

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA CARLA AGUSTINI

**CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS DE UVAS *Vitis labrusca* POR MEIO DO SEU
CONTEÚDO EM AMINOÁCIDOS E AMINAS BIOATIVAS**

**CURITIBA
2011**

BRUNA CARLA AGUSTINI

**CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS DE UVAS *Vitis labrusca* POR MEIO DO SEU
CONTEÚDO EM AMINOÁCIDOS E AMINAS BIOATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Tania M. B. Bonfim

**CURITIBA
2011**

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e a seus professores pelo aprendizado.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À Profª Dra Tania Maria Bordin Bonfim, por todo o conhecimento transmitido tanto no âmbito acadêmico quanto pessoal. Foram os seus ensinamentos, por vezes tão simples como elaboração de um plano de aula, por vezes tão grandiosos como me ensinar a ir em busca e a acreditar na realização dos meus sonhos, que fizeram deste mestrado um diferencial em minha vida. Agradeço ainda pelo apoio em momentos delicados que passei ao longo desta trajetória, seu carinho e sua amizade foram fundamentais.

Ao colega de laboratório, Daniel Braga de Lima, pela colaboração e troca de conhecimentos ao longo destes dois anos e pela agradável e divertida companhia.

Ao colega de laboratório, Gilberto Alves de Lima Júnior pela amizade e companheirismo.

Aos alunos de extensão do Programa do Vinho pelo trabalho em conjunto e pelo harmonioso convívio.

Ao Profº Dr. Roberto Pontarolo e sua equipe do Centro de Estudos em Biofarmácia pela permissão em utilizar os equipamentos e pela assistência no manuseio dos mesmos.

Aos vinicultores dos municípios de Colombo e Almirante Tamandaré pela concessão dos vinhos que geraram as análises presentes nesta dissertação.

À Henrique Ravanhol Frigeri, por ser essa pessoa maravilhosa que tanto me incentivou e me apoiou nesta trajetória. Garanto a você que este caminho foi bem mais fácil devido ao seu carinho, compreensão e companheirismo.

Ao meu irmão, Carlos Henrique Agustini, pelos seus ensinamentos, pelo apoio e incentivo nesta minha escolha.

Ao meu pai, Carlos Agustini, por ter me ensinado a lutar pelos meus ideais, por sempre proferir aquela palavra que faltava tanto para me encorajar quanto para me confortar diante dos desafios.

À minha mãe, Olivete Joanes Peruzzo Agustini, pelo amor sem medida e por ter abdicado de vários momentos para estar ao meu lado, me apoiando e me confortando.

À Deus, por ser minha sustentação e minha certeza de que no final tudo se encaminha da melhor forma possível, basta ter fé.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

Os aminoácidos atuam como fonte de nitrogênio para o desenvolvimento dos microorganismos durante a fermentação alcoólica e maloláctica. Além disso, a presença dos mesmos é fundamental para a formação de compostos voláteis responsáveis pelo buquê do vinho. No entanto, eles também estão associados com a produção de uma classe de substâncias indesejáveis, as aminas bioativas. Assim, cinquenta amostras de vinho variando quanto ao tipo, coloração e origem foram analisadas simultaneamente para dezessete aminoácidos, o íon amônio e cinco aminas bioativas por meio de cromatografia a líquido de alta eficiência em fase reversa e detecção por ultravioleta, posteriormente a derivatização pré-coluna com o reagente etoximetilenomalonato de dietila. Características físico-químicas e a ocorrência da fermentação maloláctica foram também avaliadas a fim de encontrar correlações significativas com a formação das aminas. Análise de componentes principais foi realizada usando os níveis de aminoácidos e aminas bioativas para procurar padrões inerentes às amostras analisadas objetivando classificá-las de acordo com sua origem geográfica. A prolina foi o aminoácido prevalente enquanto a putrescina foi a amina bioativa majoritária nos vinhos. Os vinhos brancos demonstraram uma maior concentração de aminoácidos totais quando comparados aos vinhos tintos. Entretanto, aqueles apresentaram um menor conteúdo de aminas. Vinhos que passaram pela fermentação maloláctica demonstraram um maior conteúdo em amina bioativas, sugerindo que esta etapa poderia estar associada à formação das aminas. Houve correlação significativa entre algumas aminas e também entre aminas e parâmetros físico-químicos. O conteúdo de aminoácidos e aminas foi afetado em maior extensão pela variedade da uva e pelas práticas enológicas do que pela origem geográfica como foi verificado pelo resultado da análise multivariada.

Palavras-chave: Vinho. Aminoácidos. Aminas bioativas. Cantinas rurais.

ABSTRACT

Amino acids act as nitrogen source for the development of microorganisms during alcoholic and malolactic fermentation. Moreover their presence are fundamental for the formation of volatile compounds responsible for the *bouquet* of wine. However, they are also associated with the production of a class of substances not so desirable in wines, the bioactive amines. Hence, fifty wines samples varying in type, colour and origin were analysed simultaneously for seventeen amino acids, the ammonium ion and five bioactive amines using reversed-phase high performance liquid chromatography and ultraviolet detection after pre-column derivatization with the reagent diethyl ethoxymethylenemalonate. Physico-chemical characteristics and the occurrence of malolactic fermentation were also evaluated in order to encounter significant correlation with amine formation. Analysis of principal components was performed using amino acids and bioactive amines content to search inherent patterns in the samples analysed aiming to classify them by their geographical origin. Proline was found to be the prevalent amino acid while putrescine was the majority amine in wines. White wines showed a higher concentration of total amino acids when compared to red wines. However, the former presented a lower concentration of total amine content. Wines that have undergone malolactic fermentation demonstrated a major content of bioactive amines, suggesting that this step could be associated with amine formation. There was significant correlation between some amines and also between amines and physico-chemical parameters. Amino acid and amine content were affected in a greater extent by grape variety and vinification practices compared to geographic origin as it was verified by the results of multivariate analysis.

Keywords: Wine. Amino acids. Bioactive amines. Rural wineries.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO DOS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ NO ESTADO DO PARANÁ.....	15
FIGURA 2 - LIMITES GEOGRÁFICOS DA INDICAÇÃO DE PROCEDÊNCIA VALE DOS VINHEDOS, COMPOSTA POR PARTE DOS MUNICÍPIOS DE BENTO GONÇALVES, GARIBALDI E MONTE BELO DO SUL, NA SERRA GAÚCHA, RIO GRANDE DO SUL.....	17
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA BAGA.....	18
FIGURA 4 - PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE VINHOS BRANCOS E VINHOS TINTOS.....	24
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUMAS AMINAS BIOATIVAS.....	30
FIGURA 6 – AMINOÁCIDOS PRECURSORES DAS AMINAS BIOATIVAS.....	31
FIGURA 7 - REAÇÃO GERAL DEMONSTRANDO A FORMAÇÃO DAS NITROSAMINAS.....	33
FIGURA 8 - ESTRUTURA DOS DERIVADOS AMINOENONAS. A) REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO; B) DERIVADO DE AMINOÁCIDO PRIMÁRIO; C) DERIVADO DE AMINOÁCIDO SECUNDÁRIO.	43
FIGURA 9 – CROMATOGRAMA REFERENTE À ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS E AMINAS BIOATIVAS SIMULTANEAMENTE. A) PADRÕES ; B) AMOSTRA DE VINHO.....	64
FIGURA 10 – PERCENTUAL DE CADA AMINA NOS VINHOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ QUE APRESENTARAM AS MAIORES CONCENTRAÇÕES DE AMINAS TOTAIS.....	78
FIGURA 11 – CARACTERIZAÇÃO DOS VINHOS POR PCA UTILIZANDO O CONTEÚDO DE AMINAS E AMINOÁCIDOS COMO OS DADOS ANALÍTICOS. (A) SCORES; (B) LOADINGS.....	92
FIGURA 12 - CARACTERIZAÇÃO DOS VINHOS POR PCA UTILIZANDO O CONTEÚDO DE AMINAS E AMINOÁCIDOS COMO OS DADOS ANALÍTICOS.	94

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR TOTAL (g.L^{-1}) NOS VINHOS SECOS DA SAFRA 2009	52
GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR TOTAL (g.L^{-1}) DOS VINHOS SUAVES NA SAFRA 2009	53
GRÁFICO 3 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DO TEOR ALCOÓLICO (% v/v) DOS VINHOS PRODUZIDOS NA SAFRA 2009	55
GRÁFICO 4 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DOS VALORES DE pH DOS VINHOS PRODUZIDOS NA SAFRA 2009	56
GRÁFICO 5 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DOS VALORES DE ACIDEZ TOTAL (mEq.L^{-1}) NOS VINHOS DA SAFRA 2009.....	58
GRÁFICO 6 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DOS VALORES DE ACIDEZ VOLÁTIL (mEq.L^{-1}) DOS VINHOS PRODUZIDOS NA SAFRA 2009.....	59
GRÁFICO 7 – REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DOS VALORES DE DIÓXIDO DE ENXOFRE ($\text{mg DE DIÓXIDO DE ENXOFRE.L}^{-1}$) DOS VINHOS PRODUZIDOS NA SAFRA 2009	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE VINHO DE ACORDO COM O TIPO DE VINHO E ORIGEM GEOGRÁFICA.....	44
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS DIFERENTES VINHOS PRODUZIDOS NOS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009	50
TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS MÁLICO (g.L ⁻¹) E LÁTICO (g.L ⁻¹) EM AMOSTRAS DE VINHOS SECOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE COLOMBO NA SAFRA 2009	62
TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS MÁLICO (g.L ⁻¹) E LÁTICO (g.L ⁻¹) EM AMOSTRAS DE VINHOS SECOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009.....	62
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS MÁLICO (g.L ⁻¹) E LÁTICO (g.L ⁻¹) EM AMOSTRAS DE VINHOS SUAVES PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE COLOMBO NA SAFRA 2009	63
TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS MÁLICO (g.L ⁻¹) E LÁTICO (g.L ⁻¹) EM AMOSTRAS DE VINHOS SUAVES PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009.....	63
TABELA 7 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L ⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS SECOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE COLOMBO NA SAFRA 2009	66
TABELA 8 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L ⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS SECOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009.....	67
TABELA 9 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L ⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS SUAVES PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE COLOMBO NA SAFRA 2009	68
TABELA 10 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L ⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS SUAVES PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009.....	69
TABELA 11 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L ⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS ROSÉS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DOS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ.....	70

TABELA 12 – CONTEÚDO DE AMINAS BIOATIVAS NOS VINHOS SECOS E SUAVES PROVENIENTES DOS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ.....	76
TABELA 13 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS DADOS FÍSICO-QUÍMICOS E AMINAS BIOATIVAS DOS VINHOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA.....	80
TABELA 14 - CONCENTRAÇÃO DE AMINAS NOS VINHOS DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA EM FUNÇÃO DO TEOR DE DIÓXIDO DE ENXOFRE TOTAL	81
TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS MÁLICO E LÁTICO, DIÓXIDO DE ENXOFRE E AMINAS TOTAIS NOS VINHOS COM FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA COMPLETA E INCOMPLETA (Continua)	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	13
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 PANORAMA DA VITIVINICULTURA MUNDIAL E BRASILEIRA.....	14
3.2 INDICAÇÃO GEOGRÁFICA.....	16
3.3 UVA.....	17
3.4 TIPOS DE VIDEIRAS.....	20
3.5 VINHO.....	23
3.5.1 Processo de Vinificação.....	23
3.6 COMPOSTOS NITROGENADOS NO VINHO.....	26
3.6.1 Aminoácidos.....	26
3.6.2 Aminas Bioativas.....	29
3.6.2.1 Fatores que afetam o conteúdo de aminas nas uvas.....	35
3.6.2.2 Influência do processo de vinificação no conteúdo de aminas.....	37
3.7 PROBLEMAS E ALTERNATIVAS ANALÍTICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAL.....	44
4.1.1 Amostras.....	44
4.1.2 Reagentes.....	44
4.2 MÉTODOS.....	45
4.2.1 Análises Físico-Químicas.....	45
4.2.2 Identificação e Quantificação dos Ácidos Orgânicos por Cromatografia a Líquido.....	46
4.2.3 Identificação de Aminoácidos e Aminas Bioativas.....	47
4.2.4 Análise Estatística.....	48
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	49
5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	60
5.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE AMINOÁCIDOS E AMINAS BIOATIVAS....	64
5.5 OCORRÊNCIA DA FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA E CORRELAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS COM A FORMAÇÃO DAS AMINAS.....	82
REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

A vitivinicultura brasileira vem apresentando um forte crescimento ao longo dos anos em virtude do aumento na área cultivada e melhorias na tecnologia de produção de uvas e de elaboração de vinhos (GUERRA *et al.*, 2009). Para entender a dimensão deste crescimento a União Brasileira de Viticultura (UVIBRA, 2009) dispõe de alguns dados interessantes em relação ao aumento da elaboração de vinhos finos e comuns desde 1998, onde a produção totalizava 184 milhões de litros de vinho, até 2008, com saldo parcial de 334 milhões de litros de vinhos. Deste saldo, 86% correspondem a vinhos comuns.

Em função da rusticidade e resistência das videiras da espécie americana *Vitis labrusca* e, devido ao estado do Paraná não ter sido privilegiado com condições climáticas adequadas para o cultivo de uvas finas, esta espécie predomina nas cidades de Colombo e Almirante Tamandaré. Dentre as variedades plantadas no município de Colombo inclui-se a uva Terci, Isabel e Niágara, que juntas correspondem a 800.000 litros de vinho por ano (BONFIM *et al.*, 2004).

Decorrente da extensão do seu território, o Brasil apresenta uma variabilidade de climas e solos capaz de agregar características diferenciadas aos produtos. Com o crescimento da produção de vinho no Brasil surgem conceitos como zoneamento vitivinícola, indicações geográficas como sinais de qualidade, segurança dos alimentos, alimentos funcionais, sustentabilidade ambiental, entre outros, que colocam a atividade em sintonia com as tendências da vitivinicultura mundial (GUERRA *et al.*, 2009).

A viticultura constitui uma atividade geradora de emprego e é adequada para dar sustentabilidade econômica e social às pequenas propriedades de agricultura familiar. Baseado nesta realidade, a Universidade Federal do Paraná, por intermédio do laboratório de Enzimologia e Tecnologia de Fermentações possui um Programa de extensão nomeado “Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia para Melhoria dos Produtos da Uva e reaproveitamento de Resíduos visando o Fortalecimento Econômico da Comunidade Produtora” o qual tem como objetivo capacitar pequenos produtores de vinho e suco de uva do estado do Paraná na geração de produtos de qualidade com identidade própria e com melhor penetração no mercado, aumentando sua competitividade e, conseqüentemente, a geração de empregos na região.

Atualmente, os municípios de Colombo e Almirante Tamandaré participam deste programa por intermédio das Secretarias Municipais de Agricultura e Abastecimento. Em virtude desta dissertação de mestrado estar vinculada diretamente a este programa de extensão, a mesma tem como objetivo encontrar características peculiares aos produtos destas localidades por meio da determinação do conteúdo de aminoácidos nos vinhos, tendo em vista sua importância como precursores aromáticos e também para a correta condução do processo fermentativo. Além disso, a demanda por uma alimentação mais saudável e por alimentos seguros conduz a avaliação da complexidade vínica para garantir seus benefícios. Neste sentido, este trabalho também possui um enfoque na dosagem de amins bioativas, devido a sua importância para a saúde humana e para a segurança alimentar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Caracterizar os vinhos oriundos da região de Colombo e Almirante Tamandaré no estado do Paraná quanto ao seu conteúdo em aminoácidos e aminas bioativas.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Realizar análises físico-químicas nos vinhos selecionados, compreendendo açúcares totais, teor alcoólico, pH, acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre.
- Identificar a ocorrência da fermentação maloláctica pela determinação, por cromatografia a líquido, dos ácidos málico e lático.
- Correlacionar a formação das aminas com os parâmetros físico-químicos analisados.
- Usar ferramentas estatísticas para agrupar os vinhos de acordo com a variedade e região vinícola.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PANORAMA DA VITIVINICULTURA MUNDIAL E BRASILEIRA

A produção mundial de vinhos no ano de 2007 foi cerca de 26 milhões de toneladas, segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO). Estimou-se que do total da uva produzida no mundo, em torno de 57% foi destinada a elaboração de vinhos. Assim, os dados coletados no triênio 2005/2007 destacaram como os maiores produtores de vinho a França, a Itália, a Espanha, os Estados Unidos e a Argentina. Nesta análise, o Brasil ocupou a 19ª posição no que se refere a elaboração de vinhos e 17ª posição em área cultivada com uvas (MELLO, 2009, 2011).

A introdução do cultivo da videira no Brasil tem data de 1535 com a chegada dos colonizadores portugueses. No entanto a vitivinicultura só começou a ter interesse socioeconômico a partir do século XIX com a chegada de imigrantes italianos, principalmente no estado do Rio Grande do Sul (GUERRA *et al.*, 2009). Em relação às regiões produtoras de vinho no Brasil, existem áreas localizadas nos paralelos clássicos da viticultura mundial do Hemisfério Sul, como é o caso da Campanha Gaúcha, e ainda, vinhedos destinados à elaboração de vinhos situados na zona intertropical (OIV, 2005).

Segundo dados do IBGE, em 2010 os maiores estados produtores de uva no Brasil foram os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná e Bahia. Ressaltando que neste período o Paraná produziu aproximadamente 102 mil toneladas de uvas. Neste ano, apenas 43% da uva produzida no Brasil foi destinada ao processamento para elaboração de vinho, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao consumo da fruta *in natura* (MELLO, 2010).

A vitivinicultura brasileira de vinhos finos, ou seja, aqueles elaborados de cultivares *Vitis vinifera*, tem destaque econômico nas regiões geográficas Sul e Nordeste. Neste contexto pontuam-se quatro estados brasileiros produtores de vinhos finos: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Pernambuco e Bahia. É interessante observar as diferenças de cultivo entre estas regiões visto que na região Sul colhe-se uma safra por ano, como na clássica viticultura mundial,

enquanto no Nordeste as colheitas se sucedem, podendo atingir até três safras por ano (GUERRA *et al.*, 2009).

A diversidade regional é uma característica particular do Brasil tendo em vista o tamanho do seu território. Esta diversidade propicia distintas características de clima, solo, variedades de uvas, sistemas de produção, de vinificação e envelhecimento, gerando assim vinhos com sabor e aroma peculiares, o que constitui uma das qualidades da vitivinicultura brasileira (GUERRA *et al.*, 2009).

Seguindo nesta diversidade o estado do Paraná, como já dito anteriormente, também se encontra entre os produtores de vinhos brasileiros. E dentro do território paranaense, os municípios de Colombo e Almirante Tamandaré (Figura 1) compreendem duas regiões viticultoras do estado no que tange o cultivo de uvas americanas e a elaboração de vinhos comuns. Ambas as cidades, pertencentes à região metropolitana de Curitiba.

FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO DOS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ NO ESTADO DO PARANÁ



FONTE: <http://www.sulpecas.ind.br/images/mapa.gif>

3.2 INDICAÇÃO GEOGRÁFICA

Juntamente com esta diversidade regional surgem novos conceitos como a Indicação Geográfica (IG). IG são direitos de propriedade intelectual que identificam um produto ou serviço como originário de um local, região ou país, quando determinada reputação, característica e/ou qualidade possam ser vinculadas essencialmente a esta sua origem particular (INPI, 2009).

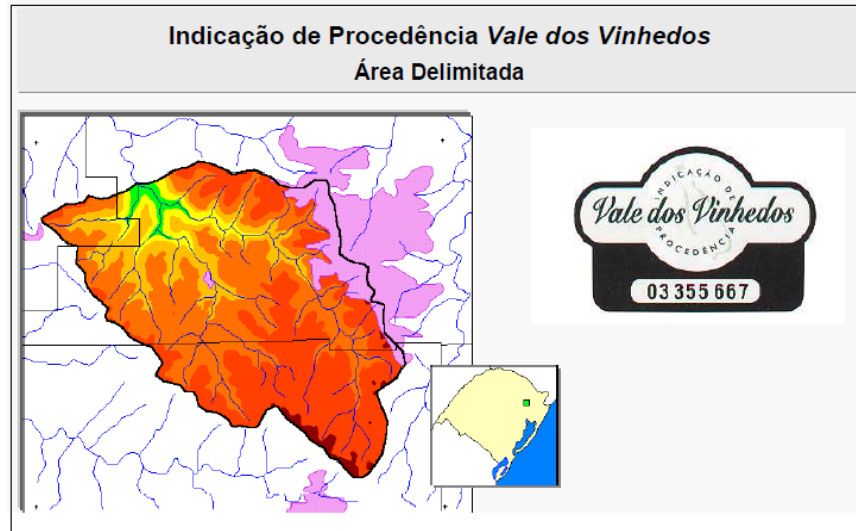
As indicações geográficas podem ser subdivididas em: 1) Indicação de Procedência; e, 2) Denominação de Origem. A Indicação de Procedência vincula um produto a uma origem geográfica precisa. Já a Denominação de Origem, garante além da origem geográfica do produto, qualidades e características obtidas dos fatores naturais dessa origem e dos fatores humanos, que são regulamentados. Assim sendo, esta última categoria de Indicação Geográfica se torna bem mais complexa de ser obtida (TONIETTO, 1993).

O conceito de indicação geográfica no caso de vinhos demonstra nestes, a presença de características únicas ou uma combinação de características que podem ser atribuídas à fonte produtora. A fonte é usualmente definida em termos de uma região geográfica delimitada, frequentemente chamada de “*terroir*” (PARR *et al.*, 2007).

A aplicação do conceito de denominação de origem deve ter como suporte a pesquisa técnico-científica. Isto porque esta categoria de indicação geográfica implica a definição clara de pelo menos alguns aspectos tais como: área geográfica determinada, usufruindo de características naturais homogêneas, variedades, sistemas de produção e padrões mínimos de qualidade (TONIETTO, 1993).

Países mais antigos nesta arte de produzir vinhos já possuem suas áreas de produção de vinho bem delimitadas. O Brasil ainda está no início de seus estudos, mas já apresenta a sua primeira Indicação Geográfica, a qual se denomina Indicação de Procedência Vale dos Vinhedos (Figura 2), concedida no ano de 2002. Os vinhos que obtêm o qualificativo de IP Vale dos Vinhedos possuem identificação no rótulo e ostentam o selo de controle numerado (GUERRA *et al.*, 2009).

FIGURA 2 - LIMITES GEOGRÁFICOS DA INDICAÇÃO DE PROCEDÊNCIA VALE DOS VINHEDOS, COMPOSTA POR PARTE DOS MUNICÍPIOS DE BENTO GONÇALVES, GARIBALDI E MONTE BELO DO SUL, NA SERRA GAÚCHA, RIO GRANDE DO SUL



FONTE: Guerra *et al.*, (2009)

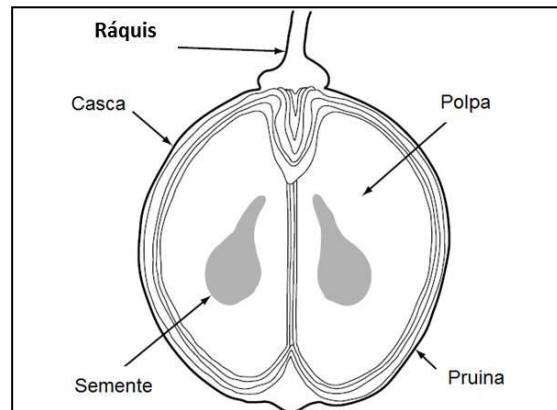
Tem-se observado uma crescente demanda entre os consumidores por alimentos de alta qualidade e que possuam uma identidade regional, decorrente talvez de um patriotismo a florado ou da procura por uma culinária específica, bem como em virtude da diminuição da confiança em alimentos produzidos fora da sua região ou país (COZZOLINO *et al.*, 2011). Assim, a indicação geográfica surge no sentido de ajudar os consumidores a distinguir entre produtos de alta e baixa qualidade. E esta confiança na indicação geográfica por parte dos consumidores faz com que os mesmos estejam dispostos a pagar mais por este tipo de produto e com isso é possível aumentar o seu valor agregado (ADDOR; THUMM; GRAZIOLI, 2003). Além disso, as IG também acarretam um aumento no turismo da região e consequentemente um aumento na oferta de empregos.

3.3 UVA

A baga é composta pela casca, polpa e sementes (Figura 3); e a estrutura do cacho de uva é fornecida pela ráquis, a qual tem a função de sustentar as bagas. A ráquis contém grande quantidade de água (75%), além de taninos (3%), os quais conferem um gosto áspero e adstringente (BORGES, 2008). Para evitar a

transferência deste sabor ao vinho é comum eliminar o contato destas estruturas com o mosto para que não haja interferência negativa na composição química do mesmo (RIZZON; MENEGUZZO; MANFROI, 2004).

FIGURA 3 - ESTRUTURA DA BAGA.



FONTE: Grainger; Tattersall (2005)

As cascas ou películas contêm matéria corante e compostos odoríferos, além de polifenóis. Na superfície externa da casca está a pruína que é uma camada de substância cerosa onde ficam aderidos micro-organismos (exemplo, leveduras alcoolgênicas e bactérias lácticas), os quais conduzem a fermentação espontânea do mosto (KUHN, 2003). Os polifenóis encontrados nas cascas podem ser divididos em dois grupos: 1) antocianidinas (encontradas apenas nas uvas tintas) e flavonas (encontradas nas uvas brancas) que dão às uvas sua coloração característica e também dão origem a substâncias antioxidantes (por exemplo, resveratrol); 2) taninos, presentes em maiores quantidades nos vinhos tintos devido a maior utilização das cascas no processo de vinificação quando comparados aos vinhos brancos ou rosés (GRAINGER; TATTERSALL, 2005).

A matéria corante da casca é mais solúvel na presença de álcool. Por isso nos chamados vinhos jovens a maceração se dá na presença de pouco álcool, onde os corantes se solubilizam parcialmente, resultando um vinho de pouca cor e estrutura (BORGES, 2008).

A polpa representa 4/5 do peso da baga e é composta por água, açúcares, ácidos, proteínas e minerais. Os principais açúcares da uva são a frutose e a glucose. Já os ácidos mais importantes encontrados na baga verde seriam o ácido tartárico e o málico, sendo que durante o amadurecimento da fruta o ácido tartárico

torna-se o principal. Quanto aos minerais, o potássio é o que se apresenta em maior quantidade (2500 mg.L^{-1}), já a concentração dos demais (exemplo, cálcio e magnésio) não ultrapassa 200 mg.L^{-1} cada (GUERRA, 2003; GRAINGER; TATTERSALL, 2005).

As sementes variam em tamanho e formato de acordo com a variedade da uva. Na sua composição encontram-se taninos e óleo vegetal. Portanto, o esmagamento e/ou prensagem da uva deve ser cuidadoso para que estas sementes não sejam rompidas e liberem excessivamente o seu conteúdo (especialmente o tanino) que pode ser prejudicial ao produto final. Isto porque os taninos oriundos das cascas já são suficientes para o papel de limpidez e conservação que exercem no produto final, sem esquecer a contribuição destes ao sabor do vinho (BORGES, 2008).

Historicamente, a colheita da uva dependia de fatores subjetivos como a aparência visual, a textura e o aroma da fruta madura. No entanto estes critérios foram substituídos por parâmetros mais objetivos com a descoberta da importância do teor de açúcar e de ácido da uva para a vinificação e com o desenvolvimento de meios convenientes para dosar estes compostos (JACKSON, 2008). Assim, açúcar e acidez se tornaram os indicadores padrão da maturidade da uva e do tempo de colheita, parâmetros estes que compõem a chamada maturação tecnológica. No entanto vinhos de alta qualidade merecem outro critério de mensuração da maturação que é a chamada maturação fenólica, a qual leva ainda em consideração a quantidade e a qualidade dos polifenóis na uva no momento da colheita (GUERRA, 2003).

À medida que amadurecem, as uvas passam por mudanças de forma e de composição, como o ganho de açúcar, a queda da acidez, o aumento de volume e de peso, a mudança de coloração e o enriquecimento dos aromas (GUERRA, 2003). O tempo da colheita é provavelmente a mais importante decisão na viticultura, pois a qualidade da uva é indispensável para a qualidade do vinho.

Colher a uva no auge da sua maturação além de possibilitar a presença de um máximo teor de açúcar e baixa acidez, também promove a quantidade adequada de compostos nitrogenados (BORGES, 2008). A importância destes compostos será discutida mais a fundo nas próximas páginas, mas é bom frisar desde o início que entre os compostos nitrogenados encontram-se os aminoácidos, os quais são

precursores de compostos aromáticos. Portanto, uvas que apresentam maiores conteúdos em aminoácidos são potencialmente as mais aromáticas.

Confrontando os valores da variável °Baumé/acidez total e do índice de cor com a concentração dos compostos nitrogenados, observou-se que a maturidade tecnológica e a fenólica coincidem com a máxima concentração de nitrogênio nas uvas (GARDE-CERDÁN *et al.*, 2009). Este mesmo estudo concluiu que, em geral, o maior valor da variável °Baumé/acidez total durante o amadurecimento da uva coincide com o maior valor do índice de cor. Da mesma forma, Navarro *et al.* (2008) citado por Garde-Cerdán *et al.* (2009) encontraram que durante o amadurecimento de diferentes variedades de uva tinta, quanto maior o °Brix, maior a intensidade da coloração.

A concentração dos compostos nitrogenados é um fator que deve ser levado em consideração no momento da colheita isto porque o mosto deve conter uma concentração de nitrogênio assimilável maior que 140 mg.L^{-1} para garantir que a fermentação se processe corretamente (GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008). Porém o desdobramento adequado da fermentação também vai depender da concentração de açúcar deste mosto, assim como da capacidade fermentativa da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na vinificação.

3.4 TIPOS DE VIDEIRAS

Mundialmente existem milhares de variedades de uva. A maioria delas pertence à espécie *Vitis vinifera*, originária do Cáucaso entre 7.000 e 5.000 a.C., de onde foi difundida por toda a costa mediterrânea, seja para a produção de fruta para consumo *in natura*, seja como matéria-prima para a elaboração de vinhos. Entre as variedades desta espécie estão as conhecidas uvas tintas Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Syrah e Tannat e, entre as uvas brancas, destacam-se a Chardonnay, Prosecco e Riesling. Algumas delas se difundiram pelo mundo em virtude da sua capacidade de adaptação e pelas características dos vinhos que originam. Outras, de adaptação mais restrita, permaneceram em suas regiões de origem, proporcionando aos seus habitantes a oportunidade de elaboração de produtos típicos e exclusivos (GUERRA *et al.*, 2009).

O Brasil pertence ao chamado novo mundo vitivinícola, juntamente com Chile, Argentina, Estados Unidos, África do Sul, Austrália e outros, cuja base de produção são variedades importadas dos tradicionais países produtores de vinhos da região mediterrânea. Algumas variedades se adaptaram muito bem as novas condições climáticas a que foram expostas nos novos países vitivinícolas. Como exemplo pode-se citar a Riesling Itálico nas condições da Serra Gaúcha (GUERRA *et al.*, 2009).

As uvas oriundas de videiras *Vitis vinifera*, cultivares europeus, são comumente usadas na elaboração de vinho pelo mundo, principalmente na Europa. Nos Estados Unidos, espécies como a *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis aestivalis*, *Vitis rupestris* e *Vitis rotundifolia* são as mais usadas para a vinificação (YANG; MARTINSON; LIU, 2009). As frutas destas últimas espécies contêm menos açúcar que as oriundas de espécies *Vitis vinifera*. Desta forma, seus vinhos também não apresentam uma alta qualidade (ESTREICHER, 2006).

As uvas americanas ou uvas híbridas são oriundas de cultivares de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e cultivares híbridas interespecíficas e, no Brasil, são denominadas “uvas comuns” ou “uvas rústicas”. Em geral, estas videiras apresentam elevada produtividade e alta resistência a doenças que atacam os cultivares *Vitis vinifera*, como o míldio e o oídio, além de apresentarem resistência à filoxera (praga que limita o desenvolvimento dos cultivares de *Vitis vinifera*, determinando a necessidade de enxertia)(CAMARGO, 2003).

No caso de cultivares híbridos, muitos apresentam qualidade similar à das uvas finas (*Vitis vinifera*) associada à resistência às doenças fúngicas, constituindo-se em alternativa interessante para a produção de uvas, vinhos e sucos (HOFFMANN; CAMARGO; MAIA, 2005). Os cultivares americanas híbridos constituem a maior parcela de plantação da América do Norte oriental e são plantadas também na América do Sul, Ásia e Europa oriental (JACKSON, 2008).

A espécie americana mais comum compreende a *Vitis labrusca*. Dentro desta espécie existem muitas variedades que apresentam características particulares e que, portanto, vão gerar vinhos com composições e qualidade diferentes. No município de Colombo são cultivadas as variedades Terceira, Isabel e Niágara (CHOCIAI *et al.*, 2000).

Terci

É uma variedade *Vitis labrusca* e é conhecida por nomes regionais, 'Bordô' no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina; 'Terci' no Paraná; 'Folha de Figo' em Minas Gerais. Este cultivar de uva tinta tem importância comercial só em regiões com inverno definido, apresentando grande dificuldade de desenvolvimento em climas tropicais. É cultivado desde o Rio Grande do Sul até o sul de Minas Gerais. É um cultivar muito rústico, com baixo potencial glucométrico, alto teor de matéria corante e resistente a doenças fúngicas. Devido a forte presença de matéria corante este cultivar dá origem a vinhos e sucos intensamente coloridos e servem para a melhoria da cor dos produtos à base de 'Isabel' e de 'Concord'(CAMARGO, 2003; HOFFMANN; CAMARGO; MAIA, 2005).

Isabel

É um cultivar de *Vitis labrusca* muito bem adaptado às condições climáticas do Sul do Brasil. Se apresenta como uma uva tinta, rústica e altamente fértil, proporcionando colheitas abundantes (ROMBALDI *et al.*, 2004). É resistente ao oídio, porém está sujeito a perdas pela incidência de antracnose e de míldio. É consumido como uva de mesa, é usado para a elaboração de vinhos brancos, rosados e tintos, além de originar suco de boa qualidade, constituindo a base do suco brasileiro para exportação. É o cultivar mais plantado no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. Normalmente os produtos elaborados com uvas do cultivar Isabel precisam ser “cortados” com vinho ou suco de cultivares tintureiras para obtenção de produtos com a intensidade de coloração que o mercado exige (CAMARGO, 2003; HOFFMANN; CAMARGO; MAIA, 2005). Por definição, vinhos de corte são aqueles produzidos pela mistura de diferentes uvas com o intuito de se obter um vinho mais equilibrado e mais rico em características.

Niágara Branca

É um cultivar de *Vitis labrusca*, rústico, fértil e resistente às principais doenças. Destacam-se, atualmente, como produtores de 'Niágara branca' o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e o Sul de Minas Gerais. É a principal uva americana utilizada para a elaboração de vinho de mesa, sendo muito apreciada pelos consumidores devido ao intenso aroma e sabor característico que confere ao vinho

(BARNABÉ; VENTURINI FILHO; BOLINI, 2007). É também usada para consumo *in natura*. É um cultivar com alguma dificuldade de adaptação em climas quentes, exigindo abundantes adubações orgânicas e irrigação para atingir vigor adequado em regiões tropicais (CAMARGO, 2003; HOFFMANN; CAMARGO; MAIA, 2005).

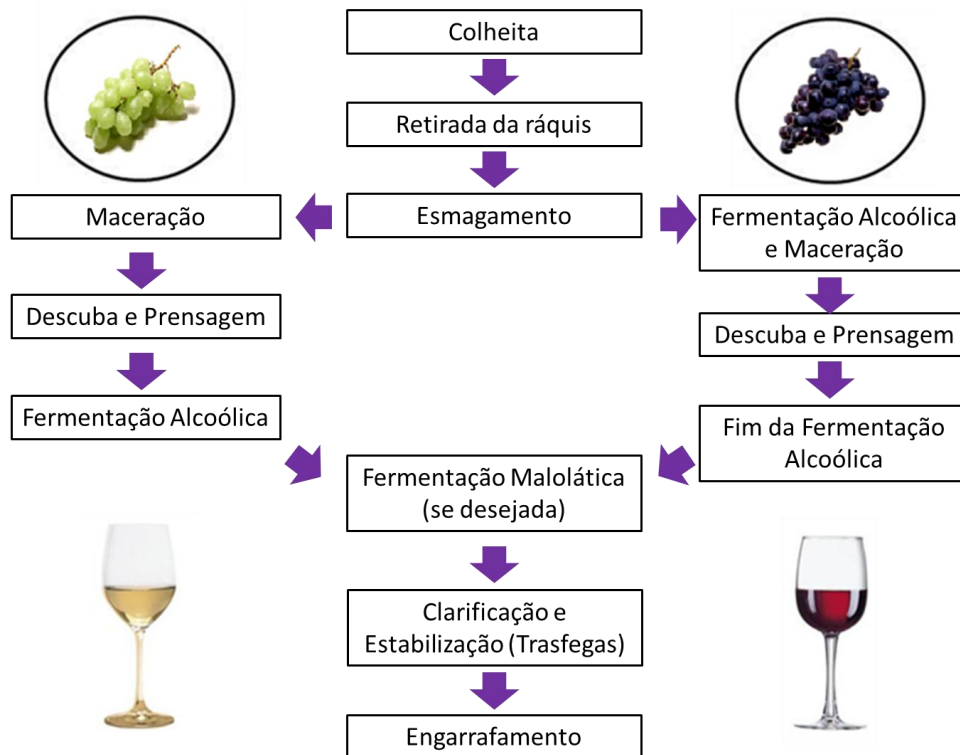
3.5 VINHO

O vinho pode ser descrito como uma mistura complexa, onde os dois ingredientes majoritários seriam a água e o etanol. No entanto, tal complexidade é explicada pela presença de muitos outros compostos que irão gerar o aroma e o sabor final do vinho. Entre estes compostos pode-se citar: açúcares, ácidos carboxílicos, minerais, compostos fenólicos, polissacarídeos, compostos nitrogenados, vitaminas, ésteres, aldeídos, acetatos, glicerol além de outros alcoóis (JACKSON, 2008; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

3.5.1 Processo de Vinificação

Alguns autores afirmam que a vinificação inicia com a chegada das uvas na vinícola, no entanto considerando que a qualidade da uva influencia diretamente na qualidade do vinho pode-se dizer que a vinificação tem seu início na própria vindima. Após a retirada de folhas e demais materiais que possam estar misturados com as uvas, as mesmas sofrem a retirada da ráquis (Figura 4). Em seguida, as bagas são prensadas para a ruptura da película com liberação do suco e início da maceração. A maceração facilita a extração de constituintes da polpa, película e sementes, por meio da ação de enzimas liberadas no processo de prensagem da baga. Entre as substâncias liberadas estão os compostos fenólicos que irão contribuir para a coloração e estrutura do vinho, aromas ou seus precursores, compostos nitrogenados, polissacarídeos e minerais (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; JACKSON, 2008).

FIGURA 4 - PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE VINHOS BRANCOS E VINHOS TINTOS



A maceração diferencia o processo de elaboração do vinho branco e do tinto. Para o vinho tinto esta etapa é fundamental já para o vinho branco esta etapa é evitada. No caso dos vinhos tintos, a maceração ocorre juntamente com a fermentação alcoólica, na qual a formação do etanol e a elevação da temperatura contribuem para a dissolução dos constituintes da parte sólida da uva (RIZZON; DALL'AGNOL, 2009).

A etapa de fermentação alcoólica pode ser iniciada espontaneamente pela presença de leveduras na própria casca da uva (KUHN, 2003). No entanto já é uma prática comum a adição ao mosto de leveduras selecionadas, com características conhecidas, para conduzir esta fermentação (RIZZON; DALL'AGNOL, 2009).

Em relação aos vinhos tintos, após a fermentação alcoólica acompanhada do período de maceração, ocorre a transfega. Esse procedimento permite a transferência do líquido fermentado para um novo recipiente, deixando como resíduos as cascas e outros sólidos, os quais serão conduzidos a uma prensa para obtenção de mais suco. Do total de suco, 10 a 15% são oriundos desta etapa de prensagem. O suco não prensado possui menos taninos, menos pigmentos corantes

e é muitas vezes considerado de qualidade superior. Alguns produtores decidem produzir seus vinhos utilizando apenas o suco livre de qualquer prensagem (GRAINGER; TATTERSALL, 2005). Esta etapa de prensagem quando se trata de vinhos brancos é realizada antes da fermentação alcoólica.

Após a primeira fermentação, o vinho pode sofrer uma segunda fermentação, chamada de maloláctica, na qual ocorre a transformação enzimática do ácido málico em ácido láctico (RIZZON; MENEGUZZO; MANFROI, 2004). Esta tem maior importância em regiões de clima frio, onde uma diminuição na acidez promove uma melhora no sabor do vinho. No entanto, enquanto a maioria dos vinhos tintos se beneficia dos resultados da fermentação maloláctica, poucos vinhos brancos são submetidos a ela. Isto porque a acidez contribui para o frescor característico destes vinhos (JACKSON, 2008). Esta segunda fermentação é conduzida principalmente pela bactéria láctica *Oenococcus oeni*, mas também ocorre ação de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Esta etapa pode ser induzida pelo aquecimento das dornas ou pela inoculação de espécies de bactérias lácticas (COSTANTINI; GARCÍA-MORUNO; MORENO-ARRIBAS, 2009).

Na sequência, um período de maturação sucede as fermentações para que o vinho adquira a limpidez e a estabilidade necessárias para ser conservado adequadamente. A maturação de vinhos tinto finos em barricas de carvalho favorece a clarificação e a estabilização em virtude da oxigenação lenta e gradativa. Durante este período, excesso de gás carbônico é dissipado e partículas em suspensão são precipitadas. No caso dos vinhos tintos, a presença dos taninos favorece a precipitação das proteínas substâncias responsáveis por causar a turvação nos vinhos brancos. Nestes, o uso de bentonite ajuda na clarificação do vinho (RIZZON; DALL'AGNOL, 2009).

Além disso, a etapa de estabilização é preconizada com o objetivo de se prevenir a formação de cristais de tartarato (de sódio ou potássio) após o engarrafamento do vinho. Tendo em vista que os cristais decantam no inverno, esta estabilização pode ocorrer naturalmente. No entanto, para acelerar o processo, pode-se resfriar o vinho até -3 °C a -4 °C, por um período de 8 a 10 dias provocando a insolubilização e a precipitação dos cristais (RIZZON; MENEGUZZO; MANFROI, 2004). Alternativamente, pode-se diminuir a temperatura a 0 °C e introduzir finos cristais de tartarato seguidos por uma vigorosa agitação. Estes cristais iniciais vão

atrair outros fazendo com que o processo de remoção total dos cristais dure aproximadamente 24 horas (GRAINGER; TATTERSALL, 2005).

Após algumas semanas ou meses, o vinho sofre uma *trasfega* para separá-lo de sólidos que se depositaram de forma espontânea. Este sedimento consiste principalmente por células de leveduras e bactérias, restos da baga da uva, taninos precipitados, proteínas e cristais de tartarato de potássio (JACKSON, 2008). Ademais, o vinho ainda pode ser clarificado por meio de filtrações.

Antes do engarrafamento, os vinhos geralmente recebem uma dose de dióxido de enxofre para diminuir a oxidação e evitar o crescimento de micro-organismos indesejáveis (RIZZON; DALL'AGNOL, 2009). As garrafas podem ser envelhecidas na vinícola durante meses ou até mesmo anos antes de serem enviadas para o comércio (JACKSON, 2008).

3.6 COMPOSTOS NITROGENADOS NO VINHO

3.6.1 Aminoácidos

Os aminoácidos compreendem 30 a 40% do total de nitrogênio presente no vinho e sua origem pode ser explicada a partir de diversas fontes. Primeiramente, há os aminoácidos oriundos da própria uva, os quais vão ser utilizados pela levedura durante a fermentação alcoólica como fonte de nitrogênio, necessária para o seu crescimento (SOUFLEROS *et al.*, 2003). A concentração destes compostos aumenta com a maturação da uva e isto pode ser observado no estudo realizado por Bauza (2007) no qual nota-se a evolução do aminoácido arginina na baga desde a fase do aparecimento dos botões florais até atingir a sua maior concentração na fase de maturação (BAUZA; KELLY; BLAISE, 2007). Outra fonte de aminoácidos seriam aqueles excretados pelas leveduras vivas no final da fermentação e ainda aqueles liberados por proteólise durante a autólise das leveduras. Por último, ressalta-se a presença dos aminoácidos produzidos pela degradação enzimática das proteínas da uva (SOUFLEROS *et al.*, 2003).

No início do processo fermentativo as leveduras usam o nitrogênio de sais de amônia para o seu desenvolvimento, seguido do nitrogênio dos aminoácidos livres. Alguns destes, particularmente, arginina, ácido glutâmico, glutamina, ácido

aspártico, asparagina, treonina e serina, são preferencialmente assimilados (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Os aminoácidos e os íons amônio são também importantes fatores de crescimento para as bactérias lácticas responsáveis pela fermentação maloláctica (GOMEZ-ALONSO; HERMOSIN-GUTIERREZ; GARCIA-ROMERO, 2007). Em particular, os peptídeos e os aminoácidos de baixo peso molecular consistem na principal fonte de nitrogênio para as bactérias lácticas. Dentre os aminoácidos presentes, há aqueles que são de fácil assimilação pelas bactérias, como a etanolamida, a leucina, a arginina, a metionina e a histidina. E ainda, há aqueles que só são consumidos quando as fontes primárias de nutrientes já se exauriram, como a glicina, a alanina, a asparagina e o ácido β -aminobutírico (BARRADO; RODRIGUEZ; CASTRILLEJO, 2009).

O total de nitrogênio amínico livre (soma do total de aminoácidos exceto prolina) é usado como indicador da qualidade do mosto, isto porque baixos valores refletem em insuficiente reserva nutricional para o desenvolvimento das leveduras, promovendo um prolongamento no tempo de fermentação (HERBERT *et al.*, 2000).

A importância da quantidade adequada de nitrogênio nos mostos não se restringe apenas em promover uma fermentação com o crescimento normal das leveduras, mas também em garantir um buquê apropriado ao produto final (HERBERT; SANTOS; ALVES, 2001). Isto porque os aminoácidos contribuem grandemente com a composição aromática do vinho, visto que o seu metabolismo pode dar origem a ésteres, alcoóis superiores e ácidos graxos voláteis que estão envolvidos na formação do buquê. Um exemplo da relação entre o metabolismo de compostos nitrogenados e estes grupos de substâncias voláteis é o próprio catabolismo de aminoácidos que forma os cetoácidos e seus alcoóis correspondentes (GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008).

Esta contribuição dos aminoácidos na formação do aroma final do vinho foi verificada por Pereira *et al.* (2008) ao se observar a quantidade destes compostos em dois vinhos oriundos de uma mesma variedade de uva, mas submetidos a diferentes fermentações. O vinho submetido a uma fermentação completa apresentou uma diminuição de no mínimo 50% nos aminoácidos arginina, alanina, ácido γ -aminobutírico e treonina, quando comparado com outro vinho submetido a uma fermentação parcial (PEREIRA *et al.*, 2008).

Pelas razões discutidas acima, é uma prática comum em enologia suplementar o mosto com sais de amônio. No entanto esta adição deve ser criteriosa, pois excesso de nitrogênio também pode gerar uma instabilidade microbiológica devido ao crescimento bacteriano e a produção de carbamato de etila, que é um composto carcinogênico (GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008). O Carbamato de etila e a ureia são formados por reações subseqüentes a partir da arginina, daí a importância clínica em se quantificar os aminoácidos, sobretudo este em particular devido as suas implicações toxicológicas (CALLEJÓN; TRONCOSO; MORALES, 2010).

O perfil de aminoácidos apresenta uma grande variabilidade entre os diferentes vinhos e isto se deve a uma diversidade de fatores, incluindo: fertilização, condições climáticas, o tempo de maceração do mosto, envelhecimento, ocorrência da fermentação maloláctica, safra, variedade da uva, práticas de viticultura e condições de vinificação. Sendo assim, a composição aminoacídica pode ser um método eficaz para a classificação dos vinhos segundo sua variedade, origem geográfica, tecnologia de produção e safra correspondente (SOUFLEROS *et al.*, 2003; BARRADO; RODRIGUEZ; CASTRILLEJO, 2009).

Em relação a origem geográfica, o estudo de Garde-Cerdán *et al.* (2009) com diferentes variedades de uva (Monastrell, Syrah, Merlot e Petit-Verdot) em duas safras distintas pôde observar uma provável adaptação das mesmas a região de Jumilla na Espanha pela análise do perfil aminoacídico. A coincidência do perfil de aminoácidos majoritários e minoritários nestas variedades demonstra uma contribuição para a classificação destes vinhos segundo sua origem geográfica.

Apesar da grande variedade de fatores que podem afetar a composição aminoacídica dos vinhos, muitos pesquisadores têm empregado com sucesso o perfil de aminoácidos como ferramenta para auxiliar na diferenciação e autenticidade do produto. Como exemplo, pode-se citar o uso do perfil de aminoácidos na diferenciação das autênticas champagnes em relação aos demais vinhos espumantes (SOUFLEROS *et al.*, 2003). E ainda, destaca-se o uso da concentração de aminoácidos na garantia da autenticidade do renomado vinho do Porto (HERBERT *et al.*, 2000). Isto porque se trata de um vinho fortificado que tem sua fermentação precocemente interrompida pela adição de aguardente vínica,



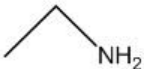
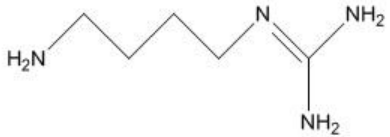
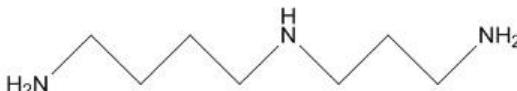
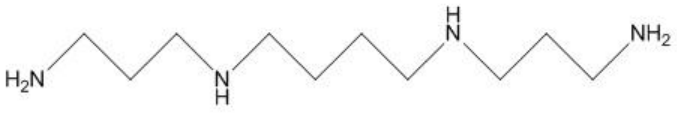
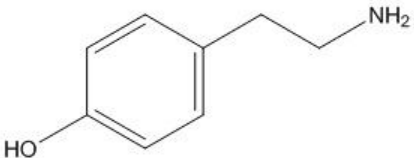
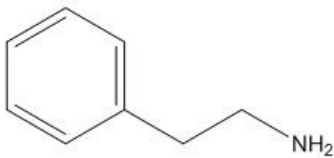
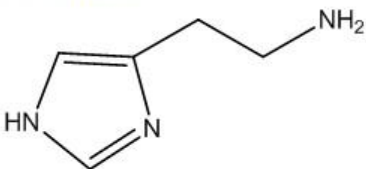
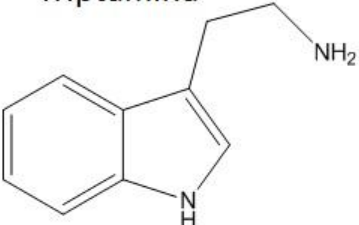
possibilitando assim que as altas concentrações de aminoácidos no mosto inicial se mantenham no produto final.

3.6.2 Aminas Bioativas

Além dos compostos voláteis originados a partir de aminoácidos, outra classe de compostos com a mesma origem compreende as aminas bioativas. A presença destas nos vinhos tem sido estudada há mais de 30 anos e, particularmente nos últimos anos, estas pesquisas se intensificaram devido ao aumento da preocupação com a saúde dos consumidores (DEL PRETE *et al.*, 2009). Estas substâncias podem ser formadas em todos os alimentos que contenham proteínas ou aminoácidos livres e que sejam submetidos a condições que permitam o crescimento microbiano ou atividade bioquímica (SILLA-SANTOS, 1996). Desta forma produtos fermentados como cerveja, vinho e queijo são bons exemplos de alimentos que apresentam certas quantidades destas aminas.

Aminas bioativas são compostos nitrogenados básicos e de baixo peso molecular que, de acordo com a sua estrutura química (Figura 5) podem ser classificadas como: a) alifáticas, como a putrescina, a cadaverina, a etilamina, a metilamina, a espermina e a espermidina; b) aromáticas, como a tiramina e a feniletilamina; c) heterocíclicas, como a histamina e a triptamina (SILLA-SANTOS, 1996; SMIT; DU TOIT; DU TOIT, 2008).

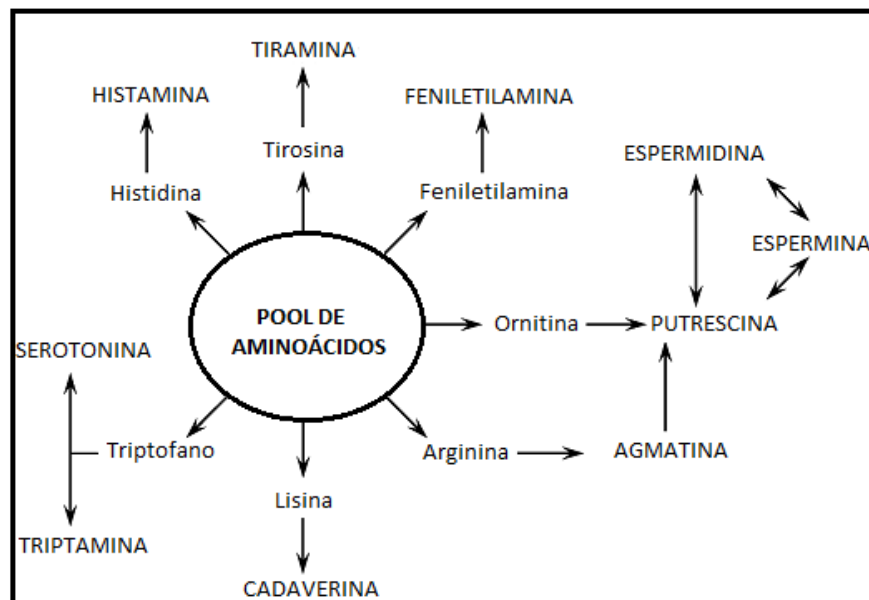
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUMAS AMINAS BIOATIVAS

AMINAS ALIFÁTICAS	
Putrescina 	Cadaverina 
Etilamina 	Metilamina $\text{H}_3\text{C}-\text{NH}_2$
Agmatina 	
Espermidina 	
Espermina 	
AMINAS AROMÁTICAS	
Tiramina 	Feniletilamina 
AMINAS HETEROCÍCLICAS	
Histamina 	Triptamina 

Estas aminas são formadas pela descarboxilação dos seus aminoácidos precursores (Figura 6) por meio da ação das leveduras durante a fermentação alcoólica, das bactérias lácticas durante a fermentação maloláctica, ou ainda por outros micro-organismos contaminantes (LONVAUD-FUNEL, ALINE, 2001). Esta

descarboxilação é enzimática e se deve à presença de enzimas descarboxilases nestes micro-organismos. A presença do gene que codifica para a formação das descarboxilases, não garante que a enzima vai ser funcional e que vai haver formação das aminas bioativas. É também necessário que o ambiente seja propício para a atividade enzimática, afinal parâmetros físico-químicos como pH, teor alcoólico, dióxido de enxofre e temperatura influenciam nesta atividade (SOUZA *et al.*, 2005; SMIT; DU TOIT; DU TOIT, 2008). Além da formação por descarboxilação dos aminoácidos durante o processo fermentativo, algumas aminas também podem ser encontradas já na baga, tais como putrescina e outras poliaminas.

FIGURA 6 – AMINOÁCIDOS PRECURSORES DAS AMINAS BIOATIVAS



FONTE: Ancín-Azpilicueta (2008)

Relacionando a formação das aminas ao processo fermentativo, a identificação de micro-organismos que exibem a atividade de descarboxilase é importante para monitorar o risco da contaminação dos alimentos. Para isto um método rápido e eficiente seria o uso da cromatografia em camada delgada. Assim, faz-se o crescimento dos micro-organismos em meios suplementados com aminoácidos (precursores das aminas bioativas). Amostras do crescimento são retiradas em tempos pré-estabelecidos e aplica-se uma reação de derivatização as possíveis aminas presentes. O resultado desta reação é aplicado a placa de sílica e revelado. A presença das aminas é caracterizada pela comparação dos fatores de

retenção (R_f) das substâncias presentes na amostra com os R_f dos padrões de aminas aplicados a placa. Em caso de positividade para aminas, conclui-se que o micro-organismo testado possui descarboxilases que foram capazes de transformar os aminoácidos em aminas (COSTANTINI *et al.*, 2009).

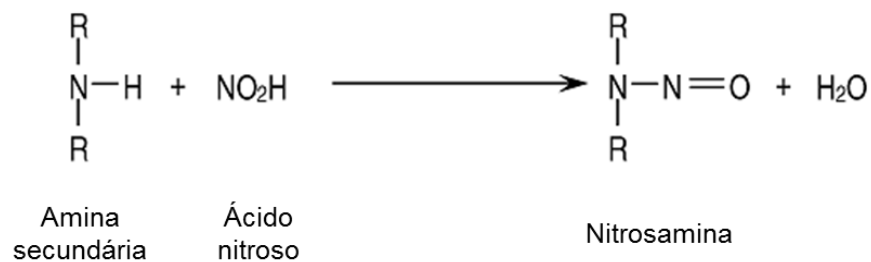
No entanto, Del Prete *et al.* (2009) demonstraram que as aminas bioativas podem aparecer no vinho por outras vias que não a descarboxilação dos aminoácidos. Para isto, realizou fermentações usando mosto de uva esterilizado e adicionou as mesmas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni*, ambas não produtoras de aminas bioativas (não possuíam enzimas descarboxilases para tal feito). Sem contaminação microbiana externa, algumas aminas apareceram ao final da fermentação alcoólica e da fermentação maloláctica. Um exemplo disto foi a presença tardia da agmatina e tiramina oriundas provavelmente da hidrólise de amidas derivadas do ácido hidroxicinâmico presente nas uvas através do metabolismo normal da levedura e da bactéria utilizada.

A presença das aminas bioativas nos vinhos pode acarretar certa apreensão aos consumidores, principalmente aos mais susceptíveis, devido aos seus efeitos fisiológicos indesejáveis. A histamina pode acarretar dor de cabeça e outros sintomas alérgicos como hipotensão, edema, palpitações, vermelhidão (rubor), diarreia e vômito. Enquanto a tiramina e feniletilamina têm sido associadas com enxaquecas e hipertensão (SILLA-SANTOS, 1996; HUSNIK *et al.*, 2006). Além disso, álcool, acetaldeído, drogas antidepressivas e outras aminas bioativas podem potencializar o efeito tóxico da histamina, tiramina e feniletilamina (SILLA-SANTOS, 1996; HUSNIK *et al.*, 2006). Este aumento da toxicidade provocado pelas próprias aminas bioativas se refere, especificamente, a ação da cadaverina e da putrescina em interferir com enzimas que metabolizam as aminas histamina, tiramina e feniletilamina (SILLA-SANTOS, 1996; COSTANTINI *et al.*, 2009).

Ainda em relação à toxicidade, tem-se que a histamina e as poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) podem induzir a transformações celulares e à patogênese tumoral (HUSNIK *et al.*, 2006). No que diz respeito apenas às aminas secundárias como, por exemplo, a espermidina e a espermina, há ainda a possibilidade de reação com o ácido nitroso ou seus respectivos sais para a formação de nitrosaminas (Figura 7) que são consideradas carcinogênicas,

mutagênicas e teratogênicas (ANCÍN-AZPILICUETA; GONZÁLEZ-MARCO; JIMÉNEZ-MORENO, 2008).

FIGURA 7 - REAÇÃO GERAL DEMONSTRANDO A FORMAÇÃO DAS NITROSAMINAS.



O potencial toxicológico das amins bioativas se dá quando do consumo de grandes quantidades destas amins. Os limites regulatórios para a quantidade máxima de amins bioativas permitida nos vinhos ainda não foram estabelecidos pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), embora alguns países já tenham criado seus limites máximos para o conteúdo de histamina nos vinhos (2 mg.L⁻¹ na Alemanha, 4 mg.L⁻¹ na Holanda, 6 mg.L⁻¹ na Bélgica, 8 mg.L⁻¹ na França, 10 mg.L⁻¹ na Suíça e Áustria). Assim, permanece a necessidade de estudos toxicológicos futuros com o intuito de analisar o real impacto destes compostos sobre a saúde humana (MARQUES, ANA P.; LEITÃO, MARIA C.; SAN ROMÃO, MARIA V., 2008).

Após o consumo, as amins bioativas são normalmente metabolizadas por amino oxidases, tais como a monoamino oxidase (MAO), a diamino oxidase (DAO) e a histamina-*N*-metil transferase, a compostos menos ativos (SILLA-SANTOS, 1996). No entanto, em indivíduos com uma quantidade insuficiente de enzimas detoxificantes, estas amins podem ser absorvidas e entrar na corrente sanguínea causando efeitos indesejáveis a saúde (HUSNIK *et al.*, 2006).

Em resumo, a dificuldade em se estabelecer os limites tóxicos das amins bioativas reside na dependência dos tipos de amins presentes, no tipo de alimento que está sendo ingerido concomitantemente e na eficiência dos mecanismos de detoxificação que são próprios de cada indivíduo (ANCÍN-AZPILICUETA; GONZÁLEZ-MARCO; JIMÉNEZ-MORENO, 2008).

Apesar da presença das aminas estar associada a desvantagens aos vinhos, algumas poliaminas tem uma função biológica importante sendo uma fonte de nitrogênio para as células e agindo como fatores de crescimento, antioxidantes, estabilizadores do DNA e RNA, reguladores metabólicos, segundos mensageiros, além de atuarem como precursores na síntese de hormônios, alcaloides, ácidos nucleicos, e proteínas (SILLA-SANTOS, 1996; CALLEJÓN; TRONCOSO; MORALES, 2010).

O estudo das aminas bioativas pode também ser usado como um indicador da qualidade do alimento já que a sua presença pode ser associada com condições sanitárias inadequadas durante a elaboração do mesmo (KISS; KORBÁSZ; SASS-KISS, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008).

A engenharia genética de leveduras vínicas pode ser usada com o objetivo de prevenir e/ou reduzir a formação destas aminas bioativas nos vinhos. Husnik *et al.*(2006) construíram a primeira linhagem metabolicamente modificada para ser comercializada na indústria vinícola. Esta linhagem, ML01, geneticamente modificada a partir de uma levedura *Sacch. cerevisiae* usada na indústria, expressa o gene da malato permease do micro-organismo *Schizosaccharomyces pombe* (*mae1*) e o gene da enzima maloláctica do *Oenococcus oeni* (*mleA*) sob o controle do promotor PGK1 da levedura *Sacch. cerevisiae* e de sequências terminais. Os resultados da fermentação utilizando este micro-organismo modificado são interessantes visto que ML01 foi capaz de degradar integralmente 5,5 g.L⁻¹ de ácido málico em um período de 9 dias a 13 °C, enquanto o *Oenococcus oeni* foi incapaz de completar a fermentação maloláctica e, após quatro meses constatou-se ainda 2,61 g.L⁻¹ de ácido málico remanescentes no vinho. Sendo assim, ML01 aumenta a eficiência da fermentação maloláctica e reduz e/ou inibe a formação de aminas bioativas, contribuindo assim para o aumento da qualidade e da segurança daqueles vinhos que se beneficiam da ocorrência desta segunda fermentação.

Além disso, pesquisas comprovam que o uso de culturas iniciadoras (*starter*) de bactérias lácticas pode reduzir a incidência de aminas bioativas quando comparadas as fermentações espontâneas (MARTÍN-ÁLVAREZ *et al.*, 2006; MARQUES, ANA P.; LEITÃO, MARIA C.; SAN ROMÃO, MARIA V., 2008).

Segundo Ancín-Azpilicueta, González-Marco e Jiménez-Moreno (2008) há muitos fatores que influenciam a concentração das aminas nos vinhos, fatores estes

que estão inter-relacionados e, portanto, dificultam o reconhecimento da ação individual de cada um deles. A seguir estão descritos os fatores que afetam o conteúdo de amins nas uvas bem como a influência que o processo de vinificação exerce na formação destas amins.

3.6.2.1 Fatores que afetam o conteúdo de amins nas uvas

Conteúdo em aminoácidos

Considerando que as amins são formadas pela descarboxilação dos aminoácidos é coerente pensar que os seus níveis influenciam de alguma forma a produção das amins. Bertrand *et al.* (1991) citado por Ancín-Azpilicueta *et al.* (2008) verificaram que a fertilização nitrogenada de vinhedos com o cultivar Merlot produziu um aumento no conteúdo dos compostos nitrogenados da uva, bem como nas concentrações de histamina, putrescina, cadaverina e fenietilamina nos vinhos. Já González-Marco, Moreno e Azpilicueta (2006) adicionaram aminoácidos ao mosto provenientes de autolisado de proteínas e não notaram aumento na concentração de amins durante a fermentação alcoólica, porém o aumento foi percebido durante a fermentação maloláctica. Já Soufleros *et al.* (2007) verificaram que o consumo de aminoácidos precursores não estava relacionado com a formação das respectivas amins.

Em resumo, é difícil estabelecer uma correlação entre esses fatores, isto porque, como dito anteriormente, a origem das amins bioativas é multifatorial e, portanto, outros parâmetros interferem concomitantemente como, por exemplo, a capacidade aminogênica dos micro-organismos que conduziram as fermentações acima relatadas.

Safra

As diferenças no conteúdo de amins entre as safras de 2003 e 2004 ficaram evidente nos vinhos portugueses e isto pode ter se dado em virtude da diversidade de micro-organismos que são naturalmente selecionados a cada ano, provavelmente devido às condições climáticas e, conseqüentemente, as práticas de viticultura e vinificação utilizadas (MARQUES, ANA P.; LEITÃO, MARIA C.; SAN ROMÃO,

MARIA V., 2008). A interferência da safra no conteúdo das aminas também foi demonstrado por Martín-Álvarez *et al.*(2006), que justificaram este fato em virtude da diferença significativa existente entre o conteúdo de aminoácidos das safras em questão, além da já discutida variedade microbiana entre os anos. Del Prete *et al.* (2009) também notaram diferenças significativas no conteúdo de aminas (tanto no mosto quanto nos vinhos) presentes nas duas safras estudadas, associando-as as mudanças climáticas ocorridas nos anos estudados.

Variedade da uva

A variedade da uva parece influenciar no conteúdo das aminas provavelmente devido aos tipos e quantidades de aminoácidos característicos da composição de cada variedade (MARQUES, ANA P.; LEITÃO, MARIA C.; SAN ROMÃO, MARIA V., 2008). Já Soufleros *et al.* (2003) observaram que algumas variedades de uvas apresentavam maior conteúdo em aminoácidos primários que outras variedades estudadas, mas não chegaram a avaliar a presença de aminas nestas variedades. Ao analisar vinhos portugueses da região do Alentejo, Herbert *et al.* (2005) observaram diferenças entre os conteúdos de aminas e também aminoácidos entre as distintas variedades analisadas. Putrescina, cadaverina e espermidina já foram encontradas no pericarpo da uva e também nas sementes das variedades Furmint e Hárslevelü cultivadas na Hungria (KISS; KORBÁSZ; SASS-KISS, 2006). Cejudo-Bastante *et al.* (2010) apenas encontraram espermidina e putrescina como aminas oriundas das uvas Trebbiano e Sauvignon Blanc cultivadas na Itália.

Técnicas de viticultura e condições climáticas

A variação do conteúdo de aminas encontrado na baga pode ser associada ao excesso de fertilização e/ou a baixas concentrações de potássio no solo, técnicas que aumentam a produção de poliaminas na baga (KISS; KORBÁSZ; SASS-KISS, 2006; LANDETE, J. M.; FERRER; PARDO, 2007).

As condições climáticas parecem influenciar o conteúdo de aminas bioativas. Del Prete *et al.* (2009) verificaram que os vinhos produzidos com uvas que foram cultivadas em condições climáticas inadequadas (exemplo, período de maturação e colheita chuvosos) apresentaram um conteúdo de aminas superior àqueles oriundos

de uvas cultivadas em condições climáticas favoráveis ao seu crescimento e maturação.

Origem geográfica

Vinhos portugueses oriundos de três regiões distintas apresentaram quantidades de amins diferentes (MARQUES, ANA P.; LEITÃO, MARIA C.; SAN ROMÃO, MARIA V., 2008). Bem como vinhos espanhóis apresentaram conteúdo de histamina, tiramina, putrescina e feniletilamina diferentes quando comparadas três regiões vitícolas distintas (LANDETE, JOSE M. *et al.*, 2005). Assim também, vinhos portugueses de diferentes sub-regiões inseridas na região demarcada de Alentejo apresentaram diferenças nos conteúdos de amins bioativas (HERBERT *et al.*, 2005).

3.6.2.2 Influência do processo de vinificação no conteúdo de amins

Fermentação alcoólica

Em um estudo conduzido com leveduras e bactérias selecionadas em um mosto previamente esterilizado foi detectada a presença de algumas amins já no mosto (etanolamina, etilamina e putrescina). E, durante a fermentação alcoólica foi comprovado o aumento da etanolamina e a diminuição do conteúdo de putrescina e etilamina (DEL PRETE *et al.*, 2009). Já Cejudo-Bastante *et al.* (2010) detectaram a produção de putrescina, triptamina e histamina durante a fermentação alcoólica, enquanto apenas traços de tiramina e cadaverina foram encontrados.

Maceração

Martin-Alvarez *et al.* (MARTÍN-ÁLVAREZ *et al.*, 2006) analisaram a influência do tempo de maceração apenas na formação das amins bioativas, sem avaliar a extração dos aminoácidos e demonstraram que um período de maceração maior pode favorecer a formação das amins bioativas. Soleas, Carey e Goldberg (1999) analisaram vinhos finos brancos e tintos de diversos cultivares e atribuíram a maior concentração de amins totais encontrada para os vinhos da variedade Pinot Noir ao maior tempo de maceração desta uva devido a fraca coloração da sua casca. O

mesmo fato pode se estender a uva Chardonnay que neste mesmo estudo aparece em segundo lugar em termos de concentração de aminas.

Fermentação maloláctica

A condução da fermentação maloláctica com bactérias lácticas selecionadas pode reduzir a formação das aminas bioativas (MARQUES, ANA P.; LEITÃO, MARIA C.; SAN ROMÃO, MARIA V., 2008). Este resultado está em concordância com outro estudo que demonstrou a diminuição da formação das aminas com o uso das culturas iniciadoras, principalmente no que diz respeito ao conteúdo de histamina, tiramina e cadaverina (MARTÍN-ÁLVAREZ *et al.*, 2006). Para reforçar os estudos anteriores, Izquierdo-Cañas *et al.* (2008) verificaram que as aminas histamina, tiramina e putrescina aumentam de forma significativa durante a fermentação maloláctica conduzida de forma espontânea.

Condições higiênicas sanitárias durante a vinificação

Vinhos que foram tratados com fungicidas apresentaram quantidades menores de aminas bioativas frente àqueles vinhos que não foram tratados. Isto demonstra que a formação das aminas pode ser atribuída ao desenvolvimento de fungos nos vinhos não tratados ou, em virtude de alguma atividade de origem bacteriana distinta daquelas normalmente presentes em uvas saudáveis (MARQUES, ANA P.; LEITÃO, MARIA C.; SAN ROMÃO, MARIA V., 2008). Além disso, Kiss, Korbász e Sass-Kiss (2006) demonstraram que uvas intactas contêm menor número de aminas (putrescina, cadaverina, espermidina e histamina) do que as uvas infectadas por fungos e bactérias que além das aminas citadas acima, apresentaram também feniletilamina e agmatina.

Parâmetros físico-químicos

No que diz respeito à formação das aminas bioativas, a síntese das mesmas tem sido descrita como um mecanismo de defesa dos micro-organismos para manter a homeostase do pH intracelular quando expostos a condições ácidas de crescimento (CID; MIGUÉLEZ-ARRIZADO; BECKER, 2008).

Além disso, de acordo com Ancín-Azpilicueta, González-Marco e Jiménez-Moreno (2008), valores elevados de pH favorecem a proliferação de espécies de

bactérias, as quais podem ser responsáveis pela formação das aminas nos vinhos. Além disso, neste mesmo estudo foi citada a existência de uma correlação entre os conteúdos de histamina e tiramina e os valores de acidez volátil em vinhos brancos e rosés.

A presença de dióxido de enxofre parece influenciar o metabolismo de nitrogênio amino. Isto porque Cejudo-Bastante *et al.* (2010) acompanharam processos de vinificação utilizando duas linhagens distintas de *Sacch. cerevisiae* e notaram que a adição de sulfitos ao mosto antes da fermentação resultou em um aumento significativo no consumo de glutamina e alanina. O declínio do pH intracelular que segue a entrada do dióxido de enxofre na célula diminui o gradiente de pH transmembrana, dissipando a força próton motriz através da membrana. Isto pode resultar em uma eficiência diminuída de processos tais como o transporte ativo de solutos e aminoácidos, os quais requerem a força próton motriz, conduzindo para modificações no comportamento metabólico da levedura (CEJUDO-BASTANTE *et al.*, 2010). Neste mesmo estudo foi possível visualizar que o dióxido de enxofre influencia no metabolismo dos aminoácidos, mas o conteúdo de aminas não foi afetado no produto final. No entanto, outros estudos já relataram a existência de correlação negativa entre a quantidade de dióxido de enxofre adicionada ao vinho e o conteúdo de aminas (VIDAL-CAROU *et al.*, 1990, *apud* ANCÍN-AZPILICUETA *et al.*, 2008). Enquanto Souza *et al.* (2005) descreveram a existência de correlação positiva entre a formação da amina espermidina e os níveis de dióxido de enxofre em vinhos da variedade Merlot, ao mesmo tempo que encontraram correlação negativa entre os mesmos parâmetros só que em vinhos da variedade Cabernet Franc.

A importância da determinação do teor alcoólico em análises de aminas bioativas nos vinhos se fundamenta em um estudo com a espécie *Oenococcus oeni* no qual foi observado que vinhos com altas concentrações de álcool (12% v/v) inibem a atividade da enzima histidina descarboxilase, resultando em uma menor formação de histamina nestes vinhos (ROLLAN *et al.*, 1995, *apud* ANCÍN-AZPILICUETA, GONZÁLEZ-MARCO E JIMÉNEZ-MORENO, 2008).

Envelhecimento

Vinhos que após a fermentação maloláctica ficaram em contato com a borra por mais seis meses apresentaram mais aminas bioativas que aqueles que foram separados da borra. A justificativa desta ocorrência se deve a hidrólise das proteínas presentes nas leveduras remanescentes, e dos peptídeos a aminoácidos, os quais são precursores das aminas bioativas (MARQUES, ANA P.; LEITÃO, MARIA C.; SAN ROMÃO, MARIA V., 2008). Estes resultados estão de acordo com Martín-Álvarez *et al.* (2006) que demonstraram o aumento significativo das aminas putrescina e metilamina nos vinhos envelhecidos em contato com a borra. Contraditoriamente, este mesmo estudo notou que os níveis de tiramina diminuíram significativamente nos vinhos envelhecidos com a borra, sendo seu consumo explicado pela ação de micro-organismos residuais que a utilizaram para a produção de esqueletos carbônicos ou amino grupos.

Vinhos que passaram por um período de envelhecimento mais longo apresentam maiores concentrações de algumas aminas, como espermidina, histamina e feniletilamina, bem como maior conteúdo total de aminas em relação a vinhos mais jovens (SOUFLEROS *et al.*, 2007).

3.7 PROBLEMAS E ALTERNATIVAS ANALÍTICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS

No controle de qualidade dos vinhos nota-se que a análise quantitativa de aminoácidos e suas respectivas aminas bioativas não são uma prática comum e este fato deve-se principalmente à deficiência dos métodos analíticos (HERBERT; SANTOS; ALVES, 2001). A análise do perfil de aminoácidos em vinhos deve abranger baixos limites de detecção para que aminoácidos presentes em menores quantidades possam ser analisados. Além disso, seria ideal ter uma técnica com tempo de análise curta para facilitar o uso rotineiro para certificação do vinho e a criação de banco de dados com as características próprias de cada vinho para ajudar na identificação de adulterações (HERBERT *et al.*, 2000). A quantificação das aminas bioativas também é complexa devido à sua presença em pequenas quantidades, à sua estrutura e, além disso, devido à complexidade da matriz onde elas se encontram (DEL PRETE *et al.*, 2009).

A análise destes compostos nitrogenados é difícil devido à ausência de um cromóforo específico, além disso, as aminas alifáticas não exibem nenhuma característica para absorção no ultravioleta, propriedades fluorescentes ou atividade eletroquímica (GOMEZ-ALONSO; HERMOSIN-GUTIERREZ; GARCIA-ROMERO, 2007; SMIT; DU TOIT; DU TOIT, 2008). Assim, os compostos devem passar por uma etapa de derivatização pré ou pós-coluna para aumentar os limites de detecção e prevenir interferências da matriz na qual estão inseridos.

Metodologias analíticas como as que determinam aminoácidos e aminas isoladamente ou como diferentes derivados conduzem a perdas consideráveis de ambos os grupos, requerendo mais tempo e maiores custos que as metodologias que analisam ambos os compostos concomitantemente (KUTLÁN; MOLNÁR-PERL, 2003). Sendo assim, vários trabalhos têm demonstrado maneiras de se quantificar aminoácidos e aminas bioativas de forma simultânea, na mesma matriz e sem extração preliminar (BAUZA *et al.*, 1995; HERBERT; SANTOS; ALVES, 2001; KUTLÁN; MOLNÁR-PERL, 2003; GOMEZ-ALONSO; HERMOSIN-GUTIERREZ; GARCIA-ROMERO, 2007).

Vários métodos analíticos quantitativos foram propostos para a análise de aminoácidos e aminas bioativas incluindo cromatografia a gás, cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar, além de cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) (PEREIRA *et al.*, 2008).

A cromatografia a líquido de alta eficiência baseia-se na separação de componentes através da sua permeação por uma coluna contendo partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência. No entanto, devido a sua baixa permeabilidade é necessário o uso de bombas de alta pressão para permitir a eluição da fase móvel. Esta bomba deve ser capaz de fornecer ao sistema um fluxo contínuo e sem pulsos possibilitando alta reprodutibilidade (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A determinação de compostos nitrogenados usando derivatização pré-coluna e CLAE em fase reversa tem sido a ferramenta analítica mais usada devido a sua alta resolução e sensibilidade. Dentre as metodologias propostas (BAUZA, 1995; HERBERT, 2001; KUTLÁN, 2003; GOMEZ-ALONSO, 2007; PEREIRA, 2008), (HERBERT *et al.*, 2000; SOUFLEROS *et al.*, 2003) existem diversos agentes de

derivatização utilizados, destacando-se o cloroformato de 9-fluorenilmetil (FMOC-Cl), orto-ftaldeído (OPA) e o etoximetilenomalonato de dietila (DEEMM).

O o-ftaldeído é um fluoróforo que reage com aminoácidos primários para formar isoindóis. Os derivados isoindóis são separados por cromatografia em fase reversa e se mostram muito sensíveis a pequenas variações na fase móvel (SOUFLEROS *et al.*, 2003). Este derivatizante não reage com aminoácidos secundários, produz derivados instáveis e que necessitam de detecção por fluorescência (SOUFLEROS *et al.*, 2003; CALLEJÓN; TRONCOSO; MORALES, 2010). A reação de derivatização é rápida, consumindo apenas alguns minutos (~2 min) para a mistura dos reagentes e homogeneização dos mesmos antes da injeção no cromatógrafo e o excesso de derivatizante não interfere na cromatografia (CALLEJÓN; TRONCOSO; MORALES, 2010).

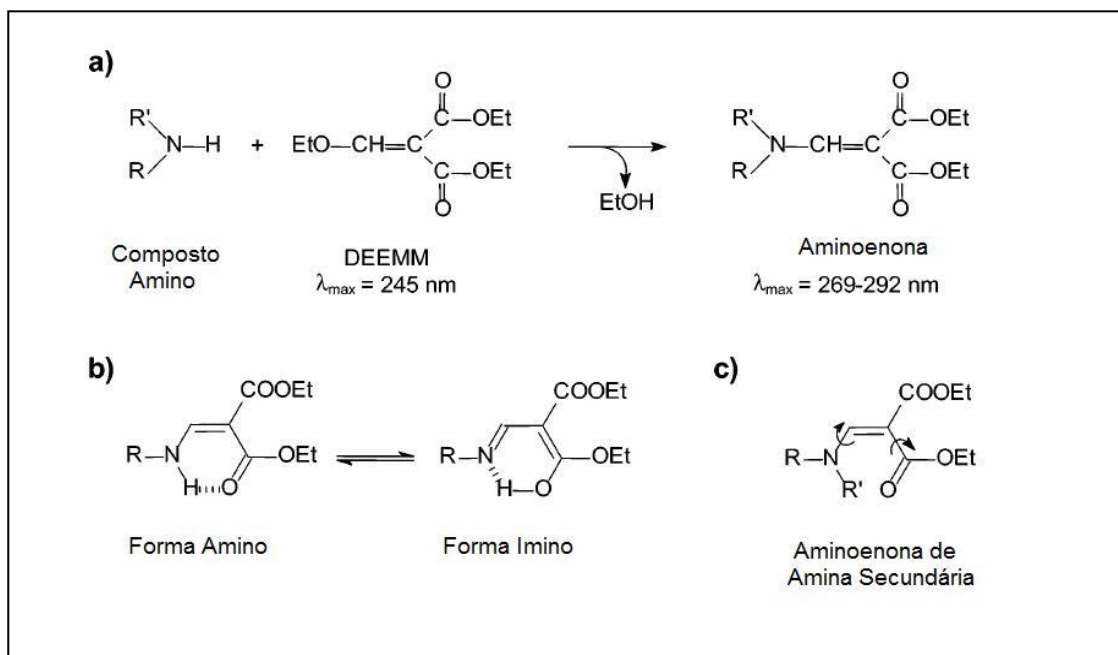
O FMOC-Cl (cloroformato de 9-fluorenilmetil) possui a vantagem de reagir tanto com aminoácidos primários quanto secundários e promover uma rápida reação de derivatização (6-10 minutos). Os compostos derivatizados se mostram estáveis e sua detecção é realizada por fluorescência (CALLEJÓN; TRONCOSO; MORALES, 2010).

Em contraste com os dois reagentes derivatizantes acima, o PITC (fenil-isotiocianato) e o DEEMM (etoximetilenomalonato de dietila) produzem compostos derivatizados que são detectados por ultravioleta ao invés de fluorescência. Ambos têm a vantagem de reagir tanto com aminoácidos primários quanto secundários e de não produzir interferentes na cromatografia por excesso de reagente. O PITC tem a vantagem de promover uma reação de derivatização mais rápida (10-20 minutos) em comparação com o DEEMM (30-50 minutos) (CALLEJÓN; TRONCOSO; MORALES, 2010). Em relação às desvantagens, o PITC não possui sensibilidade satisfatória quando em presença de elevados níveis de açúcar (HERBERT *et al.*, 2000). Já o DEEMM possui a desvantagem de produzir derivados instáveis da prolina e hidroxiprolina (GOMEZ-ALONSO; HERMOSIN-GUTIERREZ; GARCIA-ROMERO, 2007).

A reação que ocorre entre o DEEMM e o grupamento amino presente nos aminoácidos e nas aminas é uma substituição do grupo etóxi no DEEMM pelo grupo amino presente (Figura 8a). Se o grupo amino envolvido na reação é primário (R-NH₂), como ocorre na maioria dos aminoácidos e nas aminas bioativas, a

aminoenona resultante é estabilizada especialmente pela formação de uma ponte de hidrogênio entre o hidrogênio amínico livre e o oxigênio de um dos grupos carbonila do agente de derivatização (Figura 8b). Esta ponte de hidrogênio permite ao grupamento aminoenona adotar uma conformação planar que facilita o equilíbrio tautomérico amino-imino, resultando numa ligação N-C mais forte na aminoenona já que existe um certo grau de dupla ligação. No caso da prolina e da hidroxiprolina, a ponte de hidrogênio não pode ser formada na aminoenona resultante porque não há hidrogênio livre ligado ao nitrogênio. Isto porque trata-se de aminoácidos secundários. Conseqüentemente, as ligações simples (N-C e C-C) do sistema aminoenona, na ausência de características de dupla ligação, podem girar livremente (Figura 8c). Não havendo uma conformação planar, a ligação N-C é mais fraca. Sendo assim os derivados aminoenonas da prolina e da hidroxiprolina quando formados precisam ser quantificados dentro de 24 horas da reação de derivatização pois eles não são estáveis. Já as demais aminoenonas são perfeitamente estáveis (GOMEZ-ALONSO; HERMOSIN-GUTIERREZ; GARCIA-ROMERO, 2007).

FIGURA 8 - ESTRUTURA DOS DERIVADOS AMINOENONAS. A) REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO; B) DERIVADO DE AMINOÁCIDO PRIMÁRIO; C) DERIVADO DE AMINOÁCIDO SECUNDÁRIO.



FONTE: Gomez-Alonso; Hermosin-Gutierrez; Garcia-Romero (2007)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Amostras

Para a realização das análises foram coletadas 50 amostras de vinhos, das quais 30 foram oriundas do município de Colombo e, as outras 20, do município de Almirante Tamandaré, ambos no estado do Paraná. Os vinhos analisados são classificados como brancos, tintos e rosés, podendo ser do tipo suave ou seco (Tabela 1). Todos foram produzidos a partir de uvas da espécie *Vitis labrusca* variedade Terci e Niágara Branca, plantadas dentro dos limites dos municípios citados, de forma a caracterizar cada região vitivinícola. Todas as amostras de vinhos são pertencentes à safra 2009.

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE VINHO DE ACORDO COM O TIPO DE VINHO E ORIGEM GEOGRÁFICA

Municípios no Estado do Paraná					
Vinho	Colombo		Almirante Tamandaré		TOTAL
	Seco	Suave	Seco	Suave	
Tinto	11	8	8	5	32
Branco	4	5	2	4	15
Rosé	-	2	-	1	3
TOTAL	15	15	10	10	50

As cantinas rurais responsáveis pela elaboração dos vinhos analisados foram nomeadas com o uso de siglas a fim de preservar a identidade das mesmas. Desta forma, as cantinas pertencentes ao município de Colombo, foram identificadas como AA, AB, AC, AD, AE, AF, AG, AJ, AL, AM, AN e AO. Enquanto as cantinas rurais pertencentes ao município de Almirante Tamandaré foram identificadas como BA, BB, BC, BD, BE, BF, BG, BH e BI.

4.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados para as análises físico-químicas foram de grau analítico e provenientes dos fornecedores Merck, Sigma e Synth. Os solventes

utilizados para o preparo das fases móveis utilizadas nas técnicas cromatográficas foram provenientes da Merck e da Tedia, todos grau HPLC.

Os padrões de ácido málico e ácido láctico foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Foram preparadas soluções estoque de ácido málico (10 g.L^{-1}) e ácido láctico (12 g.L^{-1}), as quais foram refrigeradas e, posteriormente utilizadas para dar origem as soluções de trabalho com as concentrações da curva de calibração elaborada para cada ácido.

Os dezessete aminoácidos a serem analisados foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), sendo eles: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina e valina. Além dos aminoácidos, foi também quantificado o íon amônio, padrão também obtido da Sigma-Aldrich. Soluções estoque destes aminoácidos foram preparadas em meio contendo ácido clorídrico $0,1 \text{ M}$.

Quanto às aminas bioativas, foram utilizados padrões de putrescina, triptamina, tiramina, histamina e espermidina, todos provenientes do fornecedor Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Soluções estoque destas aminas também foram preparadas em meio contendo ácido clorídrico $0,1 \text{ M}$.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Análises Físico-Químicas

Todas as metodologias referentes às análises físico-químicas seguem a recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para Fermentados Alcoólicos (BRASIL, 2005). Os métodos que envolvem as determinações de açúcares totais, acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre total são titulométricos, enquanto o pH foi mensurado pelo método potenciométrico e o teor alcoólico determinado pelo método densimétrico. O potenciômetro utilizado pertencia ao modelo 330i, fabricado por WTW (Alemanha).

Todas as amostras foram quantificadas em triplicatas para todos os parâmetros físico-químicos e os dados foram relatados como Média \pm SD (Desvio padrão).

4.2.2 Identificação e Quantificação dos Ácidos Orgânicos por Cromatografia a Líquido

As análises cromatográficas para identificação e quantificação de ácidos orgânicos foram realizadas pelo método descrito por Zotou, Loukou e Karava (2004). Para tanto, cada amostra passou por um pré-tratamento para retirada de polifenóis e substâncias neutras que poderiam causar interferência na quantificação. Sendo assim, 10 mL de amostra foram transferidos para frasco de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 0,5 g de polivinilpirrolidona, o qual foi levado ao agitador-incubador por 15 minutos a 150 rpm. Em seguida, o conteúdo do frasco de Erlenmeyer foi transferido para um tubo de centrifuga para ser submetido à centrifugação (Bio Eng, modelo BE 6000) durante 15 minutos a 2100 x g. O sobrenadante foi removido, filtrado a 0,45 µm (PVDF, Millipore, USA) e diluído na proporção de 1:2 com água ultra-pura. Em seguida corrigiu-se o pH desta diluição para $9,0 \pm 0,5$ com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M. Paralelamente, acondicionou-se os cartuchos de extração em fase sólida (SPE-SAX, Phenomenex) com 1 mL de metanol e, depois, 1 mL de água ultra-pura. Então, adicionou-se 0,5 mL da amostra, a qual foi eluída com 1,5 mL de água ultra-pura para a retirada dos compostos neutros e com 2,5 mL de ácido clorídrico 1M para a eluição dos ácidos orgânicos. Esta última eluição foi filtrada novamente a 0,45 µm (PVDF, Millipore, USA) diretamente a um frasco analítico para encaminhamento a análise cromatográfica.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1100 (Waldbronn, Alemanha) equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1379A, injeção automática G1320A e detector de arranjo de fotodiodos G1315B.

As condições cromatográficas empregadas foram eluição isocrática com fase móvel composta por ácido fosfórico 0,02 M e metanol na proporção de 98:2 (v/v), coluna cromatográfica C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; Waters), fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e detecção dos compostos de interesse em comprimento de onda de 230 nm.

A quantificação do ácido málico e do ácido láctico foi realizada por meio da construção de curvas de calibração ($R^2 > 0,98$) com padrão externo dos ácidos de interesse, sendo que as mesmas foram compostas por seis pontos variando de 0,03 a 2,0 g.L⁻¹ e 0,03 a 2,4 g.L⁻¹, respectivamente. As amostras que apresentaram valores excedentes a curva de calibração elaborada foram submetidas a diluições apropriadas.

Todas as amostras foram quantificadas em duplicatas e todos os dados foram relatados como Média \pm SD (Desvio padrão).

4.2.3 Identificação de Aminoácidos e Aminas Bioativas

Previamente a inserção da amostra no cromatógrafo a líquido, elas foram submetidas a uma etapa de derivatização para modificar a estrutura química dos aminoácidos e das aminas, transformando-os em derivados aminoenonas.

O agente de derivatização utilizado foi o etoximetilenomalonato de dietila (DEEMM). A metodologia de derivatização foi realizada conforme Gómez-Alonso, Hermosín-Gutiérrez e Garcia-Romero (2007). Para tanto, em um tubo de vidro com tampa de rosca, 1,75 mL de tampão borato de sódio foram acrescidos a 750 μ L de metanol, em seguida 1 mL da amostra (vinho) foi adicionada a mistura. E por fim, juntou-se 30 μ L de agente derivatizante. Esta mistura foi então levada a um banho de ultrassom por 30 minutos. Após este período, permaneceu por 2 horas a 70 °C. Em seguida as amostras foram filtradas a 0,45 μ m (PVDF, Millipore, USA) diretamente a um frasco analítico para ser encaminhada ao cromatógrafo.

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Varian ProStar (Califórnia, Estados Unidos) compreendendo o módulo ProStar 240 referente a bomba e o módulo ProStar 330 referente ao detector de arranjo de fotodiodos. Para tal, foi utilizada uma coluna cromatográfica C-18 HL (ACE), de comprimento 250 x 4,6 mm e com tamanho de partículas de 5 μ m; e uma pré-coluna C-18 HL (ACE). A fase móvel utilizada foi composta por fase A: tampão acetato em pH 5,8 com 0,02% de azida sódica; e fase B: acetonitrila:metanol (80:20) com fluxo de 0,9 mL.min⁻¹. O gradiente linear para a fase móvel A seguiu o seguinte protocolo: 0 min, 90%; 20 min, 90%; 30,5 min, 83%; 33,5 min, 83%; 65 min, 60%; 73 min, 28%; 78 min, 18%; 82 min, 0%;

85 min, 0%. Foi utilizado um intervalo de 3 minutos entre as injeções para estabilizar a pressão na coluna de acordo com as condições iniciais.

A detecção foi realizada a 280 nm enquanto a quantificação dos aminoácidos e das aminas foi realizada por meio da construção de curvas de calibração interna (ácido L-aminoadípico como padrão interno) dos respectivos padrões ($R^2 > 0,95$), os quais foram submetidos ao mesmo processo de derivatização assim como as amostras. As curvas de calibração foram compostas por seis pontos variando de 0,20 a 128,0 mg.L⁻¹ e 0,20 a 60,0 mg.L⁻¹, para os aminoácidos e para as aminas, respectivamente. As amostras que apresentaram valores excedentes a curva de calibração elaborada foram submetidas a diluições apropriadas.

Os compostos presentes nas amostras foram identificados pela comparação com os tempos de retenção dos seus respectivos padrões e também por análise do perfil espectral (UV).

Todas as amostras foram quantificadas em triplicatas e todos os dados foram reportados como Média \pm SD (Desvio padrão).

4.2.4 Análise Estatística

Os gráficos Box Plot foram construídos utilizando o programa Origin 8.0. Já as análises quimiométricas de análise de componentes principais (PCA) foram realizadas com o uso do programa Matlab 7.0.1.

As análises de normalidade foram realizadas pelo teste de Kolmogorov. Para comparação entre médias obtidas, utilizou-se análise de variância (ANOVA) corrigida pelo teste Tuckey HSD (Honest Significant Difference) a um nível de significância de 99 e 95% ($p < 0,01$; $p < 0,05$).

Coefficientes de correlação foram calculados para avaliar a associação entre os parâmetros físico-químicos e a presença das aminas bioativas e, entre os conteúdos de ácidos málico e lático e o conteúdo das aminas bioativas.

As correlações de Pearson e as análises de variância foram realizadas com o Excel suplementado com o aplicativo da Action versão 1.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados das análises físico-químicas dos vinhos provenientes de Colombo e Almirante Tamandaré compreendendo açúcar total, teor alcoólico, pH, acidez total e acidez volátil estão apresentados na Tabela 2. Algumas diferenças significativas foram observadas entre os vinhos analisados para os parâmetros de acidez total, pH e dióxido de enxofre total. Diferenças estas oriundas tanto do processo de vinificação escolhido quanto da própria composição da uva no momento da colheita.

Em relação aos vinhos tintos secos, os procedentes do município de Almirante Tamandaré apresentaram um resultado para a acidez total significativamente maior que os mesmos tipos de vinhos do município de Colombo. A mesma observação foi constatada para os vinhos tintos suaves. Em ambos os casos, os maiores valores de acidez total nos vinhos do município de Almirante Tamandaré refletiram em uma média para os valores de pH menor que os do município de Colombo. No entanto, somente para os vinhos tintos suaves é que esta diminuição no pH ocorre de forma significativa.

Nota-se ainda que nos resultados apresentados para os vinhos brancos, os vinicultores do município de Almirante Tamandaré utilizaram uma menor quantidade de dióxido de enxofre nesta variedade de uvas quando comparado aos produtores do município de Colombo. Além disso, para os vinhos brancos secos daquele município, não foram encontradas quantidades detectáveis de dióxido de enxofre, acarretando assim uma diferença significativamente menor em relação ao mesmo parâmetro para o município de Colombo.

Ainda em relação aos vinhos brancos secos, verifica-se um valor significativamente maior de acidez volátil para os vinhos oriundos do município de Almirante Tamandaré. Esta observação pode ser decorrente do fato de que o pH nestes vinhos encontra-se um pouco elevado em relação aos demais, proporcionando condições mais favoráveis para o desenvolvimento de bactérias acéticas, por exemplo, um dos micro-organismos responsáveis pelo aumento da acidez volátil.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS DIFERENTES VINHOS PRODUZIDOS NOS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009

	Colombo	Almirante Tamandaré
Vinho Tinto Seco		
	Média ± SD	Média ± SD
Açúcar Total (g.L ⁻¹)	2.52 ± 0.72	2.88 ± 1,72
Teor Alcoólico (% v/v)	12.22 ± 2.02	11.75 ± 2,48
pH	3.28 ± 0.10	3.18 ± 0,16
Acidez Total (mEq.L ⁻¹)	107.24 ± 10.51 ^c	126.93 ± 15,25 ^d
Acidez Volátil (mEq.L ⁻¹)	18.06 ± 10.04	17.08 ± 7,32
Dióxido Enxofre Total (mg.L ⁻¹)	141,41 ± 134,74	206,63 ± 165,60
Vinho Tinto Suave		
Açúcar Total (g.L ⁻¹)	114.95 ± 55,08	109.90 ± 50,62
Teor Alcoólico (% v/v)	12.83 ± 2,20	11.36 ± 1,65
pH	3.29 ± 0,09 ^a	3.16 ± 0,10 ^b
Acidez Total (mEq.L ⁻¹)	101.01 ± 9,41 ^a	120.42 ± 20,85 ^b
Acidez Volátil (mEq.L ⁻¹)	18.38 ± 5,74	19.33 ± 11,70
Dióxido Enxofre Total (mg.L ⁻¹)	121,08 ± 127,36	169,80 ± 124,70
Vinho Branco Seco		
Açúcar Total (g.L ⁻¹)	1.48 ± 0,41	1.25 ± 0,01
Teor Alcoólico (% v/v)	12.27 ± 2,44	8.75 ± 0,78
pH	3.31 ± 0,13	3.40 ± 0,20
Acidez Total (mEq.L ⁻¹)	87.62 ± 19,53	86.80 ± 22,15
Acidez Volátil (mEq.L ⁻¹)	9.99 ± 3,26 ^a	18.14 ± 1,39 ^b
Dióxido Enxofre Total (mg.L ⁻¹)	351,73 ± 86,62 ^c	0,00 ^d
Vinho Branco Suave		
Açúcar Total (g.L ⁻¹)	156.83 ± 51,43	125.18 ± 17,43
Teor Alcoólico (% v/v)	10.92 ± 0,97	11.88 ± 1,62
pH	3.39 ± 0,12	3.37 ± 0,14
Acidez Total (mEq.L ⁻¹)	82.08 ± 9,25	91.55 ± 3,44
Acidez Volátil (mEq.L ⁻¹)	14.63 ± 3,93	14.23 ± 8,07
Dióxido Enxofre Total (mg.L ⁻¹)	274,53 ± 165,97	101,02 ± 123,97
Vinho Rosé Suave		
Açúcar Total (g.L ⁻¹)	191.20 ± 116,39	80,00
Teor Alcoólico (% v/v)	12.30 ± 0,71	9,75
pH	3.37 ± 0,004 ^c	3,53 ^d
Acidez Total (mEq.L ⁻¹)	89.69 ± 8,32	63,59
Acidez Volátil (mEq.L ⁻¹)	6,86 ± 3,51	14,22
Dióxido Enxofre Total (mg.L ⁻¹)	279,64 ± 197,71	471,87

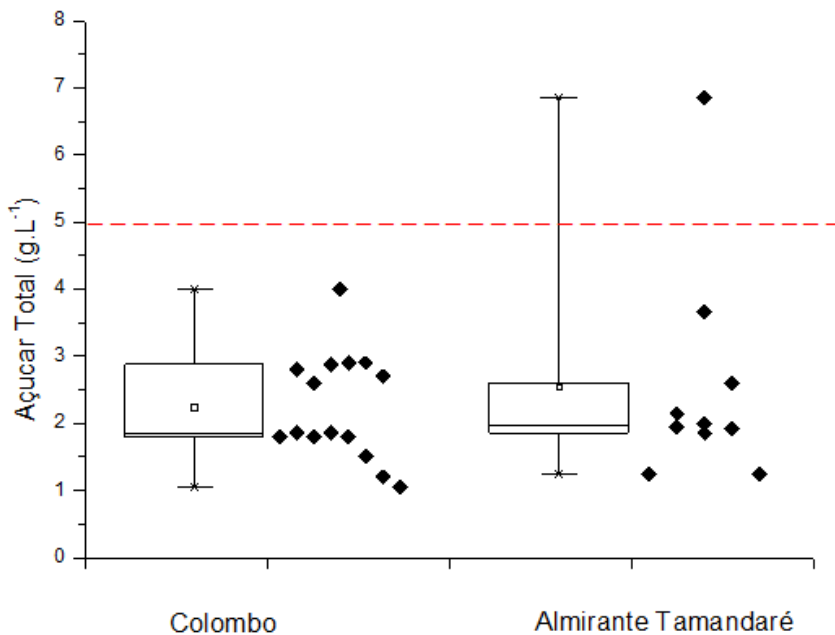
Médias com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as mesmas.
(a,b : $p < 0,05$; c,d : $p < 0,01$)

Os parâmetros físico-químicos são apresentados a seguir em gráficos do tipo Box Plot. Estes gráficos possibilitam representar a distribuição de um conjunto de dados com base em alguns parâmetros estatísticos como média, mediana e amplitude. Assim, o conjunto amostral está organizado dentro da caixa central que contém 50% das amostras e na linha vertical superior e inferior, as quais representam os outros 25% das amostras cada. Os limites destas linhas representam o valor máximo e o valor mínimo existente no conjunto amostral. A caixa central contém no seu interior um quadrado menor que representa a média das amostras e uma linha horizontal referente à mediana. À direita da representação gráfica encontram-se dispostas cada amostra (losango cheio) de acordo com o seu valor para o parâmetro em questão.

O Gráfico 1 traz as concentrações de açúcar total das amostras de vinhos secos e confirma que todos os vinhos, com exceção de uma amostra do município de Almirante Tamandaré, estão dentro dos limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que é de 5 g.L^{-1} para os vinhos secos. A única amostra que apresentou valor superior ao estabelecido foi o vinho tinto seco pertencente à cantina BE com $6,86 \text{ g.L}^{-1}$.

Todos os vinhos analisados sejam tintos ou brancos, suaves ou secos, foram chaptalizados, ou seja, houve correção da quantidade de açúcar ao mosto, caracterizando que os cultivares estudadas não possuem potencial de produção de açúcar nas regiões analisadas. A variedade de uva tinta Terceira, plantada no Rio Grande do Sul também apresenta essa mesma particularidade, sendo necessária a chaptalização (TECCHIO; MIELE; RIZZON, 2007).

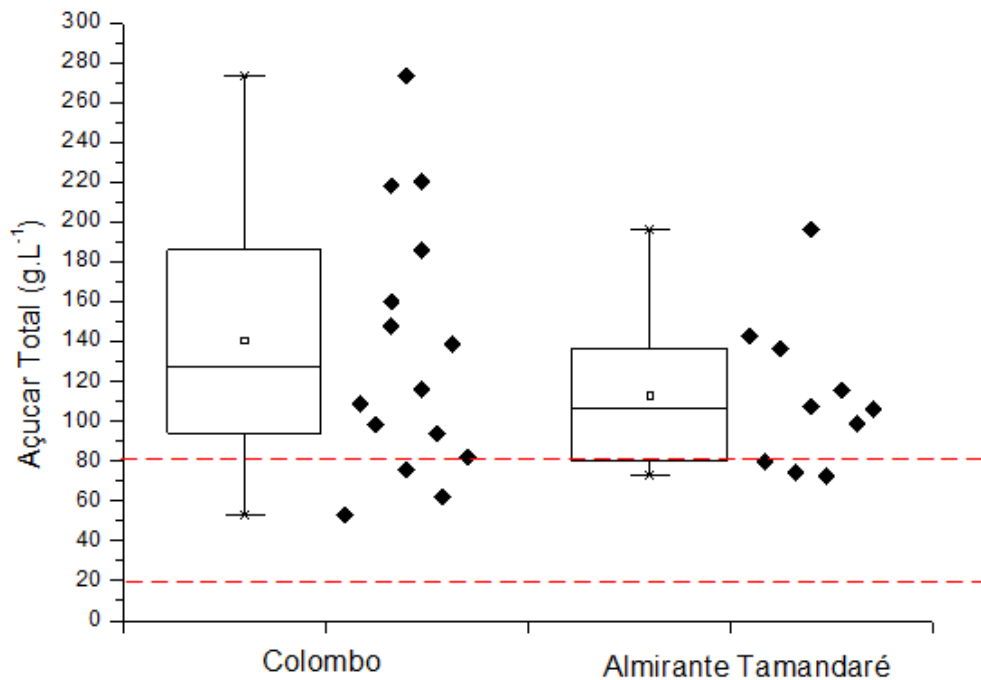
GRÁFICO 1 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR TOTAL (g.L^{-1}) NOS VINHOS SECOS DA SAFRA 2009



--- A linha tracejada indica o limite estabelecido pela Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a concentração de açúcar total em vinhos de mesa secos (BRASIL, 1988).

O Gráfico 2 apresenta as concentrações de açúcar total nos vinhos suaves analisados. Neste é possível visualizar que os vinhos de Colombo apresentaram uma média de concentração de aproximadamente 140 g.L^{-1} , enquanto os vinhos de Almirante Tamandaré apresentaram uma média de 130 g.L^{-1} . A legislação brasileira estabeleceu que os vinhos suaves devem conter concentrações acima de 20 g.L^{-1} mas não estabelecem limite máximo. Já a legislação do Mercosul por meio da Resolução nº 45 de 21 de junho de 1996 preconiza o mesmo limite inferior mas além deste, estabelece ainda um limite superior de 80 g.L^{-1} (MERCOSUL, 1996). De acordo com esta regulamentação, apenas seis dos vinhos analisados estariam dentro do exigido.

GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR TOTAL (g.L^{-1}) DOS VINHOS SUAVES NA SAFRA 2009



--- A linha vermelha tracejada indica os limites estabelecido pela Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a concentração de açúcar total em vinhos de mesa suaves (BRASIL, 1988) e pela Resolução 45 de 1996 do MERCOSUL/GMC.

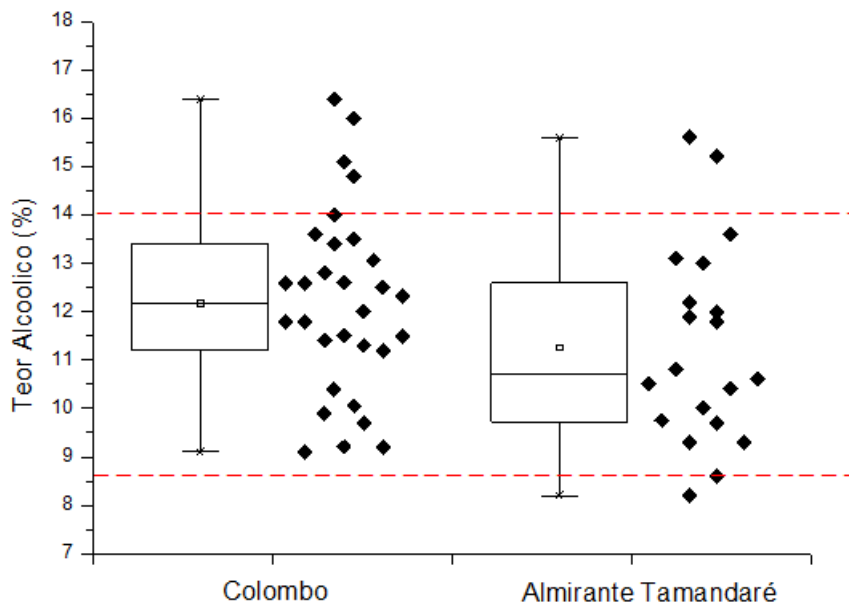
Em relação ao teor alcoólico, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio da Lei 10.970/2004 fixa os limites de 8,6 a 14% (v/v) para os vinhos brasileiros. No entanto os vinhos analisados apresentaram valores variando entre 8,2 e 16,4% (v/v), dentre os quais há um valor abaixo do limite inferior e seis valores acima do limite superior estabelecido. Vinhos de mesa com teor alcoólico inferior a 10% são mais suscetíveis a deteriorações e são considerados “sem corpo”. Vinhos com teor alcoólico elevado (superior a 14% v/v) apresentam características de excesso de etanol, como falta de sabor e ardência (OUGH; AMERINE, 1988).

O teor alcoólico apresentado pelos vinhos está diretamente relacionado com o conteúdo de açúcar fermentescível presente no suco de uva. E, como já dito anteriormente, todos os vinhos analisados passaram previamente por uma etapa de chaptalização para corrigir a quantidade de açúcar. Assim, limites inferiores de teor alcoólico podem ser resultado de uma adição de açúcar insuficiente no suco de uva.

Já os limites superiores podem ser explicados por uma adição exacerbada de açúcar. Porém uma das amostras apresentou o valor de 16,4% (v/v) de teor alcoólico, o qual não é compatível com a sobrevivência das leveduras vínicas. Isto porque linhagens de *Sacch. cerevisiae* conseguem fermentar entre 13 a 15% (v/v) de etanol, ressaltando ainda que o crescimento normalmente cessa em concentrações abaixo daquelas que inibem a fermentação (JACKSON, 2008). Desta forma, supõe-se que este teor foi alcançado por meio da adição de álcool ao vinho.

Para exemplificar esta dependência do teor alcoólico a quantidade de açúcar, o estudo de Lee *et al.* (2006) se mostra interessante. Isto porque ele avaliou parâmetros físico-químicos e sensoriais de vinhos de mesa utilizando *Vitis labrusca*, chaptalizados ou não, produzidos na Coreia do Sul, tendo em vista que as condições climáticas deste país não são muito favoráveis ao cultivo da *Vitis vinífera*. Para isto, o suco de uvas foi separado em duas partes, uma delas não recebeu adição de açúcar (15,5 °Brix) e a outra chegou a 21 °Brix com a adição de sacarose. Ao final da vinificação a primeira parte atingiu um teor alcoólico de 8% (v/v) enquanto a parte chaptalizada atingiu 11% (v/v). No trabalho de Rizzon e Miele (2005) outras formas de chaptalização além da sacarose são testadas (açúcar mascavo, mosto concentrado, álcool vínico e glicose de milho) e a composição final do vinho foi analisada. Dentre todas as substâncias avaliadas, a sacarose foi o produto mais adequado para a correção do mosto, pois não incorporou componentes estranhos e apresentou elevado rendimento alcoólico. Além disso, a interferência do açúcar mascavo foi muito negativa para a qualidade do vinho, pois atribuiu aspecto de vinho oxidado. Segundo a Lei nº 7.678 de 8 de novembro de 1988 ao mosto poderão ser adicionados apenas os corretivos sacarose, mosto concentrado e/ou álcool vínico.

GRÁFICO 3 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DO TEOR ALCOÓLICO (% v/v) DOS VINHOS PRODUZIDOS NA SAFRA 2009



--- As linhas tracejadas indicam o limite estabelecido pela Lei 10.970 de 12 de novembro de 2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o teor alcoólico em vinhos de mesa (BRASIL, 2004).

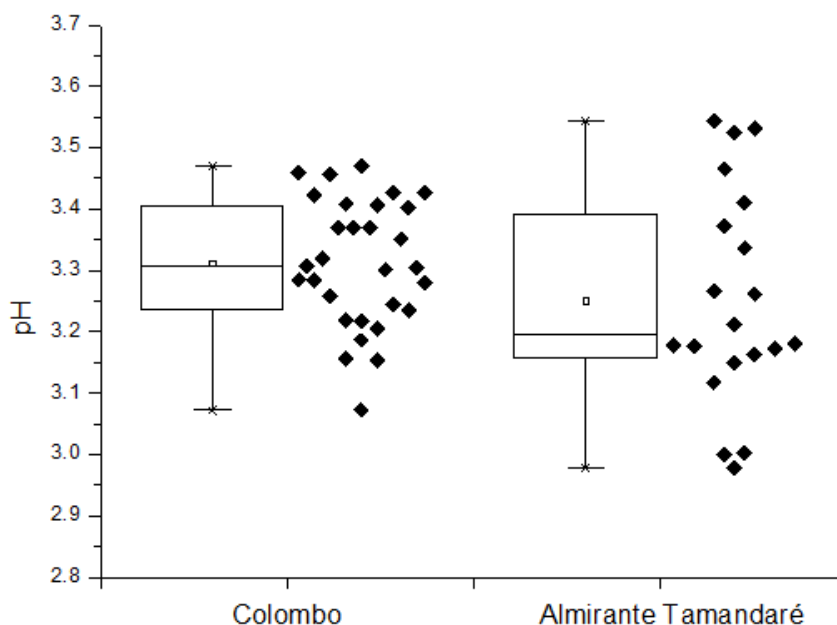
A acidez do mosto e do vinho pode ser avaliada por meio da acidez titulável, da concentração dos ácidos orgânicos e da acidez real (expressa pelo pH). O pH do vinho depende do tipo e da concentração dos ácidos orgânicos, e da concentração de cátions, especialmente o potássio (RIZZON; MIELE, 2002). A representação em box plot dos valores de pH dos vinhos analisados (Gráfico 4) distribui as amostras entre 2,9780 e 3,5440. Tecchio, Miele e Rizzon (2007) trabalharam com uvas Bordô da região de Flores da Cunha, Rio Grande do Sul, e encontraram valores de pH variando entre 3,04 e 3,48. Vinhos coreanos produzidos com uvas da variedade *Vitis labrusca* também apresentaram valores de pH baixos, com média de 3,20 (LEE *et al.*, 2006).

Em relação aos valores de pH para vinhos finos, Del Prete *et al.* (2009) relataram uma variação entre 3,12 e 3,71 para vinhos italianos, enquanto Souza *et al.* (2005) relataram valores mais elevados para vinhos finos brasileiros, entre 3,80 e 4,07.

Valores de acidez total elevados e baixos de pH parece ser uma característica dos cultivares *Vitis labrusca*. Segundo Rizzon, Miele e Meneguzzo (2000), a variedade Isabel que, assim como a Terci, é um cultivar da espécie *Vitis labrusca* apresenta características que não favorecem o aumento de pH na vinificação devido ao tamanho da baga, relação película/polpa e teor de potássio do mosto.

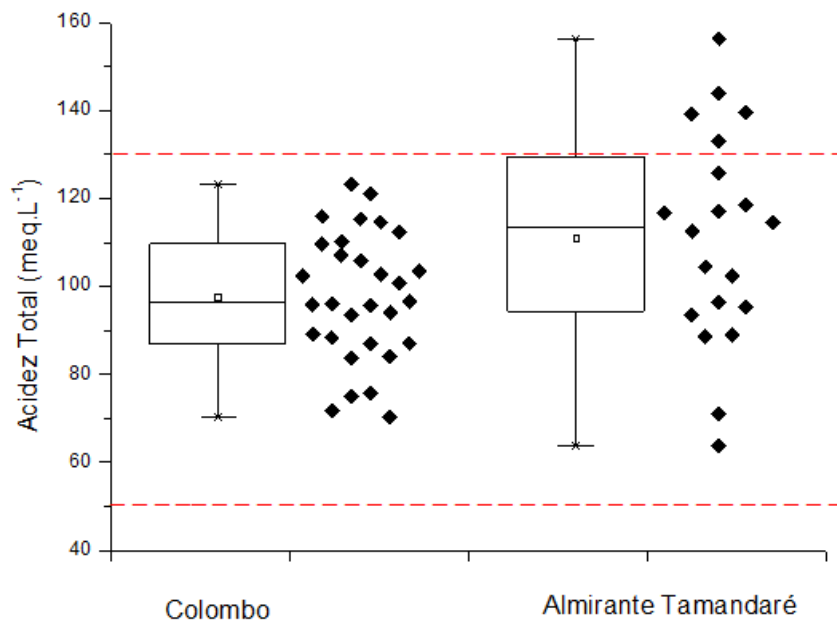
O pH é uma das características mais importantes nos vinhos tintos, pois interfere na cor e no gosto do produto. Além disso, vinhos com pH elevado ($\text{pH} \geq 3,9$) são mais susceptíveis a sofrer alterações oxidativas, isto porque compostos fenólicos na forma ionizada se oxidam mais facilmente que a forma não ionizada. E ainda, valores de pH elevados conduzem a menor estabilidade da coloração vermelha associada as antocianinas e a maior susceptibilidade a contaminação microbiana (RIZZON; MIELE, 2002; JACKSON, 2008). Sendo assim, todos os vinhos analisados se encontram em uma faixa de pH baixa, fato que os fornece uma maior estabilidade química e biológica.

GRÁFICO 4 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DOS VALORES DE pH DOS VINHOS PRODUZIDOS NA SAFRA 2009



A acidez total nos vinhos é composta pela acidez volátil e fixa. A primeira se refere àqueles ácidos que podem ser removidos facilmente por destilação, enquanto a acidez fixa está relacionada com ácidos pouco voláteis. Os ácidos acético, fórmico e propiônico são exemplos dos ácidos que compõem a acidez volátil. Já os ácidos málico, tartárico e cítrico compõem a categoria dos ácidos fixos (JACKSON, 2008). No Gráfico 5 estão representados os resultados de acidez total (acidez fixa e acidez volátil) dos vinhos analisados. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento os limites recomendados para a acidez total nos vinhos ficam estabelecidos entre 55 e 130 mEq.L⁻¹. Sendo assim, apenas quatro amostras do município de Almirante Tamandaré apresentaram valores acima do recomendado. Verifica-se na Tabela 2 que os vinhos tintos (tanto suaves quanto secos) de ambos os municípios apresentam valores de acidez total acima do encontrado por outros estudos. Um trabalho conduzido com a mesma variedade de uva tinta que a da presente pesquisa (Terci ou Bordô), caracterizou a safra de 2005 do município de Flores da Cunha, Rio Grande do Sul, como apresentando uma acidez pronunciada (média de 91 mEq.L⁻¹), mesmo em condições climáticas favoráveis a maturação da uva, caracterizando então a alta acidez, particularidade dos cultivares americanos (TECCHIO; MIELE; RIZZON, 2007). E ainda, Souza *et al.* (2005) encontraram concentrações variando entre 67,7 a 85,3 mEq.L⁻¹ para vinhos finos oriundos do município de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul.

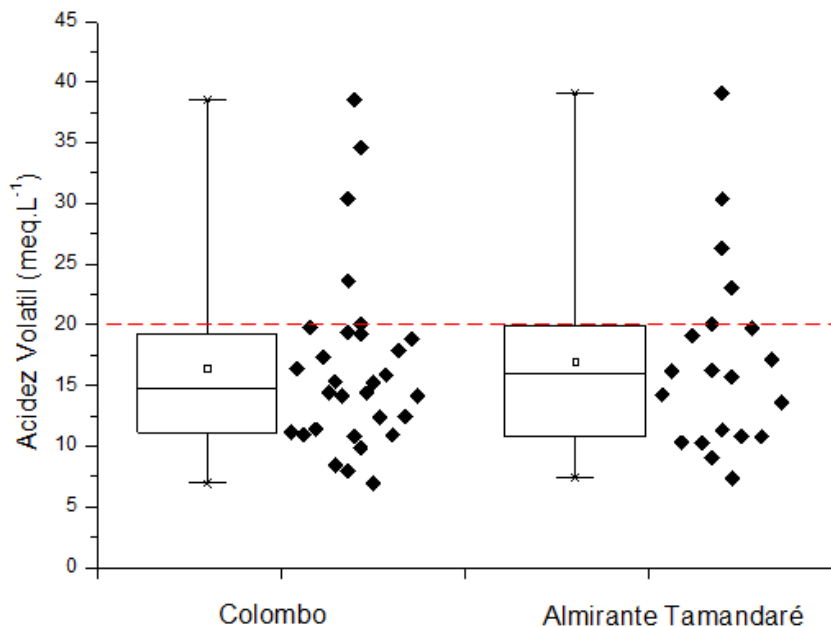
GRÁFICO 5 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DOS VALORES DE ACIDEZ TOTAL (mEq.L^{-1}) NOS VINHOS DA SAFRA 2009



--- As linhas tracejadas indicam o limite estabelecido pela Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a concentração de acidez total em vinhos de mesa (BRASIL, 1988).

Os ácidos voláteis são compostos comuns na composição dos vinhos, no entanto eles aparecem em níveis mais pronunciados em vinhos expostos a deterioração microbiana, como por exemplo, por bactérias acéticas e lácticas. Além disso, sua presença pode estar associada ao precário estado sanitário das uvas utilizadas no processo de vinificação. Portanto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece que o limite máximo de acidez volátil nos vinhos esteja em 20 mEq.L^{-1} . Assim, pelo Gráfico 6 percebe-se que 22,2 % dos vinhos analisados apresentam valores acima do preconizado por legislação. É interessante notar ainda que os vinhos que excederam o limite neste parâmetro também apresentaram os maiores valores de pH dentro do conjunto amostral. E, maiores valores de pH aumentam o número e a variedade dos micro-organismos que se desenvolvem no vinho e, conseqüentemente, cresce o risco do desenvolvimento de espécies não desejáveis que possam diminuir a qualidade do vinho (LONVAUD-FUNEL, ALINE, 2001).

GRÁFICO 6 - REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DOS VALORES DE ACIDEZ VOLÁTIL (mEq.L^{-1}) DOS VINHOS PRODUZIDOS NA SAFRA 2009



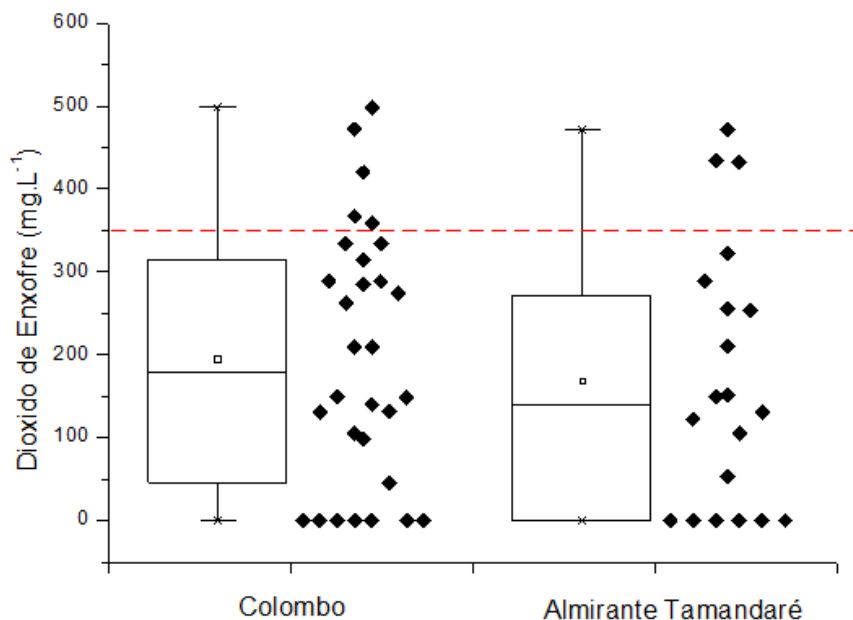
--- A linha tracejada indica o limite estabelecido pela Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a concentração de acidez volátil em vinhos de mesa (BRASIL, 1988).

O dióxido de enxofre é geralmente adicionado aos vinhos na forma de metabissulfito de potássio que é uma substância usada como desinfetante para reduzir a proliferação de bactérias não desejáveis ao processo de vinificação. No entanto, muitos vinicultores relutam em adicionar qualquer composto de origem química no seu processo e, os que aceitam esta adição, se mostram confusos quanto ao cálculo da quantidade correta a ser acrescentada. Estas dificuldades são evidenciadas nos resultados do gráfico 7, no qual 13 vinhos não apresentaram quantidades detectáveis de dióxido de enxofre pela metodologia utilizada (sendo graficamente representados na linha do zero da escala), provavelmente devido ao não uso do metabissulfito de potássio. Por outro lado, oito vinhos apresentaram valores acima do limite de 350 mg.L^{-1} estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, evidenciando a adição de quantidade equivocada de metabissulfito de potássio ao processo.

Em relação à toxicidade do dióxido de enxofre composto, o consumo de 400 mg deste composto ao dia por pessoas saudáveis não apresenta efeitos adversos. Isto porque, pessoas normais rapidamente convertem os sulfitos a

sulfatos, eliminando-os pela urina. No entanto, em pessoas sensíveis, o dióxido de enxofre gasoso pode provocar ataques de asma. Contudo, a maioria dos vinhos não apresenta quantidade suficiente de dióxido de enxofre molecular para induzir a um ataque asmático. Porém, os limites para a presença deste composto devem ser respeitados, pois para uma pequena parcela dos asmáticos, qualquer forma de dióxido de enxofre é potencialmente alergênica (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

GRÁFICO 7 – REPRESENTAÇÃO EM BOX PLOT DOS VALORES DE DIÓXIDO DE ENXOFRE (mg DE DIÓXIDO DE ENXOFRE.L⁻¹) DOS VINHOS PRODUZIDOS NA SAFRA 2009



--- A linha tracejada indica o limite estabelecido pela Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a concentração de acidez volátil em vinhos de mesa (BRASIL, 1988).

5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os resultados da quantificação de ácidos orgânicos, particularmente o ácido málico e o láctico estão representados na Tabela 3 a 6. A transformação do ácido málico (diácido) em ácido láctico (monoácido) influencia a qualidade e o sabor dos vinhos (MATAIX; LUQUE DE CASTRO, 2001; da SILVA, 2003). O ácido málico é oriundo da própria uva, enquanto o ácido láctico é produzido em quantidades significativas durante o processo de vinificação (PERES *et al.*, 2009). Os resultados

apresentados variam amplamente entre os tipos de vinhos estudados (suaves e secos) e também dentro de cada classe (brancos, tintos e rosés). Isto pode ser explicado pela variedade da uva e pela diferença entre os processos de vinificação.

De acordo com Rizzon, Zanuz e Miele (1997) as variedades de uva americanas, em especial a Isabel, geralmente apresentam baixos valores de ácido málico e de dióxido de enxofre em comparação aos vinhos finos (cultivar Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon) e, portanto, a fermentação maloláctica tende a acontecer logo após a fermentação alcoólica de forma espontânea. Isto foi verificado no presente trabalho com as variedades americanas Terci e Niágara Branca, onde todos os vinhos iniciam a fermentação maloláctica, mas apenas 50% deles completam-na. Nestes, os níveis de ácido málico foram inferiores a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, demonstrando que praticamente todo ele foi transformado em ácido láctico por ação das bactérias lácticas. Lee *et al.* (2006) encontraram uma média de $1,86 \text{ g.L}^{-1}$ para o ácido málico em vinhos coreanos comuns (*Vitis labrusca*) e de $0,48 \text{ g.L}^{-1}$ para o ácido láctico, demonstrando que não houve a fermentação maloláctica nestes vinhos.

Devido à ocorrência da fermentação maloláctica, seja de forma completa ou incompleta, as médias das concentrações de ácido láctico em todos os grupos apresentados nas Tabelas 3 a 6 se mostraram sempre superior às concentrações de ácido málico. Além disso, não foi observada diferença significativa entre as concentrações de ácido málico entre os vinhos tintos, brancos e rosés dentro de um mesmo município, bem como não houve diferença para as concentrações de ácido láctico. Isto demonstra que a variedade da uva e/ou a técnica de vinificação empregada não são suficientes para causar variação significativa nos vinhos produzidos quanto aos ácidos orgânicos em questão.

Peres *et al.* (2009) analisaram 23 vinhos finos brasileiros e verificaram que em 18 não foi possível detectar ácido málico devido a fermentação maloláctica ter se completado. Já em relação à presença de ácido láctico, os vinhos tintos variaram de $0,035$ a $7,3 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto os vinhos brancos variaram de $0,061$ a $3,9 \text{ g.L}^{-1}$. No presente estudo, a maior variação em relação ao ácido láctico se deu entre os vinhos brancos que foi de $1,94$ a $4,71 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto os vinhos tintos variaram entre $1,75$ a $2,75 \text{ g.L}^{-1}$.

Do ponto de vista gustativo, segundo Lonvaud-Funel (2001) citado por Manfroi (2002), a transformação do ácido málico em láctico é mais relevante

qualitativa que quantitativamente. Sendo assim, mais importante que ter completado a fermentação maloláctica é tê-la iniciado, pois a transformação de alguns gramas de ácido málico já é capaz de apresentar benefícios ao vinho do ponto de vista gustativo (MANFROI, 2002). Desta forma, todos os vinhos aqui analisados conseguiram diminuir em alguma extensão a acidez sentida no momento da apreciação do produto final.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS MÁLICO (g.L^{-1}) E LÁTICO (g.L^{-1}) EM AMOSTRAS DE VINHOS SECOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE COLOMBO NA SAFRA 2009

Composto	Vinhos Tintos Secos ($n^*= 11$)				Vinhos Brancos Secos ($n^*= 4$)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Ácido Málico	0,62	0,49	0,05	1,39	0,92	0,76	0,21	1,93
Ácido Lático	2,75	1,34	0,68	4,65	2,08	0,61	1,60	2,95

Médias não diferiram de forma significativa (Teste de Tukey, $p<0,05$ e $p<0,01$)

TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS MÁLICO (g.L^{-1}) E LÁTICO (g.L^{-1}) EM AMOSTRAS DE VINHOS SECOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009

Composto	Vinhos Tintos Secos ($n^*= 8$)				Vinhos Brancos Secos ($n^*= 2$)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Ácido Málico	1,31	1,41	0,05	3,81	0,13	0,01	0,12	0,14
Ácido Lático	1,75	1,24	0,32	3,45	4,71	3,07	2,54	6,88

Médias não diferiram de forma significativa (Teste de Tukey, $p<0,05$, $p<0,01$)

TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS MÁLICO (g.L⁻¹) E LÁTICO (g.L⁻¹) EM AMOSTRAS DE VINHOS SUAVES PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE COLOMBO NA SAFRA 2009

Composto	Vinhos Tintos Suaves (n* = 8)				Vinhos Brancos Suaves (n* = 4)				Vinhos Rosés Suaves (n* = 2)			
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Ácido Málico	0,75	0,62	0,14	1,94	0,89	0,96	0,07	2,40	1,22	1,61	0,09	2,36
Ácido Lático	2,21	1,35	0,49	4,42	1,94	0,66	1,30	2,65	2,04	0,42	1,74	2,34

Médias não diferiram de forma significativa (Teste de Tukey, p<0,05, p<0,01)

TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS MÁLICO (g.L⁻¹) E LÁTICO (g.L⁻¹) EM AMOSTRAS DE VINHOS SUAVES PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009

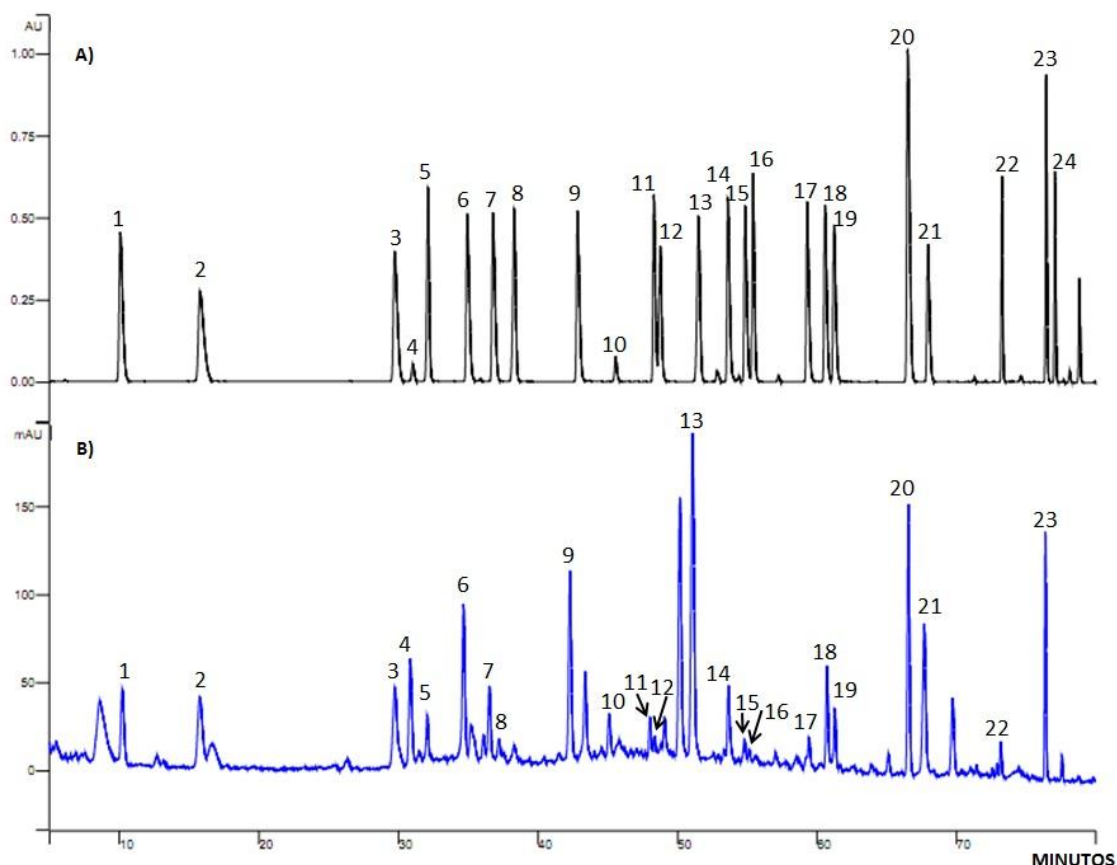
Composto	Vinhos Tintos Suaves (n* = 5)				Vinhos Brancos Suaves (n* = 4)				Vinhos Rosés Suaves (n* = 1)			
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Ácido Málico	1,07	0,99	0,10	2,52	0,50	0,33	0,29	0,99	0,88	-	-	-
Ácido Lático	2,15	1,28	1,12	4,14	3,46	1,81	1,49	5,75	1,95	-	-	-

Médias não diferiram de forma significativa (Teste de Tukey, p<0,05, p<0,01)

5.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE AMINOÁCIDOS E AMINAS BIOATIVAS

O vinho, assim como outros alimentos fermentados, é um substrato ideal para a formação das aminas em virtude do seu conteúdo protéico e aminoacídico aliado a condições favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos e a atividade de enzimas descarboxilases (SILLA-SANTOS, 1996; MARTÍN-ÁLVAREZ *et al.*, 2006). A Figura 9 traz dois cromatogramas resultantes, respectivamente, de uma corrida cromatográfica referente a uma solução padrão contendo as 24 substâncias pesquisadas e outra corrida cromatográfica referente à amostra AO1 proveniente do município de Colombo.

FIGURA 9 – CROMATOGRAMA REFERENTE À ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS E AMINAS BIOATIVAS SIMULTANEAMENTE. A) PADRÕES ; B) AMOSTRA DE VINHO



1: ácido aspártico; 2: ácido glutâmico; 3: serina; 4: padrão interno; 5: histidina; 6: glicina; 7: treonina; 8: arginina; 9: alanina; 10: prolina; 11: tirosina; 12: histamina; 13: íon amônio; 14: valina; 15: metionina; 16: cisteína; 17: isoleucina; 18: leucina; 19: fenilalanina; 20: lisina; 21: espermidina; 22: tiramina; 23: putrescina; 24: triptamina.

As Tabelas 7 a 11 apresentam os resultados da determinação dos aminoácidos e das amins bioativas quantificadas por cromatografia a líquido em fase reversa. Em todas elas é possível notar, para alguns compostos, um desvio padrão elevado proveniente das diferenças existentes na composição dos vinhos analisados e também devido às práticas de viticultura e vinificação escolhidas por cada cantina rural.

Ao analisar o perfil aminoacídico, nota-se que o aminoácido mais abundante nos vinhos de ambos os municípios é a prolina, seguido da alanina. A exceção recai para os vinhos brancos suaves de Colombo (Tabela 9), os quais apresentam uma inversão dos aminoácidos majoritários, sendo a alanina o aminoácido que aparece em maior concentração seguido da prolina. Além disso, foi percebido mais uma divergência em relação ao segundo aminoácido mais prevalente, que para os vinhos rosés suaves de Colombo (Tabela 11) é a serina ao invés da alanina. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Gómez-Alonso, Hermosín-Gutiérrez e Garcia-Romero (2007) que demonstraram ser a prolina o aminoácido majoritário nos vinhos espanhóis oriundos da região de Castilla-La Mancha.

TABELA 7 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS SECOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE COLOMBO NA SAFRA 2009

Composto	Vinhos Tintos Secos (n*=11)				Vinhos Brancos Secos (n*= 4)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Asp	13,47	8,35	4,60	33,50	12,71	8,05	1,15	19,73
Glu	22,84	20,00	6,18	64,17	32,55	20,44	2,62	47,33
Ser	9,88	6,93	1,40	23,89	18,56	10,93	4,20	30,41
His	4,60	2,39	2,47	9,08	4,07	2,43	0,72	5,96
Gly	9,62	6,08	1,89	18,89	11,65	6,07	3,66	17,67
Thr	8,76	5,32	1,89	17,18	11,79	6,92	1,91	17,14
Arg	6,70 ^a	5,68	1,42	21,12	21,00 ^b	17,05	3,03	40,88
Ala	23,93 ^a	26,71	1,32	95,44	111,12 ^b	100,24	5,38	208,67
Pro	91,15	51,61	23,59	190,72	132,55	56,32	51,54	181,52
Tyr	8,71	4,64	3,66	19,87	13,51	7,89	2,02	19,62
Íon	19,10	15,79	2,19	55,21	37,72	26,38	3,85	68,12
Val	7,58	4,00	2,47	13,23	10,97	6,46	1,85	17,12
Met	5,27	1,90	1,45	8,27	5,32	2,82	1,21	7,62
Cys	2,40	1,56	0,44	5,39	1,33	0,70	0,31	1,83
Ile	4,73	2,82	0,66	9,85	5,64	3,90	1,08	10,49
Leu	8,74	4,50	1,19	14,67	12,46	7,87	3,43	22,44
Phe	9,43 ^a	3,93	2,12	13,46	20,44 ^b	14,99	2,01	38,35
Lys	10,73	6,80	0,19	21,97	18,81	11,68	4,07	31,64
TOTAL	272,92				496,68			
Histamina	2,97	1,86	n,d	6,65	1,94	1,03	0,55	3,04
Espermidina	1,25	0,71	n,d	2,41	1,65	1,02	0,57	2,98
Tiramina	3,76	4,16	n,d	10,41	2,72	1,18	0,98	3,61
Putrescina	13,41	16,54	n,d	45,44	1,17	0,26	0,83	1,42
Triptamina	2,72	3,49	n,d	7,94	n,d	-	-	-
TOTAL	24,10				7,48			

*Médias com letras diferentes na mesma linha diferem de forma significativa (a, b : $p < 0,05$; c, d : $p < 0,01$)

** n.d: quantidade não detectável

TABELA 8 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS SECOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009

Composto	Vinhos Tintos Secos (n*=8)				Vinhos Brancos Secos (n*= 2)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Asp	13,87	14,40	3,33	41,66	17,48	15,93	6,22	28,74
Glu	13,25	21,26	0,73	63,87	29,79	29,32	9,05	50,52
Ser	6,02	4,06	1,35	12,12	16,22	12,36	7,48	24,97
His	3,10	2,69	0,78	9,30	3,92	1,42	2,91	4,92
Gly	9,34	11,42	1,33	36,60	12,73	8,93	6,41	19,04
Thr	8,24	6,65	3,06	22,99	11,86	7,39	6,64	17,08
Arg	9,04	12,29	1,56	35,96	3,99	3,23	1,70	6,27
Ala	14,36	18,59	1,57	58,67	33,29	30,05	12,04	54,54
Pro	78,18	65,54	14,28	212,17	124,07	97,30	55,27	192,88
Tyr	10,14	8,79	3,33	29,46	7,44	1,31	6,51	8,37
Íon	29,28	46,82	2,06	138,66	25,41	18,49	12,34	38,48
Val	5,75	5,19	1,40	16,96	12,67	7,44	7,41	17,93
Met	4,64	2,91	2,07	11,20	6,81	4,05	3,94	9,67
Cys	1,88	0,77	0,48	2,99	1,82	0,78	1,27	2,37
Ile	3,81	3,26	0,83	10,86	9,20	4,20	6,23	12,17
Leu	6,64	6,46	0,75	20,43	20,78	15,51	9,81	31,74
Phe	6,61	6,50	0,31	20,62	16,99	13,39	7,52	26,46
Lys	9,28	11,95	0,33	36,13	24,54	18,98	11,12	37,96
TOTAL	236,34				391,30			
Histamina	4,65	3,86	1,43	11,80	2,94	3,43	0,52	5,36
Espermidina	1,95	1,83	n,d	4,58	1,82	1,81	0,54	3,10
Tiramina	1,94 ^a	2,60	n,d	6,50	7,67 ^b	7,28	2,52	12,82
Putrescina	5,81	12,54	0,47	36,79	19,27	25,11	1,51	37,03
Triptamina	1,29	-	n,d	1,29	n,d	-	n,d	n,d
TOTAL	15,63				31,69			

*Médias com letras diferentes na mesma linha diferem de forma significativa (a, b : $p < 0,05$; c, d : $p < 0,01$)

** n.d: quantidade não detectável

TABELA 9 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS SUAVES PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE COLOMBO NA SAFRA 2009

Composto	Vinhos Tintos Suaves (n*=8)				Vinhos Brancos Suaves (n*= 5)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Asp	6,75	6,11	6,41	5,28	8,10	5,34	0,84	13,41
Glu	12,97	10,66	1,14	30,81	16,88	15,37	1,97	35,29
Ser	7,92	6,03	1,76	19,04	9,73	5,98	2,02	15,41
His	4,20	3,05	0,85	10,02	3,68	2,33	1,55	6,70
Gly	10,44	9,92	1,95	30,48	7,92	4,23	4,43	13,12
Thr	7,69	5,79	1,62	18,54	6,37	5,31	0,82	12,39
Arg	6,93	5,04	1,32	14,08	21,48	21,97	2,01	50,12
Ala	19,50	17,42	2,75	44,00	34,51	31,87	6,39	73,16
Pro	48,85	26,18	25,00	103,23	23,38	19,02	10,59	51,68
Tyr	7,57	4,10	1,89	13,04	8,94	6,42	2,37	16,48
Íon	8,57	6,99	1,69	20,82	15,34	13,14	1,64	28,72
Val	7,19	4,42	1,94	13,96	6,26	4,71	1,62	12,02
Met	6,68	3,65	1,92	14,01	3,52	3,53	0,91	8,73
Cys	2,76	1,54	0,62	5,56	1,75	0,78	0,75	2,48
Ile	4,02	3,12	0,35	9,47	3,94	3,53	0,41	8,75
Leu	7,14	4,83	0,67	13,57	11,20	9,85	0,99	24,61
Phe	3,68	3,89	0,45	11,29	2,09	1,98	0,75	5,01
Lys	7,62	7,43	0,31	20,82	15,33	14,31	1,30	34,97
TOTAL	180,49				200,40			
Histamina	2,20	1,13	0,82	4,00	1,32	1,01	0,45	2,38
Espermidina	1,52	0,93	n,d	2,62	1,58	1,59	n,d	3,91
Tiramina	3,46	4,02	n,d	9,98	2,33	2,51	n,d	5,20
Putrescina	7,74	9,60	0,73	28,06	1,05	0,23	n,d	1,25
Triptamina	0,94	0,38	n,d	1,21	0,18	-	n,d	0,18
TOTAL	15,87				6,46			

*Médias com letras diferentes na mesma linha diferem de forma significativa

(a, b : $p < 0,05$; c, d : $p < 0,01$)

** n.d: quantidade não detectável

TABELA 10 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS SUAVES PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DO MUNICÍPIO DE ALMIRANTE TAMANDARÉ NA SAFRA 2009

Composto	Vinhos Tintos Suaves (n*=5)				Vinhos Brancos Suaves (n*= 4)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Asp	11,75	11,36	2,68	28,05	10,45	3,28	6,72	12,90
Glu	14,77	17,43	2,21	40,11	14,69	7,64	8,21	23,12
Ser	10,80	9,23	0,82	23,32	6,60	3,27	3,35	10,92
His	6,20	5,54	0,99	13,91	3,08	0,73	2,24	3,74
Gly	9,13	6,68	1,60	17,48	9,13	5,75	2,92	16,76
Thr	8,03	7,21	2,62	19,31	4,82	2,72	2,44	8,73
Arg	7,97	8,43	0,81	21,82	5,56	1,66	3,54	7,41
Ala	19,83	23,34	1,76	59,29	29,57	30,08	5,43	73,52
Pro	41,68	30,66	19,84	94,62	63,37	63,37	11,57	153,04
Tyr	10,47	8,82	1,34	21,90	6,36	2,99	2,79	9,72
Íon	10,75	9,43	1,87	24,14	9,58	6,45	4,42	18,82
Val	7,55	6,40	1,45	15,18	4,78	2,41	2,01	7,62
Met	5,48	3,15	2,16	9,74	1,98	0,58	1,15	2,44
Cys	3,15	2,76	1,04	7,92	1,51	0,81	0,58	2,42
Ile	4,67	5,06	0,32	12,33	2,82	1,39	0,89	4,19
Leu	7,29	6,79	0,78	14,66	5,35	2,43	1,73	6,90
Phe	2,44	1,07	0,92	3,64	1,17	0,44	0,53	1,54
Lys	9,86	9,80	0,40	21,28	9,77	5,81	2,31	16,19
TOTAL	191,81				190,59			
Histamina	2,63 ^c	0,89	1,24	3,34	0,82 ^d	0,33	0,33	1,03
Espermidina	2,83	0,91	n,d	4,09	0,84	0,35	0,33	1,13
Tiramina	1,11	0,20	n,d	1,28	1,01	0,46	n,d	1,34
Putrescina	5,29	6,41	n,d	14,86	1,90	1,11	0,26	2,64
Triptamina	n,d	-	n,d	n,d	n,d	-	n,d	n,d
TOTAL	11,86				4,58			

*Médias com letras diferentes na mesma linha diferem de forma significativa (a, b : $p < 0,05$; c, d : $p < 0,01$)

** n.d: quantidade não detectável

TABELA 11 – CONCENTRAÇÕES EM mg.L⁻¹ DE AMINOÁCIDOS, ÍON AMÔNIO E AMINAS EM VINHOS ROSÉS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DOS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ

Composto	Colombo (n*=2)				Almirante Tamandaré (n*= 1)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Asp	4,72	-	n,d	4,72	2,91	-	-	-
Glu	5,79	-	n,d	5,79	7,87	-	-	-
Ser	8,28	2,10	6,79	9,77	5,70	-	-	-
His	1,35	1,21	0,49	2,21	4,00	-	-	-
Gly	2,61	2,49	0,84	4,37	6,84	-	-	-
Thr	2,54	1,32	1,61	3,48	4,20	-	-	-
Arg	6,15	6,69	1,42	10,88	5,79	-	-	-
Ala	5,59	6,85	0,75	10,44	14,97	-	-	-
Pro	21,98	15,11	11,30	32,66	70,70	-	-	-
Tyr	3,43	3,00	1,31	5,56	3,54	-	-	-
Íon	3,76	2,72	1,84	5,68	10,65	-	-	-
Val	2,35	2,02	0,92	3,78	4,04	-	-	-
Met	2,05	1,75	0,81	3,29	2,11	-	-	-
Cys	1,18	-	n,d	1,18	1,04	-	-	-
Ile	1,55	1,56	0,45	2,65	2,56	-	-	-
Leu	4,02	4,98	0,50	7,54	6,02	-	-	-
Phe	0,11	-	n,d	0,11	0,49	-	-	-
Lys	5,16	6,92	0,26	10,05	7,55	-	-	-
TOTAL	82,63				160,97			
Histamina	1,09	0,13	1,00	1,18	1,84	-	-	-
Espermidina	n,d	-	n,d	n,d	0,29	-	-	-
Tiramina	0,76	-	n,d	0,76	2,26	-	-	-
Putrescina	1,41	-	n,d	1,41	16,80	-	-	-
Triptamina	n,d	-	n,d	n,d	n,d	-	-	-
TOTAL	3,28				21,20			

*Médias com letras diferentes na mesma linha diferem de forma significativa (a, b : $p < 0,05$; c, d : $p < 0,01$)

** n.d: quantidade não detectável

A maior presença da prolina e da alanina na composição final dos vinhos analisados é coerente devido ao baixo consumo destes aminoácidos pelos micro-organismos que participam do processo fermentativo. Os resultados de Cejudo-Bastante *et al.* (2010) também revelaram um acúmulo de prolina durante o processo de vinificação devido a excreção de prolina nos vinhos somado ao fato da prolina não ser consumida sob condições anaeróbicas e se acumular devido ao metabolismo da arginina (do qual é um metabólito). Além disso, a alanina só é consumida quando os aminoácidos de fácil assimilação já se exauriram do meio (exemplos: arginina, glutamina, histidina e leucina) (BARRADO; RODRIGUEZ; CASTRILLEJO, 2009; CEJUDO-BASTANTE *et al.*, 2010)

O íon amônio e os aminoácidos de fácil assimilação, principalmente a arginina, constituem as principais fontes de nitrogênio para a levedura *Sacch. cerevisiae* (GARDE-CERDÁN *et al.*, 2009). Durante a fermentação, o transporte de outros aminoácidos não preferidos através da membrana plasmática é regulado por GAP1, uma permease geral de aminoácidos, a qual se encontra reprimida quando o íon amônio está presente no mosto (SALMON; BARRE, 1998).

Quando o mosto se encontra pobre nestes compostos é prática rotineira nas vinícolas, acrescentar sais de amônio para atingir uma concentração de 140 mg de nitrogênio.L⁻¹ que favorece o andamento da fermentação alcoólica (GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008). Assim, tendo em vista a importância da quantificação do íon amônio para o sucesso da fermentação, a escolha da metodologia simultânea de análise de aminoácidos e aminas com o agente derivatizante DEEMM se deu em função da capacidade da mesma em também determinar com sensibilidade comprovada este composto (GOMEZ-ALONSO; HERMOSIN-GUTIERREZ; GARCIA-ROMERO, 2007).

Os conteúdos de íon amônio nos vinhos analisados (Colombo e Almirante Tamandaré) variaram de 8,57 a 29,28 mg.L⁻¹ entre os vinhos tintos e de 9,58 a 37,72 mg.L⁻¹ entre os vinhos brancos. Gómez-Alonso, Herмосín-Gutiérrez e Garcia-Romero (2007) encontraram 10,29 mg.L⁻¹ como conteúdo médio do íon amônio em vinhos tintos espanhóis e 4,36 mg.L⁻¹ para os vinhos brancos.

Quando se faz a suplementação do mosto com sais de amônio isto não impede que o mesmo permaneça deficiente em aminoácidos, os quais influenciam na composição aromática do vinho. Assim, Garde-Cerdán e Ancín-Azpilicueta (2008) testaram a adição de diferentes concentrações de aminoácidos em conjunto com a suplementação do íon amônio em mostos deficientes em nitrogênio e verificaram que a adição de aminoácidos favoreceu a formação de compostos voláteis no vinho, contribuindo com o aroma final.

Em relação à quantidade total de aminoácidos nos vinhos analisados (50 amostras), notou-se que os vinhos brancos apresentaram $319,74 \text{ mg.L}^{-1}$, seguido dos vinhos tintos com $220,39 \text{ mg.L}^{-1}$ e dos vinhos rosés com $121,80 \text{ mg.L}^{-1}$. A preponderância dos vinhos brancos quanto a este parâmetro também foi visualizada por Soufleros *et al.* (2007) em vinhos gregos com $488,00 \text{ mg.L}^{-1}$, seguido dos vinhos rosés com $293,00 \text{ mg.L}^{-1}$ e dos vinhos tintos com $229,00 \text{ mg.L}^{-1}$. A inversão do predomínio da quantidade total de aminoácidos dos vinhos tintos e rosés neste estudo em comparação com os resultados aqui apresentados pode ter ocorrido devido à pequena disponibilidade de amostras do tipo rosés ($n = 3$). Quantidade esta, talvez, não representativa. Estas diferenças causadas no conteúdo de aminoácidos podem ser decorrentes da própria variedade da uva, assim como das técnicas de vinificação e viticultura.

Apesar do maior conteúdo em aminoácidos totais, os vinhos brancos apresentaram os menores conteúdos em aminas bioativas totais quando comparados aos vinhos tintos, com exceção dos vinhos brancos secos de Almirante Tamandaré que apresentaram quantidades superiores de aminas quando comparados aos vinhos tintos secos do mesmo município (Tabela 8).

Sendo assim, hipóteses são levantadas para justificar o maior conteúdo de aminas totais apresentados pelos vinhos tintos. Uma delas seria em virtude do metabolismo das bactérias lácticas durante a ocorrência da fermentação maloláctica nestes vinhos (GOMEZ-ALONSO; HERMOSIN-GUTIERREZ; GARCIA-ROMERO, 2007) e, Arena e Manca (2001) sugerem que esta diferença se deve a presença de maior diversidade de micro-organismos produtores de aminas nos vinhos tintos em virtude do próprio processo fermentativo. Marques *et al.* (2008) corroboram com esta afirmação ao

demonstrar que o uso de técnicas que induzem a maior extração de nutrientes e de micro-organismos nos mostos de uvas tintas é que propiciam esta diferença no conteúdo de amins, a exemplo o fato da vinificação destas ocorrer na presença das cascas e ainda, em virtude destas uvas passarem por uma etapa de esmagamento.

Quanto à prevalência das amins bioativas notou-se que a amina encontrada em maior quantidade nos vinhos das regiões estudadas foi a putrescina, com exceção aos vinhos brancos secos e suaves de Colombo os quais apresentaram a tiramina em maior concentração. Uma explicação para a predominância da putrescina na maioria dos vinhos se encontra na capacidade que algumas bactérias lácticas têm em converter, enzimaticamente, a arginina em putrescina pela via da arginina deiminase (ANCÍN-AZPILICUETA; GONZÁLEZ-MARCO; JIMÉNEZ-MORENO, 2008; SMIT; DU TOIT; DU TOIT, 2008). Isto porque em virtude da pequena quantidade de ornitina presente nos vinhos, não haveria possibilidade de formação de quantidades tão elevadas de putrescina apenas por meio de reações de enzimas descarboxilases (ANCÍN-AZPILICUETA; GONZÁLEZ-MARCO; JIMÉNEZ-MORENO, 2008).

Nota-se pela Tabela 8 que os vinhos brancos secos do município de Almirante Tamandaré apresentaram quantidade de tiramina significativamente maior quando comparados aos vinhos tintos secos deste mesmo município. Verificando a quantidade do seu aminoácido precursor, a tirosina, nos vinhos brancos secos, verifica-se um valor médio inferior, o qual não mostrou uma diminuição significativamente menor em relação aos tintos secos. Já na Tabela 10 os vinhos tintos suaves do município citado acima apresentaram quantidade de histamina significativamente maior que os vinhos brancos suaves. Ao se verificar a quantidade de histidina, seu precursor, os vinhos tintos suaves apresentaram uma média maior deste aminoácido, mas a mesma não chegou a apresentar uma diferença significativa em relação aos vinhos brancos suaves. Estes resultados demonstram que o conteúdo de amins não está relacionado diretamente ao conteúdo de aminoácidos presente. Estes resultados estão em concordância com o encontrado por Soufleros *et al* (2007) para os conteúdos de aminoácidos e amins em vinhos gregos. Para se assegurar de que realmente os aminoácidos precursores não estão

diretamente envolvidos na formação das amins eu precisaria dos resultados de concentração de aminoácidos nos sucos de uva (mostos) que deram origem aos vinhos.

Soufleros *et al.* (2007) determinaram o conteúdo de amins bioativas em vinhos gregos secos ($< 4 \text{ g.L}^{-1}$), semi-secos (4 g.L^{-1} a 45 g.L^{-1}) e suaves ($> 45 \text{ g.L}^{-1}$) e concluíram que os vinhos suaves apresentaram maior concentração de amins totais que os vinhos semi-secos e, estes por sua vez, concentrações superiores aos vinhos secos. De forma inversa, na presente pesquisa os resultados demonstram que os vinhos suaves (tanto os tintos como os brancos) apresentam um conteúdo de amins totais menor que os vinhos secos da mesma variedade de uva, conforme Tabela 12. Esta menor formação de amins bioativas poderia estar atrelada a menor concentração de aminoácidos totais presentes nos vinhos suaves. A concentração de aminoácidos nos mostos depende de uma série de fatores como, por exemplo, a variedade da uva, a safra, a origem geográfica, a fertilização do solo, o grau de maturidade da uva e as condições de vinificação (ANCÍN-AZPILICUETA; GONZÁLEZ-MARCO; JIMÉNEZ-MORENO, 2008). No estudo em questão, os dois primeiros fatores podem ser desconsiderados, isto porque todos os vinhos provêm da mesma safra e das mesmas variedade de uva (Terci para os tintos; Niágara Branca para os brancos). Além disso, a origem geográfica é irrelevante visto que de acordo com a análise de PCA (Figura 11) os municípios analisados não possuem características suficientes para separá-los em regiões distintas de acordo com seu conteúdo de aminoácidos e amins bioativas, fato que será melhor discutido a frente. Os fatores relacionados à fertilização e maturação são também de uma importância menor já que as uvas, tanto para elaboração de vinhos secos quanto suaves, são oriundas da mesma colheita.

Assim, restam apenas os fatores procedentes do processo de vinificação, dentre eles a duração da maceração. No entanto os benefícios desta prática de vinificação, no que diz respeito à extração de aminoácidos, parecem depender da variedade da uva utilizada. Isto porque Guitart, Hernandez-Orte e Cacho (1997) demonstraram que para a variedade de uva Chardonnay um período de maceração de 6 horas aumenta o conteúdo da maioria dos aminoácidos. E, Martín-Álvares *et al.* (2006) estudando vinhos

tintos da variedade Tempranillo, notaram que um tempo de maceração superior a 10 dias aumenta a extração de aminoácidos e o conteúdo de aminas biogênicas. No entanto, Hernandez-Orte *et al.* (1998) demonstraram que os tempos de maceração de 2 a 12 horas não são adequados para a variedade Macabeo devido à perda de aminoácidos. Com isto, sugere-se que o tempo de maceração utilizado para a vinificação dos vinhos suaves tenha sido diferente dos vinhos secos e possa ter influenciado na menor concentração de aminoácidos e, por consequência, no conteúdo de aminas encontradas.

Considerando que o açúcar na indústria de alimentos é utilizado para provocar desidratação osmótica em frutas e outros alimentos. Osorio *et al.* (2007) utilizaram solução de sacarose a 70% como agente osmótico e notaram que ela promoveu a transferência de importantes compostos voláteis e antocianinas das frutas para a solução em questão. Assim, tendo em vista o incremento da extração dos pigmentos corantes provocado pela presença do açúcar reforça-se a sugestão de que o tempo de maceração nos vinhos suaves possa ter sido de fato menor e, portanto, menor teria sido a extração dos aminoácidos para o mosto.

Porém, em virtude da ausência de dados referentes aos tempos de maceração usados nos processo de vinificação que deram origem aos vinhos aqui analisados e, devido à incerteza a respeito dos benefícios desta etapa para a extração dos aminoácidos, surge a necessidade de maiores estudos para avaliar se a maceração age positiva ou negativamente na extração dos compostos nitrogenados no caso das variedades *Vitis labrusca* utilizadas neste estudo.

Além de tentar justificar a menor concentração de aminoácidos nos vinhos suaves com os fatores que interferem na presença destes compostos no mosto, poderia se pensar em um maior consumo dos aminoácidos pelos microorganismos presentes. Isto porque, a absorção destes nutrientes pelas leveduras durante a fermentação alcoólica depende de fatores como a temperatura, a concentração de oxigênio e a concentração de açúcar. Em relação ao último fator, quanto maior a concentração de açúcar mais nitrogênio é requerido (AGENBACH, 1977, *apud* MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009a). Desta forma, supõe-se que nos vinhos suaves por possuírem maior

concentração de açúcar houve um maior consumo de aminoácidos para suprir as necessidades das leveduras durante a fermentação alcoólica. E, conseqüentemente, estes vinhos apresentaram menor formação de amins em virtude da menor concentração de precursores disponíveis já que os produtores dos municípios analisados não realizam a correção de nitrogênio em seus processos.

Ao comparar as médias dos grupos da Tabela 12, verificou-se diferença significativa apenas nos níveis de histamina, a qual se mostrou superior nos vinhos secos. Diferença significativa também foi relatada para a histamina e metilamina em vinhos gregos, no entanto os vinhos suaves apresentaram maiores conteúdos que os secos e semi-secos (SOUFLEROS *et al.*, 2007).

É interessante ressaltar que os vinhos doces de origem europeia são aqueles originados de uvas com uma concentração de açúcar muito mais alta que se conseguiria no final da maturação. Isto porque as bagas passam por um processo de desidratação para acumularem açúcar e, além disso, o seu processo de vinificação inclui a parada precoce da fermentação, preservando o restante do açúcar natural tornando o vinho doce. Assim, em virtude deste interrompimento da fermentação estes vinhos apresentam quantidades de aminoácidos superiores aos secos (SOUFLEROS *et al.*, 2003). E esta pode também ser a causa da maior produção de amins (quando comparado ao estudo em questão), ou seja, devido ao maior conteúdo de precursores.

TABELA 12 – CONTEÚDO DE AMINAS BIOATIVAS NOS VINHOS SECOS E SUAVES PROVENIENTES DOS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ

	Vinhos Secos (n=25)				Vinhos Suaves (n=25)			
	Média	SD	Mín	Máx	Média	SD	Mín	Máx
Histamina	3,22 ^a	2,74	0,00	11,80	1,75 ^b	1,07	0,33	4,00
Espermidina	1,17	1,17	0,00	4,58	1,22	1,23	0,00	4,09
Tiramina	2,94	3,71	0,00	12,82	1,58	2,57	0,00	9,98
Putrescina	8,95	14,44	0,00	45,44	4,53	6,94	0,00	28,06
Triptamina	0,49	1,61	0,00	7,94	0,08	0,27	0,00	1,21
TOTAL	16,77				9,16			

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem de forma significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$; $p < 0,01$)

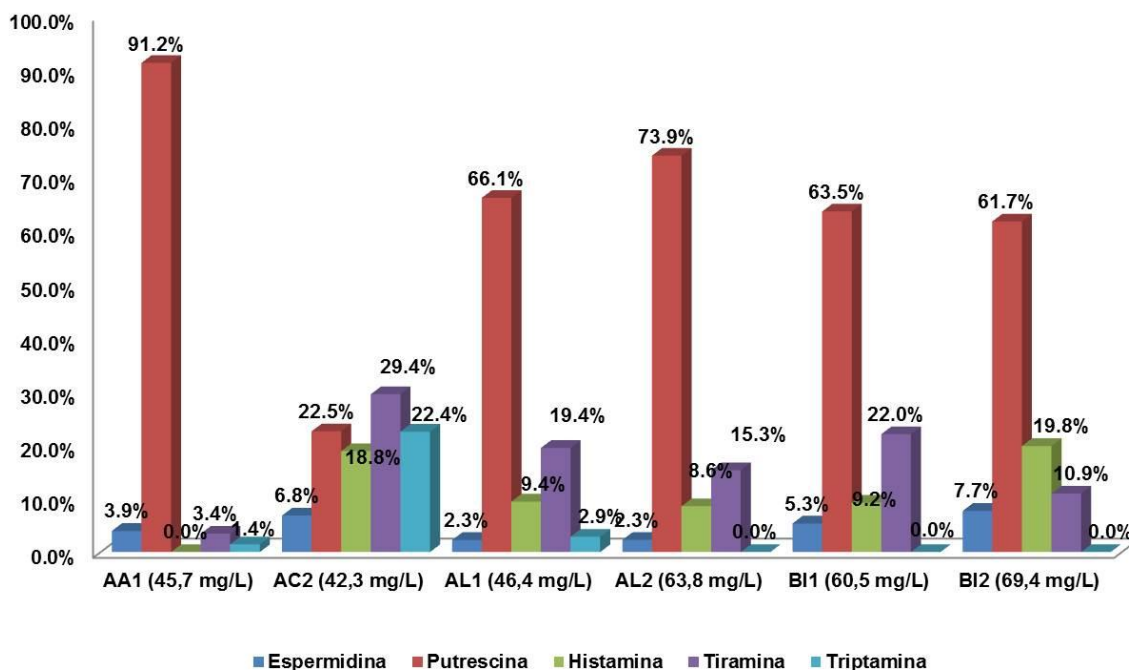
A contribuição individual das aminas para a quantidade de aminas totais são mostradas na Figura 10 para aquelas amostras que apresentaram os maiores níveis de aminas totais entre os vinhos analisados. No geral, a putrescina foi a amina prevalente nos vinhos, dado também observado nos vinhos espanhóis analisados por Martín-Álvarez *et al.* (2006). A exceção se dá na amostra AC2 na qual a tiramina aparece com maior representação (29,4%). Em números absolutos, esta porcentagem representa $10,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiramina nesta amostra. Considerando que a tiramina, juntamente com a histamina, é uma das aminas com maior implicação do ponto de vista toxicológico é interessante que seus níveis permaneçam baixos nos vinhos. Segundo citado por Soufleros *et al.* (2007), quantidades acima de 25 mg.L^{-1} já seriam consideradas tóxicas. No entanto, 100% dos vinhos analisados apresentaram concentrações abaixo de 13 mg.L^{-1} . Apesar da ausência de legislação também a respeito dos limites da histamina nos vinhos brasileiros, alguns países estabeleceram limites seguros que variam de 2 a 10 mg.L^{-1} (CEJUDO-BASTANTE *et al.*, 2010). Assim, no geral, 98% dos vinhos analisados nos municípios de Colombo e Almirante Tamandaré apresentaram valores de histamina igual ou inferior a $8,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Soufleros *et al.* (2007) concluiu que 95% dos vinhos gregos analisados pelo seu grupo apresentaram quantidades de histamina inferior a 2 mg.L^{-1} , o limite mais rígido imposto para esta amina. Se considerarmos este limite, apenas 54% dos vinhos da região metropolitana de Curitiba analisados se encontram abaixo deste limite, demonstrando a maior produção de histamina se comparados com os vinhos gregos e também em comparação com vinhos finos produzidos no município de Bento Gonçalves-Rio Grande do Sul, Brasil (SOUZA *et al.*, 2005). Os 2% que faltam para que os vinhos analisados sejam classificados como contendo valores de histamina abaixo do limite de 10 mg.L^{-1} corresponde a amostra BI2 que apresentou $11,80 \text{ mg.L}^{-1}$. Esta maior produção de histamina pode estar relacionada a condução da fermentação maloláctica por micro-organismos com alta atividade de histidina descarboxilase, as práticas enológicas da cantina rural em questão ou até mesmo as condições higiênico-sanitárias nas quais a vinificação foi conduzida (SILLA-SANTOS, 1996; ANCÍN-AZPILICUETA; GONZÁLEZ-MARCO; JIMÉNEZ-MORENO, 2008). Outros estudos também apresentaram

determinações acima de 10 mg.L^{-1} para a histamina (HERBERT; SANTOS; ALVES, 2001; MARCOBAL *et al.*, 2005; MARTÍN-ÁLVAREZ *et al.*, 2006; GOMEZ-ALONSO; HERMOSIN-GUTIERREZ; GARCIA-ROMERO, 2007).

Uma vez formada as amins bioativas, sua eliminação seria difícil sem alterar a composição do vinho. Desta forma, preza-se pela prevenção da formação das amins e, para isso, alguns cuidados tem mostrado bons resultados como o uso de uvas sadias, o uso de culturas iniciadoras de bactérias lácticas com menor capacidade aminogênica, manter a maceração pelo menor tempo possível e o uso de dióxido de enxofre previamente ao engarrafamento (ANCÍN-AZPILICUETA; GONZÁLEZ-MARCO; JIMÉNEZ-MORENO, 2008).

A espermidina foi a amina que contribuiu em menor proporção com o conteúdo de amins totais nos vinhos representados na Figura 10 ($\leq 6,8\%$). Quanto a triptamina, última amina analisada, esta não se mostrou presente em 3 das 6 amostras representadas nesta figura e, no geral, a triptamina foi a amina com menor incidência estando presente em apenas 16% das 50 amostras de vinhos analisadas.

FIGURA 10 – PERCENTUAL DE CADA AMINA NOS VINHOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ QUE APRESENTARAM AS MAIORES CONCENTRAÇÕES DE AMINAS TOTAIS



5.4 CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E O CONTEÚDO DE AMINAS BIOATIVAS

O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida da associação linear entre duas variáveis. Os valores desta correlação variam de -1 a +1, sendo que o sinal indica a direção desta associação e o valor absoluto indica a força da mesma (SOUFLEROS *et al.*, 2007).

Os parâmetros físico-químicos tais como pH, temperatura e dióxido de enxofre podem influenciar a concentração e a diversidade dos microorganismos no vinho, mas podem também afetar a atividade das enzimas descarboxilases presentes e a expressão gênica (SMIT; DU TOIT; DU TOIT, 2008). Assim, correlacionou-se os resultados das análises físico-químicas com a formação das aminas bioativas (Tabela 13).

Correlações positivas entre as aminas analisadas foram encontrados em todos os tipos de vinhos analisados, com exceção dos vinhos rosés suaves. Da mesma forma, Souza *et al.* (2005) também descreveram correlações entre aminas presentes em vinhos brasileiros da variedade Cabernet Sauvignon e Soufleros *et al.* (2007) também o fizeram em relação aos vinhos gregos. Estas correlações sugerem a influência de fatores comuns na formação de algumas aminas (SOUZA *et al.*, 2005).

O teor alcoólico foi correlacionado positivamente com os níveis de espermidina nos vinhos tintos secos e, negativamente com os níveis de tiramina nos vinhos rosés. Nestes, ainda foi observado correlação positiva entre espermidina e pH. A existência de correlação entre o teor alcoólico e o pH com a formação de aminas também já foi descrito anteriormente nos estudos de Souza *et al.* (2005).

A correlação positiva entre a formação das aminas e o pH é plausível tendo em vista que a medida que o pH aumenta, cresce também o número e a variedade da população microbiana no vinho (LONVAUD-FUNEL, ALINE, 2001). Com isso, aumenta-se o risco de desenvolvimento de espécies não desejáveis, as quais, dependendo do seu potencial aminogênico podem contribuir com a formação das aminas bioativas.

De forma oposta a encontrada neste estudo, Souza *et al.* (2005) relataram uma correlação positiva entre a tiramina e o teor alcoólico em vinhos finos da variedade Merlot. A origem desta contradição pode ser decorrente do uso de um pequeno número de amostras tanto no presente estudo (n=3 vinhos rosés) quanto no estudo comparativo de Souza *et al.* (2005) (n=3 vinhos finos Merlot). Esta contradição também foi evidenciada no estudo de Del Prete *et al.* (2009), no qual agmatina e tiramina apresentaram correlação positiva com o teor alcoólico, enquanto etilamina e putrescina apresentaram correlação negativa. Não foi encontrado nenhuma informação na literatura que pudesse explicar a correlação entre a espermidina e a tiramina com o teor alcoólico encontrados neste estudo.

TABELA 13 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS DADOS FÍSICO-QUÍMICOS E AMINAS BIOATIVAS DOS VINHOS PRODUZIDOS POR CANTINAS RURAIS DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA

Aminas / Parâmetros Físico-Químicos	Coeficiente de Correlação
Tintos Secos (n=19)	
Putrescina x Teor Alcoólico	0,8560*
Histamina x Espermidina	0,7026*
Branco Secos (n=6)	
Putrescina x Tiramina	0,9743*
Putrescina x Histamina	0,8326
Histamina x Tiramina	0,9057
Histamina x Espermidina	0,9153
Tintos Suaves (n=13)	
Tiramina x Triptamina	0,8832*
Putrescina x Triptamina	0,8350*
Branco Suaves (n=9)	
Espermidina x Tiramina	0,9701*
Rosés Suaves (n=3)	
Espermidina x pH	0,9991
Tiramina x Teor Alcoólico	-0,9999*

Correlação de Pearson a 95% de significância.

*Correlação de Pearson a 99% de significância.

(-) Correlação negativa.

Quando os vinhos analisados são divididos por faixas de concentração de dióxido de enxofre (Tabela 14), não observamos diferenças significativas ao utilizar o teste de Tukey nos níveis das aminas analisadas bem como nenhuma correlação foi encontrada por meio da correlação de Pearson entre as diferentes concentrações de dióxido de enxofre total e a formação das aminas bioativas. Porém, a existência de correlação negativa entre estas variáveis já foi relatada, onde os maiores níveis de aminas foram encontrados em vinhos com baixos níveis de dióxido de enxofre total (VIDAL-CAROU *et.al.*, 1990, *apud* ANCÍN-AZPILICUETA *et al.*, 2008). Além disso, Souza *et al.* (2005) também descreveu a existência de correlação entre a formação de espermidina e os níveis de dióxido de enxofre. No entanto esta correlação foi negativa para os vinhos da variedade Cabernet Franc e positiva para os vinhos da variedade Merlot (SOUZA *et al.*, 2005).

TABELA 14 - CONCENTRAÇÃO DE AMINAS NOS VINHOS DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA EM FUNÇÃO DO TEOR DE DIÓXIDO DE ENXOFRE TOTAL

SO₂ Total (mg.L⁻¹)	Histamina	Espermidina	Tiramina	Putrescina	Triptamina
	Média±SD	Média±SD	Média±SD	Média±SD	Média±SD
< 100 (n=17)	2,48 ± 2,88	1,54 ± 1,29	3,13 ± 4,16	11,96 ± 14,26	0,17 ± 0,37
100-200 (n=11)	2,80 ± 2,37	0,75 ± 1,21	1,25 ± 2,74	5,39 ± 13,31	0,10 ± 0,32
200-300 (n=11)	1,72 ± 1,09	0,71 ± 0,67	1,61 ± 2,41	3,58 ± 8,16	0,22 ± 0,49
>300 (n=11)	2,87 ± 1,80	1,48 ± 1,23	2,76 ± 2,96	4,01 ± 5,04	0,72 ± 2,39

Médias não diferem de forma significativa entre as diferentes concentrações de dióxido de enxofre total (Teste de Tukey, $p < 0,05$; $p < 0,01$)

O processo de vinificação envolve fundamentalmente leveduras e bactérias lácticas, as quais podem ser oriundas da própria baga da uva. No mosto podem-se encontrar mais de dez espécies de bactérias lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus*. Durante a fermentação alcoólica uma seleção natural ocorre, predominando a espécie *Oenococcus oeni* (LONVAUD-FUNEL, A., 1999). De

acordo com Rollan *et al.* (1995) citado por Ancín-Azpilicueta, González-Marco e Jiménez-Moreno (2008), a enzima histidina descarboxilase deste micro-organismo é inibida em concentrações alcoólicas superiores a 12%, resultando em uma menor formação de histamina. Os resultados aqui apresentados para os vinhos secos corroboram com esta afirmativa. Isto porque na Tabela 2 verifica-se que tanto os vinhos tintos como os brancos secos do município de Colombo apresentaram um teor alcoólico médio de 12,22 e 12,27% (v/v), respectivamente, com uma concentração média de histamina de 2,97 e 1,94 mg.L⁻¹ (Tabela 7), respectivamente. Enquanto os vinhos do município de Almirante Tamandaré apresentaram valores de teor alcoólico abaixo de 12% (11,75% v/v) para os vinhos tintos secos e 8,75% (v/v) para os vinhos brancos secos) e apresentaram maiores quantidades de histamina (4,65 mg.L⁻¹ para os vinhos tintos secos e 2,94 mg.L⁻¹ para os vinhos brancos secos) quando comparados com os mesmos vinhos produzidos em Colombo. Assim, sugere-se que os vinhos secos de Colombo, por apresentarem teores alcoólicos superiores, inibiram a atividade da enzima responsável pela descarboxilação da histidina e, portanto, a formação da histamina.

Como dito anteriormente, a predominância da espécie *Oenococcus oeni* é fato, porém nem todas as linhagens desta espécie possuem a enzima histidina descarboxilase para contribuir na formação de histamina (LUCAS; CLAISSE; LONVAUD-FUNEL, 2008). Portanto, esta diferença nos níveis de histamina entre os vinhos dos dois municípios estudados pode ter se intensificado pelo fato de que em Colombo predominam linhagens desprovidas do gene que codifica para a formação da enzima em questão e, portanto, os níveis de histamina são menores.

5.5 OCORRÊNCIA DA FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA E CORRELAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS COM A FORMAÇÃO DAS AMINAS

De acordo com Lonvaud-Funel (1999) durante a fermentação maloláctica todo o ácido málico presente vai ser degradado. Pan *et al.* (2011) condiciona o sucesso da fermentação maloláctica a concentrações abaixo de 0,15 g.L⁻¹ de ácido málico. No presente estudo, considera-se a ocorrência da

fermentação maloláctica completa para os vinhos que apresentam quantidades de ácido málico iguais ou inferiores a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, de acordo com Borges (2008). Todos os demais vinhos foram classificados como fermentação maloláctica incompleta. As concentrações de ácido láctico não foram usadas nesta classificação devido à variedade de informações a respeito da sua presença em vinhos que passaram ou não pela fermentação maloláctica. Notem que Borges (2008) comenta que o ácido láctico pode atingir 3 g.L^{-1} com a fermentação maloláctica enquanto Manfroi (2002), indica uma concentração inicial do mosto de $2,4 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico.

A ocorrência de uma fermentação maloláctica incompleta ou muito longa pode trazer efeitos maléficos à qualidade final do vinho já que os vinhos devem ser mantidos por longos períodos sob condições favoráveis a oxidação e a deterioração microbiana (PAN *et al.*, 2011). Para evitar esse tipo de situação tem sido proposto a inoculação simultânea do mosto com leveduras e bactérias, pois isto permitiria uma fermentação maloláctica bem sucedida devido a adaptação gradual das bactérias ao aumento do teor alcoólico, bem como se beneficiariam da disponibilidade de nutrientes no início da fermentação alcoólica (MASSERA *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2011). Massera *et al.* (2009) perceberam que os mostos que foram inoculados simultaneamente com leveduras e bactérias completaram a fermentação alcoólica e maloláctica com 7 a 14 dias de diferença do tempo que levou o método tradicional (fermentação maloláctica ocorrendo após o término da fermentação alcoólica). Este ganho, além de representar uma economia para a vinícola também poderia evitar a presença de micro-organismos contaminantes e a formação das aminas bioativas. No entanto, neste mesmo estudo, Massera *et al.* (2009) verificaram que não houve diferença significativa no conteúdo de aminas bioativas entre ambas os processos.

Na Tabela 15 as amostras, AM3, AO1, AO2, e BL2 e as amostras AF1, AF2 e BC1 apresentam quantidade de dióxido de enxofre superior ao limite máximo de 350 mg.L^{-1} estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Essa adição excedente provavelmente foi resultado de uma última adição deste componente, após a ocorrência da fermentação maloláctica com o objetivo de eliminar leveduras e bactérias residuais. Caso esta

quantidade fosse colocada no início da vinificação, provavelmente a ocorrência da fermentação maloláctica, de forma completa no primeiro grupo de amostras (AM3, AO1, AO2 e BL2) e de forma incompleta no segundo grupo, seria praticamente impossível devido à atividade antimicrobiana do dióxido de enxofre.

TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS MÁLICO E LÁTICO, DIÓXIDO DE ENXOFRE E AMINAS TOTAIS NOS VINHOS COM FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA COMPLETA E INCOMPLETA (Continua)

	Vinho	Ácido Málico (g.L ⁻¹)	Ácido Lático (g.L ⁻¹)	Dióxido de Enxofre (mg.L ⁻¹)	Aas Totais (mg.L ⁻¹)	Aminas Totais (mg.L ⁻¹)
		Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD		
COMPLETA	AA1	0,16 ± 0,02	4,65 ± 0,45	0,00	474,49	45,68
	AA2	0,07 ± 0,00	2,58 ± 0,53	285,02 ± 17,03	25,06	0,47
	AA3	0,09 ± 0,00	2,34 ± 0,32	139,84 ± 5,97	32,39	1,20
	AE1	0,23 ± 0,07	1,89 ± 0,09	45,74 ± 4,47	45,90	1,92
	AE3	0,05 ± 0,00	3,29 ± 0,67	0,00	323,17	28,72
	AL1	0,14 ± 0,14	2,19 ± 0,73	274,24 ± 18,13	309,22	42,48
	AM1	0,14 ± 0,04	4,17 ± 0,22	0,00	247,25	17,16
	AM2	0,16 ± 0,12	3,64 ± 0,60	0,00	190,99	17,86
	AM3	0,47 ± 0,14	2,06 ± 0,57	358,33 ± 61,24	485,61	10,29
	AM4	0,49 ± 0,13	2,65 ± 0,75	334,11 ± 37,81	362,85	12,45
	AN1	0,15 ± 0,15	2,45 ± 0,14	131,07 ± 19,92	57,56	4,41
	AN2	0,12 ± 0,02	1,53 ± 0,49	0,00	127,67	4,38
	A01	0,45 ± 0,00	1,88 ± 0,83	367,01 ± 25,21	209,69	11,34
	A02	0,21 ± 0,03	1,72 ± 0,84	471,87 ± 84,55	735,08	8,74
	BA2	0,29 ± 0,07	3,45 ± 0,51	104,86 ± 9,37	223,18	11,61
	BB1	0,10 ± 0,05	4,14 ± 1,58	0,00	343,51	21,48
	BB2	0,43 ± 0,03	2,72 ± 0,63	0,00	238,57	3,62
	BC2	0,29 ± 0,08	3,89 ± 1,51	150,60 ± 8,90	265,49	5,69
	BH1	0,13 ± 0,10	2,39 ± 0,79	131,07 ± 9,55	149,40	4,00
	BH2	0,42 ± 0,09	2,71 ± 0,27	122,39 ± 6,02	40,65	1,24
BH3	0,12 ± 0,02	6,88 ± 0,44	0,00	178,44	5,08	
BH4	0,30 ± 0,06	5,75 ± 0,85	253,47 ± 15,44	181,03	5,49	
BI1	0,14 ± 0,03	2,54 ± 0,38	0,00	604,16	58,31	
BI2	0,05 ± 0,00	3,34 ± 0,73	52,43 ± 5,45	689,83	59,67	
BL2	0,21 ± 0,03	2,09 ± 0,64	434,02 ± 63,67	340,10	10,82	
	Média			275,25	15,76	

TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS MÁLICO E LÁTICO, DIÓXIDO DE ENXOFRE E AMINAS TOTAIS NOS VINHOS COM FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA COMPLETA E INCOMPLETA (Conclusão)

Vinho	Ácido Málico (g.L ⁻¹)	Ácido Lático (g.L ⁻¹)	Dióxido de Enxofre (mg.L ⁻¹)	Aas Totais (mg.L ⁻¹)	Aminas Totais (mg.L ⁻¹)
	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD		
AB1	1,00 ± 0,01	0,49 ± 0,05	98,17 ± 6,33	227,57	7,92
AB2	1,39 ± 0,04	0,68 ± 0,26	104,86 ± 21,56	145,83	4,25
AB3	1,25 ± 0,18	1,31 ± 0,34	209,72 ± 22,09	286,18	4,15
AC2	0,82 ± 0,40	1,86 ± 0,11	314,58 ± 57,33	469,33	35,36
AD1	0,71 ± 0,12	1,95 ± 0,57	262,15 ± 13,57	57,98	3,87
AD5	1,94 ± 0,44	0,70 ± 0,04	0,00	52,46	1,62
AE2	0,92 ± 0,10	4,42 ± 0,84	0,00	316,88	27,85
AF1	2,36 ± 0,07	1,74 ± 0,36	419,44 ± 67,52	121,07	3,17
AF2	2,40 ± 0,19	1,30 ± 0,30	498,08 ± 51,70	106,67	4,44
AF3	1,93 ± 0,13	1,60 ± 0,20	288,36 ± 49,94	668,55	7,36
AF4	1,03 ± 0,10	1,54 ± 0,41	131,07 ± 27,05	120,56	4,19
AF5	1,20 ± 0,01	2,27 ± 0,55	148,61 ± 12,74	235,55	5,65
AJ1	0,59 ± 0,11	3,43 ± 0,66	209,72 ± 35,88	145,85	5,54
AJ2	0,63 ± 0,10	2,28 ± 0,99	334,11 ± 56,39	135,42	8,45
AJ3	1,07 ± 0,07	2,95 ± 0,45	288,36 ± 37,44	97,52	3,52
AL2	1,23 ± 0,58	4,55 ± 0,35	148,61 ± 8,32	533,11	61,47
BA1	2,52 ± 0,72	1,12 ± 0,38	255,46 ± 21,09	141,54	6,61
BC1	3,81 ± 0,19	0,61 ± 0,23	432,55 ± 70,66	247,87	3,94
BD1	1,64 ± 0,03	1,36 ± 0,66	148,61 ± 11,44	78,35	9,48
BD2	1,75 ± 0,39	1,10 ± 0,28	288,36 ± 29,11	115,34	4,86
BE1	1,44 ± 0,30	0,73 ± 0,00	209,72 ± 17,35	43,07	1,90
BG1	2,80 ± 0,20	0,32 ± 0,12	0,00	81,94	5,64
BI3	0,89 ± 0,02	1,95 ± 0,43	471,87 ± 70,45	160,97	21,20
BK1	0,99 ± 0,07	1,49 ± 0,47	0,00	52,12	1,49
BL1	0,66 ± 0,05	1,42 ± 0,52	322,56 ± 45,66	328,49	10,13
Média				198,81	10,16

INCOMPLETA

O dióxido de enxofre existe no vinho tanto no estado livre quanto ligado. Quando se encontra ligado (exemplo: a antocianinas, açúcares, acetaldeído) ele exerce uma atividade fracamente antimicrobiana. No entanto, esta fração ligada pode liberar a forma livre em algumas circunstâncias, como é o caso da

metabolização do acetaldeído pelas bactérias lácticas durante a fermentação maloláctica. Assim, esta fração liberada pode ser suficiente para inibir ou desacelerar a fermentação maloláctica (JACKSON, 2008). Em resumo, a ocorrência da fermentação maloláctica nas amostras de vinho em questão, denota que a primeira adição de dióxido de enxofre foi realizada nas devidas proporções.

A amostra BI1 não apresentou quantidade detectável de dióxido de enxofre, indicando que esta substância não foi utilizada. Isto pode ter sido a causa da produção elevada de aminas bioativas ($58,31 \text{ mg.L}^{-1}$), visto que leveduras e bactérias residuais podem ter dado continuidade a sua atividade metabólica depois do engarrafamento. Estudos demonstram que há um aumento progressivo no conteúdo de certas aminas durante o envelhecimento do vinho, particularmente da histamina, tiramina e putrescina (MORENO; GOÑI; AZPILICUETA, 2003; HERBERT *et al.*, 2005). No entanto, não há como apontar uma causa única para a produção das aminas bioativas visto que a sua ocorrência é multifatorial e que todos estes fatores estão inter-relacionados. Isto fica ainda mais evidente ao analisar a amostra BI2 a qual apresenta $52,43 \text{ mg.L}^{-1}$ de dióxido de enxofre total e quantidade de aminas totais superior a da amostra BI1, resultando em $59,67 \text{ mg.L}^{-1}$. Assim, avaliar a adição de dióxido de enxofre de forma isolada não é suficiente para justificar a maior ou menor produção de aminas bioativas.

Entre as causas da produção de aminas bioativas está o metabolismo dos micro-organismos que conduzem a fermentação maloláctica. A ocorrência da fermentação maloláctica não é desejável em todos os processos de vinificação, como por exemplo na vinificação de vinhos brancos finos nos quais o caráter varietal e a acidez são importantes (RIZZON; ZANUZ; MIELE, 1997). No entanto, quando esta fermentação é recomendada, a exemplo nos vinhos tintos, traz benefícios como diminuição da acidez, aumento da complexidade do aroma do vinho bem como contribuição a estabilidade microbiana evitando fermentação na garrafa (da SILVA, 2003). Esta segunda fermentação serve também para regular a qualidade das safras vitícolas, uma vez que diminui o excesso de acidez presente nos vinhos de safras de má qualidade (RIZZON; ZANUZ; MIELE, 1997).

Tendo em vista que os vinhos produzidos na região metropolitana de Curitiba são vinhos que, no geral, apresentam-se muito ácidos, a passagem dos mesmos por esta segunda fermentação é favorável no sentido de suavizar esta característica sensorial que desagradava os consumidores. Para que a fermentação maloláctica aconteça a população de bactérias lácticas precisa atingir 10^6 UFC.mL⁻¹, crescimento dependente, principalmente, da temperatura, do pH e teor alcoólico apresentado pelo vinho (LONVAUD-FUNEL, A., 1999). Ademais, altas concentrações de dióxido de enxofre e deficiência de nutrientes se mostram prejudiciais ao crescimento bacteriano (ORDUÑA, 2010). Assim, o fato da fermentação maloláctica não ter sido completa em algumas amostras (50% das amostras analisadas) pode ser explicado pela existência de condições desfavoráveis para que a mesma prosseguisse. Esta explicação é reforçada pelo fato de que a média dos valores de pH e de teor alcoólico para as amostras que não completaram a fermentação maloláctica foi de 3,24 e 12,6% (v/v), respectivamente, enquanto que para as amostras que a completaram foi de 3,34 e 11,1% (v/v), respectivamente. Mudanças no pH e concentração de álcool alteram a atividade enzimática envolvida na reação de descarboxilação, além disso o etanol modifica a integridade e a composição lipídica das membranas celulares dos micro-organismos envolvidos (MANFROI, 2002).

Ainda na Tabela 15, é possível verificar que o conjunto dos vinhos que realizaram a fermentação maloláctica apresenta quantidade de amins totais superior a quantidade encontrada nos vinhos que não completaram esta fermentação. Este resultado sugere que o metabolismo das bactérias lácticas aumenta os níveis de amins bioativas. A fermentação maloláctica também foi associada como a principal fonte da formação de putrescina e tiramina em vinhos portugueses da região do Alentejo (HERBERT *et al.*, 2005).

Além disso, ao correlacionar os resultados de ácido málico e láctico dos vinhos com o conteúdo de amins totais dos mesmos, notou-se uma correlação positiva de 0,3540 entre os resultados de ácido láctico e o total de amins bioativas. Isto demonstra que quanto maior o conteúdo de ácido láctico mais amins são formadas, o que é coerente tendo em vista que o conteúdo de ácido láctico aumenta à medida que se progride com a fermentação maloláctica.

Para corroborar com esta observação, Soufleros *et al.* (2007) demonstraram a existência de correlação negativa da ordem de -0,2450 entre seus resultados de aminas totais e ácido málico. Esta correlação negativa confirma que à medida que a fermentação maloláctica progride, os níveis de ácido málico decrescem (pela transformação a ácido láctico) e os níveis das aminas aumentam. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que também demonstraram a importância da condução da fermentação maloláctica de forma espontânea (ou seja, com micro-organismos naturalmente presentes na baga da uva) na formação das aminas, como histamina, tiramina e putrescina (LONVAUD-FUNEL, ALINE, 2001; IZQUIERDO CAÑAS *et al.*, 2008). Por outro lado, Manfroi *et al.* (2009) demonstraram que a fermentação maloláctica, independente se a mesma ocorre de forma espontânea ou não, não irá necessariamente estar associada a produção de certas aminas, como por exemplo as aminas prejudiciais a saúde humana, histamina e tiramina.

A partir dos resultados discutidos acima e, considerando que os níveis de aminas nos vinhos analisados estão acima dos níveis encontrados por outros estudos (SOUZA *et al.*, 2005; BAUZA; KELLY; BLAISE, 2007; SOUFLEROS *et al.*, 2007), uma alternativa para reduzir estas quantidades seria o uso de culturas iniciadoras (*starter*) de bactérias lácticas com menor potencial aminogênico (MARQUES, ANA P.; LEITÃO, M. C.; SAN ROMÃO, MARIA V., 2008). Além do mais, a seleção das bactérias lácticas para condução da fermentação maloláctica pode ir além da avaliação apenas da capacidade aminogênica da mesma e ponderar outras propriedades enológicas de forma a potencializar os benefícios ao produto final (exemplo: atividade da glicosidase) (RUIZ *et al.*, 2010). No caso dos vinhos analisados da região metropolitana de Curitiba, a prevalência foi da amina putrescina que, sozinha não possui implicação toxicológica, mas associada à presença da histamina poderia aumentar o risco de intoxicação relacionado a esta, em virtude da saturação da atividade das mono e diaminoxidases presentes no trato gastrintestinal (SMIT; DU TOIT; DU TOIT, 2008). Experimentos com animais demonstraram que a toxicidade da histamina aumenta em dez vezes quando esta amina é administrada 40 minutos depois da ingestão de putrescina (PARROT; NICOT, 1966, *apud* ANCÍN-AZPILICUETA, 2008). Além da toxicidade, a putrescina

pode trazer efeitos negativos do ponto de vista sensorial à qualidade do vinho produzido. Concentrações entre 15 a 20 mg.L⁻¹ de putrescina podem reduzir a qualidade sensorial de vinhos brancos, enquanto os tintos são prejudicados com concentrações entre 20 a 30 mg.L⁻¹ (ARENA; MANCA DE NADRA, 2001; SMIT; DU TOIT; DU TOIT, 2008).

Segundo demonstraram Soufleros *et al.* (2003), vinhos que não passaram pela fermentação maloláctica apresentaram concentrações mais elevadas para a maioria dos aminoácidos. Consequentemente, a quantidade de aminoácidos totais nos vinhos que realizaram a segunda fermentação foi menor. Considerando que as aminas bioativas são formadas pela atividade microbiana por meio da descarboxilação dos aminoácidos, era de se esperar que os vinhos que realizaram a fermentação maloláctica e que também apresentaram as maiores concentrações de aminas, tivessem, portanto menor quantidade média de aminoácidos totais. No entanto, os resultados (Tabela 15) demonstraram o contrário, bem como os resultados de Izquierdo-Cañas *et al.* (2008). Neste estudo os autores justificam esta observação pela presença da borra oriunda do final da fermentação alcoólica e a consequente autólise das leveduras. E ainda, pela produção de peptidases e proteases extracelulares secretadas por algumas espécies de *Oenococcus oeni*, as quais poderiam contribuir com este aumento no conteúdo de aminoácidos totais após a fermentação maloláctica.

Além disso, sugere-se que as aminas podem ser formadas por outras vias que não a descarboxilação dos aminoácidos, como demonstrado por Del Prete *et al.* (2009), contribuindo sinergicamente com a preservação dos aminoácidos.

5.6 DISCRIMINAÇÃO ENTRE OS MUNICÍPIOS DE COLOMBO E ALMIRANTE TAMANDARÉ

A quimiometria é uma ferramenta útil no que se refere à aplicação de métodos matemáticos e estatísticos a resultados de experimentos químicos (COZZOLINO *et al.*, 2009). Abordagens estatísticas multivariadas como o análise de componentes principais (PCA) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) podem ser usadas para discernir padrões significantes em conjunto de dados complexos (ANASTASIADI *et al.*, 2009).

Pela análise multivariada de dados tentou-se classificar as amostras de vinho a partir dos resultados da quantificação de aminoácidos e aminas bioativas. Assim, a matriz de dados que originou a Figura 11 foi composta pelas 50 amostras analisadas com suas respectivas concentrações dos 17 aminoácidos e 5 aminas quantificadas além do resultado para o íon amônio. Os dados foram autoescalados para fornecer pesos iguais para todos os compostos.

O método de redução de variáveis mais conhecido e utilizado denomina-se PCA (COZZOLINO *et al.*, 2009). Por meio do uso desta ferramenta foi possível explicar 73,81% das diferenças entre as 50 amostras de vinho analisadas utilizando três componentes principais (PC). Onde PC1 explica 59,75% da variância total, PC2 explica 8,06 % e PC3, 6,00 %.

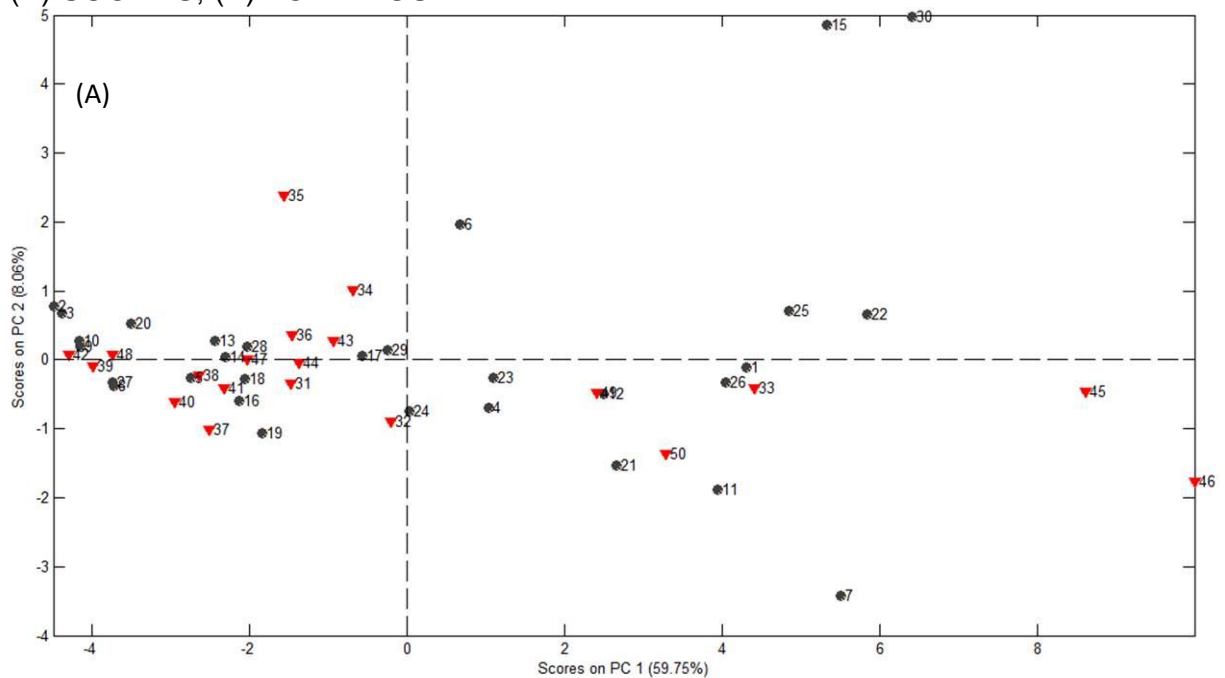
A interpretação dos dados foi realizada por gráficos bidimensionais para facilitar a visualização dos possíveis grupos formados. A Figura 11 plota no eixo x a variável PC1 e no eixo y a variável PC2, dividindo esta figura em 4 quadrantes, nos quais foram atribuídos sinais + e – de acordo com a posição dos mesmos.

A distribuição das amostras nesta figura situa a grande maioria dos vinhos de Almirante Tamandaré no lado esquerdo. Para entender esta distribuição é necessário verificar o gráfico de *loadings* na Figura 11B, na qual percebe-se que os aminoácidos e as aminas analisadas ficam situados do lado direito do gráfico (PC1+). Assim como os resultados das Tabelas 7 a 11 demonstraram, a maioria dos vinhos de Almirante Tamandaré são distribuídos mais a esquerda do gráfico (PC1-) em virtude da menor concentração destes compostos quando comparados os vinhos de Colombo. A minoria dos vinhos

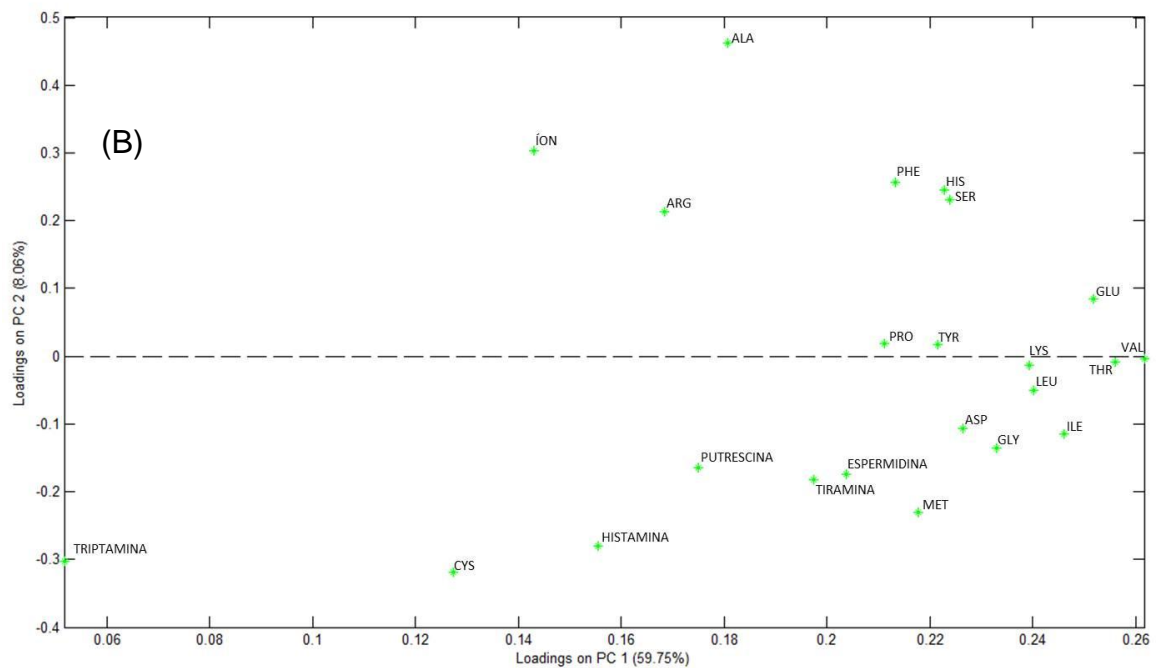
de Almirante Tamandaré (30%) encontram-se em PC1+ por possuírem um maior conteúdo de compostos nitrogenados que os demais (70%). Já Colombo, apresenta quase metade (46,7 %) dos seus vinhos em PC1 +, demonstrando o seu maior conteúdo em aminas e aminoácidos.

Percebe-se pela Figura 11B que todos os compostos analisados influenciam na disposição das amostras neste gráfico. Mas devido a concentração dos mesmos nos quadrantes PC1+, não conseguiram promover uma melhor separação entre os municípios estudados. Isto se verifica na presença de uma parcela das amostras de Almirante Tamandaré se encontrarem em PC1+, assim como uma parcela de Colombo se encontrar em PC1-, essa mistura evidencia que os *loadings* utilizados não foram efetivos em diferenciar as regiões estudadas.

FIGURA 11 – CARACTERIZAÇÃO DOS VINHOS POR PCA UTILIZANDO O CONTEÚDO DE AMINAS E AMINOÁCIDOS COMO OS DADOS ANALÍTICOS. (A) SCORES; (B) LOADINGS.



*Círculo: vinhos de Colombo;** Triângulo invertido: vinhos de Almirante Tamandaré.

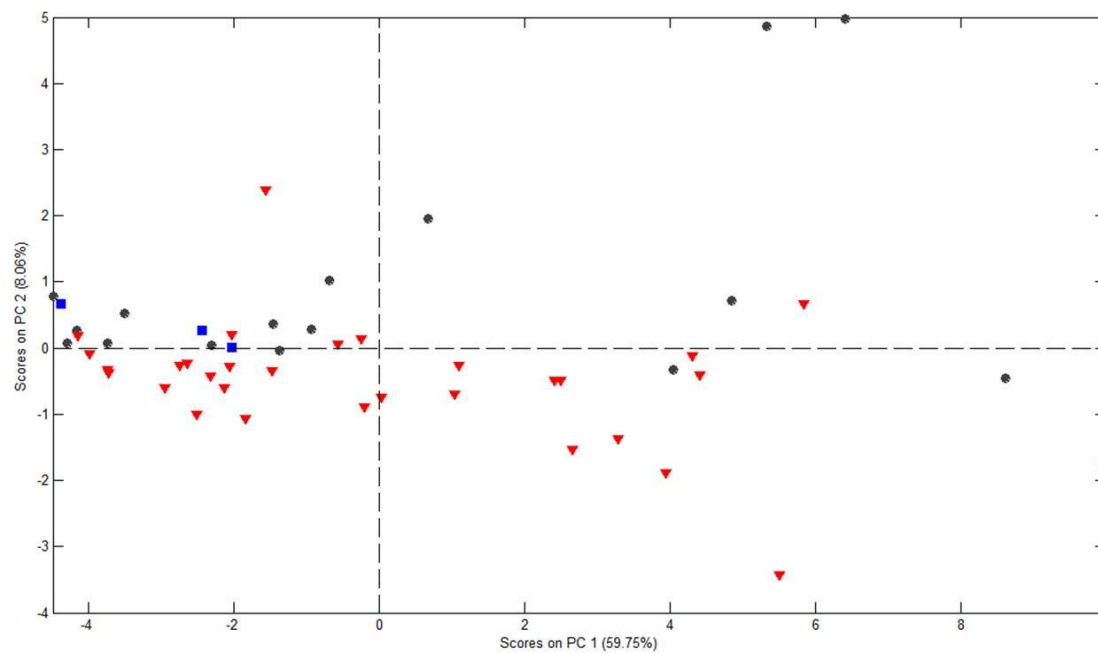


Assim, fica demonstrado que a origem geográfica não embutiu características marcantes aos vinhos, no que diz respeito a composição de aminas e aminoácidos, a ponto de contribuir para a segregação dos municípios. Em partes, isto pode ser explicado pela proximidade geográfica dos

municípios, os quais se distanciam por 9,4 quilômetros (Google Earth), o que não implica em diferenças edafoclimáticas suficientes para alterar a composição das uvas cultivadas em ambos os municípios. García-Villar *et al.* (2007), usou o conteúdo de aminas bioativas de vinhos de seis regiões vitivinícolas espanholas (distantes entre si por no mínimo 77 km) na tentativa de obter a segregação das mesmas por análise de componentes principais, mas também não obteve padrões relevantes para estabelecer esta diferenciação. No entanto, em outro estudo, uma distinção entre regiões vitivinícolas gregas (distantes por no mínimo 200 km) foi observada utilizando os resultados da determinação de aminoácidos como dados para a análise de componentes principais e análise discriminatória (SOUFLEROS *et al.*, 2003).

No entanto estes resultados demonstram que a variedade da uva prevaleceu sobre as diferenças que, por ventura, fossem oriundas da origem geográfica, tendo em vista que ambos os municípios cultivam as mesmas variedades. Sendo assim, o uso das aminas e aminoácidos como dados químicos para a análise de componentes principais conseguiu dispor 13 dos 15 vinhos brancos da variedade Niágara Branca nos quadrantes superiores (PC2+), enquanto os vinhos tintos oriundos da variedade Terci encontram-se na sua maioria nos quadrantes inferiores (26 amostras das 32 analisadas) (Figura 12). Os vinhos brancos predominam nos quadrantes superiores em virtude do seu maior conteúdo de aminoácidos e menor conteúdo em aminas bioativas frente aos vinhos tintos. Lembrando que, de acordo com o gráfico de *loadings* (Figura 11B) os aminoácidos prevalecem no quadrante superior (PC1+ e PC2+) e as aminas no quadrante inferior (PC1+ e PC2-). Sendo assim, a observação da prevalência dos vinhos tintos no quadrante inferior é resultado do seu maior conteúdo em aminas.

FIGURA 12 - CARACTERIZAÇÃO DOS VINHOS POR PCA UTILIZANDO O CONTEÚDO DE AMINAS E AMINOÁCIDOS COMO OS DADOS ANALÍTICOS.



*Círculo: vinhos Brancos; **Triângulo Invertido: vinhos Tintos; ***Retângulo: vinhos Rosés.

6 CONCLUSÃO

Os níveis elevados de aminos bioativas encontrados nos vinhos dos municípios de Colombo e Almirante Tamandaré demonstram a necessidade de algumas mudanças no processo de vinificação de forma a aumentar a segurança alimentar e a qualidade dos mesmos.

Os vinhos oriundos de ambos os municípios não apresentam características suficientemente diferenciadas, com relação ao perfil de aminoácidos e de aminos bioativas, que pudessem levar a uma discriminação entre os mesmos.

REFERÊNCIAS

ADDOR, F.; THUMM, N.; GRAZIOLI, A. Geographical Indications: Important Issues for Industrialized and Developing Countries. **Institute for Prospective Technological Studies**. v. n.74, p. 24-31. 2003.

ANASTASIADI, M. *et al.* ¹H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n.23, p. 11067-11074. 2009.

ANCÍN-AZPILICUETA, C.; GONZÁLEZ-MARCO, A.; JIMÉNEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amines in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 48, p. 257-275. 2008.

ARENA, M. E.; MANCA DE NADRA, M. C. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, n.2, p. 158-162. 2001.

BARNABÉ, D.; VENTURINI FILHO, W. G.; BOLINI, H. M. A. Análise descritiva quantitativa de vinhos produzidos com uvas niágara rosada e bordô. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 10, n.2, p. 122-129. 2007.

BARRADO, E.; RODRIGUEZ, J. A.; CASTRILLEJO, Y. Determination of primary amino acids in wines by high performance liquid chromatography. **Talanta**. v. 78, n.3, p. 672-5. 2009.

BAUZA, T. *et al.* Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 707, n.2, p. 373-379. 1995.

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**. v. 105, n.1, p. 405-413. 2007.

BONFIM, T. M. B. *et al.* **Melhoria da Qualidade do Vinho produzido no Município de Colombo - Paraná**. Disponível em: <http://www.pr5.ufrj.br/cd_iberico/biblioteca_pdf/tecnologia_trabalho/14_ibericoamericano.pdf>. Acesso em: Julho 2009.

BORGES, E. P. **ABC ilustrado da vinha e do vinho**. 2. ed. Rio de Janeiro: Mauad, 2008.

BRASIL. Portaria nº. 229, de 25 de outubro de 1988. Aprova as normas referentes à "Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho". **Diário Oficial da União**, 1988.

BRASIL. Lei nº. 10.970, de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras

providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004.

BRASIL. Instrução Normativa nº 24. Aprova o "Manual Operacional de Bebidas e Vinagres". **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

CALLEJÓN, R. M.; TRONCOSO, A. M.; MORALES, M. L. Determination of amino acids in grape-derived products : A review. **Talanta**. v. p. 2010.

CAMARGO, U. A. Espécies e Cultivares. In: KUHN, G. B. **UVA para processamento: Produção**. Brasília: Embrapa, 2003

CEJUDO-BASTANTE, M. J. *et al.* 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. p. 2010.

CHOCIAI, M. B. *et al.* Qualidade do vinho produzido no município de Colombo na safra 2001. **Visão Acadêmica**. v. 2, n.1, p. 23-30. 2000.

CID, S. B.; MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J.; BECKER, B. Amino acid decarboxilation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. **Food Microbiology**. v. 25, p. 269-277. 2008.

COSTANTINI, A.; GARCÍA-MORUNO, E.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Biochemical Transformations Produced by Malolactic Fermentation. In: MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Madrid: Springer, 2009

COSTANTINI, A. *et al.* Biogenic amine production by contaminating bacteria found in starter preparations used in winemaking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 10664-10669. 2009.

COZZOLINO, D. *et al.* Can spectroscopy geographically classify Sauvignon Blanc wines from Australia and New Zealand. **Food Chemistry**. v. 126, p. 673-678. 2011.

COZZOLINO, D. *et al.* Mid infrared spectroscopy and multivariate analysis: A tool to discriminate between organic and non-organic wines grown in Australia. **Food Chemistry**. v. 116, n.3, p. 761-765. 2009.

da SILVA, G. A. Elaboração de vinhos: aspectos microbiológicos. In: GUERRA, C. C. **Uva para processamento: Pós-colheita**. Brasília: Embrapa, 2003

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**. v. n.7, p. 1998.

DEL PRETE, V. *et al.* Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. **Food Chemistry**. v. 112, n.2, p. 474-481. 2009.

ESTREICHER, S. K., Ed. **Wine: From Neolithic Times to 21st Century**. Nova York: Algora, 1 ed. 2006.

GARCÍA-VILLAR, N.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Characterization of wines through the biogenic amine contents using chromatographic techniques and chemometric data analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 7453-7461. 2007.

GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. **LWT - Food Science and Technology**. v. 41, n.3, p. 501-510. 2008.

GARDE-CERDÁN, T. *et al.* Study of the Evolution of Nitrogen Compounds during Grape Ripening. Application to Differentiate Grape Varieties and Cultivated Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n.6, p. 2410-2419. 2009.

GOMEZ-ALONSO, S.; HERMOSIN-GUTIERREZ, I.; GARCIA-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**. v. 55, n.3, p. 608-613. 2007.

GRAINGER, K.; TATTERSALL, H., Eds. **Wine Production: Vine to Bottle**. Oxford: Blackwell, p.127, 1 ed. 2005.

GUERRA, C. C. Maturação e Colheita. In: GUERRA, C. C. **UVA para processamento Pós-colheita**. Brasília: Embrapa, 2003

GUERRA, C. C. *et al.* Conhecendo o Essencial sobre Uvas e Vinhos. 2009. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>>. Acesso em: 20/01/2011.

GUITART, A.; HERNANDEZ ORTE, P.; CACHO, J. Effects of maceration on the amino acid content of Chardonnay musts and wines. **Vitis**. v. 36, n.1, p. 43-47. 1997.

HERBERT, P. *et al.* HPLC Determination of Amino Acids in Musts and Port Wine Using OPA/FMOC Derivatives. **Journal of Food Science**. v. 65, n.7, p. 1130-1133. 2000.

HERBERT, P. *et al.* Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationships with variety, sub-region and vintage. **Journal of Food Engineering**. v. 66, p. 315-322. 2005.

HERBERT, P.; SANTOS, L.; ALVES, A. Simultaneous Quantification of Primary, Secondary Amino Acids, and Biogenic Amines in Musts and Wines Using OPA/3-MPA/FMOC-Cl Fluorescent Derivatives. **Journal of Food Science**. v. 66, n.9, p. 1319-1325. 2001.

HERNANDEZ ORTE, P. *et al.* Effect of maceration time and the addition of enzymes on the amino acid composition of musts and wines and its influence on wine aroma. Influencia del tiempo de maceracion y de la adiccion de enzimas sobre la composicion de los aminoacidos de mostos y vinos y su relacion con el aroma. **Food Science and Technology International**. v. 4, n.6, p. 407-418. 1998.

HOFFMANN, A.; CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. **Sistema de Produção de Uvas Rústicas para Processamento em Regiões Tropicais do País**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessam>>. Acesso em: Julho 2009.

HUSNIK, J. I. *et al.* Metabolic engineering of malolactic wine yeast. **Metab Eng.** v. 8, n.4, p. 315-23. 2006.

INPI. **INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL.** Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/indicacao/o-que-e-indicacao-geografica>>. Acesso em: 27 ago. 2009.

IZQUIERDO CAÑAS, P. M. *et al.* Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines. **Journal of Food Composition and Analysis.** v. 21, n.8, p. 731-735. 2008.

JACKSON, R. S., Ed. **Wine Science: Principles and Applications.** Califórnia: Elsevier, 3 ed. 2008.

KISS, J.; KORBÁSZ, M.; SASS-KISS, A. Study of Amine Composition of Botrytized Grape Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 54, n.23, p. 8909-8918. 2006.

KUHN, G. B., Ed. **UVA para processamento Produção.** Brasília: Embrapa, 1. ed. 2003.

KUTLÁN, D.; MOLNÁR-PERL, I. New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography: Analysis of wine, beer and vinegar. **Journal of Chromatography A.** v. 987, n.1-2, p. 311-322. 2003.

LANDETE, J. M.; FERRER, S.; PARDO, I. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. **Food Control.** v. 18, n.12, p. 1569-1574. 2007.

LANDETE, J. M. *et al.* Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 53, n.4, p. 1119-1124. 2005.

LEE, S.-J. *et al.* Development of korean red wines using *Vitis labrusca* varieties: instrumental and sensory characterization. **Food Chemistry.** v. 94, p. 385-393. 2006.

LONVAUD-FUNEL, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. **Antonie Van Leeuwenhoek.** v. 76, n.1-4, p. 317-31. 1999.

LONVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v. 199, n.1, p. 9-13. 2001.

LUCAS, P. M.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n.3, p. 811-817. 2008.

MANFROI, L. **Avaliação do processo fermentativo e da composição de vinho Merlot elaborado com diferentes espécies de *Saccharomyces*, *Oenococcus* e *Lactobacillus***. Viçosa, 2002. f. - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

MANFROI, L. *et al.* Influence of alcoholic and malolactic starter cultures on bioactive amines in Merlot wines. **Food Chemistry**. v. 116, p. 208-213. 2009.

MARCO, A. G.; MORENO, N. J.; AZPILICUETA, C. A. Influence of addition of yeast autolysate on the formation of amines in wine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 86, n.13, p. 2221-2227. 2006.

MARCOBAL, A. *et al.* Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. **Food Research International**. v. 38, p. 387-394. 2005.

MARQUES, A. P.; LEITÃO, M. C.; SAN ROMÃO, M. V. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. **Food Chemistry**. v. 107, n.2, p. 853-860. 2008.

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

MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J. *et al.* Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. **Eur Food Res Technol**. v. 222, p. 420-424. 2006.

MASSERA, A. *et al.* Simultaneous inoculation of Malbec (*Vitis vinifera*) musts with yeast and bacteria: effects on fermentation performance, sensory and sanitary attributes of wines. **Food Technol. Biotechnol.** v. 47, n.2, p. 192-201. 2009.

MATAIX, E.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Determination of l-(-)-malic acid and l-(+)-lactic acid in wine by a flow injection-dialysis-enzymic derivatisation approach. **Analytica Chimica Acta**. v. 428, n.1, p. 7-14. 2001.

MELLO, L. M. R. D. Área e Produção de Uvas: Panorama Mundial. **Artigos Técnicos**. 2009. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/producaomundial.pdf>>. Acesso em: 11/03/2011.

MELLO, L. M. R. D. Vitivinicultura brasileira: panorama 2010. **Artigos Técnicos**. 2010. Disponível em: <<http://www.uvibra.com.br/pdf/Panorama%202010%20-%20Vitivinicultura%20Brasileira.pdf>>. Acesso em: 11/03/2011.

MELLO, L. M. R. D. Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial - Panorama 2010. **Artigos Técnicos**. 2011. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/mercextvit2010.pdf>>. Acesso em: 11/03/2011.

MERCOSUL. Resolução Mercosul nº 45 de 21 de junho de 1996. Aprova o regulamento vitivinícola do Mercosul. **Diário Oficial da União**, Buenos Aires. Argentina, 1996.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C., Eds. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Madrid: Springered. 2009.

MORENO, N. J.; GOÑI, D. T.; AZPILICUETA, C. A. Changes in amine concentrations during aging of red wine in oak barrels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 5732-5737. 2003.

OIV. Situazione del Settore Vitivinicolo Mondiale nel 2005. **Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino**, 2005. p.69.

ORDUÑA, R. M. Climate changes associated effects on grape and wine quality and production. **Food Research International**. v. 43, p. 1844-1855. 2010.

OSORIO, C. *et al.* Colour and flavour changes during osmotic dehydration of fruits. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 8, n.3, p. 353-359. 2007.

OUGH, C. S.; AMERINE, M. A. **Methods for analysis of must and wine** 2.ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1988.

PAN, W. *et al.* Kinetics of sugar, organic acids and acetaldehyde during simultaneous yeast-bacterial fermentations of white wine at different pH values. **Food Research International**. v. p. 2011.

PARR, W. V. *et al.* The distinctive flavour of New Zealand Sauvignon blanc: Sensory characterisation by wine professionals. **Food Quality and Preference**. v. 18, n.6, p. 849-861. 2007.

PEREIRA, V. *et al.* Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure. **Journal of Chromatography A**. v. 1189, n.1-2, p. 435-443. 2008.

PERES, R. G. *et al.* Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Control**. v. 20, n.6, p. 548-552. 2009.

RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.*, Eds. **Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications**. England: John Wiley & Sons, v.1, 2 ed. 2006.

RIZZON, L. A.; DALL'AGNOL, I., Eds. **Vinho Tinto - Coleção Agroindústria Familiar**. Brasília: Embrapa, 1. ed. 2009.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J.; MANFROI, L. Processo de Produção. In. **Processamento de Uva, Vinho Tinto, Grapa e Vinagre**: Embrapa, 2004

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Acidez na vinificação em tinto das uvas Isabel, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc. **Ciência Rural**. v. 32, n.3, p. 511-515. 2002.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Correção do mosto da uva Isabel com diferentes produtos na Serra Gaúcha. **Ciência Rural**. v. 35, n.2, p. 450-454. 2005.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 20, p. 115-121. 2000.

RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C.; MIELE, A. Efeito da fermentação malolática na composição do vinho tinto. **Ciência Rural**. v. 27, n.3, p. 497-500. 1997.

ROMBALDI, C. V. *et al.* Produtividade e qualidade de uva, cv. Isabel, em dois sistemas de produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, p. 89-91. 2004.

RUIZ, P. *et al.* Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. **International Journal of Food Microbiology**. v. 137, p. 230-235. 2010.

SALMON, J.-M.; BARRE, P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n.10, p. 3831-3837. 1998.

SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 29, n.2-3, p. 213-231. 1996.

SMIT, A. Y.; DU TOIT, W. J.; DU TOIT, M. Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache. **South African Journal of Enology and Viticulture**. v. 29, n.2, p. 109-127. 2008.

SOLEAS, G. J.; CAREY, M.; GOLDBERG, D. M. Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines. **Food Chemistry**. v. 64, n.1, p. 49-58. 1999.

SOUFLEROS, E. H. *et al.* Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. **Food Chemistry**. v. 80, n.2, p. 261-273. 2003.

SOUFLEROS, E. H. *et al.* Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. **Food Chemistry**. v. 101, n.2, p. 704-716. 2007.

SOUZA, S. C. *et al.* Bioactive amines in Brazilian wines: types, levels and correlation with physico-chemicals parameters. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, n.1, p. 53-62. 2005.

TECCHIO, F. M.; MIELE, A.; RIZZON, L. A. Composição físico-química do vinho Bordô de Flores da Cunha, RS, elaborado com uvas maturadas em condições de baixa precipitação. **Ciência Rural**. v. 37, n.5, p. 1480-1483. 2007.

TONIETTO, J., Ed. **O conceito de denominação de origem: uma opção para o desenvolvimento do setor vitivinícola brasileiro**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, p.20, 1 ed. 1993.

UVIBRA. **Produção de uva, elaboração de vinhos e derivados**. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva1998-2008.pdf>. Acesso em: 20 junho 2009.

YANG, J.; MARTINSON, T. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**. v. 116, n.1, p. 332-339. 2009.

ZOTOU, A.; LOUKOU, Z.; KARAVA, O. Method development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography **Chromatographia**. v. 60, p. 39-44. 2004.