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.016>

MAYER, H. K.; FIECHTER, G. UHPLC analysis of biogenic amines in different cheese varieties. **Food Control**, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.040>

MEY, E. DE; DRABIK-MARKIEWICZ, G.; MAERE, H. DE; et al. Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1017–1023, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.124>

MIERCZYNSKA-VASILEV, A.; SMITH, P. A. Surface modification influencing adsorption of red wine constituents: The role of functional groups. **Applied Surface Science**, v. 386, p. 14–23, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.06.016>

MILHEIRO, J.; FERREIRA, L. C.; RIBEIRO, L. F.; COMES, F.; NUNES, F. M. A simple dispersive solid phase extraction clean-up/concentration method for selective and sensitive quantification of biogenic amines in wines using benzoyl chloride derivatisation. **Food Chemistry**, v. 274, p. 110 – 117, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.116>

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 1959.

<https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MOLAEIA R.; TAJIKA H.; MORADIA M.; FOROUGH M. Application of novel Fe₃O₄-g-GO-g-RAFT agent nanoabsorbents for D-SPME of biogenic amines in smoked fish. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 87, p. 103-400, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103400>

MOLOGNONI, L.; DAGUER, H.; SÁ PLOÊNCIO, L. A. DE; DEA LINDNER, J. DE. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. **Talanta**, v. 178, p. 1053–1066, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.081>

MORATALLA, L. M. L.; BASTÉ, C. O.; CID, B. S.; CAROU, V. M. C. Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. **Food and Chemical Toxicology**, v. 99, p. 78–85, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.011>

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. Amino acids and biogenic amines. **Wine Chemistry and Biochemistry**, 2009.

<https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>

MORET, S.; CONTE, L. S. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 363-369, 1996.

[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00961-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00961-2)

MOTA, R. V.; REGINA, M. A.; AMORIM, D. A.; FÁVERO, A. C. Fatores que afetam a maturação e a qualidade da uva para vinificação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 56-64, 2006.

MOTA, R. V. DA; RAMOS, C. L.; PEREGRINO, I.; HASSIMOTTO, N. M. A.; PURGATTO, E.; SOUZA, C. R. DE; DIAS, D. R.; REGINA, M. D. A. Identification of the potential inhibitors of malolactic fermentation in wines. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 174–179, 2018.

<https://doi.org/10.1590/1678-457x.16517>

NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P.; MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food - existing and emerging approaches. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 139–150, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>

NAYAK, A.; BHUSHAN, B.; ROSALES, A.; TURIENZO, L. R.; CORTINA, J. L. Valorisation potential of Cabernet grape pomace for the recovery of polyphenols: Process intensification, optimisation and study of kinetics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 74–85, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.004>

NGAPO, T. M.; VACHON, L. Biogenic amine concentrations and evolution in “chilled” Canadian pork for the Japanese market. **Food Chemistry**, v. 233, p. 500-506, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.120>

OCHI, N. Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in salted mackerel fillet by ion-pair solid-phase extraction and volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1601, p. 115–120, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.027>

OIV. Organização Internacional da Uva e do Vinho. **Relatório estatístico da OIV sobre a viticultura mundial**. Disponível em:

<http://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>. acesso em 20 de setembro de 2019.

OLIVEIRA, J. B. DE; EGIPTO, R.; LAUREANO, O.; CASTRO, R. DE; PEREIRA, G. E.; RICARDO-DA-SILVA, J. M. Chemical composition and sensory profile of Syrah wines from semiarid tropical Brazil – Rootstock and harvest season effects. **LWT**, v.

114, p. 108–415, 2019a.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108415>

OLIVEIRA, J. B. DE; EGIPTO, R.; LAUREANO, O.; CASTRO, R. DE; PEREIRA, G. E.; RICARDO-DA-SILVA, J. M. Climate effects on physicochemical composition of Syrah grapes at low and high altitude sites from tropical grown regions of Brazil. **Food Research International**, v. 121, p. 870–879, 2019b.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.011>

ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1475–1486, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.028>

ORDÓÑEZ, J. L.; CALLEJÓN, R. M.; MORALES, M. L.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. A survey of biogenic amines in vinegars. **Food Chemistry**, v.141, p. 2713-2719, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.087>

ORDÓÑEZ, J. L.; CALLEJÓN, R. M.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Evaluation of biogenic amines profile in opened wine bottles: Effect of storage conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p.139-147, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.042>

ORDÓÑEZ, J. L.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. D. C.; CALLEJÓN, R. M. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 939, p. 10–25, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.045>

ORTIZ, M. J.; BARRAJÓN, N.; BAFFI, M. A.; ARÉVALO-VILLENA, M.; BRIONES, A. Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 371–377, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.019>

PALOMINO-VASCO, M.; RODRÍGUEZ-CÁCERES, M. I.; MORA-DIEZ, N.; PARDO-BOTELLO, R.; ACEDO-VALENZUELA, M. I. Biogenic amines profile in red wines regarding aging and storage conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 83, p. 103–295, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103295>

PANCERI, C. P.; GOIS, J. S. DE; BORGES, D. L. G.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Effect of grape dehydration under controlled conditions on chemical composition and sensory characteristics of Cabernet Sauvignon and Merlot wines. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 228–235, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.014>

PAPAGEORGIU, M.; LAMBROPOULOU, D.; MORRISON, C.; NAMIEŚNIK, J.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography – Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine. **Talanta**, v. 183, p. 276–282, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.006>

PÉREZ-MARTÍN, F.; SESEÑA, S.; IZQUIERDO, P. M.; PALOP, M. L. Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 153–158, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.024>

PEÑAS, E.; FRIAS, J.; SIDRO, B.; VIDAL-VALVERDE, C. Impact of fermentation conditions and refrigerated storage on microbial quality and biogenic amine content of sauerkraut. **Food Chemistry**, v. 123, p.143-150, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.021>

PEÑA-GALLEGO, A.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Amines in Must and Wine: A Review. **Food Reviews International**, 2012.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2011.594973>

PEREIRA, G.E.; GUERRA, C.C.; AMORIM, F.F.; NASCIMENTO, A.M.S.; SOUZA, J.F.; LIMA, L.L.A.; TONIETTO, J. Vinhos Tropicais do Semiárido do Brasil. Desvendando o Potential Vitivinícola desta Nova Fronteira Geográfica do Vinho [Portuguese]. Semi-Arid tropical wines of Brazil. Discovering the wine potential of this new geographic frontier of wine. **Université de Bourgogne, Dijon France**, v. 9, p. 1 – 13, 2018

PINEDA, A.; CARRASCO, J.; PEÑA-FARFAL, C.; HENRÍQUEZ-AEDO, K.; ARANDA, M. Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC. **Food Control**, v. 23, p. 251-257, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.025>

PŁOTKA-WASYLKA, J.; SIMEONOV, V.; NAMIEŚNIK, J. An in situ derivatization - dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas-chromatography - mass spectrometry for determining biogenic amines in home-made fermented alcoholic drinks. **Journal of Chromatography A**, v. 1453, p. 10–18, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.052>

PŁOTKA-WASYLKA, J.; SIMEONOV, V.; MORRISON, C.; NAMIEŚNIK, J. Impact of selected parameters of the fermentation process of wine and wine itself on the biogenic amines content: Evaluation by application of chemometric tools. **Microchemical Journal**, v. 23, p. 251-257, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.06.038>

PRADENAS, J.; GALARCE-BUSTOS, O.; HENRÍQUEZ-AEDO, K.; MUNDACA-URIBE, R.; ARANDA, M. Occurrence of biogenic amines in beers from Chilean market. **Food Control**, v. 70, p.138-144, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.043>

PRICHARD, E.; BARWICK, V. Quality Assurance in Analytical Chemistry. **Wiley-LGC**, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470517772>

RAMOS, R. M.; VALENTE, I. M.; RODRIGUES, J. A. Analysis of biogenic amines in wines by salting-out assisted liquid-liquid extraction and high-performance liquid

chromatography with fluorimetric detection. **Talanta**, v.124, p.146-151, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.026>

RAOOF, J. B.; OJANI, R.; BAGHAYERI, M.; AMIRI-AREF, M. Application of a glassy carbon electrode modified with functionalized multi-walled carbon nanotubes as a sensor device for simultaneous determination of acetaminophen and tyramine. **Analytical Methods**, v. 4, p. 1579–1587, 2012B.
<https://doi.org/10.1039/c2ay05494a>

RAOOF, J. B.; OJANI, R.; AMIRI-AREF, M.; BAGHAYERI, M. Electrodeposition of quercetin at a multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode as a novel and efficient voltammetric sensor for simultaneous determination of levodopa, uric acid and tyramine. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 166, p. 508–518, 2012A.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.02.096>

RAPINI, R.; MARRAZZA, G. Electrochemical aptasensors for contaminants detection in food and environment: Recent advances. **Bioelectrochemistry**, v. 118, p.47-61, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.004>

REDRUELLO, B.; LADERO, V.; RIO, B. DEL; FERNÁNDEZ, M.; MARTIN, M. C.; ALVAREZ, M. A. A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. **Food Chemistry**, v. 217, p. 117-124, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.040>

REGINA, M. A.; MOTA, R. V.; SOUZA, C. R.; FAVERO, A. C. Viticulture for fine wines in Brazilian Southeast. **Acta Horticulturae**, v. 910, p. 113–120, 2011.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.910.8>

RESTUCCIA, D.; SICARI, V.; PELLICANÒ, T. M.; SPIZZIRRI, U. G.; LOIZZO, M. R. The impact of cultivar on polyphenol and biogenic amine profiles in Calabrian red grapes during winemaking. **Food Research International**, v. 102, p. 303–312, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.012>

RESTUCCIA, D.; SPIZZIRRI, U. G.; PARISI, O. I.; CIRILLO, G.; PICCI, N. Brewing effect on levels of biogenic amines in different coffee samples as determined by LC-UV. **Food Chemistry**, v.175, p. 143-150, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.134>

RIBEIRO, F. L.; MILHEIRO, J.; FERREIRA, L. C.; CORREIA, E.; COSME, F.; NUNES, F. M. Biogenic amines and polyamines in wines: Does Dekkera/Brettanomyces red wine spoilage increases the risk of intake by consumers? **LWT**, v. 115, p. 10–8488, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108488>

RIZZON, L.A. Sistema de produção de vinho tinto. Sistemas de Produção - EMBRAPA Uva e Vinho - **CNPUV**. Bento Gonçalves, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/VinhoTinto/recebimento>>.

htm>. Acesso em abr. 2019.

ROBLES, A.; FABJANOWICZ, M.; CHMIEL, T.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115630>

ROSI, I.; NANNELLI, F.; GIOVANI, G. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 525–530, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.004>

SABAINI, P. S. Métodos de análise e determinação de aminas livres e conjugadas em uvas e vinhos. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

SACCHI, K. L.; BISSON, L. F.; ADAMS, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 95, p. 200-208, 2005.

SAELAO, S.; MANEERAT, S.; THONGRUCK, K.; WATTHANASAKPHUBAN, N.; WIRIYAGULOPAS, S.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Reduction of tyramine accumulation in Thai fermented shrimp (kung-som) by nisin Z-producing *Lactococcus lactis* KTH0-1S as starter culture. **Food Control**, v. 90, p. 249-258, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.003>

SAGRATINI, G.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; DE BERARDINIS, F.; et al. Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 537–543, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.054>

SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M.; REDONDO-GÓMEZ, E.; LÓPEZ-RUIZ, B. Electrochemical enzyme biosensors based on calcium phosphate materials for tyramine detection in food samples. **Talanta**, v. 175, p. 209-216, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.033>

SANTOS, M. C.; NUNES, C.; FERREIRA, A. S.; JOURDES, M.; TEISSEDRE, P. L.; RODRIGUES, A.; AMADO, O.; SARAIVA, J. A.; COIMBRA, M. A. Comparison of high pressure treatment with conventional red wine aging processes: impact on phenolic composition. **Food Research International**, v. 116, p. 223–231, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.018>

SAURINA, J. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 234–245, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.11.008>

ŠEHOVIĆ, D.; PETRAVIĆ, V.; MARIĆ, V. Glycerol and wine industry glycerol determination in grape must and wine. **Kemija u industriji/Journal of Chemists and Chemical Engineers**, v. 11, p. 505–516, 2004.

SHIMAZU, S.; MIKLYA, I. Pharmacological studies with endogenous enhancer substances: β -phenylethylamine, tryptamine, and their synthetic derivatives. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, p. 421–427, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.11.016>

SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: Their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 213–231, 1996.

[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)

SOUZA, C. M.; REGINA, M. A.; PEREIRA, G. E. FREITAS, G. F.; Indicação de cultivares de videira para o sul de Minas Gerais. In: REGINA, M. A. (Coord.). Viticultura e enologia – atualizando conceitos. **Caldas: EPAMIGFEC**, 2002. p. 277-286.

STANDAGE, T. História do Mundo em 6 copos. **Zahar**, 2015.

SILVA, W.; GHICA, M. E.; AJAYI, R. F.; IWUOHA, E. I.; BRETT, C. M. A. Tyrosinase based amperometric biosensor for determination of tyramine in fermented food and beverages with gold nanoparticle doped poly(8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid) modified electrode. **Food Chemistry**, v. 282, p. 18–26, 2019a.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.104>

SILVA, W.; GHICA, M. E.; AJAYI, R. F.; IWUOHA, E. I.; BRETT, C. M. A. Impedimetric sensor for tyramine based on gold nanoparticle doped-poly(8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid) modified gold electrodes. **Talanta**, v. 195, p. 604–612, 2019b.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.054>

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. M. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed, 2005.

SCOLLARY, G. R. Wines: Wine Production. In: **Encyclopedia of Food and Health**, 2015.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00754-6>

SHENG, W.; SUN, C.; FANG, G.; WU, X.; HU, G.; ZHANG, Y.; WANG, S. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Tyramine as an Index of Freshness in Meat and Seafood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04422>

SMIT, A. Y.; TOIT, W. J. DU; STANDER, M.; TOIT, M. DU. Evaluating the influence of maceration practices on biogenic amine formation in wine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 297-307, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.006>

SOARES, I. P.; DA SILVA, A. G.; DA FONSECA ALVES, R.; et al. Electrochemical enzymatic biosensor for tyramine based on polymeric matrix derived from 4-

mercaptophenylacetic acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 23, p. 985–995, 2019.

<https://doi.org/10.1007/s10008-019-04204-w>

SOUZA, D. DE; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Quimica Nova**, 2003.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>

STOCKLEY, C.; TEISSEDRE, P. L.; BOBAN, M.; LORENZO, C. DI; RESTANI, P. Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: A review. **Food and Function**, 2012.

<https://doi.org/10.1039/c2fo10208k>

SUZZI, G.; TORRIANI, S. Editorial: Biogenic amines in foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p.1–2, 2015.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00472>

TABANELLI, G.; MONTANARI, C.; GARDINI, F. Biogenic Amines in Food: A Review of Factors Affecting Their Formation. *In: Reference Module in Food Science*, 2018.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21833-7>

TELSNIG, D.; KRENN, A. T.; KASSARNIG, V.; KALCHER, K.; ORTNER, A. Development of a voltammetric amine oxidase-modified biosensor for the determination of biogenic amines in food. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 6893–6903, 2012.

TENREIRO, A. M.; NABAIS, C.; CORREIA, J. P.; et al. Progress in the understanding of tyramine electropolymerisation mechanism. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 11, p. 1059–1069, 2007.

<https://doi.org/10.1007/s10008-007-0268-6>

TOIT, M. DU; ENGELBRECHT, L.; LERM, E.; KRIEGER-WEBER, S. Lactobacillus: The Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures-an Overview. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 876–906, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s11947-010-0448-8>

TRAN, L. D.; PIRO, B.; PHAM, M. C.; et al. A polytyramine film for covalent immobilization of oligonucleotides and hybridization. **Synthetic Metals**, v. 139, p. 251–262, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(03\)00131-0](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(03)00131-0)

TREDOUX, A.; VILLIERS, A. DE; MÁJEK, P.; LYNEN, F.; CROUCH, A.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction combined with GC-MS analysis and chemometric methods for the classification of South African wines according to the volatile composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4286–4296, 2008.

<https://doi.org/10.1021/jf0734673>

TUBEROSO, C. I. G.; CONGIU, F.; SERRELI, G.; MAMELI, S. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by

HPLC-FLD. **Food Chemistry**, v. 175, p. 29–35, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.120>

TUBEROSO, C. I. G.; SERRELI, G.; MONTORO, P.; et al. Biogenic amines and other polar compounds in long aged oxidized Vernaccia di Oristano white wines.

Food Research International, v. 111, p. 97–103, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.020>

VALE, S. R.; GLÓRIA, M.B.A. Determination of biogenic amines in cheese. **AOAC**

Int, v.80, p. 1006-1012, 1997. <https://doi.org/10.1093/jaoac/80.5.1006>

VARELA, C. The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1861–1874, 2016

<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>

VELOSO, A. J.; FULTHORPE, R. R.; KERMAN, K. Electrochemical detection of perchloroethylene using differential pulse voltammetry. **Electrochemistry**

Communications, v.37, p. 28-31, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.09.007>

VENTURI, F.; SANMARTIN, C.; TAGLIERI, I.; XIAOGUO, Y.; QUARTACCI, M. F.; SGHERRI, C.; ANDRICH, G.; ZINNAI, A. A kinetic approach to describe the time evolution of red wine as a function of packaging conditions adopted: Influence of closure and storage position. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 13, p. 44–48, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.001>

VIEIRA, P. C.; PEREIRA C. M.; SILVA, V. L. M; FRASAO B. S., FRASAO C , AQUINO L. F.M. C.; NUNES Y. E.C. O.; JUNIOR C. A. C. Development and validation of RP-HPLC-DAD method for biogenic amines determination in probiotic yogurts. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 1582-1597, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.12.010>

VIEIRA, R. M. DA; RAMOS, C. L.; PEREGRINO, I.; HASSIMOTTO, N. M. A.;

PURGATTO, E.; SOUZA, C. R. DE; DIAS, D. R.; REGINA, M. D. A. Identification of the potential inhibitors of malolactic fermentation in wines. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 174–179, 2020.

WANG, Y. Q.; YE, D. Q.; ZHU, B. Q.; WU, G. F.; DUAN, C. Q. Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect. **Food Chemistry**, v. 163, p. 6–15, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.064>

WANG, S.; LI, S.; ZHAO, H.; GU, P.; CHEN, Y.; ZHANG, B.; ZHU, B. Acetaldehyde released by *Lactobacillus plantarum* enhances accumulation of pyranoanthocyanins in wine during malolactic fermentation. **Food Research International**, v. 108, p. 254–263, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.032>

WASYLKA, J. P.; SIMEONOV, V.; NAMIEŚNIK, J. An in situ derivatization -

dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas-chromatography - mass spectrometry for determining biogenic amines in home-made fermented alcoholic drinks. **Journal of Chromatography A**, v. 1453, p. 10–18, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.052>

WASYLKA, J. P.; SIMEONOV, V.; MORRISON, C.; NAMIEŚNIK, J. Impact of selected parameters of the fermentation process of wine and wine itself on the biogenic amines content: Evaluation by application of chemometric tools.

Microchemical Journal, v. 142, p. 187–194, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.06.038>

WOJNOWSKI, W.; NAMIEŚNIK, J.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for in situ determination of biogenic amines in meat: Estimation of meat's freshness.

Microchemical Journal, v. 145, p. 130–138, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.034>

XU, W.; LIU, B.; WANG, C.; KONG, X. Organic cultivation of grape affects yeast succession and wine sensory quality during spontaneous fermentation. **LWT**, v. 120, p. 108–894, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108894>

YEN, G. C.; HSIEH, C. L. Antioxidant effects of dopamine and related compounds.

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 61, p. 1646–1649, 1997.

<https://doi.org/10.1271/bbb.61.1646>

YILDIRIM, H. K.; ÜREN, A.; YÜCEL, U. Evaluation of biogenic amines in organic and non-organic wines by HPLC OPA derivatization. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 62–68, 2007.

YILMAZ, C.; GÖKMEN, V. Formation of tyramine in yoghurt during fermentation – Interaction between yoghurt starter bacteria and *Lactobacillus plantarum*. **Food Research International**, v. 97, p. 288-295, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.014>

ZAMORA, F. Biochemistry of alcoholic fermentation. *In*: **Wine Chemistry and Biochemistry**. Cap. 1; p. 7–20, 2009.

ZHANG, Y.; ZHANG, M.; WEI, Q.; et al. An easily fabricated electrochemical sensor based on a graphene-modified glassy carbon electrode for determination of octopamine and tyramine. **Sensors (Switzerland)**, v. 16, p. 535, 2016.

<https://doi.org/10.3390/s16040535>

ZHANG, YU JIA; ZHANG, YUAN; ZHOU, Y.; LI, G. HUI; YANG, W. ZHEN; FENG, X. SONG. A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010. **Journal of Chromatography A**, v. 1605, p. 360–361, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.07.015>

ZHU, X.; ZHAO, J.; JIA, T.; LI, S.; LI, N.; HOU, H.; ZHONG, R. L.; FAN, Z.; GUO, M. A comparison study of graphene-cyclodextrin conjugates for

enhanced electrochemical performance of tyramine compounds. Carbohydrate Polymers, v. 209, p. 258-265, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.023>