

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE GARUS SAINT CLAIR COLIMO

AVALIAÇÃO DO TEOR DE METAIS E AMINAS BIOGÊNICAS NOS VINHOS
PRODUZIDOS A PARTIR DE UVAS CULTIVADAS EM SOLOS
CONDICIONADOS COM SUBPRODUTOS DE XISTO

CURITIBA

2013

ALINE GARUS SAINT CLAIR COLIMO

AVALIAÇÃO DO TEOR DE METAIS E AMINAS BIOGÊNICAS NOS VINHOS
PRODUZIDOS A PARTIR DE UVAS CULTIVADAS EM SOLOS
CONDICIONADOS COM SUBPRODUTOS DE XISTO

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós Graduação em Química do Setor de
Ciências Exatas da Universidade Federal do
Paraná

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof.^a Dra. Iara Messerschmidt
Co-orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. João Peterson Pereira
Gardin

CURITIBA

2013

C696a

Colimo, Aline Garus Saint Clair

Avaliação do teor de metais e amins biogênicas nos vinhos produzidos a partir de uvas cultivadas em solos condicionados com subprodutos de xisto / Aline Garus Saint Clair Colimo. – Curitiba, 2013.

80f. : il. [algumas color.], tab.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2013.

Orientadora: Iara Messerschmidt, Coorientador: Brás Heleno de Oliveira, Coorientador: João Peterson Pereira Gardin

Bibliografia: p. 72-80.

1. Vinho -- Analise. 2. Amins biogênicas . 3. Xisto. I. Messerschmidt, Iara. II. Oliveira, Brás Heleno de . III. Gardin , João Peterson Pereira. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD: 543.84

TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE METAIS E AMINAS BIOGÊNICAS NOS VINHOS
PRODUZIDOS A PARTIR DE UVAS CULTIVADAS EM SOLOS CONDICIONADOS COM
SUBPRODUTOS DE XISTO**

por

ALINE GARUS SAINT CLAIR COLIMO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientadora:



Prof.^a Dr.^a Iara Messerschmidt
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Volnei Pauletti
Dep. de Solos – UFPR



Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 29 de maio de 2013

A todos os pesquisadores que agem como cidadãos para o objetivo do bem comum.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Iara Messerschmidt, pela orientação e companheirismo.

Aos co-orientadores Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira e Prof. Dr. João Peterson Pereira Gardin pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos pesquisadores do Projeto Xisto pelas contribuições e sugestões.

Ao Prof. Dr. Rafael Schumacher pelas inúmeras dúvidas sanadas.

Aos pesquisadores e funcionários da EPAGRI/SC pela realização da vinificação e controle de qualidade dos vinhos.

A aluna Rayta Paim Horta pelo auxílio na parte experimental e pela amizade.

Ao secretário Marcelino Câmara pela compreensão e agilidade nos momentos mais necessários.

Aos colegas do Laboratório de Projetos e Processos Ambientais (LABPPAM), Laboratório de Química Analítica Ambiental (LQAA), Laboratório De Produtos Naturais e Biotransformações e Laboratório De Produtos Naturais e Ecologia Química que auxiliaram de alguma maneira.

A Petrobras SIX, à Embrapa Clima Temperado e à Universidade Federal do Paraná por prover a infraestrutura e apoio financeiro.

Aos professores Dr. Gilberto Abate e Dr. Volnei Pauletti pela avaliação desse trabalho.

“João Crisóstomo disse que Deus deixou para os seres humanos algumas coisas do paraíso: as estrelas no céu, as flores no campo e os olhos das crianças. Tomás de Aquino complementa dizendo que Crisóstomo teria esquecido de duas coisas: o queijo e o vinho.”

Anselm Grün, monge beneditino alemão (1945)

RESUMO

O potencial do uso dos subprodutos do xisto na agricultura tem despertado o interesse de alguns órgãos brasileiros de pesquisa, como a Embrapa Clima Temperado, que desenvolve o Projeto Xisto Agrícola em parceria com a Petrobras e outras instituições. As frentes de pesquisa dividem-se em eficiência agrônômica, segurança dos alimentos e segurança ambiental. Na área de segurança de alimentos, destaca-se o estudo dos vinhos produzidos a partir de uvas cultivadas em solos condicionados com subprodutos do xisto. Foram avaliadas amostras provenientes de dois tratamentos do solo executados em dois anos consecutivos utilizando finos de xisto, calcário de xisto e ou calcário calcítico. O critério para avaliação foi o conteúdo de alguns metais controlados pelo Ministério da Agricultura, ANVISA e Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), e o teor de amins biogênicas relacionadas a efeitos tóxicos. Para efetuar a quantificação dos metais, foram investigados métodos de pré-tratamento de amostra para a determinação de espécies metálicas por ICP-OES. Também foi necessário adaptar o método derivatização e determinação de amins biogênicas por cromatografia em fase líquida. Os resultados mostraram que não existem diferenças significativas entre as amostras testemunha e as amostras provenientes dos diferentes tratamentos do solo. Os vinhos apresentaram teores de metais e amins biogênicas abaixo dos limites máximos definidos pela legislação e ou compatíveis com os reportados pela literatura. De maneira geral, sugere-se que o uso dos subprodutos do xisto no solo onde foram cultivadas as uvas não afetou os vinhos produzidos segundo os critérios estudados, indicando que as matrizes fertilizantes aqui estudadas podem ser utilizadas na cultura da videira.

Palavras-chave: xisto, vinhos, metais, amins biogênicas

ABSTRACT

The potential use of oil shale byproducts in agriculture has calling attention of some Brazilian institutes of research, as Embrapa Clima Temperado, which develops the project "Xisto Agrícola" in association with Petrobras and other organizations. Research lines are divided in agronomic efficiency, food security and environmental security. About food security, it is highlighted the study of wines produced from grapes cultivated in soils conditioned with oil shale byproducts. Samples from two soil treatments executed in two consecutive years were evaluated. The treatments utilized were powdered oil shale, retorted oil shale and/or calcitic limestone in different concentration. The evaluation criterion was the content of some metals controlled by Agriculture Ministry, ANVISA and International Organization of Wine and Grapes (OIV), and the biogenic amines related to toxicological effects content. For the metal quantification, sample pretreatment methods to ICP-OES analysis were tested. It was also necessary to adapt the derivatization and quantification method to liquid chromatography analysis. Results showed no significant differences among samples. Wines presented metals and biogenic amines levels below the maximum defined by law, and, or, according to literature. In general, according to the studied criterions, it can be suggest that the use of oil shale byproducts in soils cultivated with grapes didn't affect the wines produced on them, indicating that byproducts utilized in this study can be used in viticulture with safety.

Keywords: oil shale, wines, metals, biogenic amines

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FOLHELHO PIROBETUMINOSO.....	17
FIGURA 2 - SUBPRODUTOS DA INDUSTRIALIZAÇÃO DO XISTO.....	18
FIGURA 3 - EXEMPLOS DE VARIEDADES DE UVAS EUROPEIAS, COMO A CABERNET SAUVIGNON (À DIREITA) E DE UVAS AMERICANAS, COMO A BORDÔ (À ESQUERDA).....	22
FIGURA 4 - REAÇÃO DE DESCARBOXILAÇÃO DA LISINA GERANDO CADAVERINA (ACIMA) E DA ORNITINA GERANDO PUTRESCINA (ABAIXO).....	27
FIGURA 5 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DA HISTAMINA (A), TIRAMINA (B), FENILETILAMINA (C), TRIPTAMINA (D), CADAVERINA (E), PUTRESCINA (F).....	28
FIGURA 6 - ESTRUTURA DAS AMINOENONAS. (A) REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO; (B) PRODUTO DA DERIVATIZAÇÃO DE AMINOÁCIDO PRIMÁRIO; (C) PRODUTO DA DERIVATIZAÇÃO DE AMINOÁCIDO SECUNDÁRIO.....	30
FIGURA 7 - CULTIVAR CABERNET SAUVIGNON NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DA EPAGRI/SC.....	35
FIGURA 8 - GARRAFAS DE “VINHO DE XISTO”	37
FIGURA 9 - CURVAS ANALÍTICAS PARA OS METAIS UTILIZANDO O MÉTODO DA PADRONIZAÇÃO INTERNA.....	44
FIGURA 10 - AMOSTRAS DE VINHO APÓS PRÉ-TRATAMENTO SEGUNDO OS MÉTODOS DE DIGESTÃO EM ULTRASSOM (À ESQUERDA) E AQUECIMENTO A SECO (À DIREITA).....	45
FIGURA 11 - GRÁFICO BILOT DE LOADINGS E SCORES DA PC1 PELA PC2 PARA OS TEORES DE METAIS NOS “VINHOS DE XISTO”	51
FIGURA 12 – CROMATOPLACAS PARA ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD). EM SENTIDO HORÁRIO, CADAVERINA, FENILETILAMINA, HISTAMINA TRIPTAMINA, TIRAMINA E PUTRESCINA.....	54
FIGURA 13 - CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DA SOLUÇÃO PADRÃO DA HISTAMINA 50,0 mg L⁻¹.....	55

FIGURA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE O CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DA SOLUÇÃO PADRÃO DA HISTAMINA 50,0 mg L ⁻¹ E DOS CROMATOGRAMAS DOS REAGENTES.....	56
FIGURA 15 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE SOLUÇÃO PADRÃO DA HISTAMINA 50,0 mg L ⁻¹ E DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE SOLUÇÃO PADRÃO DA HISTAMINA 100,0 mg L ⁻¹	57
FIGURA 16 - POSSÍVEIS PRODUTOS FORMADOS ORIUNDOS DA DEGRADAÇÃO DO DEEMM DURANTE A ETAPA DE AQUECIMENTO DA MISTURA REACIONAL.....	58
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE SOLUÇÃO PADRÃO DAS AMINAS (50 mg L ⁻¹ CADA) E 20 µL DE HEPTILAMINA (1,00 g L ⁻¹) COMO PADRÃO INTERNO, UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 150 mm DE COMPRIMENTO. NA ORDEM: HISTAMINA (1), TIRAMINA (2), PUTRESCINA (3), TRIPTAMINA (4), FENILETILAMINA (5), CADAVERINA (6), HEPTILAMINA (7).....	60
FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE SOLUÇÃO PADRÃO DAS AMINAS (50 mg L ⁻¹ CADA) E 20 µL DE HEPTILAMINA (1,00 g L ⁻¹) COMO PADRÃO INTERNO, UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 250 mm DE COMPRIMENTO. NA ORDEM: HISTAMINA (1), TIRAMINA (2), PUTRESCINA (3), TRIPTAMINA (4), FENILETILAMINA (5), CADAVERINA (6), HEPTILAMINA (7).....	61
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE VINHO E 20 µL DE HEPTILAMINA (1,00 g L ⁻¹) COMO PADRÃO INTERNO, UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 250 mm DE COMPRIMENTO....	62
FIGURA 20 - CURVAS ANALÍTICAS PARA AS AMINAS UTILIZANDO O MÉTODO DA PADRONIZAÇÃO INTERNA.....	63
FIGURA 21 - GRÁFICO BILOT DE <i>LOADINGS</i> E <i>SCORES</i> DA PC1 PELA PC2 PARA OS TEORES DE AMINAS NOS “VINHOS DE XISTO”	69
FIGURA 22 - GRÁFICO BILOT DE <i>LOADINGS</i> E <i>SCORES</i> DA PC1 PELA PC2 PARA OS TEORES DE METAIS E AMINAS NOS “VINHOS DE XISTO”.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO INORGÂNICA APROXIMADA DAS MATRIZES DE FINOS DE XISTO (FX) E CALCÁRIO DE XISTO (CX).....	19
TABELA 2 - LIMITES MÁXIMOS TOLERÁVEIS PARA CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS SEGUNDO MAPA E ANVISA	25
TABELA 3 - LIMITE MÁXIMO DE HISTAMINA EM VINHO EM PAÍSES EUROPEUS.....	29
TABELA 4 - TRATAMENTOS DOS SOLOS COM MATRIZES FERTILIZANTES UTILIZADOS PARA ELABORAÇÃO DE VINHOS EM PEQUENA ESCALA (EXPERIMENTO FXCX).....	35
TABELA 5 - TRATAMENTOS DOS SOLOS COM MATRIZES FERTILIZANTES UTILIZADOS PARA ELABORAÇÃO DE VINHOS EM PEQUENA ESCALA (EXPERIMENTO CXCC).....	38
TABELA 6 - DADOS METEOROLÓGICOS DE VIDEIRA/SC NOS ANOS DE 2010 e 2011.....	38
TABELA 7 - CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO ICP-OES PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	37
TABELA 8 - FASES MÓVEIS UTILIZADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DAS PLACAS CROMATOGRÁFICAS.....	41
TABELA 9 - GRADIENTE DE FASE MÓVEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA.....	42
TABELA 10 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ICP-OES.....	45
TABELA 11 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO PARA METAIS USANDO FORTIFICAÇÃO DE 0,100 mg L ⁻¹	46
TABELA 12 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO PARA METAIS USANDO FORTIFICAÇÃO DE 0,500 mg L ⁻¹	47
TABELA 13 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO PARA METAIS USANDO FORTIFICAÇÃO DE 0,750 mg L ⁻¹	47

TABELA 14 - CONCENTRAÇÕES DE METAIS ENCONTRADOS NOS “VINHOS DE XISTO” PROVENIENTES DOS EXPERIMENTOS FXCX E CXCC DAS SAFRAS DE 2010 E 2011.....	49
TABELA 15 - GRADIENTE DE FASE MÓVEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM LC UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 150 mm DE COMPRIMENTO.....	60
TABELA 16 - GRADIENTE DE FASE MÓVEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM LC UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 250 mm DE COMPRIMENTO.....	61
TABELA 17 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS.....	64
TABELA 18 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONTINUAÇÃO).....	64
TABELA 19 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONCENTRAÇÃO INFERIOR).....	65
TABELA 20 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONCENTRAÇÃO MÉDIA).....	66
TABELA 21 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONCENTRAÇÃO SUPERIOR).....	66
TABELA 22 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONCENTRAÇÃO MÉDIA) UTILIZANDO 40 µL DE DEEMM NA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.....	66
TABELA 23 - CONCENTRAÇÕES DE AMINAS NOS “VINHOS DE XISTO” PROVENIENTES DOS EXPERIMENTOS FXCX E CXCC DAS SAFRAS DE 2010 E 2011.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC - Análise de Variáveis Canônicas
AX - Água de Xisto
CA - Análise de Agrupamento
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CG - Cromatografia a Gás
CX - Calcário de Xisto
CXCC – Calcário de Xisto e Calcário Calcítico (experimento)
DA - Análise Discriminante
DPR - Desvio Padrão Relativo
DEEMM – Dietiletoximetilenomalonato
ETAAS - Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica
FAAS - Espectrometria de Absorção Atômica por Chama
FX - Finos de Xisto
FXCX – Finos de Xisto e Calcário de Xisto (experimento)
GQA - Grupo de Química Ambiental
HCA - Análise de Agrupamento Hierárquico
HPLC – Cromatografia/ Cromatógrafo em fase Líquida de Alta Eficiência
ICP-MS - Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-OES - Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado
LD - Limite de Detecção
LDA - Análise Discriminante Linear
LMT - Limites Máximos Toleráveis
LQ - Limite de Quantificação
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho
PCA - Análise de Componentes Principais
SIMCA - Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe
T1 a T8 - Tratamentos do solo referentes aos experimentos 1 a 8
TX – Taxa da Recuperação
UV - ultravioleta
XR - Xisto Retornado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Xisto como insumo agrícola	17
2.2 Vitivinicultura no Brasil	20
2.3 O vinho	21
2.4 Elementos químicos em vinhos	23
2.5 Determinação de elementos químicos em vinhos	25
2.6 Aminas biogênicas em vinhos	26
2.7 Determinação de aminas biogênicas em vinhos.....	29
2.8 Quimiometria.....	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Reagentes.....	34
4.2 Amostras.....	34
4.3 Determinação de metais nos “Vinhos de Xisto”	37
4.4 Determinação de aminas biogênicas nos “Vinhos de Xisto”	39
4.5 Parâmetros de mérito e análise estatística.....	43
5 ANÁLISE DE RESULTADOS	44
5.1 Determinação de metais nos “Vinhos de Xisto”	44
5.2 Determinação de aminas biogênicas nos “Vinhos de Xisto”	52
6 CONCLUSÕES	71
6.1 Determinação de metais nos “Vinhos de Xisto”	71
6.2 Determinação de aminas biogênicas nos “Vinhos de Xisto”	72
6.3 Conclusão Final.....	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

O xisto (folhelho pirobetuminoso) é uma rocha sedimentar da qual se extrai óleos combustíveis, nafta, gás e enxofre num processo chamado de retortagem. Dele são gerados subprodutos como água de xisto e xisto retortado, além de frações da rocha que não passam pelo processamento, como finos de xisto e calcário de xisto (PETROBRAS, 2011). O potencial de uso desses subprodutos na agricultura se dá devido a sua composição, rica em matéria orgânica e elementos químicos (PEREIRA et al., 2009b), fato que tem despertado o interesse de alguns órgãos brasileiros de pesquisa, que juntos desenvolvem o Projeto Xisto Agrícola. Um dos objetivos desse projeto é avaliar a segurança dos alimentos produzidos nos solos condicionados com esses subprodutos, por meio da quantificação de espécies metálicas e orgânicas potencialmente nocivas para a saúde humana.

A videira é uma das culturas estudadas, dado que a vitivinicultura é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil. Além disso, há uma tendência mundial de redução de consumo de vinhos em termos quantitativos e um aumento pelo consumo de vinhos finos (MELLO, 2010b), reforçando a necessidade de se produzir vinhos nacionais de melhor qualidade (ROSA, CONSENZA e LEÃO, 2006).

Um dos critérios para a segurança dos alimentos em vinhos é o seu conteúdo de elementos químicos, sobretudo aqueles cujas concentrações máximas são definidas pela legislação (BRASIL, 1965; BRASIL, 2010, OIV, 2012). O teor dessas espécies deve ser controlado já que alguns elementos causam preocupação devido a sua toxicidade para os seres vivos (PERALTA-VIDEA, 2009). Além disso, até mesmo elementos considerados micronutrientes podem ocasionar danos à saúde se consumidos em quantidades elevadas (STAFILOV e KARADJOVA, 2009).

Nos vinhos, o principal fator que determina o conteúdo de metais é o solo no qual a videira é cultivada, sejam esses elementos de origem natural ou antropogênica (ÁLVAREZ et al., 2007; ANGELOVA, IRANOV e BRAIKOV, 1999; FLAMINI, 2008; MACKENZIE e CHRISTY, 2005; RODRIGUES et al., 2011).

Para a determinação desses elementos, a Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) oferece o melhor desempenho por permitir determinações multi-elementares (FLAMINI, 2008).

Outras espécies relacionadas à segurança dos vinhos para consumo são as aminas biogênicas. Elas são os compostos nitrogenados mais simples presentes no vinho, definidas como moléculas de baixa massa molar associadas ao grupo amino (JACKSON, 2008). São sintetizadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos pelos metabolismos microbiano, vegetal e animal (LONVAUD-FUNEL, 2001; SILLA SANTOS, 1996), em condições adequadas e que contenham aminoácidos livres, micro-organismos descarboxilase-positivos (SILLA SANTOS, 1996). O controle do teor dessas espécies no vinho é necessário por elas serem substâncias fisiologicamente ativas, que em níveis altos, podem induzir dores de cabeça, hipertensão e reações alérgicas em indivíduos sensíveis (LONVAUD-FUNEL; 2001; JACKSON, 2008; SILLA SANTOS, 1996). Não há legislação no Brasil que determine o limite máximo de aminas biogênicas em vinhos, mas em alguns países da União Europeia é definido um limite máximo para a histamina.

Dentre as condições que favorecem a produção desses compostos nas uvas, destacam-se as condições climáticas, o tipo do solo, a sua composição e fertilização (DEL PRETE et al., 2009; MARQUES, LEITÃO e SAN ROMÃO, 2008). Para a determinação das aminas nos vinhos, a cromatografia em fase líquida é a técnica mais utilizada (PEREIRA et al., 2008). No entanto, por não possuírem um cromóforo específico, essas espécies precisam ser derivatizadas para diminuir os limites de detecção e evitar interferências da matriz (ANLI et al., 2004; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GARCÍA-ROMERO, E., 2007; FLAMINI, 2008).

Para a correlação das variáveis estudadas, uma das ferramentas mais utilizadas é a quimiometria, cujo propósito é tratar os dados obtidos de maneira multivariada. As duas formas de reconhecimento de padrões não supervisionados mais conhecidas são as análises de agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA). A PCA e a HCA são metodologias exploratórias que visam evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados. Assim, estabelecer correlações entre o tipo de fertilização e acúmulo de metais e produção de aminas biogênicas é decisivo para definir qual (ou quais) dos tratamentos empregados no solo é mais adequado para o cultivo da videira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 XISTO COMO INSUMO AGRÍCOLA

O xisto (folhelho pirobetuminoso) é uma rocha sedimentar formada pelo acúmulo de algas cianofíceas dentre outros componentes, há 250 milhões de anos, da qual se extrai óleos combustíveis, nafta, gás e enxofre. A maior reserva mundial encontra-se nos Estados Unidos, seguido pelo Brasil, que possui a Formação Irati, a qual abrange os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás.



FIGURA 1 – FOLHELHO PIROBETUMINOSO
FONTE: Petrobras (2013)

A Petrobras, por intermédio de sua Unidade de Negócio da Industrialização do Xisto (SIX) situada em São Mateus do Sul, processa diariamente 7.800 toneladas de xisto (PETROBRAS, 2011), o que gera 300 m³ de subproduto líquido (água de xisto) e 6.600 toneladas de subproduto sólido (xisto retornado). Além disso, o processo de mineração envolve a extração de outros materiais, como finos de xisto (1.300 toneladas), calcxisto (7.700 toneladas) e calcário de xisto (300 toneladas) (SHEER et al., 2009a). O calcário de xisto (CX) constitui-se de rochas carbonáticas consideradas estéreis por não apresentarem teor de óleo adequado ao processamento, mas suficientes para sua utilização como corretor da acidez do solo. Já os finos de xisto (FX) são fragmentos da rocha de xisto que não podem ser aproveitados devido a sua pequena granulometria, a qual não se enquadra nas necessidades do processo de

retortagem. Assim, apenas o xisto retortado (XR) e a água de xisto (AX) são resíduos originados diretamente do processo de pirólise da rocha (PETROBRAS, 2011).



FIGURA 2 – SUBPRODUTOS DA INDUSTRIALIZAÇÃO DO XISTO
FONTE: Petrobras (2013)

O potencial de uso desses materiais na agricultura tem despertado o interesse de alguns órgãos brasileiros de pesquisa, como a Embrapa Clima Temperado, que desenvolve o Projeto Xisto Agrícola em parceria com a Petrobras e outras instituições de pesquisa. As frentes de pesquisa são divididas em eficiência agrônômica, segurança dos alimentos e segurança ambiental (PEREIRA et al. 2009a). Em conjunto, visam promover o uso do xisto garantindo sustentabilidade ambiental, social e econômica, além de representar uma oportunidade para o Brasil reduzir sua dependência de insumos externos, especialmente de fertilizantes (PEREIRA et al., 2009b).

As plantas absorvem uma grande quantidade de elementos do solo, dentre eles nutrientes essenciais para o seu ciclo de vida, como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre (LUCHESE, FAVERO e LENZI, 2001), além de elementos de transição como ferro, manganês, molibdênio, cobre, zinco e níquel. Outros elementos como prata, ouro, cobalto e alumínio são considerados não essenciais para as plantas, embora estimulem o crescimento vegetal. Também são absorvidos elementos sem função biológica conhecida que se apresentam tóxicos mesmo em

baixas concentrações, como o arsênio, cádmio, cromo, mercúrio e chumbo. Uma vez que as plantas constituem a base da cadeia alimentar, estes elementos podem ser ingeridos causando graves problemas de saúde ao organismo humano. É válido ressaltar que até mesmo micronutrientes podem ser considerados tóxicos em altos teores (PERALTA-VIDEA et al., 2009).

A TABELA 1 apresenta a composição inorgânica aproximada das matrizes de finos de xisto e calcário de xisto:

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO INORGÂNICA APROXIMADA DAS MATRIZES DE FINOS DE XISTO (FX) E CALCÁRIO DE XISTO (CX):

FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (mg kg ⁻¹)	ELEMENTO	
	FX	CX
0 - 100	Ag, As, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Hg, Li, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, V, Zn	Ag, As, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Hg, Li, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, V, Zn
100 - 1000	B, Ba, Mn	B, Ba, P
1000 - 10.000	Ca, Mg, P, Ti	Mn, Na, Ti
> 10.000	Al, Fe, K, Na, S	Al, Ca, Fe, K, Mg, S

Fonte: PEREIRA et al. (2009b)

A composição das duas matrizes é rica em diversos elementos químicos, sendo diferenciada principalmente pelos teores de Ca e Mg, superiores no calcário de xisto, o que justifica o seu potencial de correção do pH do solo (PEREIRA et al., 2009b). No entanto, a presença de elementos químicos bioacumulativos e de compostos orgânicos como fenóis, hidrocarbonetos aromáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), torna necessária a avaliação das plantas e dos alimentos obtidos a partir delas para que não ofereçam risco para a saúde humana e animal.

Dentre os trabalhos realizados para avaliar a segurança de alimentos em culturas que receberam a adição de xisto retornado, Pereira e Vitti (2004) analisaram os tecidos vegetais do tomateiro e chegaram à conclusão de que há pouca influência do xisto na absorção de espécies metálicas pela planta. Nas cultivares de batata Ágata e Baronesa, a aplicação de matrizes de FX, CX e XR não afetou as concentrações de elementos-traço como Hg, As, Cd, Cr, Ni, Pb nos tubérculos, influenciando apenas no teor de Se que é um elemento essencial para a saúde humana (SHEER et al., 2009a). Ao utilizar água de xisto como fertilizante foliar nas culturas da alface, milho e morango, Sheer et al. (2009b) obtiveram o mesmo resultado favorável ao seu uso na agricultura.

Por outro lado, dos Anjos e Reissmann (1996) verificaram que, embora a aplicação de finos de xisto na aveia preta tenha proporcionado maior crescimento vegetal, os teores de Cd e Cr encontrados na sua massa foliar seca excedem os teores encontrados em gramíneas de outras regiões e os teores de Cr atingiram níveis considerados tóxicos às plantas.

Neste sentido, projetos estão em andamento para avaliar a absorção de nutrientes e elementos-traço nas espécies estudadas, a fim de garantir ao consumidor a oferta de um produto que não ofereça riscos à saúde e ao meio ambiente. Dentre tais projetos, especial destaque vem sendo dado aos “Vinhos de Xisto”, produtos da vinificação das uvas produzidas em solos que receberam tratamentos com subprodutos do xisto.

Uma vez que esses subprodutos contêm matéria orgânica e diversos elementos químicos, a lixiviação e posterior absorção dessas espécies pela planta pode interferir no seu desenvolvimento e nas características do fruto produzido, bem como no produto final (nesse caso, o vinho). Assim, existe a necessidade de que estudos sejam conduzidos para avaliar alguns parâmetros de segurança dos alimentos nesse produto.

2.2 VITIVINICULTURA NO BRASIL

A vitivinicultura é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil. Nos últimos anos, tem promovido a geração de emprego também em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento. Em 2010, apenas 43,07 % da uva produzida no Brasil foi destinada ao processamento para elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva in natura (MELLO, 2010a). No Brasil, o consumo de vinhos (cerca de 1,6 litro per capita por ano) é considerado baixo se comparado com os países do Mercosul e menor ainda se comparados com os países tradicionais produtores de vinhos (ROSA, COSENZA e LEÃO, 2006). Atualmente, há uma tendência mundial de redução de consumo de vinhos em termos quantitativos e um aumento pelo consumo de vinhos finos (MELLO, 2010b). Isso reforça a necessidade de se produzir vinhos nacionais de melhor qualidade que consigam competir de maneira mais homogênea com os vinhos importados (ROSA, COSENZA e LEÃO, 2006).

2.3 O VINHO

De acordo com a legislação brasileira, o vinho é a bebida obtida da fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1988). Os vinhos elaborados com variedades de uvas americanas são denominados de mesa (ou comuns), e somente poderão ser denominados vinhos finos aqueles elaborados com uvas das variedades *Vitis Vinifera*. Quanto à cor, os vinhos são classificados como tintos, rosados ou brancos (BRASIL, 2004). Por ser resultante da fermentação natural da uva, o vinho tem a sua qualidade influenciada diretamente pelo solo, clima, matéria-prima (uva) e pela tecnologia do processo de vinificação (AMARANTE, 1986).

2.3.1 Solos e Clima

Em geral, a variedade, o clima e o solo estão ligados entre si. É complexa a influência do solo sobre a qualidade da uva (CATALUÑA, 1984). O tipo de solo mais recomendado à videira deve ser profundo, solto, pedregoso, com um pouco de areia e calcário, e um acidez com pH situado entre 6 e 6,5 (AMARANTE, 1986). Os terrenos alcalinos são os mais convenientes para se obter uvas ricas em açúcares, e os terrenos argilosos, pelo ferro que possuem, produzem uvas ricas em matéria corante. Os terrenos vulcânicos são bons para o cultivo da vinha, pela sua riqueza em fósforo e potássio (CATALUÑA, 1984). Geralmente os solos arenosos necessitam de mais adubação orgânica que os argilosos, porém são drenados com maior facilidade (AMARANTE, 1986).

As condições climáticas também influem muito na qualidade do vinho. Locais pouco ensolarados produzem vinhos ácidos, ao passo que o sol forte faz com que as uvas concentrem mais açúcar e produzam vinhos de maior teor alcoólico e menor acidez. Em anos chuvosos as uvas colhidas terão menos açúcares e mais ácidos, necessitando da adição de sacarose para atingirem o grau alcoólico mínimo à conservação do vinho. Um ano frio produzirá vinhos de baixa graduação alcoólica (AMARANTE, 1986).

2.3.2 Uvas

A videira pertence ao gênero *Vitis*, que compreende cerca de quarenta espécies (CATALUÑA, 1984), divididas em três grupos:

- a) Européia ou *Vitis vinifera*: são oriundas da bacia do Mediterrâneo e são intensamente cultivadas nos países da Europa. Essas videiras produzem uvas de casca fina e alta qualidade, razão pela qual são utilizadas na produção de vinhos finos.
- b) Americanas: têm origem na América do Norte e América Central, e são mais resistentes que as viníferas, além de produzirem maior quantidade de uvas. São de qualidade inferior, para serem consumidas in natura ou na produção de geleias e sucos.
- c) Híbridas: resultam do cruzamento das europeias com as americanas, no intuito de combater a filoxera, uma praga que costuma devastar vinhedos (PACHECO, 2000).

Foram identificadas até o momento cerca de 5.000 variedades de *Vitis vinifera*, sendo que apenas 50 são utilizadas na elaboração de vinhos de alta qualidade (AMARANTE, 1986).



FIGURA 3 – EXEMPLOS DE VARIEDADES DE UVAS EUROPEIAS, COMO A CABERNET SAUVIGNON (À DIREITA) E DE UVAS AMERICANAS, COMO A BORDÔ (À ESQUERDA)

2.3.3 Propriedades nutraceuticas

O vinho possui uma composição bastante complexa, pois além de etanol, açúcares e ácidos orgânicos, o vinho contém taninos, substâncias corantes, aromáticas e microelementos (STAFILOV e KARADJOVA, 2009). Estes constituintes e seus metabólitos atuam sinergicamente no organismo humano, motivo pelo qual o consumo moderado e regular de vinho tem sido associado a benefícios para a saúde. Embora efeitos terapêuticos tenham sido observados com o consumo da uva e do suco de uva, alguns pesquisadores acreditam que no vinho esses efeitos são potencializados pelos álcoois e/ou pela biodisponibilidade dos polifenóis, que aumenta após o processo de fermentação. Estudos também indicam que o vinho tinto é mais benéfico do que o vinho branco, uma vez que no primeiro o mosto é fermentado na presença das cascas, as quais contêm grande quantidade de polifenóis (GUILFORD e PEZZUTO, 2011).

2.4 ELEMENTOS QUÍMICOS EM VINHOS

A fração mineral total de um vinho raramente excede 5000 mg L^{-1} , e geralmente está entre 2000 e 3000 mg L^{-1} . Cerca de 97 % do conteúdo mineral é composto por 8 macro-elementos em concentrações superiores a 10 mg L^{-1} (K, Mg, Ca, Na, C, P, S, Cl). Os 3 % que restam são representados por micro-elementos e elementos-traço em concentração entre $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ e 10 mg L^{-1} , incluindo Si, Mn B, Rb, Zn, Sr, Fe, Cu, Al, F e I em concentrações mais altas, e Sn, V, Ti, As, Ba, Pb, Br, Cr, Li, Ni, Co, Mo e Ag em concentrações mais baixas. O vinho também contém elementos radioativos e do grupo das terras raras em nível ultra-traço, com concentrações inferiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (FLAMINI, 2008).

Os principais fatores que determinam o conteúdo de metais em vinhos são a contribuição do solo onde o vinhedo está localizado e a capacidade das uvas de absorver minerais. Outras fontes estão relacionadas ao processo de vinificação e com os equipamentos nele utilizados (STAFILOV e KARADJOVA, 2009). Vários autores concordam que a principal fonte de elementos traços nas uvas é o solo bem como a fertilização utilizada (ÁLVAREZ et al., 2007; ANGELOVA, IRANOV E BRAIKOV, 1999; FLAMINI, 2008; MACKENZIE e CHRISTY, 2005; RODRIGUES et al., 2011). Segundo Fiket, Mikac e Kniewald (2011), a aplicação de pesticidas, fungicidas e fertilizantes

contendo As, Cd, Cu, Mn, Pb e Zn leva ao aumento da quantidade desses elementos no solo, na uva e no vinho. Além disso, a composição multi-elementar do vinho está relacionada fortemente com a solubilidade destas espécies no solo. No entanto, a composição de elementos traço no vinho costuma ser diferente da uva. É comprovado que durante a fermentação e clarificação a concentração de vários elementos como Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, V e Zn diminui (VRCEK et al., 2011). Por outro lado, o uso de bentonita como agente precipitante aumenta significativamente a concentração de Al, Ba, Be, Ca, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Li, Mg, Mn, Pb, Rb, Sb, Sr, Tl, U, V e Zn no vinho (FLAMINI, 2008).

O consumo regular e moderado de vinho contribui com as necessidades diárias de ingestão de elementos essenciais como K, Ca, Mg, Cr, Co, Fe, F, I, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, Zn (LARA et al., 2005). Minoia et al. (1994) concluiu que a bebida contribui com um aumento de 10 % da ingestão de B, Ba, Co, Mn, Ni, Rb, Sb, Ti e V. Por outro lado, o mesmo estudo demonstrou que o teor de Pb no sangue de consumidores de vinho é consideravelmente maior se comparado ao de indivíduos abstêmios.

O chumbo e o mercúrio são toxinas cujos efeitos negativos no sistema nervoso central são reportados detalhadamente na literatura. Outros elementos também causam preocupação devido a sua toxicidade para os seres vivos. Dentre eles se destacam o arsênio, conhecido por causar câncer de bexiga, pulmão e pele; o cádmio, que pode atacar os rins, fígado e ossos, além de afetar o sistema reprodutor feminino (PERALTA-VIDEA, 2009). Já a toxicidade do cromo está relacionada ao seu estado de oxidação. Enquanto os compostos contendo Cr VI estão associados ao aumento da incidência de câncer de pulmão, o Cr III é um nutriente essencial tóxico apenas em altas doses (ATSDR, 2008). Isso reforça que até mesmo o consumo de micronutrientes em quantidades elevadas pode ocasionar danos à saúde do indivíduo (STAFILOV e KARADJOVA, 2009).

O Ministério da Pecuária, Abastecimento e Agricultura (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelecem limites máximos toleráveis (LMT) para contaminantes inorgânicos em alimentos. Alguns teores são específicos para o vinho e/ou bebidas fermentadas, enquanto outros se aplicam a alimentos em geral. Já os teores estipulados pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) são específicos para o vinho.

TABELA 2 - LIMITES MÁXIMOS TOLERÁVEIS PARA CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS SEGUNDO MAPA, ANVISA E OIV

ELEMENTO	LMT MAPA (mg L ⁻¹)	LMT ANVISA (mg L ⁻¹)	OIV (mg L ⁻¹)
As	0,20	0,20	0,2
Cu	1	5,00	1
Sn	250	250,00	-
Pb	0,30	0,50	0,15
Fe	15	-	-
Zn	5	5,00	5
Cd	-	0,50	0,01
Sb	-	0,20	-
Cr	-	0,10	-
Hg	-	0,01	-
Ni	-	0,10	-
Se	-	0,05	-
Ag	-	-	< 0,1

FONTE: BRASIL, 1965; BRASIL, 2010; OIV, 2012

Nota-se que, embora a legislação da ANVISA contemple maior número de elementos, todas apresentam boa concordância em relação aos valores estipulados para a concentração dos elementos. A OIV, como organização intergovernamental de caráter técnico e científico na área de uvas, vinhos e derivados, propõe limites máximos para várias substâncias orgânicas e inorgânicas presentes no vinho que são observadas em muitos trabalhos presentes na literatura.

2.5 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM VINHOS

O vinho é uma matriz complexa compreendendo água, álcool, açúcares e outros compostos orgânicos e inorgânicos (RODRIGUES, 2011; POHL, 2007). É possível analisá-lo sem nenhum pré-tratamento, mas nesse caso, é necessário utilizar soluções-padrão que contenham etanol ou o método de adição de padrão, a fim de evitar interferências químicas e físicas. Muitos elementos podem ser quantificados apenas diluindo-se o vinho, sendo recomendado adicionar HNO₃ para evitar a proliferação microbiana e diminuir as ligações entre espécies metálicas e compostos orgânicos (POHL, 2007).

Geralmente é preferível destruir a matéria orgânica presente na amostra para evitar efeitos de matriz na etapa de quantificação dos elementos químicos. A mineralização com agentes oxidantes é bastante utilizada, mas alguns autores relatam que é possível preparar a amostra apenas efetuando evaporação do álcool (MORENO et al., 2008). De qualquer maneira, a escolha do método de pré-tratamento

deve levar em consideração os analitos de interesse, as características da matriz e o tempo necessário para realizá-lo (LARA et al., 2005).

O conteúdo de alguns metais em vinhos tem sido determinado por várias técnicas por outros autores, dentre elas, espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) (ORTEGA, GONZÁLEZ-SANJOSÉ e BELTRÁN, 1999.; ONIANWA et al., 1999), espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ETAAS) (KARADJOVA, IZGI e GUCER, 2002; FRESCHI et al., 2001), espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (DEAN, EBDON e MASSEY, 1990.; RODUSHKIN, ODMAN e APPELBLAD, 1999; MARENGO e ACETO, 2003) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (WUILLOUD et al., 2001a, b; ACETO et al., 2002).

Para a determinação desses elementos, a Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) oferece o melhor desempenho por permitir determinações multi-elementares. Segundo Flamini (2008), a técnica propicia uma boa faixa de trabalho, é compatível com o uso de solventes orgânicos e é adequada para propósitos gerais de quantificação. No entanto, o autor cita como desvantagem o custo do instrumento, o volume de amostra necessário para a análise e problemas relacionados a interferências espectrais e sensibilidade. Porém, esses fatores foram comparados às técnicas de absorção atômica com atomização eletrotérmica e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, que também possuem seus fatores limitantes.

Estudos envolvendo a determinação de vários elementos em vinho por ICP-OES têm proporcionado resultados satisfatórios. No trabalho de Eschnauer et al. (1989), 25 elementos traço foram quantificados numa faixa de 0,001 mg L⁻¹ a 0,1 mg L⁻¹, dentre eles Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, V, Zn. González et al. (2009) quantificou 38 elementos em vinhos em concentrações da ordem de mg L⁻¹ utilizando o ICP-OES. Assim, considerando os limites máximos de contaminantes inorgânicos no vinho propostos pelas legislações específicas, o uso do ICP-OES é, a princípio, adequado para essa determinação.

2.6 AMINAS BIOGÊNICAS EM VINHOS

Os compostos nitrogenados mais simples presentes no vinho são as aminas, moléculas de baixa massa molar associadas ao grupo amino (JACKSON, 2008) e

sintetizadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos pelos metabolismos microbiano, vegetal e animal (LONVAUD-FUNEL, 2001; SILLA SANTOS, 1996).

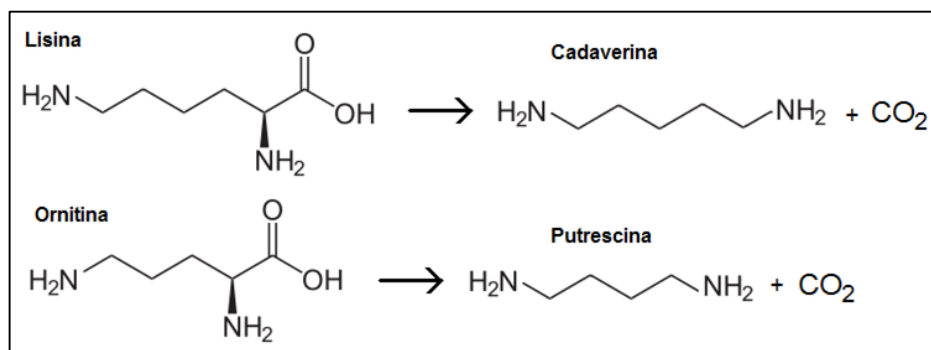


FIGURA 4 – REAÇÃO DE DESCARBOXILAÇÃO DA LISINA GERANDO CADAVERINA (ACIMA) E DA ORNITINA GERANDO PUTRESCINA (ABAIXO).

FONTE: Química Nova Interativa (2013)

Dentre os pré-requisitos para que as aminas biogênicas sejam produzidas, estão a disponibilidade de aminoácidos livres, presença de micro-organismos descarboxilase-positivos e condições no meio para que estes se desenvolvam (SILLA SANTOS, 1996).

Dentre as condições favorecem a produção desses compostos nas uvas, destacam-se as condições climáticas, o tipo do solo, a sua composição e fertilização (GARCIA-MARINO, 2009; MARQUES, LEITÃO e SAN ROMÃO, 2008). No estudo de Bertrand, Ingargiola e Delas (1991), uma alta dose de fertilizantes nitrogenados favoreceu a produção de aminas biogênicas. No entanto, muitos fertilizantes e condicionadores do solo contêm diversos elementos químicos que podem interferir no desenvolvimento da planta. Uma deficiência de nutrientes, como por exemplo, o potássio, pode favorecer a produção de aminas nas uvas (JACKSON, 2008; MARQUES, LEITÃO e SAN ROMÃO, 2008). Além disso, os elementos químicos presentes no solo também podem ser absorvidos pela videira, translocados para as uvas e estarem presentes no processo de vinificação (ANGELOVA, IRANOV E BRAIKOV, 1999; JUANG et al., 2012; KMENT et al., 2005; MACKENZIE e CHRISTY, 2005). Esses metais podem interferir no metabolismo dos micro-organismos descarboxilase-positivos, como as bactérias lácticas (BOYAVAL, 1989; SCHUT et al. 2011), consideradas as principais produtoras de aminas biogênicas (OIV, 2013a). Dessa maneira, é possível que o conteúdo de metais no mosto possa favorecer ou

diminuir a produção das aminas biogênicas. No entanto, a literatura carece de estudos correlacionando esses dois fatores.

Nos vinhos, muitas aminas são provenientes da matéria-prima ou de processos fermentativos (GARCÍA-MARINO et al. 2010; HERBERT et al., 2005). Poliaminas como putrescina e cadaverina estão presentes principalmente como resultado de contaminação por bactérias (JACKSON, 2008) associadas à falta de higiene no processo de vinificação ou a má condição sanitária das uvas (DEL PRETE et al., 2009; MARQUES et al., 2008; ZHIJUN et al., 2007).

Aminas biogênicas são substâncias fisiologicamente ativas que ocorrem no vinho em concentrações da ordem de alguns mg L^{-1} . Em níveis significativamente mais altos, essas aminas, sobretudo a histamina, podem induzir dores de cabeça, hipertensão e reações alérgicas em indivíduos sensíveis (LONVAUD-FUNEL; 2001; JACKSON, 2008; SILLA SANTOS, 1996). Os seus efeitos são potencializados pela presença de etanol, acetaldeído (JACKSON, 2008), e de outras aminas como a putrescina e cadaverina que interferem no metabolismo de desintoxicação de outras aminas (GARCÍA-MARINO, TRIGUEROS e ESCRIBANO-BAILÓN, 2010; HERNÁNDEZ-ORTE, 2008; SILLA-SANTOS, 1996). Além disso, algumas aminas podem ser precursoras de compostos carcinogênicos (BAUZA, KELLY e BLAISE, 2007; SILLA-SANTOS, 1996; SOUFLEROS et al., 2007).

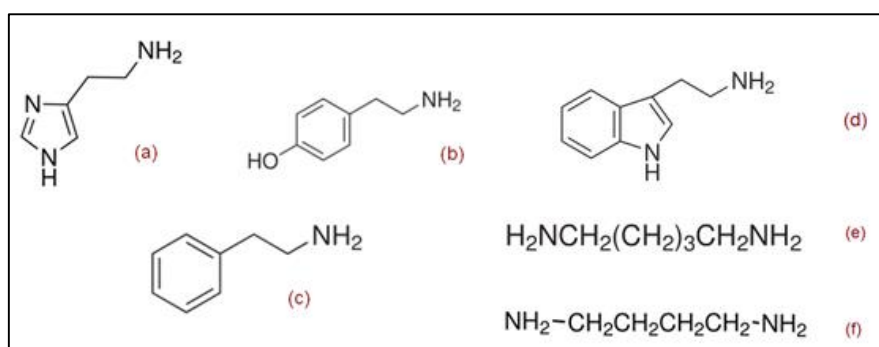


FIGURA 5 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DA HISTAMINA (A), TIRAMINA (B), FENILETILAMINA (C), TRIPTAMINA (D), CADAVERINA (E), PUTRESCINA (F)

Para fins de controle de qualidade e segurança de alimentos, não há legislação no Brasil que determine o limite máximo de aminas biogênicas em vinhos. Em outros países, é definido um limite máximo apenas para a histamina conforme mostra a TABELA 3:

TABELA 3 - LIMITE MÁXIMO DE HISTAMINA EM VINHO EM PAÍSES EUROPEUS

PAÍS	LIMITE MÁXIMO DE HISTAMINA NO VINHO (mg L ⁻¹)
Alemanha	2
Holanda	3
Finlândia	5
Bélgica	5 – 6
França	8
Suíça	10
Aústria	10

FONTE: MARQUES (2008)

Além disso, Marques et al. (2008) consideram que a concentração máxima de amins segura para consumo é de 10 mg L⁻¹.

2.7 DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM VINHOS

A determinação de amins biogênicas visa atender a demanda dos consumidores por produtos melhores e mais saudáveis, haja vista a sua nocividade (LONVAUD-FUNEL, 2001; SILLA-SANTOS, 1996). Embora seja possível determinar amins biogênicas por cromatografia a gás (CG) e eletroforese capilar, a cromatografia em fase líquida é a técnica mais utilizada (PEREIRA et al., 2008).

Como as amins não possuem um cromóforo específico precisam ser derivatizadas para diminuir os limites de detecção e evitar interferências da matriz (ANLI et al., 2004; GÓMEZ-ALONSO, HERMOSÍN-GUTIÉRREZ e GARCÍA-ROMERO, 2007; FLAMINI, 2008). Os reagentes podem acrescentar tanto cromóforos quanto fluoróforos às amins (BUSTO et al., 1997; PEREIRA et al., 2008; SOUFLEROS et al., 2003). Uma lista detalhada de todos os derivatizantes e suas aplicabilidades é descrita no artigo de Hernández-Cassou e Saurina (2011).

Um deles é o dietiletoximetilenomalonato (DEEMM), cujos derivados são estáveis, facilmente obtidos e detectáveis na região do ultravioleta. Não é necessário preparo prévio da amostra e pode ser atingido o limite de detecção de 0,07 mg L⁻¹ para amins biogênicas (HERMOSIN, CHICON e CABEZUDO, 2003). A metodologia desenvolvida por Gómez-Alonso, Herмосín-Gutiérrez e García-Romero (2007) tem como vantagem determinar simultaneamente aminoácidos, amins biogênicas e amônio em cervejas e vinhos. Ela é baseada em um método inicialmente utilizado para proteínas hidrolisadas e outras amostras biológicas, posteriormente aplicado a

aminoácidos livres em alimentos, mas nunca utilizado para determinar aminas biogênicas. Consiste na separação cromatográfica por cromatografia em fase líquida em coluna de fase reversa e detecção UV-vis das aminoenonas formadas pela reação entre aminoácidos, aminas biogênicas e amônio com o reagente derivatizante, como esquematizado na FIGURA 6.

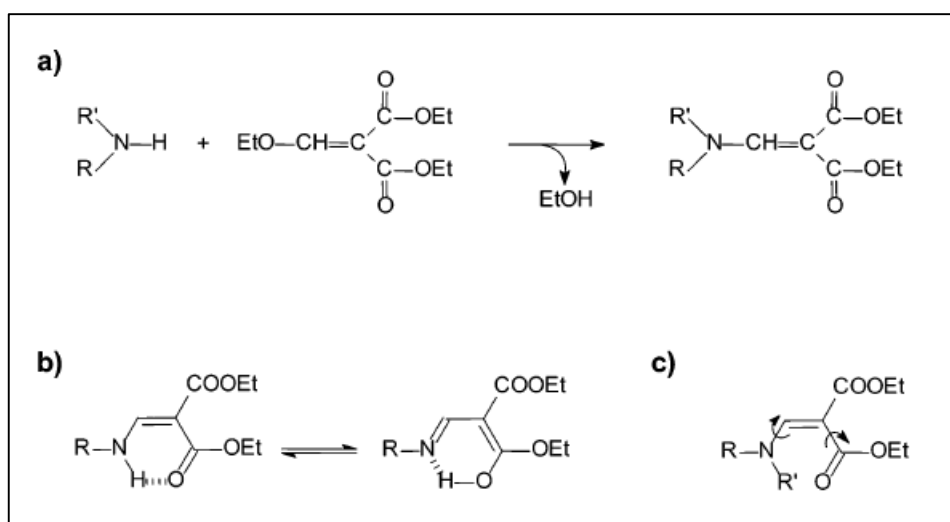


FIGURA 6 - ESTRUTURA DAS AMINOENONAS. (A) REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO; (B) PRODUTO DA DERIVATIZAÇÃO DE AMINOÁCIDO PRIMÁRIO; (C) PRODUTO DA DERIVATIZAÇÃO DE AMINOÁCIDO SECUNDÁRIO

O método descrito acima já foi adaptado por Bach et al. (2012) para a determinação exclusivamente de aminas biogênicas. No entanto, mesmo com menos analitos, o tempo de corrida total é de 52 minutos, o que inviabiliza a análise de um grande número de amostras. Dessa maneira, existe a oportunidade de variar as condições do sistema buscando a redução do tempo de separação e o desenvolvimento de um novo método para determinar de aminas biogênicas em vinhos.

2.8 QUIMIOMETRIA

Atualmente, modernos instrumentos de análise permitem produzir grandes quantidades de informações para um grande número de amostras que podem ser analisados em tempo relativamente curto. Isto leva a disponibilidade de matrizes de dados multivariadas que requerem o uso de procedimentos matemáticos e

estatísticos, a fim de extrair eficientemente o máximo de informações úteis (BURRUETA, ALONSO-SALCES e HEBERGER, 2007).

Os métodos de reconhecimento de padrões ou de classificação são utilizados para agrupar amostras em categorias segundo as suas similaridades (TODESCHINI et al., 2007). As duas técnicas de reconhecimento de padrões não supervisionados mais conhecidas são as análises de agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA). A PCA e a HCA são metodologias exploratórias que visam evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados. As informações obtidas a partir de PCA são muitas vezes complementadas com informações de outros métodos. Um exemplo são os grupos de vinhos semelhantes que podem ser avaliados por análise de agrupamento (CA) e classificados em categorias pré-estabelecidas através dos métodos de análise discriminante linear (LDA) e Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe (SIMCA) (MARTENS e NAES, 1996).

Recentemente, a caracterização de vinhos por análise multivariada tem sido utilizada em enologia com propósitos variados. A análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante (DA) tem sido aplicadas à antocianinas, flavonoides e parâmetros de cor visando diferenciar as regiões de produção. A análise de variáveis canônicas também tem sido aplicada com a mesma finalidade (SOUFLEROS et al., 2003). Segundo a literatura, esta autenticação e diferenciação de vinhos com variadas origens geográficas pode ser realizada com a utilização de ferramentas quimiométricas (CAPRON, SMEYERS-VERBEKE e MASSART, 2007; GARDE-CERDAN et al., 2008; KMENT et al., 2005).

Um dos propósitos da quimiometria é o estabelecimento de correlações entre variáveis, estudo pouco satisfatório do ponto de vista univariado, mas que produz bons resultados se tratado de maneira multivariada. No agrupamento hierárquico, a proximidade entre dois objetos define o agrupamento de duas classes. A proximidade entre dois objetos m e n baseada nos valores de i variáveis pode ser calculada de diversas maneiras, sendo uma delas pelo Coeficiente de Correlação Linear de Pearson (VICINI, 2005). Granato, Katayama e Castro (2010) demonstrou por resultados de HCA que o coeficiente de correlação entre o conteúdo fenólico de um vinho e o seu potencial antioxidante é significativo, o que indica a influência de uma variável em outra.

Assim, estabelecer correlações entre o tipo de fertilização e acúmulo de metais e produção de aminos biogênicas é decisivo para definir qual (ou quais) dos tratamentos empregados no solo é mais adequado para o cultivo da videira.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar possíveis alterações no teor de metais e de aminas biogênicas nos vinhos produzidos a partir de uvas cultivadas em solos condicionados com matrizes fertilizantes baseadas em subprodutos do xisto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer as condições experimentais para a determinação de aminas biogênicas em vinhos por cromatografia em fase líquida;
- Determinar o teor das aminas biogênicas cadaverina, histamina, putrescina, feniletilamina, tiramina e triptamina nos vinhos por cromatografia em fase líquida;
- Determinar a concentração dos elementos Cd, Cr, Cu, Fe, Pb e Zn nos vinhos por ICP-OES;
- Comparar os resultados dos referidos vinhos com os parâmetros de qualidade recomendados pelos órgãos de fiscalização;
- Correlacionar o efeito do condicionamento do solo com as matrizes fertilizantes com as variáveis citadas acima empregando ferramentas quimiométricas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os padrões das aminas, o padrão interno e o derivatizante utilizados foram da marca Sigma-Aldrich, com pureza mínima de 98 %, com exceção da 2-feniletilamina (> 95 %). Os solventes utilizados como fase móvel no cromatógrafo foram de grau HPLC/UV da marca J. T. Baker. Os demais reagentes empregados no preparo das soluções foram de grau analítico. As soluções foram preparadas utilizando água de elevada pureza com resistividade de 18, 2 M Ω cm (25 °C), obtida pelo sistema Millipore Simplicity UV.

O gás de arraste utilizado no ICP-OES consistiu de argônio com pureza superior a 99,999% da marca White Martins. As soluções utilizadas na curva analítica do ICP-OES foram preparadas a partir da solução-padrão ICP-multielementar 1000 mg L⁻¹ da marca Merck. As diluições foram executadas utilizando-se água de elevada pureza e reagentes de grau analítico ou de maior pureza.

4.2 AMOSTRAS

As microvinificações foram executadas conforme metodologia descrita por Rosier (1993), na Cantina Modelo da EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina, no município de Videira/SC, a partir de uvas tintas da variedade Cabernet Sauvignon, cultivadas na área experimental da mesma, localizada na região de Campina Bela, no mesmo município, sob responsabilidade técnica da própria empresa (FIGURA 7). Nessa região, a classificação do solo é nitossolo vermelho distrófico.



FIGURA 7 - CULTIVAR CABERNET SAUVIGNON NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DA EPAGRI/SC
FONTE: EPAGRI/SC (2013)

A adição das matrizes fertilizantes foi efetuada apenas uma vez, no dia 2 de setembro de 2009. As uvas são procedentes das safras dos dois anos seguintes, 2010 e 2011, oriundas de dois experimentos em paralelo, o FXCX e o CXCC.

No experimento FXCX, as videiras foram cultivadas em solos onde foram executados tratamentos com combinações de calcário de xisto (CX) e finos de xisto (FX) em diferentes doses, com granulometria adequada (BRASIL, 2004). Além disso, foi utilizada uma parcela testemunha (FXCX T1), conforme mostrado na TABELA 4:

TABELA 4 - TRATAMENTOS DOS SOLOS COM MATRIZES FERTILIZANTES UTILIZADOS PARA ELABORAÇÃO DE VINHOS EM PEQUENA ESCALA (EXPERIMENTO FXCX)

TRATAMENTO	FX (kg·ha ⁻¹)	CX (kg·ha ⁻¹)
FXCX T1	0	0
FXCX T2	120	120
FXCX T5	1680	1680
FXCX T6	900	900
FXCX T7	900	900
FXCX T8	900	900

FONTE: EPAGRI/SC (2013)

No experimento CXCC, as videiras foram cultivadas em solos onde foram executados tratamentos com combinações de calcário de xisto (CX) e calcário

calcítico (CC) em diferentes doses, com granulometria adequada (BRASIL, 2004). Além disso, foi utilizada uma parcela testemunha (CXCC T1), conforme mostrado na TABELA 5:

TABELA 5 - TRATAMENTOS DOS SOLOS COM MATRIZES FERTILIZANTES UTILIZADOS PARA ELABORAÇÃO DE VINHOS EM PEQUENA ESCALA (EXPERIMENTO CXCC)

TRATAMENTO	CX (kg·ha ⁻¹)	CC (kg·ha ⁻¹)
CXCC T1	0	0
CXCC T2	1000	3000
CXCC T4	3000	1000
CXCC T5	4000	0
CXCC T6	0	4000

FONTE: EPAGRI/SC (2013)

Seguem abaixo os dados meteorológicos de precipitação pluviométrica e temperatura média em Videira/SC, durante o período de 2010 e 2011 (TABELA 6):

TABELA 6 – DADOS METEOROLÓGICOS DE VIDEIRA/SC NOS ANOS DE 2010 e 2011

DADOS METEOROLÓGICOS DE VIDEIRA/SC												
PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA TOTAL MENSAL (mm)												
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
2010	282,2	247,2	268,6	315,7	178,9	98,6	115,9	70,4	58,5	178,6	72,6	295,6
2011	198,4	245,3	199,2	139	60,4	175,4	240	235,5	189,7	198,9	98,8	83,6
TEMPERATURA MÉDIA MENSAL (°C)												
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
2010	22,7	22,9	20,2	17,2	13,8	13,3	13,4	13,7	16,8	16,6	19,1	20,8
2011	22,7	22,6	20,2	18,0	14,1	11,6	12,7	13,9	15,2	18,1	18,9	19,9

FONTE: EPAGRI/SC e CIRAM (2013)

Na FIGURA 8 está apresentada uma foto do produto final, chamado “Vinhos de Xisto”.



FIGURA 8 – GARRAFAS DE “VINHO DE XISTO”

4.3 DETERMINAÇÃO DE METAIS NOS “VINHOS DE XISTO”

A determinação dos elementos de interesse foi realizada em espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), modelo iCAP 6500 Series da marca Thermo Scientific, com configuração axial, disponível no DQUI-UFPR, sob responsabilidade do Grupo de Química Ambiental (GQA). As linhas analíticas utilizadas para cada elemento e as condições instrumentais são descritas na TABELA 7.

TABELA 7 - CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO ICP-OES PARA A DETERMINAÇÃO DE METAIS NO VINHO

PARÂMETRO	
Rádio-frequência do gerador	40 W
Detector	Arranjo de diodos CCD
Tipo de Nebulizador	Concêntrico
Potência de radiofrequência	1150 W
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,0
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,70
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Comprimentos de onda (nm)	Cd (228,8); Cr (283,5); Cu (324,7); Fe (259,9); Ni (221,6); Pb (220,3); Zn (213,8)

A curva analítica foi preparada utilizando-se sete soluções multi-elementares de concentrações entre $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ em HNO_3 2 %. Para a quantificação foi utilizado o método do padrão interno com adição de ítrio na concentração final de $0,100 \text{ mg L}^{-1}$. A média dos sinais da prova em branco foi descontada dos sinais das amostras.

O material utilizado foi previamente imerso em solução de ácido nítrico 5 % durante 24 h, para em seguida serem efetuados dois enxágues com água Milli-Q.

4.3.1 Definição do método de pré-tratamento da amostra

Para a remoção de compostos orgânicos da amostra, foram testados três métodos de pré-tratamentos:

- a) Aquecimento a úmido: foram transferidos 25 mL da amostra de vinho para um béquer e adicionados 15 mL de H_2O_2 . A mistura foi levada a aquecimento de 80°C até redução da metade do volume. Em seguida, adicionou-se 1,00 mL de HNO_3 concentrado (70 %) e procedeu-se com aquecimento até redução do volume da amostra até 2 mL. A solução resultante foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, com lavagem do béquer utilizando quantidade suficiente de HNO_3 2 % e adição de água mili-Q até completar o volume do balão volumétrico (MORENO et al., 2008);
- b) Digestão em ultrassom: foram colocados 10 mL de vinho em um tubo de centrífuga com adição de 1,00 mL de HNO_3 concentrado e 2 mL de H_2O_2 . O tubo foi levado ao ultrassom por 60 segundos e à centrifugação a 3200 rpm por 10 min (CATARINO, 2006);
- c) Aquecimento a seco: foram adicionados 1,00 mL de HClO_4 e 2 mL HNO_3 concentrados a 5 mL da amostra, que em seguida foi levada ao aquecimento até completa secagem. O resíduo foi dissolvido em 0,2 mL de HNO_3 concentrado e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, sendo então completado com água milli-Q (LARA et al., 2005).

Após o tratamento, as amostras foram analisadas por ICP-OES.

4.3.2 Determinação de metais nos “Vinhos de Xisto”

Cada amostra foi analisada em simplificada, com exceção das amostras FXCX T2 2011, CXCC T4 2011 e CXCC T1 2010, que foram analisadas em triplicata.

4.3.3 Ensaio de recuperação para os metais

Testes de recuperação foram realizados através da fortificação da amostra FXCX T4 (2011) com solução multi-elementar contendo os íons dos elementos Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, e Zn. Os ensaios foram feitos em triplicata em três concentrações finais 0,100, 0,500 e 0,750 mg L⁻¹. Em seguida, as amostras passaram pelo método de pré-tratamento da amostra “A” e foram analisadas por ICP-OES. A média dos valores obtidos para a prova em branco foi calculada e descontada do valor obtido para as amostras.

4.4 DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS NOS “VINHOS DE XISTO”

4.4.1 Reação de derivatização

As amostras foram derivatizadas segundo procedimento descrito por Gómez-Alonso et al. (2007) e Bach et al. (2012). Utilizou-se 1,75 mL tampão borato (1,0 mol L⁻¹, pH 9), 750 µL metanol, 1,00 mL amostra sem pré-tratamento e 30 µL de dietiletoximetilenomalonato (DEEMM). Essa mistura foi colocada em ultrassom (marca Thornton Unique, modelo 1450 USC, Ultrasonic Cleaner, potência de 50 W, frequência 25 kHz) por 30 minutos, para em seguida ser aquecida a 70 °C por 2 h no banho de aquecimento (marca Fisatom modelo 550 potência 1200 W). Utilizou-se como padrão interno ácido L-2-aminoadípico 1,00 g L⁻¹ (em HCl 0,10 mol L⁻¹), do qual foram adicionados 20 µL à mistura reacional apenas em alguns experimentos de otimização da fase móvel no cromatógrafo a líquido. Algumas adaptações do procedimento acima foram realizadas:

4.4.1.1 Teste para modificação da concentração do tampão borato

Em cada frasco de vidro, foi adicionado 1,75 mL de tampão borato 0,50 mol L⁻¹ pH 9 e 0,75 mL de metanol. No primeiro frasco, adicionou-se 1,0 mL solução de HCl 0,10 mol L⁻¹; no segundo, 1,0 mL de HCl 0,05 mol L⁻¹; no terceiro, 1,0 mL de vinho comercial. O pH de cada solução foi medido utilizando peagâmetro (marca Tecnopon modelo MPA-210).

4.4.1.2 Adaptação da metodologia de derivatização

A metodologia adaptada seguiu as mesmas condições descritas na literatura, porém alterando-se a concentração do tampão borato de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, a concentração da solução de HCl utilizada para dissolver os padrões de aminas foi reduzida para $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e o padrão interno foi substituído por heptilamina g L^{-1} (em HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$). As misturas reacionais contendo vinho foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000 rpm em microcentrífuga (marca Labnet Force modelo 1618) antes da injeção no cromatógrafo a líquido.

4.4.2 Acompanhamento da reação de derivatização por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para cada amina, foi cortada uma placa de CCD revestida com sílica-gel nas dimensões $5,0 \times 2,5 \text{ cm}$. Medindo-se 1 cm a partir da base, foram aplicadas as seguintes amostras com o auxílio de um tubo capilar, respeitando o espaçamento de aproximadamente $0,5 \text{ cm}$ entre elas:

- a) Amina dissolvida em etanol 250 mg L^{-1} = 5 aplicações;
- b) Mistura reacional do padrão de amina (250 mg L^{-1} em HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) sem derivatizante e sem as etapas de ultrassom e aquecimento = 30 aplicações;
- c) Mistura reacional do padrão de amina (250 mg L^{-1} em HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) após ultrassom e aquecimento = 30 aplicações. Essa aplicação foi feita em triplicata, com os três pontos lado a lado;
- d) Mistura reacional do padrão de amina (25 mg L^{-1} em HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) sem derivatizante e sem as etapas de ultrassom e aquecimento = 30 aplicações;

Após a aplicação das amostras, a placa foi colocada em uma cuba contendo a fase móvel até que a mesma percorresse a placa até a parte superior. Para cada amina, foi utilizada a seguinte fase móvel definida previamente:

TABELA 8 - FASES MÓVEIS UTILIZADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DAS PLACAS CROMATOGRÁFICAS

AMINA	METANOL (mL)	ETANOL (mL)	ACETONA (mL)	HEXANO (mL)	NH ₃ CONC. (mL)
Cadaverina/Putrescina	6	-	4	-	1
Histamina	-	8	4	-	1
Feniletilamina	-	-	4	8	1
Tiramina/Triptamina	-	-	8	8	1

Encerrado o desenvolvimento da corrida cromatográfica, as placas foram reveladas por imersão em solução reveladora de ninhidrina (2 % em n-butanol) e aquecidas com o auxílio de soprador térmico (marca Toyo modelo TA-1150 potência 1500 W, frequência 50-60 Hz) até que as manchas aparecessem.

4.4.3 Otimização das condições para cromatografia em fase líquida (LC)

Usou-se o cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência marca Varian com bomba quaternária modelo 9012 e detector 18DAD, modelo 9065 Varian. A aquisição dos dados foi obtida por software Star LC Workstation versão 6.0. Foram utilizadas as colunas Agilent Eclipse XDB C18 e Varian RES ELUT C18, ambas nas dimensões 150 mm x 4,6 mm x 5 µm, e a coluna Varian modelo #071671-8 nas dimensões 250 mm x 4,6 mm x 5 µm. Em todas as corridas foi utilizada a coluna de guarda com fase estacionária C18 nas dimensões 10 mm x 4,6 mm x 5 µm da marca Varian modelo C-135B.

As fases móveis testadas foram constituídas de tampão acetato de sódio/ácido acético 25 mmol L⁻¹ pH 5,8 com azida de sódio 0,02 % (fase A) e como fase orgânica acetonitrila, metanol ou acetonitrila e metanol (80:20) (fase B). Utilizou-se vazão de 1,00 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e 50 µL, e detecção em 280 nm. A injeção foi feita manualmente com o uso de microseringa analítica marca Hamilton de 50 µL. Foram injetadas amostras derivatizadas de padrão de aminas (solução de cada amina e solução contendo todas as aminas) e de vinho. Para a solução contendo todas as aminas, foram testados dois padrões internos (ácido L-2-aminoadípico e heptilamina).

4.4.4 Determinação de aminas biogênicas nos “Vinhos de Xisto”

As aminas foram quantificadas utilizando a coluna da marca Varian modelo #071671-8 com as dimensões 250 mm x 4,6 mm x 5 µm, vazão de 1,00 mL min⁻¹,

volume de injeção de 50 μL , e detecção em 280 nm. A injeção foi feita manualmente com o uso de microseringa analítica marca Hamilton de 50 μL . A fase móvel foi constituída de tampão acetato 25 mmol L^{-1} pH 5,8 com azida de sódio 0,02 % como fase A, e acetonitrila e metanol (80:20) como fase B, segundo a programação gradiente mostrada na TABELA 9:

TABELA 9 - GRADIENTE DE FASE MÓVEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA

TEMPO (MIN)	FASE A (%)	FASE B (%)
0,00	60	40
10,00	60	40
10,01	50	50
17,00	50	50
20,00	0	100
25,00	0	100

Após cada corrida, a coluna foi equilibrada por 10,00 minutos com a fase móvel inicial do gradiente.

A curva analítica foi preparada utilizando-se cinco soluções derivatizadas em triplicata, as quais continham os padrões das seis aminas em concentrações entre 0,4 e 40 mg L^{-1} cada. Para a quantificação foi utilizado o método do padrão interno com adição de 20 μL de heptilamina na concentração de 1,04 g L^{-1} . A quantificação foi realizada por integração das áreas dos picos.

Cada amostra foi analisada em triplicata, com exceção das amostras FXCX T7 2010, FXCX T7 2011, CXCC T4 2011 e CXCC T6 2010, que foram analisadas em triplicata.

4.4.5 Ensaio de recuperação para aminas biogênicas

Testes de recuperação foram realizados através da fortificação da amostra FXCX T7 (2011) com os padrões das seis aminas. Os ensaios foram feitos em triplicata em três concentrações finais variando de 5,00 a 30,00 mg L^{-1} , para cada amina. Em seguida, as amostras foram derivatizadas como descrito anteriormente e analisadas no cromatógrafo a líquido.

4.5 PARÂMETROS DE MÉRITO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A precisão foi avaliada em nível de repetibilidade, pela média dos valores de desvio padrão relativo (DPR) os quais foram calculados para amostras analisadas em triplicata:

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{CDM}$$

Sendo: DP = desvio padrão e CMD = concentração média determinada.

A exatidão foi expressa pela Taxa de Recuperação (TX) calculada pela fórmula fornecida pela ANVISA (BRASIL, 2003):

$$TX = \frac{(\bar{x}_d - \bar{x}) 100}{d}$$

Onde: \bar{x}_d = concentração média das amostras fortificadas, \bar{x} = concentração média das amostras não-fortificadas e d = concentração do analito adicionada.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados segundo as recomendações da ANVISA (BRASIL, 2003):

$$LD = \frac{3 \times s}{S} \quad LQ = \frac{10 \times s}{S}$$

Sendo: s = desvio padrão de 10 medidas do branco (para os metais) ou o desvio padrão do intercepto da curva analítica (para as aminas biogênicas); S = inclinação da curva analítica para o analito (média, no caso de replicatas).

As Análises de Componentes Principais (PCA) foram executadas com o software Matlab versão 6.5, utilizando o pacote PLS-toolbox versão 3.0.

5 ANÁLISE DE RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DE METAIS NOS “VINHOS DE XISTO”

5.1.1 Estabelecimento do método

Observando-se a FIGURA 9, pode-se perceber que as curvas analíticas obtidas pelo ICP-OES apresentaram boa linearidade para todos os elementos.

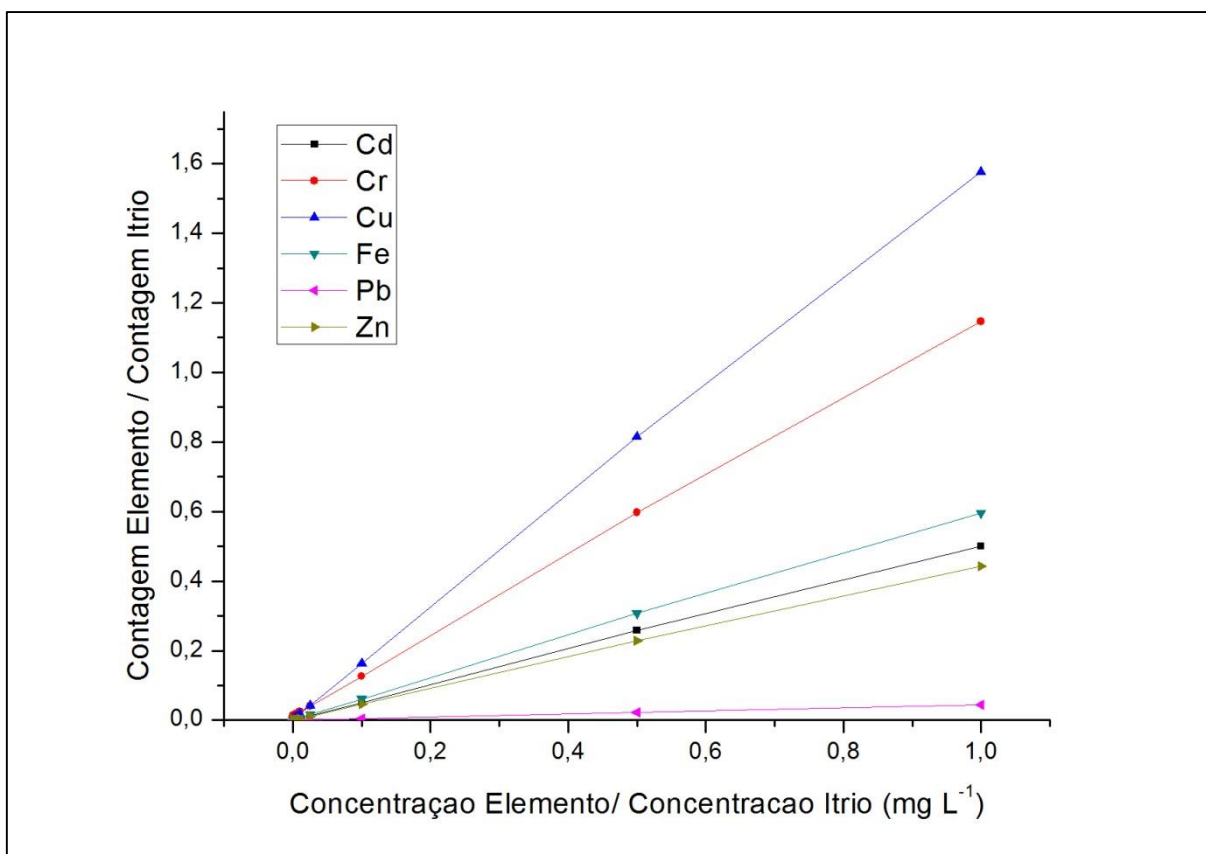


FIGURA 9 - CURVAS ANALÍTICAS PARA OS METAIS UTILIZANDO O MÉTODO DA PADRONIZAÇÃO INTERNA

Na TABELA 10 é possível perceber que todos os coeficientes de regressão possuem valores acima de 0,9975, além dos limites de quantificação terem ficado abaixo dos limites máximos exigidos pelos órgãos de fiscalização de contaminantes inorgânicos em vinhos. Observa-se que o limite de detecção do chumbo é o maior dentre todos os elementos, em função principalmente da sua menor sensibilidade.

Já o cobre possui o maior valor de sensibilidade, porém não possui os menores valores de LD e LQ, que são do cádmio, haja vista que o desvio padrão das leituras do branco ser maior no primeiro.

TABELA 10 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ICP-OES

ELEMENTO	SENSIBILIDADE (L μg^{-1})	DESVIO PADRÃO DO BRANCO (s; n = 10)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2
Cd	0,5702	0,05	0,3	0,9	0,9999
Cr	0,9445	0,8	2,5	8,2	0,9997
Cu	1,2841	0,2	0,4	1,2	0,9999
Fe	0,5398	0,7	3,9	13,0	0,9975
Pb	0,0416	0,8	59,0	196,7	0,9999
Zn	0,5066	0,07	0,4	1,4	0,9999

Legenda: LD = Limite de Detecção; LQ = Limite de Quantificação; r^2 = coeficiente de determinação

Dentre as soluções resultantes das aberturas de amostra, constatou-se visualmente que as obtidas a partir dos métodos de digestão por ultrassom e aquecimento a seco possivelmente não destruíram a matéria orgânica, uma vez que apresentaram coloração amarelada e avermelhada, respectivamente, indicando a presença de antocianinas e outros corantes.



FIGURA 10 - AMOSTRAS DE VINHO APÓS PRÉ-TRATAMENTO SEGUNDO OS MÉTODOS DE DIGESTÃO EM ULTRASSOM (À ESQUERDA) E AQUECIMENTO A SECO (À DIREITA)

Já as soluções do método de aquecimento a úmido ficaram incolores, indicando a possível destruição da matéria orgânica presente. Existe a possibilidade de a amostra conter compostos orgânicos incolores que venham a interferir nas determinações, porém estes provavelmente estão em menor concentração se comparados às amostras provenientes dos outros métodos. Os autores Lara et al. (2005) e Catarino (2006) não citaram problemas envolvendo a coloração remanescente da amostra e os métodos validados pareceram adequados. No entanto, para prolongar a vida útil do equipamento evitando possíveis entupimentos do sistema de nebulização, bem como minimizar a possibilidade de interferências espectrais, preferiu-se utilizar o método de aquecimento a úmido para tratar as amostras analisadas neste trabalho.

Para verificar se esse método possibilitava a obtenção de resultados exatos, sem que houvesse perdas ou contaminações, efetuou-se o ensaio de recuperação em uma das amostras de “Vinho de Xisto”, em três concentrações distintas (0,100, 0,500 e 0,750 mg L⁻¹), conforme recomendado pela ANVISA (BRASIL, 2003) e cujos resultados estão expressos nas TABELAS 9, 10 e 11. As concentrações adicionadas para o ensaio de recuperação se mostraram adequadas apenas para os elementos Fe e Zn. Para os demais, as três concentrações são superiores à concentração original. De maneira ideal, as concentrações adicionadas de analito devem ser próximas à contida na amostra, justificando uma adequação do método. No caso do Pb, o seu alto valor de LQ (196,7 µg L⁻¹) impossibilitou o cálculo da sua taxa de recuperação.

TABELA 11 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO PARA METAIS USANDO FORTIFICAÇÃO DE 0,100 mg L⁻¹

ELEMENTOS	C. NO VINHO (µg L ⁻¹)	C. ADIC. (µg L ⁻¹)	C. MEDIDA (µg L ⁻¹)	DESVIO PADRÃO (n=3)	TX (%)
Cd	1	100	105	0	104,4
Cr	24	100	121	9	96,8
Cu	64	100	173	15	109,2
Fe	1.089	100	1.079	178	-10,5
Pb	< 196,7	100	< 196,7	-	-
Zn	1.916	100	1.860	282	-56,3

Legenda: C. = Concentração; C. Adic. = Concentração Adicionada; TX = Taxa de Recuperação

TABELA 12 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO PARA METAIS USANDO FORTIFICAÇÃO DE 0,500 mg L⁻¹

ELEMENTOS	C. NO VINHO (µg L ⁻¹)	C. ADIC. (µg L ⁻¹)	C. MEDIDA (µg L ⁻¹)	DESVIO PADRÃO (n=3)	TX (%)
Cd	1	500	584	0	116,7
Cr	24	500	612	9	117,6
Cu	64	500	802	15	147,7
Fe	1.089	500	1.763	178	134,9
Pb	< 196,7	500	574	-	-
Zn	1.916	500	2.652	282	147,1

Legenda: C. = Concentração; C. Adic. = Concentração Adicionada; TX = Taxa de Recuperação

TABELA 13 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO PARA METAIS USANDO FORTIFICAÇÃO DE 0,750 mg L⁻¹

ELEMENTOS	C. NO VINHO (µg L ⁻¹)	C. ADIC. (µg L ⁻¹)	C. MEDIDA (µg L ⁻¹)	DESVIO PADRÃO (n=3)	TX (%)
Cd	1	750	810	0	107,9
Cr	24	750	820	9	106,0
Cu	64	750	1.009	15	126,0
Fe	1.089	750	1.796	178	94,3
Pb	< 196,7	750	786	-	< 196,7
Zn	1.916	750	2.637	282	96,1

Legenda: C. = Concentração; C. Adic. = Concentração Adicionada; TX = Taxa de Recuperação

Esse ensaio para calcular a exatidão também foi realizado por Moreno et al. (2008) ao testar três diferentes métodos de pré-tratamento de vinhos, porém com concentrações variáveis de fortificação para cada elemento e pré-estabelecidas como 25 % da concentração presente na amostra. O autor cita que seu método teve valores de recuperação variando entre 99,4 e 100,1 %. No entanto, essas recuperações são referentes aos elementos Cu, Fe e Zn, além de outros elementos alcalinos e alcalino-terrosos que foram determinados pelos autores. Para os demais, não há informação disponível sobre a recuperação obtida usando esse pré-tratamento da amostra. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003), ao validar um método analítico é aceitável obter recuperações entre 80 e 120%, sendo que houve boa concordância com esse valor para a maioria dos elementos nas três concentrações.

5.1.2 Determinação de aminas biogênicas nos “Vinhos de Xisto”

Os teores de metais encontrados nos “Vinhos de Xisto” estão apresentados na TABELA 14, na qual FXCX é a sigla para os vinhos provenientes do experimento

com finos de xisto (FX) e calcário de xisto (CX) e CXCC para os vinhos do experimento com calcário de xisto e calcário calcítico (CC). Para ambos os experimentos, T1 é a amostra testemunha e 2010 e 2011 se referem aos anos das duas safras. Foi possível concluir que nenhuma amostra analisada está em desacordo com as legislações vigentes para contaminantes inorgânicos em vinhos. É importante ressaltar que os teores de chumbo não puderam ser quantificados por estarem abaixo do limite de quantificação desse elemento. Assim sendo, pode-se afirmar que todos os vinhos possuem teores de Pb abaixo da concentração máxima permitida pelo MAPA e pela ANVISA (300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). O mesmo não pode ser afirmado para a legislação da OIV dado que o método utilizado para a determinação de Pb possui limite de quantificação acima do limite máximo tolerado recomendado por esse órgão.

Os valores obtidos também foram comparados com dados da literatura segundo revisão feita por Spaziani et al. (2005). É possível perceber que os valores de cádmio, cobre e zinco em alguns “Vinhos de Xisto” são superiores aos descritos pela literatura. Segundo Pohl (2007), estes elementos estão relacionados a pesticidas, fungicidas e fertilizantes aplicados na videira, e que conseqüentemente podem ser acumulados no vinho. No entanto, uma vez que eles se estendem tanto aos vinhos provenientes de uvas de solos com tratamento e como do solo testemunha, não é possível correlacionar estes teores às matrizes fertilizantes utilizadas. Além disso, os vinhos foram produzidos a partir de variedades de uva, solo, clima e práticas enológicas distintas, sendo esses fatores que podem alterar o conteúdo de metais presente no vinho (Rodrigues et al., 2011).

Na tabela são expressos dois tipos de desvio padrão relativo, um relacionado à triplicata de determinação de metais nos vinhos (DPR “tratamento e safra”) e outro relacionado à triplicata de tratamento no campo e vinificação (DPR vinificação). Enquanto o primeiro determina desvios experimentais da medida, o outro permite avaliar a influência das variáveis de campo (ex: clima) que não podem ser controladas experimentalmente. No que diz respeito ao desvio padrão relativo das medidas, esse está acima de 5% que é máximo recomendado pela ANVISA (2003). No entanto, Ribani et al. (2004) citam que são aceitos desvios de até 20% conforme a complexidade da amostra, e que resultados mais satisfatórios podem ser obtidos ao aumentar-se o número de replicatas.

TABELA 14 - CONCENTRAÇÕES DE METAIS ENCONTRADOS NOS “VINHOS DE XISTO” PROVENIENTES DOS EXPERIMENTOS FXCX E CXCC DAS SAFRAS DE 2010 E 2011

AMOSTRA	Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)
FXCX T1(10)	0,5	41,8	18,7	958,5	< 196,7	56,5
FXCX T2(10)	0,4	30,5	20,2	851,9	< 196,7	34,3
FXCX T5(10)	0,3	37,8	18,6	966,3	< 196,7	23,9
FXCX T6(10)	0,4	32,3	14,9	764,6	< 196,7	30,5
FXCX T7(10)	0,6	51,0	20,0	1.036,0	< 196,7	61,7
FXCX T8(10)	0,5	36,0	11,9	892,9	< 196,7	16,2
DPR FXCX 2010 (%)	62,4	32,7	51,8	16,8	-	37,5
DPR vinificação 2010 (%)	20,0	24,9	26,3	15,1	-	64,4
FXCX T1(11)	0,4	34,0	25,0	1.201,8	< 196,7	264,8
FXCX T2(11)	0,3	27,7	23,0	1.169,0	< 196,7	401,8
FXCX T5(11)	0,7	34,5	381,1	1.006,0	< 196,7	497,7
FXCX T6(11)	0,8	35,6	62,2	902,8	< 196,7	355,9
FXCX T7(11)	0,6	31,9	508,2	1.201,0	< 196,7	299,2
FXCX T8(11)	0,5	32,7	37,2	826,9	< 196,7	214,3
DPR FXCX 2011 (%)	0,0	0,5	2,8	2,1	-	0,4
DPR vinificação 2011 (%)	24,1	5,8	130,8	20,2	-	24,6
CXCC T1(10)	6,0	44,6	69,0	3.073,7	< 196,7	1.000,0
CXCC T2(10)	3,8	36,6	40,2	1.214,0	< 196,7	765,8
CXCC T4(10)	5,1	31,0	68,4	988,5	< 196,7	597,8
CXCC T5(10)	5,2	33,6	80,9	1.433,0	< 196,7	692,6
CXCC T6(10)	6,2	33,6	118,8	980,9	< 196,7	778,5
DPR CXCC 2010 (%)	8,3	15,0	18,3	8,9	-	9,0
CXCC T1(11)	0,6	48,7	93,9	1.363,0	< 196,7	2.207,0
CXCC T2(11)	0,9	34,0	74,1	1.189,0	< 196,7	2.361,0
CXCC T4(11)	0,8	36,6	64,8	1.124,1	< 196,7	1.916,0
CXCC T5(11)	1,0	54,5	68,0	1.425,0	< 196,7	2.375,0
CXCC T6(11)	0,7	46,3	109,4	1.226,0	< 196,7	2.425,0
DPR CXCC 2011 (%)	37,5	24,0	23,7	15,9	-	14,7
<i>Literatura</i>	0,010 - 1	6,6 - 90	0,010 - 1	1 - 5	10 - 300	500 - 3.500
LMT MAPA	-	-	1.000	15.000	300	5.000
LMT ANVISA	500	100	5.000	-	500	5.000
LMT OIV	10	-	1,000	-	150	5.000

Legenda: DPR = Desvio Padrão Relativo (n=3); LMT = Limites Máximos Toleráveis; Literatura: revisão feita por Spaziani et al. (2005)

A avaliação de diferenças no teor de metais entre os “Vinhos de Xisto” é dificultada devido a diversos fatores de campo que não podem ser controlados, como o clima e o desenvolvimento da vinificação. Assim, apenas as diferenças que forem superiores às diferenças entre amostras de campo produzidas em triplicata são consideradas significativas, e assim, podem ser atribuídas à fertilização. Para isso, utilizou-se o teste t pareado, considerando que as amostras T6, T7 e T8 são produzidas a partir de uvas cultivadas em solos que receberam a mesma dose de subprodutos do xisto. O desvio padrão da vinificação, compreendido entre 5,8 e 130,8%, mostra que há grandes desvios experimentais entre tratamentos iguais no campo e que passaram pelo mesmo processo de vinificação. Considerou-se essa triplicata como referência para a comparação com os tratamentos T1, T2 e T5. Para um nível de confiança de 95%, o valor de $t_{\text{crítico}}$ é de 4,30 ($n=3$) e os valores de $t_{\text{calculado}}$ para as amostras FXCX T2 2011 e FXCX T5 2011 são de -5,06 e 5,05, para os seus teores de Cr e Zn, respectivamente. Com isso, sugere-se que o tratamento FXCX T2 na safra de 2011 favorece a diminuição de Cr na amostra, enquanto o tratamento FXCX T5 na safra de 2011 favorece o aumento da concentração de zinco no vinho.

Para uma melhor interpretação dos resultados citados na TABELA 14, foi executada a análise de componentes principais (PCA) com dados autoescalados de concentração de metais. As duas primeiras componentes principais explicam quase 60% da variância das amostras.

Observando o gráfico biplot de *loadings* e *scores* das duas primeiras componentes principais apresentado na FIGURA 11, percebe-se que os vinhos FXCX de 2010 e 2011 estão agrupados pela sua similaridade. Eles apresentam maior concentração de Cu (*loading* negativo da PC1) e menor concentração dos demais elementos (*loading* positivo da PC1). As amostras FXCX não podem ser separadas por tratamento e por safra com exceção da amostra T7 de 2010, que se afasta do grupo por possuir maiores teores de Fe, Cd, Cr e Zn. No entanto, por se tratar de uma amostra da triplicata T6/T7/T8, essa diferenciação não pode ser atribuída ao tratamento do solo com as matrizes fertilizantes.

Todas as amostras CXCC de 2010 apresentaram valores positivos para PC2 devido aos maiores teores dos elementos Cd e Fe e a baixos teores de Zn e Cr. Também há maior diferenciação entre essas amostras e a amostra testemunha CXCC T1(10), uma vez que essa possui maior *score* no quadrante positivo da PC1 e PC2 se comparada com as demais, juntamente com o elemento Fe com maior *loading*, o que

justifica-se pela maior concentração do elemento nessa amostra. No entanto, tal comportamento não se repete na amostra testemunha de 2011, localizada no quadrante oposto, juntamente com as amostras CCCX T5 e T6, as quais contêm teores mais elevados de Cr e Zn se comparadas à T2 e T4.

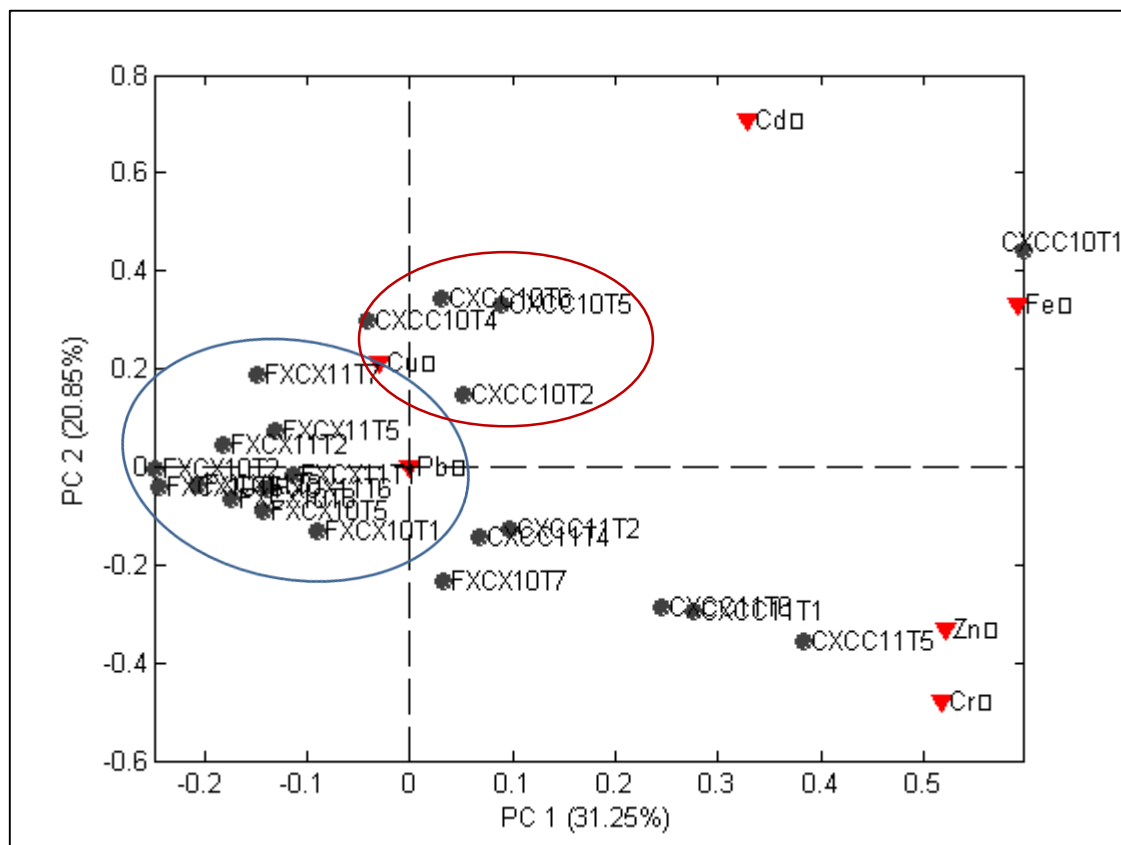


FIGURA 11 - GRÁFICO BILOT DE LOADINGS E SCORES DA PC1 PELA PC2 PARA OS TEORES DE METAIS "VINHOS DE XISTO"

Embora todas as amostras possuam concentração de Pb inferior a 197,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, o elemento foi incluído na análise. Por não influenciar as componentes principais, o *loading* dessa variável é igual a zero e as amostras não são discriminadas por esse parâmetro.

Embora haja variação significativa dos parâmetros nas amostras testemunha dos experimentos CXCC 2010 e 2011 e das amostras provenientes dos tratamentos com as matrizes fertilizantes, todas contêm os metais quantificados em concentrações aceitáveis pela legislação vigente. Isso corrobora o indicativo de que as matrizes fertilizantes podem ser utilizadas na cultura da videira sem comprometer a qualidade do vinho produzido.

5.2 DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

5.2.1 Estabelecimento do método

Para determinar as aminas biogênicas utilizando cromatografia em fase líquida com detector UV-Vis, é necessário que elas sejam previamente derivatizadas para que haja adição de cromóforos, os quais aumentam a detectabilidade e a seletividade do método. Foram escolhidos como referência os métodos propostos por Gómez-Alonso et al. (2007) e por Bach et al. (2012), devido a simplicidade da reação de derivatização e a compatibilidade com o detector UV no cromatógrafo. Os métodos citados quantificam um número maior de analitos, porém em maior tempo de análise. Como o foco desse trabalho é a segurança dos alimentos, selecionou-se quatro aminas cíclicas (histamina, feniletilamina, tiramina e triptamina) e as duas poliaminas (cadaverina e putrescina) mais abundantes nos vinhos. Do ponto de vista toxicológico, as aminas cíclicas estão relacionadas aos efeitos tóxicos após sua ingestão e as poliaminas ao aumento da toxicidade das primeiras por possuírem o mesmo ciclo metabólico (MORET & CONTE, 1996).

Ao preparar os reagentes para a reação de derivatização, foi constatada a formação de uma fase sólida no fundo do frasco contendo a solução tampão borato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Embora fosse possível utilizar apenas o sobrenadante, esse teria concentração inferior ao da solução tampão original, e no preparo das soluções seguintes a formação de fase sólida poderia não ser homogênea, causando problemas na repetibilidade do experimento. Não há relatos na literatura sobre esse fato, porém foram trocados os reagentes, e na persistência do ocorrido, reduziu-se a concentração da solução-tampão para $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. Por causa dessa modificação, foi preciso testar a capacidade tamponante dessa solução para verificar se ela seria suficiente para manter o pH da reação em 9,0 após a adição dos demais reagentes. Por isso, foi preparada a mistura reacional utilizando soluções de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, as quais são utilizadas para dissolver os padrões de amina, e utilizando uma amostra de vinho. Em todos os casos o pH sofreu pouca variação, porém optou-se por utilizar a solução de HCl menos concentrada, dado que o número de analitos dissolvidos na solução padrão é inferior ao reportado nos dois artigos de referência (GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GARCÍA-ROMERO, E., 2007;

BACH et al. 2012), sendo por isso, menor o número de moléculas de amins a serem protonadas para se tornarem solúveis.

Após a adaptação da reação de derivatização, considerou-se prudente testar a sua eficácia. A princípio, injetar cada padrão de amina no cromatógrafo seria suficiente para observar o aparecimento do pico da aminoenona. No entanto, não é possível observar o consumo da amina na reação, dado que a mesma não absorve significativamente na região UV. A estratégia utilizada foi acompanhar a reação por cromatografia em camada delgada (CCD), que permite a visualização das amins quando utilizado revelador específico para este grupo funcional. A detecção de amins biogênicas em alimentos utilizando essa técnica já foi descrita por Lapa-Guimarães e Pickova (2004), Shalaby (1999) e Tao et al. (2011), porém de maneira quantitativa, utilizando como detecção a densitometria.

Para este experimento, foi necessário definir as condições cromatográficas para as amins, principalmente o número de aplicações da amostra na placa, a fase móvel e o revelador. O número de aplicações foi definido empiricamente, a fim de ser uma quantidade razoável e que permitisse boa visualização das manchas. De todos os reveladores testados, incluindo soluções contendo ácido sulfúrico, ácido nítrico, vanilina ou permanganato de potássio, a ninhidrina se mostrou a mais adequada. Em seguida, foram testadas fases móveis que eluissem as amins em um fator de retenção compreendido entre 0,3 e 0,7. Com isso, as manchas das amins estariam localizadas na parte central da placa, havendo a possibilidade da visualização das manchas das aminoenonas em alturas próximas, caso estas também reagissem com a ninhidrina. Utilizou-se uma amina de cada vez, dado que não foi possível separar a mistura das seis amins na mesma placa, e em uma concentração mais elevada do que geralmente é encontrada nos vinhos a fim de melhorar a visualização da mancha.

Na FIGURA 12 observa-se uma foto das seis placas, cada uma correspondente a uma amina. Acima de cada placa estão escritos ou numerados à lápis o nome das amostras aplicadas na parte inferior dentro do limite de duas linhas. O primeiro ponto à esquerda corresponde ao padrão da amina dissolvido em etanol, o qual serve de controle para a comparação do fator de retenção da amina na mistura reacional. O segundo ponto é a mistura reacional sem o derivatizante, de maneira que a reação de derivatização não seja iniciada, o qual indica a mancha da amina no tempo zero de reação. O terceiro, quarto e quinto pontos correspondem à triplicata da mistura reacional contendo o derivatizante, de forma que ocorra a reação de

derivatização de maneira a consumir o analito, que no caso é a amina. O sexto e último ponto corresponde à mistura reacional com concentração dez vezes menor que das soluções anteriores, e sem conter o derivatizante, a qual foi chamada de MR 10%.

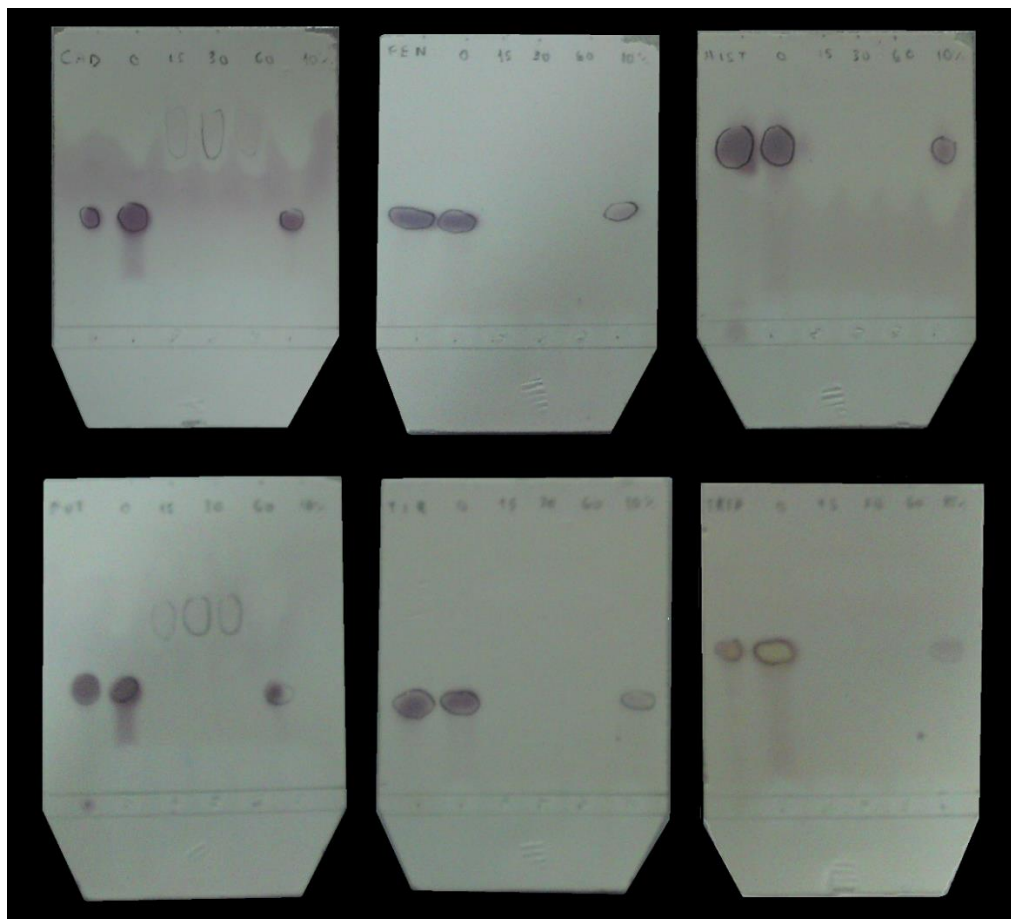


FIGURA 12 – CROMATOPLACAS PARA ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD). EM SENTIDO HORÁRIO, CADAVERINA, FENILETILAMINA, HISTAMINA TRIPTAMINA, TIRAMINA E PUTRESCINA.

Assim, é possível perceber que a mancha arroxeadada/rosada de cada amina está presente na solução de controle, na mistura reacional no tempo zero e na MR 10%, sendo nessa última com menor intensidade. Porém, a mesma não aparece em nenhum dos pontos da triplicata da mistura reacional contendo o derivatizante, o que indica que aproximadamente 90% ou mais da amina foi consumida e convertida à aminoenona. Assim, foi possível concluir que a reação de derivatização com as condições adaptadas foi eficaz. Em seguida, passou-se para as determinações por cromatografia em fase líquida, utilizando a coluna da marca Agilent. Primeiramente,

foi utilizada uma programação de eluição gradiente, apenas para testar a retenção das aminas e a ordem de eluição das mesmas.

Ao injetar cada mistura reacional de amina separadamente, foi possível observar diversos picos de menor intensidade além do pico majoritário da aminoenona, como é possível visualizar na FIGURA 13.

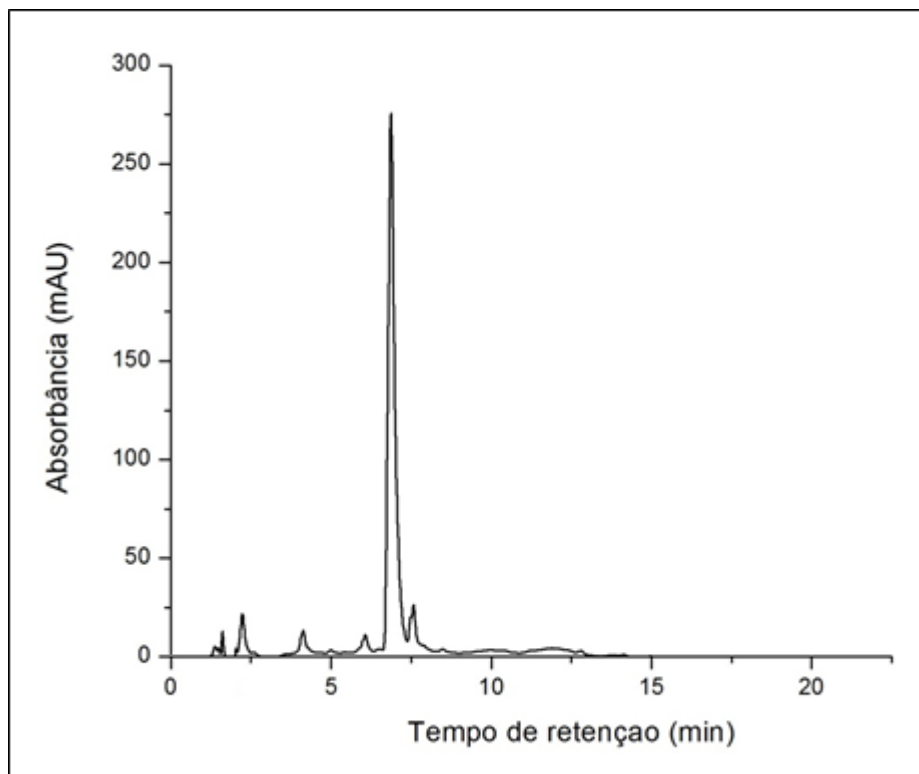


FIGURA 13 - CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DA SOLUÇÃO PADRÃO DA HISTAMINA 50,0 mg L⁻¹

Tais picos eram comuns aos cromatogramas de todas as aminas, havendo a dúvida se eles seriam oriundos de algum dos reagentes utilizados na derivatização. Para isso, eles foram injetados separadamente, conforme observado na FIGURA 14. O cromatograma na cor preta é referente à injeção de uma mistura dos solventes utilizados na mesma proporção da mistura reacional. Como não se percebe nenhum pico significativo nesse cromatograma, conclui-se que os solventes não são responsáveis pelas impurezas. O cromatograma em cor azul provém de uma solução contendo os mesmos reagentes citados anteriormente, mais o padrão de amina. Se as impurezas aparecessem nesse cromatograma, por comparação com o cromatograma anterior, haveria um indício de que elas são oriundas do padrão de amina. No entanto, só existe semelhança entre esses picos nos cromatogramas apresentados nas cores verde e vermelho. O verde corresponde à mistura reacional contendo padrão de amina (histamina), e o vermelho, a uma mistura reacional

contendo o derivatizante, porém sem a amina. Com isso, pode-se concluir que as impurezas são possivelmente oriundas de subprodutos da reação de derivatização ou de degradação do DEEMM.

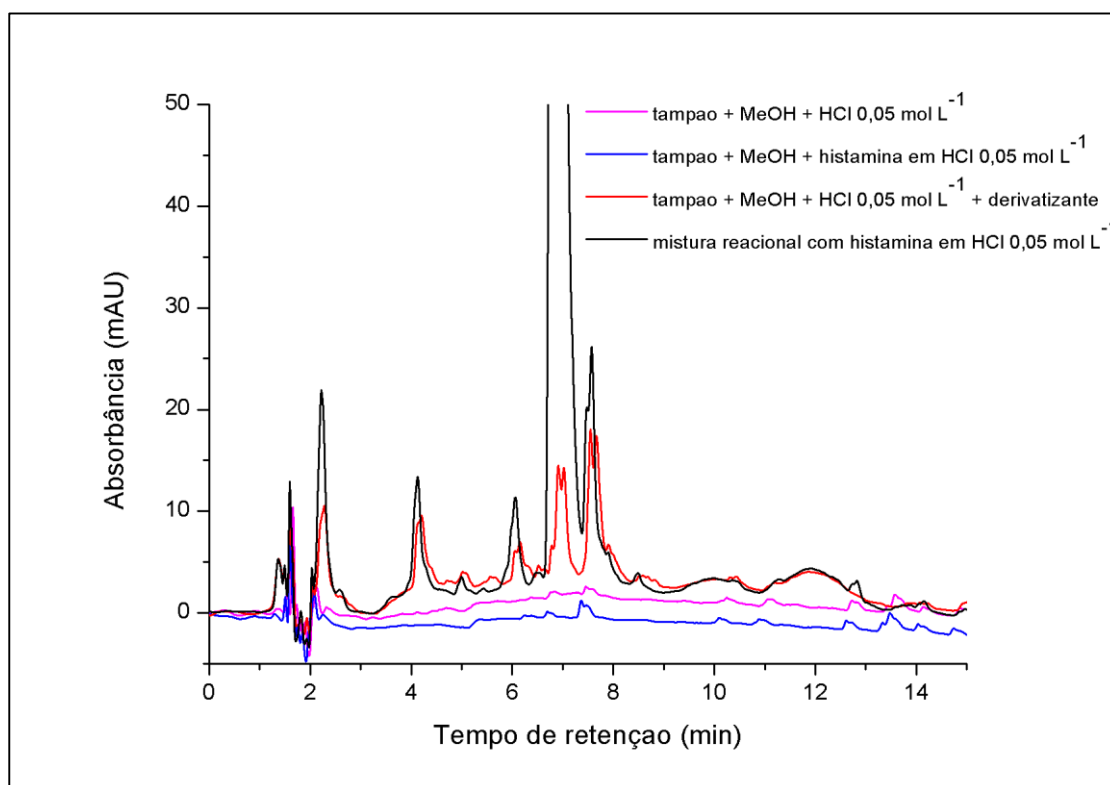


FIGURA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE O CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DA SOLUÇÃO PADRÃO DA HISTAMINA 50,0 mg L⁻¹ E DOS CROMATOGRAMAS DOS REAGENTES (AMPLIAÇÃO)

Para confirmar a origem desses subprodutos, foi dobrada a concentração do padrão de amina, esperando-se observar um aumento proporcional na concentração dessas impurezas. Isso indicaria que elas são subprodutos da reação de derivatização e que contêm aminas, implicando na necessidade da integração desses picos na quantificação dos analitos. No entanto, tal aumento ocorreu apenas no pico considerado da aminoenona, como visualizado na FIGURA 15:

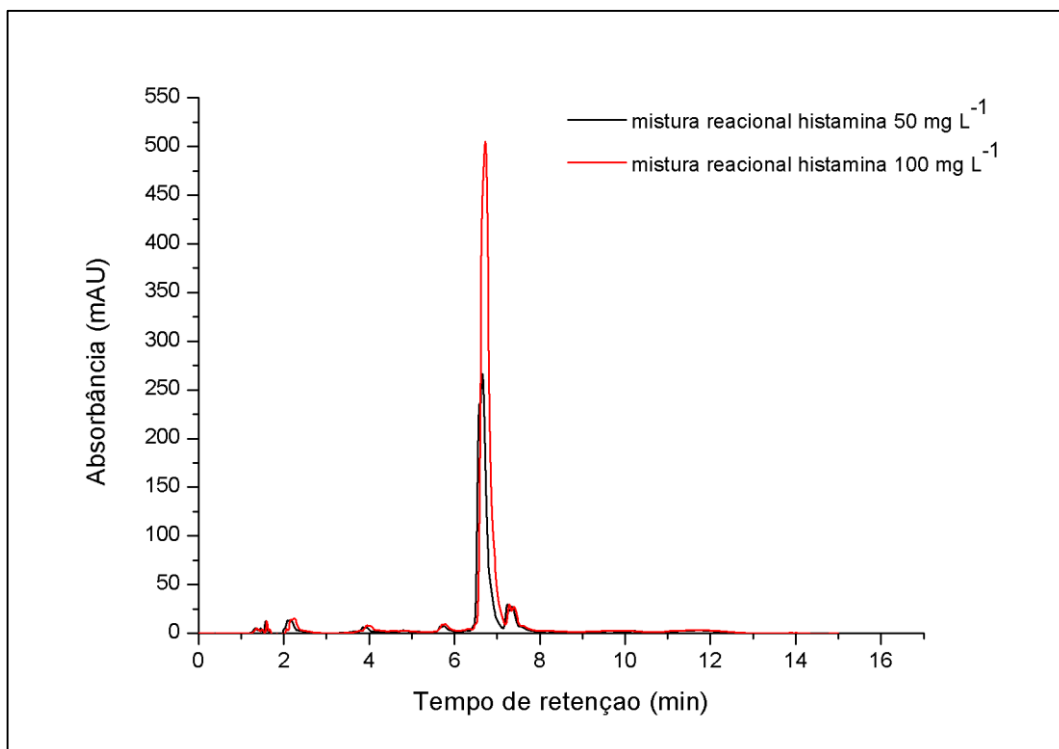


FIGURA 15 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE SOLUÇÃO PADRÃO DA HISTAMINA 50,0 mg L⁻¹ E DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE SOLUÇÃO PADRÃO DA HISTAMINA 100,0 mg L⁻¹

Como os picos das impurezas não aumentaram, concluiu-se que esses picos são oriundos apenas da degradação do derivatizante. Embora não interfiram na determinação, essas substâncias podem coeluir com outras aminas levando a erros na quantificação. O único relato encontrado na literatura sobre algumas moléculas derivadas do DEEMM em condições semelhantes à da mistura reacional é de Bazhin et al. (2012), mostrada na FIGURA 16:

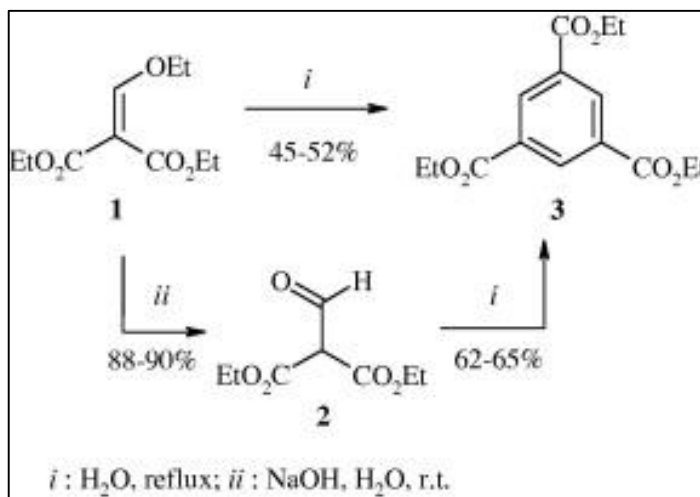


FIGURA 16 - POSSÍVEIS PRODUTOS FORMADOS ORIUNDOS DA DEGRADAÇÃO DO DEEMM DURANTE A ETAPA DE AQUECIMENTO DA MISTURA REACIONAL
 FONTE: BAZHIN ET AL. (2012)

Algumas estratégias de eliminação dessas impurezas foram testadas. Uma vez que a concentração do tampão borato foi alterada, suspeitou-se que o mesmo tivesse interferido na reação de degradação do derivatizante, dificultando-a e/ou gerando outros subprodutos. Ao notar-se que o pH da mistura reacional diminuía drasticamente nessa etapa, foram preparadas soluções tampão 0,50 mol L⁻¹ com pH mais elevado. Também foram testadas soluções 1,00 mol L⁻¹ com pH mais baixo, nesse caso pretendendo-se aumentar a capacidade tamponante sem que houvesse formação de fase sólida da solução tampão. O pH da mistura reacional também foi alterado na etapa de aquecimento visando facilitar a degradação do DEEMM.

Outras abordagens envolveram diminuir a concentração do derivatizante, visando utilizá-lo em excesso apenas suficiente para reagir com os analitos, mas não o bastante para gerar tal quantidade de subprodutos que aparecessem no cromatograma. Na hipótese de que os subprodutos poderiam ser substâncias voláteis, como as apresentadas por Bazhin et al. (2012), foi realizada a etapa de aquecimento com o tubo da mistura reacional aberto, visando deslocar o equilíbrio da reação de degradação. E por fim, membranas de filtração de nylon, PVDF e teflon foram utilizadas na tentativa de que nesse processo as impurezas permanecessem retidas. Como nenhum desses ensaios eliminou os interferentes, e já tendo sido certificado que esses vêm de subprodutos da degradação do derivatizante, procedeu-se com a otimização da fase móvel para separar os analitos sem que estes coeluissem com as impurezas.

Inicialmente, utilizou-se na separação das aminas as programações de fase móvel propostas pelos dois artigos de referência (GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GARCÍA-ROMERO, E., 2007; BACH et al. 2012), que se mostraram ineficientes. Outras fases móveis foram utilizadas, e no insucesso em separar os analitos, trocou-se a coluna por outra da marca Varian. Foi obtida a separação das aminas com resoluções entre os picos de 0,8 a 1,2. Embora resoluções acima de 1,0 sejam consideradas adequadas para quantificação (LANÇAS, 2009), a maioria dos picos referentes às impurezas não foi observada, possivelmente por terem eluído no início do cromatograma. A partir desses resultados, conclui-se que é necessário levar em consideração que ao utilizar colunas com especificações e até mesmo fabricante diferentes do artigo de referência, pode-se esperar cromatogramas diferentes, não apenas no que diz respeito à separação dos analitos e seus tempos de retenção, mas também na quantidade de picos que são visualizados.

Não foi possível localizar o pico correspondente ao padrão interno (ácido L-2-aminoadípico). Além disso, no artigo do Gómez-Alonso et al. (2007), o padrão interno possui tempo de retenção de aproximadamente 15 minutos, enquanto a primeira amina aparece no cromatograma em aproximadamente 45 minutos. Isso leva a conclusão de que o produto da derivatização do ácido L-2-aminoadípico é muito mais polar que as aminoenonas, ficando pouco retido na coluna e saindo da coluna juntamente com outros picos não identificados no início do cromatograma. Outro indicativo desse fato é o relato de Bach et al. (2012), que propôs uma adaptação do método de Gómez-Alonso et al. (2007) substituindo o padrão interno por 2,4,6-hidrocloreto de trimetilfenetilamina, embora o autor não justifique essa troca e nem a sua escolha do novo reagente. Escolheu-se utilizar a heptilamina, uma monoamina alifática cujo uso como padrão interno é reportado na literatura (KASCHAK et al., 2009; SANTOS et al., 2004) e que possui baixo custo e disponibilidade imediata. No entanto, após visualizar os cromatogramas contendo o padrão interno, foi possível perceber que o mesmo não apresenta tempo de retenção e simetria de pico semelhantes aos dos analitos, duas características desejadas para essa função. No entanto, ao utilizá-lo o método apresentou-se reprodutível, motivo pelo qual esse padrão interno foi mantido.

Assim, após algumas alterações na fase móvel, chegou-se a melhor separação utilizando essa coluna em um tempo de corrida total de 30 minutos, cujo

cromatograma está apresentado na FIGURA 17 e as condições cromatográficas, na TABELA 15:

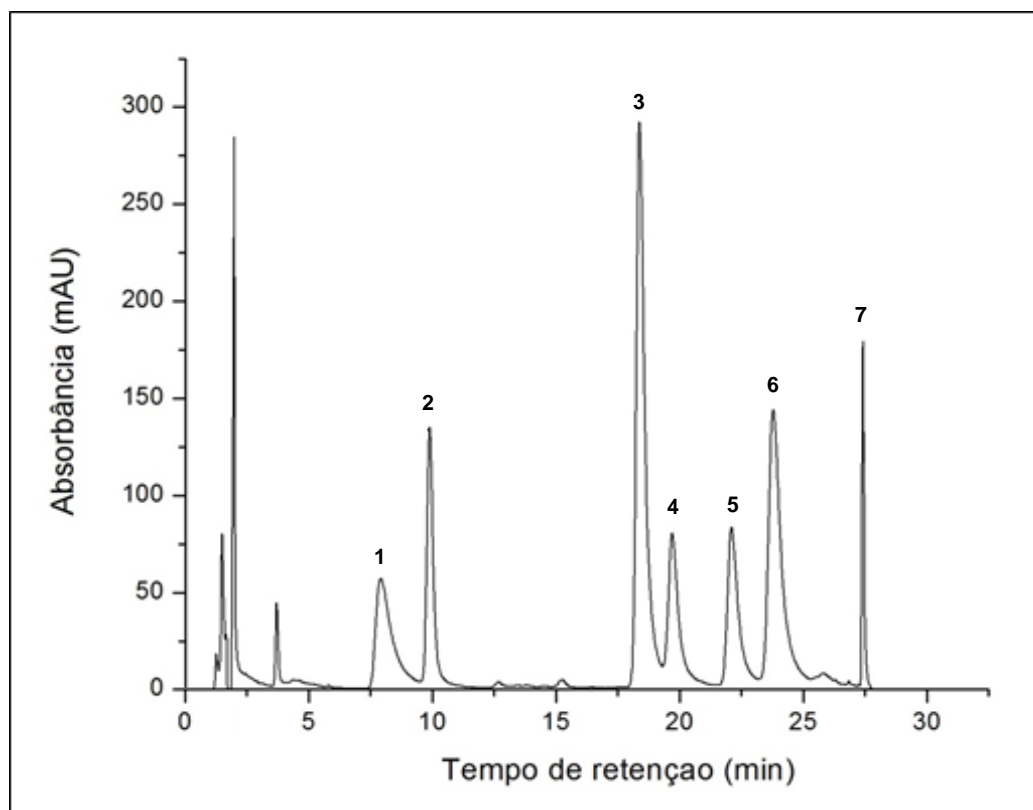


FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE SOLUÇÃO PADRÃO DAS AMINAS (50 mg L^{-1} CADA) E $20 \mu\text{L}$ DE HEPTILAMINA ($1,00 \text{ g L}^{-1}$) COMO PADRÃO INTERNO, UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 150 mm DE COMPRIMENTO. NA ORDEM: HISTAMINA (1), TIRAMINA (2), PUTRESCINA (3), TRIPTAMINA (4), FENILETILAMINA (5), CADAVERINA (6), HEPTILAMINA (7)

TABELA 15 - GRADIENTE DE FASE MÓVEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM LC UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 150 MM DE COMPRIMENTO

TEMPO (MIN)	FASE A (%)	FASE B (%)
0,01	70	30
10,00	67	33
10,01	62	38
23,00	61	39
25,00	0	100
30,00	0	100

No entanto, os picos mostram-se assimétricos, apresentando formação de cauda pronunciado, o que prejudica na integração dos mesmos e na quantificação. Após alterações da fase móvel B para melhorar a seletividade, sem sucesso, optou-se novamente pela troca da coluna. Visando aumentar a eficiência, utilizou-se a

coluna da marca Varian de 250 mm. Também alterou-se o volume de injeção de 20 μL para 50 μL no intuito de aumentar a detectabilidade do método. Com essa coluna foram obtidas as condições definitivas de análise, apresentadas no cromatograma da FIGURA 18 e na TABELA 16:

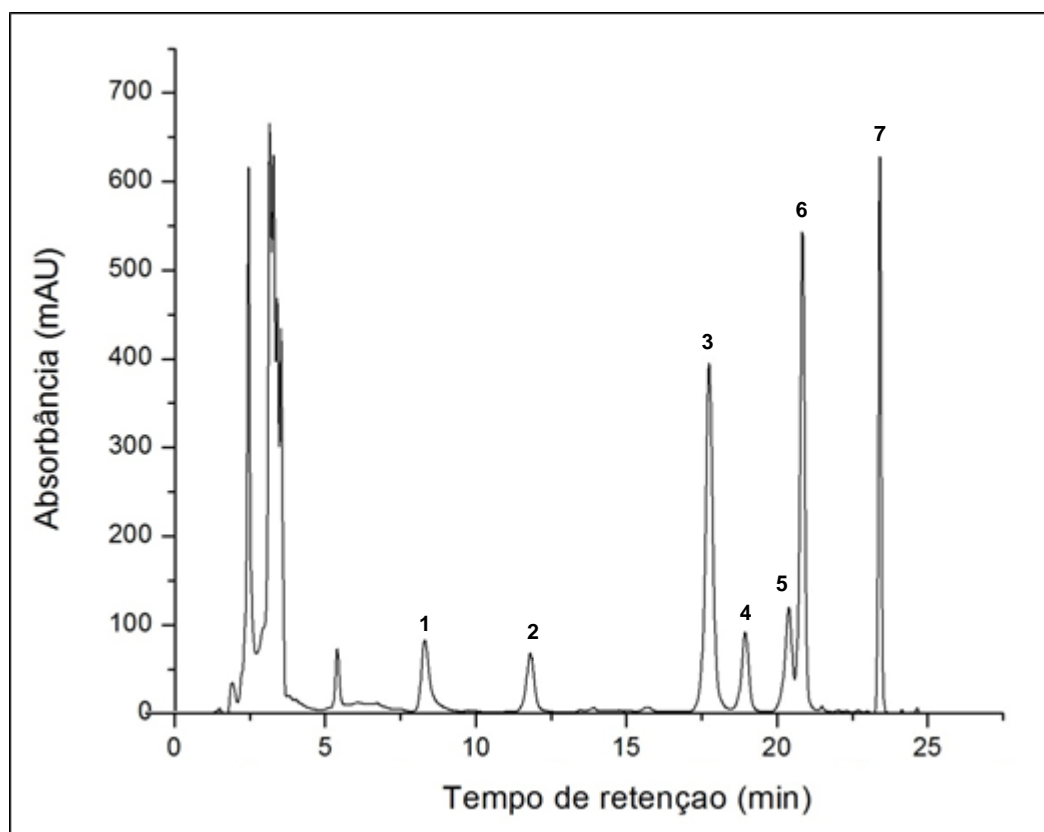


FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE SOLUÇÃO PADRÃO DAS AMINAS (10 mg L^{-1} CADA) E 20 μL DE HEPTILAMINA ($1,00 \text{ g L}^{-1}$) COMO PADRÃO INTERNO, UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 250 mm DE COMPRIMENTO. NA ORDEM: HISTAMINA (1), TIRAMINA (2), PUTRESCINA (3), TRIPTAMINA (4), FENILETILAMINA (5), CADAVERINA (6), HEPTILAMINA (7).

TABELA 16 - GRADIENTE DE FASE MÓVEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM LC UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 250 mm DE COMPRIMENTO

TEMPO (MIN)	FASE A (%)	FASE B (%)
0,01	60	40
10,00	60	40
10,01	50	50
17,00	50	50
20,00	0	100
25,00	0	100

Em seguida, foi efetuada a injeção da mistura reacional utilizando vinho, pois havia uma grande possibilidade de coeluição entre os analitos e as aminoenonas provenientes de outras aminas, de aminoácidos e de outros compostos da matriz que

absorvem no mesmo comprimento de onda que essas espécies. Nessa etapa é importante lembrar que o derivatizante reage com ambas espécies, e embora alguns analitos tenham sido selecionados para serem quantificados, os demais compostos devem aparecer no cromatograma da mesma maneira. Para a separação otimizada, observou-se que essas espécies são mais polares e eluem com menor tempo de retenção.

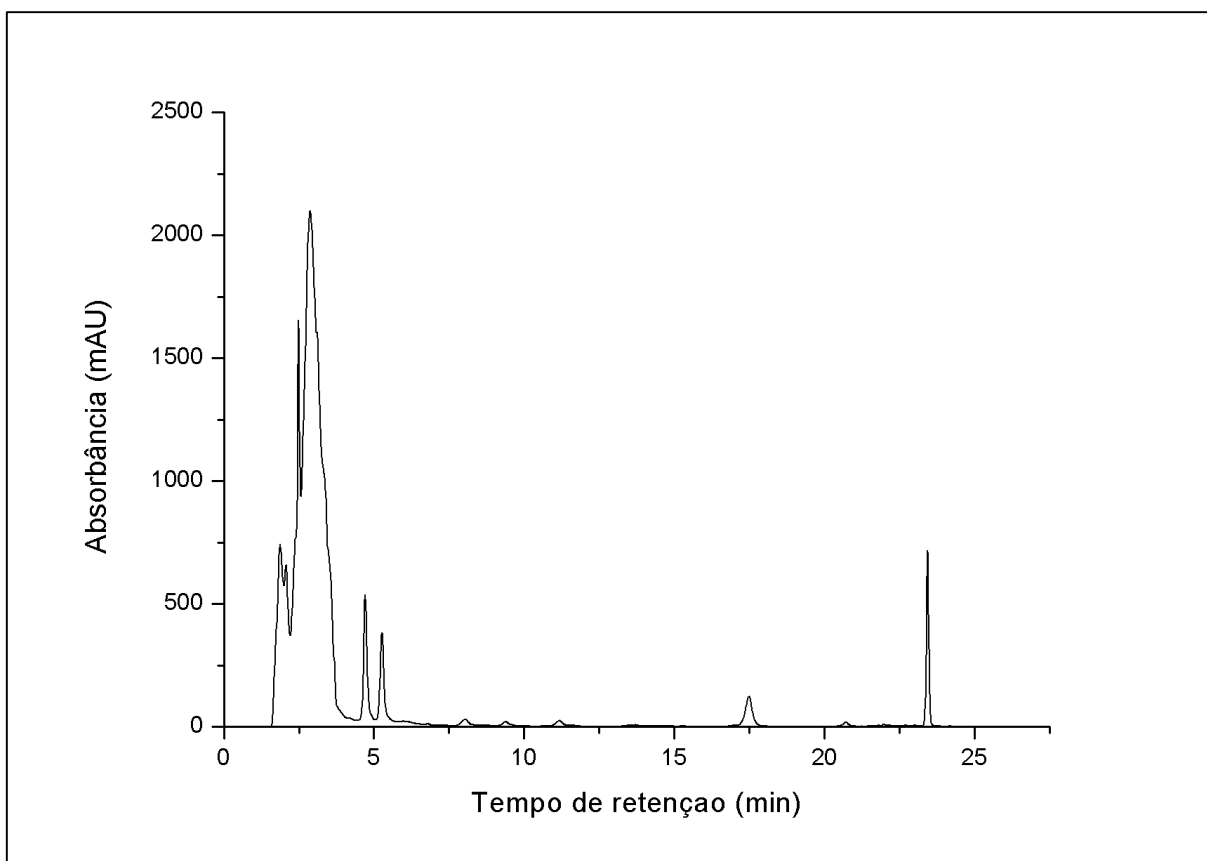


FIGURA 19 - CROMATOGRAMA DA MISTURA REACIONAL CONTENDO 1,00 mL DE VINHO E 20 μ L DE HEPTILAMINA ($1,00 \text{ g L}^{-1}$) COMO PADRÃO INTERNO, UTILIZANDO A COLUNA DA MARCA VARIAN DE 250 mm DE COMPRIMENTO.

A curva analítica, mostrada na FIGURA 20 e cujos parâmetros estão detalhados nas TABELAS 17 e 18, apresentou coeficientes de determinação muito próximos a 1, sendo mais altos do que os obtidos por Gómez-Alonso et al. (2007). Além disso, os baixos valores de desvio entre as triplicatas das amostras injetadas levam à confirmação de que a reação de derivatização é eficiente e reproduzível. Outros métodos utilizando diferentes derivatizantes também apresentaram coeficiente de determinação acima de 0,99 (MARCOBAL et al., 2005; GARCIA-VILLAR et al., 2006; GÓMES-ALONSO, HERMOSÍN-GUTIÉRREZ e GARCÍA-ROMERO, 2007; SOUFLEROS et al., 2007; ZHIJUN et al.; 2007; PROESTOS, LOUKATOS e

KOMAITIS, 2008; BACH et al., 2012; PINEDA et al., 2012) indicando que é uma das vantagens dos métodos de derivatização de amins. As faixas de concentração foram baseadas nas utilizadas em relatos da literatura, sendo que a cadaverina e a putrescina possuem faixa mais ampla por estarem presentes nos vinhos em maior quantidade. A quantificação foi feita pelo método do padrão interno, onde a razão entre a concentração do analito e do padrão interno é plotada contra a a razão das suas áreas de pico.

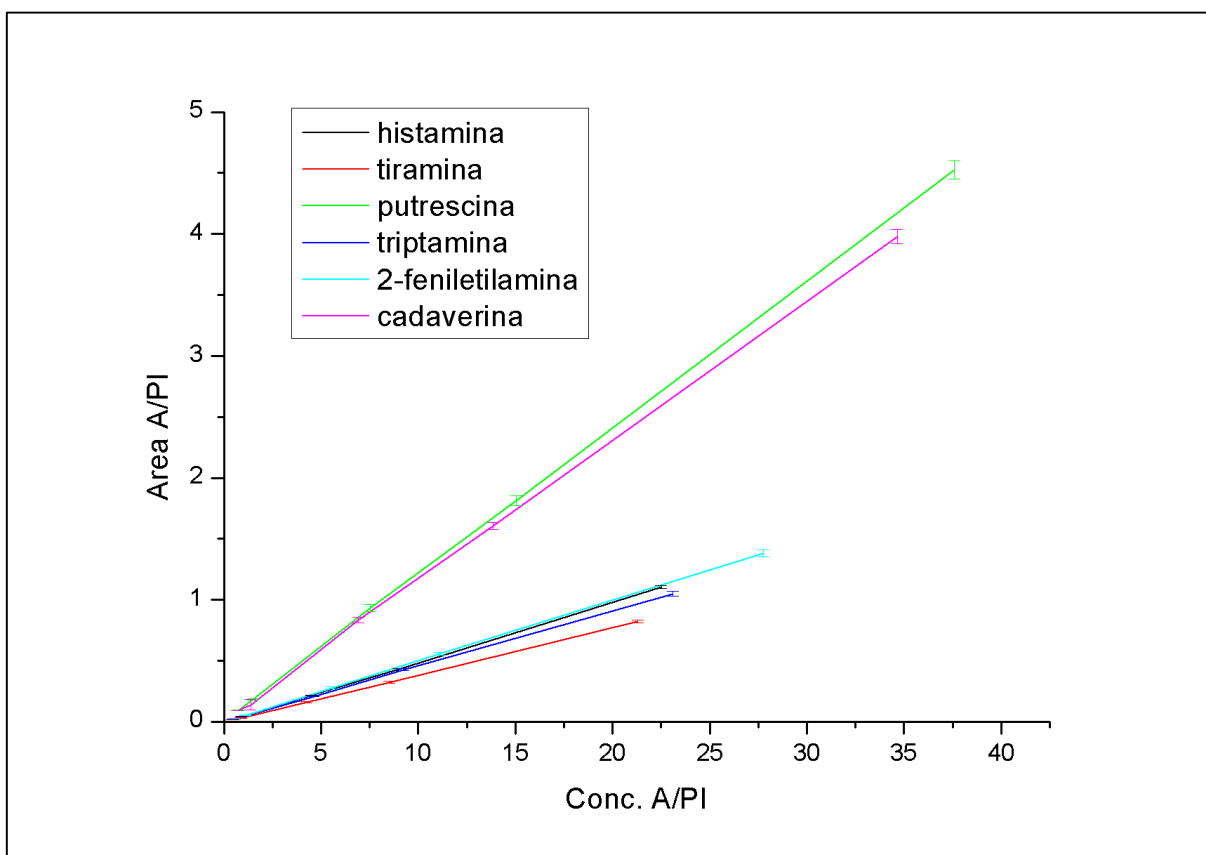


FIGURA 20 - CURVAS ANALÍTICAS PARA AS AMINAS UTILIZANDO O MÉTODO DA PADRONIZAÇÃO INTERNA

Poucos artigos apresentam os limites de quantificação dos seus métodos, dando ênfase aos limites de detecção, calculados multiplicando-se por 3 a relação sinal-ruído conforme uma das recomendações da OIV (OIV, 2013b). Embora muitos valores sejam da ordem de microgramas, não faz sentido comparar métodos que utilizam derivatizantes que contêm fluoróforos, dada a maior sensibilidade dos detectores baseados em espectrometria de fluorescência (LANÇAS, 2009). Também é pouco adequado comparar esses valores com de outros derivatizantes que adicionam cromóforos, pois as absorvidades molares dos produtos são diferentes.

Assim, pode-se comparar os valores obtidos com os dos trabalhos de Gómez-Alonso et al. (2008) e de Bach et al. (2012), que utilizam o DEEMM como derivatizante. O primeiro conseguiu limites de detecção entre 0,01 e 0,04 mg L⁻¹, conforme a amina; já o segundo, entre 0,1 e 0,5 mg L⁻¹, bastante semelhantes ao encontrados nesse trabalho.

Deve-se notar que as aminas putrescina e cadaverina são as com maior inclinação na curva, já que apresentam a maior resposta no detector. No entanto, o LD e o LQ da cadaverina são os maiores dentre todas as aminas, fato justificado pelo grande desvio de uma das replicatas. No entanto, ao desconsiderá-la, o LD e o LQ seriam de 0,6 e 2,2 mg L⁻¹, respectivamente, devido da diminuição do número de graus de liberdade. Assim, o mais adequado seria repetir essa medida para eliminar eventuais problemas pontuais. O mesmo ocorre com o LQ da histamina, que está acima do primeiro ponto da curva. O mesmo pode ser reduzido para 0,002 e 0,006 mg L⁻¹ ao desconsiderar uma das replicatas. No entanto, esses valores foram mantidos para fins de discussão. Além disso, tanto para a histamina como para cadaverina, os desvios padrão no primeiro ponto da curva são baixos (0,0011 para ambas), demonstrando que a medida foi efetuada com precisão. Em ambos os casos, o limite de quantificação foi assumido como o primeiro ponto da curva, por ser adequado para fins de quantificação de aminas em vinhos.

TABELA 17 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

AMINA	SENSIBILIDADE (L µg ⁻¹)	INTERCEPTO	DESVIO PADRÃO DO INTERCEPTO (s; n = 3)	r ²
Histamina	0,0494	-0,0093	0,0041	0,9997
Tiramina	0,0388	-0,0042	0,0009	0,9999
Putrescina	0,1202	0,0093	0,0038	0,9999
Triptamina	0,0455	-0,0008	0,0016	0,9999
Feniletilamina	0,0497	-0,0002	0,0015	0,9999
Cadaverina	0,1147	0,0093	0,0170	0,9998

Legenda: r² = coeficiente de determinação

TABELA 18 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONTINUAÇÃO)

AMINA	INTERVALO (mg L ⁻¹)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Histamina	0,50 – 24,0	0,2	0,8
Tiramina	0,50 - 22,8	0,1	0,2
Putrescina	0,80 - 40,2	0,1	0,3
Triptamina	0,50 - 24,7	0,1	0,4
Feniletilamina	0,60 – 29,7	0,1	0,3
Cadaverina	0,70 – 37,1	0,4	1,5

Legenda: LD = Limite de Detecção; LQ = Limite de Quantificação

Para determinar a exatidão, foi efetuado o ensaio de recuperação por meio da fortificação de uma amostra de vinho, a qual foi utilizada para dissolver os padrões das aminas. Tal procedimento foi necessário devido a baixa solubilidade dessas espécies, dando origem a soluções de concentração próximas a 500 mg L⁻¹ em solução contendo apenas uma amina, e menor caso a solução seja preparada a partir do padrão de várias aminas. Ao utilizar uma alíquota de pequeno volume para efetuar a fortificação, não foi possível atingir concentrações que contemplassem valores correspondentes a faixa média e superior de trabalho. Ademais, optou-se por não utilizar maiores volumes de solução para a fortificação uma vez que o volume de mistura reacional seria alterado significativamente.

Os dados do ensaio de recuperação estão expressos nas TABELAS 19, 20, 21 e 22. Nota-se que as taxas de recuperação encontram-se entre 80 e 100 %, sendo que a maioria está próxima de 90%. Esses resultados estão dentro da faixa obtida por vários autores em diferentes métodos de derivatização de aminas citados anteriormente, com a diferença de que esses estudos também apresentaram valores de recuperação acima de 100 %. Uma das hipóteses que explicaria esses dados é o fato do DEEMM derivatizar apenas aminas nas soluções da curva analítica e derivatizar aminas e aminoácidos na amostra. Dessa maneira, há uma carência de derivatizante para reagir com todas as espécies da amostra, fazendo com que as aminas sejam derivatizadas em menor proporção. Um indício desse fato é o resultado do ensaio de recuperação após efetuar a reação de derivatização utilizando 40 µL de DEEMM, o qual é apresentado na TABELA 19. Nesse caso, foram algumas das taxas de recuperação acima de 100%, indicando uma possível necessidade do aumento desse reagente na reação. No entanto, poderia-se retornar ao problema discutido anteriormente acerca das impurezas presentes no cromatograma.

TABELA 19 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONCENTRAÇÃO INFERIOR)

AMINAS	C. NO VINHO (mg L ⁻¹)	C. ADIC (mg L ⁻¹)	C. MEDIDA (mg L ⁻¹)	DESVIO PADRÃO (n=3)	TX (%)
Histamina	4,3	6,5	9,9	0,1	86,2
Tiramina	4,7	5,4	9,4	0,5	87,0
Putrescina	6,7	8,6	15,2	0,8	98,8
Triptamina	n.d.	6,3	5,1	0,2	81,0
Feniletilamina	n.d.	9,4	8,5	0,4	90,4
Cadaverina	0,3	6,6	5,9	0,3	84,9

Legenda: C. = Concentração; C. Adic. = Concentração Adicionada; TX = Taxa de Recuperação

TABELA 20 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONCENTRAÇÃO MÉDIA)

AMINAS	C. NO VINHO (mg L ⁻¹)	C. ADIC (mg L ⁻¹)	C. MEDIDA (mg L ⁻¹)	DESVIO PADRÃO (n=3)	TX (%)
Histamina	4,3	13,0	16,1	0,8	90,7
Tiramina	4,7	10,9	14,2	1,1	87,2
Putrescina	6,7	17,2	23,1	0,5	95,0
Triptamina	n.d.	12,6	10,4	0,3	81,9
Feniletilamina	n.d.	18,8	16,8	0,5	89,1
Cadaverina	0,3	13,1	11,1	0,2	82,4

Legenda: C. = Concentração; C. Adic. = Concentração Adicionada; TX = Taxa de Recuperação

TABELA 21 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONCENTRAÇÃO SUPERIOR)

AMINAS	C. NO VINHO (mg L ⁻¹)	C. ADIC. (mg L ⁻¹)	C. MEDIDA (mg L ⁻¹)	DESVIO PADRÃO (n=3)	TX (%)
Histamina	4,3	19,5	21,5	0,6	88,1
Tiramina	4,7	16,3	19,6	0,8	91,4
Putrescina	6,7	25,2	31,4	0,4	97,8
Triptamina	n.d.	19,0	15,8	0,2	83,6
Feniletilamina	n.d.	28,3	25,1	0,3	88,7
Cadaverina	0,3	19,7	16,5	0,2	82,2

Legenda: C. = Concentração; C. Adic. = Concentração Adicionada; TX = Taxa de Recuperação

TABELA 22 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE RECUPERAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS (CONCENTRAÇÃO MÉDIA) UTILIZANDO 40 µL DE DEEMM NA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO

AMINAS	C. NO VINHO (mg L ⁻¹)	C. ADIC. (mg L ⁻¹)	C. MEDIDA (mg L ⁻¹)	TX (%)
Histamina	4,3	13,0	16,4	93,1
Tiramina	4,7	10,9	16,3	106,2
Putrescina	6,7	17,2	24,5	103,2
Triptamina	n.d.	12,6	11,0	86,7
Feniletilamina	n.d.	18,8	17,6	93,8
Cadaverina	0,3	13,1	11,7	87,3

Legenda: C. = Concentração; C. Adic. = Concentração Adicionada; TX = Taxa de Recuperação

5.2.2 Determinação de aminos biogênicos nos “Vinhos de Xisto”

Os resultados das determinações de aminos biogênicos nos “Vinhos de Xisto” estão apresentados na TABELA 23, na qual FXCX é a sigla para os vinhos provenientes do experimento com finos de xisto (FX) e calcário de xisto (CX) e CXCC para os vinhos do experimento com calcário de xisto e calcário calcítico (CC). Para ambos os experimentos, T1 é a amostra testemunha e 2010 e 2011 se referem aos anos das duas safras.

Os vinhos analisados apresentaram baixos teores de aminas biogênicas, sendo que a triptamina e feniletilamina não foram detectadas pelo método utilizado. Os vinhos do experimento FXCX apresentaram teores de histamina abaixo do mínimo permitido pela legislação alemã, que é mais rigorosa (2 mg L^{-1}). Esse fenômeno que não se repetiu nos vinhos de 2011, já que essas amostras tiveram um incremento na concentração de todas as aminas.

Assim como na avaliação de metais nos “Vinhos de Xisto”, foi efetuado o teste t pareado para verificar se as diferenças entre o teor de aminas em vinhos provenientes de diferentes tratamentos eram significativas se comparadas às diferenças devido a fatores não controlados de campo e no processo de vinificação. O desvio padrão relativo da vinificação, calculado para as amostras as amostras T6, T7 e T8 e compreendido entre 6,3 e 69,0%, indica a presença de desvios experimentais entre tratamentos iguais no campo e que passaram pelo mesmo processo de vinificação. Tal fato pode ser comprovado pela análise estatística aplicando-se teste t pareado para o grupo de amostras FXCX da safra de 2010 e de 2011. Para um nível de confiança de 95%, a única amostra que pode ser diferenciada das demais foi a FXCX T5 de 2011, cujo teor de tiramina é superior ao das demais. De acordo com os valores de $t_{\text{calculado}}$ para esse teste, todas as demais amostras de 2010 ou 2011 não são significativamente diferentes das amostras pertencentes à triplicata T6, T7 e T8 do mesmo ano.

O teste t pareado não pode ser aplicado nas amostras provenientes dos tratamentos CXCC por estes não terem vinificações executadas em replicata que pudessem fornecer o desvio experimental do processo de produção do vinho. Nesse caso, a análise dos dados foi fundamentada no PCA dessas amostras, mostrado na FIGURA 20.

Assim, é possível concluir que houve diferença entre as safras de 2010 e 2011, mas não entre as amostras provenientes dos diversos tratamentos. Esse fato é corroborado pelo teor de aminas nas amostras testemunha, similar ao das amostras que receberam tratamento. Já as amostras provenientes dos tratamentos CXCC são bastante similares entre si e nas duas safras, demonstrando pouca influência dos tratamentos no conteúdo de aminas biogênicas nos vinhos.

TABELA 23 - CONCENTRAÇÕES DE AMINAS NOS “VINHOS DE XISTO” PROVENIENTES DOS EXPERIMENTOS FXCX E CXCC DAS SAFRAS DE 2010 E 2011

AMOSTRA	HISTAMINA (mg L ⁻¹)	TIRAMINA (mg L ⁻¹)	PUTRESCINA (mg L ⁻¹)	TRIPTAMINA (mg L ⁻¹)	FENILETILAMINA (mg L ⁻¹)	CADAVERINA (mg L ⁻¹)
FXCX T1(10)	1,1	0,5	0,8	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T2(10)	1,3	0,5	1,0	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T5(10)	1,3	<0,5	1,5	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T6(10)	1,1	<0,5	1,0	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T7(10)	0,6	0,5	<0,8	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T8(10)	1,3	0,5	<1,5	n.d.	n.d.	<1,5
DPR FXCX 10 (%)	5,2	1,8	2,2	-	-	-
DPR vinificação 2010 (%)	39,9	7,8	69,0	-	-	-
FXCX T1(11)	3,6	3,1	5,2	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T2(11)	4,7	5,0	8,0	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T5(11)	2,9	0,5	1,4	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T6(11)	4,5	6,0	12,2	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T7(11)	4,3	4,7	6,7	n.d.	n.d.	<1,5
FXCX T8(11)	3,5	3,6	6,5	n.d.	n.d.	<1,5
DPR FXCX 11 (%)	32,1	6,3	6,7	-	-	-
DPR vinificação 2011 (%)	13,5	25,5	38,3	-	-	-
CXCC T1(10)	2,1	1,3	4,0	n.d.	n.d.	<1,5
CXCC T2(10)	1,8	1,3	3,4	n.d.	n.d.	<1,5
CXCC T4(10)	2,2	2,0	4,1	n.d.	n.d.	<1,5
CXCC T5(10)	2,9	0,5	1,4	n.d.	n.d.	<1,5
CXCC T6(10)	2,2	2,8	4,3	n.d.	n.d.	<1,5
DPR CXCC 10 (%)	3,2	1,9	1,5	-	-	-
CXCC T1(11)	2,1	0,5	3,0	n.d.	n.d.	<1,5
CXCC T2(11)	3,1	3,2	5,9	n.d.	n.d.	<1,5
CXCC T4(11)	2,2	1,9	1,4	n.d.	n.d.	<1,5
CXCC T5(11)	2,9	0,5	1,4	n.d.	n.d.	<1,5
CXCC T6(11)	2,8	2,7	4,2	n.d.	n.d.	<1,5
DPR CXCC 11 (%)	32,1	6,3	6,7	-	-	-
Literatura	n.d. – 14,05	n.d. – 19,1	n.d. – 48,72	n.d. – 1,32	n.d. – 12,73	n.d. – 14,1

Legenda: DPR = Desvio Padrão Relativo (n=3); Literatura: revisão feita pela autora (ver p.65)

Os resultados foram comparados com dados dos autores Marcobal et al. (2005), García-Villar, Saurina e Hernandez-Cassou (2006), Gómez-Alonso, Hermosín-Gutiérrez e García-Romero (2007), Soufleros et al. (2007), Zhijun et al. (2007), Proestos, Loukatos e Komaitis (2008), Bach et al. (2012) e Pineda et al. (2012). Na maioria deles, a triptamina e feniletilamina também não foram detectadas. O teor de aminas nos “Vinhos de Xisto” está abaixo do valor médio encontrado na literatura, reforçando o indício da sua segurança para consumo.

A análise de componentes principais (FIGURA 21) foi utilizada para discriminar as amostras. As duas primeiras componentes principais explicam 98,26 % da variância do conjunto, que possui maior contribuição da PC1.

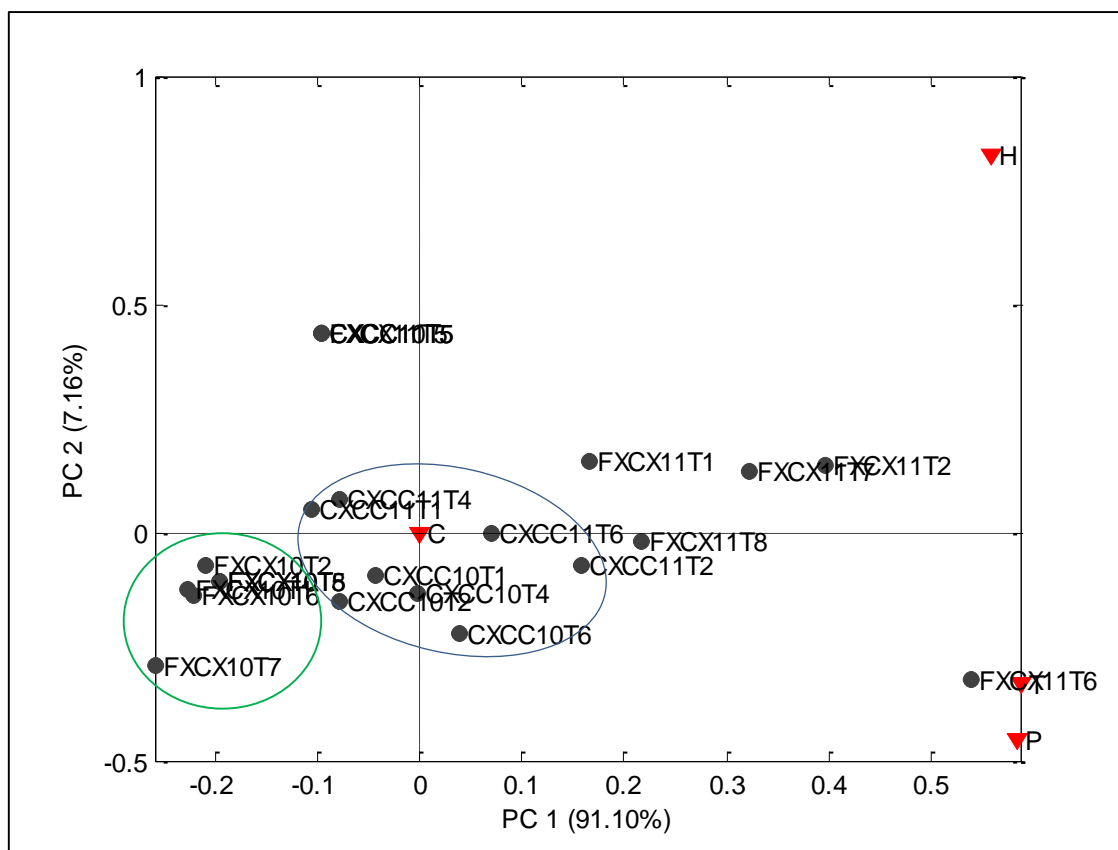


FIGURA 21 - GRÁFICO BIPLÓT DE *LOADINGS* E *SCORES* DA PC1 PELA PC2 PARA OS TEORES DE AMINAS NOS “VINHOS DE XISTO”

As amostras provenientes dos tratamentos com FXCX e CXCC foram discriminadas pelos quadrantes positivos e negativos da PC1. As amostras FXCX de 2010 similares entre si e diferentes das amostras da safra de 2011, cujos *loadings* de putrescina, histamina e tiramina indicam o maior teor de aminas biogênicas nessas amostras. Já os vinhos provenientes dos tratamentos CXCC não puderam ser

discriminadas pelo seu teor de aminos biogênicas, com exceção das amostras T5 de 2010 e 2011.

Para correlacionar o conteúdo de metais e aminos biogênicas nas amostras, foi executada a análise de componentes principais de todos os analitos determinados nesse estudo (FIGURA 22). Com a explicação de 54,13% da variância pelas duas primeiras componentes principais, foi possível observar discriminação das amostras semelhante a do PCA contendo apenas os dados das aminos. Os *loadings* de metais nos valores mais positivos da PC2 em contraste com os *loadings* das aminos nos valores mais negativos da mesma componente indicam que as amostras contendo maior teor de metais contêm menores teores de histamina, tiramina e putrescina.

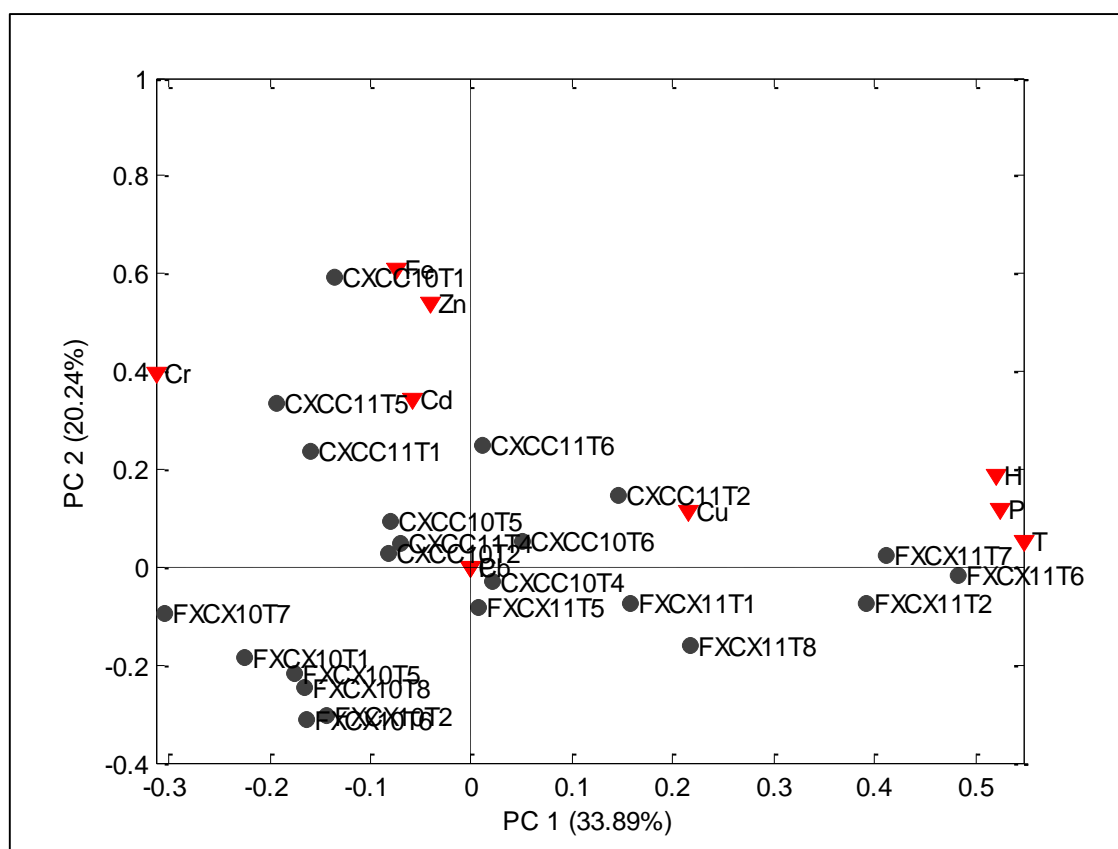


FIGURA 22 - GRÁFICO BILOT DE *LOADINGS* E *SCORES* DA PC1 PELA PC2 PARA OS TEORES DE METAIS E AMINAS NOS "VINHOS DE XISTO"

Desta maneira, sugere-se que a presença de metais nos vinhos, sejam eles oriundos dos tratamentos do solo com as matrizes de xisto ou não, favorece diminuição da produção de aminos, sendo um dos possíveis motivos a inibição das bactérias lácticas que produzem essas aminos, concordando com os dados relatados por Boyaval (1989) e Schut et al. (2011).

6 CONCLUSÕES

6.1 DETERMINAÇÃO DE METAIS NOS “VINHOS DE XISTO”

Dentre os métodos de pré-tratamento de amostra visando eliminar interferentes orgânicos, o método de adição de H_2O_2 e HNO_3 seguida de aquecimento apresentou-se como a melhor opção, por ter sido o mais eficiente para destruição da matéria orgânica.

Para verificar a exatidão desse método, foram realizados ensaios de recuperação em três concentrações diferentes, que no geral apresentaram boa concordância com o recomendado pela ANVISA. No ensaio de exatidão, a maior parte dos elementos apresentou valores de recuperação dentro dos limites de 80 e 120% estabelecidos pela ANVISA. Para os demais elementos, o método analítico empregado pode ser considerado adequado com ressalvas, sendo necessário repetir o experimento realizando a etapa de digestão no branco e aumentando o número de replicatas para minimizar o desvio padrão relativo.

Os vinhos foram analisados e nenhum deles apresentou teores dos elementos analisados acima dos limites máximos toleráveis exigidos pela legislação brasileira. Ao comparar os teores encontrados com a literatura, os elementos Cr, Pb e Zn encontram-se acima do usual, porém tal fato pode ser devido à aplicação de pesticidas e fungicidas. Embora também estejam relacionados à fertilização, os altos teores se repetem também nas amostras testemunha, não podendo então ser definitivamente associados aos tratamentos aplicados no solo.

A análise de componentes principais mostrou que as amostras provenientes do tratamento FXCX não podem ser diferenciadas segundo os critérios selecionados. Enquanto isso, as amostras do experimento CXCC 2010 encontram-se melhor discriminadas, com destaque para CXCC T1(/10) com altos teores de cádmio e ferro e baixos teores dos demais elementos. As amostras do experimento CXCC 2011 também são diferenciadas pelos scores no quadrante positivo da PC1, sendo esse um indicativo da diferente absorção de metais do solo em virtude de diferença entre os tratamentos executados com as matrizes fertilizantes.

6.2 DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

As aminas biogênicas mais importantes do ponto de vista toxicológico foram selecionadas para serem determinadas nos vinhos aqui estudados. O método escolhido para a quantificação dessas aminas, descrito na literatura por Gómez-Alonso et al. (2007) e Bach et al. (2012), passou por adaptações na concentração de alguns reagentes, as quais não interferiram na eficiência da reação de derivatização, conforme foi confirmado por cromatografia em camada delgada.

A metodologia para determinação cromatográfica também foi otimizada para que fosse possível utilizar uma fase móvel que propiciasse menor tempo de corrida, sendo a separação atingida em 25 minutos. Para isso, foi necessário substituir o padrão interno ácido L-2-aminoadípico por heptilamina, para adaptá-lo ao tempo de retenção desejado.

Os vinhos analisados apresentaram baixos teores de aminas biogênicas, sendo que a triptamina e feniletilamina não foram detectadas pelo método utilizado. Os vinhos do experimento FXCX apresentaram teores de histamina abaixo do máximo permitido pela legislação alemã, que é a mais rigorosa (2 mg L^{-1}). Esse fenômeno não se repetiu nos vinhos de 2011, dado que essas amostras apresentaram um incremento na concentração de todas as aminas. Já as amostras provenientes dos tratamentos CXCC foram bastante similares entre si e também nas duas safras, demonstrando pouca influência dos tratamentos no conteúdo de aminas biogênicas nos vinhos. Assim, por meio de análise estatística aplicando-se teste t pareado foi possível concluir que as diferenças entre os tratamentos em geral não são significativas. A análise de componentes principais indicou que as amostras contendo maior teor dos metais analisados possuem menor teor de aminas biogênicas.

6.3 CONCLUSÃO FINAL

De maneira geral, sugere-se que o uso dos subprodutos do xisto no solo onde foram cultivadas as uvas não afetou os vinhos produzidos segundo os critérios estudados, indicando que as matrizes fertilizantes aqui estudadas podem ser utilizadas na cultura da videira.

REFERÊNCIAS

- ACETO, M., ABOLLINO, O., BRUZZONITI, M., MENTASTI, E., SARZANINI, C., MALANDRINO, M. **Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review.** *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 126–133, 2002.
- ÁLVAREZ, M., MORENO, I. M., JOS, A., CAMEÁN, A. M., GONZÁLEZ, A.G. **Differentiation of ‘two Andalusian DO ‘fino’ wines according to their metal content from ICP-OES by using supervised pattern recognition methods.** *Microchemical Journal*, 87, 72–76, 2007.
- AMARANTE, J. O. A. **Vinhos do Brasil e do Mundo para Conhecer e Beber.** São Paulo: Summus, 1983.
- ANGELOVA, V. R., IVANOV, A. S., BRAIKOV, D. M. **Heavy metals (Pb, Cu, Zn and Cd) in the system soil, grapevine, grape.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 713-721, 1999.
- ANLI, R.E.; VURAL, N.; YILMAZ, S.; VURAL, Y. H. **The determination of biogenic amines in Turkish red wines.** *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 53–62, 2004.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Chromium Toxicity.** *Case Studies in Environmental Medicine (CSEM)*, 2008,
- BACH, B., LE QUERE, S., 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*, 732, 114-119, 2012.
- BAUZA, T.; KELLY, M.T. ; BLAISE, A. **Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and Syrah grapes and wine of the Rhone Valley.** *Food Chemistry*, 105, 405-413, 2007.
- BAZHIN, D. N.; KUDYAKOVA, Y. S.; BURGART, Y. V. SALOUTIN, V. I. **Catalyst-free transformations of diethyl 2-ethoxymethylenemalonate and diethyl polyfluorobenzoylmalonates in water.** *Tetrahedron Letters*, 53, 1961-1963, 2012.
- BERTRAND, A.; INGARGIOLA, M. C.; DELAS, J. **Incidence de la fumure azotée de la vigne et du greffage sur la composition des vins de merlot en particulier sur présence de carbamate d'éthyle et des amines biogènes.** *Revue Française d'Oenologie*, 31, 7–13, 1991.
- BOYAVAL P. **Lactic acid bacteria and metal ions.** *Lait*. 69, 87–113, 1989.
- BRASIL. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. **Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de**

aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Diário Oficial da União, 1965.

BRASIL. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. **Aprova o Regulamento Técnico: Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos".** Diário Oficial da União, 1998.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da União, 2003.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 4, de 2 de agosto de 2004.** Definições e normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos corretivos de acidez, corretivos de alcalinidade, corretivos de sodicidade e dos condicionadores de solo, destinados à agricultura. Diário Oficial da União, 2004.

BRASIL. Portaria nº 259, de 31 de Maio de 2010. **Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho e Derivados da Uva e do Vinho.** Diário Oficial da União, 2010.

BURRUETA, L.A.; ALONSO-SALCES, R.M.; HEBERGER, K. **Supervised Pattern Recognition in Food Analysis.** Journal of Chromatography A, 1158, 196–21, 2007.

BUSTO, O.; MIRACLE, M.; GUASCH, J.; BORRULL, F. **Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization.** Journal of Chromatography A, 757, 311-318, 1997.

CAPRON, X.; SMEYERS-VERBEKE, J.; & MASSART, D. L. **Multivariate determination of the geographical origin of wines from four different countries.** Food Chemistry, 101, 1585–1597, 2007.

CATALUÑA, E. **As uvas e os vinhos.** São Paulo: Globo, 1984.

CATARINO, S. C. G. **Metais contaminantes nos vinhos por influência das bentonites.** Dissertação de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa, 2006

CEJUDO-BASTANTE, M. J. ; SONNI, F.; CHINNICI, F.; VERSARI, A.; PEREZ-COELLO, M.S.; RIPONI, C. **Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines.** LWT - Food Science and Technology. v.43 (10), p. 1501-1507, 2010.

CIRAM - Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina. Acervo. 2013.

DEAN, J.R., EBDON, L., MASSEY, R.C. **Isotope ratio and isotope dilution analysis of lead in wine by inductively coupled plasma mass spectrometry.** Food Additives & Contaminants.7, 109–116, 1990.

DEL PRETE, V., CONSTANTINI, A., CECCHINI, F. MORASSUT, M., GARCIA-MORUNO, E. **Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes.** Food Chemistry, 112, 474-481, 2009.

DOS ANJOS, A. R. M, REISSMANN, C. B. **Influência dos Resíduos da Mineração do Xisto no Crescimento e no Teor Foliar de Cd, Co e Cr em Plantas de Aveia Preta.**Ciência Rural, 26 (1), 75-79, 1996.

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Acervo, 2013.

ESCHNAUER, H., JAKOB, L., MEIERER, H. NEEB, R. **Use and limitations of ICP-OES in wine analysis.** Microchimica Acta, 99, 291-298, 1989.

FIKET, Z., MIKAC, N., KNIEWALD, G. **Arsenic and other trace elements in wines of eastern Croatia.** Food Chemistry. 126, 941–947, 2011.

FLAMINI, R. **Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry.** England: John Wiley & Sons Ltd, 2008.

FRESCHI, G., DAKUZAKU, C., MORAES, M., NÓBREGA, J., GOMES NETO, J.A. **Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry.** Spectrochimica Acta Part B 56, 1987–1993, 2001.

GARCÍA-MARINO, M.; TRIGUEROS, A.; ESCRIBANO-BAILÓN, T. **Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines.** Journal of Food Composition and Analysis, 23, 455–462, 2010.

GARCÍA-VILLAR, N.; SAURINA, J.; HERNANDEZ-CASSOU, S. **High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure.** Analytica Chimica Acta, Louisville, 575, 97-105, 2006.

GARDE-CERDAN, T.; LORENZO, C.; CAROT, J. M.; JABALOYES, J. M.; ESTEVE, M. D.; SALINAS, M. R. **Statistical differentiation of wines of different geographic origin and aged in barrel according to some volatile components and ethylphenols.** Food Chemistry, 111, 1025–1031, 2008.

GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GARCÍA-ROMERO, E. **Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 608-613, 2007.

GONZÁLVEZ, A.; LLORENS, A.; CERVERA, M. L.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. **Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia.** Food Chemistry, v. 112, p. 25-34, 2009.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. **Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics.** Food Science and Technology, 43, 10, 1542-1549, 2010.

GUILFORD, J. M., PEZZUTO, J. M. **Wine and Health: A Review.** American Journal of Enology and Viticulture.62 (4), 471-486, 2011.

HERBERT, P.; CABRITA, M. J.; RATOLA, N.; LAUREANO, O. ; ALVES, A. **Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage.** Journal of Food Engineering, 66, 315-322, 2005.

HERMOSIN, I.; CHICON, R. M.; CABEZUDO, M.D. **Free amino acid composition and botanical origin of honey.** Food Chemistry, 83, 263–268, 2003.

HERNÁNDEZ-CASSOU, S., SAURINA, J. **Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques.** Journal of Chromatography B, 879, 1270–1281, 2011.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; LAPEÑA, A.C; PEÑA-GALLEGO, A; ASTRAIN,J; BARON, C.; PARDO, I.; POLO, L.; FERRER, S.; CACHO, J.; FERREIRA,V. **Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation.** Food Research International, 41, 697–706, 2008.

JACKSON, R. S. **Wine Science: Principles and Applications.** St. Catherine's: Academic Press, 2008.

JUANG, K.W.; LEE, Y.I.; LAI, H.Y.; WANG, C.H.; CHEN, B.C. **Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings.** Environmental Science and Pollution Research, 19, 1315, 2012.

KASCHAK, E.; GOHRING, N.; KONIG, H.; PFEIFFER, P. **Biogenic amines in German wines: analysis and assessment according to the application of different HPLC-process.** DLR, 105, 375-384, 2009.

KARADJOVA, I., IZGI, B., GUCER, S., **Fractionation and speciation of Cu, Zn and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry.** Spectrochimica Acta Part B, 57, 581–590, 2002.

KMENT, P.; MIHALJEVIC, M.; ETTLER, V.; ŠEBEK, O.; STRNAD, L.; ROHLOVA, L. **Differentiation of Czech wines using multielements composition – a comparison with vineyard soil.** Food Chemistry, 91, 157–165, 2005.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia Líquida Moderna.** Campinas: Editora Átomo, 2009.

LAPA-GUIMARÃES, J.; PICKOVA, J. **New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid.** Journal of Chromatography A, 1045, 223–232, 2004.

LARA, R., CERUTT, S.I., SALONIA, J.A., OLSINA, R.A., MARTINEZ, L.D. **Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES.** Food and Chemical Toxicology, 43, 293–297, 2005.

LONVAUD-FUNEL, A. **Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria.** FEMS Microbiology Letters, 199, 9-13, 2001.

LUCHESE, E. B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. **Fundamentos da Química do Solo, Teoria e Prática.** Rio de Janeiro: Freitas Bastos Editora, 2001.

MACKENZIE, D.E, CHRISTY, A.G. **The role of soil chemistry in wine grape quality and sustainable soil management in vineyards.** Water Science and Technology, 51 (1) 27–37, 2005.

MARCOBAL, A.; POLO, M.C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; MORENO-ARRIBAS, M.V. **Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines.** Food Research International, 38, 4, 387-394, 2005.

MARENGO, E., ACETO, M. **Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines.** Food Chemistry.81, 621–630, 2003.

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

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate Calibration.** John Wiley & Sons. Nova York: 1996.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2010.** Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br>>. Acesso em: março de 2011a.

MELLO, L. M. R. **Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial – panorama 2010** Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br>>. Acesso em: março de 2011b.

MINOIA, A., SABBIONI, E., RONCHI, A., GATTI, A., PIETRA, R., NICOLOTTI, A., FONTANER, S., BALDUCCI, C., FONTE, A., ROGGI, C. **Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. IV. Influence of dietary factors.** The Science of the Total Environment, 141, 181-195, 1994.

MOLNAR-PERL, I. **Quantitation of amino acids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously or separately.** Journal of Chromatography A, 987, 291–309, 2003.

MORENO, I. M; GONZÁLEZ-WELLER, D., GUTIERREZ, V. MARINO, M.; CAMEÁN, A. M., GONZÁLEZ, A. G.; HARDISSON, A. **Determination of Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn in red wine samples by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. Evaluation of preliminary samples treatments.** Microchemical Journal, 88, 56-61, 2008.

MORET, S.; CONTE, L. S.M **High Performance Liquid Chromatographic Evaluation of Biogenic Amines in Foods.** Journal of Chromatography A, 729, 363-369, 1996.

OIV. **Maximum acceptable limits of various substances contained in wine.** Disponível em: <http://87.98.209.109/oiv/info/enmethodesinternationalesvin>. Acesso em: fevereiro de 2012.

OIV. **OIV code of good vitivinicultural practices in order to minimise the presence of biogenic amines in vine-based products.** Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/files/3%20-%20Resolutions/EN/2011/OIV-CST%20369-2011.pdf>. Acesso em: maio de 2013a.

OIV. **Estimation of the detection and quantification limits of a method of analysis.** Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/files/6%20-%20Domaines%20scientifiques/6%20-%204%20Methodes%20d%20analyses/6-4-3/EN/OIV-MA-AS1-10.pdf>. Acesso em: maio de 2013b.

ONIANWA, P.C., ADETOLA, I.G., IWEBGUE, C.M.A., OJO, M.F., TELLA, O.O. **Trace heavy metals composition of some Nigerian beverages and food drinks.** Food Chemistry, 66, 275-279, 1999.

ORTEGA M., GONZÁLEZ-SANJOSÉ M.L.; BELTRÁN S. **Metal content of Spanish red wines from certified denomination of origin.** Quimica Analítica. 18, 127-131, 1999.

PACHECO, A. O. **Iniciação à Enologia.** São Paulo: Editora SENAC São Paulo, 2000.

PERALTA-VIDEA, J.R., LOPEZ, M.L., NARAYAN, M., SAUPE, G., GARDEA-TORRESDEY, J. **The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.41, 1665–1677, 2009.

PEREIRA, V.; PONTES, M.; CÂMARA, J.S.; MARQUES, J.C. **Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure.** Journal of Chromatography A, 1189, 435-443, 2008.

PEREIRA, I.S., ANTUNES, L. E. C., SILVEIRA, C. A. P., MESSIAS, R. S., GARDIN, J. P. P., SCHENEIDER, F. C., PILLON, C. N. **Caracterização Agronômica da Amoreira-preta Cultivada no Sul do Estado do Paraná.** Projeto Xisto Agrícola – Documentos 271. 2009a.

PEREIRA, B. F., DOLATTO, R. G., CARDOSO, E. M. C., LEAL, A. M., NICOLINI, J., SILVEIRA, C. A. P., PILLON, C. N., FERREIRA, L. H. G. **Caracterização Química – avaliação de risco dos sólidos de xisto.** Projeto Xisto Agrícola – Relatório Interno, 2009b.

PEREIRA, H. S., VITTI, G. C. **Efeito do uso do xisto em características químicas do solo e nutrição do tomateiro.** Horticultura Brasileira, 22, 2, 2004.

PETROBRAS. SIX: **Unidade de Negócio da Industrialização do Xisto.** Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br>>. Acesso em: março de 2011a.

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, 23, 251-257, 2012.

POHL, P. **What do metals tell us about wine?** Trends in Analytical Chemistry, 26 (9), 941-949, 2007.

PROESTOS, C.; LOUKATOS, P.; KOMAITIS, M. **Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection.** Food Chemistry, 106, 3, 1218-1224, 2008.

QUÍMICA NOVA INTERATIVA. Disponível em: http://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=yIEibWJ_JADHSv2psd5MNZ03bSvbp5qEk9j8z3bwJ6w0glCRz2hI2pD8Cgv8r437AQeCUt5-OF_I-UqvXNaIOg Acesso em julho de 2013.

RIBANI, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, 27, 5, 771-80, 2004.

RODRIGUES, S. M., OTERO, M., ALVES, A. A., COIMBRA, J. COIMBRA, M. A., PEREIRA, E., DUARTE, A. C. **Elemental analysis for categorization of wines and authentication of their certified brand of origin.** Journal of Food Composition and Analysis, 24, 548–562, 2011.

ROSA, S. E. S.; COSENZA, J.P.; LEÃO, L.T.S. Panorama do setor de bebidas no Brasil. In: **BNDES Setorial**, 23, 101-150. Rio de Janeiro: BNDES, 2006.

RODUSHKIN, I., ODMAN, F., APPELBLAD, P.K. **Multielement determination and lead isotope ratio measurement in alcoholic beverages by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry.** Journal of Food Composition and Analysis, 12, 243–257, 1999.

ROSIER, J. P. **Manual de Elaboração de Vinho Para Pequenas Cantinas.** Florianópolis: EPAGRI, 1993.

SANTOS, B.; SIMONET, B. M.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. **Direct automatic determination of biogenic amines in wine by flow injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry.** Electrophoresis, 25, 3427–3433, 2004.

SCHUT, S.; ZAUNER, S.; HAMPEL, G.; KÖNIG, H.; CLAUS, H. **Biosorption of copper by wine-relevant lactobacilli.** Int. J. Food Microbiol. 145, 126-131, 2011.

SHALABY, A. R. **Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods.** Food Chemistry, 65,117-121, 1999.

SHEER, B. B., SILVEIRA, C. A. P., PILLON, C. N., SCHENEIDER, F. C., GARDIN, J. P. P., FERREIRA, L. H. G., VOIGT, M. A., MESSIAS, R. S., DOS ANJOS E SILVA, S. D., BORGES, I., OLIVEIRA, T. R., ARAÚJO, V. F. **Segurança dos Órgãos de Colheita a partir do Uso das Matrizes Sólidas de Xisto na Adubação de Base para a Cultura da Batata.** Projeto Xisto Agrícola – Relatório Interno. 2009a.

SHEER, B. B., SILVEIRA, C. A. P., SCHENEIDER, F. C., PAGEL, I. A., PEREIRA, I. S., GARDIN, J. P. P., FERREIRA, L. H. G., VOIGT, M. A., MESSIAS, R. S., OLIVEIRA, T. R., ARAÚJO, V. F. **Segurança dos Órgãos de Colheita a partir do Uso da Água de Xisto como Matéria Prima para Fertilizantes Foliares.** Projeto Xisto Agrícola – Relatório Interno. 2009b

SILLA –SANTOS, M.H. **Biogenic amines: their importance in foods.** International Journal of Food Microbiology, 29, 213-231, 1996.

SILVEIRA, C. A. P., PILLON, C. N., CARVALHO, C., MARTINS, E., SCHENEIDER, F. C., BORGES, I., FERREIRA, L. H. G., MILECH, R. **Avaliação da Eficiência Agronômica da Matriz Fertilizante MBR7 na Cultura do Trigo.** Projeto Xisto Agrícola – Relatório Interno. 2009a.

SILVEIRA, C. A. P., PILLON, C. N., CARVALHO, C., MARTINS, E., SCHENEIDER, F. C., BORGES, I., FERREIRA, L. H. G., MILECH, R. **Efeito da MBR 12 no Desenvolvimento Inicial e na Produção de Frutas de Pessegueiro Cultivares Chimarrita e Leonense.** Projeto Xisto Agrícola – Relatório Interno. 2009b.

SILVEIRA, C. A. P., GARCIA, C. R., PILLON, C. N., RIBEIRO, D. C. O., SILVEIRA, D. B., MARTINS, E., SCHENEIDER, F. C., PEREIRA, H., BORGES, I., SILVA, J. L. S., FERREIRA, L. H. G., RODRIGUES, M. A. V., LOPES, M. G. J., LOUZADA, R. M., MILECH, R. **Avaliação da Eficiência Agronômica da MBR1 na Cultura do Tifton CV. 85 em Áreas em Processo Avançado de Arenização.** Projeto Xisto Agrícola – Relatório Interno. 2009c.

SOUFLEROS, E.H.; BOULOUMPASI,E.; TSARCHOPOULOS, C.; BILIADERIS, C. G. **Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage.** Food Chemistry, 80, 261-273, 2003.

SOUFLEROS, E.H.; BOULOUMPASI,E.; ZOTOU, A.; LOUKOU, Z. **Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration.** Food Chemistry, 101, 704–716, 2007.

SPAZIANI, M.; OLIVEIRA, P. V.; CADORE, S.; OLIVEIRA, E. **Determinação de alguns constituintes inorgânicos em amostras de vinhos por espectrometria atômica: ICP-OES e ETAAS.** Revista Analytica, 20, dezembro 2005/janeiro/2006.

STAFILOV, T.; KARADJOVA, I. **Atomic Absorption Spectrometry in Wine Analysis – a Review**. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, **28 (1)**, 17–31, 2009.

TAO, Z.; SATO, M.; HAN, B. Y.; TAN, A. Z.; YAMAGUCHI, A. T.; NAKANO, T. **A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination**. Food Control, **22**, 1154-1157, 2011.

TODESCHINI, R.; BALLABIO, D.; CONSONNI, V.; MAURI, A.; PAVAN, M. **CAIMAN (Classification And Influence Matrix Analysis): A new approach to the classification based on leverage-scaled functions**. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **87**, 3 – 17, 2007.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. Monografia de especialização. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2006.

VRCEK, I.V., BOJIC, M., ZUNTAR, I., MENDAŠ, G., MEDIC´-ŠARIC´, M. **Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes**. Food Chemistry, **124**, 354–361, 2011.

ZHIJUN, L.; YONGNING, W. GONG, Z. ; YUNFENG, Z.; CHANGHU, X. **A survey of biogenic amines in chinese red wines**. Food Chemistry, **105**, 1530–1535, 2007.

WUILLOUD, R.G., GONZALEZ, A., MARCHEVSKY, E., OLSINA, R.A., MARTINEZ, L.D. **On-line complexation/preconcentration system for the determination of lead in wine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with ultrasonic nebulization**. Journal of AOAC International. **84**, 1555–1560, 2001.