José de Oliveira Fernandes

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM VINHOS DO PORTO E EM MOSTOS

APLICAÇÃO AO ESTUDO DA SUA ORIGEM E EVOLUÇÃO EM VINHOS DO PORTO



2001

JOSÉ DE OLIVEIRA FERNANDES

Licenciado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Porto

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM VINHOS DO PORTO E EM MOSTOS

APLICAÇÃO AO ESTUDO DA SUA ORIGEM E EVOLUÇÃO EM VINHOS DO PORTO

2001

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM VINHOS DO PORTO E EM MOSTOS

APLICAÇÃO AO ESTUDO DA SUA ORIGEM E EVOLUÇÃO EM VINHOS DO PORTO

JOSÉ DE OLIVEIRA FERNANDES

Licenciado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Porto

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM VINHOS DO PORTO E EM MOSTOS

APLICAÇÃO AO ESTUDO DA SUA ORIGEM E EVOLUÇÃO EM VINHOS DO PORTO

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

PORTO

2001

Trabalho realizado no Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob a orientação da Professora Doutora Margarida A. Ferreira

E há todos aqueles que são ignorantes dessas coisas (os alimentos) e não lhes têm qualquer consideração.
Como podem eles compreender as doenças dos homens?

Hipócrates

Sabemos sempre mais do que os outros julgam que nós sabemos,
mas sempre menos do que nós próprios julgamos saber.

Vergílio Ferreira

AGRADECIMENTOS

À Professora Margarida Ferreira agradeço, muito reconhecido, a supervisão científica, o incentivo permanente, a total disponibilidade, que nem sempre terei aproveitado devidamente, bem como o esforço permanente para criar as condições necessárias ao desenrolar deste trabalho. Espectador privilegiado da sua acção à frente do Serviço de Bromatologia da FFUP e da sua luta apaixonada pela valorização de uma área do conhecimento cuja integração plena no âmbito das Ciências Farmacêuticas é muitas vezes alvo de escolhos injustificáveis, foi com um misto de surpresa e de desencanto que a vi, pela primeira vez, deixar-se bater pelo desânimo e decidir partir para outras batalhas que não a da Bromatologia. Penso que o melhor tributo que lhe poderemos fazer é o de termos sempre presente que as sementes custam muito a germinar enquanto as plantas podem cair ao mais ligeiro abanão.

À Doutora Beatriz Oliveira, actual responsável pelo Serviço de Bromatologia da FFUP e "velha" colega das lides laboratoriais, desejo manifestar o meu sincero reconhecimento pela sua disponibilidade e sentido de colaboração e, em especial, pela sua acção decisiva na concretização das condições que se revelaram indispensáveis para a conclusão do trabalho experimental realizado nesta dissertação.

Aos meus "pupilos", a Sara e o Miguel, um agradecimento especial por toda a ajuda prestada, em especial no tão valioso quanto "invisível" trabalho de secretaria, que incluiu a pesquisa e a recolha de uma grande parte das referências bibliográficas usadas e a colaboração na execução gráfica de uma porção substancial da tese (gráficos, espectros e cromatogramas, em especial). Manifesto-lhes igualmente o meu reconhecimento pelo seu constante encorajamento, pela sua permanente disponibilidade e pela sua contribuição decisiva para ajudar a ultrapassar os dias de "desânimo cromatográfico".

Às restantes colegas do Serviço de Bromatologia, nomeadamente à Eulália, à Dra. Ema, à Isabel, à Susana e à Olívia (esta na qualidade de membro honorário do Serviço) agradeço a solidariedade sempre demonstrada e a resposta pronta a todos os pedidos de auxílio. Uma palavra também de agradecimento pelo apoio e a amizade da Irene e da Rosa. Ah! e um abraço ao Duarte, agora a iniciar-se nestas andanças.

À firma Barros, Almeida & CA. — Vinhos S.A., agradeço reconhecidamente toda a colaboração prestada, em particular na cedência das amostras de uvas e de vinhos usadas para a realização do trabalho. Uma palavra especial para o Eng. Soares, o Eng. Manso e o Eng. José Maria pela forma entusiasmada e solícita com que sempre esclareceram todas as minhas dúvidas.

Ao colega Rui Ramos agradeço igualmente a cedência de algumas das amostras de vinhos analisadas bem como a solidariedade sempre manifestada.

Ao colega Rui Alves agradeço a valiosa ajuda prestada para a realização das análises discriminantes. Destaco em particular as doses bem "ponderadas" de paciência, empenhamento, entusiasmo e rigor que sempre coloca na realização de qualquer trabalho. Um dia destes terá de me revelar o algoritmo usado.

Para o Carlos Afonso vai o meu agradecimento especial para a ajuda prestada nas questões ligadas à nomenclatura química (e não só), na certeza de que os erros que persistiram são da minha inteira responsabilidade.

Ao Professor Costa Lima dedico o prémio de maior incentivador (então Zé, como vai isso? ... pronto está bem, vamos falar de outra coisa ... foi um monólogo a que o forcei dezenas de vezes e do qual me penitencio). Aproveito para agradecer reconhecidamente a amizade com que me distingue e para publicamente lhe prometer que daqui para a frente os prazos serão para cumprir !!!

À Professora Manuela Moreira agradeço a disponibilidade e a colaboração prestada.

Aos meus amigos, que me dispensarei de nomear pois todos se saberão reconhecer nesta definição, manifesto a minha gratidão pelo interesse sempre manifestado pelo desenvolvimento do trabalho e pelas palavras de encorajamento que sempre me dirigiram. Dentre eles, contudo, terei de referir dois, por aquilo que de especial representam para mim, como todos os outros compreendem. Ao meu "compadre" Dr. Vilar não só agradeço o especial carinho com que sempre me brindou, como lhe prometo solenemente que nunca mais estarei 15 dias sem lhe telefonar. Ao meu sempre amigo Dr. Queirós apenas uma palavra emocionada para lhe dizer que o Mundo sem ele se tornou bem menos interessante.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, a cujo corpo docente tenho a honra de pertencer, agradeço a oportunidade que me concede de me proporcionar a possibilidade de fazer aquilo que mais gosto. Uma palavra especial para o actual Presidente do Conselho Directivo, Professor J. M. Sousa Lobo, pela sua especial responsabilidade no suporte financeiro indispensável à realização deste trabalho. Quanto à amizade com que me distingue, apenas lhe direi que é um privilégio que não deixarei nunca de tentar retribuir.

Aos meus pais agradeço as portas que sempre ajudaram a abrir mesmo quando desconheciam o que estava do outro lado. À restante família agradeço também o apoio e a confiança que sempre me transmitiram bem como a compreensão pelas minhas faltas e ausências.

Por fim, uma homenagem especial à Fátima, ao Tó, à Catarina e à Filipa, a quem dedico este trabalho. Foram eles os grandes prejudicados pelos dias sem fim em que o convívio foi substituído pelo isolamento no escritório, foram eles que passaram férias com o pai/marido a acompanhar pelo telefone. Finalmente o "livro" está pronto e vou já tratar do prometido passeio à Holanda.

RESUMO

A presença de aminas biogénicas em alimentos constitui um importante problema de segurança alimentar dada a sua implicação em fenómenos de intolerância e intoxicação. No trabalho de dissertação apresentado pretendeu-se contribuir para um melhor esclarecimento desta temática, actuando-se a dois níveis distintos: 1. Desenvolvimento de novos métodos analíticos para o doseamento de uma larga gama de aminas biogénicas habitualmente encontradas nos alimentos. 2. Estudo da origem e da evolução deste tipo de compostos em vinhos do Porto.

Assim, desenvolveram-se e optimizaram-se três diferentes métodos analíticos, baseados no uso da técnica de cromatografia gasosa - espectrometria de massa, capazes de permitir uma correcta quantificação das aminas biogénicas de interesse em mostos e em vinhos do Porto e de se constituírem como métodos de referência para o doseamento deste tipo de compostos. O primeiro desses métodos consistiu no uso de um processo prévio de extracção das aminas por um agente de par-iónico, seguido da derivatização dos compostos com anidrido heptafluorobutírico. Foi usado na determinação de aminas aromáticas, de diaminas e de poliaminas, todas elas caracterizadas pela sua reduzida volatilidade. O segundo desses métodos baseou-se no mesmo processo de extracção, seguido de uma derivatização com brometo de pentafluorobenzilo, tendo sido usado na determinação de histamina. O terceiro método desenvolvido consistiu num processo de derivatização bifásico com cloroformato de isobutilo, aplicado directamente sobre as amostras. Foi usado na determinação de todas as aminas estudadas, voláteis e não-voláteis, com excepção da histamina e das poliaminas.

Em todos os casos, procedeu-se a uma criteriosa escolha dos padrões internos mais adequados para as diversas classes de aminas, tendo-se optado sempre que possível pelo uso de isótopos deuterados. A quantificação foi feita no modo de monitorização selectiva de iões, de modo a potenciar os níveis de sensibilidade permitidos pelo equipamento analítico.

Os três métodos desenvolvidos foram aplicados no estudo da composição em aminas biogénicas de mostos monovarietais usados na elaboração de vinhos do Porto, de vinhos do Porto monovarietais recém-elaborados e de amostras de vinhos do Porto dos tipos "Tawny" e "Vintage" com diferentes tempos de envelhecimento. Os resultados obtidos permitiram avanços consideráveis na caracterização de mostos e de vinhos do Porto de distintos tipos e idades no que respeita à presença de aminas, a qual é globalmente inferior à referida para outros tipos de vinhos.

ABSTRACT

The presence of biogenic amines in food constitutes an important food safety problem, due to its implication in phenomena of food intolerance and intoxication. Throughout the thesis we have aspired to contribute to a better enlightenment of these themes working in two different levels: 1. Development of new quantitative methods for determining a large range of biogenic amines, usually found in foods. 2. Study of the origin and evolution of this kind of compounds in Port wines.

Three different analytical methods were therefore developed and improved, based on the use of gas chromatography/mass spectrometry technique, which enable both a correct quantification of the biogenic amines with interest in musts and Port wines and constitute themselves as reference methods for determining this kind of compounds. The first of those methods consisted of using a previous ion-pair extraction of the amines, followed by derivatization of compounds with heptafluorobutyric anhydride. It was used for determining aromatic amines, diamines and polyamines, all of them characterized by their lessened volatility. The second of those methods was based on the same ion-pair extraction procedure, followed by a derivatization with pentafluorobenzyl bromide, which was used for the determination of histamine. The third method developed consisted of a two-phase derivatization procedure with isobutyl chloroformate directly applied in the samples. It was used in the determination of all studied amines, both volatile and non-volatile, except for histamine and polyamines.

In all cases an accurate selection of the most adequate internal standards for several classes of amines was made, having been chosen the use of deuterated isotopic analogues as far as possible. The quantification was achieved in the selected ion-monitoring mode in order to take advantage of the improved sensibility levels given by the analytical equipment.

The three developed methods were applied in the study of the constitution of biogenic amines from samples of varietal musts, used in the elaboration of Port wines, of varietal young Port wine samples and of samples of aged "Tawny" and "Vintage" Ports. The obtained results allowed considerable advances in the characterization of musts and Port wines of distinct types and age, as far as the presence of amines is concerned, which is globally lower than the one referred to other types of wines.

RÉSUMÉ

La présence d'amines biogènes dans certains aliments constitue un problème considérable de sécurité alimentaire dû à leur engagement dans des phénomènes d'intolérance et d'intoxication. Le travail de dissertation présenté a essayé de contribuer à mieux éclaircir ce sujet, en opérant à deux niveaux différents: 1. Développement de nouvelles méthodes analytiques pour le dosage d'une large variété d'amines biogènes habituellement trouvées dans les aliments. 2. Étude de l'origine et de l'évolution de ce type de composés dans les vins de Porto.

Ainsi, on a mis au point trois différentes méthodes analytiques fondées dans la technique de chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse, capables de permettre une quantification correcte des amines biogènes d'intérêt dans des moûts et vins de Porto et de se constituer comme méthodes de référence pour le dosage de ce type de composés. La première de ces méthodes a consisté à l'usage d'un procédé préalable d'extraction des amines par un agent au pair-ionique, suivi de la derivatisation des amines avec anhydride heptafluorobutyrique. Cela a été utilisé pour déterminer des amines au noyau aromatique, des diamines et des poliamines, caractérisées, sans exception par leur réduite volatilité. La deuxième de ces méthodes s'est basée dans le même procédé d'extraction, suivi d'une autre réaction de derivatisation avec bromure pentafluorobenzylique, et a été utilisé dans la détermination d'histamine.La troisième méthode développée a consisté à un procédé de derivatisation en deux phases avec chloroformate isobutylique, appliqué directement sur les échantillons. Cela a été utilisé pour déterminer toutes les amines étudiées, volatiles et non volatiles, sauf l'histamine et les poliamines.

En tous ces cas, on a procédé à un choix sensé des standards internes les plus adéquats aux diverses classes d'amines, en privilégiant si possible l'usage d'isotopes de deutérium. La quantification a été faîte dans le mode de programmation sélective d'ions, de façon à tirer profit des niveaux de sensibilité permis par l'équipement analytique.

Les trois méthodes développées ont été appliquées à l'étude de la composition en amines biogènes de moûts des cépages plus importants usées dans l'élaboration des vins de Porto, de vins de Porto jeunes obtenues à partir du moût d'une seule cépage et d'échantillons de vins de Porto des types "Tawny" et "Vintage" avec de différents temps de vieillissement. Les résultats obtenus ont permis des progrès considérables dans la caractérisation de moûts et vins de Porto de types et âges différents en ce qui concerne la présence d'amines biogènes qui est globalement inférieure par rapport à celle qu'on fait référence pour d'autres types de vins.

ABREVIATURAS*

AOAC	Instituição oficial dos Estados Unidos responsável pelo estabelecimento de métodos analíticos oficiais para a análise de produtos alimentares (Association of Official Analytical Chemists)
AQC	Carbamato de 6-aminoquinoloil-*N*-hidroxisuccinimidilo
BEHPA	Hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo) (Bis(ethylhexyl)phosphate)
DAO	Diamino-oxidase
FMOC	Cloroformato de 9-fluorenilmetilo
GC	Cromatografia Gasosa ou Cromatografia Gás-Líquido (Gas Chromatography ou Gas-Liquid Chromatography)
GC-MS	Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (Gas Chromatography – Mass Spectrometry)
HMT	Histamina-*N*-metiltransferase
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficência (High Performance Liquid Chromatography)
IVP	Instituto do Vinho do Porto
M^+	Ião molecular. É o pico de um espectro de massa que corresponde à molécula ionizada, contendo apenas os isótopos de maior abundância natural
MAO	Monoamino-oxidase
min	Minutos
m/z	Relação massa/carga dos fragmentos iónicos formados num espectrómetro de massa; a massa é expressa em daltons ou unidades de massa atómica
NOC-Cl	Cloroformato de 2-naftilo
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho (Office Internationale de la Vigne et du Vin)
OPA	Ortoftaldialdeído
PCR	Reacção em cadeia da polimerase do ADN (Polymerase chain reaction)
PI	Padrão interno
PNZ-Cl	Cloroformato de *p*-nitrobenzilo
r	Coeficiente de correlação
R^2	Coeficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto

* Para várias das abreviaturas usadas, manteve-se a notação anglo-saxónica dado o seu carácter universal, logo, o seu mais fácil reconhecimento; nesses casos, a designação anglo-saxónica é aqui apresentada entre parêntesis a seguir à respectiva tradução em português.

SAX	Designação usual para colunas de extracção em fase sólida com propriedades de troca aniónica
SCX	Designação usual para colunas de extracção em fase sólida com propriedades de troca catiónica
SIM	Monitorização selectiva de iões (Selected ion monitoring)
SPE	Extracção em fase sólida
SPME	Micro-extracção em fase sólida
TLC	Cromatografia em cada fina (Thin layer chromatography)
TR	Tempo de Retenção
UV	Ultra-violeta; região do espectro electromagnético que abrange as radiações invisíveis com comprimento de onda situado entre 4 nm e 400 nm
VIS	Visível; região do espectro electromagnético que abrange as radiações visíveis (capazes de impressionar a retina), as quais apresentam um comprimento de onda situado entre 400 nm e 800 nm

Abreviaturas usadas para a designação das aminas nas Tabelas dos capítulos 7 e 8.

MA	Metilamina
DMA	Dimetilamina
EA	Etilamina
DEA	Dietilamina
IPA	Isopropilamina
IBA	Isobutilamina
2-MBA	2-Metilbutilamina
IAA	Isoamilamina
PIR	Pirrolidina
1,3-DAP	1,3-Diaminopropano
PUT	Putrescina
CAD	Cadaverina
EPMD	Espermidina
EPM	Espermina
2-FEA	2-Feniletilamina
TIR	Tiramina
HIST	Histamina

DESIGNAÇÕES ANGLO-SAXÓNICAS USADAS NESTE TRABALHO*

Bleeding	Fenómeno caracterizado pela saída da coluna e consequente chegada ao detector de pequenas porções da fase estacionária das colunas capilares, que se traduz num aumento da linha de base dos cromatogramas obtidos, tanto mais visível quanto mais a temperatura se aproxima da temperatura limite para a fase estacionária em causa.
Dwell-time	Tempo de monitorização de cada valor de *m/z*, regulável pelo operador, durante a operação de um aparelho de GC-MS em modo de monitorização selectiva de iões.
Insert	Peça de vidro de formato cilíndrico, aberta nas duas extremidades, colocada no interior de um sistema de injecção, no interior da qual é feita a introdução da amostra num sistema de cromatografia gasosa, ou seja, a transferência da amostra da seringa, onde é previamente colocada, para a coluna cromatográfica. Em língua inglesa é também designada por "liner".
Purge-off time	Termo usado para designar o tempo durante o qual a válvula de divisão permanece fechada durante uma injecção em modo "splitless".
Split	Termo usado para designar a divisão do fluxo gasoso durante a injecção num sistema de cromatografia gasosa.
Splitless	Termo usado para designar a ausência de divisão do fluxo gasoso durante a injecção num sistema de cromatografia gasosa.
Split-splitless	Termo usado para designar os injectores que permitem a opção pelo uso da técnica de injecção com divisão do fluxo (split) ou, alternativamente, pela técnica de injecção sem divisão do fluxo (splitless).
Software	Conjunto de programas que possibilita o funcionamento do computador no tratamento dos problemas que lhe são colocados.
Tailing	Fenómeno caracterizado pelo aparecimento de picos cromatográficos não simétricos (com cauda) que pode ser provocado por várias causas, das quais a mais importante costuma ser a interacção dos compostos com locais activos do sistema cromatográfico.

* Optou-se neste trabalho por manter a notação anglo-saxónica de algumas designações técnicas pelas mesmas razões apresentadas anteriormente para o uso de algumas abreviaturas, ou seja, o seu carácter universal e o seu mais fácil reconhecimento. Desta forma tentou evitar-se o "ruído" na leitura provocado pelo uso de traduções, nem sempre coincidentes entre os diversos autores.

ÍNDICE

Agradecimentos ---- VII
Resumo ---- IX
Abstract ---- X
Résumé ---- XI
Abreviaturas ---- XII

Introdução Geral. Objectivos e organização do trabalho ---- 1

PARTE TEÓRICA ---- 13

Capítulo 1. Aminas biogénicas em vinhos ----

1.1. Histamina e Aminas Aromáticas ---- 17
1.1.1. Introdução ---- 17
1.1.2. Importância da histamina e das aminas aromáticas no metabolismo humano ---- 18
1.1.2.1. Histamina ---- 18
1.1.2.1.1. Intolerância à histamina presente nos alimentos ---- 20
1.1.2.2. Tiramina e 2-feniletilamina ---- 28
1.1.2.2.1. Fenómenos de intolerância alimentar associados à presença de 2-feniletilamina e de tiramina ---- 31
1.1.3. Formação de histamina e de aminas aromáticas. Breve referência à sua presença noutros alimentos ---- 33
1.1.4. Teores de histamina e de aminas aromáticas em vinhos ---- 36
1.1.5. Estudos sobre a origem da histamina e das aminas aromáticas em vinhos ---- 46
1.1.5.1. Presença da histamina e das aminas aromáticas nos mostos ---- 47
1.1.5.2. Formação da histamina e das aminas aromáticas pelas leveduras envolvidas no processo de fermentação alcoólica ---- 48
1.1.5.3. Formação da histamina e das aminas aromáticas por acção bacteriana. Influência das condições de "vinificação em tinto" ---- 50
1.1.5.4. Evolução da histamina e das aminas aromáticas durante o processo de envelhecimento ---- 55
1.1.5.5. Outros factores com possível influência na formação da histamina e das aminas aromáticas em vinhos ---- 55
1.1.5.6. Acção de agentes clarificantes na remoção de histamina dos vinhos ---- 56
1.2. Diaminas e poliaminas naturais ---- 57
1.2.1. Introdução ---- 57
1.2.2. Importância das diaminas e das poliaminas no metabolismo humano ---- 59
1.2.3. Formação de diaminas e poliaminas. Breve referência à sua presença noutros alimentos ---- 67
1.2.4. Teores de diaminas e poliaminas em vinhos ---- 69

1.2.5. Estudos sobre a origem das diaminas e das poliaminas naturais em vinhos ---- 74
1.2.5.1. Presença das diaminas e das poliaminas nos mostos ---- 75
1.2.5.2. Formação das diaminas e das poliaminas pelas leveduras envolvidas no processo de fermentação alcoólica ---- 76
1.2.5.3. Formação das diaminas e das poliaminas por acção bacteriana ---- 77
1.2.5.4. Evolução das diaminas e das poliaminas durante o processo de envelhecimento ---- 78
1.3. Aminas voláteis ---- 79
1.3.1. Introdução ---- 79
1.3.2. Importância das aminas voláteis no metabolismo humano ---- 80
1.3.3. Formação das aminas voláteis. Breve referência à sua presença noutros alimentos ---- 82
1.3.4. Teores de aminas voláteis em vinhos e mostos ---- 85
1.3.4.1. Metilamina, etilamina e isoamilamina ---- 86
1.3.4.2. Outras aminas alifáticas ---- 90
1.3.4.3. Aminas alicíclicas (pirrolidina, piperidina e morfolina) ---- 91
1.3.5. Estudos sobre a origem das aminas voláteis em vinhos ---- 93
Bibliografia ---- 95

Capítulo 2. Metodologias analíticas usadas na determinação de aminas biogénicas em vinhos e mostos

2.1. Introdução ---- 113
2.2. Processos de extracção/purificação ---- 115
2.2.1. Extracção líquido/líquido ---- 116
2.2.2. Extracção em fase sólida ---- 118
2.2.3. Outros processos de extracção/purificação ---- 120
2.3. Métodos fluorimétricos ---- 121
2.4. Métodos cromatográficos ---- 124
2.4.1. Cromatografia em camada fina (TLC) ---- 124
2.4.2. Cromatografia de troca-iónica. Uso de Auto-analisadores ---- 125
2.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ---- 127
2.4.3.1. Agentes derivatizantes ---- 127
2.4.3.1.1. Ortoftaldialdeído (OPA) ---- 128
2.4.3.1.2. Cloretos de sulfonilo ---- 132
2.4.3.1.3. Cloretos de carbonilo (cloroformatos) ---- 137
2.4.3.1.4. Fluorescamina ---- 140
2.4.3.1.5. Outros agentes derivatizantes ---- 141
2.4.3.2. Agentes de par-iónico ---- 142
2.4.4. Cromatografia gasosa ---- 145
2.5. Outras técnicas analíticas ---- 150
Bibliografia ---- 155

PARTE EXPERIMENTAL ---- 165

Introdução ---- 167

Capítulo 3. Reagentes e equipamentos usados na execução da parte experimental desta dissertação

3.1. Reagentes ---- 177
3.1.1. Padrões de aminas ---- 177
3.1.2. Padrões internos deuterados ---- 178
3.1.3. Outros padrões internos ---- 178
3.1.4. Reagentes derivatizantes ---- 179
3.1.5. Outros reagentes ---- 179
3.1.6. Reagentes usados no método de HPLC ---- 180
3.1.7. Gases ---- 181
3.2. Equipamentos ---- 181
3.2.1. Sistemas de GC-MS ---- 181
3.2.2. Sistema de HPLC ---- 183
3.2.3. Outra aparelhagem ---- 183
3.2.4. Consumíveis ---- 184

Capítulo 4. Determinação de diaminas, poliaminas e aminas aromáticas em vinhos do Porto e em mostos. Desenvolvimento de uma metodologia baseada num processo de extracção por par-iónico e na análise por GC-MS, na forma de derivados heptafluorobutíricos

4.1. Introdução ---- 187
4.2. Procedimento analítico ---- 188
4.2.1. Processo de extracção ---- 188
4.2.1.1. Vinhos ---- 188
4.2.1.2. Mostos ---- 189
4.2.2. Processo de derivatização ---- 190
4.2.3. Condições operatórias ---- 190
4.2.4. Quantificação ---- 193
4.3. Desenvolvimento do método e discussão ---- 197
4.3.1. Processo de extracção ---- 197
4.3.1.1. Extracção de aminas por agentes de par-iónico. Considerações prévias ---- 197
4.3.1.2. Ensaios executados para o desenvolvimento do processo extractivo usado ---- 202
4.3.2. Processo de derivatização ---- 205
4.3.2.1. Derivatização de aminas com agentes acilantes. Considerações prévias ---- 205

4.3.2.2. Ensaios executados para o desenvolvimento do processo de derivatização usado ---- 209
4.3.3. Processo cromatográfico ---- 210
4.3.3.1. Escolha dos padrões internos ---- 210
4.3.3.2. Condições operatórias ---- 215
4.4. Validação do método ---- 223
4.4.1. Linearidade ---- 223
4.4.2. Precisão ---- 224
4.4.3. Recuperação ---- 226
4.4.4. Limites de detecção e de quantificação ---- 230
4.5. Conclusões ---- 230
Bibliografia ---- 233
Anexo 1. Espectros de massa dos derivados heptafluorobutíricos das aminas biogénicas estudadas ---- 237
Breve estudo dos espectros de massa apresentados ---- 251
Anexo 2. Curvas de recuperação das aminas biogénicas estudadas referentes a amostras de vinho do Porto e de mosto ---- 255

Capítulo 5. Determinação de histamina em vinhos do Porto e em mostos. Desenvolvimento de uma metodologia baseada num processo de extracção por par-iónico e na análise por GC-MS, na forma de tri(pentafluorobenzil)histamina

5.1. Introdução ---- 267
5.2. Procedimento analítico ---- 268
5.2.1. Processo de extracção ---- 268
5.2.2. Processo de derivatização ---- 268
5.2.3. Processo cromatográfico ---- 269
5.2.4. Quantificação ---- 270
5.3. Análise de histamina por cromatografia gasosa. Considerações prévias ---- 271
5.4. Desenvolvimento do método e discussão ---- 273
5.5. Validação do método ---- 279
5.5.1. Linearidade ---- 279
5.5.2. Precisão ---- 279
5.5.3. Recuperação ---- 280
5.5.4. Limites de detecção e de quantificação ---- 280
5.6. Conclusões ---- 285
Bibliografia ---- 289

Capítulo 6. Determinação de aminas biogénicas em vinhos do Porto e em mostos. Desenvolvimento de uma metodologia baseada num processo bifásico de derivatização com cloroformato de isobutilo e análise por GC-MS

6.1. Introdução ---- 293
6.2. Procedimento analítico ---- 294
6.2.1. Processo de derivatização ---- 294
6.2.2. Condições operatórias ---- 295
6.2.3. Quantificação ---- 298
6.3. Desenvolvimento do método e discussão ---- 301
6.3.1. Processo de derivatização ---- 301
6.3.1.1. Uso de cloroformatos na derivatização de aminas ---- 301
6.3.1.2. Desenvolvimento inicial de uma metodologia para a determinação de aminas em vinhos após derivatização com cloroformato de butilo. Razões do insucesso obtido ---- 307
6.3.1.3. Trabalho experimental realizado para a definição das condições de derivatização usadas ---- 310
6.3.2. Processo cromatográfico ---- 315
6.3.2.1. Escolha dos padrões internos ---- 315
6.3.2.2. Condições operatórias ---- 317
6.4. Validação do método ---- 345
6.4.1. Linearidade ---- 345
6.4.2. Precisão ---- 347
6.4.3. Recuperação ---- 347
6.4.4. Limites de detecção e de quantificação ---- 347
6.4.5. Comparação de métodos ---- 358
6.5. Conclusões ---- 361
Bibliografia ---- 363
Anexo 1. Espectros de massa dos derivados isobutoxicarbonílicos (carbamatos) das aminas biogénicas estudadas ---- 367
Breve estudo dos espectros de massa apresentados ---- 395
Anexo 2. Curvas de recuperação das aminas biogénicas estudadas referentes a amostras de vinho do Porto e de mosto ---- 403

Capítulo 7. Estudos sobre a presença de aminas biogénicas em mostos e em vinhos do Porto elementares recém-elaborados

7.1. Introdução ---- 429
7.2. Aminas biogénicas em mostos representativos das cinco castas mais usadas na elaboração de vinho do Porto: Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão ---- 430
7.2.1. Caracterização das amostras ---- 430
7.2.2. Resultados obtidos ---- 432
7.2.3. Discussão dos resultados ---- 438

7.3. Aminas biogénicas em vinhos elementares das cinco castas mais usadas na elaboração de vinho do Porto: Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão ---- 442
7.3.1. Caracterização das amostras ---- 442
7.3.2. Resultados obtidos ---- 444
7.3.3. Discussão dos resultados ---- 448
7.4. Análise discriminante ---- 451
7.4.1. Análise discriminante de mostos por castas ---- 453
7.4.2. Análise discriminante de mostos por anos ---- 454
7.4.3. Análise discriminante de vinhos por castas ---- 455
7.4.4. Análise discriminante de vinhos por anos ---- 456
7.5. Conclusões gerais sobre a presença de aminas biogénicas em mostos e em vinhos do Porto recém-elaborados ---- 458
Bibliografia ---- 460

Capítulo 8. Estudo do comportamento das aminas biogénicas durante o envelhecimento do vinho do Porto

8.1. Introdução. Breve abordagem sobre os diferentes tipos de envelhecimento do vinho do Porto ---- 465
8.2. Caracterização das amostras analisadas ---- 467
8.3. Resultados obtidos ---- 470
8.4. Discussão dos resultados e conclusões ---- 483
Bibliografia ---- 487

Conclusões Finais ---- 489

INTRODUÇÃO GERAL

OBJECTIVOS E ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

A presença nos alimentos de constituintes minoritários não nutritivos, com acção fisiológica relevante, nalguns casos benéfica mas a mais das vezes prejudicial para o consumidor, constitui um dos temas mais interessantes com que se confronta a comunidade científica da área da Nutrição e Bromatologia nos dias de hoje.

Com o advento de técnicas analíticas cada vez mais poderosas, tornam-se frequentes os relatos da descoberta de novos compostos nas mais variadas matrizes alimentares e a mesma dúvida surge repetidamente: terão os mesmos uma origem natural, em resultado de processos metabólicos endógenos ao próprio alimento ou às matérias-primas usadas na sua elaboração, ou serão provenientes dos mais diversos tipos de contaminações (químicas, microbianas, ambientais, etc.) que podem ocorrer durante o respectivo processamento?

Associados à presença nos alimentos de muitos destes compostos, surgem, muitas vezes, fenómenos de intolerância e de intoxicação alimentar que, nos casos extremos, podem atingir contornos extremamente graves, podendo levar inclusivamente à morte. Documentados desde os longínquos tempos de Hipócrates (séc. IV AC), que alertou para os perigos que alguns indivíduos podiam correr pela simples ingestão de certos tipos de queijos, os fenómenos de intolerância

alimentar foram durante muito tempo encarados como uma fatalidade, da qual os indivíduos dificilmente se poderiam livrar. Nas últimas décadas, a sua visibilidade tem aumentado a um ritmo galopante, em especial nos países industrializados, facto a que não é alheia a maior atenção dada pelos investigadores ao registo e descrição dos casos que, um pouco por toda a parte, vão ocorrendo.

No caso dos produtos alimentares elaborados com recurso a processos fermentativos, categoria na qual se integram os vinhos, a magnitude deste tipo de questões não pode senão ser ampliada e dotada de um carácter ainda mais complexo. Produto resultante da transformação dos tecidos vegetais de um fruto — a uva — por acção de microorganismos — leveduras e também bactérias lácticas — a composição do vinho reflecte forçosamente todo um conjunto de fenómenos bioquímicos, que vão da maturação da uva até à evolução que ocorre durante o seu envelhecimento, passando, obviamente, pelas etapas fermentativas e por toda uma série de processos metabólicos que têm lugar por acção dos microorganismos envolvidos.

Natural será, assim, a presença nos vinhos de um grande número de constituintes minoritários cuja detecção e identificação apenas se torna possível com as modernas ferramentas analíticas colocadas ao dispor dos investigadores, possibilitando, desta forma, um conhecimento mais profundo da verdadeira composição do produto. No caso de compostos com actividade fisiológica relevante, nomeadamente daqueles dotados de reconhecida toxicidade ou que possam estar envolvidos em fenómenos de intolerância, a sua correcta quantificação e o estudo das suas origens e dos factores implicados na sua formação tornam-se mesmo numa exigência para todos os investigadores empenhados nesta área, de forma a permitir a correcta avaliação dos factores de risco correlacionados com a ingestão do produto.

Exemplo de um grupo de compostos com as características atrás assinaladas é o das aminas biogénicas. Segundo a definição consensualmente aceite por vários autores, as aminas biogénicas correspondem a bases orgânicas de baixa massa molecular, dotadas de actividade biológica, que ocorrem naturalmente em animais superiores, plantas e microorganismos, em consequência do seu normal metabolismo. Sob esta definição, engloba-se um conjunto heterogéneo de substâncias com diferentes estruturas químicas, diferentes origens e diferentes acções biológicas mas que se caracterizam por possuir em comum a presença de uma função aminada e uma origem biológica.

De acordo com a sua estrutura química, as aminas biogénicas cuja presença nos vinhos já foi referenciada podem classificar-se da seguinte forma:

Aminas alifáticas

Monoaminas primárias: metilamina, etilamina, n-propil e isopropilamina, n-butil e isobutilamina, n-amil e isoamilamina, 2-metilbutilamina, hexilamina.

Monoaminas secundárias: dimetilamina, dietilamina.

Outras monoaminas: etanolamina

Diaminas:1,3-diaminopropano, 1,4-diaminobutano (putrescina), 1,5-diaminopentano (cadaverina), 1,6-diaminohexano.

Poliaminas: espermidina, espermina, agmatina.

Aminas aromáticas: 2-feniletilamina, tiramina.

Aminas *N*-heterocíclicas

Com anel aromático: histamina, *N*-metil-histamina, serotonina, triptamina.

Alicíclicas: pirrolidina, piperidina, morfolina.

No seu todo, trata-se de um conjunto de compostos largamente difundidos na Natureza, que actuam como substratos, intermediários ou produtos finais de distintos processos metabólicos dos diferentes tipos de seres vivos. Para lá do seu papel como fontes de armazenamento de azoto, algumas aminas biogénicas actuam como precursores da síntese de hormonas, de alcalóides, de ácidos nucleicos e de proteínas, desempenhando dessa forma um importante papel em várias funções fisiológicas dos seres vivos, como a regulação dos processos de crescimento celular, da temperatura corporal e da actividade cerebral.

Atendendo à sua larga distribuição, não será de estranhar a presença de aminas biogénicas de origem endógena em grande número de alimentos, tanto de origem vegetal como animal, ainda que em quantidades reduzidas. Algumas, as mais voláteis, podem mesmo desempenhar um papel importante ao nível das características aromáticas dos mesmos. As principais vias de formação incluem a descarboxilação de aminoácidos, a transaminação de compostos carbonílicos e a degradação de compostos azotados de diversa origem.

Segundo alguns autores, a maior parte das aminas biogénicas que se podem encontrar nos alimentos são formadas, todavia, como resultado de acções microbianas não controladas. Persistem, no entanto, muitas dúvidas sobre a real extensão deste fenómeno.

Nos produtos alimentares com elevada percentagem de material proteico, como o peixe e a carne, quando mal conservados, é usual a formação de elevadas quantidades de algumas aminas biogénicas, em especial de histamina, de aminas aromáticas, de diaminas e também de algumas aminas voláteis, como resultado de contaminações de origem microbiana. Nestes casos, o teor dessas aminas pode ser usado, com os devidos cuidados, como indicador do grau de contaminação do produto.

Nos alimentos obtidos por processos fermentativos, como os vinhos e os queijos, a presença de aminas biogénicas pode ter origem na própria matéria-prima, resultar da actividade dos próprios microorganismos envolvidos no processo ou, alternativamente, ter origem na actividade microorganismos "oportunistas" capazes de se desenvolver nas condições em que o processamento e a maturação do produto têm lugar.

A ingestão de alimentos ricos em aminas biogénicas deve ser prevenida atendendo aos problemas de ordem toxicológica que daí podem advir. O ser humano, quando em boas condições de saúde, é capaz de metabolizar facilmente, em muitos casos ainda no lúmen intestinal, as quantidades normais de aminas biogénicas presentes nos alimentos, dando lugar a produtos de degradação fisiologicamente inactivos. Na presença de elevadas quantidades de aminas biogénicas, o sistema de inactivação, no qual desempenham um papel fundamental duas enzimas — a monoaminooxidase (MAO) e a diaminooxidase (DAO) — pode revelar-se insuficiente para eliminar eficazmente a totalidade das aminas biogénicas presentes, permitindo a sua rápida absorção, entrada no sistema circulatório e os consequentes efeitos tóxicos. O problema agrava-se nos casos em que o referido sistema de inactivação se apresenta de alguma forma inibido, logo incapaz de desempenhar eficazmente a sua tarefa, o que pode acontecer por diversos motivos: a) deficiência congénita do

indivíduo; b) inibição por fármacos com actuação a esse nível, ou seja, inibidores da MAO e inibidores da DAO; c) presença simultânea de outros constituintes alimentares, como é o caso do etanol, o que assume especial relevância no caso das bebidas alcoólicas. Nestes casos, o resultado pode ser a ocorrência de manifestações típicas de intolerância alimentar as quais, em determinadas situações, podem atingir níveis de extrema gravidade.

No caso particular de algumas aminas, em particular as secundárias como a dimetilamina, a dietilamina, a morfolina, a piperidina e a pirrolidina, o principal problema da sua ingestão provem do facto de se tratarem de potenciais precursores para a formação de compostos *N*-nitrosados, designadamente de nitrosaminas, caracterizados pela sua actividade carcinogénica, e que constituem um grave problema de segurança alimentar.

Objectivos do Trabalho

O interesse acerca da presença de aminas biogénicas em vinhos e o seu possível efeito na respectiva qualidade está bem patente não só nas várias dezenas de trabalhos publicados sobre o assunto como no tratamento preferencial que lhe tem sido dedicado pelo organismo internacional responsável pela regulamentação do sector — Office International de la Vigne et du Vin (OIV) — onde o assunto tem sido discutido em praticamente todos as reuniões anuais desde 1983, nomeadamente ao nível da sub-comissão responsável pela avaliação da qualidade e pela unificação dos métodos de análise [OIV, 1983-1998].

A grande dispersão dos teores apresentados na literatura relativos à presença de algumas das aminas biogénicas nos vinhos e o carácter algo aleatório dos mesmos coloca muitas dúvidas quanto às suas origens, aos factores ambientais com maior influência na sua formação e, também, numa outra vertente, quanto à qualidade dos métodos de análise empregues. As propostas apresentadas por alguns países no sentido de serem estabelecidos limites máximos para a presença de aminas [Busto, 1996a], em especial de histamina, de longe a amina biogénica que é alvo do maior interesse por parte da comunidade científica, implicam a necessidade de um conhecimento profundo dos teores actualmente apresentados pelos diversos tipos de vinhos e uma exploração exaustiva dos caminhos a

percorrer no sentido de se conseguir uma efectiva redução desses teores e, dessa forma, se contribuir para aumentar a segurança dos consumidores.

Neste contexto, a presente dissertação teve como objectivo principal monitorizar a presença e estudar a possível origem e a evolução das aminas biogénicas em vinhos do Porto. A escolha da matriz teve em conta uma tripla vertente: a) por um lado, a importância que do ponto de vista económico o produto representa para o nosso país, onde contribui em mais de 50 % para o valor das exportações de produtos resultantes da actividade agrícola; b) por outro lado, a inexistência de dados consistentes relativos à presença de aminas biogénicas no produto, à sua origem e ao seu possível desenvolvimento durante os tradicionais processos de envelhecimento a que o vinho é habitualmente sujeito. c) finalmente, tendo em atenção as suspeitas que ciclicamente vão sendo lançadas quanto ao envolvimento do vinho do Porto em fenómenos de intolerância alimentar, as quais, embora não baseadas em quaisquer dados científicos e muitas vezes perseguindo objectivos de índole puramente comercial, acabam por criar um clima de desconfiança nos consumidores e afectar negativamente a imagem do produto.

Organização do Trabalho

Para a prossecução do objectivo traçado, foi realizado trabalho a dois níveis distintos mas complementares entre si. Assim,

1. Desenvolveram-se e optimizaram-se novos métodos analíticos, baseados no uso da técnica de cromatografia gasosa - espectrometria de massa, capazes de permitir uma correcta quantificação de todas as aminas biogénicas de interesse em mostos e em vinhos do Porto. Estas matrizes, caracterizadas pelo seu elevado conteúdo em açúcares, apresentam sempre dificuldades adicionais em relação aos vinhos em geral, já de si matrizes extremamente complexas capazes de colocar muitas dificuldades do ponto de vista analítico.

2. Procedeu-se à aplicação das metodologias desenvolvidas ao estudo da presença de aminas biogénicas em:

- Amostras de mostos monovarietais representativos das cinco castas mais usadas na elaboração de vinhos do Porto — Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão — obtidos em três anos consecutivos.

- Amostras de vinhos elementares (ou monovarietais) elaborados à escala industrial, por uma empresa do sector, a partir de mostos idênticos aos acima referidos.

- Amostras de vinhos do Porto sujeitas a dois distintos processos de envelhecimento e representativas das colheitas de 1974 até 1995 (vinhos "Tawny" – envelhecimento na presença de oxigénio atmosférico) e de 15 colheitas de 1970 a 1997 (vinhos "Vintage" – envelhecimento em garrafa, ao abrigo do ar).

Organização desta dissertação

A presente dissertação foi estruturada em 3 partes: (1) Parte Teórica, (2) Parte Experimental, (3) Conclusões Finais.

A **Parte Teórica** inclui 2 capítulos. No primeiro capítulo é feita uma revisão crítica sobre o actual estado do conhecimento no que respeita à presença de aminas biogénicas em mostos e vinhos, às suas causas e às suas possíveis consequências.

Tendo em atenção a origem diversificada das diferentes aminas biogénicas, a grande variabilidade dos respectivos efeitos fisiológicos e os diferentes graus de risco associados à sua ingestão optámos pela sua divisão em três grandes grupos, baseados na sua estrutura química e também na sua acção fisiológica: (1) Histamina e aminas biogénicas aromáticas, (2) Diaminas e poliaminas naturais, (3) Aminas voláteis.

O primeiro grupo, referente à histamina e às aminas caracterizadas pela presença de um anel aromático, inclui algumas das mais conhecidas e indesejáveis aminas biogénicas que se podem encontrar nos alimentos: para além da histamina, incluem-se aqui a tiramina e a 2-feniletilamina, compostos de estrutura aromática simples, muitas vezes apontados como causadores de fenómenos de intolerância e de intoxicação alimentar.

O segundo grupo é formado pelas diaminas e pelas poliaminas, compostos que ocorrem ubiquitariamente em todas as células vivas e desempenham importantes funções ligadas ao crescimento celular. A sua presença nos alimentos apresenta, em regra, contornos negativos, não tanto pela sua toxicidade, que é reduzida, mas pelo facto de funcionarem, pelo menos alguns deles, como indicadores de contaminações bacterianas indesejáveis e prejudiciais para a qualidade dos produtos.

Finalmente, no grupo das aminas voláteis estão incluídas todas as monoaminas alifáticas atrás referidas, nas quais se incluem compostos dotados de um carácter tóxico acentuado como a metilamina e etilamina, bem como as aminas *N*-heterocíclicas de carácter não aromático. Estas últimas, embora constituam um sub-grupo à parte, são aqui incluídas devido às características de volatilidade comuns às aminas alifáticas. Dentre elas, o destaque vai para a pirrolidina, a única cuja presença nos vinhos se verificou ser constante.

Para cada uma das 3 diferentes classes de aminas consideradas deu-se particular relevo à sua importância biológica e aos respectivos processos de formação e degradação em plantas — que leva à sua presença endógena nalguns alimentos incluindo as uvas, que constituem a matéria prima para a elaboração dos vinhos — em microorganismos — que leva à sua presença em produtos fermentados, como é o caso do vinho, ou em alimentos em geral sujeitos a contaminação bacteriana — e no homem — onde algumas, como a histamina e a tiramina, exercem uma acção fisiológica geralmente nefasta, e outras, como as poliaminas, exercem importantes funções ligadas aos processos de crescimento. É também feita uma revisão dos estudos até agora efectuados sobre a presença de aminas biogénicas em mostos e vinhos, as suas possíveis origens e a sua evolução.

No capítulo 2 apresenta-se uma revisão crítica, que se pretendeu o mais profunda possível, sobre as metodologias analíticas referidas na literatura para a determinação de aminas biogénicas em mostos e vinhos. Merecem referência especial as diversas metodologias baseadas na técnica de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC), de longe a mais popularizada entre os diversos autores, apontando-se para cada caso aqueles que nos pareceram os aspectos mais fortes e mais débeis das propostas apresentadas. São apresentadas também as diversas propostas alternativas ao uso de HPLC, com destaque para as metodologias baseadas na cromatografia gasosa e na electroforese capilar.

A **Parte Experimental** é dividida em seis capítulos, antecedidos de uma parte introdutória, na qual se justificam as opções tomadas e se dá conta de algumas das vicissitudes ocorridas durante a execução dos trabalhos, com importância para o rumo que o mesmo acabou por tomar.

O primeiro desses capítulos, o capítulo 3, é dedicado aos reagentes e equipamentos usados para a prossecução do trabalho experimental executado.

Os capítulos 4, 5 e 6 são dedicados aos três métodos desenvolvidos para a determinação de aminas biogénicas por cromatografia gasosa / espectrometria de massa em amostras de vinho do Porto e em mostos.

No capítulo 4 é descrito o método desenvolvido para a determinação de diaminas, poliaminas e aminas aromáticas após extracção por uma solução de hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo) (agente de par-iónico) em clorofórmio e derivatização com anidrido heptafluorobutírico.

No capítulo 5 é descrito o método desenvolvido para a determinação de histamina após aplicação do mesmo processo extractivo e derivatização com brometo de pentafluorobenzilo.

No capítulo 6 é descrito o método desenvolvido para a determinação de todas as aminas em estudo — com excepção da espermidina, da espermina e da histamina — após derivatização extractiva com cloroformato de isobutilo.

Em cada um dos capítulos, para além da descrição pormenorizada do método desenvolvido, é feita uma discussão do trabalho realizado e das opções tomadas — incluindo nessa discussão breves revisões sobre a aplicação analítica do método de derivatização em causa e também, no primeiro caso, da metodologia usada para a extracção das aminas — e são apresentados os resultados obtidos nos testes de validação executados. Em anexo são apresentados os espectros de massa correspondentes aos derivados obtidos e a respectiva elucidação assim como as "curvas de recuperação" obtidas para cada composto.

Nos capítulos 7 e 8 são apresentados os resultados obtidos na aplicação das diferentes metodologias às amostras de mostos e de Vinhos do Porto elementares recém-vinificados (capítulo 7) e às amostras de Vinhos do Porto envelhecidos do tipo "Tawny" e do tipo "Vintage" (capítulo 8), com a consequente discussão e o respectivo tratamento estatístico. É feita também a caracterização das amostras usadas (local de origem, modos de obtenção, elaboração e de conservação das amostras

e a sua caracterização analítica no que respeita ao teor alcoólico (vinhos), ao pH e ao teor dos principais ácidos orgânicos).

No final, é apresentada uma sistematização das **Conclusões** retiradas do trabalho efectuado, de acordo com os resultados obtidos.

As referências bibliográficas citadas são referidas no final de cada capítulo*.

*As citações feitas nesta parte introdutória estão incluídas na bibliografia correspondente ao capítulo 1.

PARTE TEÓRICA

CAPÍTULO 1

AMINAS BIOGÉNICAS EM VINHOS

1.1. Histamina e Aminas Aromáticas

1.1.1. Introdução

1.1.2. Importância da histamina e das aminas aromáticas no metabolismo humano

1.1.2.1. Histamina

1.1.2.1.1. Intolerância à histamina presente nos alimentos

1.1.2.2. Tiramina e 2-feniletilamina

1.1.2.2.1. Fenómenos de intolerância alimentar associados à presença de 2-feniletilamina e de tiramina

1.1.3. Formação de histamina e de aminas aromáticas. Breve referência à sua presença noutros alimentos

1.1.4. Teores de histamina e de aminas aromáticas em vinhos

1.1.5. Estudos sobre a origem da histamina e das aminas aromáticas em vinhos

1.1.5.1. Presença da histamina e das aminas aromáticas nos mostos

1.1.5.2. Formação da histamina e das aminas aromáticas pelas leveduras envolvidas no processo de fermentação alcoólica

1.1.5.3. Formação da histamina e das aminas aromáticas por acção bacteriana. Influência das condições de "vinificação em tinto"

1.1.5.4. Evolução da histamina e das aminas aromáticas durante o processo de envelhecimento

1.1.5.5. Outros factores com possível influência na formação da histamina e das aminas aromáticas em vinhos

1.1.5.6. Acção de agentes clarificantes na remoção de histamina dos vinhos

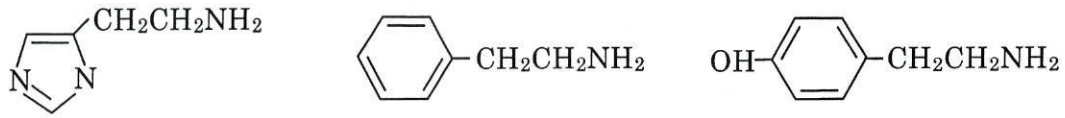
1.2. Diaminas e poliaminas naturais
1.2.1. Introdução
1.2.2. Importância das diaminas e das poliaminas no metabolismo humano
1.2.3. Formação de diaminas e poliaminas. Breve referência à sua presença noutros alimentos
1.2.4. Teores de diaminas e poliaminas em vinhos
1.2.5. Estudos sobre a origem das diaminas e das poliaminas naturais em vinhos
1.2.5.1. Presença das diaminas e das poliaminas nos mostos
1.2.5.2. Formação das diaminas e das poliaminas pelas leveduras envolvidas no processo de fermentação alcoólica
1.2.5.3. Formação das diaminas e das poliaminas por acção bacteriana
1.2.5.4. Evolução das diaminas e das poliaminas durante o processo de envelhecimento
1.3. Aminas voláteis
1.3.1. Introdução
1.3.2. Importância das aminas voláteis no metabolismo humano
1.3.3. Formação das aminas voláteis. Breve referência à sua presença noutros alimentos
1.3.4. Teores de aminas voláteis em vinhos e mostos
1.3.4.1. Metilamina, etilamina e isoamilamina
1.3.4.2. Outras aminas alifáticas
1.3.4.3. Aminas alicíclicas (pirrolidina, piperidina e morfolina)
1.3.5. Estudos sobre a origem das aminas voláteis em vinhos
Bibliografia

1.1. Histamina e Aminas Aromáticas

1.1.1. Introdução

Integram-se neste grupo algumas das aminas biogénicas cuja presença nos vinhos e noutros produtos alimentares tem sido objecto de um maior número de estudos, em consequência do seu possível envolvimento em problemas de intoxicação alimentar. O destaque principal vai para a histamina, composto de estrutura imidazólica que é de longe a amina biogénica mais estudada em todo o género de produtos alimentares, e para duas monoaminas aromáticas, a 2-feniletilamina e a tiramina (ver estruturas na Figura 1.1).

Outras aminas que também poderiam ser integradas neste grupo, dada a sua presença em diversos géneros alimentícios, são a serotonina e a triptamina, compostos de estrutura indólica; os dados disponíveis apontam, contudo, para a sua ausência em vinhos pelo que não serão aqui consideradas.



Histamina 2-Feniletilamina Tiramina

Figura 1.1. Estrutura das aminas aromáticas: histamina, 2-feniletilamina e tiramina.

A histamina ou 4-(2-aminoetil)imidazol é uma amina resultante da descarboxilação do aminoácido L-histidina, dotada de uma potente actividade fisiológica. O seu amplo espectro de actividades pode ser explicado em função das suas peculiares características estruturais. Trata-se, com efeito, de um composto com duas funções aminadas — pk_a do grupo amina primário da cadeia lateral 9,4; pk_a do grupo amina secundário da porção imidazólica 5,8 — que apresenta propriedades tautoméricas (características do grupo imidazólico) e a possibilidade de diferentes conformações na cadeia lateral. Uma pequena mudança de pH de 6 para 7 pode mesmo transformar o composto de dador em receptor de protões [Maslinski, 1975]. A pH fisiológico encontra-se geralmente na forma de monocatião, ou seja, com a função amina da cadeia lateral carregada positivamente.

A 2-feniletilamina e a tiramina — que corresponde à 2-feniletilamina hidroxilada — são aminas aromáticas resultantes da descarboxilação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, respectivamente. A primeira pode considerar-se um análogo estrutural da anfetamina, da qual só difere por esta apresentar um grupo metilo no carbono α, sendo por isso muitas vezes designada por "anfetamina natural". Encontram-se amplamente distribuídas nos seres vivos, exercendo no homem uma actividade simpaticomimética acentuada.

1.1.2. Importância da histamina e das aminas aromáticas no metabolismo humano

1.1.2.1. Histamina

De todas as aminas biogénicas, a histamina constitui aquela sobre a qual mais dados estão disponíveis no que respeita à sua actividade no organismo humano. Trata-se de um composto com

características vasodilatadoras acentuadas, que desempenha funções de mediador celular em muitas e importantes acções biológicas como sejam a regulação do conteúdo e quantidade das secreções gástricas e a mediação de reacções de hipersensibilidade e de reacções inflamatórias do organismo em resposta a agressões externas. Nos últimos anos tem vindo a ser reconhecido o seu papel como neurotransmissor a nível do sistema nervoso central.

A histamina ocorre em plantas e bactérias bem como em diversos tecidos animais, tendo já sido identificada como componente de venenos e outros tipos de secreções animais [Burkhalter *et al.*, 1998; Reite, 1972]. No homem é geralmente classificada como um autacóide ("auto" - próprio; "akos" - remédio), ou seja, uma substância com funções de hormona local embora carecendo de uma glândula própria para a sua produção [Babe e Serafin, 1996; Garrett, 1994]. Em pequenas doses fisiológicas trata-se de uma substância necessária e desejável ao funcionamento do organismo; em doses elevadas, normalmente com origem exógena ou em resposta à agressão de certos agentes externos, a histamina começa a manifestar os seus efeitos tóxicos, podendo mesmo transformar-se num tóxico de grande potência capaz de provocar, em casos extremos, a morte do indivíduo [Taylor, 1986].

No organismo humano, a histamina é produzida e armazenada no interior de grânulos situados em células especializadas, capazes de regular a sua libertação quando para tal solicitadas. À semelhança do que se verifica nos microorganismos, é sintetizada por descarboxilação da histidina por acção da histidino-descarboxílase, enzima dependente do fosfato de piridoxal. O mais importante depósito de histamina são os mastócitos, células presentes nos mais variados tecidos, embora nem sempre com características exactamente iguais [Lemanske *et al.*, 1983]. Outro importante depósito do composto corresponde aos basófilos sanguíneos, existindo ainda outros tipos de células com capacidade de armazenamento de histamina, embora com menor importância.

A libertação de histamina pode ocorrer como resultado de uma resposta alérgica do organismo ou ser induzida directamente. No primeiro caso, a resposta é mediada por anti-corpos (IgE) previamente ligados à superfície membranar dos mastócitos e capazes de, na presença do antigénio respectivo, desencadear uma série de eventos bioquímicos em cascata que levam à libertação da histamina e de uma série de outros componentes armazenados conjuntamente, nomeadamente heparina e diversas enzimas hidrolíticas [Babe e Serafin 1996]. A desgranulação directa dos mastócitos, sem prévia sensibilização, pode ser provocada por vários compostos,

geralmente com características básicas, incluindo polipeptídeos de origem endógena ou exógena e um grande número de agentes terapêuticos como a vancomicina, a morfina, etc.

A histamina exerce os seus efeitos por interacção com receptores presentes nas membranas celulares, sendo conhecidos três tipos diferentes de receptores, designados por H_1, H_2 e H_3. Os dois primeiros, que são os mais bem conhecidos, são susceptíveis de diferenciação com base na existência de agonistas e antagonistas específicos [Taylor, 1986].

Os receptores H_1, localizados principalmente na pele e em células do tracto respiratório e do tracto gastro-intestinal, foram os primeiros a ser descobertos tendo dado origem a uma série de drogas anti-histamínicas, de grande utilidade no tratamento de reacções alérgicas: derivados da etanolamina e da etilenodiamina, alquilaminas diversas, etc. Ao actuar sobre os receptores H_1, a histamina cumpre um papel fisiológico de defender o organismo frente a agentes estranhos, a danos mecânicos, queimaduras e infecções [Söllhuber e Avendaño, 1993]. A estimulação dos receptores H_1 origina a contracção da musculatura lisa do intestino, do útero e dos brônquios, a dilatação da musculatura lisa dos vasos sanguíneos e o incremento da permeabilidade das paredes dos capilares sanguíneos.

Os receptores H_2 situam-se maioritariamente nas paredes estomacais, sendo responsáveis pela produção de ácido clorídrico pelas células parietais. Uma situação patológica resulta numa hipersecreção clorídrica e na consequente formação de úlceras gástricas e duodenais. Os respectivos antagonistas (cimetidina, por ex.) são bastante eficazes no controlo destas situações mas também no tratamento de diversos outros fenómenos típicos da intoxicação histamínica [Blakesley, 1983].

Sobre os receptores H_3, cuja descoberta se deu na década de oitenta, são ainda escassos os conhecimentos actuais. Sabe-se que se encontram presentes nos tecidos cerebrais, onde provavelmente são responsáveis pela regulação da síntese e libertação de histamina implicada na transmissão nervosa, e também no aparelho respiratório e no sistema digestivo.

1.1.2.1.1. Intolerância à histamina presente nos alimentos

O fenómeno de intolerância à ingestão de histamina presente nos alimentos, habitualmente designado por intolerância histamínica — HIT na abreviação inglesa — ou por histaminose entérica,

tem vindo a ser alvo da atenção crescente de diversos grupos de investigadores alertados pela rápida expansão do número de ocorrências descritas na literatura. Pode ser definido do ponto de vista patofisiológico como uma pseudo-alergia devida à elevação repentina dos níveis plasmáticos e/ou teciduais de histamina em resultado da absorção gastro-intestinal de quantidades anormalmente elevadas do composto [Amon *et al.*, 1999; Jarisch e Wantke, 1996].

Embora sejam ainda vários os aspectos a necessitar de uma melhor e mais fundamentada explicação, devido, entre outras causas, à falta de um número suficiente de dados epidemiológicos, existe hoje uma evidência crescente de que a intolerância histamínica é uma das principais causas das manifestações de intolerância a determinados alimentos observadas num grande número de pessoas, em especial no que diz respeito à intolerância a bebidas alcoólicas e a outros produtos fermentados [Chandra, 1997; Wantke *et al.*, 1992, 1994].

De acordo com a classificação proposta em 1995 pelo "Subcomité de Reacções Adversas a Alimentos da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica", a intolerância a alimentos devido à presença de histamina e/ou outras aminas biogénicas pode ser caracterizada como não tóxica*, não imuno-mediada e de carácter farmacológico (Figura 1.2) [Bruinjnzeel-Koomen *et al.*, 1995]. Estima-se que afecte 0,2 % da população mundial [Young *et al.*, 1994] e é particularmente evidente após a ingestão de alimentos caracterizados por poderem apresentar teores elevados de histamina: queijos, vinhos, "pickles", peixes (em especial os da família do atum), enchidos, etc.

Os principais sintomas da intoxicação por histamina são conhecidos desde os trabalhos pioneiros de Dale [Dale e Laidlaw, 1910; 1912; 1919; Dale e Richards, 1918], citados por grande número de autores. Muitos desses sintomas resultam da acção do composto no sistema cardiovascular, principalmente por interacção com receptores H_1; a histamina provoca, deste modo, uma dilatação acentuada dos vasos sanguíneos periféricos que tem como resultado um estado geral de hipotensão e ainda manifestações secundárias facilmente visíveis como rubor da face e no nariz e cefaleia. O aumento da permeabilidade capilar também induzido pelo composto está na origem de sintomas como o edema generalizado, urticária e aumento da viscosidade sanguínea. A acção estimulante da histamina sobre o músculo cardíaco provoca o aumento dos respectivos batimentos e manifestações de palpitação.

* Entendem-se por tóxicas as reacções que ocorrem em todos os indivíduos, desde que a dose seja suficientemente alta. Entendem-se por não-tóxicas as manifestações de intolerância que só ocorrem em indivíduos susceptíveis.

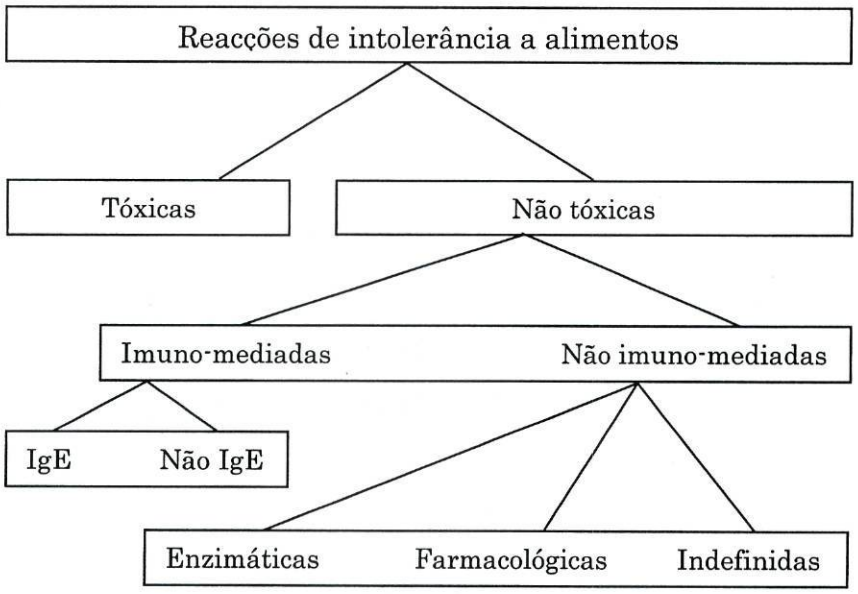


Figura 1.2. Classificação das reacções de intolerância humana a alimentos.

A nível do tecido muscular extravascular, a acção da histamina pode causar tanto a contracção como a relaxação, de acordo com o tipo de receptores envolvidos. No homem, o mais comum é a existência de fenómenos de contracção do tecido muscular liso, que se notam com maior frequência ao nível dos brônquios, podendo provocar uma acentuada dificuldade respiratória, e dos intestinos; em casos de intoxicação histamínica por via oral a acção do composto a nível intestinal é, obviamente, mais evidente, traduzindo-se em manifestações de espasmos abdominais, vómitos e diarreia. A estimulação do sistema nervoso central pode manifestar-se sob a forma de dor e zumbidos, fenómenos que normalmente acompanham as lesões urticárias no caso de intoxicações.

O quadro clínico atrás referido apresenta um grande paralelismo com o verificado em muitos casos de intolerância ou intoxicação alimentar supostamente causados pela presença de histamina. Nos casos mais simples, o fenómeno pode limitar-se à ocorrência de fortes dores de cabeça e de fenómenos de ruborescência da face, o que nalgumas pessoas é muito comum após a ingestão de vinho [Malone *et al.*, 1986; Peatfield, 1995; Settipane, 1987; Vaughan, 1994; Wantke *et al.*, 1993]. Nos casos mais graves, o quadro clínico pode assumir proporções particularmente drásticas, com a

manifestação simultânea da generalidade dos sintomas atrás indicados. Existem registos de grave intoxicação simultânea de um grande número de pessoas, incluindo alguns casos fatais por falência do sistema circulatório, subsequente à ingestão de peixe em mau estado de conservação, nas quais a histamina foi identificada como agente causal [Morrow *et al.*, 1991; Kan *et al.*, 2000].

Em condições normais, a presença de histamina na dieta não tem consequências nefastas, dado que o organismo não é capaz de absorver a histamina eficientemente a partir do tracto gastro-intestinal [Taylor, 1986]. Ao contrário do que acontece com a administração intravenosa de histamina, que produz imediatamente efeitos dependentes da dose, é de há muito conhecido que a administração oral de histamina não exerce efeitos tóxicos no homem, mesmo em doses significativamente superiores às que se podem encontrar em qualquer tipo de alimento. Weiss *et al.* [1932] administraram doses de 180 mg/L sem qualquer efeito visível. Resultados idênticos foram obtidos nos estudos de Granerus *et al.* [1968], neste caso com doses mais baixas, de 67,5 mg/L.

Esta impossibilidade de reproduzir com a administração isolada de histamina os efeitos tóxicos comprovadamente causados pela presença do composto, em doses muito mais baixas, em certo tipo de alimentos, foi designado por Taylor [1986] como o "paradoxo da histamina". Pode ser explicado pela existência nos alimentos envolvidos nos fenómenos de intoxicação de substâncias capazes de inibir o normal processo de inactivação de histamina a nível gastro-intestinal e dessa forma serem responsáveis pela absorção de grandes quantidades do composto.

O facto de a histamina ser absorvida com maior intensidade na presença de outros compostos foi verificado pela primeira vez em experiências em cobaios realizadas pelo grupo de Parrot [Parrot *et al.*, 1947; Gabe e Parrot, 1952]. Segundo aqueles autores, a histamina entérica apenas se mostrava biologicamente importante quando administrada simultaneamente com putrescina ou outra diamina similar. Embora o significado destas experiências tenha sido subavaliado durante muito tempo devido à falta de rigor dos métodos analíticos usados [Amon *et al.*, 1999], a sua validade encontra-se perfeitamente demonstrada, sabendo-se hoje que muitos outros compostos para além da putrescina são capazes potenciar a toxicidade da histamina.

Uma das hipóteses inicialmente colocadas quanto à forma de actuação dos potenciadores da histamina foi a destes impedirem, de forma competitiva, a ligação da histamina à mucina intestinal, processo essencial para retardar a absorção do composto. Embora seja ainda defendida em trabalhos recentes [Kanny *et al.*, 1997], esta hipótese é posta de parte pela generalidade dos autores, pelo menos

como a principal causa de potenciação da histamina. Para isso contribuíram uma série de resultados experimentais revistos por Taylor [1986].

A principal causa da ocorrência de manifestações de intoxicação histamínica subsequentes à ingestão de alimentos, parece residir na inibição das enzimas responsáveis pelo inactivação da histamina a nível do tubo digestivo, nomeadamente da diamino-oxidase (DAO), enzima que parece desempenhar um papel essencial nesse processo.

O tracto gastro-intestinal é rico em enzimas capazes de metabolizar a histamina ingerida com os alimentos e de impedir a sua absorção, na forma intacta, e a consequente entrada na corrente circulatória. Como se pode observar na Figura 1.3, a histamina é primariamente metabolizada por duas enzimas principais: uma é a já referida DAO, que converte o composto por desaminação em ácido imidazol-4-acético, o qual é normalmente conjugado com a ribose antes de ser eliminado; a outra é a histamina-*N*-metiltransferase (HMT), a qual converte a histamina em N^{τ}-metil-histamina, composto que é posteriormente metabolizado por acção de uma outra enzima extremamente abundante no tracto gastro intestinal, a monoamino-oxidase (MAO) com formação de ácido N^{τ}-metilimidazol-4-acético. Destas duas vias enzimáticas a primeira parece a mais importante [Bieganski *et al.*, 1983; Sattler *et al.*, 1989; Sjaastad e Sjaastad, 1974]. Embora esteja demonstrado o papel essencial da HMT no catabolismo da histamina no tracto respiratório [Yamauchi *et al.*, 1994], a sua presença no tubo digestivo é inclusivamente posta em causa por Wantke *et al.* [1996].

Os produtos finais do metabolismo da histamina são excretados na urina, onde também já se encontraram traços de N^{α}-metil-histamina e de N^{α},N^{α}-dimetil-histamina, cuja origem não é conhecida, e de *N*-acetil-histamina, este último composto com origem provavelmente na acção de bactérias intestinais [Beavan *et al.*, 1978].

A importância da inibição da DAO como justificação para a ocorrência de fenómenos de intoxicação histamínica foi sugerida inicialmente por Taylor e Lieber [1979], que demonstraram essa capacidade para muitas substâncias, incluindo algumas das aminas biogénicas habitualmente encontradas nos alimentos como a putrescina, a cadaverina, a agmatina e a tiramina. Em trabalhos posteriores, o mesmo grupo de autores concluiu que também a 2-feniletilamina, a triptamina e a serotonina são capazes de desempenhar esse papel [Hui e Taylor, 1985; Stratton *et al.*, 1991]. Idênticas conclusões foram retiradas dos diversos trabalhos do grupo do Prof. Sattler [Sattler *et al.*, 1985; Sattler *et al.*, 1988; Sattler *et al.*, 1989; Sattler e Lorenz, 1990]. Neste último, os autores verificaram em

modelos animais (suínos) que a administração de 600 mg de histamina podia provocar a morte no caso de uma forte inactivação desta via catabólica. Algumas aminas habitualmente presentes nos alimentos, como a tiramina, a 2-feniletilamina, a triptamina e a agmatina são também capazes de inactivar a HMT [Taylor e Lieber, 1979], assim como grande número de fármacos, incluindo agonistas e antagonistas dos receptores H_1 [Barth e Lorenz, 1978].

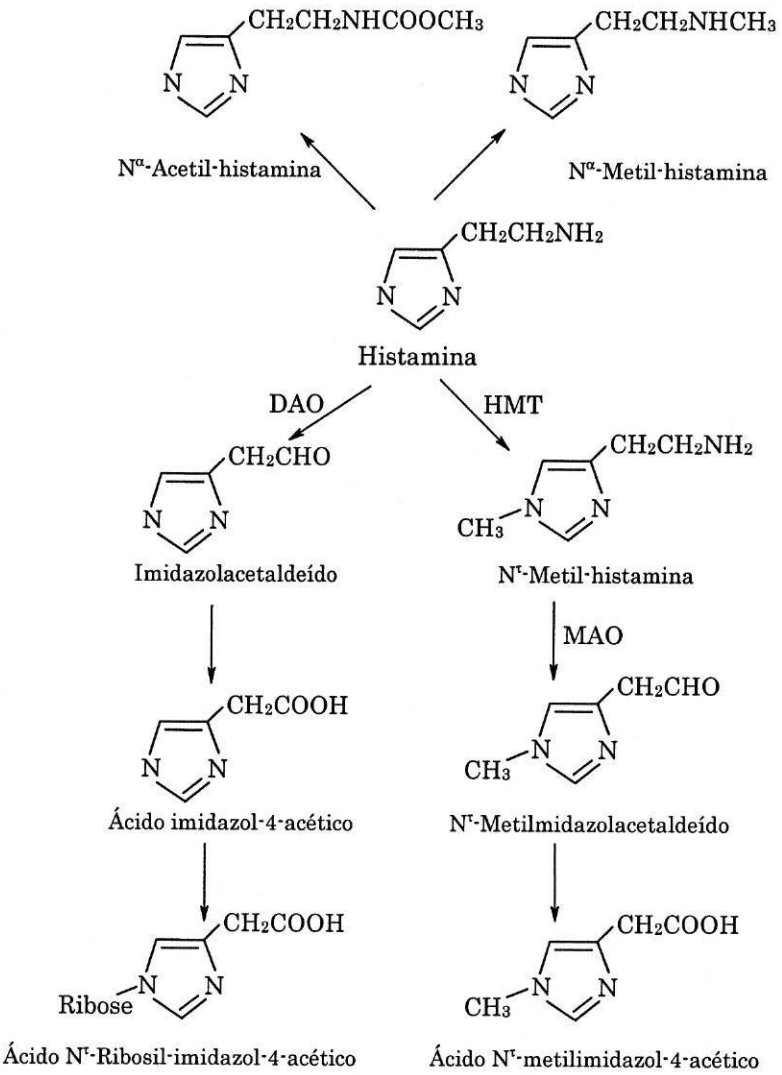


Figura 1.3. Vias metabólicas de inactivação da histamina.

A irregularidade verificada na ocorrência de fenómenos de intoxicação supostamente causados pela absorção gastro-intestinal de grandes quantidades de histamina não parece contudo depender exclusivamente da presença de compostos capazes de inibir a inactivação metabólica do composto.

No caso dos vinhos, parece assumir especial importância a presença de etanol. O possível efeito potenciador da acção da histamina provocado pelo etanol e pelo acetaldeído, que é o seu principal produto de metabolização, é conhecido há muito. Assume particular interesse uma comunicação de Mammoser *et al.* [1929], na qual os autores relatam o facto de uma mesma dose de histamina não ter provocado qualquer efeito visível numa série de voluntários usados na experiência, mas já ter provocado alterações a nível circulatório quando administrada juntamente com soluções alcoólicas a 15 e a 30 %. Experiências mais tarde realizadas em cobaios e em gatos confirmaram aqueles resultados [Marquardt e Werringloer, 1965].

Não existe, contudo, uma teoria definitiva relativa à forma como o etanol desempenha esse papel. As várias hipóteses surgidas foram recentemente sintetizadas por Kanny *et al.* [1997]. A primeira diz respeito ao papel desempenhado pelo composto, e também pelo acetaldeído, em modificar o epitélio intestinal, provocando a abertura das junções intercelulares e, dessa forma, facilitar a absorção dos componentes do bolo alimentar antes da sua inactivação enzimática. A segunda tem a ver com a capacidade apresentada pelo etanol de inibição da MAO, o que impediria a via catabólica da histamina em que intervem aquela enzima, e a capacidade apresentada por alguns dos seus produtos metabólicos em diminuirem a actividade da DAO, como foi comprovado em experiências em ratinhos [Sessa *et al.*, 1984]. Finalmente, uma terceira hipótese, respeita à possibilidade do etanol e do acetaldeído não actuarem ao nível gastro-intestinal, mas antes o de poderem provocar a desgranulação dos mastócitos com a consequente libertação de histamina, como foi demonstrado em experiências em animais [Dinda *et al.*, 1993; Myou *et al.*, 1994]. Neste sentido aponta também uma experiência realizada por Lowenberg *et al.* [1981], na qual se verificou um rápido aumento dos níveis sanguíneos de histamina em voluntários sujeitos à ingestão de 120 mL duma solução hidroalcoólica a 40 %, isenta de histamina. Segundo estes autores, esta libertação de histamina subsequente à ingestão de etanol pode não ser mais do que uma resposta fisiológica do organismo ao aumento de pH provocado no suco gástrico pela presença de etanol. A histamina libertada teria a função de activar as secreções gástricas e dessa forma repôr os valores de pH.

Outro factor que parece assumir uma relevância especial na ocorrência de fenómenos de intolerância/intoxicação alimentar associados à presença de histamina tem a ver com uma redução endógena na actividade da DAO presente no tracto gastro-intestinal. Este facto tem sido posto em evidência nos diversos trabalhos do grupo do Professor Jarisch [Jarisch *et al.*, 1992; Wantke *et al.*, 1992; Wantke *et al.*, 1993; Wantke *et al.*, 1994; Wantke *et al.*, 1996; Wantke *et al.*, 1999], que muito têm contribuído para o esclarecimento do fenómeno.

De acordo com os resultados obtidos nesses trabalhos, que incluem experiências com diversos tipos de pacientes, feitas através de rígidos protocolos com uso de placebos e um sistema de duplo controlo, os mesmos autores formularam uma teoria para a ocorrência de fenómenos de intolerância histamínica, que nos parece sintetizar bem o actual estado do conhecimento nesta área [Jarisch e Wantke, 1996]. Baseia-se nos seguintes pontos:

1. Grande número dos fenómenos de intolerância/intoxicação alimentar observados após a ingestão de vinhos e de outros alimentos caracterizados por poderem apresentar níveis elevados de histamina e de outras aminas biogénicas — queijos, salsichas curadas, tomates, "pickles" e peixes da família do atum — devem-se à elevação repentina dos níveis plasmáticos de histamina (nível médio $\geq$ 0,2 ng/mL).

2. A causa principal desse incremento dos níveis plasmáticos de histamina reside numa deficiente actividade da DAO presente no tracto gastro-intestinal (nível médio $\leq$ 0,07 nKat/L) apresentada pela generalidade dos pacientes envolvidos e com origem provavelmente congénita.

3. Embora assumam uma óbvia importância, não existe, porém, uma relação directa entre os teores de histamina encontrados nos alimentos e o aparecimento dos sintomas, mesmo nos pacientes com deficiente actividade da DAO.

   Existem uma série de outros factores que podem contribuir para o agravamento dos sintomas, designadamente todos os que podem contribuir para o aumento dos níveis plasmáticos de histamina ou, por outro lado, todos os que contribuem para uma ainda maior diminuição da actividade da enzima:

   Encontram-se no primeiro caso os fenómenos de libertação espontânea de histamina das células em que a mesma se encontra armazenada, os quais podem ser

originados por outros constituintes alimentares ainda não identificados, e os fenómenos de libertação de histamina por reacções do tipo alérgico, o que leva a que nestes pacientes o grau de risco esteja substancialmente aumentado.

A diminuição da actividade da DAO pode ser provocada:

- por outras aminas biogénicas presentes no alimento.
- por grande número de fármacos, incluindo alguns de uso bastante generalizado como o ácido clavulânico, a isoniazida e a prometazina, de entre um total de 94 já identificados pelos autores.
- pelo etanol, o que assume particular importância no caso da ingestão de vinhos.

Em geral, as mulheres apresentam menores índices de actividade da DAO do que os homens, com excepção das grávidas que apresentam uma actividade enzimática francamente aumentada; as crianças apresentam menores índices de actividade do que os adultos.

4. O tratamento preventivo ou curativo da doença pode ser feito, no imediato, pela administração de anti-histamínicos do tipo bloqueadores H_1, que impedem a acção da histamina plasmática, e, com menos eficiência, pela administração de Vitamina B_6 (fosfato de piridoxal) que é um co-factor crucial para a actividade da DAO.

5. Para os pacientes com dores de cabeça crónicas suspeitas de serem resultado de intolerância histamínica é sugerida a sujeição a um teste desenvolvido pelos autores — "The red wine provocation test". Em caso de lhes ser diagnosticada a doença, devem seguir uma alimentação o mais possível isenta de alimentos contendo histamina, o mesmo sendo sugerido a pacientes a seguir tratamentos de longa duração com qualquer uma das drogas capazes de inactivar a DAO.

1.1.2.2. Tiramina e 2-feniletilamina

Ao contrário da histamina, as duas aminas aromáticas com importância nos vinhos, a tiramina e a 2-feniletilamina, apresentam propriedades vasoconstrictoras acentuadas, podendo originar uma

forte constrição de todo o sistema vascular e a estimulação do músculo cardíaco. A sua acção mais bem documentada, e durante muito tempo considerada como única, consiste em provocar a libertação de catecolaminas das terminações nervosas simpáticas, actuando assim como agentes simpaticomiméticos indirectos [Hoffman e Lefkowitz, 1996; Moore, 1994].

Nos últimos anos, à medida que métodos analíticos cada vez mais sensíveis e específicos foram sendo aplicados, a presença destes compostos nos tecidos cerebrais e nos líquidos fisiológicos começou a despertar uma atenção crescente por parte de muitos investigadores, dada a importância que poderão assumir em determinados patologias. A 2-feniletilamina e a tiramina conjuntamente com seus produtos de hidroxilação, feniletanolamina e octopamina (Figura 1.4), são habitualmente designadas por aminas minoritárias ("trace amines" na designação inglesa). Encontram-se presentes no cérebro em concentrações duas ordens de magnitude mais baixas do que as catecolaminas e a serotonina [Boulton, 1976]. Essa baixa concentração é resultado, muito provavelmente, da sua grande susceptibilidade à MAO, a enzima responsável pela sua degradação. A sua acção, embora ainda não completamente elucidada, parece ser a de activadores sinápticos ou neuro moduladores capazes de manter a região sináptica numa espécie de estado de alerta e de, simultaneamente, regular a intensidade dos neurotransmissores clássicos [Blau, 1989].

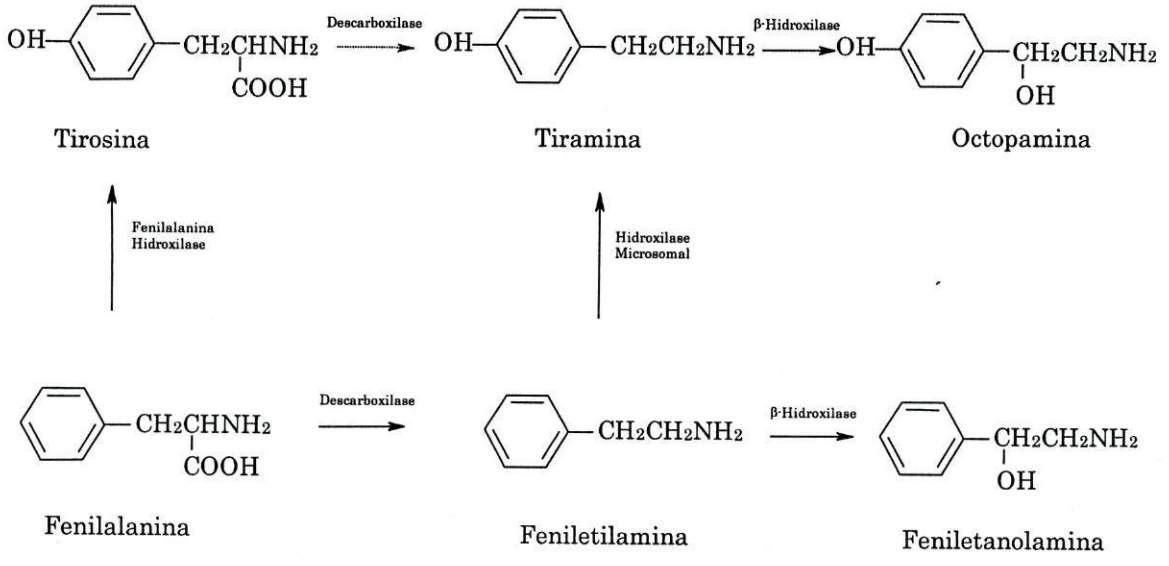


Figura 1.4. Inter-relações metabólicas entre a 2-feniletilamina e a tiramina.

A 2-feniletilamina pode ser considerada como a estrutura base a partir da qual todas aminas simpaticomiméticas derivam. Tem origem na descarboxilação enzimática da fenilalanina (Figura 1.4). Embora seja geralmente vista apenas como um neuromodulador excitatório, capaz de estimular a acção das catecolaminas e da serotonina a partir dos neurónios simpáticos, existem autores que postulam a existência de receptores específicos para o composto.

A administração de 2-feniletilamina a animais de experiência suscita numerosos sintomas do tipo excitatório [Diamond *et al.*, 1984; Greenshaw, 1984]. No homem é conhecida a sua implicação em diversas desordens psíquicas, incluindo crises de esquizofrenia [Sandler e Reynolds, 1976]. Na fenilcetonúria, doença metabólica hereditária caracterizada pela ausência no fígado da fenilalanina--hidroxilase, sabe-se que os seus níveis se encontram aumentados, tanto a nível plasmático como em diversos tecidos, mas o seu papel no desenvolvimento da doença não se encontra ainda bem elucidado [Blau, 1989]. Pelo contrário, níveis diminutos de 2-feniletilamina parecem estar relacionados com doenças depressivas, havendo indicações de que o efeito anti-depressivo manifestado por alguns fármacos que actuam por inibição da MAO seja consequência do aumento provocado nos níveis de 2-feniletilamina no organismo [Sabelli e Mosnaim, 1974].

A tiramina é também conhecida pelas suas propriedades simpaticomiméticas indirectas no organismo humano. Sabe-se que a sua presença no sangue pode estar na origem de fortes crises de hipertensão arterial, provavelmente como consequência da libertação massiva de catecolaminas dos tecidos, nomeadamente da nor-adrenalina [Hoffman, 1998; Hoffman e Lefkowitz, 1996; Moore, 1994]. Alguns autores sugeriram a possibilidade do composto agir como um "falso" neurotransmissor ou neurotransmissor "alternativo", capaz de interagir com um receptor da mesma forma que o "verdadeiro" neurotransmissor, mas com resultados ligeiramente diferentes [Blau, 1989].

Tal como acontece com a 2-feniletilamina, verificou-se que os níveis de tiramina aparecem aumentados em doentes com fenilcetonúria, o que à primeira vista não seria de esperar, dado a doença se caracterizar pelo bloqueio da síntese de tirosina, o aminoácido a partir do qual se forma. É hoje conhecido que a tiramina pode ser sintetizada directamente a partir da 2-feniletilamina, provavelmente por acção de uma hidroxilase microssomal (Figura 1.4) e que esta via biossintética pode nalguns casos ser mais proeminente do que a produção por descarboxilação da tirosina [Jonsson *et al.*, 1975].

1.1.2.2.1. Fenómenos de intolerância alimentar associados à presença de 2-feniletilamina e de tiramina

Tal como acontece com a histamina, a 2-feniletilamina e a tiramina são de há muito suspeitas de estar na origem de fenómenos de intolerância/intoxicação alimentar, em especial nos casos caracterizados por fortes cefaleias e outras manifestações de carácter hipertensivo que se seguem à ingestão de certos tipos de alimentos [Hannington, 1974]. A 2-feniletilamina, em particular, foi considerada como estando na origem de cefaleias ligadas à ingestão de vinho [Luthy e Schlatter, 1983], sendo também apontada como a principal causadora de cefaleias associadas à ingestão de chocolate, alimento onde está presente em teores apreciáveis [Dalton, 1975; Hannington, 1974]. A tiramina aparece associada a fenómenos de intolerância resultantes da ingestão de determinados tipos de queijos, caracterizados por apresentarem elevados teores do composto [Stratton *et al.*, 1991]. A sua implicação em fenómenos de intolerância a vinhos, em especial vinhos tintos, foi também sugerida por alguns autores.

Em condições normais, a 2-feniletilamina e a tiramina com origem exógena ou formadas no tracto gastrointestinal por descarboxilação dos respectivos aminoácidos precursores, por acção bacteriana, são rapidamente inactivadas pela acção da MAO, enzima muito abundante no tubo digestivo e no fígado. Estudos feitos com voluntários mostraram que a administração por via oral de 100 mg de tiramina é perfeitamente tolerada por pacientes normais [Moneret-Vautrin e André, 1983]. Em pacientes medicados com inibidores da MAO (IMAO), a ingestão de apenas 5-6 mg de tiramina pode, no entanto, dar lugar a uma subida rápida da tensão arterial, a administração de 10 mg pode ampliar o efeito hipertensor observado e a administração de 25 mg pode dar lugar a crises hipertensivas de grande gravidade [Ponto *et al.*, 1977]. De igual forma a administração de doses tão pequenas como 3 mg de 2-feniletilamina a pacientes com problemas de intolerância a alguns alimentos é passível de desencadear crises de hipertensão [Sandler *et al.*, 1974].

A explicação para as reacções de certos indivíduos à ingestão de alimentos contendo 2-feniletilamina e tiramina deve-se, muito provavelmente, e tal como no caso da histamina, a uma insuficiente actividade das enzimas responsáveis pela sua inactivação, quer por factores endógenos ligados ao próprio indivíduo quer por factores exógenos como a ingestão simultânea de outros compostos capazes de bloquearem a actividade enzimática.

Os casos mais bem estudados são os relacionados com pacientes tratados com IMAO, onde a inactivação enzimática é, obviamente, muito acentuada, pelo que não será de estranhar a ocorrência de fenómenos de intolerância. Estão descritos inúmeros casos de graves incidentes, alguns dos quais mortais, em pacientes sujeitos a tratamento com IMAO após ingestão de diversos alimentos, em particular de queijos [Price e Smith, 1971].

Os IMAO constituem um grupo de fármacos que apresentam, na sua grande maioria, uma acção antidepressiva, embora também possam ser usados no tratamento da doença de Parkinson. A sua acção não é sempre igual devido à existência de duas formas diferentes da enzima. Com efeito, o complexo enzimático monoamino-oxidase (MAO) tem duas formas isoenzimáticas com diferentes especificidades no que respeita aos substratos. A 2-feniletilamina é predominantemente metabolizada pela isoenzima MAO-B enquanto a tiramina é metabolizada tanto pela MAO-A como pela MAO-B. Os IMAO clássicos, como a tranilcipromina e a fenelzina, provocam uma acção irreversível sobre as duas formas isoenzimáticas, sendo eles que estão na origem de graves problemas associados à ingestão simultânea de alimentos, aparentemente pelo seu teor em tiramina. Todos eles, devido ao seu difícil manuseamento, encontram-se retirados do mercado português, embora ainda se encontrem disponíveis noutros países [Matos, 1994]. Actualmente, contudo, existem IMAO de acção reversível e específicos para a forma isoenzimática A (toloxatona, moclobemida, cimoxatona e brofaromina), os quais apresentam um risco de interacção com a tiramina substancialmente diminuído [Tiller *et al.*, 1986]. Por exemplo, foi demonstrado que pacientes tratados com cimoxatona podem tolerar 40 a 80 mg de tiramina administrados por via oral, enquanto os mesmos pacientes tratados com um IMAO clássico não toleram sequer 6 mg do composto [Dollery *et al.*, 1983]. A explicação reside não só no facto dos fármacos ao ligarem-se exclusivamente à MAO-A deixarem a MAO-B livre para metabolizar a tiramina como também no facto de a sua acção ser reversível, pelo que na presença de um excesso de tiramina podem deslocar-se da enzima, permitindo-lhe assim metabolizar esse excesso [Matos, 1994].

1.1.3. Formação de histamina e de aminas aromáticas. Breve referência à sua presença noutros alimentos

A histamina, a tiramina e a 2-feniletilamina são formadas por descarboxilação dos correspondentes aminoácidos por acção de enzimas descarboxilases (Figura 1.5). Estas podem ser endógenas à própria matéria prima, em especial quando se trata de produtos vegetais, ou terem origem em microorganismos descarboxilase-positivos presentes no meio, quer como contaminantes quer como responsáveis por processos fermentativos.

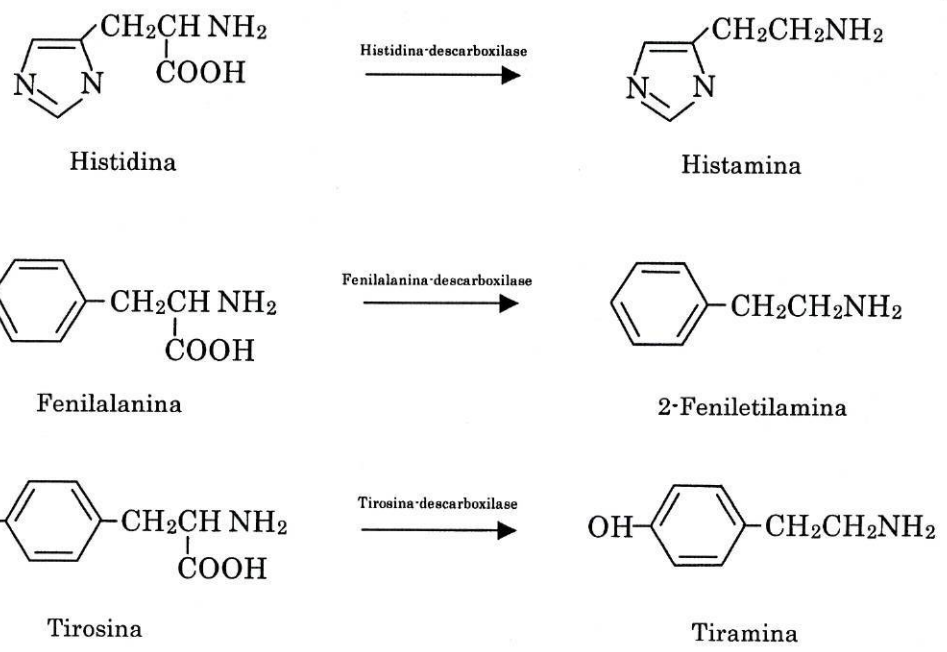


Figura 1.5. Formação de histamina, 2-feniletilamina e tiramina por descarboxilação dos aminoácidos correspondentes.

Os maiores teores de aminas verificam-se em alimentos sujeitos a processos de fermentação (queijos, produtos de charcutaria, pickles, etc.) ou em alimentos em estado de putrefacção. Por este motivo, a atenção dos investigadores tem estado preferencialmente dirigida para a origem microbiana dos compostos, havendo mesmo autores que afirmam que a presença de histamina (juntamente com

putrescina e cadaverina) em alimentos não fermentados pode ser usada como indicador de contaminação microbiana [Brink *et al.*, 1990; Karmas, 1981]. É conhecida, porém, a presença nos tecidos vegetais de uma enzima histidina-descarboxilase específica para a histidina enquanto a descarboxilação da tirosina e da fenilalanina nos mesmos tecidos pode ter lugar por acção de enzimas inespecíficas designadas por descarboxilases de aminoácidos aromáticos [Facchini *et al.*, 2000].

Não admira assim que esteja descrita a presença destas aminas nos produtos vegetais e, em particular nos frutos. Dos três compostos, a tiramina parece ser o mais abundante, estando a sua presença referenciada no ananás, no limão, na laranja e na tangerina, na banana, no abacate, na ameixa, na framboesa, na beringela, no tomate, na batata, nas sementes de cevada e de milho e nas folhas de espinafre [Smith, 1980-81]. Os teores encontrados nos frutos são, segundo Coutts *et al.* [1986], tipicamente inferiores a 5 mg/kg. A histamina foi encontrada em mais de uma dezena de frutos, incluindo bananas, laranjas, maçãs, pêras, ananases, cerejas, mas sempre em teores inferiores a 0,250 mg/kg [Feldman, 1983]. Os teores mais elevados parecem encontrar-se nos espinafres e nas beringelas, chegando a atingir os 60 mg/kg [Couttts *et al.*, 1986]. A 2-feniletilamina, cuja presença no chocolate foi já evidenciada por vários autores, parece encontrar-se nas sementes de cacau em muito baixo teor tendo a sua formação lugar apenas durante os processos de fermentação e de torra a que o cacau é sujeito.

Há alguns anos atrás, um grupo de autores alemães registou a presença das três aminas em questão (mais putrescina e cadaverina) em sumos, néctares e limonadas de diferentes frutos como laranjas, limões, morangos, uvas e framboesa, em quantidades geralmente inferiores a 1 mg/L, com excepção de uma amostra de sumo de framboesas obtido pelos autores em laboratório directamente a partir do respectivo fruto, no qual o teor de tiramina encontrado foi de 66,7 mg/L [Maxa e Brandes, 1993].

Não obstante estes resultados, que apontam para uma presença que pode ser importante da histamina e da tiramina em produtos naturais, encontra-se hoje de alguma forma bem documentada a responsabilidade de um considerável número de estirpes bacterianas na formação de histamina e de aminas aromáticas em produtos fermentados ou em alimentos sujeitos a processos de decomposição [Halász *et al.*, 1994; Brink *et al.*, 1990]. Tais estirpes caracterizam-se pela presença de uma ou mais enzimas descarboxilantes. Estas, embora não sejam enzimas largamente distribuídas entre as bactérias, foram já identificadas em várias espécies bacterianas pertencentes a distintos géneros [Rice

et al., 1976; Voigt e Eitenmiller, 1977], incluindo muitas espécies lácticas com actividade comprovada em processos fermentativos [Straub *et al.*, 1995; Sumner *et al.*, 1985]. Segundo o postulado por Rice *et al.* [1976], geralmente aceite pelos outros autores, a formação de histamina e de aminas aromáticas por acção bacteriana está dependente de três factores, a saber: a) presença de microorganismos descarboxilase-positivos; b) disponibilidade dos aminoácidos precursores; c) condições ambientais favoráveis à actividade enzimática.

Os teores apresentados pelos produtos fermentados podem apresentar variações muito grandes — da quase ausência a valores da ordem das centenas de mg/kg ou L — em especial de histamina e de tiramina. A tentativa de identificar correctamente os microorganismos responsáveis e, dessa forma, evitar a sua utilização nos processos fermentativos tem sido o objectivo de muitos investigadores com trabalho publicado na área, especialmente em queijos [Brink *et al.*, 1990; Joosten e Northolt, 1987; Joosten e Stadhouders, 1987; Ordónez *et al.*, 1997] e em produtos de charcutaria [Buncic *et al.*, 1993; Butturini *et al.*, 1995; Eerola *et al.*, 1996; Maijala *et al.*, 1995; Masson *et al.*, 1996; Santos, 1998].

Em certos peixes da família *Scombridae*, que inclui entre outros o atum e a cavala, quando em estado de decomposição bacteriana, os teores de histamina chegam a atingir valores da ordem de gramas por kg de peixe [Kan *et al.*, 2000; Kim e Bjeldanes, 1979; Omura *et al.*, 1978]. A causa parece estar nos elevados teores de histidina livre apresentados pelos peixes da referida família. Por esse motivo, a histamina tem sido apontada como a causadora de alguns casos descritos de intoxicações graves, por vezes mesmo fatais, subsequentes à ingestão desse tipo de peixes. Tem sido difícil, porém, encontrar provas irrefutáveis sobre a responsabilidade do composto, dadas as dificuldades da investigação. Além de não ser possível determinar os teores de histamina no peixe já ingerido, muitas vezes o fenómeno só atinge um número restrito de pessoas de entre todas as que partilharam idêntica refeição. Existem mesmo autores que refutam categoricamente o envolvimento da histamina neste tipo de intoxicações alimentares, independentemente dos níveis elevados em que o composto possa estar presente, sugerindo a responsabilidade de outras substâncias não identificadas também formadas durante os processos de degradação bacteriana dos alimentos em questão [Ijomah *et al.*, 1991].

1.1.4. Teores de histamina e de aminas aromáticas em vinhos

Pelas razões expostas, a presença de histamina em vinhos constitui de há muito um polo especial de interesse por parte de muitos investigadores. Não será pois de estranhar que seja especialmente extenso o número de referências existentes na literatura referentes aos teores do composto em vinhos. Com a excepção de um pequeno número de estudos dedicados exclusivamente às aminas voláteis, todos os trabalhos dedicados a estudar a presença de aminas biogénicas em vinhos apresentam resultados referentes à histamina. Nalguns casos, principalmente nos estudos mais antigos, esta constitui mesmo o objecto único dos trabalhos realizados.

Embora não despertando um interesse tão grande como a histamina, também é significativamente elevada a quantidade de dados relativos à presença nos vinhos de tiramina e de 2-feniletilamina. A generalização do uso de metodologias analíticas capazes de permitir a análise simultânea de diversas aminas, faz com que nos trabalhos mais recentes seja comum a apresentação simultânea de dados relativos a estas três aminas.

Muitos dos resultados adiante referidos devem ser vistos com o sentido crítico necessário, tendo em atenção as metodologias analíticas usadas, algumas das quais caracterizadas por níveis insuficientes de especificidade e de sensibilidade. Tendo em atenção a clareza do texto e uma mais fácil apreensão pelo leitor dos aspectos fundamentais, decidimos não fazer aqui referências detalhadas aos métodos analíticos usados, que serão referidos no capítulo seguinte.

A primeira referência à presença de histamina em vinhos foi feita por Tarantola [1954] que encontrou o composto durante o desenvolvimento de um método analítico para a separação e identificação de aminoácidos. A descoberta foi confirmada alguns anos mais tarde por Marquardt e Werringloer [1965] que constataram a presença de histamina na maioria de 100 amostras de vinhos analisadas, com maior incidência nos vinhos tintos (teores geralmente superiores a 5 mg/L, atingindo num caso os 22 mg/L) do que nos vinhos brancos (teores geralmente inferiores a 5 mg/L). Em contraste, verificaram a ausência do composto numa série de 50 mostos sujeitos a análise.

Ainda nos anos 60, e fazendo uso de diferentes metodologias analíticas, a presença de histamina em vinhos foi verificada por outros autores. Millies [1966] encontrou um teor médio de 1,7 mg/L em 13 amostras de vinhos europeus; Schuller *et al.* [1967] encontraram um teor médio de 0,85 mg/L (com uma variação entre 0 e 10 mg/L) em 33 amostras de vinhos alemães; Saint-Blanquat e

Derache [1968] registaram um teor médio de 1,8 mg/L (com uma variação entre 0,05 e 9,3 mg/L) em 12 amostras de vinhos franceses; Jakob [1968] encontrou valores entre 0,6 e 20 mg/L em 7 amostras de vinhos; Granerus *et al.* [1969] encontraram um teor médio de 4,9 mg/L (com uma variação entre 0,04 e 15,6 mg/L) em 13 amostras de vinhos; finalmente, Quevauviller e Mazière [1969] analisaram 60 amostras de vinhos franceses, tendo encontrado um teor médio de 4,9 mg/L (com uma variação entre 0,1 e 30 mg/L).

Pese embora as debilidades apresentadas pela generalidade dos métodos então usados para a quantificação da histamina e os grandes avanços que a esse nível foram ocorrendo (ver capítulo 2), as principais linhas de força resultantes destes primeiros trabalhos — presença do composto na maioria das amostras em quantidades da ordem dos poucos mg/L, por vezes mesmo inferiores a 1 mg/L, com maior incidência nos vinhos tintos do que nos vinhos brancos, atingindo máximos, num pequeno número de amostras, da ordem das poucas dezenas de mg/L — vieram a ser genericamente confirmadas pelos trabalhos posteriores.

Ough [1971] analisou cerca de 300 amostras de vinhos da Califórnia, tendo encontrado apenas três com teores superiores a 10 mg/L (máximo de 15,5 mg/L) e outras 7 com teores compreendidos entre 5 e 10 mg/L. Ao contrário dos resultados obtidos por Marquardt e Werringloer [1965], o autor também registou a presença de histamina em amostras de mostos, em teores entre 4 e 10 mg/L, o que de resto já tinha sido evidenciado por Millies [1966], embora em quantidades inferiores (teor médio de 1,0 mg/L em 13 amostras de mostos provenientes de diferentes países europeus).

Mack [1973] analisou 31 vinhos tintos com diversas proveniências, tendo registado a ausência de histamina em 15 amostras, a sua presença em "traços" em 6 amostras, e teores entre 0,3 e 6,6 mg/L nas restantes 10 amostras. Resultados idênticos foram obtidos na mesma altura por Zappavigna *et al.* [1974] que analisaram 43 amostras de vinhos italianos, não tendo encontrado histamina em 29 amostras e teores entre 1 e 2 mg/L nas restantes 14. Por seu lado, Lafon-Lafourcade [1975] determinou o teor de histamina em 123 amostras de vinhos franceses tendo encontrado teores entre 0 e 21 mg/L, com as concentrações mais elevadas a corresponderem a vinhos tintos da região do "Médoc" e da região do "Burgundy".

Entretanto, dados abundantes relativos a vinhos suíços, resultado da actividade de diferentes investigadores, revelaram valores não muito diferentes dos até então considerados. Num dos estudos

[Mayer e Pause, 1982], verificou-se a ausência de histamina em 70 % das amostras analisadas e teores médios de 0,9 mg/L em vinhos tintos (máximo: 6 mg/L) e de 0,4 mg/L em vinhos brancos (máximo: 8 mg/L), valores estes inferiores aos obtidos em trabalhos anteriores do mesmo grupo, possivelmente devido à melhoria do processo analítico usado. Aerny [1982], registou teores inferiores a 1 mg/L em 25 de um conjunto de 36 amostras de vinhos brancos e em 15 de um conjunto de 29 amostras de vinhos tintos, tendo encontrado apenas 3 amostras com teores superiores a 10 mg/L, todas correspondentes a vinhos tintos. Fröhlich e Battaglia [1980] analisaram 100 amostras de vinhos comerciais, tendo encontrado teores ligeiramente superiores: em 27 amostras os teores encontrados foram superiores a 3 mg/L, tendo-se verificado em 5 delas teores superiores a 21 mg/L.

A partir de meados dos anos oitenta, começou a generalizar-se o uso de metodologias baseadas em técnicas de cromatografia líquida, capazes de proporcionar a obtenção simultânea de dados referentes a mais do que uma amina.

Um dos primeiros ensaios em larga escala referentes à determinação de histamina e de tiramina (juntamente com putrescina e cadaverina) foi efectuado por Zee *et al.* [1983] que analisaram um total de 221 amostras com proveniência em diversos países, sendo 102 correspondentes a vinhos tintos, 99 a vinhos brancos, 17 a vinhos tipo Porto (produzidos no Canadá) e 3 a vinhos tipo Sherry (também produzidos no Canadá). Os teores médios obtidos para a histamina foram, respectivamente, de 5,73, 3,35, 3,48 e 5,48 mg/L. Para a tiramina os teores médios encontrados nas mesmas amostras foram da mesma ordem de grandeza, com excepção das 3 amostras de Sherry, nas quais não foram detectados quaisquer sinais do composto: vinhos tintos - 5,18 mg/L; vinhos brancos - 4,41 mg/L; vinhos tipo Porto - 2,17 mg/L. Por curiosidade pode afirmar-se que foram analisadas 2 amostras de vinhos tintos e 4 amostras de vinhos brancos com origem em Portugal, as quais apresentaram teores de histamina e de tiramina (apenas no caso dos vinhos tintos) muito inferiores à média geral: para a histamina, o teor médio dessas amostras foi de 1,24 e 1,12 mg/L, para os vinhos tintos e os vinhos brancos, respectivamente; a tiramina, por seu lado, não foi encontrada nas amostras de vinho tinto, tendo-se observado um teor médio de 4,43 mg/L nas amostras de vinho branco, idêntico ao teor médio verificado para o conjunto de todas as amostras.

Cilliers e Van Wyk [1985] analisaram 184 amostras de vinhos comerciais elaborados na África do Sul, tendo obtido para a histamina um teor médio de 4,8 mg/L nos vinhos tintos (117 amostras), muito superior ao verificado nos vinhos rosé (5 amostras) – 1,03 mg/L – e, principalmente, ao verificado nos vinhos brancos (62 amostras) – 0,1 mg/L; o teor médio observado para os vinhos

tintos que tinham sofrido a fermentação maloláctica (91 amostras) foi de 5,4 mg/L, enquanto para os restantes (26 amostras) o teor médio encontrado foi de apenas 2,5 mg/L. 13 amostras, 12 das quais correspondentes a vinhos com fermentação maloláctica, apresentaram um teor superior a 10 mg/L, incluindo uma amostra contendo 49 mg/L, um dos valores mais elevados, senão o mais elevado, até hoje referidos na literatura. Os vinhos brancos apresentaram todos teores inferiores a 1 mg/L. Para a tiramina os teores médios observados foram de 0,5 mg/L para os vinhos tintos (105 amostras) e inferiores a 0,1 mg/L para os vinhos brancos (47 amostras); nos vinhos tintos verificou-se, a exemplo do assinalado para a histamina, um teor médio superior nos vinhos com fermentação maloláctica, 0,6 mg/L contra 0,2 mg/L para os restantes; registaram-se 13 amostras com teores superiores a 1 mg/L, com um máximo de 6,4 mg/L, enquanto o máximo encontrado num vinho branco foi de 2,4 mg/L.

De entre os vários trabalhos publicados pelo grupo de Cerutti e colaboradores efectuados com vinhos italianos (em que os autores procederam à determinação das três aminas aqui em estudo mais a putrescina e a cadaverina) podemos salientar dois, pelo número de amostras analisadas e pelo significado dos resultados obtidos. No primeiro, correspondente à análise de 71 amostras de vinhos [Cerutti *et al.*, 1986], verificou-se, pela primeira vez em larga escala, teores médios de 2-feniletilamina em vinhos superiores aos de histamina e de tiramina: enquanto que estas duas aminas não foram encontradas em, respectivamente, 31 e 33 amostras, a ausência de 2-feniletilamina apenas foi verificada em 3 amostras; nas restantes, os teores encontrados desta amina situaram-se entre 0,3 e 1 mg/L (22 amostras), entre 1 e 3 mg/L (36 amostras) e superiores a 3 mg/L (10 amostras, com um máximo de 8,9 mg/L). Nas amostras em que foi verificada a presença de histamina e de tiramina, os teores encontrados situaram-se, no caso da histamina, entre 0,2 e 1 mg/L (19 amostras), entre 1 e 3 mg/L (9 amostras) e superiores a 3 mg/L (12 amostras) e, no caso da tiramina, entre 0,2 e 1 mg/L (19 amostras), entre 1 e 3 mg/L (14 amostras) e superiores a 3 mg/L (5 amostras). A exemplo do verificado nos trabalhos anteriormente referidos, os vinhos tintos apresentaram, em regra, teores de histamina, tiramina e 2-feniletilamina superiores aos vinhos brancos; a quase totalidade das amostras com teores superiores a 3 mg/L de qualquer das 3 aminas em causa eram de vinhos tintos, incluindo todas as amostras com valores superiores a 5 mg/L.

Em trabalho posterior do mesmo grupo [Vecchio *et al.*, 1989], no qual foi usada uma metodologia analítica mais avançada (HPLC - ver capítulo 2), a análise de 33 amostras de vinhos italianos revelou resultados muito inferiores aos anteriores. A grande maioria dos vinhos (26 amostras) não revelou a presença de histamina (limite de detecção do método: 0,05 mg/L), tendo

apenas uma amostra registado um teor superior a 0,2 mg/L – 2,6 mg/L. Para a tiramina, os resultados obtidos foram similares; o composto não foi encontrado em 25 amostras (limite de detecção do método: 0,05 mg/L), tendo 3 amostras apresentado teores superiores a 1 mg/L, com um máximo de 5,4 mg/L. A amostra com teor mais elevado em tiramina foi a mesma que apresentou um teor máximo de histamina, apresentando também um teor elevado de putrescina (8,2 mg/L) mas não de 2-feniletilamina (< 0,05 mg/L). Para esta última, os teores observados foram de novo superiores mas não tão elevados como na experiência anterior: apenas 12 amostras revelaram a presença desta amina (limite de detecção do método: 0,05 mg/L), tendo apenas 3 apresentado teores superiores a 1 mg/L, com um máximo de 2,4 mg/L.

Vidal-Carou *et al.* [1990a] determinaram os teores de histamina e tiramina em 226 e 186 amostras de vinhos espanhóis, respectivamente. Os teores médios de histamina observados foram de 4,07 mg/L nos vinhos tintos (127 amostras), 0,86 mg /L nos vinhos rosés (34 amostras) e 0, 81 mg/L nos vinhos brancos (65 amostras). A diferença de teores entre os vinhos tintos e os vinhos brancos foi bem vísivel: dos vinhos brancos, 86 % das amostras apresentaram teores inferiores a 2 mg/L, enquanto para os vinhos tintos a percentagem foi de apenas 48 %. Adicionalmente, 30 % das amostras de vinhos tintos apresentaram teores superiores a 4 mg/L, não havendo nenhuma amostra de vinho branco a atingir esse teor. Para a tiramina, a diferença entre vinhos tintos e vinhos brancos também foi notada mas com menor intensidade; os teores médios observados foram de 3,03 mg/L nos vinhos tintos (111 amostras), 1,66 mg /L nos vinhos rosés (23 amostras) e 1,49 mg/L nos vinhos brancos (52 amostras).

Num relatório publicado em 1990, com dados relativos à análise de vinhos tintos de grande qualidade produzidos em França (23 amostras), Espanha (21 amostras) e Itália (17 amostras) [Tricard e Cazabeil, 1990], foram registados os seguintes teores: histamina – teores médios de 3,63, 5,02 e 2,19 mg/L, para vinhos franceses, espanhóis e italianos, respectivamente, variando de 0 a 11,4, de 0,8 a 16,6 e de 0,1 a 8,3 mg/L; tiramina - teores médios de 3,22, 6,33 e 3,21 mg/L, para os mesmos vinhos, variando de 0,6 a 10,5, de 0,9 a 20,2 e de 0,7 a 6,5 mg/L; 2-feniletilamina - teores médios 0,86, 0,86 e 0,96 mg/L, para os mesmos vinhos, variando de 0,2 a 2,5, de 0,1 a 2,5 e de 0,1 a 1,8 mg/L.

Por seu lado, Ibe *et al.* [1991] encontraram, em 32 amostras de vinhos tintos, teores médios de 1,90, 1,87 e de 1,34 mg/L para a histamina, tiramina e 2-feniletilamina, respectivamente, com variações de < 1 (16 amostras) a 10,0, de 0,13 a 9,51 e de 0,18 a 5,18 mg/L. Nas 43 amostras de vinhos brancos analisadas, os autores registaram a presença de histamina em apenas 11, com um teor

médio de 1,1 mg/L e um máximo de 9,9 mg/L; a tiramina foi encontrada em 38 amostras, com um teor médio de 0,98 e um máximo de 7,80 mg/L e a 2-feniletilamina mostrou-se presente em 41 amostras, com um teor médio de 2,26 e um máximo de 10,4 mg/L.

Ingargiola e Bertrand [1991] obtiveram teores médios de 4,15, 2,18 e 1,30 mg/L, para a histamina, a tiramina e a 2-feniletilamina, respectivamente, em 49 amostras de vinhos tintos franceses e teores médios das mesmas aminas de 1,85, 3,45 e 0,85 mg/L, em 13 amostras de vinhos brancos da "Bourgogne", nos quais a fermentação maloláctica tinha ocorrido, e de 0,57, 0,77 e 0,47 mg/L em 7 amostras de vinhos brancos de "Bourdeaux" não sujeitos ao referido processo fermentativo. Os mesmos autores determinaram também os teores de histamina em 9 amostras de "Champagne" tendo encontrado um teor médio de 4,94 mg/L.

Numa série de estudos citados num artigo de revisão da autoria de Lehtonen [1996] são referidos teores médios de histamina de 3,4 e de 0,26 mg/L, teores médios de tiramina de 3,1 e de 0,6 mg/L e teores médios de 2-feniletilamina de 1,0 e de 1,3 mg/L, para 200 amostras de vinhos tintos e 125 amostras de vinhos brancos, respectivamente [Holen e Sanderud, 1991]; teores médios de 2,0 e de 1,5 mg/L, para a histamina, de 4,8 e de 8,6 mg/L, para a tiramina e de 1,7 e de 1,7 mg/L, para a 2-feniletilamina, em 151 amostras de vinhos tintos e 51 amostras de vinhos brancos, respectivamente [Mayer e Pause, 1987]; teores variando entre 0,2 e 6,3 mg/L e entre 0,2 e 4,2 mg/L, para a histamina, entre 1,2 e 11,8 mg/L e entre 0,9 e 8,8 mg/L, para a tiramina, e entre 0,4 e 11,7 mg/L e entre 0,2 e 14,7 mg/L, no caso da 2-feniletilamina, em 38 amostras de vinhos tintos e 56 amostras de vinhos brancos [Maxa *et al.*, 1992].

Num trabalho da autoria de Bauza *et al.* [1995a], com dados relativos a 220 vinhos franceses das regiões do "Rhône" e da "Provence" (150 vinhos tintos e 70 vinhos rosés e brancos), aqueles autores também registaram teores médios de histamina significativamente superiores nos vinhos tintos – 5,2 mg/L – do que nos vinhos brancos e róses – 0,2 mg/L; destes, 98 % apresentaram teores inferiores a 1 mg/L enquanto nos vinhos tintos essa percentagem foi de apenas 3 %; além disso, 12 % dos vinhos tintos apresentaram teores superiores a 10 mg/L, incluindo 7 amostras com teores superiores a 20 mg/L. No que respeita à tiramina, a diferença entre os teores dos vinhos tintos e dos restantes foi semelhante – teores médios de 2,3 e de 0,2 mg/L, respectivamente; 38 % das amostras de vinhos tintos apresentaram teores superiores a 5 mg/L, incluindo 11 amostras com um teor superior a 10 mg/L, com um valor máximo de 19 mg/L. Ao contrário do registado noutros estudos, a 2-feniletilamina apresentou para os vinhos tintos um teor médio inferior aos encontrados para a

tiramina e para a histamina – 1,4 mg/L; nos vinhos brancos, o teor médio foi de 0,7 mg/L; No seu todo, mais de metade das amostras apresentaram teores de 2-feniletilamina inferiores a 1 mg/L, tendo-se encontrado apenas 5 amostras com um teor superior a 5 mg/L, com um máximo de 8,06 mg/L.

Nos diversos trabalhos do grupo de Busto e colaboradores, correspondentes à aplicação de diferentes metodologias de HPLC desenvolvidas pelos autores a amostras de vinhos espanhóis da região de Tarragona (ver capítulo 2), os teores obtidos para a histamina em vinhos tintos, apresentaram uma certa homogeneidade, sem grandes variações entre as diversas amostras. Este facto é particularmente evidente num trabalho de 1995, em que os teores observados em 13 amostras variaram entre 3,25 e 5,65 mg/L, com um teor médio de 3,94 mg/L [Busto *et al.*, 1995], e num trabalho posterior, correspondente à análise de 15 amostras, nas quais se encontraram teores de histamina entre 5,3 e 7,8 mg/L, com um teor médio de 6,3 mg/L [Busto *et al.*, 1997]. Num trabalho intercalar, correspondente à análise de 44 amostras de vinhos tintos, os mesmos autores registaram um teor médio de histamina da mesma ordem de grandeza – 5,13 mg/L, mas com valores que variaram entre 0,66 e 13,5 mg/L [Busto *et al.*, 1996b]. Neste mesmo trabalho foram analisadas 14 amostras de vinhos brancos e 8 amostras de vinhos rosé da mesma região, tendo sido encontrados teores médios de histamina de 1,15 mg/L, com um máximo de 3,46 mg/L, para os vinhos brancos e de 2,48 mg/L, com um máximo de 5,18 mg/L, para os vinhos rosé.

Quanto à tiramina, os teores encontrados no primeiro dos trabalhos referidos [Busto *et al.*, 1995] variaram entre 0,73 e 3,93 mg/L, com um teor médio de 2,21 mg/L, enquanto nos restantes trabalhos o composto se apresentou estranhamente ausente da totalidade das amostras (com excepção de uma amostra de vinho branco) o que levanta a possibilidade de existência de problemas analíticos não assinalados pelos autores, até porque em ambos os casos foi usado um agente de derivatização pouco divulgado entre os restantes autores (ver capítulo 2). A 2-feniletilamina foi encontrada nas 13 amostras atrás referidas em teores que variaram entre 0,40 e 2,31 mg/L, com um teor médio de 1,17 mg/L [Busto *et al.*, 1995], enquanto que no trabalho referente à análise de 15 amostras, os teores obtidos foram muito homogéneos, variando entre 0,5 e 0,6 mg/L [Busto *et al.*, 1997]. No trabalho correspondente à análise de um maior número de amostras [Busto *et al.*, 1996b] não são referidos, um tanto inexplicavelmente, resultados referentes a esta amina.

Teores médios de histamina e de tiramina relativamente elevados foram registados por Vazquez-Lasa *et al.* [1998] em 89 amostras de vinhos tintos da região espanhola de Rioja, disponíveis

comercialmente. Os autores dividiram as amostras em 4 diferentes categorias, de acordo com a idade e a qualidade global dos vinhos — "jovens" (elaborados recentemente); "crianzas" (3 anos de envelhecimento, um dos quais, pelo menos, em casco de madeira); "reservas" (vinhos de grande qualidade com um mínimo de 3 anos de envelhecimento, um dos quais, pelo menos, em casco de madeira) e "grandes reservas" (vinhos de grande qualidade com um mínimo de 2 anos de envelhecimento em casco de madeira e de 3 anos em garrafa) — tendo obtido teores médios de, respectivamente, 8,72 mg/L (36 amostras), 6,67 mg/L (26 amostras), 6,92 mg/L (17 amostras) e 5,12 mg/L (10 amostras) para a histamina e de 4,98, 5,78, 4,00 e 5,98 mg/L, para a tiramina. Como será assinalado no capítulo respectivo, os teores de putrescina encontrados nestas amostras foram extremamente elevados em relação aos habitualmente referidos na literatura. Em 10 amostras de vinhos brancos e 10 amostras de vinhos rosés da mesma região simultaneamente analisadas os teores médios encontrados foram significativamente mais baixos, 0,84 e 1,21, para a histamina, e 0,89 e 0,95 mg/L, para a tiramina.

No trabalho de Soufleros *et al.* [1998], referente à determinação de 8 aminas biogénicas (histamina, tiramina, 2-feniletilamina, putrescina, cadaverina, metilamina, etilamina e isoamilamina) em vinhos franceses de diferentes regiões, a histamina e a tiramina apresentaram-se como as aminas biogénicas mais abundantes nas amostras de vinhos tintos, logo a seguir à putrescina. Para a histamina, os teores médios encontrados foram de 9,77 e de 7,20 mg/L, para os vinhos oriundos da "Bourgogne" (tintos; 20 amostras), e de "Bordeaux" (tintos; 66 amostras), respectivamente, com variações que se situaram entre 0,04 e 31,63 no primeiro caso e entre 0,83 e 16,26 mg/L no segundo. Para a tiramina, os teores médios encontrados nas mesmas amostras foram de 6,90 e de 5,64 mg/L, com variações que se situaram entre 0,27 e 22,10 mg/L e entre 0,89 e 15,62 mg/L, respectivamente. Teores destas duas aminas também elevados foram observados nalgumas das 6 amostras de vinhos "Champagne" simultaneamente analisadas; nessas amostras, o teor médio de histamina foi de 5,45 mg/L com uma variação entre 0,20 e 17,20 mg/L, e o teor médio de tiramina foi de 10,98 mg/L com uma variação entre 0,20 e 17,60 mg/L. Nas amostras de vinhos brancos da "Alsace" (20 amostras) e, em especial, de vinhos licorosos (5 amostras), os teores encontrados foram significativamente inferiores; os primeiros apresentaram um teor médio de histamina de 1,09 mg/L, com uma variação entre 0,03 e 7,72 mg/L, e um teor médio de tiramina de 1,14 mg/L, com uma variação entre 0,13 e 7,67 mg/L; os vinhos licorosos apresentaram todos teores de histamina inferiores a 1 mg/L, com um teor médio de 0,42 mg/L, enquanto para a tiramina os teores observados foram em média de 1,37 mg/L, com uma variação entre 0,32 e 2,68 mg/L. Para a 2-feniletilamina, os teores encontrados nas

mesmas amostras foram muito inferiores, não se tendo encontrado diferenças importantes entre os diversos tipos de vinhos. O teor médio mais elevado foi verificado nas amostras de vinhos licorosos (2,87 mg/L, variando entre 1,07 e 4,49 mg/L) enquanto os teores mais baixos foram observados nas amostras de "Champagne" (0,23 mg/L, variando entre 0,10 e 0,30 mg/L); nas amostras de vinhos tintos de "Bourgogne", registou-se um teor médio de 1,23 mg/L, com uma variação entre 0,08 e 3,30 mg/L; nos vinhos de "Bordeaux" o teor médio foi inferior, 0,67 mg/L, em resultado da existência de muitas amostras isentas da referida amina, mas algumas amostras apresentaram níveis elevados, com um máximo de 9,83 mg/L. Nos vinhos brancos o teor médio foi de 1,57 mg/L, com uma variação entre 0,08 e 4,85 mg/L.

A ideia da histamina como a segunda amina biogénica habitualmente mais abundante nos vinhos, logo a seguir à putrescina, saiu reforçada no estudo de Glória *et al.* [1998] referente à determinação de aminas biogénicas não voláteis em 59 amostras de vinhos monovarietais das castas Pinot Noir (36 amostras) e Cabernet Sauvignon (23 amostras) produzidos no estado de Oregon, nos Estados Unidos, e referentes às colheitas de 1991 e 1992. O composto foi detectado em 88 % das amostras analisadas, tendo sido obtidos, para cada uma das castas teores médios de 7,20 e de 2,71 mg/L, respectivamente. Um total de 23 amostras, 18 da casta Pinot Noir e 5 da casta Cabernet Sauvignon, apresentou teores superiores a 8 mg/L, tendo o teor máximo correspondido a 23,98 mg/L. A tiramina apresentou, como em muitos dos trabalhos já referidos, teores inferiores aos de histamina; nos vinhos Pinot Noir o teor médio foi de 1,62 mg/L, tendo-se observado um teor máximo de 8,31 mg/L, enquanto nos vinhos Cabernet Sauvignon o teor médio observado foi de 0,71 mg/L, com um máximo de 7,53 mg/L. Para a 2-feniletilamina, os teores médios obtidos foram significativamente inferiores, em especial nos vinhos Cabernet Sauvignon, onde o máximo verificado foi de 0,14 mg/L. Nos vinhos Pinot Noir o teor médio foi de 0,12 mg/L, tendo-se verificado um teor máximo de 0,89 mg/L.

No mesmo estudo, os autores procederam à determinação de duas aminas indólicas raramente alvo do interesse dos diversos investigadores: a triptamina e a serotonina. Se bem que reduzidos, os seus teores mostraram-se, porém, superiores aos de 2-feniletilamina, o que não deixa de despertar alguma curiosidade. Nos vinhos Pinot Noir, essa presença foi mais evidente, tendo-se observado um teor médio de triptamina de 0,20 mg/L, com uma amostra a apresentar um teor máximo de 5,51 mg/L, enquanto para a serotonina o teor médio observado foi de 0,47 mg/L, com um teor máximo de 2,23 mg/L. Nos vinhos Cabernet Sauvignon, não foi detectada a presença de

triptamina em nenhuma das amostras, tendo-se observado um teor máximo de 0,49 mg/L de serotonina.

Finalmente, num estudo referente à análise de 73 vinhos varietais produzidos no Canadá e prontos a entrar no circuito comercial, Soleas *et al.* [1999] registaram níveis de histamina e de tiramina muito inferiores aos referidos nos estudos anteriormente citados, ainda assim mais elevados nos vinhos tintos do que nos vinhos brancos. Genericamente, os vinhos foram obtidos a partir de uvas em estado de maturação completa, o período de maceração pré-fermentativa foi de algumas horas para os vinhos brancos e de 5 a 21 dias para os vinhos tintos, tendo a fermentação sido efectuada em cubas de aço inoxidável após adição de açúcar (até 12° alcoólicos potenciais) e de leveduras iniciadoras da espécie "Prise de Mousse"; a fermentação maloláctica teve lugar apenas nos vinhos tintos, imediatamente após o final da fermentação alcoólica, por inoculação com bactérias da espécie *Leuconostoc oenos*, sendo os vinhos posteriormente adicionados de SO_2 (40 mg/L) e clarificados com bentonite ou terra de diatomáceas. Nos vinhos tintos, produzidos a partir de 5 diferentes castas (Gamay Noir, Merlot, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc; 34 amostras no total), os teores médios de histamina variaram entre 1,0 e 2,5 mg/L, com um máximo de cerca de 3,4 mg/L, enquanto os teores médios de tiramina variaram entre 0,1 e 0,4 mg/L, com um máximo de 0,7 mg/L. Nos vinhos brancos, produzidos também a partir de 5 diferentes castas (Vidal Blanc, Seyval Blanc, Riesling, Chardonnay e Muscat Morio; 39 amostras no total) os teores médios de histamina variaram entre 0,2 e 0,8 mg/L, com um máximo de cerca de 3,4 mg/L, enquanto a tiramina apenas foi encontrada nos 12 vinhos elaborados a partir de uvas da casta "Chardonnay" que apresentaram um teor médio de 0,2 mg/L, com um máximo de 0,4 mg/L. Para a 2-feniletilamina, os teores máximos encontrados corresponderam aos vinhos tintos das castas Gamay Noir e Pinot Noir, teores médios de 1,0 e 0,65 mg/L, respectivamente, tendo as restantes amostras, tanto de vinhos tintos como brancos, apresentado teores médios muito baixos, sempre inferiores a 0,3 mg/L; o composto não foi encontrado nos vinhos brancos da casta Vidal Blanc. Neste trabalho é feita referência pela primeira vez, pelo menos na literatura a que tivemos acesso, à presença em vinhos de 1-metil-histamina; o composto foi encontrado em quantidades significativas nos vinhos de todas as castas, excepto da casta branca Muscat Morio, com particular incidência nos vinhos das castas brancas Chardonnay (teor médio de 2,4 mg/L, com um máximo de 3,25 mg/L), Seyval Blanc (teor médio de 1,7 mg/L, com um máximo de 2,8 mg/L) e da casta tinta Pinot Noir (teor médio de 2,4 mg/L, com um máximo de 2,9 mg/L).

No que se refere a vinhos portugueses, os únicos dados existentes referem-se a um estudo recentemente publicado com dados relativos a 30 amostras de diversas regiões demarcadas [Mafra *et al.*, 1999]. Os teores encontrados foram genericamente reduzidos, em especial de histamina e de tiramina, para as quais os teores máximos encontrados foram de 1,7 e de 3,1 mg/L, respectivamente. A 2-feniletilamina apareceu em destaque nos vinhos da região do Dão, que apresentaram um teor médio de 4,87 mg/L (6 amostras) com uma das amostras a apresentar um teor de 12,73 mg/L.

1.1.5. Estudos sobre a origem da histamina e das aminas aromáticas em vinhos

Tendo em atenção as diversas etapas do processo de elaboração dos vinhos, podem admitir-se cinco origens possíveis para a presença de aminas nos mesmos:

1. Presença nos mostos usados como matéria-prima na elaboração dos vinhos.
2. Formação pelas leveduras envolvidas no processo de fermentação alcoólica.
3. Formação pelas bactérias responsáveis pelo processo de fermentação malo-láctica.
4. Formação pela acção de bactérias contaminantes.
5. Formação durante o processo de envelhecimento (por actividade enzimática residual ou por acção bacteriana).

O trabalho experimental realizado pelos diferentes grupos de investigadores nesta área tem tido como objectivo principal elucidar a importância relativa de cada uma destas diferentes origens, de forma a ser possível a implementação de acções concretas no sentido de se poder obter vinhos com menores teores deste tipo de compostos. O centro das atenções tem sido focalizado na origem bacteriana das aminas, sem dúvida importante nalguns casos particulares, mas aparentemente incapaz de justificar, por si só, algumas das variações observadas. A influência de algumas variáveis relacionadas com os processos de vinificação, como a temperatura dos processos fermentativos, o pH dos mostos e dos vinhos, o tempo de maceração, etc., tem sido também estudada de forma intensiva. O contributo de outros factores, porventura importantes para se conseguir uma abordagem global do fenómeno, como a influência da casta e o tipo de evolução das aminas ao longo do processo de

envelhecimento dos vinhos tem sido de certa forma descurado, sendo poucos os resultados obtidos nesses domínios, como se poderá verificar nos respectivos itens*.

1.1.5.1. Presença da histamina e das aminas aromáticas nos mostos

São diminutas e já um pouco antigas as referências encontradas na literatura respeitantes à presença de histamina e de aminas aromáticas no mosto de uvas. A ideia generalizada é a de que os mostos não contêm este tipo de compostos, pelo menos em quantidades significativas [Radler e Fäth, 1991].

Millies [1966] terá sido o primeiro autor a referir a presença de histamina, tendo encontrado um teor médio de 1,0 mg/L em 13 amostras de mostos originários de diferentes países europeus; Ough [1971], por seu lado, encontrou teores mais elevados, de 4 a 10 mg/L, em três amostras de mosto, mas os seus resultados poderão sofrer das debilidades manifestadas pelo método analítico usado (ver capítulo 2). Posteriormente, Desser *et al.* [1981] referem teores de histamina de apenas 0,6 µmol/L ou, aproximadamente, 0,070 mg/L, não tendo encontrado quaisquer vestígios de tiramina, enquanto Buteau *et al.* [1984], pelo contrário, verificaram a presença de tiramina — teor de 3,5 µmol/L ou, aproximadamente, 0,380 mg/L — mas não encontraram qualquer indício da presença de histamina. Feldman [1983] refere teores de histamina inferiores a 0,250 mg/L e Vidal-Carou *et al.* [1990b], por seu lado, verificaram a presença de ambos os compostos em todos as cinco amostras de mostos estudadas, com teores variando entre 0,10 e 1,15 mg/L. No que respeita à 2-feniletilamina, as únicas referências que encontrámos na literatura referente à sua presença em mostos, encontram-se em dois trabalhos do grupo de Ough, nos quais é indicada a presença do composto em quantidades inferiores a 0,2 mg/L [Ough e Daudt, 1981; Ough *et al.*, 1981].

Não obstante os baixos teores referidos e tendo em conta os resultados recentemente obtidos por Maxa e Brandes [1993] em sumos de frutas, a hipótese de uma parcela importante da histamina e das aminas aromáticas presentes nos vinhos poderem ser originárias das uvas continua em aberto. De igual forma é possível, do ponto de vista teórico, haver diferenças significativas no que respeita aos

* Como afirmado no capítulo de Introdução Geral, o objectivo do trabalho executado para a elaboração desta dissertação passou precisamente, para além dos aspectos respeitantes ao desenvolvimento de novos procedimentos analíticos, pela tentativa de contribuir para o esclarecimento de alguns dos pontos menos estudados, designadamente, a presença de aminas nos mostos, a sua formação durante o processo fermentativo e, finalmente, a sua evolução durante o processo de envelhecimento.

teores de aminas normalmente apresentados pelas diversas castas. Recentemente, foram encontradas diferenças significativas nos teores encontrados em vinhos monovarietais produzidos numa mesma região (Niagara, Ontário, Canadá) em condições de vinificação relativamente idênticas (nomeadamente no que diz respeito ao uso de leveduras seleccionadas para o arranque da fermentação, ao controle de temperatura e aos teores de SO_2 usados) o que sugere a existência dessas mesmas diferenças nos mostos usados para a respectiva elaboração [Soleas *et al.* 1999]. Os autores adiantam, contudo, a necessidade de mais experiências para comprovar o facto, pois algumas das diferenças podem estar relacionadas com o facto de cada vinho ter sido sujeito a diferentes tempos de maceração, factor que como veremos mais adiante parece influenciar a quantidade de algumas aminas apresentada pelos vinhos. Por exemplo, os teores mais elevados de aminas (aromáticas e não só) foram observados nos vinhos da casta Pinot Noir, que se caracterizam pela intensidade e extensão dos fenómenos de maceração, justificados pela fraca intensidade corante das uvas em causa.

1.1.5.2. Formação da histamina e das aminas aromáticas pelas leveduras envolvidas no processo de fermentação alcoólica

O possível papel desempenhado pelas leveduras envolvidas no processo de fermentação alcoólica tem sido alvo do interesse de alguns investigadores, com resultados nem sempre coincidentes. Inicialmente, houve autores que acreditaram ser essa a principal origem das aminas encontradas nos vinhos [Lafon-Lafourcade, 1975; Quevauvillier e Mazière, 1969, Zappavigna, 1974]. No entanto, o facto dos elevados teores de aminas apresentados por alguns vinhos não poderem ser justificados apenas pela actividade fermentativa das leveduras tem levado os investigadores a prestar maior atenção à possível origem bacteriana das aminas em detrimento do estudo da sua formação por acção das leveduras.

Não obstante, existem estudos que parecem apontar para um papel das leveduras na formação de aminas mais importante do que aquele que normalmente lhe é reconhecido. Buteau *et al.* [1984] puseram em evidência a formação de histamina e de tiramina, numa quantidade superior a 1 e a 2 mg/L, respectivamente, durante o processo de fermentação alcoólica, mas não conseguiram demonstrar de forma inequívoca que essa formação fosse consequência apenas da actividade das leveduras. A formação de histamina durante a fermentação alcoólica foi também observada por um grupo de investigadores espanhóis [Somavilla *et al.*, 1986]. Vidal-Carou *et al.* [1990b], por seu lado,

observaram a formação de pequenas quantidades de tiramina (com um máximo de cerca de 1 mg/L), não tendo verificado qualquer variação nos teores de histamina originalmente presentes nos mostos. Anteriormente, num trabalho do mesmo grupo, tinha já sido observada a formação de pequenas quantidades de tiramina, 0,3 e 0,7 mg/L, na monitorização de duas cubas de fermentação [Rivas-Gonzalo *et al.*, 1983]. Cerutti *et al.* [1991], por seu lado, observaram diferenças nos teores de 2-feniletilamina imputáveis ao uso de diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisae* no processo fermentativo. Sintomaticamente, a estirpe que se caracterizou por originar vinhos com maiores teores daquele composto tinha sido anteriormente caracterizada pela capacidade de formar teores importantes de álcool 2-feniletílico.

São muito escassas as referências que conseguimos encontrar na literatura referentes à presença de actividade descarboxilante nas leveduras. Num dos raros trabalhos sobre o assunto, porém, foi encontrada actividade histidino-descarboxilante (medida pela formação de histamina a partir de um meio de cultura padronizado, adicionado de histidina) em todos os cinco diferentes tipos de leveduras do género *Saccharomyces cerevisae* ensaiados [Pogorzelski, 1992]. Sintomaticamente, o autor verificou que os resultados obtidos em meio sintético se confirmaram numa experiência de elaboração de vinhos a partir de mostos de baga de sabugueiro*: as leveduras que em meio sintético se apresentaram mais fortemente produtoras de histamina deram origem aos vinhos com maiores teores do composto (6,82 a 11,00 mg/L). Segundo o autor, a acção histaminogénica das referidas leveduras, identificadas pelo mesmo como "Bordeaux" e "Burgundy", pelo papel predominante habitualmente desempenhado na elaboração daqueles vinhos tintos, poderia assim justificar o facto de muitos vinhos tintos apresentarem teores de histamina mais elevados. Idênticos resultados, no que respeita à dependência dos teores de histamina em função do tipo de levedura usado na fermentação, terão sido observados anteriormente em vinhos obtidos a partir de diversos frutos, por outros autores polacos, num artigo escrito na língua nativa, ao qual não tivemos acesso [Rosa e Komornicka, 1990].

Por outro lado, é de há muito conhecido o facto dos extractos de leveduras conterem histamina e tiramina, em teores que podem atingir 2,8 e 1,6 g/kg, respectivamente [Blackwell *et al.*, 1969]. Estas quantidades podem ser responsáveis, assumindo a total libertação das aminas para o meio, pela presença nos vinhos de 3 mg/L de histamina e de 2 mg/L de tiramina [Radler e Fäth, 1991]. A autólise das leveduras, fenómeno que vai gradualmente tendo lugar no final do processo fermentativo, poderia assim justificar a presença de maiores quantidades daquelas aminas nos vinhos

* "elderberry fruit", na designação inglesa

tintos, pois é habitual estes ficarem em repouso em contacto com as respectivas "borras" até à ocorrência da fermentação maloláctica ao contrário dos vinhos brancos, que são de imediato clarificados.

1.1.5.3. Formação da histamina e das aminas aromáticas por acção bacteriana. Influência das condições de "vinificação em tinto"

Tendo em conta os conhecimentos sobre a presença de histamina noutros produtos fermentados, a possibilidade de uma fracção importante dos teores de histamina encontrados nos vinhos ter uma origem bacteriana foi uma hipótese que, naturalmente, também foi colocada desde cedo por alguns autores. Embora pareça hoje em parte confirmada, muitos porém são os aspectos que continuam a ser alvo de controvérsia e a necessitar de explicações coerentes, não só no que respeita à formação de histamina, mas principalmente no que respeita à formação de tiramina e de 2-feniletilamina, sobre as quais se poderá afirmar serem ainda mais as dúvidas do que as certezas.

Como vimos anteriormente, é comum nos diversos trabalhos efectuados sobre a presença destas aminas nos vinhos a constatação de teores mais elevados de histamina e de tiramina nos vinhos tintos do que nos vinhos brancos. Verificam-se, no entanto, algumas nuances dignas de registo. Se no caso da histamina essa constatação é generalizada, já no caso da tiramina são muitas as excepções a essa regra, enquanto os teores de 2-feniletilamina parecem mesmo não ser influenciados pelo tipo de vinho.

Uma das diferenças fundamentais entre a elaboração de vinhos tintos e de vinhos brancos reside no processo de acabamento conhecido por fermentação maloláctica, que consiste basicamente na transformação do ácido málico em ácido láctico, e é responsável pela melhoria das qualidades organolépticas dos vinhos com excesso de acidez. Da responsabilidade de um número restrito de bactérias lácticas, dotadas com o equipamento enzimático necessário para a referida transformação e capazes de sobreviver nas condições inóspitas provocadas pela presença de álcool e por um pH da ordem dos 3-3,5, o processo é comum à quase totalidade dos vinhos tintos, onde muitas vezes é promovido pela inoculação do vinho com as bactérias apropriadas, e normalmente evitado nos vinhos brancos, que raramente melhoram com a referida desacidificação.

É natural, assim, que tenham recaído sobre as bactérias lácticas responsáveis pela fermentação maloláctica as principais atenções no que respeita à formação de aminas, tendo a ideia sido, desde muito cedo, promovida por muitos autores [Aerny, 1982, 1985; Marquardt e Werringloer, 1965; Mayer e Pause, 1971; Plumas e Sautier, 1972; Schneyder, 1973]. Duas linhas de investigação em paralelo estudaram o assunto, com resultados, as mais das vezes, contraditórios e decepcionantes.

Alguns autores limitaram-se a observar o efeito da fermentação maloláctica nos teores de aminas observados nos vinhos. Se muitos verificaram uma nítida influência do referido processo no aumento dos teores observados, principalmente de histamina e, em muitos casos, também de tiramina [Castino, 1975; Delfini, 1989; Subden, 1979; Vidal-Carou, 1990a; Soufleros *et al.* 1998], outros não encontraram qualquer relação entre os dois fenómenos em experiências especificamente dirigidas para o estudo do tema [Buteau et *al.*, 1984; Cavazza et *al.*, 1995; Cerutti et *al.*, 1987; Ough et *al.*, 1987]. Num dos casos, os autores verificaram mesmo uma diminuição dos teores de histamina (e também de putrescina e de cadaverina) durante a ocorrência do referido processo fermentativo [Buteau et *al.*, 1984].

Por outro lado, o trabalho de muitos microbiologistas incidiu sobre a tentativa de descobrir actividade descarboxilante nas bactérias em causa, em especial nas pertencentes à espécie *Leuconostoc oenos*, unanimemente consideradas como as mais aptas para executar a referida transformação. Mayer *et al.* [1971] terão sido dos primeiros a estudar o assunto, tendo concluído que a histamina poderia ser formada por algumas estirpes de *Pediococcus*, em especial da espécie *P. damnosus*, mas não pelas diversas estirpes de *Leuconostoc oenos* ensaiadas, as quais se revelaram todas negativas no que respeita à produção daquele composto. Estes resultados foram sendo, na sua essência, confirmados por diversos outros autores que se dedicaram ao assunto. Weiller e Radler [1976] testaram 105 estirpes de bactérias lácticas, incluindo praticamente todas as estirpes conhecidas de *Leuconostoc œnos*, tendo encontrado capacidade de formação de histamina em apenas uma estirpe de *Pediococcus*. Ough *et al.* [1987] verificaram a formação de quantidades muito reduzidas de histamina (0,1 a 0,7 mg/L) por acção de diferentes estirpes de *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*, mesmo quando suplementadas com histidina. Em experiências similares, Delfini [1985, 1989] verificaram um teor máximo de histamina de 2,8 mg/L por acção de uma estirpe de *Pediococcus cerevisae*, enquanto todas as outras estirpes ensaiadas levaram à formação de teores substancialmente inferiores. Choudhury *et al.* [1990] observaram a capacidade de formação de histamina em duas estirpes de *Lactobacillus buchneri* e a capacidade de formação de tiramina por descarboxilação de tirosina numa estirpe de *Leuconostoc œnos*.

Farias *et al.* [1993] detectaram a presença de histidina-descarboxilase em apenas uma estirpe de *Lactobacillus hilgardi* de entre 21 diferentes espécies de bactérias lácticas encontradas em vinhos argentinos (10 espécies de *Pediococcus pentosaceus*, 7 espécies de *Lactobacillus hilgardi* e 4 espécies de *Leuconostoc oenos*) ensaiadas. Faeth e Radler [1994] confirmaram a capacidade de formação de grandes quantidades de histamina (50 mg/L) das duas estirpes de *Lactobacillus buchneri* referidas por Choudhury *et al.* [1990], tendo observado também a formação de elevados teores de tiramina (41 mg/L) numa estirpe de *Streptococcus*.

Uma alteração nesta convicção generalizada sobre a ausência de capacidade produtora de histamina nas bactérias do género *Leuconostoc oenos* teve lugar finalmente em 1994, quando uma estirpe retirada de um vinho, identificada pelos autores por *L. oenos* 9204, demonstrou essa capacidade [Lonvaud-Funel e Joyeux, 1994]. O facto foi confirmado por estudos posteriores do mesmo grupo que levaram, numa primeira fase, ao isolamento e caracterização da enzima histidino-descarboxilase responsável pelo processo [Rollan *et al.*, 1995] e, posteriormente, à clonagem e sequenciação do gene correspondente [Coton *et al.*, 1997].

Baseados no conhecimento da sequência nucleotídica do gene correspondente à referida histidina-descarboxilase, o mesmo grupo de autores desenvolveu um método baseado na moderna técnica de PCR, pelo qual se torna possível avaliar a presença em vinhos da estirpe contendo a enzima em questão [LeJeune *et al.*, 1995]. A aplicação do método a 118 vinhos representativos das mais importantes regiões francesas mostrou a presença da referida estirpe em cerca de metade dos vinhos analisados [Coton *et al.*, 1998]. Segundo os autores, os vinhos para os quais o teste foi negativo não apresentaram sinais de histamina enquanto os restantes apresentaram teores entre 0,130 e 10,580 mg/L. Nos vinhos contendo histamina, os autores verificaram também a presença de quantidades significativas de outras aminas, nomeadamente tiramina e putrescina (teores não referidos), enquanto nos restantes vinhos essa presença se revelou muito inferior. O estudo da bactéria em questão, todavia, revelou a inexistência de capacidade para a descarboxilação de outros aminoácidos para além da histidina, o que deixa em aberto a possibilidade de existência de outras estirpes com esta capacidade, capazes de actuarem em simultâneo.

Os diversos estudos posteriormente feitos pelo mesmo grupo no sentido de identificar estirpes de *Leuconostoc oenos* com actividade tirosina-descarboxilase positiva resultaram todos em fracasso. Apenas foi possível verificar a presença da referida actividade em duas estirpes de

Lactobacillus brevis isoladas a partir de vinhos com a fermentação maloláctica completa, as quais mostraram aptidão para a formação de tiramina e também de 2-feniletilamina [Moreno-Arribas *et al.*, 2000].

Uma actividade descarboxilásica genérica, sem especificação dos aminoácidos em causa, foi entretanto observada por um grupo de autores portugueses [Leitão *et al.*, 2000] em 6 estirpes de *Leuconostoc oenos*, de um total de 200 estirpes analisadas. Essa actividade, porém, foi verificada apenas em meio de cultura caracterizado por pH 6 e ausência de etanol. A inoculação de vinhos com as referidas estirpes bacterianas resultou na esperada degradação do ácido málico mas não se verificou a formação de quantidades significativas de aminas biogénicas.

Obviamente que, embora constituindo um avanço assinalável na caracterização da origem da histamina nos vinhos, estes resultados deixam perceber estar-se ainda perante um longo caminho a percorrer no que respeita a um esclarecimento cabal das origens das aminas aromáticas nos vinhos. Tal como Aerny [1990] tinha referido a propósito da inoculação de vinhos com estirpes de *Pediococcus damnosus* capazes de formar histamina em meio sintético, também a presença da estirpe de *Leuconostoc oenos* possuidora de actividade histidino-descarboxilásica não leva automaticamente à formação de histamina, o que sugere que outras condições devem estar reunidas para a reacção ter lugar.

Lafon-Lafourcade [1975] tinha avançado com a ideia da formação de histamina estar associada a fenómenos de carência, o que de certa forma condiz com as observações de Aerny [1990] acerca da formação de histamina ter lugar durante a fase final da fermentação maloláctica. Nos últimos anos esta ideia parece começar a ganhar adeptos entre os restantes autores, particularmente entre os acima citados com trabalho na área da identificação de estirpes com actividade descarboxilásica. É o caso de Lonvaud-Funel e Joyeux [1994] que verificaram que a produção de histamina pela estirpe de *Leuconostoc oenos* identificada como histidino-descarboxilase positiva era estimulada em meios carentes em glucose e em ácido málico. Nesse sentido aponta também a observação feita por Leitão *et al.* [2000] acerca de uma maior actividade proteolítica na fase estacionária do crescimento bacteriano, ou seja, após a exaustão do meio nos nutrientes mais energéticos. Bauza *et al.* [1995a], por seu lado, verificaram que a adição de leveduras seleccionadas, que proporciona um arranque e um final de fermentação mais eficazes, contribuía para uma diminuição efectiva dos teores encontrados em relação a vinhos elaborados apenas com a participação da flora indígena, o que também vem corroborar a referida tese.

Outros factores ligados ao processo de vinificação são também considerados por alguns autores como importantes no elevado teor de aminas apresentado por certos vinhos. Assim, Bauza *et al.* [1995a] apontam os processos de fermentação demorados, normalmente acompanhados de intensa maceração, e que são característicos da produção de alguns vinhos tintos de qualidade, como uma possível causa para a formação de teores elevados de histamina e de tiramina. Aqueles autores encontraram uma forte correlação entre a duração desses processos e os teores daquelas duas aminas.

Mais importante ainda parece ser importância do contacto prolongado dos vinhos com as respectivas "borras" no final dos processos fermentativos. Esta ideia, sugerida inicialmente por Buteau *et al.* 1984, foi recentemente defendida por Coton *et al.* [1999] e Soleas *et al.* [1998]. O contacto com as "borras" poderá provocar o enriquecimento do meio nos aminoácidos precursores, nomeadamente por acção de proteases de origem bacteriana, cuja presença foi identificada em certas estirpes de *Leuconostoc oenos* [Manca de Nadra *et al.*, 1997, 1999]. A autólise das leveduras, que entretanto vai tendo lugar, também pode estar na origem da libertação para o meio dos referidos aminoácidos [Lonvaud-Funel *et al.*, 1988]. Não existe, porém, qualquer correlação entre o teor de aminas aromáticas de um vinho e os respectivos aminoácidos precursores, histidina, tirosina e fenilalanina [Bauza *et al.*, 1995a].

O pH e o teor de SO_2 dos mostos em fermentação podem também influenciar decisivamente a formação de aminas, provavelmente pela selecção provocada ao nível do tipo de bactérias contaminantes presentes [Aerny, 1990; Cerutti et *al.*, 1991; Cillliers e Van Wik, 1985; Mayer e Pause, 1973; Vidal-Carou, 1990a]. Teores de pH superiores a 3,5 poderão provocar uma proliferação de bactérias contaminantes, incluindo as da espécie *Pediococcus damnousus*, que são muito sensíveis ao pH, não se conseguindo desenvolver abaixo daquele valor. As bactérias de *Leuconostos oenos*, por seu lado, suportam valores de pH mais baixos, mas são muito sensíveis à presença de SO_2. O pH óptimo para a actividade das diversas amino-descarboxilases parece variar entre 4,0 e 5,4 [Teodorovic *et al.*, 1994].

Ainda assim, todos estes factores não parecem ter qualquer influência sobre os teores de 2-feniletilamina, para a qual a hipótese de origem bacteriana carece de demonstração experimental, e muito dificilmente explicam as variações observadas nos teores de tiramina que, relembre-se, por vezes são mais elevados nos vinhos brancos, geralmente menos ricos em aminoácidos e menos sujeitos a contaminações bacterianas.

1.1.5.4. Evolução da histamina e das aminas aromáticas durante o processo de envelhecimento

É grande o desconhecimento no que se refere à evolução das aminas durante o envelhecimento dos vinhos, o que reflecte o reduzido trabalho experimental realizado nessa área. Bauza *et al.* [1995a] não encontraram diferenças significativas no teor de histamina e de aminas aromáticas de vinhos envelhecidos nas adegas, antes do engarrafamento, durante períodos diferentes, de apenas alguns meses a mais de dois anos. Pelo contrário, foi notória a diferença encontrada pelos mesmos autores entre os vinhos envelhecidos em cubas de cimento e de aço inox e os vinhos envelhecidos em recipientes de madeira, apresentando estes últimos teores de histamina e de tiramina sensivelmente duplos dos primeiros; para a 2-feniletilamina não verificaram qualquer diferença significativa. No estudo já antes citado, que visou a determinação de aminas em vinhos da Rioja (em que os vinhos mais velhos tinham aproximadamente cinco anos de armazenamento) os autores também não verificaram qualquer aumento do teor de aminas com a idade [Vasquez-Lasa *et al.*, 1998]. Coton *et al.* [1998] afirmam, porém, ter verificado que a actividade da enzima histidina-descarboxilase responsável pela transformação de histidina em histamina se mantinha com o tempo, mesmo após a população bacteriana não ser já detectável; em consequência, postulam que a formação de histamina, poderá ter lugar ao longo do processo de envelhecimento.

1.1.5.5. Outros factores com possível influência na formação da histamina e das aminas aromáticas em vinhos

A utilização de processos de fertilização azotada excessivos é referida por Ingargiola e Bertrand [1991] e por Bauza *et al.*, [1995a] como uma das causas dos elevados teores de histamina e de tiramina apresentados por alguns vinhos, sem contudo avançarem com dados concretos. Delas [1993] aponta um valor de 100 kg N/ha/ano como causador de um aumento dos teores de histamina, para lá de um empobrecimento geral da generalidade dos parâmetros de qualidade dos vinhos.

Hipótese interessante foi a colocada por um autor polaco já anteriormente citado, baseado em estudos feitos com vinhos elaborados a partir de baga de sabugueiro [Pogorzelski, 1992]. Segundo aquele autor, a formação de histamina estaria extremamente dependente da composição dos mostos em aminoácidos por três motivos diferentes: o primeiro residia no facto de a cisteína actuar como

inibidor da histidina-descarboxilase, em virtude da sua capacidade de bloquear o fosfato de piridoxal cuja função é essencial para a actividade da enzima; o segundo residia no papel estimulante exercido por alguns aminoácidos, nomeadamente alanina, leucina e arginina, no desenvolvimento de microorganismos produtores de histamina; o terceiro, mais óbvio, estava relacionado com o teor do mosto em histidina, o aminoácido precursor para a síntese da histamina. Não temos conhecimento, porém, de qualquer desenvolvimento posterior da sua proposta. A exemplo do já referido a propósito de extractos de leveduras, o mesmo autor observou também capacidade de formação de histamina a partir de preparações pectolíticas de uso comercial, muito usadas na fase pré-fermentativa do processo de elaboração de alguns vinhos (por exemplo, são muito usadas na preparação de vinhos verdes brancos).

1.1.5.6. Acção de agentes clarificantes na remoção de histamina dos vinhos

O uso habitual de bentonite na clarificação dos vinhos brancos é considerado por alguns autores como responsável pelos menores teores de aminas aromáticas apresentados por estes. A capacidade daquele agente clarificante remover aminas dos vinhos é conhecida de há muito [Cerutti e Colombo, 1972; Mayer e Pause, 1985]. Mais recentemente, Scholten [1996] verificou que concentrações elevadas daquele agente clarificante resultavam numa remoção significativa da histamina presente nos vinhos. Num outro trabalho também recente, verificou-se que o uso de bentonite numa quantidade de 120 g/hL resultou numa redução muito acentuada dos teores de histamina observados (de cerca de 11 mg/L para valores da ordem dos 2-3 mg/L, com quatro distintas variedades comerciais de bentonite) enquanto para a tiramina a diminuição verificada foi praticamente insignificante [Kállay e Body-Szalkai, 1996]. Está descrito, porém, que quantidades de bentonite superiores a 50 g/hL provocam uma diminuição acentuada das qualidades organolépticas do vinho. Nos vinhos tintos, o referido agente clarificante não pode sequer ser usado devido ao facto de promover a remoção de compostos polifenólicos, incluindo os antocianos responsáveis pela cor. Os mesmos autores verificaram igualmente que o carvão activado, em quantidades superiores a 5 g/hL, era ainda mais eficaz na redução dos teores, neste caso tanto de histamina como de tiramina.

1.2. Diaminas e poliaminas naturais

1.2.1. Introdução

No grupo das diaminas e poliaminas naturais, o maior destaque vai para a putrescina, a espermidina e a espermina, compostos que ocorrem ubiquitariamente em todas as células vivas, onde desempenham importantes funções ligadas ao crescimento e diferenciação celular [Seiler *et al.*, 1990; Tabor e Tabor, 1984]. Outros compostos aqui considerados são a cadaverina — que apesar da sua semelhança estrutural com a putrescina não apresenta as mesmas origens e tem uma importância nos organismos vivos bastante mais reduzida — a 1,3-diaminopropano, a 1,6-diaminohexano e a agmatina (ver estruturas na Figura 1.6).

Conhecidos há longo tempo — a título de exemplo podemos referir que a formação de cristais de fosfato de espermina a partir de sémen humano foi evidenciada por V. Leeuwenhoek em 1678 — o interesse pelo estudo destes compostos teve um acréscimo assinalável na última metade do século XX, particularmente desde que o casal Tabor, em 1958, conseguiu elucidar as linhas gerais do

seu processo de síntese biológica [Zappia e Pegg, 1988]. Desde então, e particularmente nos últimos 20-25 anos, situam-se já na casa das dezenas de milhares o número de novas referências a poliaminas e tópicos relacionados, como facilmente se poderá concluir pela consulta a uma base de dados apropriada, o que dá conta da extraordinária importância que lhes é atribuída.

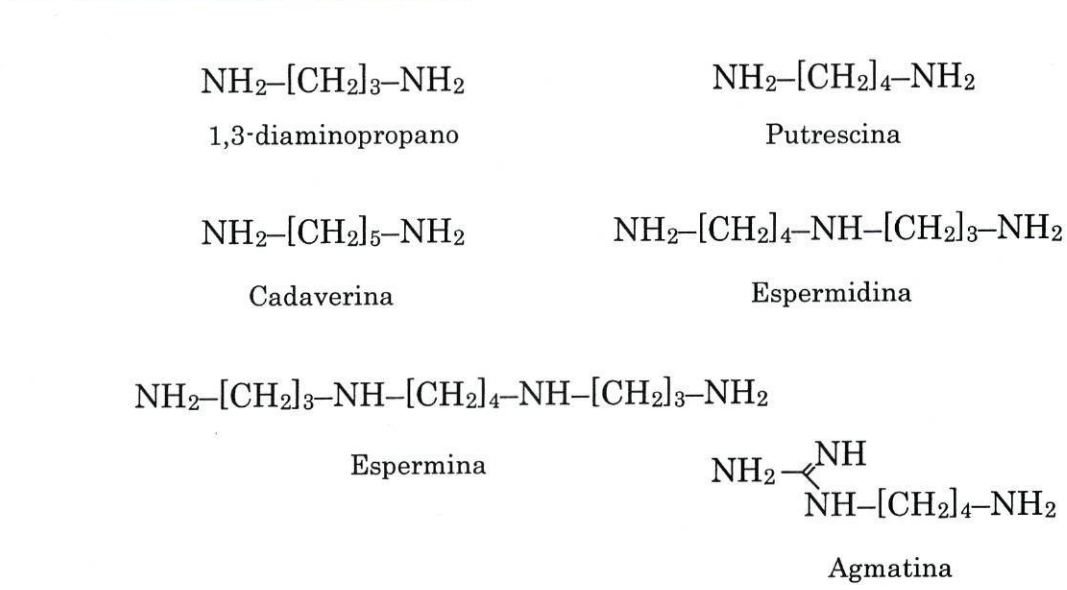


Figura 1.6. Estrutura das diaminas e poliaminas: 1,3-diaminopropano, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina

Os motivos deste generalizado interesse pelas di e poliaminas baseiam-se no facto de se tratar de compostos que se encontram presentes em todas as células vivas, em concentrações que se podem considerar relativamente elevadas e, fundamentalmente, cujos teores aumentam significativamente nos tecidos que se encontram em processo de rápido crescimento. Este facto leva a que lhes seja atribuído um papel essencial na etiologia de doenças como o cancro, da mesma forma que pode abrir novos caminhos no combate a certas infecções devastadoras como a malária e, também, no controlo de fitopatogénicos responsáveis pela devastação de muitas plantas [Galston e Weinstein, 1988].

Durante muito tempo consideradas como "moléculas à procura de uma função", está hoje perfeitamente estabelecido que a putrescina, a espermidina e a espermina exercem funções essenciais para o crescimento e o normal desenvolvimento de microorganismos bem assim como para as células das plantas e dos animais superiores. Actuam fundamentalmente a nível dos processos de divisão

celular, sendo mesmo consideradas, nas plantas, como uma nova classe de factores de crescimento ou hormonas vegetais [Bagni e Pistocchi, 1988]. Muitos dos mecanismos que regulam o seu modo de actuação continuam, porém, por elucidar. Exemplo bem demonstrativo, que não resistimos a deixar de referir, é o título de um trabalho recente de dois autores japoneses conhecidos pelo seu trabalho nesta área desde os anos setenta: *"Poliaminas: misteriosos moduladores de funções celulares"* [Igarashi e Kashiwagi, 2000].

A presença de di e poliaminas nos alimentos apresenta, deste modo, aspectos contraditórios, que convém desde já salientar. Por um lado, trata-se de compostos indispensáveis ao organismo humano, especialmente nas fases de crescimento intenso ou de rejuvenescimento de determinado tipo de tecidos ou de órgãos (fases pós-operatórias, queimaduras, etc.). Por esse motivo, e como veremos mais adiante, alguns autores advogam firmemente a necessidade da suplementação de alguns tipos de dieta com este tipo de compostos ou, pelo contrário, a sua total supressão na dieta de pacientes com determinado tipo de doenças, em especial as associadas ao crescimento indevido de determinados tecidos, como é o caso do cancro. Por outro lado, a sua presença em alguns alimentos, em particular a presença de putrescina, está normalmente associada a fenómenos de contaminação bacteriana, sendo usada como indicador de insuficiente qualidade higiénica, um pouco à semelhança do que se passa com a histamina. Acresce a isto, o facto atrás mencionado, da sua presença poder potenciar os fenómenos de intolerância/intoxicação provocados nalguns indivíduos pela presença de histamina e tiramina nos alimentos, em virtude da sua contribuição para a inibição das enzimas gastro-intestinais responsáveis pela degradação daqueles compostos.

Tendo em atenção o panorama descrito, parece evidente a necessidade de conhecimentos fidedignos e actualizados respeitantes à presença de poliaminas nos diversos alimentos, com particular destaque para os produtos fermentados, como os vinhos, onde os mesmos podem existir em quantidades mais elevadas.

1.2.2. Importância das diaminas e das poliaminas no metabolismo humano

A exemplo do que acontece na generalidade dos organismos vivos, a putrescina, a espermidina e a espermina exercem no homem um papel determinante nos mecanismos de renovação celular podendo considerar-se, em consequência, essenciais para a manutenção da saúde.

A acção destes compostos a nível celular resulta da sua peculiar estrutura policatiónica, a qual lhes facilita a interacção com moléculas carregadas negativamente e a consequente possibilidade de ligação a estruturas nucleares e de membrana, sobretudo fosfolípidos, proteínas e ácidos nucleicos [Smith, 1985; Seiler, 1990; Tabor e Tabor, 1984]. A fracção livre e a fracção ligada das poliaminas parecem estar presentes num rápido equilíbrio dinâmico. A maior parte das suas funções celulares é explicada pelas modificações estruturais causadas no RNA, molécula a que se encontram preferencialmente ligadas no interior do compartimento celular [Igarashi e Kashiwagi, 2000]. Embora possam actuar de forma não-específica por ligação a estruturas celulares carregadas negativamente (papel em que podem ser substituídos por catiões metálicos como o Ca^{2+} e o Mg^{2+}) muitos dos efeitos biológicos das di e poliaminas são específicos, pelo que se podem considerar como substâncias essenciais para o crescimento e proliferação celular. Bardócz *et al.* [1995] sumarizam as etapas dos processos de síntese proteica e de síntese de DNA e de RNA em que parece haver uma acção de modulação por parte das di e poliaminas, e que incluem:

- Controlo e iniciação do processo de translação.
- Regulação da sua fidelidade
- Estimulação da associação das subunidades ribossómicas durante a síntese de DNA e de RNA.
- Estabilização da estrutura do RNA de transferência
- Redução do grau de degradação do RNA
- Envolvimento no processo de condensação do DNA

Os aspectos até agora mais difíceis de explicar referem-se ao tipo de regulação a que obedece o comportamento das di e poliaminas no interior do compartimento celular e às diferentes funções que as mesmas parecem executar, de acordo com o estado evolucionário da célula. No que respeita a este último ponto, a mais recente proposta é a de Igarashi e Kashiwagi [2000] que atribuem duas categorias diferentes de funções a estes compostos, de acordo com os seus níveis intracelulares: em concentrações relativamente baixas, a sua acção será essencialmente de manutenção da viabilidade celular enquanto concentrações mais elevadas terão um efeito estimulante sobre a proliferação celular, com as consequências positivas ou negativas, que daí poderão advir.

Embora não mencionada por muitos autores, uma possível propriedade das poliaminas que tem vindo a ganhar relevo em muitos dos trabalhos publicados é o seu hipotético papel como anti-oxidantes e anti-inflamatórios naturais do organismo. O tema foi recentemente revisto por Løvaas [1997] num bem documentado trabalho com mais de 150 referências bibliográficas. Resumidamente, a tese do autor, sustentada numa elevada quantidade de trabalho experimental, é a de que as poliaminas têm uma acção geral de protecção do organismo contra todas as formas de agressão oxidativa, protegendo em especial os ácidos nucleicos e os ácidos gordos poliinsaturados desse tipo de ataque. A forma como o fazem estará associada à sua dupla capacidade de ligação a estruturas aniónicas e catiónicas: no primeiro caso, isso permite-lhes a sua ligação a ácidos nucleicos e membranas fosfolipídicas, protegendo-as dos agentes oxidantes capazes de actuar sobre as mesmas; no segundo caso, a sua ligação a catiões metálicos actua como forma de prevenção da formação de locais específicos dentro da célula com grande densidade de oxigénio activo. Recentemente verificou-se que a acção anti-inflamatória da espermina é conseguida por intermédio da sua capacidade de modulação da actividade dos macrófagos [Zhang *et al.*, 2000].

Bastante interessante no contexto desta tese é a proposta muito recentemente apresentada por Dandrifosse *et al.* [2000], que postularam um papel essencial para as poliaminas, espermidina e espermina, na prevenção de alergias alimentares. O seu estudo, baseado em trabalho experimental desenvolvido em ratinhos e também em crianças de tenra idade, permitiu concluir que as poliaminas são essenciais para um normal desenvolvimento do tracto digestivo das crianças, de grande importância nomeadamente no que respeita à permeabilidade às macromoléculas, e que a espermina, em particular, desempenha um papel de importância fundamental na proliferação e diferenciação dos linfócitos isolados das amígdalas. A probabilidade de desenvolvimento de alergias alimentares por parte das crianças mostrou uma correlação negativa com os teores de espermina do leite com que eram alimentadas, chegando a atingir os 80 % quando os teores eram inferiores a 2 nmol/mL e aproximando-se de zero quando esses teores ultrapassavam os 13 nmol/mL. Segundo os autores, o leite materno apresenta geralmente poliaminas em quantidade suficiente para impedir o aparecimento de fenómenos alérgicos, mas o leite em pó apresenta teores bastante mais reduzidos, pelo que será aconselhável a sua suplementação com os referidos compostos.

A maior parte das células humanas, tal como as dos outros seres vivos, tem capacidade para produzir as poliaminas de que necessitam para o seu normal funcionamento. A ornitina, produto resultante do metabolismo da arginina, é habitualmente considerada como o precursor exclusivo para

a sua síntese "de novo", intervindo no processo a enzima ornitina-descarboxilase, que catalisa a descarboxilação daquele composto com formação de putrescina.

A partir da putrescina existem duas grandes vias metabólicas responsáveis pela formação e degradação das poliaminas: o chamado ciclo de interconversão das poliaminas, esquematizado na Figura 1.7, e o chamado processo de catabolismo terminal [Seiler, 1990].

Por intermédio do referido ciclo de interconversão das poliaminas, a putrescina pode dar origem à espermidina (triamina) e à espermina (tetraamina), por transferência sucessiva de grupos aminopropil, cujo dador é a S-adenosilmetionina descarboxilada, proveniente do metabolismo do aminoácido metionina. Ao contrário do que sucede com a putrescina, a síntese das poliaminas está assim dependente da disponibilidade de S-adenosilmetionina descarboxilada e, desse modo, directamente ligada ao metabolismo de um segundo aminoácido, a metionina. Um dos produtos formados em quantidades equimoleculares durante a produção de espermidina e de espermina é a 5-metiltioadenosina, reutilizado pela célula na formação de ATP.

Simultaneamente, e em sentido inverso, a espermina e a espermidina podem ser transformadas nos seus precursores imediatos, espermidina e putrescina, respectivamente. Essa transformação tem como ponto de partida a acetilação das moléculas de espermina e de espermidina, o que leva a uma diminuição da sua polaridade, logo a uma maior facilidade na sua participação nos processos de troca entre o meio intracelular e o exterior. A acetilespermina e a acetilespermidina podem então, sob a acção de poliamino-oxidases, cindir-se em duas moléculas dando origem a uma molécula de espermidina ou de putrescina, respectivamente, e a uma molécula de acetoamidopropanal. Em todo este processo metabólico intervêm uma série de enzimas altamente reguladas e induzidas por inúmeros factores, cada uma delas capaz de se tornar no factor limitante do processo, dependendo da situação fisiológica [Seiler, 1990].

O processo de catabolismo terminal das poliaminas, é catalisado por amino-oxidases capazes de transformar cada uma das poliaminas nos respectivos aldeídos por desaminação oxidativa de um grupo amina primário. Estes aldeídos são posteriormente transformados em ácidos ou compostos γ-lactâmicos e, nessa forma, excretados por via urinária, juntamente com derivados acetilados não metabolizados [Seiler *et al.*, 1981].

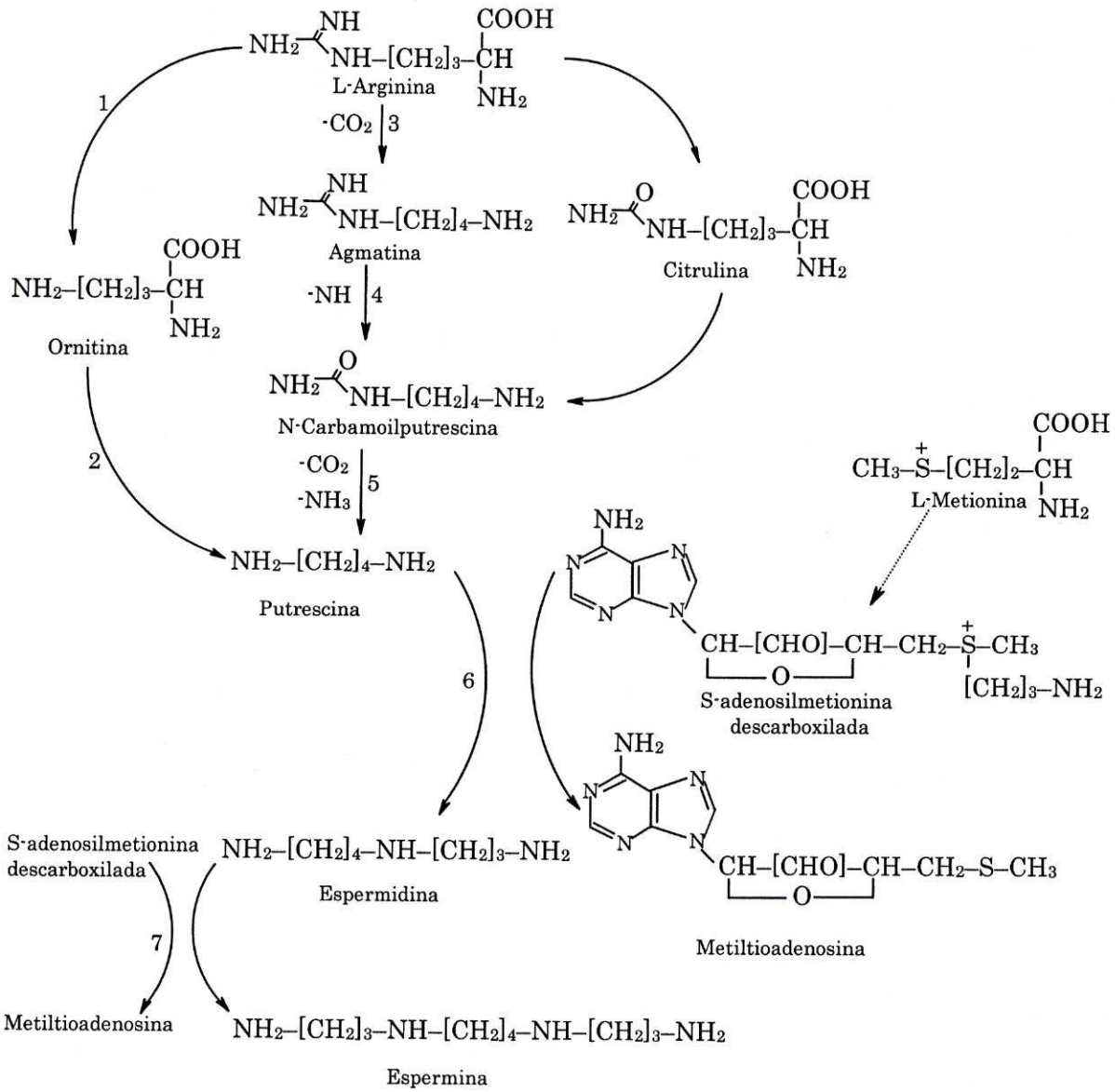


Figura 1.7. Vias metabólicas que regulam a produção de putrescina, espermidina e espermina. (1-arginase; 2-ornitina-descarboxilase; 3-arginina-descarboxilase; 4-agmatina-iminohidrolase; 5-putrescina-carbamoíl-transferase; 6-espermidina-sintase; 7-espermina-sintase)*.

* Para evitar a repetição da figura algumas páginas adiante, está indicada na mesma a formação de putrescina a partir da arginina pela via da agmatina e pela via da citrulina, as quais apenas têm lugar em plantas e microorganismos. Como é descrito no texto, no homem apenas se conhece a via metabólica que apresenta a ornitina como intermediária.

No passado pensou-se que a síntese das poliaminas era sempre feita *in situ* nas células, à medida das respectivas necessidades. Todavia, sabe-se hoje que, adicionalmente ao processo de síntese intracelular de poliaminas, os tecidos com necessidades especiais destes compostos podem usar as poliaminas provenientes de fontes exógenas, particularmente da dieta e da acção das bactérias residentes no tracto gastrointestinal [Bardócz *et al.*, 1993; Sarhan *et al.*, 1989].

O teor das poliaminas nas células é, desta forma, um processo passível de grande regulação, ao nível da respectiva síntese, degradação, absorção e excreção [Igarashi e Kashiwagi, 1999; Pegg, 1986]. A sua síntese e absorção são estimuladas por estímulos proliferativos, que simultaneamente inibem a respectiva degradação e excreção. Pelo contrário, quando os teores de poliaminas são superiores às necessidades celulares, há uma indução da sua degradação e excreção e, ao mesmo tempo, uma inibição dos mecanismos de absorção e de síntese, neste último caso principalmente por aumento da velocidade de degradação da ornitina-descarboxilase, a enzima que ocupa um papel chave em todo o processo [Igarashi e Kashiwagi, 2000].

No que respeita ao aporte de poliaminas provenientes da dieta, experiências desenvolvidas em ratinhos mostraram que as poliaminas são facilmente absorvidas no intestino delgado, provavelmente por difusão passiva [Bardócz *et al.*, 1995]. É possível que outros mecanismos de absorção, como o transporte activo ou a difusão facilitada, também tenham lugar, mas a níveis de concentração muito inferiores aos normalmente verificados nos alimentos, logo de reduzida importância na absorção de compostos provenientes da dieta [Scemama *et al.*, 1993].

Contudo, apenas uma fracção das poliaminas que atingem o lúmen intestinal são absorvidas, integradas na corrente circulatória e postas à disposição dos diferentes órgãos. No estudo feito em ratinhos já atrás referido, Bardócz *et al.* [1995] verificaram não chegar a 50 % a fracção absorvida, sendo a restante porção imediatamente metabolizada por acção de enzimas intestinais responsáveis pelos processos de catabolismo das poliaminas; a diamino-oxidase (DAO), no caso da putrescina e a poliamino-oxidase (PAO), no caso da espermidina e da espermina, parecem ser as enzimas com um papel mais importante no controlo da quantidade de poliaminas disponíveis para absorção. No caso da putrescina, essa acção metabólica faz-se sentir com especial intensidade, o que não admira se tivermos em conta que a DAO é uma das enzimas mais abundantes nos tecidos intestinais [Seiler *et al.*, 1980].

De qualquer dos modos, tendo em atenção os teores apresentados pelos diversos alimentos, a quantidade de poliaminas proveniente da dieta parece ser quantitativamente importante em relação à quantidade de poliaminas sintetizadas pelas células do organismo. Este facto assume especial relevância em situações de elevada exigência do organismo em poliaminas, nas quais as quantidades formadas endogenamente pelos tecidos não chegam para suprir as respectivas necessidades.

Assim, as poliaminas fornecidas pela dieta podem desempenhar um papel da maior importância durante as etapas de crescimento intenso, como são a infância e a adolescência (pese embora uma maior actividade dos processos metabólicos naturais durante estas fases), e em situações patológicas de grande exigência nestes compostos devido à necessidade de uma rápida regeneração de tecidos lesados: processos de cicatrização, de recuperação pós-cirúrgica, de regeneração hepática, etc.

Nos adultos saudáveis as necessidades do organismo em poliaminas são menores, já que somente são necessárias para a normal substituição de algumas células e como mediadores da acção das hormonas de crescimento. À medida que se avança na idade, a importância das poliaminas fornecidas pela dieta volta a aumentar, em consequência da normal diminuição dos processos metabólicos celulares, particularmente visível na diminuição da actividade da ornitina-descarboxilase.

A ideia de se controlar os níveis de poliaminas da dieta, inclusivamente a nível da alimentação parenteral, de acordo com as necessidades concretas do organismo tem vindo a ser defendida por alguns autores, mas a sua implementação tem sido difícil, estando-se ainda a dar os primeiros passos nesse sentido. As dificuldades a vencer são bastantes, nomeadamente a nível dum conhecimento adequado dos diferentes mecanismos de controlo dos processos de síntese/degradação endógena e também da regulação dos mecanismos de absorção das poliaminas com origem exógena. É conhecido o papel crucial desempenhado pela ornitina-descarboxilase e pela adenosilmetionina-descarboxilase na regulação da globalidade do processo biossintético. Trata-se, contudo, como foi atrás referido, de enzimas altamente reguladas, sujeitas não só a fenómenos de retroinibição por parte dos diversos produtos formados [Holm *et al.*, 1989; Persson *et al.*, 1989], como, provavelmente, a outros sistemas mais complexos de regulação, que têm sido difíceis de elucidar na sua totalidade. A título de curiosidade podemos referir, por exemplo, ter sido descoberta recentemente a capacidade do etanol em inibir a expressão da ornitina-descarboxilase em tecidos embrionários, podendo ser este o principal mecanismo que leva ao atraso no crescimento dos fetos com origem em mães alcoólicas [Sandstrom *et al.*, 1993; Shibley *et al.*, 1995].

Alguns estudos feitos em animais de experiência apontam para uma melhor resposta em situações pós-traumáticas com a administração de espermidina numa quantidade da ordem de 0,05 % da quantidade total de azoto fornecido (Jeevanandan *et al.*, 1997].

Em diversos trabalhos do grupo de T.K. Smith e colaboradores, efectuados com pintainhos, os autores concluíram que a suplementação das dietas com pequenas quantidades de poliaminas podia exercer efeitos benéficos no crescimento dos animais mas que um pequeno aumento nas quantidades usadas levava, de imediato, à observação de sintomas de toxicidade. Os melhores resultados foram obtidos para a putrescina, a mais pequena e logo a menos catiónica das poliaminas, que se mostrou promotora do crescimento quando usada em quantidades de 0,2 % e tóxica em quantidades de 0,8 % [Smith, 1990]. Com a espermina, a mais catiónica das poliaminas, os resultados obtidos foram piores, tendo-se verificado apenas um pequeno efeito de promoção do crescimento a níveis muito reduzidos de suplementação e efeitos tóxicos mais pronunciados do que os observados para a putrescina para os mesmos níveis de suplementação [Sousa-Dias *et al.*, 1995]. Finalmente, para a espermidina os resultados obtidos foram intermédios, tendo-se verificado algum incremento no crescimento quando se usaram quantidades de 0,05 % e uma depressão do crescimento com níveis de 0,4 % [Smith *et al.*, 1996].

A pequena diferença observada entre os níveis de poliaminas capazes de favorecer o crescimento dos animais e os níveis capazes de exercer efeitos tóxicos, leva a que sejam necessários cuidados redobrados na possível elaboração de dietas deste tipo para o homem. Além do mais tornam obrigatório um profundo conhecimento dos teores presentes nos constituintes da dieta, que podem ser por si só ser suficientes ou até excessivos em relação às quantidades pretendidas. O problema torna-se ainda mais complexo se tivermos em conta que o efeito positivo das poliaminas no crescimento pode dar-se não por acção directa nos tecidos mas de forma indirecta, possivelmente por intensificação da absorção intestinal de outros nutrientes como indicado em estudos efectuados em vitelos [Grant *et al.*, 1989] e em leitões [Grant *et al.*, 1990].

A elaboração de dietas de baixo teor de poliaminas para situações como as neoplasias, em que há um crescimento indesejável e descontrolado dos tecidos, parece recomendável, embora até agora não tenha sido reportada qualquer experiência concreta nesse sentido. As linhas de investigação seguidas têm até agora dedicado mais atenção ao controlo da síntese endógena de poliaminas do que ao seu fornecimento por via externa. Como exemplo, podemos citar uma experiência recente que

consistiu na administração de DFMO, um conhecido inibidor da ornitina-descarboxilase, em pacientes com risco de neoplasias do tracto intestinal, na qual se registou uma forte reacção secundária de ototoxicidade [Love *et al.*, 1998].

1.2.3. Formação de diaminas e poliaminas. Breve referência à sua presença noutros alimentos

Como já referimos as di e poliaminas são compostos ubiquitários, presentes em todas as células vivas. Desta forma, a sua presença nos alimentos, tanto de origem vegetal como animal pode considerar-se como natural. A sua génese, contudo, pode ter causas múltiplas, a começar na actividade metabólica normal dos tecidos em causa e a acabar, mais uma vez, na actividade desenvolvida por microorganismos, quer os usados nos processos fermentativos comuns a muitos alimentos quer aqueles, que sem qualquer papel positivo no processo de elaboração do alimento, actuam simplesmente como agentes contaminantes, responsáveis pela deterioração dos mesmos.

Tanto os microorganismos como as plantas superiores apresentam, na sua generalidade, processos metabólicos semelhantes aos já descritos para o homem, no que respeita à formação de poliaminas, incluindo o ciclo de interconversão atrás referido. A diferença maior consiste na origem da putrescina, composto que está na base do referido ciclo metabólico: ao contrário dos vertebrados, em que a única via de síntese existente corresponde à descarboxilação da ornitina, nos microorganismos e nas plantas superiores a putrescina pode também ser formada a partir da arginina por intermédio de um processo metabólico que inclui a agmatina e a *N*-carbamoílputrescina como intermediários e que envolve sucessivamente três enzimas: a arginina-descarboxilase, a agmatina--iminohidrolase e a putrescina-carbamoíltransferase (Figura 1.7). Uma terceira via, conhecida como a via da citrulina, apenas foi verificada em células de *Sesamum* [Crocomo *et al.*, 1970] e de cana de açúcar [Maretzki *et al.*, 1969], tendo a sua ocorrência também sido observada em *Escherichia coli* [Akamatsu *et al.*, 1978]. Nesta via, o passo final de formação da putrescina a partir da *N*-carbamoílputrescina é comum à via da agmatina, envolvendo de igual modo a putrescina-carbamoíltransferase.

A formação de cadaverina, por seu lado, parece dar-se, à semelhança do referido para as aminas aromáticas, por simples descarboxilação de um aminoácido, a lisina, sendo poucas as referências na literatura à disseminação na natureza da enzima lisina-descarboxilase responsável pelo processo.

Está já hoje relativamente bem documentada a presença de putrescina e de poliaminas em todos os tipos de alimentos, sejam de origem vegetal (frutos e vegetais), sejam de origem animal (leite, ovos, carne, etc.) [Bardócz *et al.*, 1995; Coutts *et al.*, 1986; Mariné-Font *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 1997]. Na Tabela 1.1, retirada de Bardócz *et al.* [1995], podemos observar, a título de exemplo, os valores obtidos pelo referido grupo de trabalho em produtos de grande consumo na Inglaterra.

TABELA 1.1

TEORES EM PUTRESCINA E EM POLIAMINAS (mg/kg OU L) EM ALGUNS PRODUTOS ALIMENTARES CONSUMIDOS POR ADULTOS EM INGLATERRA

Alimento	Putrescina	Espermidina	Espermina
Cereais			
Mistura de cereais para pequeno-almoço (10 var)	2,0-2,2	24,1-24,4	6,0-6,6
Tarte de compota	0,9-1,1	3,9-4,5	0,2-0,4
Pão de ló	0,7-1,1	2,5-3,3	0,2-0,6
Ovos			
Cozidos	0,3-0,4	0-0,1	0,2-0,6
Vegetais			
Sopa de lentilhas	3,3-3,4	21,5-22,5	6,8-7,8
Batatas fritas em pacote (3 var.)	38,4-41,9	35,2-39,9	4,2-5,0
Batatas fritas	21,1-22,0	23,8-25,8	2,4-2,8
Frutos			
Laranjas	1,2-1,3	2,6-2,9	0,4-0,6
Pêssegos	1,2-1,3	2,2-2,8	0,2
Pêras	0,9-1,1	3,0-3,6	0,4-0,8
Uvas	0,8-1,2	5,2-1,6	0,4-0,6
Amêndoas			
Amêndoas de cajú	16,0-16,3	37,0-38,6	53,0-55,8
Carne			
Bife crú	14,9-16,5	2,8-3,0	35,0-39,4
Bife cozinhado	4,9-5,1	3,8-4,1	20,8-24,4
Posta irlandesa (cabrito) cozinhada	1,8-2,0	8,0-9,0	14,6-15,6
Carne de porco cozinhada	22,1-23,1	6,5-7,4	11,2-12,8
Peixe			
Peixe em molho de queijo	4,8-1,2	2,9-3,5	3,2-3,8
Doces			
Açúcar (3 var.)	—	0,1-0,3	—
Compotas (4 var.)	1,2-1,3	1,7-2,6	0,8-2,6
Bebidas			
Chá: Folhas	14,4-16,1	35,5-39,7	57,2-59,4
Infusão	—	0,1-0,3	—
Café: Folhas	2,9-3,3	2,6-3,5	0,2-0,6
Infusão	0-0,1	—	—

Nota: todos os valores do trabalho original foram transformados de μmol/kg ou L para mg/kg ou L, tendo sido arredondados às décimas.

1.2.4. Teores de diaminas e poliaminas em vinhos

É muito extenso o número de referências existentes na literatura relativas aos teores de putrescina e de cadaverina encontrados em vinhos. Tal facto não será de surpreender, tendo em conta que a putrescina constitui muitas vezes a amina biogénica mais abundante, independentemente do tipo de vinho, e a cadaverina, embora em quantidades mais diminutas, é também um constituinte habitualmente presente na generalidade das amostras. Já os dados relativos à presença das diferentes poliaminas são bastante mais escassos, não só pelas quantidades inferiores em que se encontram, como também pelas dificuldades analíticas colocadas pelas mesmas. A metodologia seguida foi a mesma já usada anteriormente para a histamina, a tiramina e a 2-feniletilamina, limitando-nos a fazer referência aos resultados mais significativos, nomeadamente àqueles que correspondem à análise de um grande número de amostras. Como a maioria dos estudos foram já referidos a propósito dos teores de histamina e de aminas aromáticas, decidimos omitir alguns dos detalhes referentes aos mesmos (proveniência das amostras, p. ex.) repetindo aqueles que nos pareceram indispensáveis para facilitar a leitura dos resultados.

Um dos primeiros ensaios em larga escala referentes à determinação de putrescina e de cadaverina (juntamente com histamina e tiramina) foi o trabalho de Zee *et al.* [1983] que analisaram um total de 221 amostras; os teores médios obtidos para a putrescina foram superiores nos vinhos tintos (5,13 mg/L; 102 amostras) do que nos vinhos brancos (1,94 mg/L; 99 amostras), tendo sido de 3,30 mg/L nas amostras de vinhos tipo Porto (17) e de 0,73 mg/L nas amostras de vinhos tipo Sherry (3). Para a cadaverina, os teores médios encontrados foram substancialmente mais baixos, sendo ligeiramente superiores nos vinhos brancos (0,92 mg/L) do que nos vinhos tintos (0,66 mg/L) e nos vinhos tipo Porto (0,23 mg/L).

Cerutti *et al.* [1986] analisaram 71 amostras de vinhos italianos tendo registado a presença de putrescina em todas as amostras, variando entre 0,2 e 5 mg/L em 52 das amostras, entre 5 e 10 mg/L em 13 amostras e entre 10 e 15 mg/L nas 6 amostras restantes. Os vinhos tintos apresentaram, em regra, teores superiores aos vinhos brancos; a quase totalidade das amostras com teores superiores a 3 mg/L eram de vinhos tintos, incluíndo todas as amostras com valores superiores a 10 mg/L. A cadaverina, por seu lado, foi encontrada apenas em 38 das amostras, com valores oscilando entre os 0,2 mg/L (limite de detecção do método de HPTLC usado) e 1,2 mg/L. A frequência da presença do composto foi maior nas amostras de vinho branco do que nas amostras de vinho tinto.

Em trabalho posterior do mesmo grupo, no qual foi usada uma metodologia analítica mais avançada (HPLC), [Vecchio *et al.*, 1989], a análise de 33 amostras revelou a presença de putrescina em todas as amostras, com teores entre 0,2 e 9,4 mg/L, enquanto a cadaverina foi encontrada somente numa única amostra num teor de 0,3 mg/L (limite de detecção do método: 0,05 mg/L).

No seu relatório, Woller e Kobelt [1990] afirmam ter encontrado putrescina na maioria dos vinhos analisados, com um teor máximo de 30 mg/L enquanto a presença de cadaverina foi observada em cerca de 50 % das amostras, sem nunca ultrapassar os 3 mg/L, com excepção de um vinho da casta Gewürztraminer, que apresentou 5 mg/L.

No relatório publicado em 1990, com dados relativos à análise de vinhos tintos de grande qualidade produzidos em França (23 amostras), Espanha (21 amostras) e Itália (17 amostras) [Tricard e Cazabeil, 1990], foram registados para a putrescina teores médios de 10,8, 16,6 e 6,37 mg/L, para vinhos franceses, espanhóis e italianos, respectivamente, com variações de 1,7 a 33,6, de 7,7 a 76,0 e de 3,2 a 14,4 mg/L, e para a cadaverina teores médios de 0,18, de 0,25 e de 0,21 mg/L, para os mesmos vinhos, variando de 0,1 a 0,4, de 0,1 a 0,5 e de 0,1 a 0,4 mg/L.

As principais conclusões retiradas dos trabalhos mencionados, que consistem na verificação de uma presença de putrescina significativamente superior à de cadaverina (constituindo mesmo, em muitos casos, a amina biogénica mais abundante presente nos vinhos) e com teores mais elevados em vinhos tintos do que em vinhos brancos é uma tónica dominante confirmada pela generalidade dos estudos posteriores.

Assim, Ibe *et al.* [1991] encontraram, em 32 amostras de vinhos tintos, teores médios de 4,84 e de 0,22 mg/L para a putrescina e a cadaverina, respectivamente, com variações de 0,74 a 28,6 mg/L no primeiro caso e de 0,03 a 0,48 mg/L no segundo. Nas 43 amostras de vinhos brancos analisadas, os teores médios obtidos foram de 1,20 e de 0,06 mg/L, respectivamente, tendo no caso da putrescina variado entre 0,11 e 10,4 mg/L enquanto que para a cadaverina o número de amostras positivas (acima do limite de detecção – 0,02 mg/L) foi de apenas 31, com um teor máximo observado de 0,38 mg/L. Os autores também quantificaram os teores de espermidina, tendo encontrado o composto em 25 amostras de vinhos tintos e 19 amostras de vinho branco, com teores médios de 0,16 e de 0,04 mg/L, respectivamente, e com máximos de 0,81 e de 0,34 mg/L.

Ingargiola e Bertrand [1991] obtiveram teores médios de 17,49 e de 3,06 mg/L, para a putrescina e para a cadaverina, respectivamente, em 49 amostras de vinhos tintos franceses e teores médios das mesmas aminas de 4,23 e de 1,24 mg/L em 13 amostras de vinhos brancos da "Bourgogne", nos quais a fermentação maloláctica tinha ocorrido, e de 1,83 e 0,42 mg/L em 7 amostras de vinhos brancos de "Bourdeaux" não sujeitos ao referido processo fermentativo.

Nos estudos citados por Lehtonen [1996] são referidos teores médios de putrescina de 14,3 e de 1,1 mg/L e teores médios de cadaverina de 0,5 e de 0,3 mg/L, para 200 amostras de vinhos tintos e 125 amostras de vinhos brancos, respectivamente [Holen e Sanderud, 1991]; teores médios de 21,4 e de 11,1 mg/L, para a putrescina, e de 0,3 e de 0,1 mg/L, para a cadaverina, em 151 amostras de vinhos tintos e 51 amostras de vinhos brancos, respectivamente [Mayer e Pause, 1987]; teores variando entre 1,0 e 24,0 mg/L e entre 0,6 e 4,7 mg/L, para a putrescina, e sempre inferiores a 0,010 mg/L, no caso da cadaverina, em 38 amostras de vinhos tintos e 56 amostras de vinhos brancos [Maxa *et al.*, 1992].

Elevados teores de putrescina foram igualmente encontrados por Bauza *et al.* [1995a] em amostras de vinho tinto. No seu estudo com dados relativos a 150 vinhos tintos e 70 vinhos rosés e brancos das regiões do "Rhône" e da "Provence", aqueles autores encontraram nos vinhos tintos um teor médio de 12,70 mg/L, havendo 43 % das amostras com um teor superior a 10 mg/L e cerca de 10 % com um teor superior a 20 mg/L. Os vinhos brancos e os vinhos rosés apresentaram teores médios idênticos, de 2,43 e de 2,92 mg/L, respectivamente. No que respeita à cadaverina, o composto foi detectado apenas em 58 % das amostras (limite de detecção do método usado: 0,1 mg/L) e destas 95 % apresentaram um teor inferior a 0,5 mg/L.

No mesmo ano, o mesmo grupo de autores publicou outro trabalho com dados referentes a 84 amostras com a mesma origem, mas obtidos através de uma metodologia analítica diferente que lhes permitiu a quantificação de espermidina, espermina e agmatina [Bauza *et al.*, 1995b]. Os teores médios encontrados para a espermidina e para a espermina foram, respectivamente, de 0,6 e 0,1 mg/L nas amostras de vinhos tintos (54), de 0,4 e 0,2 mg/L nas amostras de vinhos rosés (15) e de 0,3 e 0, 1 mg/L nas amostras de vinhos brancos; apenas 14 amostras de vinhos tintos e 1 amostra de vinho branco apresentaram um teor superior a 1 mg/L. No que respeita à agmatina, os teores encontrados foram surpreendentemente elevados, o que na nossa opinião poderá ter sido resultado de deficiência do processo analítico usado, como se pode adivinhar pela análise dos cromatogramas

apresentados, nos quais o pico identificado como sendo de agmatina aparece com uma resolução muito má. 21,6, 9,0 e 10,3 mg/L foram os teores médios do composto observados pelos autores nas amostras de vinhos tintos, rosés e brancos, respectivamente.

Teores de putrescina ainda mais elevados foram registados por Vazquez-Lasa *et al.* [1998] na sua análise de vinhos da Rioja. Para as quatro diferentes categorias de vinhos — "jovens", "crianzas", "reservas" e "grandes reservas" — os autores verificaram teores médios de, respectivamente, 32,97 mg/L (36 amostras), 31,35 mg/L (26 amostras), 33,79 mg/L (17 amostras) e 36,10 mg/L (10 amostras). Em 10 amostras de vinhos brancos e 10 amostras de vinhos rosés da mesma região simultaneamente analisadas os teores médios encontrados foram significativamente mais baixos, 3,01 e 3,84 mg/L, respectivamente, em concordância com os valores habitualmente encontrados por outros autores. Nas mesmas amostras, os teores de cadaverina obtidos foram de, respectivamente, 0,61, 1,74, 1,25 e 1,32 mg/L, nas amostras dos distintos tipos de vinhos tintos, de 0,28 mg/L nas amostras de vinhos brancos e de 0,40 mg/L nas amostras de vinhos rosés.

Nos diversos trabalhos do grupo de Busto e colaboradores, incidindo em vinhos da região de Tarragona, os teores obtidos para a putrescina em vinhos tintos, são bastante inferiores aos atrás mencionados. Estes autores obtiveram teores médios de 4,61 mg/L, com uma variação entre 1,60 e 8,80 mg/L, em 13 amostras analisadas [Busto *et al.*, 1995], teores médios de 3,76 mg/L, com uma variação entre < 0,005 mg/L (limite de detecção) e 5,04 mg/L, em 44 amostras analisadas [Busto *et al.*, 1996b], e teores médios de 4,4 mg/L, com uma pequena variação entre 3,3 e 4,8 mg/L, em 15 amostras analisadas [Busto *et al.*, 1997]. Num dos trabalhos mencionados [Busto *et al.*, 1996b], os autores também analisaram 8 amostras de vinhos róses e 14 amostras de vinhos brancos, tendo obtido teores médios semelhantes aos obtidos para os vinhos tintos: 3,65 e 3,04 mg/L, respectivamente, com variações entre 2,64 e 4,01 mg/L no caso dos vinhos rosés e entre 1,93 e 3,88 mg/L no caso dos vinhos brancos. Também nestes trabalhos, os teores de cadaverina encontrados nas mesmas amostras foram sistematicamente inferiores, sendo o máximo referente a uma amostra de vinho branco que revelou conter 1,43 mg/L.

No trabalho de Soufleros *et al.* [1998] referente a determinações de aminas biogénicas em vinhos de diferentes regiões francesas, a putrescina apresentou-se como a amina biogénica mais abundante na grande maioria das amostras, em especial as correspondentes a vinhos tintos e a vinhos "Champagne". Os teores de putrescina apresentaram, contudo, grandes variações de acordo não só

com o tipo de vinho e a respectiva região de origem, mas também entre as amostras provenientes da mesma região. Assim, os teores médios encontrados foram de 25,90, 16,51 e 4,53 mg/L para os vinhos oriundos da "Bourgogne" (tintos; 20 amostras), de "Bordeaux" (tintos; 66 amostras), e da "Alsace" (brancos; 20 amostras), respectivamente, com variações que se situaram entre 0,71 e 137,86, entre 0,25 e 46,56 e entre 0,48 e 29,92 mg/L, para os mesmos conjuntos de amostras. Para a cadaverina os teores médios encontrados nas mesmas amostras foram de 0,40, 0,31 e 0,14 mg/L, com máximos de 1,00, 2,36 e 0,94 mg/L, respectivamente. Nas 6 amostras de vinhos "Champagne" simultaneamente analisadas, os autores encontraram um teor médio de putrescina relativamente elevado de 14,17 mg/L com uma grande variação entre 1,20 e 59,20 mg/L, enquanto que os teores das 6 amostras de vinhos licorosos analisadas foram significativamente inferiores: teor médio de 1,58 mg/L, com uma variação entre 0,99 e 2,99 mg/L. Para a cadaverina os teores médios encontrados nas mesmas amostras foram de 0,12 e de 2,86 mg/L, respectivamente, com máximos de 0,20 e de 9,91 mg/L.

De igual forma, Soleas *et al.* [1999], no seu estudo referente a 73 vinhos varietais produzidos no Canadá, concluíram que a putrescina era a amina biogénica predominante nos vinhos tintos, os quais apresentaram teores médios que variaram entre 6 e 10,5 mg/L, nas 5 diferentes castas estudadas. Nos vinhos brancos (6 castas diferentes) os teores médios obtidos foram sensivelmente inferiores, variando entre cerca de 0,5 e cerca de 2,5 mg/L. A cadaverina apresentou teores médios muito inferiores, mas com um perfil semelhante, ou seja, mais elevados nos vinhos tintos (entre cerca de 0,20 e cerca de 0,60 mg/L) do que nos vinhos brancos (apenas os vinhos de duas das seis castas apresentaram consistentemente valores detectáveis, ainda assim com teores médios inferiores a 0,20 mg/L num caso e a 0,10 mg/L no outro).

A putrescina também se apresentou como a amina biogénica mais abundante no estudo de Glória *et al.* [1998] referente à determinação de aminas biogénicas não voláteis em 59 amostras de vinhos monovarietais das castas Pinot Noir (36 amostras) e Cabernet Sauvignon (23 amostras) produzidos no estado de Oregon, nos Estados Unidos, e referentes às colheitas de 1991 e 1992. O composto foi detectado em todas as amostras analisadas, tendo sido obtidos, para cada uma das castas teores médios de 27,47 e de 10,63 mg/L, respectivamente. As variações obtidas para os teores de putrescina nos vinhos da mesma casta foram, porém, muito significativas. Nos vinhos da casta Pinot Noir, o teor mínimo verificado foi de 2,43 mg/L; duas das amostras apresentaram teores muito elevados de 148,79 e de 203,12 mg/L; sem considerar essas duas amostras o teor médio obtido foi de

18,74 mg/L, ainda assim superior ao obtido nos vinhos da casta Cabernet Sauvignon. Nestes, os teores obtidos variaram entre 3,15 e 23,60 mg/L.

No mesmo estudo, os teores médios obtidos para a cadaverina foram de 0,36 e de 0,70 mg/L, com variações entre < 0,020 (limite de detecção do método) e 2,07 mg/L e entre < 0,020 e 1,51 mg/L, para os vinhos das castas Pinot Noir e Cabernet Sauvignon, respectivamente. Ao contrário da generalidade dos trabalhos anteriormente referidos, os compostos poliaminados espermidina, espermina e agmatina também foram alvo do interesse dos autores, tratando-se mesmo do maior estudo, em termos de quantidade de amostras analisadas, efectuado sobre a presença destes compostos em vinhos. De alguma forma surpreendentemente, verificou-se que os seus teores, embora diminutos, eram na maior parte dos casos ligeiramente superiores aos teores obtidos para a cadaverina. Assim, para a espermidina obteve-se nas amostras da casta Pinot Noir um teor médio de 0,51 mg/L, com uma variação entre < 0,020 (limite de detecção do método) e 2,38 mg/L enquanto nas amostras da casta Cabernet Sauvignon os teores obtidos foram inferiores: teor médio de 0,08 mg/L, com uma variação entre < 0,020 e 1,17 mg/L. Para a espermina os resultados obtidos foram, respectivamente, de 0,60 mg/L, com uma variação entre < 0,020 (limite de detecção do método) e 2,35 mg/L, e de 1,64 mg/L, com uma variação entre < 0,020 e 4,03 mg/L. Para a agmatina verificaram-se, nas mesmas amostras teores médios de 0,57 e de 0,18 mg/L, com variações entre < 0,045 (limite de detecção do método) e 8,37 mg/L e entre < 0,045 e 1,61 mg/L.

No que se refere a vinhos portugueses, os únicos dados existentes, referentes ao trabalho anteriormente citado neste capítulo [Mafra *et al.*, 1999], apontam para teores de putrescina inferiores aos geralmente referidos pelos restantes autores, sendo o teor máximo encontrado, referente a um vinho do Dão, de 6,01 mg/L. Para a cadaverina, os teores encontrados foram ainda mais reduzidos, em todos os casos inferiores a 1 mg/L.

1.2.5. Estudos sobre a origem das diaminas e das poliaminas naturais em vinhos

Tal como fizemos a propósito da histamina e das aminas aromáticas, e por uma questão metodológica, dividimos por vários itens a revisão dos estudos referentes à identificação da origem destas substâncias nos vinhos, a saber: a) presença nos mostos, b) formação por acção das leveduras,

c) formação por acção bacteriana, d) formação durante o processo de envelhecimento em resultado de uma possível actividade enzimática residual.

Convém sublinhar, contudo, que pese embora todo o interesse despertado pela problemática da presença de aminas biogénicas em vinhos, o interesse dos diversos grupos de investigação tem-se centrado mais no estudo das origens da histamina, devido aos potenciais problemas de toxicidade que a sua presença pode acarretar, não sendo muitos os avanços respeitantes à presença de di e poliaminas. Desta forma, é ainda bastante elevado o número de aspectos que continuam por esclarecer.

1.2.5.1. Presença das diaminas e das poliaminas nos mostos

Está relativamente bem documentada a presença de putrescina e de poliaminas em diversos tecidos da vinha. Tal como noutra plantas superiores, a formação de putrescina pode ter lugar quer a partir da ornitina quer a partir da arginina pela via da agmatina, assumindo as enzimas responsáveis, a arginina descarboxilase e a ornitina descarboxilase, o papel de reguladores do processo [Adams *et al.*, 1992]. Embora não seja ainda claro qual das duas vias biossintéticas é a predominante, sabe-se que noutras plantas a formação a partir da ornitina parece predominar em situações de rápido crescimento dos tecidos enquanto que a formação pela via da agmatina é predominante em situações de stress metabólico [Smith, 1985].

É conhecido de há muito o fenómeno de acumulação de putrescina e de poliaminas nas plantas em situações de carência de potássio, magnésio e, em especial, na presença de grandes concentrações de amónia no meio nutriente [Basso e Smith, 1974; LeRudulier e Goas, 1975]. O resultado de trabalhos posteriores indicaram que na situação mais comum, que corresponde à deficiência do meio em potássio, o fenómeno é muito mais intenso para a putrescina, mantendo-se os níveis das poliaminas sensivelmente constantes [Smith, 1984]. Estudos realizados em folhas de vinha mostraram teores de putrescina 21 a 30 vezes mais elevados nas folhas com sintomas de carência de potássio do que nas folhas normais [Adams *et al.*, 1990]. Com base nestes resultados, alguns autores propuseram que a determinação do teor de putrescina poderia servir para optimizar os níveis de potássio mais adequados para o desenvolvimento da planta: a acumulação do composto actuaria como indicador de uma deficiência em potássio da planta [Geny *et al.*, 1997].

Apesar destes conhecimentos apontarem para que a presença das di e poliaminas nos mostos usados para a elaboração de vinhos seja uma realidade, são poucas as referências existentes na literatura.

A contribuição mais importante nesta área corresponde ainda ao trabalho de Desser *et al.* [1981], os quais encontraram em mostos quantidades apreciáveis de putrescina (de 0,325 a 2,120 mg/L), cadaverina (0,040 a 1,640 mg/L), espermidina (2,360 a 4,145 mg/L) e espermina (0,365 a 8,830 mg/L. Desde então, apenas um outro estudo faz referência à presença de putrescina e de cadaverina nos mostos, em ambos os casos em quantidade inferior a 1 mg/L (Bauza *et al.*, 1995c]. Bisson [1991] cita uma comunicação pessoal de D.O. Adams, na qual também é referida a presença de putrescina, espermidina e espermina em mostos, em baixos níveis. Pelo contrário, Buteau *et al.* [1984] verificaram a ausência no mosto de putrescina, cadaverina e de agmatina

1.2.5.2. Formação das diaminas e das poliaminas pelas leveduras envolvidas no processo de fermentação alcoólica

São praticamente inexistentes os estudos referentes à evolução destes compostos no decorrer da fermentação alcoólica. A convicção generalizada, baseada nos resultados obtidos por Desser *et al.* [1981], parece ser a de que ocorre uma diminuição dos teores de poliaminas enquanto os teores de putrescina e de cadaverina aumentarão ao longo do processo fermentativo. Buteau *et al.* [1984] também verificaram a produção de pequenas quantidades de putrescina, cadaverina e de agmatina durante a fermentação alcoólica. A utilização de poliaminas como fonte azotada por parte das leveduras do género *Saccharomyces* foi referida por Large [1986].

O comportamento das di e poliaminas ao longo do processo fermentativo poderá, contudo, não ser assim tão linear, tendo em atenção os últimos conhecimentos sobre o metabolismo azotado das leveduras. Assim, tal como já foi observado para os aminoácidos [Monteiro e Bisson, 1991; Ough *et al.*, 1991] e também para algumas aminas voláteis (ver mais adiante), o teor destes compostos poderá flutuar durante a fermentação de acordo com a forma como as leveduras os assimilam e libertam para o meio, em função das suas necessidades metabólicas. Tal comportamento já foi observado para a putrescina, a cadaverina e a espermina durante a fermentação de cervejas [Dumont *et al.*, 1992].

1.2.5.3. Formação das diaminas e das poliaminas por acção bacteriana

Atendendo aos altos níveis de putrescina encontrados nalgumas amostras, a possibilidade de haver, nesses casos, uma significativa contribuição bacteriana na formação do composto é unanimemente considerada pela generalidade dos autores. O mesmo se pode dizer a propósito da presença de cadaverina, embora neste caso os teores encontrados nos vinhos sejam substancialmente inferiores. Contudo, e tal como referido a propósito da histamina e das aminas aromáticas, existem muitos resultados contraditórios na literatura disponível, não havendo grandes certezas sobre o tipo de bactérias envolvidas no fenómeno. No que respeita às outras di e poliaminas o desconhecimento é ainda maior, até pela ausência de um número relevante de dados respeitantes à sua presença nos vinhos.

As divergências existentes entre os diversos autores no que respeita ao papel desempenhado pela fermentação maloláctica na formação de putrescina apresentam um paralelismo quase total às já mencionadas neste capítulo a propósito da formação de histamina, pelo que nos dispensaremos de as referir em pormenor. Aliás são vários os autores a verificar a existência de um certo grau de correlação entre os teores de histamina e os teores de putrescina encontrados nos vinhos, apontando desse modo para a possibilidade de uma origem similar [Bauza *et al.*, 1995a; Coton *et al.*, 1998; Soufleros *et al.*, 1998]. Para a cadaverina não se encontrou até ao momento qualquer tipo de relação com a fermentação maloláctica ou sequer com qualquer dos aspectos ligados às condições de vinificação.

Tal como acontece com a histamina e a tiramina, são muitas as espécies bacterianas com reconhecida intervenção na elaboração de alimentos fermentados que possuem as enzimas descarboxilases responsáveis pela descarboxilação da arginina e da lisina, de que resultam, respectivamente, a putrescina e a cadaverina. Porém, ao contrário do êxito dos estudos referentes à identificação da histidina-descarboxilase numa estirpe bacteriana da espécie *Leuconostoc oenos*, não foi possível até ao momento encontrar qualquer estirpe daquela espécie possuidora das referidas enzimas.

1.2.5.4. Evolução das diaminas e das poliaminas durante o processo de envelhecimento

Tal como referimos para a histamina, é grande o desconhecimento no que se refere à evolução das di e poliaminas durante o envelhecimento dos vinhos. Bauza *et al.* [1995a] observaram um comportamento para a putrescina idêntico ao verificado para a histamina e a tiramina, ou seja, não encontraram diferenças significativas em vinhos com idade compreendida entre alguns meses e mais de dois anos. De igual forma, encontraram teores de putrescina mais baixos nos vinhos envelhecidos em cubas de cimento e de aço inox em relação aos vinhos envelhecidos em vasilhame de madeira. Vasquez-Lasa *et al.* [1998], no seu estudo com vinhos da Rioja, também não encontraram qualquer alteração significativa do teor de putrescina e de cadaverina.

1.3. Aminas voláteis

1.3.1. Introdução

Como foi referido na Introdução Geral, incluimos neste grupo de aminas voláteis todas as monoaminas alifáticas de baixa massa molecular já identificadas em vinhos — metil e dimetilamina, etil e dietilamina, n-propil e isopropilamina, n-butil e isobutilamina, n-amil e isoamilamina, 2-metilbutilamina, hexilamina — bem como as aminas alicíclicas — pirrolidina, morfolina e piperidina. Estas últimas, embora constituam um sub-grupo à parte, são aqui incluídas devido não só às suas características de volatilidade como também ao facto de apresentarem problemas de toxicidade comuns a todas as aminas secundárias, como a dimetilamina e a dietilamina, relacionados com o seu papel de precursores de N-nitrosaminas.

1.3.2. Importância das aminas voláteis no metabolismo humano

Não é conhecido qualquer papel positivo desempenhado por este tipo de compostos no metabolismo humano, tanto no que se refere às aminas alifáticas como às aminas aliciclícas aqui consideradas. Pelo contrário, a sua toxicidade é relevante, sendo habitualmente descrita nos manuais de toxicologia ambiental, dada a sua presença em inúmeros produtos químicos industriais (manufactura de plásticos, de borrachas, de corantes usados na indústria têxtil, de produtos da indústria farmacêutica, etc.) e o carácter de poluentes ambientais que apresentam [Manahan, 1994]. No caso das aminas secundárias, o problema agrava-se devido ao papel desempenhado na formação de N-nitrosoaminas.

As aminas alifáticas de baixa massa molecular são geralmente classificadas entre as mais tóxicas substâncias usadas rotineiramente em escala industrial [Manahan, 1992]. A principal razão para a sua toxicidade reside no seu carácter básico o que as leva, em virtude do aumento de pH provocado, a uma acção corrosiva sobre os tecidos podendo inclusivamente causar a necrose no ponto de contacto. Esse carácter tóxico é tanto mais de salientar quanto é sabido que a absorção destes compostos se dá com facilidade tanto por via oral como por via respiratória ou por via cutânea [Bauza *et al.* 1995d].

Uma compilação detalhada dos dados de ordem fisiológica e toxicológica existentes até ao momento sobre estes compostos (incluindo a morfolina e piperidina) foi recentemente publicada por autores alemães [Greim *et al.*, 1998], com 28 referências bibliográficas, na maior parte correspondentes a relatórios com origem em diversos institutos alemães de toxicologia. Significativamente, três dos autores pertencem aos departamentos de toxicologia de três das maiores empresas químicas mundiais — BASF, Bayer e Hoechst — o que serve para ilustrar a importância destes compostos como contaminantes de origem industrial. Sinteticamente, pode afirmar-se que as aminas alifáticas são, em geral, metabolizadas por oxidação via MAO, com libertação de amónia e a formação dos correspondentes aldeídos, posteriormente transformados em ácidos carboxílicos e, finalmente, em CO_2. Algumas aminas (etilamina, p. ex.), contudo, são excretadas por via urinária, na sua quase totalidade na forma intacta. No que respeita à sua toxicidade aguda, baseada em dados obtidos em experiências com ratinhos, estes compostos podem ser classificados como substâncias "prejudiciais à saúde", caracterizando-se principalmente pela acção irritante sobre os tecidos, já acima mencionada. Essa toxicidade diminui marcadamente quando os compostos são previamente

neutralizados e administrados sob a forma de sais, o que tem um interesse fundamental no aspecto que nos diz mais respeito, pois é nessa forma que eles estão presentes nos vinhos. Para além do carácter irritante já descrito, os ensaios de toxicidade crónica não demonstraram a existência de efeitos sistémicos pronunciados assim como nenhum efeito carcinogénico ou teratogénico foi detectado. No que respeita a outros efeitos verificados após a administração destes compostos é de salientar um aspecto particularmente interessante que é a capacidade apresentada pelas aminas primárias de induzir a libertação de histamina, capacidade essa que aumenta com o aumento da cadeia carbonada.

A possibilidade da metilamina possuir propriedades citotóxicas "in vitro" sobre culturas celulares neuronais foi, contudo, demonstrada num trabalho de Gilad e Gilad [1986], não mencionado no relatório anteriormente referido. Bauza *et al.* [1995d], no seu trabalho de revisão sobre metabolismo e toxicidade das aminas biogénicas, citam um autor russo [Dabeev, 1981]* para afirmar que reduzidas concentrações de etilamina são capazes, no homem, de afectar respostas do tipo reflexo, e provocam em ratinhos de experiência disfunções do sistema nervoso, do fígado, do sistema sanguíneo e de diversos mecanismos de adaptação. Ainda assim, os teores em causa são francamente superiores aos passíveis de serem transmitidos pelos vinhos.

No que respeita às aminas secundárias, dimetilamina e dietilamina nomeadamente, mas também a morfolina e a piperidina, o relatório atrás citado reitera a já referida capacidade apresentada por estes compostos de, na presença de nitritos ou de outros agentes nitrosantes, serem transformadas nas correspondentes N-nitrosaminas. Desde os anos sessenta que o problema tem vindo a ser objecto da atenção de vários investigadores, dadas as graves implicações decorrentes da nefasta acção destes compostos no organismo humano. A título de exemplo podemos referir os trabalhos de Hotchkiss [1987, 1989] e de Tricker e Preussmann [1991a, 1991b].

Em geral, a formação das N-nitrosaminas dá-se durante o armazenamento, a conservação e o tratamento culinário dos alimentos por acção de diversos agentes nitrosantes, abundantes nos mais variados produtos alimentares. A reacção pode ter lugar também durante a ingestão dos alimentos, pois é favorecida pelas secreções gástricas e por tiocianatos presentes na saliva, em especial dos fumadores [Ferrando, 1986]. No caso das aminas primárias a reacção também tem lugar mas dá origem à formação de compostos alquilantes de curto tempo de vida que rapidamente reagem com

* Artigo que possuímos, mas do qual não pudemos retirar qualquer proveito devido ao facto de estar escrito na língua nativa.

outros componentes da matriz para dar origem a produtos (alcoóis, principalmente) desprovidos de actividade tóxica. No caso das aminas secundárias, os compostos formados são dotados de grande estabilidade, sendo a extensão da reacção aparentemente determinada por vários factores, como a influência estérica dos grupos alquilo, o pH, a temperatura e a presença de catalisadores ou de inibidores. A intensidade do efeito carcinogénico das diferentes nitrosaminas parece ser muito variável, mas são muitos, ainda, os pormenores desconhecidos. Está de há muito estabelecido, contudo, que a N-nitrosomorfolina é um potente carcinogénico, com actuação a nível das células hepáticas [Singer e Lijinsky, 1976].

1.3.3. Formação das aminas voláteis. Breve referência à sua presença noutros alimentos

De entre as aminas que se podem encontrar nos alimentos, as aminas voláteis são aquelas acerca das quais os dados na literatura são mais escassos. As aminas alifáticas de baixa massa molecular caracterizam-se por apresentarem odores extremamente intensos e desagradáveis, habitualmente referidos por "odor a peixe podre". Sabe-se que se encontram largamente distribuídas no reino vegetal [Smith, 1980-81] e que desempenham um papel importante na atracção de insectos responsáveis pela polinização de flores [Daudt e Ough, 1982]. A sua presença nos alimentos é naturalmente considerada indesejável.

A principal origem deste tipo de compostos em plantas superiores reside na aminação enzimática de aldeídos e cetonas, através de uma bem conhecida via metabólica muitas vezes utilizada pelos organismos para a desaminação de aminoácidos [Hartmann *et al.*, 1972a, 1972b; Preusser, 1975]. Um exemplo de um processo deste tipo é apresentado na Figura 1.8, onde se pode ver esquematicamente como a desaminação da L-alanina em ácido pirúvico é acompanhada pela simultânea formação de etilamina a partir de acetaldeído, composto que actua simultaneamente como fornecedor de um átomo de oxigénio e como aceitador do grupo amina do aminoácido [Smith, 1980-81].

A ocorrência da reacção foi demonstrada "in vivo", em amostras de maçã, por Hartmann (1967), sendo posteriormente confirmada pelo mesmo autor em outras plantas superiores [Hartmann, 1972b]. A L-alanina é o aminoácido mais eficiente como dador do grupo amina, reagindo não só com o acetaldeído mas também com o formaldeído e com outros aldeídos superiores (propanaldeído,

n-butiraldeído e isobutiraldeído, n-amilaldeído e isoamilaldeído, etc.) originando as correspondentes aminas.

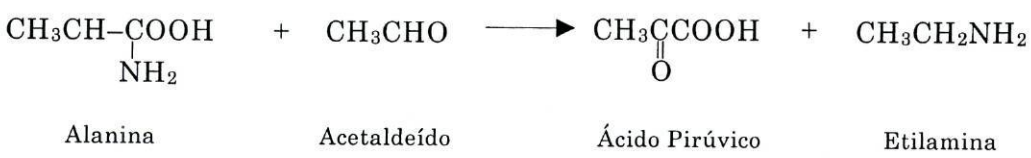


Figura 1.8. Formação da etilamina por transaminação

Está também referida a formação de aminas voláteis por descarboxilação de aminoácidos durante os processos de escurecimento não enzimático que podem ocorrer em muitos alimentos durante a cozedura [Velisek et Davidek, 1974]. Pelo contrário, a formação de aminas voláteis por meio da descarboxilação enzimática de aminoácidos não parece ter grande expressão; está, contudo, referida a sua ocorrência em algumas plantas, designadamente na origem da etilamina [Crocomo e Fowden, 1970].

Pese embora a existência de referências dispersas sobre a presença de aminas voláteis nos alimentos, a maior parte dos dados que conseguimos compilar são provenientes de dois excelentes trabalhos dedicados a estes compostos: o já atrás citado trabalho de revisão de Smith [1980-81] e um extenso estudo realizado por investigadores do Instituto de Toxicologia e Quimioterapia de Heidelberg, que analisaram as aminas voláteis em 264 amostras dos mais variados tipos de alimentos [Pfundstein *et al.*, 1991].

Sinteticamente pode afirmar-se que, no que respeita a aminas primárias, a predominância vai para a metilamina e a etilamina. Smith [1980-81] refere a presença dos dois compostos em diversos produtos vegetais como o café, a aveia, a soja, a cevada e também em bananas, maçãs, batatas, no chá e no cacau. No que respeita à metilamina chama a atenção, contudo, para o facto de a mesma, embora se apresente como um composto ubiquitário nos produtos vegetais, poder formar-se facilmente como artefacto durante os processos de extracção. Pfundstein *et al.* [1991] referem a presença dos dois compostos em todos os trinta diferentes tipos de alimentos analisados, tanto de origem vegetal como

animal, tendo os valores máximos correspondido a amostras de peixe fresco e fumado (superiores a 100 mg/kg no caso da metilamina e sensivelmente metade no caso da etilamina), de café (apenas metilamina, de 28 a 71 mg/kg) e de carnes diversas, com particular destaque para a carne de animais de capoeira. A presença de outras aminas primárias é também referida em ambos os trabalhos mas em quantidades substancialmente inferiores. Em todas as amostras analisadas pelos investigadores alemães o teor máximo encontrado foi de 77 mg/kg de isoamilamina em amostras de vegetais frescos mas, em regra, os teores encontrados variaram entre o não detectado (mais de 50 % das amostras analisadas) e valores inferiores a 1 mg/kg.

No que respeita à presença de aminas secundárias, o destaque vai para a dimetilamina cuja presença em diversos produtos alimentares é referida em ambos os trabalhos. Os teores mais elevados referem-se a amostras de peixe fumado (chegando a atingir os 160 mg/kg), sendo a sua origem aparentemente a mesma que a da metilamina, em resultado da degradação enzimática do óxido de trimetilamina, bastante abundante em certos peixes [Stanley e Hultin, 1984]. Outras possíveis fontes de dimetilamina na dieta humana foram identificadas como sendo a carne e os seus produtos derivados (teores até 20 mg/kg), o pão (cerca de 5 mg/kg), vegetais frescos e especiarias (em ambos os casos variando entre o não detectado e os 40 mg/kg).

Das outras aminas secundárias encontradas nos alimentos pelos referidos autores, a pirrolidina e a piperidina merecem destaque. Para além de extraordinariamente abundantes nas especiarias (teores de piperidina na pimenta superiores a 500 mg/kg e teores de pirrolidina da ordem dos 50 mg/kg) também foram detectadas em muitos outros produtos, em especial a primeira, presente, por exemplo, em vários tipos de carne e no malte em teores superiores a 10 mg/kg. A presença destas aminas aliciclícas, de grande importância do ponto de vista toxicológico pelos mesmos motivos apontados para a dimetilamina, ou seja, a capacidade de originarem N-nitrosaminas, tinha já sido verificada por diversos outros autores, como Singer e Lijinsky [1976], que referiram a probabilidade de serem resultado da degradação de alcalóides das plantas. Ao contrário destes autores, porém, que verificaram a presença ubiquitária de morfolina, Pfundstein *et al.* [1991] apenas encontraram o composto em oito das 264 amostras analisadas, e em teores sempre inferiores a 2 mg/kg, pelo que subsiste a hipótese de o mesmo corresponder a um artefacto do método analítico previamente usado.

1.3.4. Teores de aminas voláteis em vinhos e mostos

Torna-se difícil fazer uma revisão crítica dos teores de aminas voláteis em mostos e vinhos encontrados na literatura. São várias as contrariedades encontradas, algumas das quais passamos a referir:

a) Dada a maior importância geralmente atribuída a outras aminas biogénicas, muitos dos autores relegam para segundo plano a determinação dos teores de aminas voláteis, muitas vezes não se referindo sequer a algumas delas.

b) Sendo a maior parte dos resultados obtidos por métodos de HPLC nos quais é feita a determinação simultânea de várias aminas, muitas vezes a optimização dos mesmos é feita em função das aminas mais estudadas em detrimento das aminas voláteis; muitas vezes subsiste a dúvida sobre se a ausência de resultados se fica a dever à impossibilidade de uma correcta quantificação das mesmas se à sua ausência nas amostras, pelo menos em quantidades acima dos limites de detecção dos métodos usados.

c) Na literatura aparecem, por vezes, resultados muito díspares, que podem ser consequência de variações grandes entre os diferentes tipos de vinhos analisados ou, tão simplesmente, resultarem de deficiências nos processos analíticos encontrados. Parece-nos pois importante assumir algumas precauções especiais na leitura de alguns resultados. Entre outros exemplos, podemos referir os resultados obtidos por Woller e Kobelt [1990], autores de um extenso relatório referente aos resultados obtidos na análise de 459 amostras de vinhos, amplamente citado por Radler e Fath [1991] no seu importante trabalho de revisão sobre a ocorrência de aminas biogénicas em mostos e vinhos. Provavelmente devido à metodologia usada, um processo automatizado de cromatografia de troca-iónica executado com equipamento habitualmente usado na determinação de aminoácidos (ver cap. 2), aqueles autores obtiveram para muitas aminas analisadas, em especial para as mais voláteis, resultados significativamente diferentes dos obtidos posteriormente pela maioria dos autores. Colocados perante a possibilidade de os referirmos neste trabalho ou, simplesmente, os ignorarmos, optamos conscientemente pela primeira opção, mas com as reservas referidas.

1.3.4.1. Metilamina, etilamina e isoamilamina

A metilamina, a etilamina e a isoamilamina constituem, dentro do grupo das aminas voláteis, aquelas cuja presença nos vinhos e mostos é apresentada pelos diversos autores como mais constante e significativa. Não obstante, os teores observados são normalmente diminutos, raramente ultrapassando os 5 mg/L e situando-se na maior parte das casos abaixo de 1 mg/L.

A presença de aminas voláteis em mostos e a sua evolução ao longo do processo de maturação das uvas foi alvo da atenção do grupo de Ough e colaboradores [Ough *et al.*, 1981; Ough e Daudt, 1981], constituindo os seus estudos, ainda hoje, vinte anos passados, uma referência neste campo.

De acordo com os resultados de um desses estudos [Daudt e Ough, 1982], a metilamina e a etilamina são as aminas que aparecem nas uvas em maiores quantidades apresentando, contudo, um padrão diferente durante a fase final da maturação: os teores de metilamina têm tendência a decrescer (de 700 a 180 μg/L e de 6000 a 500 μg/L, em duas experiências efectuadas com duas castas diferentes) enquanto os teores de etilamina apresentam a tendência inversa (de 25 a 150 μg/L e de 25 a 610 μg/L nas mesmas duas experiências). Os teores obtidos em uvas maduras apresentou-se muito variável para ambas as aminas, de 145 a 850 μg/L para a metilamina e de 610 a 4900 μg/l para a etilamina, o mesmo acontecendo para a isoamilamina cujos teores variaram entre "traços" e 700 μg/L.

Noutro dos seus estudos, neste caso visando interpretar o comportamento das aminas voláteis durante o processo fermentativo, os autores concluíram haver uma queda brusca dos teores observados logo após o início do processo fermentativo, provavelmente devido ao facto de serem assimiladas pelas leveduras e usadas no seu crescimento [Ough e Daudt, 1981]. Este comportamento é similar ao que hoje é conhecido sobre o comportamento dos aminoácidos durante a fermentação [Monteiro e Bisson, 1991; Ough *et al.*, 1991]. Durante os processos de acabamento e de conservação do vinho, os teores observados voltam, em muitos casos, a aumentar, segundo os autores devido à autólise das leveduras ou a quaisquer outras condições que propiciem a sua formação. Nos vinhos prontos a ser consumidos os maiores teores observados foram os de etilamina – 8,6 mg/L, num dos casos – apresentando todas as outras aminas teores inferiores a 1 mg/L.

Num trabalho já anteriormente referido neste capítulo, Ibe *et al.* [1981] verificaram ser a isoamilamina a amina volátil mais abundante nos vinhos que analisaram, com teores que variaram nos vinhos tintos entre 0,080 e 11,8 mg/L, com uma média de 1,95 mg/L, e nos vinhos brancos entre < 0,020 (limite de detecção) e 31,5 mg/L, com uma média de 5,11 mg/L. O teor de 31,5 mg/L encontrado numa amostra de vinho branco correspondeu ao mais alto teor verificado de todas as aminas em estudo para o conjunto das amostras, incluindo as habitualmente mais abundantes putrescina e tiramina, tendo o mesmo sido confirmado por cromatografia gasosa – espectrometria de massa, segundo informação dos autores. Os teores de metilamina encontrados nas mesmas amostras variaram nos vinhos tintos entre 0,060 e 0,500 mg/L, com uma média de 0,190 mg/L, e nos vinhos brancos entre < 0,020 (limite de detecção) e 0,430 mg/L, com uma média de 0,140 mg/L. Teores ligeiramente superiores foram registados para a etilamina; nos vinhos tintos variaram entre 0,080 e 1,690 mg/L, com uma média de 0,780 mg/L, e nos vinhos brancos variaram entre < 0,020 (limite de detecção) e 1,100 mg/L, com uma média de 0,280 mg/L.

A ligeira predominância dos teores de isoamilamina foi também verificada, mais recentemente, no trabalho de Soufleros *et al.* [1998], que encontraram teores médios de 2,580, 3,140 e 0,470 mg/L, respectivamente, em amostras de vinhos franceses das regiões de "Bourgogne" (20 amostras de vinhos tintos), "Alsace" (20 amostras de vinhos brancos) e "Bordeaux" (66 amostras de vinhos tintos), com máximos de 6,350, 10,490 e 3,120 mg/L. Para a etilamina os teores médios encontrados nas mesmas amostras foram de 1,510, 0,620 e 1,800 mg/L com máximos de 2,150, 1,260 e 1,800 mg/L, respectivamente, e para a metilamina de 0,430, 0,300 e 0,190 com máximos de 1,640, 0,550 e 2,260 mg/L, respectivamente. Em 5 amostras de vinhos licorosos e em 6 amostras de vinho "Champagne" simultaneamente analisadas, os mesmos autores encontraram teores mais baixos de isoamilamina, com uma média de 1,970 mg/L no primeiro caso e de 0,470 mg/L no segundo, com máximos de 6,350 e de 1,300 mg/L, respectivamente. Para a etilamina os teores encontrados nestas amostras foram de 1,340 e de 1,300 mg/L com máximos de 2,120 e de 1,300 mg/L, respectivamente, e para a metilamina de 0,060 e de 0,330 mg/L com máximos de 0,250 e de 0,500 mg/L, respectivamente.

No estudo de Pfundstein *et al.* [1991], já abundantemente citado, foram analisadas 9 amostras de vinho (sem indicação do tipo) que apresentaram, em regra, teores ligeiramente superiores de etilamina (teor médio: 5,2 mg/L, com uma variação entre 1,6 e 13 mg/L), seguindo-se a isoamilamina (teor médio: 2,6 mg/L, com uma variação entre 0,6 e 6,5 mg/L) e a metilamina (teor médio: 1,5

mg/L, com uma variação entre 0,6 e 3,5 mg/L). Anote-se por curiosidade que nas 13 amostras de cerveja simultaneamente analisadas os teores de metilamina e de etilamina se apresentaram idênticos aos verificados nos vinhos enquanto os teores de isoamilamina foram substancialmente inferiores, com um teor médio de 0,060 mg/L.

De igual forma, Bauza *et al.* [1995a], no seu estudo que incidiu sobre 220 amostras comerciais de vinhos franceses das regiões do "Rhône" e da "Provence", encontraram um teor médio de etilamina ligeiramente superior ao de isoamilamina, 1,26 e 0,87 mg/L, respectivamente, enquanto os teores médios obtidos para a metilamina foram da ordem dos 0,70-0,85 mg/L, para os diferentes tipos de vinho. No caso da etilamina verificou-se um teor médio mais elevado nos vinhos tintos (1,65 mg/L) do que nos outros vinhos (inferiores a 0,50 mg/L). Os valores máximos encontrados foram de 4,690, 16,000 e 1,860 mg/L para a etilamina, a isoamilamina e a metilamina, respectivamente.

Em dois estudos realizados por investigadores franceses com dados relativos apenas à presença de etilamina e de metilamina, os resultados obtidos foram bastante idênticos, registando-se em ambos os estudos teores médios de etilamina mais elevados, mas, em qualquer caso, pouco elevados.

Assim, Tricard e Cazabeil [1990] encontraram teores médios para a etilamina de 0,880 (máximo: 1,600), 1,980 (máximo: 3,800), e 1,320 mg/L (máximo: 2,700), em vinhos tintos de grande qualidade produzidos em França (23 amostras), Espanha (21 amostras) e Itália (17 amostras), respectivamente; os teores de metilamina nos mesmos vinhos foram de 0,120 (máximo: 0,400), 0,330 (máximo: 1,300) e 0,160 mg/L (máximo: 0,300), respectivamente.

No estudo de Ingargiola e Bertrand [1991], os teores médios obtidos para a etilamina foram de 1,240, 0,790 e 0,650 mg/L, em 49 amostras de vinhos tintos, 13 amostras de vinhos brancos com a fermentação maloláctica terminada e 7 amostras de vinhos brancos não sujeitos ao referido processo fermentativo, respectivamente. Para a metilamina os teores médios obtidos foram de 0,290, 0,510 e 0,600 mg/L nas mesmas amostras.

Nos diversos trabalhos do grupo de Busto e colaboradores, já referidos ao longo deste capítulo, e em particular naquele que consideramos o mais significativo, devido ao número de amostras analisadas (44 amostras de vinhos tintos, 14 amostras de vinhos brancos e 8 amostras de vinhos rosés), o aspecto mais saliente é o facto de na maioria das amostras de vinhos brancos e de

vinhos rosé se ter verificado a ausência de etilamina (limite de detecção do método: 15 μg/L). De resto, os teores verificados para a isoamilamina e para a metilamina foram da mesma ordem de grandeza (teores médios de 0,240, 0,470 e 0,510 mg/L, nos três tipos de vinhos considerados, com máximos de 0,790, 0,820 e 0,680 mg/L, respectivamente, no caso da isoamilamina; teores médios de 0,690, 0,500 e 0,590 mg/L com máximos de 1,170, 1,210 e 0,920 mg/L, respectivamente, para a metilamina). As amostras de vinhos tintos apresentaram um teor médio de etilamina de 0,660 mg/L, com um máximo de 5,680 mg/L [Busto *et al.*, 1996b].

Pelo contrário, no estudo sobre vinhos portugueses anteriormente referido, [Mafra *et al.*, 1999], são referidos teores estranhamente elevados de etilamina na generalidade das amostras analisadas, tanto em vinhos tintos como em vinhos brancos, o que poderá dever-se a alguma deficiência do método analítico usado, não detectada pelos autores. Nas 30 amostras analisadas, o teor mínimo observado foi de 5,38 mg/L, tendo-se registado teores superiores a 9 mg/L em 70 % das amostras. Os seis vinhos brancos analisados apresentaram mesmo os teores mais elevados com uma média de 23,04 mg/L. Para a metilamina e a isoamilamina, os teores observados foram bastante inferiores, consistentemente abaixo de 1 mg/l no primeiro caso, e com maiores variações no caso da isoamilamina, que apresentou um máximo de 6,17 mg/L.

Resultados diferentes foram os apresentados, mais recentemente, por Soleas *et al.* [1999], também já anteriormente citados. Nas generalidade das amostras ensaiadas os autores verificaram que a metilamina constituía uma das aminas presentes em maior quantidade, apenas ultrapassada pela putrescina e não em todos os casos; para algumas das castas de vinhos brancos, o composto apresentou-se mesmo como o mais abundante de entre todas as aminas biogénicas estudadas. Os teores médios obtidos, em todas as 10 castas estudadas, foram sempre superiores a 1 mg/L, nalguns casos atingindo mesmo os 7 mg/L (casta Chardonnay - 12 amostras) e os 5.5 mg/L (casta Pinot Noir - 7 amostras e casta Seyval Blanc - 5 amostras). Não foi notada qualquer diferença significativa entre os teores observados nos vinhos tintos e nos vinhos brancos. No que respeita à etilamina os teores médios obtidos foram significativamente menores, sempre inferiores a 1 mg/L, no caso dos vinhos brancos inferiores mesmo a 0,3 mg/L. A isoamilamina não foi alvo da atenção dos autores, que não apresentam qualquer resultado para o composto.

Woller e Kobelt [1990], no relatório acima mencionado referente aos resultados obtidos na análise de 459 amostras de vinhos referem ter encontrado apenas "traços" de metilamina e de

etilamina num número reduzido de amostras, o que, pese embora a ausência de referência ao limite de quantificação do método usado, pressupõe teores muito inferiores a 1 mg/L, de acordo com os valores apresentados para outras aminas voláteis. Em relação à isoamilamina, os autores registaram teores muito variáveis, variando entre 0 e 39 mg/L, não apresentando, contudo, os teores médios registados.

1.3.4.2. Outras aminas alifáticas

São escassas as referências na literatura à presença de outras aminas alifáticas em mostos e vinhos, para lá das três anteriormente mencionadas. Os teores encontrados são, regra geral, muito diminutos.

Também neste caso merece especial saliência o trabalho desenvolvido pelo grupo de Ough e colaboradores, anteriormente citados. Para além das 3 aminas anteriormente referidas — metilamina, etilamina e isoamilamina — estes autores identificaram pela primeira vez em mostos a presença de dimetilamina, dietilamina, n-propilamina, isobutilamina, n-amilamina e 2-metil-1-butilamina [Ough *et al.*, 1981]; foram também os primeiros a registar, no mesmo trabalho, a presença em vinhos de dietilamina e de 2-metil-1-butilamina.

No que respeita à presença deste tipo de compostos em mostos, os resultados obtidos por aqueles autores são mesmo os únicos disponíveis na literatura a que tivemos acesso. Os teores máximos encontrados não ultrapassaram os 0,110 mg/L para a dimetilamina, os 0,210 mg/L para a dietilamina e quantidades vestigiais, sempre inferiores a 0,010 mg/L, para as restantes aminas. Em vinhos os teores encontrados pelos mesmos autores, num pequeno número de amostras analisadas, foram da mesma ordem de grandeza.

Teores mais elevados de algumas destas aminas foram entretanto observados por outros autores, subsistindo em muitos casos a dúvida sobre a eficiência das metodologias analíticas usadas, como já anteriormente salientamos. É principalmente o caso dos valores obtidos por Woller e Kobelt [1990] que realçam a importância da presença em vinhos da n-butilamina e da isobutilamina (teores máximos de 30 e de 82 mg/L, respectivamente) e, embora em menor grau, da n-propilamina (teores inferiores a 5 mg/L em vinhos novos, mas variando consistentemente entre 30 e 55 mg/L em vinhos

velhos, com idades entre 12 e 20 anos), da isopropilamina (teor máximo de 16 mg/L), e da n-amilamina (presente em cerca de 80 % dos vinhos analisados por aqueles autores, com um teor máximo de 4 mg/L).

A presença de n-propilamina e de isopropilamina em vinhos foi também evidenciada em dois trabalhos do grupo de Busto e colaboradores. No primeiro desses trabalhos [Busto *et al.*, 1994], os autores referem teores de n-propilamina entre 1,26 e 2,67 mg/L em 5 amostras de vinhos brancos e entre 0 e 1,35 mg/L para cinco amostras de vinhos tintos. Das outras aminas voláteis incluídas neste grupo apenas a n-amilamina foi encontrada numa amostra de vinho branco, num teor de 0,45 mg/L. No segundo dos trabalhos referidos [Busto *et al.*, 1996b], os teores de propilamina encontrados variaram entre 0 e 0,280 mg/L num conjunto de 66 vinhos brancos, tintos e rosés analisados enquanto que os teores de isopropilamina variaram entre 0 e 0,540 mg/L para o mesmo conjunto de amostras. Neste trabalho pode encontrar-se a única referência a que tivemos acesso referente à presença de hexilamina em vinhos; os autores referem teores máximos do composto de 0,400, 0,210 e 0,960 mg/L em vinhos brancos, rosés e tintos, respectivamente.

Arce *et al.* [1998] também se referem à presença de n-propilamina e de isopropilamina; em seis amostras de vinhos analisadas por estes autores (2 brancos, 2 tintos e 2 rosés) verificou-se a presença de propilamina em 3 das amostras (teores de 0,170, 0,150 e 0,230 mg/L) e de isopropilamina em 5 das amostras (teores de 0,120, 0,620, 0,180, 0,300 e 0,380 mg/L).

Pelo contrário, Ibe *et al.* [1991] não encontraram quaisquer vestígios de n-propilamina e de isopropilamina, bem como de n-butilamina e de n-amilamina, em 75 amostras de vinhos tintos e brancos sujeitos a análise; verificaram, contudo, a presença de isobutilamina numa amostra de vinho branco (0,100 mg/L) e em 9 amostras de vinho tinto (teor máximo de 0,490 mg/L).

1.3.4.3. Aminas alicíclicas (pirrolidina, piperidina e morfolina)

No que respeita à presença de aminas alicíclicas — pirrolidina, piperidina e morfolina — em mostos e vinhos são ainda mais escassos os dados encontrados na literatura.

A presença de pirrolidina em bebidas alcoólicas foi mencionada pela primeira vez por Slaughter [1970] e por Slaughter e Uvgard [1971] que identificaram o composto em amostras de

cerveja e no malte usado na respectiva elaboração. Singer e Lijinsky [1976] terão sido os primeiros a identificar o composto numa amostra de vinho (0,060 mg/L) tendo também encontrado morfolina (0,700 mg/L) mas não piperidina. (No que respeita à presença de morfolina é de considerar a possibilidade de se ter tratado de um artefacto analítico como foi referido atrás).

Desde então, são muito poucos os autores que apresentam resultados referentes à presença destes compostos nos vinhos. Os dados mais importantes são possivelmente os apresentados por Pfundstein *et al.* [1991], no seu estudo acima referido, que encontraram as três aminas em discussão na maioria das 9 amostras de vinho analisadas; a pirrolidina apresentou um teor médio de 0,2 mg/L, com um máximo de 0,4 mg/L; a piperidina apresentou um teor médio de 0,3 mg/L, com um máximo de 0,4 mg/L; a morfolina apresentou um teor médio de 0,24 mg/L, com um máximo de 2,1 mg/L. Como forma de melhor compreendermos o significado destes valores poderemos referir que nas amostras de outras bebidas alcoólicas analisadas, como cerveja (13 amostras) ou bebidas espirituosas (16 amostras) os autores não encontraram nem morfolina nem piperidina, tendo registado teores médios de pirrolidina superiores no caso da cerveja (0,560 mg/L) e inferiores no caso das bebidas espirituosas (0,040 mg/L).

Anteriormente, Ibe *et al* [1981], no seu trabalho já várias vezes referido ao longo deste capítulo, encontraram pirrolidina em 16 de 32 amostras de vinho tinto analisadas (teor máximo: 0,180 mg/L; teor médio: 0,070 mg/L), não tendo detectado o composto em nenhuma das 43 amostras de vinho branco também analisadas. Busto *et al.* [1994], por seu lado, referem a presença de morfolina em amostras de vinho branco (teores entre 0,490 e 1,330 mg/L em 5 amostras) e de vinho tinto (teores entre 0 e 0,270 mg/L em 5 amostras). Embora não apresentem valores, os autores deixam subentendida a presença de pirrolidina, sublinhando a impossibilidade da quantificação correcta do composto em virtude de não terem conseguido a sua separação cromatográfica em relação ao pico correspondente ao excesso de reagente derivatizante usado, formando um "ombro" que é visível no cromatograma apresentado respeitante a uma amostra de vinho (para descrição do método usado ver cap. 2).

1.3.5. Estudos sobre a origem das aminas voláteis em vinhos

Os trabalhos do grupo de Ough e colaboradores, realizados há cerca de vinte anos atrás e já acima citados e descritos, são praticamente os únicos estudos que se encontram na literatura sobre a ocorrência de aminas voláteis em vinhos. Resumidamente, os autores observaram a presença em mostos de metilamina, de etilamina e de isoamilamina em teores normalmente inferiores a 1 mg/L, e verificaram que a sua evolução no decorrer da fermentação alcoólica ocorria em duas etapas: uma primeira na qual os compostos praticamente desapareciam do meio, provavelmente por serem usados como fonte azotada pelas leveduras; uma segunda etapa, coincidente com o final do processo fermentativo, no qual voltavam a ser visíveis sinais da sua presença, muitas vezes em quantidades francamente superiores às observadas anteriormente, desconhecendo os autores os motivos que lhe estavam subjacentes.

O único outro estudo a que tivemos acesso, realizado muito recentemente, apresenta apenas resultados referentes à evolução dos teores de etilamina durante a fermentação maloláctica de cinco vinhos e os resultados não são muito elucidativos: em três dos vinhos, os teores do composto aumentaram ligeiramente durante o referido processo, mas nunca ultrapassando 1,5 mg/L, enquanto nos outros dois casos verificou-se mesmo uma diminuição acentuada do respectivo teor, de 1,6 para 0,5 mg/L e de 3,7 para 2,0 mg/L [Coton *et al.*, 1999].

A inexistência de qualquer relação entre a fermentação maloláctica e o aparecimento de etilamina (e de outras aminas voláteis), que se parece poder concluir da referida experiência, não apresenta qualquer surpresa, atendendo ao que atrás foi afirmado sobre a origem destes compostos, cuja formação por descarboxilação dos respectivos aminoácidos não parece ser muito provável.

Porém, dos poucos dados estatísticos existentes sobre a presença destes compostos nos vinhos, realça-se uma correlação fortemente positiva entre os teores de etilamina e de histamina verificada por Ingargiola e Bertrand [1991] e por Bauza *et al.* [1995a] na análise de um número elevado de amostras, o que poderia apontar para uma origem semelhante para os dois compostos. Os últimos autores também encontraram uma correlação positiva entre a isoamilamina e a 2-feniletilamina, a qual também já tinha sido observada por Mayer e Pause [1987]; neste caso as dúvidas ainda são maiores, pois como vimos, também pouco se sabe sobre a origem de 2-feniletilamina encontrada nos vinhos. Soufleros *et al.* [1998] encontraram, por seu lado, uma correlação negativa entre a presença das três

aminas em discussão (metilamina, etilamina e isoamilamina) e a presença de ácido málico e de ácido cítrico (idêntica à observada para a histamina, a tiramina e a putrescina) o que também aponta para uma possível formação daqueles compostos por acção microbiana. Curiosamente, os mesmos autores não encontraram essa correlação para a 2-feniletilamina, o que contradiz as observações anteriormente referidas sobre o paralelismo deste composto com a isoamilamina.

Quanto aos outros compostos integrados no grupo das aminas voláteis, não se encontram na literatura quaisquer dados, para lá da sua presença nos mostos em quantidades diminutas, que permitam especular sobre os motivos da sua presença nos vinhos.

Bibliografia

Adams, D.O., Franke, K.E., Christensen, L.P., Elevated putrescine levels in grapevine leaves that display symptoms of potassium deficiency. ***Am. J. Enol. Vitic., 41,*** 121 (1990).

Adams, D.O., Bates, D.J., Adams, D.F., Franke, K.E., The effect of agmatine and other precursors on the accumulation of putrescine in grape leaves. ***Am. J. Enol. Vitic., 43,*** 239 (1992).

Aerny, J., L'Histamine. Présence dans les denrées alimentaires et dans le vin en particulier. ***Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic., 14,*** 7 (1982).

Aerny, J., Origine de l'histamine dans les vins. Connaissances actuelles. ***Bull. OIV, 656-657,*** 1016 (1985).

Aerny, J., Presence d'histamine et d'autres amines biogenes dans les vins. ***Feuillet Vert OIV, nº 881*** (1990).

Akamatsu, N., Oguchi, M., Yajima, Y., Ohno, M., Formation of N-carbamylputrescine from citrulline in *Escherichia coli*. ***J. Bacteriol., 133,*** 409 (1978).

Amon, U., Bangha, E., Küster, T., Menne, A., Vollrath, I.B., Gibbs, B.F., Enteral histaminosis: clinical implications. ***Inflamm. Res., 47,*** 291 (1999).

Babe, K.S., Serafin, W.E., in: ***Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics,*** 9ª edição (editado por J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff e R.W. Ruddon — McGraw-Hill, N. York,) Cap. 25 - Histamine, bradykinin, and their antagonists, p. 581 (1996).

Bagni, N., Pistocchi, R., Polyamines as growth substances in higher plants, in ***Progress in Polyamine Research. Novel Biochemical, Pharmacological, and Clinical Aspects,*** (editado por V. Zappia e A.E. Pegg — Plenum Press, N. York, London), p. 547 (1988).

Bardócz, S., Grant, G., Brown, D.S., Ralph, A.., Pusztai, A., Polyamines in food — implications for growth and health. ***J. Nutr. Biochem., 4,*** 66 (1993).

Bardócz, S., Duguid, T.J., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A., White, A., Ralph, A., The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. ***Brit. J. Nutrition, 73,*** 819 (1995).

Barker, L.A., in ***Human Pharmacology - Molecular to Clinically,*** 2ª edição (editado por M. Brody, J. Larner, K. Minneman e H. Neu — Mosby, St. Louis, MI) Cap. 59 - Histamine and antihistamines, p. 787 (1994).

Barth, H., Lorenz, W., Structural requirements of imidazole compounds to be inhibitors or activators of histamine methyltransferase: investigation of histamine analogues and H_2 receptor antagonists. ***Agents Action, 8,*** 359, (1978).

Basso, L.C., Smith, T.A., Effect of mineral deficiency on amine formation in higher plants. ***Phytochem., 13,*** 875 (1974).

Bauza, T., Blaise, A., Mestres, J.P., Teissedre, P.L., Daumas, F., Cabanis, J.C., Teneurs en amines biogènes et facteurs de leurs variations dans les vins des côtes du Rhône, de la vallée du Rhône et de Provence. ***Sci. Aliments, 15,*** 367 (1995a).

Bauza, T., Blaise, A., Daumas, F., Cabanis, J.C., Determination of biogenic amines and their precursor amino acids of the Vallée du Rhône by high- performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. ***J. Chromatogr. A, 707,*** 373 (1995b).

Bauza, T., Blaise, A., Mestres, J.P., Teissedre, P.L., Daumas, F., Cabanis, J.C., Evolution des teneurs en amines biogènes des mouts et des vins au cours de la vinification. ***Sci. Aliments, 15,*** 559 (1995c).

Bauza, T., Blaise, A., Teissedre, P.L., Cabanis, J.C., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Les amines biogènes du vin – Métabolism et toxicité. ***Bull. OIV, 767-768,*** 42 (1995d).

Beavan, M.A., Histamine: its role in physiological and pathological processes. ***Monogr. Allergy, 13,*** 1 (1978) *(citado por Taylor, 1986).*

Bieganski, T., Kusche, J., Lorenz, W., Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. ***Biochim. Biophys. Acta, 756,*** 196 (1983).

Bisson, L., Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. in: ***Proceedings of the International Syposium on Nitrogen in Grapes and Wine,*** (editado por J.M.Rantz — The American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA) p. 78 (1991).

Blackwell, B., Mabbitt, L.A., Marley, E., Histamine and tyramine content of yeast products. ***J. Food Sci., 34,*** 47 (1969).

Blakesley, M., Scombroid poisoning: prompt resolution of symptoms with cimetidine. ***Ann. Emerg. Med., 12,*** 104 (1983) *(citado por Taylor, 1986).*

Blau, K., in: ***Clinical biochemistry - principles, methods, applications. Volume 1 - Mass spectrometry*** (editado por A.M. Lawson — Walter de Gruyter, Berlim, N. York) Cap. 3 - Biogenic amines, p. 129 (1989).

Bodmer, S., Imark, C., Kneubühl, M., Biogenic amines in foods: histamine and food processing. ***Inflamm. Res., 48,*** 296 (1999).

Boulton, A.A., in: ***Trace amines and the brain*** (editado por E. Usdin e M. Sandler — Marcel Dekker, N. York) p. 21 (1976) (citado por Blau, 1989).

Bravo-Abad, F., Gómez, E.G., Selécion de microorganismos para la producción de vinos higiénicos. I. Producción de sulfuro de hidrogéno e histamina durante la fermentación vínica. ***Alimentaria, 24,*** 103 (1987).

Brink, T. B., Damink, C., Joosten, H.M., Huis in't Veld, J.H., Ocurrence and formation of biologically active amines in foods. ***Int. J. Food Microbiol., 11,*** 73 (1990).

Bruijnzeel-Koomen, C., Ortolani, C., Aas, K., Bindsley-Jensen, C., Björkstén, B., Moneret-Vautrin, D., Wütrich, B., Adverse reactions to food, ***Alergy, 50,*** 623 (1995).

Buncic, S., Paunovic, Lj., Teodorovic, V., Radisic, D., Vojinovic, G., Smiljanic, D., Baltic, M., Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. ***Int.J. Food Microbiol., 17,*** 303 (1993).

Burkhalter, A., Julius, D.J., Katzung, B.G., in: ***Basic & Clinical Pharmacology,*** 7ª edição (Editado por B. Katzung — Lange Medical Books / Mc Graw Hill, N. York) Cap. 16 - Histamine, serotonin and the ergot alkaloids, p. 261 (1998).

Busto, O., Valero, Y., Guasch, J., Borrull, F., Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. ***Chromatographia, 38***, 571 (1994).

Busto, O., Mestres, M., Guasch, J., Borrull, F., Determination of biogenic amines in wine after clean-up by solid - phase extraction. ***Chromatographia, 40***, 404 (1995).

Busto, O., Guasch, J., Borrull, F., Biogenic amines in wine: a review of analytical methods. ***J. Internat. Sci. Vigne Vin, 30,*** 85 (1996a).

Busto, O., Guasch, J., Borrull, F., Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. ***J. Chromatogr. A, 737,*** 205 (1996b).

Busto, O., Miracle, M., Guasch, J., Borrull, F., Solid phase extraction of biogenic amines from wine before chromatographic analysis of their AQC derivatives. ***J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 20,*** 743 (1997).

Buteau, C., Duitschaever, C.L., Ashton, G.C., A study of the biogenesis of amines in a Villard Noir wine. ***Am. J. Enol. Vitic., 35,*** 228 (1984).

Butturini, A., Aloisi, P., Tagliazucchi, R., Cantoni, C., Production of biogenic amines by enterobacteria and lactic acid bacteria isolated from meat products. ***Ind. Aliment., 34,*** 9 (1995).

Castino, M., La formazione di istamina nei vini quale conseguenza della fermentazione malolattica. ***Atti Acc. It. della Vite et del Vino, 27,*** 3 (1975).

Cavazza, A., Cerutti, G., Gozzi, G., Ceppo di lievito e biogenesi di ammine nella fermentazione del mosto d'uva. ***Vignevini, 23,*** 8 (1995).

Cerutti, G., Colombo, G., Istamina, tiramina ed altre ammine fisse nei vini italiani. II. Rimozione delle amine mediante bentoniti. ***Riv. Vitic. Enol., 25,*** 451 (1972).

Cerutti, G, Cassa, W., Finoli, C., Vecchio, A., Ammine biogene nel vino. ***Vignevini,*** 35 (1986).

Cerutti, G., Margheri, G., Bongini, F., Sulla correlazione tra fermentazione malolattica ed ammine biogene vasoattive. ***Vignevini,*** 39 (1987).

Cerutti, G., Cavazza, A., Benco, S., Ceppo di lievito e produzione di ammine nella fermentazione del mosto d'uva. ***Vignevini, 18,*** 67 (1991).

Chandra, R. K., Food hypersensitivity and allergic disease: a selective review. ***Am. J. Clin. Nutr., 66,*** 526S (1997).

Choudhury, N., Hansen, W., Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. ***Lett. Appl. Microbiol., 11,*** 278 (1990).

Cillliers, J.D., Van Wik, C.J., Histamine and tyramine content of South African wine. ***S. Afr. J. Enol. Vitic, 6,*** 35 (1985).

Coton E., Rollan, G., Lonvaud-Funel, A., Histidine decarboxylase of Leuconostoc oenos 9204: purification, kinetic properties and nucleotide sequence of the hdc gene. ***J. Appl. Microbiol., 80*** (1997).

Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency and distribution. ***Am. J. Enol. Vitic, 49,*** 199 (1998).

Coton, E., Torlois, S., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., Amines biogènes et bactéries lactiques duvin. ***Bull. OIV, 72,*** 23 (1999).

Coutts, R.T., Baker, G.B., Pasutto, F.M., Foodstuffs as sources of psychoactive amines and their precursors: content, significance and identification. ***Adv. Drug Res., 15,*** 169 (1986).

Crocomo, O.J., Basso, L.C., Brasil, O.G., Formation of N-carbamoylputrescine from citrulline in *Sesamum.* ***Phytochem., 9,*** 1487 (1970).

Crocomo, O.J., Fowden, L., Amino acid decarboxylases of higher plants: the formation of ethylamine. ***Phytochem., 9,*** 537 (1970).

Dabeev, N., Hygienic standardization of monomethylamine in the air. ***Gig. Sanit., 5,*** 7 (1981).

Dale, H., Laidlaw, P., The physiological action of β-imidazolylethylamine. ***J. Physiol., 41,*** 318 (1910).

Dale, H., Laidlaw, P., Further observations on the action of β-imidazolylethylamine. ***J. Physiol., 43,*** 182 (1912).

Dale, H., Laidlaw, P., Histamine shock. ***J. Physiol., 52,*** 355 (1918).

Dale, H., Richards, A., The vasodilator action of histamine and some other substances. ***J. Physiol., 52,*** 110 (1918).

Dalton, K., Food intake prior to a migraine attack; study of 2313 spontaneous attacks. ***Headache, 10,*** 188 (1975).

Dandrifosse, G., Peulen, O., El-Khefif, N., Deloyer, P., Dandrifosse, A.C., Grandfils, C., Are milk polyamines preventive agents against food allergy? ***Proceed. Nutrit. Soc., 59,*** 81 (2000).

Daudt, C.E., Ough, C.S., Volatile amines in *Vitis vinifera* varieties and changes during maturation. ***Vitis, 21,*** 105 (1982).

Delas, J., Nutrition azotée. Composition des baies et des mouts. ***Progres Agricole Viticole (Montpellier), 110,*** 139 (1993).

Delfini, C., Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. ***Scienc. Aliments, 9,*** 413 (1989).

Desser, H., Bandion, F., Kläring, W., Zur kenntnis einiger biogener amine des traubenmostes und traubenweines. ***Mitt. Klosterneuburg, 31,*** 231(1981) *(citado por Radler e Fäth, 1991).*

Diamond, B.I., Hitri, A., Sha, C., Borison, R.L., in: ***Neurobiology of the Trace Amines*** (editado por A.A. Boulton, G.B. Baker, W.G. Dewurst e M. Sandler — Humana Press, Clifton, N. Jersey) p. 375 (1984) *(citado por Bauza et al., 1995d).*

Dinda, P.H., Holitzer, C.A., Morris, G.P., Beck, I.T., Ethanol-induced jejunal microvascular and morphological injury in relation to histamine release in rabbits. ***Gastroenterology, 104,*** 361 (1993).

Dollery, C.T., Brown, M.J., Davies, D.S., Lewis, P.J., Strolinbenedetti, M., Oral absorption and concentration effect relationship of tyramine with and without cimoxatona, a type-A specific inhibitor of monoamino-oxidase. ***Clin. Pharmacol. Ther., 34,*** 651 (1983).

Dumont, E., De Geeter, H., Huyghebaert, A., Presence and formation of biogenic amines in local belgian beers. ***Med. Fac Landbauww. Univ. Gent, 57,*** 423 (1992).

Eerola, S., Maijala, R., Roig-Sagués, A.X., Salminen, M., Hirvi, T., Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and contaminant amine-positive *Lactobacillus*. ***J. Food Sci., 61,*** 1243 (1996).

Facchini, P.J., Huber-Allanach, K., Tari, L.W., Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evalution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. ***Phytochem., 54,*** 121 (2000).

Farias, M., Nadra, M.C., Rollan, G.C., Saad, A.S., Histidine decarboxylase activity in lactic acid bacteria from wine. ***J. Int. Sci. Vigne Vin, 27,*** 191 (1993).

Feldman, J.M., Histaminuria from histamine-rich foods. ***Arch. Intern. Med., 143,*** 2099 (1983).

Ferrando, R., Toxic amino acids, amines, nitrosamines. ***Indian Food Packer, 40,*** 13 (1986).

Fröhlich, D., Battaglia, R., HPLC analyse von biogenen aminen in wein. ***Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg., 71,*** 38 (1980).

Galston, A.W., Weinstein, L.H., Control of phytopathogens by inhibitors of polyamine biosynthesis. in: ***Progress in Polyamine Research. Novel Biochemical, Pharmacological, and Clinical Aspects,*** (editado por V. Zappia e A.E. Pegg — Plenum Press, N. York, London), p. 589 (1988).

Garrett, J., in: ***Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas - Manual de Farmacologia e Farmacoterapia,*** 3ª edição (Editado por J. Garrett, W. Oswald e S. Guimarães — Porto Editora, Porto), Cap.28 - Histamine e anti-histamínicos, p.398 (1994).

Gabe, M., Parrot, J.L., Augmentation de l'absorption intestinale de l'histamine par l'action de certaines diamines. ***Presse Méd., 82,*** 1779 (1952) (citado por Bauza *et al.*, 1994d).

Geny, L., Broquedis, M., Martin-Tanguy, J., Soyer, J.P., Bouard, J., Effects of potassium nutrition on polyamine content of various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. ***Am. J. Enol. Vitic., 48,*** 85 (1997).

Gilad, G.M., Gilad, V.H., Cytotoxic effects of monodansylcadaverine and methylamine in primary cultures of rat cerebellar neurons. ***Int. J. Devl. Neuroscience, 4,*** 401 (1986).

Glória, M, Watson, B., Simon-Sarkadi, L., Daeschel, M., A survey of biogenic amines in Oregon Pinot Noir and Cabernet Sauvignon. ***Am. J. Enol. Vitic., 49,*** 279 (1998).

Granerus, G., Effects of oral histamine, histidine and diet on urinary excretion of histamine, methyl histamine and 1-methyl-4-imidazoleacetic acid in man. ***Scand. J. Clin. Lab. Invest., 22,*** 49 (1968) *(citado por Taylor, 1986).*

Granerus, G., Svensson, S.E., Wetterqvist, H., Histamine in alcoholic drinks. ***Lancet, 1,*** 1320 (1969) *(citado por Ough, 1971).*

Grant, A.L., Holland, R.E., Thomas, J.W., King, K.J., Liesman, J.S., Effect of dietary amines on the small intestine of calves fed soybean protein. ***J. Nutr., 119,*** 1034 (1989).

Grant, A.L., Thomas, J.W., King, K.J., Liesman, J.S., Effects of dietary amines on small intestinal variables in neonatal pigs fed soy protein isolate. ***J. Anim. Sci., 68,*** 363 (1990).

Greenshaw, A.J., in: ***Neurobiology of the Trace Amines*** (editado por A.A. Boulton, G.B. Baker, W.G. Dewurst e M. Sandler — Humana Press, Clifton, N. Jersey), p. 375 (1984) *(citado por Bauza et al., 1995d).*

Greim, H., Bury, D., Klimisch, H-J, Oeben-Negele, M., Ziegler-Skylakakis, K., Toxicity of aliphatic amines: structure-activity relationship. ***Chemosphere, 36,*** 271 (1998).

Halász, A., Baráth A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., Biogenic amines and their production by microorganism in food. ***Trends Food Sci. Technol., 5,*** 42 (1994).

Hannington, E., Monoamine oxydase and migraine. ***Lancet, 1,*** 558 (1974).

Hartmann, T., Biosynthese flüchtiger amine in Äpfeln durch aldehyd-aminierung. ***Z. Pflanzenphysiol., 57,*** 368 (1967) *(citado por Smith, 1980-81).*

Hartmann, T., Donges, D., Steiner, M., Biosynthese aliphatischer monoamine in mercurialis perennis durch aminosäure-aldehyd-transaminierung. ***Z. Pflanzenphysiol., 67,*** 404 (1972a) *(citado por Smith, 1980-81).*

Hartmann, T., Ilert, H., Steiner, M., Aldehydaminierung, der bevorzugte biosyntheseweg für primäre aliphatische monoamine in Blütenpflanzen. ***Z. Pflanzenphysiol., 68,*** 11 (1972b) *(citado por Smith, 1980-81).*

Hoffman, B.B, in ***Basic & Clinical Pharmacology,*** 7ª edição (Editado por B. Katzung — Lange Medical Books / Mc Graw Hill, N. York) Cap. 9 - Adrenoceptor, activating & other sympathomimetic drugs, p. 118 (1998).

Hoffman, B.B. e Lefkowitz, R.J., in ***Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics,*** 9ª edição, (editado por J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff e R.W. Ruddon — McGraw-Hill, N. York), Cap. 10 - Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptors p. 199 (1996).

Holen, B., Sanderud, R., Metode og analyse av viner høsten 91. ***Wine Monopoly of Norway. Report,*** (1991). *(citado por Lehtonen 1996).*

Holm, I., Persson, L., Stjernborg, L., Thornsson, L., Heby, O., Feedback control of ornithine decarboxylase expression by poliamines. ***Biochem. J., 258,*** 343(1989).

Hotchkiss, J.H., A review of current literature on N-nitrosocompounds in foods. ***Adv. Food Research, 31,*** 53 (1987).

Hotchkiss, J.H., Preformed N-nitrosocompounds in foods and beverages. ***Cancer Surveys, 8,*** 295 (1989).

Hui, J.Y., Taylor, S.L., Inhibiton of *in vivo* histamine metabolism in rats by foodborne and farmacological inhibitors of diamine oxidase, histamine N-methyl transferase, and monoamine oxidase. ***Toxicol. Appl. Pharmacol., 8,*** 241 (1985).

Ibe, A., Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Fujinuma, K., Nishima, T., Quantitative determination of amines in wine by liquid chromatography. ***J. AOAC Int., 74,*** 695 (1991).

Igarashi, K., Kashiwagi, K., Polyamine transport in *Escherichia coli* and yeast (Review). ***Biochem J., 344,*** 633 (1999).

Igarashi, K., Kashiwagi, K., Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. ***Biochem. Biophys. Res. Communic., 271,*** 559 (2000).

Ijomah, P., Clifford, M.N., Walker, , P., Clifford, M.N., Walker,R., Wright, J., Hardy, R., Murray, C.K., The importance of endogenous histamine relative to dietary histamine in the aetiology of scombrotoxicosis. ***Food Addit. Contamin., 8,*** 531 (1991).

Ingargiola, M.C., Bertrand, A., Origine des amines biogènes dans les vins. ***Feuillet OIV, nº 896*** (1991).

Iñiguez-Crespo, M., Vasquez-Lasa, M.B., Determination of biogenic amines and other amines in wines by an optimized HPLC method with polarity gradient elution. ***Am. J. Enol. Vitic., 45,*** 460 (1994).

Jakob, L., ***Weinberg Keller, 15,*** 535 (1968) *(citado por Ough, 1971).*

Jarisch, R., Pirker, C., Möslinger, T, Götz, M., The role of histamine in wine intolerance. ***J. Allergy Clin. Immunol., 89,*** 197 (1992).

Jarisch, R., Wantke, F., Wine and headache. ***Int. Arch. Allergy Immunology, 110,*** 7 (1996).

Jeevanandam, M., Holaday, N.J., Begay, C.K., Petersen, S.R., Nutritional efficacy of a spermidine supplemented diet. ***Nutrition, 13,*** 788 (1997).

Jonsson, J., Lindeke, B., Cho, A.K., Oxidation of phenylethylamine yielding tyramine by rat liver microsomes. ***Acta Pharmacol. Toxicol. Kbh., 37,*** 352 (1975) *(citado por Blau, 1989).*

Joosten, H.M., Northolt, M.D., Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 2. Decarboxylase properties of some non-starter bacteria. ***J. Neth. Milk Dairy, 41,*** 329 (1987).

Joosten, H.M., Stadhouders, J., Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 1. Decarboxylase properties of starter bacteria. ***J. Neth. Milk Dairy, 41,*** 247 (1987).

Kállay, M., Body-Szalkai, M., Ammine biogene nei vini ungheresi. ***Riv. Vitic. Enol., 49,*** 28 (1996).

Kan, K., Ushiyama, H., Shindo, T., Uehara, S., Yasuda, K., Outbreak of histamine poisoning due to ingestion of fish, "Abura-sokomutsu" (Lepidocybium flavobrunneum). ***J. Food Hyg. Soc. Japan, 41,*** 116 (2000).

Kanny, G., Bauza, T., Frémont, S., Blaise, A., Cabanis, J.C., Nicolas, J.P., Moneret-Vautrin, D.A., Les intolérances aux vins. Un modèle d'étude des fausses allergies alimentaires. ***Rev. Fr. Allergol., 37,*** 381 (1997).

Karmas, E., Biogenic amines as indicators of seafood freshness. ***Food Sci. Technol., 17,*** 20 (1981).

Kim, I.S., Bjeldanes, L.F., Amine content of toxic and wholesome canned tuna fish. ***J. Food Sci., 44,*** 922 (1979).

Lafon-Lafourcade, S., L'histamine des vins. ***Connaiss. Vigne Vin, 9,*** 103 (1975).

Large, P.J., Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. ***Yeast, 2,*** 1 (1986).

Lehtonen, P., Determination of amines and amino acids – a review. ***Am. J. Enol. Vitic., 47,*** 127 (1996).

LeJeune, C., Lonvaud-Funel, A., Brink, B., Hofstra, H., Vossen, J.M., Development of a detection system for histidne decarboxylase of lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. ***J. Appl. Bact., 78,*** 316 (1995).

Lemanske, R., Atkins, F., Metcalfe, D., Gastrointestinal mast cells in health and disease. Part 1. ***J. Pediatry, 103,*** 177 (1983).

LeRudulier, D., Goas, G., Influence des ions ammonium et potassium sur l'accumulation de la putrescine chez les jeunes plantes de *Soja hispida* Moench, privées de leurs cotyledons. ***Physiol. Veg., 13,*** 125 (1975) *(citado por Smith, 1980-81).*

Lonvaud-Funel, A., Masclef, J.P., Joyeux, A., Paraskevopoulos, Y., Etude des interactions entre levures et bactéries lactiques dans le moût de raisin. ***Connaiss. Vigne Vin, 22,*** 11 (1988).

Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., Histamine prodution by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos.* ***J. Appl. Bact., 77,*** 401 (1994).

Løvaas, E., Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. ***Adv. Pharmacol., 38,*** 119 (1997).

Love, R.R., Jacoby, R., Newton, M.A., Tutsch, K.D., Simon, K., Pomplun, M., Verma, A.K., A randomized, placebo-controlled trial of low-dose alpha-difluoromethylornithine in individuals at risk for colorectal cancer. ***Can. Epidem. Biom. Prev., 7,*** 989 (1998).

Lowenberg, D.W., Ough, C.S., Lepkovsky, S., Furuta, S.S., The effect of ethanol and wine on the plasma histamine level of chickens and man. ***Am. J. Enol. Vitic., 32,*** 128 (1981).

Luthy, J., Schlatter, C., Biogenic amines in food. Effects of histamine, tyramine and phenethylamine on man. ***Z. Lebensmitt. Unters.-Forsch., 177,*** 439 (1983).

Mack, D., Determination of histamine in wine with the automatic amino acid analyser. ***Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 152,*** 321 (1973).

Mafra, I., Herbert, P., Santos, L., Barros, P., Alves, A., Evalution of biogenic amines in some portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. ***Am. J. Enol. Vitic., 50,*** 128 (1999).

Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P., Hirvi, T., Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. ***J. Food Sci., 60,*** 1187 (1995).

Malone, M.H., Metcalfe, D.D., Histamine in foods: its possible role in non-allergic adverse reactions to ingestiants. ***N. Engl. Reg. Allergy Proc.,*** *7,* 241 (1996).

Mammoser, L.F., Albi, R.W., Boyd, T.E., Studies on the absorption of histamine from the intestine. ***Am. J. Physiol., 50,*** 444 (1929) *(citado por Marquardt e Werringloer, 1965).*

Manahan, S.E. in: ***Toxicological Chemistry,*** 2ª edição (editado por S.E. Manahan — Lewis Publishers, Chelsea, MI), Cap. 15 - Organonitrogen compounds, p. 347 (1992).

Manahan, S.E. in: ***Environmental Chemistry,*** 6ª edição (editado por S.E. Manahan — Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, Fl), Cap. 12 - Organic air polutants, p. 375 (1994).

Manca de Nadra, M.C., Farias, M., Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M.C., Proteolytic activity of *Leuconostoc oenos.* Effect on proteins and polypeptides from white wine. ***FEMS Microbiol. Letters, 150,*** 135 (1997).

Manca de Nadra, M.C., Farias, M., Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M.C., A proteolytic effect of Oenococcus oeni on the nitrogenous macromolecular fraction of red wine. ***FEMS Microbiol. Letters, 174,*** 41 (1999).

Maretzki, A., Thom, M., Nickell, L.G., Products of arginine catabolism in growing cells of sugarcane. ***Phytochem., 8, 811*** (1969).

Mariné-Font, A., Vidal-Carou, C., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, T., Hernández-Jover, T., Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. ***Ann. Fals. Exp. Chim. 88,*** 119 (1995).

Marquardt, P., Werringloer, H., Toxicity of wine. ***Food Cosmet. Toxicol., 3,*** 803 (1965).

Maslinski, C., Histamine and its metabolism in mammals. I. Chemistry and formation of histamine. ***Agents Actions, 5,*** 89 (1975).

Masson, F., Talon, R., Montel, M.C., Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. ***Int. J. Food Microbiol., 32,*** 199 (1996).

Matos, M.B. in: ***Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas - Manual de Farmacologia e Farmacoterapia,*** 3ª edição, (Editado por J. Garrett, W. Oswald e S. Guimarães — Porto Editora, Porto), Cap.12 - Antidepressores, p.148 (1994).

Maxa, E., Brandes, W., Daniel, R., HPLC-method zur routinemässigen quantifizierung von biogenen aminen in wein. ***Mitteilungen Klosterneuburg., 42,*** 165 (1992) *(citado por Lehtonen, 1996)*.

Maxa, E., Brandes, W., Biogene amine in fruchtsäften. ***Mitteilungen Klosterneuburg., 43,*** 101 (1993).

Mayer, K., Pause, G., Histaminbildung durch kahmhefen in wein. ***Schweiz. Z. Obst-Weinbau, 107,*** 579 (1971) *(citado por Radler e Fäth, 1991).*

Mayer, K., Pause, G., Nicht-flüchtige biogene amine in wein. ***Mitt. Geb. Lebensmitteluntersuch. Hyg., 64,*** 171 (1973) *(citado por Radler e Fäth, 1991).*

Mayer, K., Pause, G., Histamingehalte in 1981er Ostschweizer weinen. ***Schweiz. Z. Obst.-Weinbau, 118,*** 723 (1982) *(citado por Radler e Fäth, 1991).*

Mayer, K., Pause, G., Senkung der amingehalte in wein durch bentonitbehandlung-laborversuche. ***Schweiz. Z. Obst.-Weinbau, 121,*** 203 (1985). *(citado por Aerny, 1985).*

Mayer, K., Pause, G., Amingehalte in ostschweizer weinen. ***Schweiz. Z. Obst-Weinbau, 123,*** 303 (1987) *(citado por Radler e Fäth, 1991).*

Millies, K., Über das vorkommen von histamin in getränken. ***Int. Fruchtsaft-Union, Ber. Wiss. Techn. Komm., 7,*** 125 (1966) *(citado por Ough, 1971).*

Moneret-Vautrin, D.A., André, C.L., Immunopathologie de l'allergie alimentaire et fausses (Editado pelos autores — Masson) Paris, França, p. 151 (1983).

Monteiro, F.F., Bisson, L.F., Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. ***Am. J. Enol. Vitic., 42,*** 199 (1991).

Moore, K.E., in: ***Human Pharmacology - Molecular to Clinicaly,*** 2ª edição, (Editado por M. Brody, J. Larner, K. Minneman e H. Neu — Mosby, St. Louis, MI), Cap. 10 - Drugs affecting the sympathetic nervous system, p. 113 (1994).

Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, S., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. ***J. Appl. Microb., 88,*** 584 (2000).

Morrow, J.D., Margolies, G.R., Rowland, J., Roberts, L.J., II. Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning. ***N. Engl. J. Med., 324,*** 716 (1991).

Myou, S., Fujimura, M., Brando, T., Saito, M., Matsuda, T., Aerosolized acetaldehyde but not ethanol induce histamine-mediated bronchoconstriction in guinea pigs. ***Clin. Exp. Allergy, 24,*** 140 (1994) (citado por Kanny *et al.*, 1997).

OIV, Compte rendu des travaux de la sous-comission conventionelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. ***Bull. OIV, 631-632,*** 649 (1983).

OIV, Compte rendu des travaux de la sous-comission conventionelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. ***Bull. OIV, 646,*** 985 (1984).

OIV, Compte rendu des travaux de la sous-comission conventionelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. ***Bull. OIV, 656-657,*** 995 (1985).

OIV, Compte rendu des travaux de la sous-comission conventionelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. ***Bull. OIV, 705-706,*** 808 (1989).

OIV, Compte rendu des travaux de la sous-comission conventionelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. ***Bull. OIV, 719-720,*** 31 (1991a).

OIV, Compte rendu des travaux de la sous-comission conventionelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. ***Bull. OIV, 727,*** 716 (1991b).

OIV, Compte rendu des travaux de la sous-comission conventionelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. ***Bull. OIV, 747-748,*** 382 (1993).

OIV, Compte rendu des travaux de la sous-comission conventionelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. ***Bull. OIV, 755-756,*** 54 (1994a).

OIV, Compte rendu des travaux de la sous-comission conventionelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins. ***Bull. OIV, 763-764,*** 804 (1994b).

OIV, Resolution OENO 4/97, ***Bull. OIV, 803-804,*** 60 (1998).

Okamoto, A., Sugi, E., Koizumi, Y., Yanagida, F., Udaka, S., Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. ***Biosci. Biotech. Biochem. 61,*** 1582 (1997).

Omura, Y., Price, R.J., Olcott, H.S., Histamine-forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. ***J. Food Sci., 43,*** 1779 (1978) *(citado por Smith, 1980-81).*

Ordónez, A.I., Ibánez, F.C., Torre, P., Barcina, Y., Formation of biogenic amines in idiazábal ewe's-milk cheese: effect of ripening, pasteurization, and starter. ***J. Food Protect., 60,*** 1371 (1997).

Ough, C.S., Measurement of histamine in californian wines, ***J. Agric. Food Chem., 19,*** 241 (1971).

Ough, C.S., Daudt, Quantitative determination of volatile amines in grapes and wines. I. Effect of fermentation and storage temperature on amine concentrations. ***Am. J. Enol. Vitic., 32,*** 185 (1981).

Ough, C.S., Daudt, C.E., Crowell, E.A., Identification of new volatile amines in grapes and wines. ***J. AOAC Int., 29,*** 938 (1981).

Ough, C.S., Crowell, E., Kunkee, R., Vilas, M., Lagiçr, S., A study of histamine production by various wine bacteria in model solutions and in wine. ***J. Food Process. Preserv., 12,*** 63 (1987).

Ough, C.S., Huang, Z., An, D., Stevens, D., Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and reabsorption, ***Am. J. Enol. Vitic., 42,*** 26 (1991).

Parrot, J.L., Gabe, M., Herrault, A., Intoxication aiguë du cobaye par l'administration simultanée d'histamine et de putrescine. ***C. R. Soc. Biol., 141,*** 486 (1947) *(citado por Amon et al., 1999).*

Peatfield, R.C., Relationships between food, wine, and beer-precipitated migrainous headaches. ***Headache, 35,*** 355 (1995).

Pegg, A.E., Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. ***Biochem. J., 234,*** 249 (1986).

Persson, L., Khomutov, A.R., Khomutov, R.M., Feedback regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase synthesis. ***Biochem. J., 257,*** 929 (1989).

Pfundstein, B., Tricker, A.R., Theobald, E., Spiegelhalder, B., Preussmann, R., Mean daily intake of primary and secondary amines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. ***Food Chem. Toxicol., 29,*** 733 (1991).

Plumas, B., Sautier, C., Méthode de dosage simultané de l'histidine et de l'histamine dans les liquides biologiques. Application aux vins. ***Ann. Fals. Exp. Chim., 65,*** 323 (1972).

Pogorzelski, E., Studies on the formation of histamine in must and wines from elderberry fruit. ***J. Sci. Food Agric., 60,*** 239 (1992).

Ponto, L.B., Perry, P.J., Liskow, B.I., Seaba, H.H., Drug therapy reviews: Tricyclic antidepressant monoamine-oxidase inhibitor combination therapy. ***Am. J. Hosp. Pharm., 34,*** 954 (1977).

Preusser, E., Zur biosynthese von flüchtigen stickstoffverbindungen bei pflanzen. ***Biol. Zentralbl., 94,*** 75 (1975) *(citado por Smith, 1980-81)*

Price, K., Smith, S.E., Cheese reaction and tyramine. ***Lancet, 1,*** 130 (1971).

Quevauviller, A., Mazière, M., Recherche et dosage biologique de l'histamine dans les vins. ***Annales Pharmaceut. Françaises, 27,*** 411 (1969).

Radler, F., Fäth, K.P., Histamine and other biogenic amines in wines. in: ***Proceedings of the International Syposium on Nitrogen in Grapes and Wine,*** (editado por J.M.Rantz — The American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA) p. 185 (1991).

Reite, O.B., Comparative physiology of histamine. ***Physiol. Rev., 52,*** 778 (1972). *(citado por Babe e Serafin, 1996).*

Rice, S.L., Eitenmiller, R.R., Koehler, P.E., Biologically active amines in foods. A review. ***J. Milk Food Technol., 39,*** 353 (1976).

Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Hernandez, J.F., Mariné-Font, A., Study of the evolution of tyramine content during the vinification process. ***J. Food Sci., 48,*** 417 (1983).

Rollan, G.C., Coton, E., Lonvaud-Funel, A., Histidine decarboxylase activity of *Leuconostoc oenos* 9204. ***Food Microbiol., 12,*** 455 (1995).

Rosa, J., Komornicka, W., Poziom wystepowania histaminy oraz ubocznych produktów fermentacji w krajowych winach i piwie. Przem. ***Ferment Owoc-Warzywny, 7,*** 1 (1990) *(citado por Pogorzelski 1992).*

Sabelli, H.C., Mosnaim, A.D., Phenylethylamine hypothesis of affective behavior. ***Am. J. Psychiat., 131,*** 696 (1974).

Saint-Blanquat, G., Derache, R., Présence de l'histamine dans le vin. ***Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier, 28,*** 23 (1968).

Sandler, M., Youdim, M., Hannington, H., A phenylethylamine oxidising defect in migraine. ***Nature, 250,*** 335 (1974).

Sandler, M., Reynolds, G.P., Does phenethylamine cause schizofrenia? ***Lancet, 1,*** 70 (1976).

Sandstrom, L.P., Sandstrom, P.A., Pennington, S.N, Ethanol-induced insulin resistance supresses the expression of embryonic ornithine decarboxylase activity. ***Alcohol, 10,*** 303 (1993).

Santos, M.S., Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in spanish fermented meat products. ***Int. J. Food Microbiol., 39,*** 227 (1998).

Sarhan, S., Knödgen, B., Seiler, E.R., The gastrointestinal tract as polyamine source for tumor growth. ***Anticancer Research, 9,*** 215 (1989).

Sattler, J., Hesterberg, R., Lorenz, W., Schmidt, U., Cromback, M., Stahlknecht, C. D., Inhibition of human and canine diamine oxidase by drugs used in an intensive care unit – relevance for clinical side effects. ***Agents Actions, 16,*** 91 (1985).

Sattler, J., Häfner, D., Klotter, H.J., Lorenz, W., Wagner, P.K., Food induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase. ***Agents Actions, 23,*** 361 (1988).

Sattler, J., Lorenz, W., Kubo, K., Schmal, A., Sauer, S., Lüben, L., Food-induced histaminosis under diamine oxidase (DAO) blockade in pigs: further evidence of the key role of elevated plasma histamine levels as demonstrated by sucessful prophylaxis with antihistamines. ***Agents Actions, 27,*** 212 (1989).

Sattler, J., Lorenz, W., Intestinal diamine oxidases and enteral-induced histaminosis: studies on three prognostic variables in an epidemiological model. ***J. Neural. Transm., 32,*** 291 (1990).

Scemama, J.L., Grabié, V., Seidel, E.R., Characterization of univectorial polyamine transport in duodenal crypt cell line. ***Am. J. Physiol., 265,*** 851 (1993).

Schneyder, J. Histamine et substances similaires dans les vins. Cause de formation, méthodes de leur élimination du vin. ***Bull. OIV, 46,*** 821 (1973).

Scholten, G., Biogene amine in wein: vorkommen, analytik, beeinflussung durch kellerwirtschaftliche maβnahmen. Comunicação apresentada no ***11th International Oenological Symposium, Sopron, Hungria,*** 3-5 Junho 1996.

Schuller, P.L., Ockhuizen, Th., Werringloer, H., Marquardt, P., ***Arzneim.-Forsch., 17,*** 888 (1967) (citado por Ough, 1971).

Seiler, N., Bolkenius, F.N., Knödgen, B., Mamont, P., Polyamine oxidase in rat tissues. ***Biochim. Biophys. Acta, 615,*** 480 (1980).

Seiler, N., Koch-Weser, J., Knödgen, B., Richards, W., Tardif, C., Bolkenius, F.N., Schechter, P., Tell, G., Mamont, P., Fozard, J., Bachrach, U., Grosshans, E., The significance of acetylation in the urinary excretion of polyamines. ***Adv. Polyamine Res., 3,*** 197 (1981).

Seiler, N., Polyamine metabolism, ***Digestion, 46,*** 319 (1990).

Sessa, A., Desiderio, A., Perin, A., Effect of acute ethanol administartion on diamine oxidase activity in the upper gastrointestinal tract of rat. ***Alcohol. Clin. Exp. Res., 8,*** 185 (1984).

Settipane, G.A., The restaurant syndromes. ***N. Engl. Reg. Allergy Proc., 7,*** 241 (1987).

Shibley, I.A., Gavigan M.D., Pennington, S.N., Ethanol's effect on tissue polyamines and ornithine decarboxylase activity: a concise review. ***Alcoholism: Clin. Experim. Research, 19,*** 209 (1995).

Singer, G.M., Lijinski, W., Naturally ocurring nitrosable compounds. I. Secondary amines in foodstuffs. ***J. Agric. Food Chem., 24,*** 550 (1976).

Sjaastad, O., Sjaastad, O.V., Catabolism of orally administerd ^{14}C-histamine in man. ***Acta Pharmacol. Toxicol., 34,*** 33 (1974).

Slaughter, J.C., Volatile amines in the brewing process. The identification and ocurrence of pyrrolidine. ***J. Inst. Brew., 76,*** 22 (1970).

Slaughter, J.C., Uvgard, A., Volatile amines of malt and beer. ***J. Inst. Brew., 77,*** 446 (1971).

Smith, T.A., Phenethylamine and related compounds in plants. ***Phytochem., 16,*** 9, (1977).

Smith, T.A., Amines in food. ***Food Chem., 6,*** 169 (1980-81).

Smith, T.A., Putrescine and inorganic iòns. ***Adv. Phytochem., 18,*** 7 (1984).

Smith, T.A., Polyamines. ***Ann. Rev. Plant Physiol. 36,***117 (1985).

Smith, T.K., Effect of dietary putrescine on whole body growth and polyamine metabolism. ***Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 194,*** 332(1990).

Smith, T.K., Mogridge, J.A.L., Sousadias, M.G., Growth-promoting potential and toxicity of spermidine, a polyamine and biogenic amine found in foods and feedstuffs. ***J. Agric. Food Chem., 44,*** 518 (1996).

Soleas, G.J., Carey, M., Goldberg, .M., Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wine. ***Food Chem., 64,*** 49 (1999).

Söllhuber, M., Avendaño, C., in: ***Introduccion a la Quimica Farmaceutica*** (editado por C. Avendaño — McGraw-Hill, Interamericana de España, Madrid), Cap. 16 - Fármacos que actúan sobre receptores de membrana (IV). Histamina e sus receptores, p. 473 (1993).

Somavilla, C., Bravo, F., Iñigo, B., Burdaspal, P., Histaminogénesis. IV: acumulación de histamina en medios naturales y semi-sintéticos. ***Alimentaria, 23,*** 37(1986).

Soufleros, E., Barrios, M.L., Bertrand, A., Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. ***Am. J. Enol. Vitic., 49,*** 266 (1998).

Sousa-Dias, M.G., Smith, T.K., Toxicity and grow promoting potential of spermine to the chick. ***J. Anim. Sci., 73,*** 2375 (1995).

Stanley, D.W., Hultin, H.O., Amine and formaldehyde production in North American squid and their relation to quality. ***Can. Institute Food Scien. Technol. Journal, 17,*** 157 (1984).

Stratton, J.E., Hutkins, R.W., Taylor, S.L., Biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review. ***J. Food Prot., 54,*** 460 (1991).

Straub, B., Kicherer, M., Schilcher, S., Hammes, W., The formation of biogenic amines by fermentation organisms. ***Z. Lebensm. Unters Forsch., 201,*** 79 (1995).

Subden, R.E., Duitschaever, C.L., Kaiser, K., Noble, A.C., Histamine content of canadian wines determined by reversed-phase liquid chromatography. ***Am. J. Enol. Vitic., 30,*** 19 (1979).

Sumner, S.S., Speckhard, M.W., Somers, E.B., Taylor, S.L., Isolation of histamine-producing Lactobacillus buchneri from swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. ***Appl. Environ. Microbiol., 50,*** 1094 (1985).

Tabor, C.W., Tabor, H., Polyamines. ***Ann. Rev. Biochem., 53,*** 749 (1984).

Tarantola, G., Separazione e identificazione cromatographica degli amino acid nei vini. ***Atti. Accad. Ital. Vite Vino, 6,*** 146 (1954).

Taylor, S., Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. ***CRC Critical Reviews in Toxicology, 17,*** 91 (1986).

Taylor, S., Lieber, E., In vitro inhibitions of rat intestinal histamine metabolizing enzymes. ***Food Cosmet. Toxicol., 17,*** 237 (1979).

Teodorovic, V., Buncic, S., Smiljanic, D., A study of factors influencing histamine production in meat. ***Fleischwirtsch., 74,*** 170 (1994).

Tiller, J.W., Maguire, K.P., Davies, B.M., Tyramine pressor response with moclobemida, a reversible monoamino oxidase inhibitor. ***Psychiatry Res., 22,*** 213 (1986).

Tricard, C., Cazabeil, J.M., Dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC. ***Feuillet Vert OIV, nº 950*** (1990).

Tricker, A.R., Preussmann, R., Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: ocurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. ***Mutation Research, 259,*** 277 (1991a).

Tricker, A.R., Preussmann, R., Mean daily intake of volatile N-nitrosamines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. ***Food Chem. Toxicol, 29,*** 729 (1991b).

Vasquez-Lasa, M.B., Iñiguez-Crespo, M., González-Larraina, M., González-Guerrero, A, Biogenic amines in Rioja wines. ***Am. J. Enol. Vitic., 49,*** 229 (1998).

Vaughan, T.R., The role of food in the pathogenesis of migraine headache. ***Clin. Rev. Allergy, 12,*** 167 (1994).

Vechio, A., Finoli, C., Cerutti, G., Möller, F., Ammine biogene in vini italiani, ***Vignevini, 16,*** 57 (1989).

Velisek, J., Davidek, J., Formation of aliphatic amines by oxidation of some brown pigments. ***Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 154,*** 157 (1974) *(citado por Smith 1980-81).*

Vidal-Carou, Ambatlle-Espunyes, A., Ulla-Ulla, M.C., Mariné-Font, A., Histamine and tyramine in spanish wines: their formation during the winemaking process, ***Am. J. Enol. Vitic., 41,*** 160 (1990a).

Vidal-Carou, M.C., Codony-Salcedo, R., Mariné-Font, A., Histamine and tyramine in spanish wines: relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. ***Food Chem., 35,*** 217 (1990b).

Vidal-Carou, M.C., Codony-Salcedo, R., Mariné-Font, A., Changes in the concentration of histamine and tyramine during wine spoilage at various temperatures. ***Am. J. Enol. Vitic., 42,*** 145 (1991).

Vidal-Carou, M.C., Isla-Gavin, M.J., Mariné-Font, A., Codony-Salcedo, R., Histamine and tyramine in natural sparkling wine, Vermouth, cider and vinegar. ***J. Food Composit. Analysis, 2,*** 219 (1989).

Voigt, M.N., Eitenmiller, R.R., Production of tyrosine and histidne decarboxylase by dairy-related bacteria. ***J. Food Prot., 40,*** 241 (1977).

Wantke, F., Götz, M., Jarisch, R., The wine test: a simple method to verify intolerance to histamine as a model of food intolerance. ***Allergologie, 15,*** 55 (1992).

Wantke, F., Götz, M., Jarisch, R., Histamine-free diet: treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronical headaches. ***Clinical Experim. Allergy, 23,*** 982 (1993).

Wantke, F., Götz, M., Jarisch, R., The red wine provocation test: intolerance to histamine as a model for food intolerance. ***Allergy Proc., 15,*** 27 (1994).

Wantke, F., Hemmer, W., Haglmüller, T., Götz, M., Jarisch, R., Histamine in wine. ***Int. Arch. Allergy Immunology, 110,*** 397 (1996).

Wantke, F., Hemmer, W., Focke, M., Haglmüller, T., Götz, M., Jarisch, R., The red wine maximization test: drinking histamine rich wine induces a transient increase in plasma diamine oxidase activity in healthy volunteers. ***Inflamm. Res., 48,*** 169 (1999).

Weiller, H.S., Radler, F., On the metabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from wine. ***Z. Lebensm. Unters-Forsch., 161,*** 259 (1976).

Weiss, S., Robb, G.P., Ellis, L.B., The systemic effects of histamine in man. ***Arch. Int. Med., 49,*** 360 (1932) *(citado por Taylor, 1986).*

Woidich, H., Pfannhauser, W., Blaicher, G., Pechanek, U., Beitrag zur Untersuchung von biogenen aminen in rot und weißweinen. ***Mitt. Klosterneuburg, 30,*** 27 (1980) *(citado por Radler e Fäth, 1992).*

Woller, R., Kobelt, S., Biogene amine im wein. Vorkommen und bedeutung. ***Proceedings of the 9th Intern. Oenol. Symp.,*** Cascais, 493 (1990) *(citado por Radler e Fäth, 1991).*

Yamauchi, K., Sekizawa, K., Suzuki, H., Nakazawa, H., Ohkawara, Y., Katayose, D., Ohtsu, H., Tamura, G., Shibahara, S., Takemura, M., Maeyama, K., Watanabe, T., Sasaki, H., Shirato, K., Takishima, T., Structure and function of human histamine N-methyltransferase: critical enzyme in histamine metabolism in airways. ***Am. J. Physiol., 267,*** L342 (1994).

Young, E., Stoneham, M.D., Petruckevitch, A. Barton, J., Rona, R., ***Lancet, 343,*** 1127 (1994).

Zappavigna, R., Brambati, E., Cerutti, G., Ricerca e determinazioni delle amine non volati in vini, succhi, birra e aceto. ***Riv. Viticolt. Enol., 27,*** 285 (1974).

Zappia, V., Pegg, A.E., In: ***Progress in Polyamine Research. Novel Biochemical, Pharmacological, and Clinical Aspects,*** (editado por V. Zappia e A.E. Pegg — Plenum Press, N. York, London), Preface - p. VI (1988).

Zee, J.A., Simard, R.E., L'Heureux, L., Tremblay, J., Biogenic amines in wines. ***Am. J. Enol. Vitic., 34,*** 6 (1983).

Zhang, M.H., Wang, H.C., Tracey, K.J., Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. ***Critical Care Medicine, 28,*** 60 (2000).

CAPÍTULO 2

METODOLOGIAS ANALÍTICAS USADAS NA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM VINHOS E MOSTOS

2.1. Introdução

2.2. Processos de extracção/purificação
- 2.2.1. Extracção líquido/líquido
- 2.2.2. Extracção em fase sólida
- 2.2.3. Outros processos de extracção/purificação

2.3. Métodos fluorimétricos

2.4. Métodos cromatográficos
- 2.4.1. Cromatografia em camada fina (TLC)
- 2.4.2. Cromatografia de troca-Iónica. Uso de auto-analisadores
- 2.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
  - 2.4.3.1. Agentes derivatizantes
    - 2.4.3.1.1. Ortoftaldialdeído (OPA)
    - 2.4.3.1.2. Cloretos de sulfonilo
    - 2.4.3.1.3. Cloretos de carbonilo (cloroformatos)
    - 2.4.3.1.4. Fluorescamina
    - 2.4.3.1.5. Outros agentes derivatizantes
  - 2.4.3.2. Agentes de par-iónico
- 2.4.4. Cromatografia gasosa

2.5. Outras técnicas analíticas

Bibliografia

2.1. Introdução

A determinação analítica de aminas biogénicas tem constituído, ao longo dos anos, um desafio mobilizador para um grande número de químicos analistas das mais variadas áreas. As causas para essa mobilização radicam, naturalmente, na importância do papel desempenhado por este tipo de compostos nos mais variados processos fisiológicos e patofisiológicos que ocorrem em animais e plantas, como salientado no capítulo anterior. Daí a necessidade de haver metodologias analíticas prontas a responder às inúmeras solicitações que o estudo desses processos implica.

Independentemente do tipo de matriz, a quantificação correcta de aminas biogénicas é, em qualquer caso, uma operação analítica que apresenta um acentuado grau de dificuldade, devido a dois factores fundamentais: por um lado, o acentuado carácter polar dos compostos, que dificulta a sua extracção de matrizes aquosas com bom rendimento e livres de compostos interferentes e, além disso, é fonte de numerosos problemas quando se pretende a sua separação cromatográfica; por outro lado, a ausência de propriedades intrínsecas dos compostos que possibilitem a sua detecção directamente por métodos físico-químicos de aplicação corrente, como, p. ex., métodos espectrofotométricos, métodos fluorimétricos ou métodos electroquímicos.

O problema agrava-se, naturalmente, quando se trata de analisar matrizes muito complexas em que os compostos se encontram presentes em níveis de concentração muito reduzidos, como é o caso dos alimentos, em geral, e dos vinhos, em particular. Assim, facilmente se compreende que seja bastante largo o leque de metodologias analíticas propostas para a sua determinação e que, apesar disso, novas metodologias sejam continuamente desenvolvidas com o objectivo de se atingir níveis cada vez mais elevados na dupla vertente qualidade dos resultados versus facilidade e rapidez de execução.

Nas décadas de 50 e 60, quando a presença das aminas biogénicas em alimentos começou a ser alvo do interesse da comunidade científica, os métodos analíticos disponíveis eram sobretudo métodos biológicos, pouco fiáveis para a sua aplicação a este tipo de matrizes e praticamente restritos à determinação de histamina [Quevauviller e Mazière, 1969]. O mais divulgado correspondia ao ensaio "in vitro" proposto por Roberts e Adam [1950], baseado na acção contractante da histamina sobre o íleo de cobaio, ainda hoje usado nalguns laboratórios [Rodrigues, 1998]. Como curiosidade, podemos referir que um dos primeiros trabalhos de determinação de histamina em vinhos foi realizado através de um ensaio "in vivo" baseado na variação da pressão arterial e da actividade respiratória provocada pelo composto em gatos que, para o efeito, eram anestesiados com uma mistura de cloral e uretano e mantidos a uma temperatura constante [Marquardt e Werringloer, 1965].

A pouca eficácia dos métodos biológicos levou, rapidamente, à adopção de processos analíticos baseados na formação de derivados fluorescentes. Processos deste tipo foram usados para a determinação, individualizada, da histamina e da tiramina, sendo alguns deles, ainda hoje, de uso generalizado, como será referido mais adiante. Porém, a falta de especificidade muitas vezes revelada por este tipo de métodos associada à relevância cada vez maior assumida por outras aminas biogénicas, também presentes nos alimentos, levou os diversos autores a convergir nas vantagens de proceder à determinação simultânea de várias aminas, sendo para isso necessária a adopção de processos separativos adequados. A cromatografia, que nas décadas de 60 e 70 teve um desenvolvimento exponencial, surgiu assim, naturalmente, como técnica separativa de eleição. Inicialmente, através do uso das técnicas de cromatografia em placa e em papel; em seguida, pela adopção de processos de cromatografia de troca-iónica, muito divulgados pelo seu uso na análise de aminoácidos; finalmente, a partir dos anos 80, com a utilização das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e de cromatografia gasosa.

Actualmente, os métodos baseados na técnica de HPLC são os mais popularizados entre os diversos autores para a determinação de aminas biogénicas nos vinhos. A detecção e quantificação dos compostos é feita, na maior parte dos casos, pela medição da intensidade fluorescente de derivados adequadamente preparados, embora também esteja descrito o uso de detectores de UV e de detectores electroquímicos. As poucas propostas alternativas passam essencialmente pelo uso de técnicas de electroforese capilar e de cromatografia gasosa, neste último caso com uma expressão bastante diminuta relativamente ao que se verifica noutras áreas analíticas, nas quais assume muitas vezes o papel de técnica de eleição.

Não obstante a capacidade de separação característica dos métodos cromatográficos, a obtenção de bons resultados analíticos implica, muitas vezes, um processo prévio de extracção/purificação dos compostos a analisar, capaz de promover a remoção de interferências e a concentração das aminas presentes na amostra. Atendendo à importância e diversidade das propostas existentes nesta área, optámos por fazer inicialmente uma breve abordagem das mesmas, sendo o assunto complementado ao longo deste capítulo, nos casos em que tal nos pareceu relevante, a par com a descrição e a leitura crítica das metodologias analíticas propostas pelos diversos autores.

2.2. Processos de extracção/purificação

A etapa de extracção/purificação dos compostos a analisar pode ser considerada como crítica para a qualidade dos resultados obtidos, como é sublinhado por vários autores [Arce *et al.*, 1998; Busto *et al.*, 1994; Gennaro *et al.*, 1996]. Muitos dos resultados publicados acerca dos teores de aminas biogénicas em produtos fermentados podem mesmo ser postos em questão, devido a erros posteriormente detectados no "desenho" do processo extractivo [Moret e Conte, 1996].

As principais dificuldades do processo extractivo são resultam de factores tão diversos como a) a extrema complexidade da matriz, b) a acentuada polaridade dos compostos, de que resulta uma maior solubilidade em água do que na maioria dos solventes orgânicos geralmente usados, c) os baixos teores em que se encontram habitualmente presentes, d) a coexistência, geralmente em quantidades muito superiores, de diversos aminoácidos, alguns dos quais se apresentam como interferentes nos processos de determinação propriamente ditos, dada a existência de algumas

similitudes estruturais, e) finalmente, a necessidade de se extraírem moléculas estruturalmente muito diferentes (histamina, putrescina e tiramina, p. ex.).

Fundamentalmente, dois tipos diferentes de processos extractivos são geralmente usados: extracção líquido/líquido com um solvente ou uma mistura de solventes apropriados, imiscíveis com a água; extracção em fase sólida, fazendo uso de colunas cromatográficas preparadas no laboratório cheias com um adsorvente apropriado ou, como mais recentemente se tem tornado vulgar, de cartuchas de extracção comercializadas já com o respectivo enchimento (adiante designadas por colunas de SPE*).

2.2.1. Extracção líquido/líquido

A extracção líquido/líquido constitui o processo mais clássico e divulgado de extracção/purificação de compostos orgânicos presentes em matrizes complexas. Baseia-se, como é sabido, na mistura, seguida de agitação, da amostra ou da solução que contém a amostra com um solvente ou uma mistura de solventes imiscível com a mesma no qual o(s) composto(s) de interesse sejam mais solúveis.

Tratando-se as aminas biogénicas de compostos básicos, em maior ou menor grau, a sua extracção de uma matriz aquosa como o vinho pode ser feita por modulação desse seu carácter básico. Assim, a pH alcalino (acima do respectivo pKa), este tipo de compostos existe maioritariamente na sua forma livre, não protonada, podendo ser extraídos por um solvente orgânico imiscível com a água, o que promove a sua separação de compostos com características ácidas, e, em seguida, reextraídos da fase orgânica com uma solução aquosa ácida, promovendo assim a sua separação de compostos neutros [Blau, 1989].

Processos deste tipo foram usados por Almy *et al.* [1983] e por Vidal-Carou *et al.* [1989a], no primeiro caso tendo em vista a análise simultânea de diversas aminas voláteis por cromatografia gasosa, no segundo caso antecedendo a determinação isolada da histamina por um método fluorimétrico. Ambos os autores usaram butanol para a extracção das aminas a partir da amostra previamente alcalinizada e, em seguida, usaram HCl (1 M e 0,1 M, respectivamente) para a

* Iniciais da designação anglo-saxónica "solid-phase extraction"

reextracção dos compostos. Também incluída neste tipo de processos pode considerar-se a proposta de Rivas *et al.* [1979], que, como etapa prévia à determinação da tiramina por um processo fluorimétrico, alcalinizaram a amostra previamente concentrada, procederam à sua homogeneização com areia fina e sulfato de sódio anidro, extraíram o composto com acetato de etilo e, em seguida, reextraíram-no da fase orgânica com HCl 0,2 M.

Processos simples de extracção líquido/líquido, com uma só etapa, podem também ser usados. Neste caso, a amostra, previamente saturada com um sal e alcalinizada, é sujeita à acção extractiva de um solvente orgânico apropriado — regra geral o butanol ou uma mistura de butanol com outro solvente orgânico — a que se segue a evaporação, total ou parcial, do mesmo. Um processo extractivo deste tipo é suficiente para a obtenção de extractos com teores de aminoácidos muito diminuídos, o que é importante visto estes constituírem habitualmente os principais interferentes nos processos de detecção usados.

Embora bastante usado na determinação de aminas biogénicas noutras matrizes alimentares [Moret *et al.*, 1992], o uso deste tipo de processos em vinhos tem sido reduzido. Merecem referência os trabalhos de Cerutti [1975], que propôs a saturação do meio com uma mistura de fosfato de potássio e de sulfato de sódio anidro e a extracção das aminas com butanol, e de Tricard e Sudraud [1982a,b,c] que usaram carbonato de sódio para a saturação do meio e butanol para a extracção. Em ambos os casos, a alcalinização da amostra foi feita pela adição de uma solução concentrada de NaOH, não tendo havido grande cuidado quanto à verificação do pH final da amostra. Este facto pode estar na origem de graves erros no que respeita ao rendimento do processo para algumas aminas, como demonstraram Moret e Conte [1996] que concluíram que a fixação do pH a 11,5 constitui uma boa solução de compromisso; a valores de pH superiores, dá-se uma redução drástica do rendimento do processo para a tiramina, que atinge um mínimo a pH 12,5-13,0, onde o rendimento chega a ser cinco vezes inferior; a valores de pH inferiores, da ordem dos 9,5-10,0, o rendimento é óptimo para a tiramina mas manifestamente reduzido para outras aminas como a histamina, a putrescina, a cadaverina, a espermina e a espermidina. Estes autores sugerem também a saturação da amostra com um sal que não influencie o pH, como o cloreto de sódio, em detrimento do carbonato de sódio, geralmente usado. Recentemente, Arlorio *et al.* [1999] verificaram grandes diferenças no rendimento da extracção com butanol a pH alcalino (10, 11 e 12) entre soluções padrão hidroalcoólicas e amostras de vinho e de cerveja, mostrando-se o processo negativamente influenciado pelos interferentes presentes nas amostras. Os autores acabaram por escolher a

extracção a pH 10 como a melhor opção para a determinação de 2-feniletilamina enquanto para a histamina e a tiramina optaram por um processo de extracção em fase sólida.

Para além do butanol, outros solventes têm sido propostos para a extracção das aminas. Etter *et al.* [1991] usaram uma mistura de acetonitrilo e ácido perclórico 0,2 N (1:1). Mayer e Pause [1973a] usaram um processo de dupla extracção da amostra alcalinizada, inicialmente com éter etílico e depois com butanol enquanto que o diclorometano foi usado por Addeo e Malorni [1974], numa primeira etapa para extrair da amostra acidificada substâncias de carácter ácido, que eram eliminadas e, numa segunda etapa, para extrair da amostra, agora alcalinizada, as aminas biogénicas.

Alguns autores propõem o uso de processos de extracção pós-derivatização, neste caso não das aminas propriamente ditas mas dos respectivos derivados. Essa prática, como veremos adiante, é mesmo generalizada quando há necessidade em proceder à eliminação do excesso de reagente derivatizante usado, devido à interferência deste na detecção dos compostos. Outros autores propõem um processo extractivo desse tipo com o intuito de eliminar outros compostos derivatizados, como os aminoácidos, de forma a melhorar os resultados obtidos na etapa de separação cromatográfica que muitas vezes se segue. Uma abordagem mais detalhada será feita, caso a caso, quando nos referirmos ao uso dos diversos agentes derivatizantes.

2.2.2. Extracção em fase sólida

A extracção em fase sólida pode ser definida como um processo de extracção/purificação em que a retenção dos compostos ocorre sobre um suporte sólido, geralmente contido no interior de uma coluna, e a eluição se faz por intermédio de um ou mais solventes que atravessam esse suporte.

Processos deste tipo são usados há muito tempo como etapa prévia para a determinação dos mais variados tipos de compostos em amostras complexas. Durante muito tempo foi normal o uso de colunas preparadas no laboratório com enchimentos possuindo propriedades adsorventes dos mais diversos tipos (polares, apolares, de troca catiónica, de troca aniónica, etc.). Esses processos exigiam o uso de grandes quantidades tanto de amostra como de eluentes e eram, regra geral, muito demorados pois a eluição dos compostos era conseguida simplesmente à custa da força gravitacional exercida sobre os eluentes colocados no topo da coluna. Hoje em dia é normal o uso de pequenas colunas

comercialmente disponíveis (colunas de SPE), com uma vasta gama de diferentes enchimentos, as quais, pela sua grande área específica, permitem a utilização de reduzidas quantidades de amostras e de eluentes. O acoplamento de sistemas de vácuo permite, por outro lado, ritmos de trabalho muito mais elevados.

O facto de as aminas biogénicas possuírem uma função básica sempre funcionou como um convite directo para o uso de processos extractivos deste tipo, baseados na acção de resinas ácidas com propriedades de troca de catiões [Nelson *et al.*, 1979]. De entre estas, porém, sempre se considerou ser de evitar o uso das resinas com maior poder de troca catiónica, que são aquelas que têm uma função sulfónica como suporte; com estas resinas, a posterior eluição das aminas mais polares, particularmente as que possuem mais do que uma função aminada, pode tornar-se extremamente difícil de conseguir com bom rendimento, como sublinharam diversos autores [Blau, 1989; Jandera *et al.*, 1994].

Durante muito tempo foi assim comum o uso de colunas preparadas no laboratório, com enchimentos do tipo "Amberlite CG 50", que correspondem a resinas com um suporte do tipo ácido carboxílico, logo com menor poder de troca catiónica. O seu uso foi proposto por diversos autores para a extracção/purificação das amostras tendo em vista a determinação de histamina por métodos fluorimétricos e a determinação simultânea de várias aminas por métodos cromatográficos. Como foi referido atrás, o uso dessas colunas implicava a necessidade de quantidades significativas de amostra, da ordem de algumas dezenas de mililitros, e o processo era bastante demorado. A eluição era normalmente conseguida por intermédio de soluções fortemente ácidas. Com este tipo de resinas, o uso dessas soluções ácidas conduz, inevitavelmente, a consideráveis perdas de algumas das aminas habitualmente estudadas [Busto *et al.*, 1995a].

Mais recentemente, tem-se assistido à introdução gradual nas metodologias propostas das modernas colunas de SPE, acima referidas. Curiosamente, e ao contrário do que era recomendado para as antigas colunas preparadas no laboratório, são as colunas com enchimento do tipo sulfónico (SCX) as mais usadas, podendo a eluição ser feita com uma mistura de metanol e de uma solução aquosa, tamponada a pH neutro ou ligeiramente ácido, saturada com NaCl [Pfeiffer, 1996; Pfeiffer e Radler, 1992].

Numa série de trabalhos dedicados a este tema, Busto e colaboradores concluíram que as melhores condições para a eluição das aminas neste tipo de colunas (SCX) passavam pelo uso como

eluente de uma mistura de solução aquosa de borato de sódio 0,075 M e de metanol (50:50), com a qual conseguiram obter rendimentos superiores a 75 % para as oito aminas estudadas [Busto *et al.*, 1997a]. Com o uso de uma solução de HCl 1 M em metanol a 95 %, os mesmos autores tinham registado em trabalho anterior um rendimento de 35 % para a putrescina e inferior a 10 % para a cadaverina [Busto *et al.*, 1995a].

Os mesmos autores também concluíram ser desaconselhável o uso de colunas de SPE com enchimentos de C_{18}, anteriormente usadas por Subden *et al.* [1978] para a remoção de polifenóis e de interferentes de carácter pouco polar. Essa conclusão deve-se ao facto de as referidas colunas só permitirem a obtenção de resultados satisfatórios quando condicionadas, em condições de pH rigorosamente definidas, com um reagente de par-iónico como o octanosulfonato de sódio, o que torna o processo muito demorado [Busto *et al.* 1995b]. Além disso, obrigam à remoção prévia dos polifenóis existentes na amostra, pois estes bloqueiam o respectivo enchimento, especialmente quando se trata de vinhos tintos, mais ricos neste tipo de compostos [Busto *et al.* 1994]. Neste último trabalho, os autores usaram as colunas com enchimento de C_{18} para a extracção não das aminas em estudo mas dos respectivos derivados dansilados, uma vez formados. O mesmo grupo já tinha proposto, em trabalho anterior, o uso de uma coluna de troca aniónica (Bond-Elut SAX) para a purificação do meio reaccional obtido após a derivatização da amostra com fenilisotiocianato, tendo em vista a determinação de histamina [Callul *et al.*, 1991]; dessa forma era possível a separação do derivado de histamina, que não era retido, ao contrário dos derivados formados a partir de aminoácidos, que eram retidos em virtude de possuírem o grupo carboxílico intacto. Como veremos adiante, uma extracção deste tipo é impraticável quando se usa OPA como agente derivatizante, face à pouca estabilidade dos respectivos derivados [Busto *et al.* 1996a].

2.2.3. Outros processos de extracção/purificação

Isoladamente ou em conjunto com um dos processos extractivos atrás referidos, podem usar-se outros processos de pré-tratamento da amostra, como uma simples filtração ou ultrafiltração da amostra ou um tratamento com um adsorvente sólido, regra geral a polivinilpirrolidona, capaz de reter compostos de natureza polifenólica, seguido de filtração. Embora não seja muito usual na análise de aminas biogénicas em vinhos, por vezes as amostras são objecto de um tratamento prévio

com agentes capazes de promover a destruição da estrutura proteica da matriz, como o ácido perclórico ou o ácido tricloroacético, também seguido de filtração. Este tipo de processos é comum em métodos dedicados prioritariamente à análise de aminas biogénicas em matrizes alimentares proteicas, como queijos, carnes, peixes, etc. [Joosten e Olieman, 1986]. Petridis e Steinhart [1995] propuseram o tratamento com ácido tricloroacético a 10 % seguido de uma purificação do extracto obtido por passagem por uma coluna de troca catiónica. A prévia destilação da amostra também foi usada para a determinação de aminas voláteis por cromatografia gasosa, como será referido com maior detalhe mais adiante.

Recentemente, algumas das metodologias por HPLC propostas para a análise de aminas biogénicas em vinhos não incluem nenhum processo prévio de extracção/purificação dos compostos (excepto a simples filtração da amostra). Esta opção é muito generalizada nos processos automatizados que usam ortoftaldialdeído como agente derivatizante, permitindo encurtar o tempo de análise e evitar os erros que sempre se associam aos processos de extracção quando se trata de análises quantitativas.

Contudo, e não obstante os grandes desenvolvimentos verificados nos últimos anos ao nível da capacidade de separação das colunas cromatográficas e a grande selectividade proporcionada pelos detectores fluorimétricos, esse tipo de metodologias raramente permite uma boa separação de todos os compostos de interesse, levando a sérias dificuldades na quantificação de muitos deles, como é sublinhado por alguns autores [Busto *et al.*, 1994, 1995b].

2.3. Métodos fluorimétricos

Os métodos fluorimétricos simples são usados principalmente para a determinação de histamina. O ortoftaldialdeído (OPA) constitui o reagente derivatizante habitualmente utilizado neste tipo de análise.

O processo de detecção fluorimétrica da histamina após reacção com o OPA foi originalmente desenvolvido por Shore *et al.* [1959], tendo revolucionado a análise de histamina em amostras biológicas [Taylor, 1986]. A reacção tem lugar em meio alcalino, quase instantaneamente, e

dá lugar à formação, com elevado rendimento, de um produto de condensação altamente fluorescente (λ Exc.: 360 nm; λ Em.: 440 nm), de acordo com o esquema da Figura 4.1.

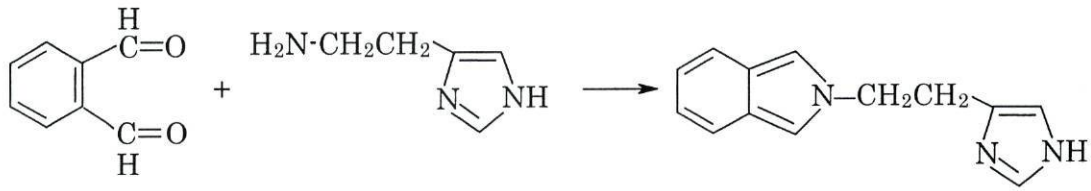


Figura 4.1. Reacção de derivatização da histamina por acção do ortofataldialdeído (OPA).

O processo foi usado por diversos autores na determinação do teor de histamina em vinhos, dos quais poderemos destacar pelo seu pioneirismo os trabalhos de Saint-Blanquat e Derache [1968], Ough [1971], Plumas e Sautier [1972] e Lafon-Lafourcade [1974, 1975]. A reacção com o OPA, porém, não é totalmente específica para a histamina, havendo outros compostos presentes no vinho que igualmente dão origem a derivados fluorescentes, embora com menor intensidade; é o caso de dois aminoácidos, a histidina e a cisteína, e também das poliaminas espermina e espermidina [Shore, 1971]. O maior obstáculo é constituído pela presença de histidina; Taylor e Lieber [1977] verificaram que este aminoácido quando presente numa concentração cem vezes superior à concentração de histamina (o que é comum no caso dos vinhos) tem uma intensidade fluorescente cerca de cinco vezes superior, o que, obviamente, anula a possibilidade de obtenção de resultados analíticos minimamente válidos.

Por esse motivo, é indispensável a aplicação prévia de um processo de extracção/purificação da amostra, capaz de promover a separação dos dois compostos: histamina e histidina. Inicialmente, foi proposto o uso de colunas de troca catiónica, do tipo "Amberlite CG 50" na forma sódica, capazes de reter a histamina e não a histidina, quando condicionadas a pH 7, sendo a eluição da histamina feita com HCl 3 M [Saint-Blanquat e Derache, 1968; Plumas e Sautier, 1972; Lafon-Lafourcade, 1974, 1975]. Ough [1971], usando um sistema idêntico, verificou, porém, que a separação dos dois compostos não era totalmente conseguida, tendo proposto uma etapa adicional

para a purificação da solução obtida após a eluição, que consistia na passagem por uma outra coluna, neste caso de troca aniónica, capaz de reter a histidina a pH alcalino devido à presença do grupo carboxílico.

Processos de extracção líquido/líquido também podem ser usados, como proposto por Tricard [1983] e por Vidal-Carou *et al.* [1989a] que usaram com sucesso um processo, já anteriormente referido, de extracção da histamina com butanol em meio alcalino saturado com carbonato de sódio seguido da sua reextracção com HCl, antes da derivatização com o OPA. Em ambos os casos, contudo, os autores apenas conseguiram bons resultados usando o método das adições, o que implica a necessidade de várias determinações da mesma amostra, adicionada de quantidades crescentes do composto, para a obtenção do respectivo teor. O problema, contudo, não residiu na presença de histidina, que se verificou não interferir nos resultados obtidos mesmo quando presente na amostra num teor mais de cem vezes superior ao teor de histamina, mas antes no facto de a matriz possuir interferentes não identificados capazes de diminuir as características de fluorescência do derivado de histamina [Vidal-Carou *et al.*, 1989a]. Estes autores verificaram, além disso, que a estabilidade do referido derivado era reduzida (cerca de 30 minutos), o que está de acordo com referências de outros autores, como veremos mais adiante, ao referirmos o uso do OPA em processos de cromatografia liquída.

Uma metodologia mista, baseada numa extracção das amostras com uma solução de metanol a 75 %, seguida da purificação do extracto através da passagem por uma coluna de troca aniónica, capaz de reter a histidina, foi proposta por Staruszkiewicz *et al.* [1977a] e alvo de um ensaio interlaboratorial, com bons resultados [Staruszkiewicz *et al.*, 1977b]. Constitui, desde então, o método oficial nos Estados Unidos para a determinação da histamina em produtos alimentares [AOAC, 1990].

Além da histamina, também a tiramina foi determinada por um método fluorimétrico, segundo proposta inicial de Rivas-Gonzalo *et al.* [1979], posteriormente usada em diversos trabalhos do mesmo grupo [Rivas-Gonzalo *et al.*, 1983; Vidal-Carou *et al.*, 1989b, 1990a, 1990b, 1991]. O reagente derivatizante foi o α-nitroso-β-naftol que reage com a tiramina (60 °C; 1 hora) com formação de um complexo fluorescente (λ Exc.: 465 nm; λ Em.: 545 nm). De uma série de aminas e de aminoácidos testados como potenciais interferentes, apenas a tirosina mostrou capacidade de formar um composto fluorescente com o reagente usado, sendo a sua completa separação conseguida por meio de um processo extractivo em duas etapas, já atrás referido.

2.4. Métodos cromatográficos

2.4.1. Cromatografia em camada fina (TLC)

Durante as décadas de 60 e 70 desenvolveram-se numerosos métodos para a análise de histamina e de outras aminas biogénicas baseados na técnica de cromatografia em camada fina [Taylor, 1986]. Genericamente, pode dizer-se que esses métodos incluíam uma etapa prévia de extracção dos compostos, a separação das aminas em placas de gel de sílica ou de outra fase estacionária de carácter polar, o uso de sistemas mono ou bidimensionais de eluição e, finalmente, a revelação dos compostos por aplicação de uma mistura reveladora, constituindo a ninidrina o agente mais usado pela sua capacidade de tornar coradas as manchas correspondentes às aminas em estudo.

Com as adaptações necessárias, tendo em conta a especificidade da matriz, alguns destes métodos foram usados intensivamente na determinação semi-quantitativa de aminas biogénicas em vinhos, em especial da histamina, que era a amina que despertava maior interesse.

A 1ª referência ao uso da cromatografia em camada fina em vinhos surge no trabalho de Marquardt e Werringloer [1965], já anteriormente citado a propósito do uso de métodos biológicos para a determinação da histamina. Como alternativa a esse tipo de processos, os autores desenvolveram um método que consistia na extracção do composto por passagem da amostra através de uma coluna de troca catiónica (Permutit-Folin), separação em placa de gel de sílica com um sistema bidimensional de eluição [mistura de propanol-amónia a 37 % (67:33) seguida de mistura propanol-água (64:36)] e revelação por ninidrina.

Desenvolvimentos deste método foram feitos posteriormente por Pupputi e Suomalainen [1969], que usaram celulose como fase estacionária, e por e Pause [1973b] que, usando o mesmo sistema cromatográfico, antecedido por um processo extractivo com éter etílico e butanol, conseguiram fazer a determinação semi-quantitativa de 9 aminas, não incluíndo contudo a histamina por não ser extraída com o sistema de solventes usado. Zappavigna *et al.* [1974], Cerutti [1975] e Tricard e Sudraud [1982a,b,c] realçaram as vantagens do uso como revelador do "reagente de Pauly" (ácido sulfanílico diazotado) para a determinação da histamina, mantendo a ninidrina como revelador de eleição para as restantes aminas. A extracção das aminas com n-butanol em meio alcalino seguida da sua separação com gel de sílica e um sistema monodimensional de eluentes permitiu aos últimos

autores a determinação em vinhos de 5 aminas (histamina, tiramina, etanolamina, 2-feniletilamina e putrescina).

A separação por cromatografia em camada fina das aminas previamente derivatizadas com cloreto de dansilo foi proposta por Addeo e Malorni [1974]. Usando uma lampâda de UV a 366 nm para a revelação das placas de gel de sílica usadas para a separação, aqueles autores conseguiram identificar a presença em vinhos de etilamina, butilamina, amilamina, 2-feniletilamina e pirrolidina (provavelmente de forma errada no caso da butilamina e da amilamina, cuja presença nos vinhos é insignificante segundo a generalidade dos autores).

Todos estes métodos caracterizavam-se por serem muito morosos e permitirem apenas a determinação semi-quantitativa dos compostos. Cerutti [1975], p. ex., refere tempos de eluição de 6 e 8 horas para a análise bidimensional em placas de celulose e de gel de sílica, respectivamente.

O desenvolvimento entretanto verificado na qualidade das placas cromatográficas comercializadas foi aproveitado, entre outros, pelo grupo de Cerutti e colaboradores. Estes autores desenvolveram um método de cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC) baseado na extracção das aminas por acção de uma resina de troca catiónica, separação em placa de celulose por acção de uma mistura eluente contendo butanol, ácido acético, água e piridina (15:3:5:2) e revelação com ninidrina [Cerutti *et al.*, 1986]. O método permitiu a análise quantitativa de 5 aminas (histamina, tiramina, 2-feniletilamina, putrescina e cadaverina) com um limite de quantificação de 0,2 mg/L, tendo sido posteriormente aplicado em vários trabalhos do mesmo grupo [Cerutti *et al.*, 1987, 1991; Vechio *et al.*, 1989].

A proposta mais recente neste campo foi a de Sherma *et al.* [1991], que propuseram um método simples e rápido para a determinação de histamina por HPTLC. Porém, o limite de quantificação obtido — 20 mg/L — é demasiado elevado para permitir o seu uso corrente.

2.4.2. Cromatografia de troca-Iónica. Uso de auto-analisadores

As primeiras aplicações de sistemas de cromatografia líquida associados a detectores espectrofotométricos corresponderam ao uso dos aparelhos automatizados, habitualmente designados por auto-analisadores, usados para a análise de aminoácidos, de acordo com a proposta

original de Vandekerckhove e Henderickx [1973]. Nesse tipo de sistemas a separação cromatográfica é conseguida pelo uso de colunas de troca iónica, normalmente termostatizadas a temperaturas da ordem dos 65 °C; como fase móvel são usadas, sucessivamente, diversas soluções aquosas, tamponadas a diferentes valores de pH. No final da separação cromatográfica, os compostos são sujeitos a um processo de derivatização pós-coluna com ninidrina (mantida num banho termostatizado a 80-85 °C) e detectados colorimetricamente a 570 nm.

A primeira adaptação de um sistema deste tipo para a análise de aminas em vinhos foi feita por Mack [1973] que o usou para a determinação de histamina em amostras previamente purificadas por meio de uma coluna de troca catiónica. A metodologia foi mais tarde desenvolvida por Woidich *et al.* [1980], que fizeram a determinação simultânea de histamina, tiramina, 2-feniletilamina, putrescina, cadaverina e espermina, e por Zee *et al.* [1981], que determinaram histamina, tiramina, putrescina, cadaverina e agmatina, tendo em ambos os casos sido dispensada a etapa prévia de purificação.

O uso deste tipo de sistema, embora constituindo um enorme avanço para a época, apresentava bastantes limitações, essencialmente na deficiente separação de algumas das aminas biogénicas em relação a substâncias interferentes presentes nas amostras e no facto de a análise ser extremamente demorada; em regra, cada cromatograma demorava entre 120 e 150 minutos, de forma a permitir a prévia eluição dos aminoácidos, e a isso juntava-se um processo de regeneração da resina usada como fase estacionária, que demorava mais 150 minutos.

Os últimos desenvolvimentos no uso dos auto-analisadores foram feitos por Sayem-El-Daher *et al.* [1983] — que usando um gradiente de tampões de pH 5,6 a pH 12,7, conseguiram a separação de 14 aminas em amostras de carnes, de queijos e de vinhos — por Pfeiffer *et al.* [1986] — que conseguiram melhorar a qualidade dos resultados obtidos pelo grupo de Zee, usando um gradiente de temperatura de 62,5 °C até 79,5 °C — e por Mueller-Seitz e Reimerdes [1988] — que conseguiram reduzir o limite de detecção para a maioria das aminas numa magnitude de cerca de dez vezes (de valores da ordem de 1 mg/L habitualmente referidos para valores da ordem de 0,1 mg/L), fazendo uma pré-concentração das amostras, sob vácuo, e usando um sistema de tampões citrato para a eluição.

O desenvolvimento dos modernos sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), entretanto verificado, nomeadamente com novos sistemas de propulsão da fase móvel, colunas mais eficientes e detectores mais sensíveis acabou por destronar este tipo de metodologias, que passaram a ter um uso meramente residual.

2.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Como já referimos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) constitui actualmente a técnica de eleição para a determinação das aminas biogénicas nos vinhos e nas diversas matrizes alimentares. A técnica tem sido exaustivamente explorada pelos diferentes autores, nas suas diversas vertentes, pelo que não é de estranhar o elevado número de diferentes metodologias propostas. Ponto comum à quase totalidade dessas propostas é o recurso a reagentes derivatizantes, de forma a melhorar os níveis de separação obtidos e, fundamentalmente, de modo a possibilitar a detecção dos compostos com a sensibilidade necessária aos teores em que geralmente se encontram. Para além disso é grande a diversidade das metodologias desenvolvidas. Assim, estão referidos processos de derivatização pré-coluna, na-coluna e pós-coluna, aplicados directamente sobre a amostra ou após processos de extracção/purificação mais ou menos complexos, e fazendo uso de diferentes tipos de colunas cromatográficas e de fases móveis com uma composição bastante diversificada, incluindo o uso de agentes de par-iónico. Para a detecção dos derivados formados estão descritos diferentes tipos de detector, com predominância para o uso de detectores de fluorescência.

Tratando-se, na sua quase totalidade, de métodos baseados na acção de um reagente derivatizante, pareceu-nos que a melhor forma de fazer a sua classificação seria aquela que privilegia o reagente derivatizante utilizado, sendo nesta perspectiva que será feita, em seguida, a respectiva análise.

2.4.3.1. Agentes derivatizantes

Os agentes derivatizantes mais usados caracterizam-se pela sua capacidade de reagir com as aminas com formação de derivados fluorescentes. Dessa forma torna-se possível a obtenção de uma grande selectividade na análise acompanhada de níveis muito elevados de sensibilidade. Alguns dos derivados formados, contudo, são passíveis de ser detectados por espectrofotometria de UV/VIS ou por intermédio de detectores electroquímicos, o que é aproveitado por alguns autores. Existem diversas substâncias que podem ser usadas como reagentes derivatizantes, cada uma com características específicas. Iremos fazer referência às mais utilizadas.

2.4.3.1.1. Ortoftaldialdeído (OPA)

O ortoftaldialdeído (OPA) constitui o reagente mais usado neste tipo de análise. Trata-se de um composto que não apresenta propriedades fluorescentes intrínsecas, já referido anteriormente pela sua utilidade na determinação da histamina, com a qual reage dando origem a um derivado altamente fluorescente.

O grande impulso para o uso generalizado do OPA como agente fluorogénico foi dado pelo trabalho de Roth [1971] que demonstrou que na presença de um tiol com carácter nucleofílico (usualmente o mercaptoetanol) a formação de derivados fluorescentes era extensível à generalidade dos compostos que contêm funções aminas primárias, aminoácidos incluídos. Os produtos de condensação formados apresentam a estrutura de 1-alquiltio-2-alquilisoindóis, como se pode observar no esquema da Figura 4.2.

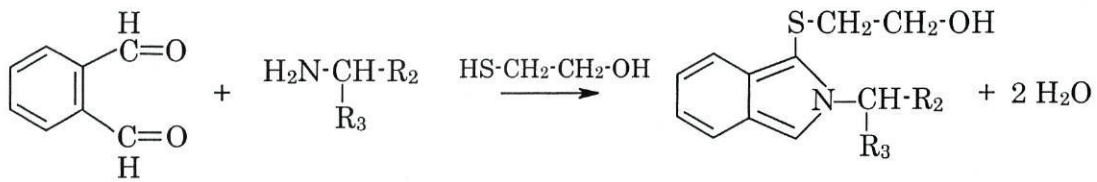


Figura 4.2. Reacção de derivatização de aminas primárias por acção do ortofataldialdeído (OPA) na presença de mercaptoetanol.

A reacção tem lugar a pH medianamente alcalino (9-11), usando-se habitualmente um tampão de boratos para a sua fixação. Se a concentração do agente derivatizante for 2 a 3 ordens de grandeza maior do que a do composto aminado, a reacção completa-se em 1-2 minutos à temperatura ambiente [Seiler, 1993].

O relativo êxito das primeiras experiências de separação por HPLC dos derivados formados a partir de aminas e de aminoácidos pela acção conjunta do OPA e do mercaptoetanol, levou a que o

seu uso depressa se popularizasse, devido à rapidez e simplicidade com que o processo de derivatização se realiza e também à intensa fluorescência apresentada pelos derivados obtidos, o que permite atingir níveis de sensibilidade apreciáveis.

No capítulo da análise de aminas biogénicas em vinhos, a primeira referência ao uso do par OPA/mercaptoetanol corresponde ao trabalho de Droz e Tanner [1983], que transpuseram para a análise de aminas biogénicas em vinhos a metodologia proposta por Umagat *et al.* [1982] para a determinação quantitativa de aminoácidos. Com ligeiras variações, o processo foi rapidamente adoptado por vários outros autores [Buteau *et al.*, 1984a; Cilliers e V. Wyk, 1985; Mayer e Pause, 1984; Ough *et al.*, 1987].

A maior contrariedade apresentada pelo uso do OPA reside no facto, desde cedo referido pela generalidade dos autores, de muitos dos derivados formados apresentarem uma reduzida estabilidade, com as naturais consequências que isso acarreta para a qualidade dos resultados obtidos. Essa instabilidade levou ao desenvolvimento de sistemas automatizados para a derivatização/injecção da amostra, que permitem a fixação com rigor do espaço de tempo que medeia entre a formação dos derivados e a sua introdução no sistema cromatográfico [Busto *et al.*, 1995a,b; Lehtonen *et al.*, 1992; Monteiro e Bertrand, 1994; Petridis e Steinhart, 1995]. Na ausência desse tipo de sistemas, a metodologia de trabalho apresenta, obviamente, um grande inconveniente, que consiste na impossibilidade de derivatizar em simultâneo uma série de amostras, sendo necessária a presença permanente do analista para ir procedendo à derivatização das amostras ao ritmo imposto pelo aparelho de HPLC.

Para ultrapassar o problema causado pela instabilidade dos derivados, Busto *et al.* [1997b] propuseram um método de derivatização na-coluna, usando para o efeito um sistema de solventes ternário, um dos quais constituído por uma solução tamponada do próprio reagente derivatizante (OPA/N-acetilcisteína) usada apenas durante os primeiros 11 minutos de análise. Os resultados obtidos foram prometedores mas terão de ser resolvidos os problemas causados pelas distorções observadas na linha de base, em resultado da presença do excesso de derivatizante na própria fase móvel.

Outra forma de evitar a degradação dos derivados formados consiste em efectuar a reacção de derivatização somente após a separação cromatográfica dos compostos — derivatização pós-coluna — processo que implica o uso de equipamento adicional apropriado. O maior inconveniente neste tipo de abordagem consiste no mau comportamento cromatográfico de alguns

dos compostos, originado pelo seu carácter polar, o que leva a dificuldades acrescidas na sua separação.

A aplicação deste processo a vinhos foi usada num ensaio interlaboratorial realizado por laboratórios oficiais holandeses para a determinação de uma única amina, a histamina, em amostras de vinho branco [Beljaars *et al.*, 1998]. Segundo os autores, nas condições ensaiadas, o método permitiria a determinação simultânea de histamina e de tiramina, mas não de putrescina e de cadaverina, em virtude de não possibilitar a resolução cromatográfica dos respectivos picos.

Alguns autores têm tentado ultrapassar o problema inerente aos métodos de derivatização pós-coluna, ou seja, a má resolução cromatográfica das aminas, procedendo a processos de separação de par-iónico. A sua abordagem será feita um pouco adiante, quando nos referirmos a esse tipo de processos.

Regra geral, a separação cromatográfica dos derivados isoindólicos obtidos pela acção do OPA sobre as aminas é feita em colunas de fase reversa com enchimento em C_{18}, com uso de um sistema binário de eluentes, incluindo uma fase aquosa tamponada a pH perto da neutralidade (5,9-7,0) e um solvente orgânico, em regra o metanol ou o acetonitrilo. Busto *et al.* [1997b] usaram uma coluna com suporte polimérico capaz de suportar o pH alcalino necessário para o processo de derivatização na-coluna.

A separação dos diversos derivados formados apresenta, normalmente, alguns problemas, especialmente quando a derivatização é feita directamente na amostra sem qualquer etapa prévia de extracção/purificação, como é o caso das propostas de Buteau *et al.* [1984a], Crespo e Lasa [1994], Lehtonen *et al.* [1992], Mafra *et al.* [1999], Monteiro e Bertrand [1994], Soleas *et al.* [1999] e Tricard *et al.* [1991]. Os principais interferentes são os aminoácidos, alguns dos quais presentes nos vinhos em quantidades bem superiores à das aminas e que, na sua grande maioria, reagem facilmente com o OPA dando também lugar à formação de derivados fluorescentes.

Alguns autores ultrapassam o problema, optimizando a metodologia para a determinação de um número reduzido de aminas, como Cilliers e V. Wyk [1985], que apenas determinaram teores de histamina e de tiramina. Diversas tentativas no sentido de melhorar essa separação têm, contudo, sido ensaiadas. Assim, o tetrahidrofurano é usado como modificador orgânico por muitos autores [Achili *et al.*, 1994; Busto *et al.*, 1995a e 1997b; Crespo e Lasa, 1994; Ough *et al.*, 1987; Soleas *et al.*, 1999;

Tarrach, 1995], e o 2-octanol é usado por Monteiro e Bertrand [1994] e por Tricard *et al.* [1991]. Busto *et al.* [1995a] usaram adicionalmente trietanolamina, mas os mesmos autores em trabalho posterior afirmam que o seu uso deve ser evitado pois leva a uma redução do tempo de vida da coluna cromatográfica [Busto *et al.*, 1996b]. A termostatização da coluna cromatográfica a temperaturas superiores à temperatura ambiente (37-40 °C) é também usada com o mesmo intuito por vários autores [Achili *et al.*, 1994, Busto *et al.*, 1997b, Pfeiffer, 1996], sendo num dos casos mesmo a separação feita a uma temperatura invulgarmente elevada, 60 °C [Busto *et al.*, 1995a].

Ainda com o mesmo objectivo, de melhorar a separação cromatográfica dos derivados correspondentes às diversas aminas biogénicas, Buteau *et al.* [1984a] propuseram a extracção dos derivados formados com acetato de etilo, promovendo dessa forma a rejeição dos derivados correspondentes aos aminoácidos, que por serem mais polares não são extraídos por aquele solvente. Busto *et al.* [1996a] são de opinião que essa extracção leva a perdas significativas dos derivados de algumas aminas, não só por o rendimento do processo extractivo ser incompleto para alguns dos compostos, mas, principalmente, devido à reduzida estabilidade de alguns deles.

Uma característica associada ao uso do OPA como agente derivatizante reside no facto de o composto apenas reagir com aminas primárias, o que impede a análise de algumas aminas importantes nos vinhos como a dimetilamina, a pirrolidina e as poliaminas, espermina e espermidina. Este facto pode, contudo, funcionar como uma vantagem em relação a outros derivatizantes, pela maior selectividade conseguida.

Embora estejam bem caracterizados os produtos resultantes da reacção do OPA com as diversas aminas na presença de mercaptoetanol, a acção do reagente parece ser fortemente dependente de factores relacionados com a estrutura dos compostos aminados. A histamina, p. ex., não requer a presença de mercaptoetanol para dar origem a um derivado fluorescente; pelo contrário, na presença daquele tiol o produto resultante apresenta menor intensidade fluorescente [Allenmark *et al.*, 1985]. Este facto foi aproveitado por Tarrach [1995] que desenvolveu um método altamente selectivo para a determinação de histamina em vinhos, baseado na uso de OPA sem adição de mercaptoetanol.

A detecção dos derivados formados pela reacção do OPA com as aminas presentes no vinho é usualmente feita por meio de um detector de fluorescência, embora também possam ser usados detectores electroquímicos. Os comprimentos de onda usados para a excitação e para a emissão são,

regra geral, na zona de 330-360 nm e de 440-460 nm, respectivamente. Lehtonen *et al.* [1992] usaram um comprimento de onda para a excitação mais baixo (230 nm), logo menos específico, mas de maior intensidade. Crespo e Lasa [1994] e Soleas *et al.* [1999] usaram como comprimento de onda para a emissão 420 nm, aparentemente com bons resultados em termos de selectividade.

Excepcionalmente, Achili *et al.* [1995] usaram um detector coulombimétrico para a detecção dos derivados resultantes da acção do OPA sobre as aminas. O método desenvolvido revelou características excepcionais de selectividade, pelo recurso às capacidades selectivas do próprio detector, que permite a obtenção de um cromatograma diferente por cada um dos 16 eléctrodos usados. Os valores obtidos para as 3 amostras de vinho analisadas (1 vinho branco, 1 vinho tinto com 6 anos e um vinho do Porto envelhecido) foram, porém, particularmente elevados para alguns dos compostos estudados, quando comparados com valores da restante literatura, o que nos leva a colocar algumas reticências quanto à sua exactidão. (p. ex.: putrescina: 162, 18 e 7 mg/L; histamina: 42, 10 e 12 mg/L, respectivamente).

Finalmente, é de referir uma última desvantagem do uso do OPA/mercaptoetanol como reagente derivatizante, relacionada com o odor muito intenso e francamente desagradável característico do mercaptoetanol, o que aliado ao facto de se tratar de um composto tóxico por inalação obriga a cuidados redobrados no seu manuseamento. Como exemplo deste facto, refira-se que na metodologia proposta por Busto *et al.* [1997b] baseada na derivatização na-coluna das aminas em estudo, anteriormente referida, o uso de N-acetilcisteína em substituição do mercaptoetanol deveu-se exclusivamente à impossibilidade de usar o composto nas condições exigidas, ou seja, como um dos componentes da fase móvel.

2.4.3.1.2. Cloretos de sulfonilo

Os cloretos de sulfonilo (cloretos de ácidos sulfónicos) constituem um grupo de compostos com características electrofílicas bastante usado em química analítica pela sua capacidade de reagir facilmente com aminas primárias e secundárias. As sulfonamidas resultantes são, regra geral, estáveis e bastante resistentes à hidrólise [Sternson, 1981].

O principal uso destes reagentes reside na conversão das aminas em produtos fluorescentes, sendo essa fluorescência originária da porção orgânica da molécula. O mais conhecido é o cloreto de dansilo (cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo), amplamente usado desde a década de 60 no estudo das proteínas, pelas suas propriedades de tornar fluorescentes moléculas proteicas e peptídicas, por reacção com a porção terminal aminada [Seiler, 1993]. Alguns dos derivados formados apresentam igualmente boas características de absorção na zona do UV.

O cloreto de dansilo reage com aminas primárias e secundárias, a pH medianamente alcalino (9,5-10), de acordo com a reacção esquematizada da Figura 4.3. Os derivados formados são em regra estáveis, embora em meio alcalino possa haver hidrólise de alguns deles, o que é particularmente evidente no caso da histamina [Seiler, 1993].

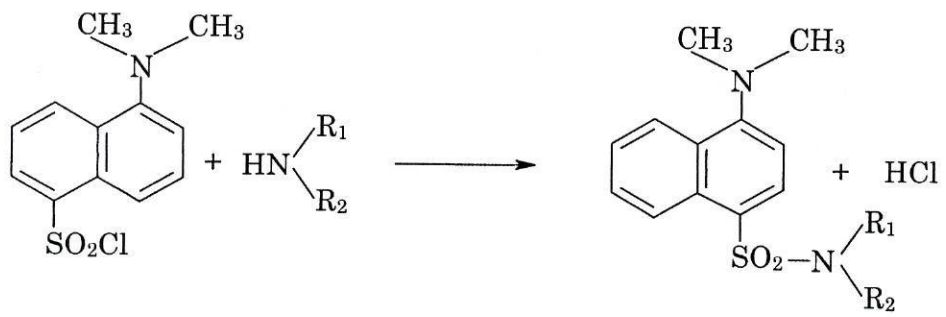


Figura 4.3. Reacção de derivatização de aminas primárias e secundárias por acção do cloreto de dansilo

O uso de cloreto de dansilo na quantificação de aminas biogénicas em vinhos foi proposto num trabalho pioneiro de Battaglia e Frölich [1978] dedicado à determinação da histamina, logo em seguida adaptado para a determinação simultânea de outras aminas de interesse [Frölich e Battaglia, 1980].

Apesar de alguns desenvolvimentos posteriores feitos por diversos autores, os métodos baseados no uso de cloreto de dansilo apresentam, porém, várias contrariedades, que têm levado a que a sua utilização seja cada vez mais restrita. O principal problema reside na capacidade do composto reagir, embora de forma mais lenta do que reage com aminas, com compostos que

possuam funções fenólicas e mesmo alcoólicas; este facto leva à presença de inúmeros picos adicionais nos cromatogramas obtidos a partir de vinhos, ricos, como é sabido, em polifenóis e em alcoóis alifáticos e, nalguns casos, em açúcares.

Esta desvantagem do cloreto de dansilo foi realçada por Buteau *et al.* [1984b], que se decidiram pela não utilização do composto devido à impossibilidade de separar satisfatoriamente mais do que três aminas (histamina, putrescina e tiramina), com o sistema cromatográfico usado. Alguns autores tentaram resolver o problema recorrendo não só a uma etapa prévia de purificação da amostra como ainda à extracção dos derivados uma vez finalizada a reacção de derivatização. Assim, Vechio *et al.* [1989] e Ibe *et al.* [1991] fizeram a extracção prévia das aminas através da passagem por uma coluna de troca catiónica, e usaram processos de extracção líquido-líquido para a extracção dos derivados formados do meio reaccional usado; no primeiro caso foi usado éter etílico como agente extractor, a que se seguiu a evaporação do solvente à secura e a redissolução do resíduo com acetonitrilo; no segundo caso o solvente usado para a extracção dos derivados foi o tolueno. Os melhores resultados foram os alcançados pelos autores japoneses [Ibe *et al.*, 1991], que conseguiram a separação e quantificação de 16 aminas biogénicas, usando para o efeito duas determinações para cada amostra, uma numa coluna de C_{18}, com a qual não era possível a resolução dos pares 2-feniletilamina / isoamilamina e do par pirrolidina / isobutilamina e outra numa coluna de C_8, incapaz de separar convenientemente os picos respeitantes à butilamina, à isobutilamina e à triptamina em relação a impurezas presentes na amostra.

Bons resultados, também, foram reclamados pelo grupo do Professor Battaglia, naquela que constitui, até ao momento, a sua última proposta baseada no uso de cloreto de dansilo [Etter *et al.*, 1990]. Para além do uso de um processo prévio de extracção com uma mistura de acetonitrilo e ácido perclórico 0,2 N (1:1) e de um processo de extracção dos derivados formados com acetato de etilo (seguido de evaporação à secura e redissolução em acetonitrilo), o método caracteriza-se pelo uso de dois detectores montados em série (UV + Fluorímetro), tendo possibilitado a quantificação de nove das principais aminas presentes em vinhos, revelando os cromatogramas apresentados uma boa resolução de todos os compostos. O uso dos dois detectores permitiu uma maior margem de segurança na correcta quantificação dos compostos quando presentes em baixos teores e, além disso, permitiu baixar significativamente o limite de detecção obtido para algumas aminas (o derivado da histamina, p. ex., apresenta muito maior sensibilidade com o detector de UV a 254 nm do que com o detector de fluorescência). Ainda assim, o maior inconveniente do método, consiste nos limites de

detecção obtidos, relativamente elevados face a outros métodos, da ordem dos 500 μg/L para cada uma das aminas estudadas.

Busto *et al.* [1994], por seu lado, propuseram o tratamento prévio da amostra com polivinilpirrolidona, de forma a eliminar os polifenóis, e o uso de colunas de extracção em fase sólida com enchimento em C_{18}, para a extracção dos derivados correspondentes às aminas, sendo a eluição dos mesmos feita com acetonitrilo. A detecção foi feita por UV a 250 nm, mas os resultados obtidos não foram satisfatórios, o que levou os autores a posteriormente optarem pelo desenvolvimento de outros métodos de derivatização. O facto de a reacção ser relativamente lenta (cerca de 1 hora) e, logo, não permitir uma fácil automatização do processo é um outro factor que leva a relegar o cloreto de dansilo para segundo plano [Busto *et al.*, 1996a].

Melhores características parece apresentar um composto análogo, o cloreto de dabsilo (cloreto de diaminobenzenosulfonilo), introduzido há alguns anos atrás como reagente de derivatização para a análise de aminoácidos [Lin e Chang, 1975] e de aminas [Lin e Lai, 1980]. O compostos reage com aminas primárias e secundárias, de acordo com o esquema da Figura 4.4, dando origem à formação de derivados estáveis e que absorvem na zona do vísivel (436-460 nm) com grande especificidade e sensibilidade.

O uso do cloreto de dabsilo como reagente derivatizante para a determinação de aminas biogénicas em diversos tipos de alimentos, incluindo vinhos, foi proposto pelo grupo de Bockhardt [Bockhardt *et al.*, 1995; Bockhardt *et al.* 1996; Krause *et al.*, 1995].

No último destes trabalhos, os referidos autores conseguiram a determinação simultânea de 19 aminas (doze das quais de interesse nos vinhos), reclamando para o método desenvolvido boas características de linearidade e reprodutibilidade para a quase totalidade das aminas e uma sensibilidade satisfatória [Bockhardt *et al.*, 1996]. Para o efeito, usaram um método automatizado para a reacção de derivatização — efectuada a 70 °C, durante 15 minutos, sobre uma alíquota da amostra previamente acidificada e ultra-centrifugada (para remoção do material proteico) — e uma fase móvel que incluía o éter *terc*-metilbutílico como modificador orgânico (não utilizado nos dois trabalhos anteriores acima referidos) o qual se mostrou essencial em vários aspectos: permitiu eliminar a interferência dos aminoácidos, que nas condições usadas são eluídos durante os primeiros cinco minutos de cromatograma, antes de qualquer das aminas de interesse; permitiu a detecção dos derivados mais hidrófobos, nomeadamente os correspondentes às poliaminas, espermina e

espermidina, que anteriormente não eram detectados por dificuldades na eluição; permitiu, por último, uma diminuição acentuada da duração do processo cromatográfico. Nas condições usadas, contudo, não foi possível promover a separação de alguns pares de aminas, incluindo algumas de interesse nos vinhos, como a pirrolidina e a agmatina. Por outro lado, os autores não apresentaram quaisquer resultados referentes aos teores de aminas encontrados nas amostras analisadas, não permitindo, assim, uma avaliação do método baseada numa comparação com os valores encontrados na literatura.

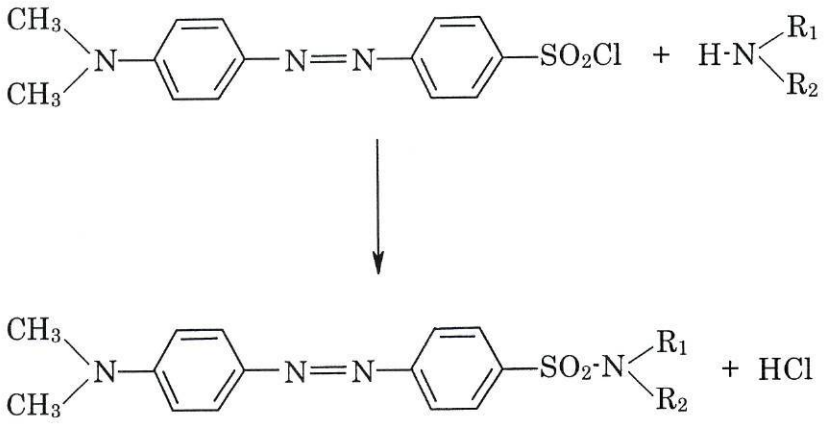


Figura 4.4. Reacção de derivatização de aminas primárias e secundárias por acção do cloreto de dabsilo

Os últimos desenvolvimentos deste método devem-se a um grupo de investigadores espanhóis, que publicaram recentemente dois artigos dedicados à optimização das condições de derivatização para amostras de vinhos [Romero *et al.*, 2001] e à optimização dos diversos parâmetros envolvidos no processo de separação cromatográfica [Romero *et al.*, 2000]. Sinteticamente, podemos referir que os autores limitaram o seu trabalho à determinação de apenas 8 aminas de interesse nos vinhos - putrescina, cadaverina, espermina, espermidina, histamina, tiramina, 2-feniletilamina e triptamina — tendo as principais opções consistido no uso de dimetilformamida e de trietilamina como modificadores orgânicos da fase móvel (juntamente com o éter *terc*-metilbutílico proposto pelo grupo de Bockardt) e na termostatização da coluna de C_{18} usada a 40 °C.

Tendo em atenção os bons resultados apresentados pelos autores nos ensaios de validação efectuados, os teores obtidos na aplicação do método a 6 amostras de vinho - concordantes com os valores usualmente descritos na literatura, com excepção dos relativos à 2-feniletilamina, que os autores não encontraram em qualquer das amostras — e a qualidade dos cromatogramas apresentados — também verificada nos trabalhos do grupo de Bockardt — parece-nos que esta metodologia representará provavelmente a melhor das opções actualmente propostas para a determinação deste tipo de compostos em vinhos por HPLC.

2.4.3.1.3. Cloretos de carbonilo (cloroformatos)

Os cloretos de ácidos carboxílicos ou cloretos de carbonilo constituem outro grupo de reagentes propostos como alternativa para a introdução de um grupo fluorogénico nas aminas biogénicas previamente à sua análise por cromatografia líquida. De entre eles destacam-se os cloroformatos (cloretos do ácido fórmico), compostos altamente reactivos na presença de aminas primárias e secundárias, também usados na derivatização de aminas para a sua análise por cromatografia gasosa*.

Nos últimos anos, diferentes cloroformatos caracterizados por conterem na sua estrutura um grupo fluorogénico têm sido ensaiados para a derivatização de compostos aminados, incluindo os aminoácidos. De todos, o mais conhecido é o cloroformato de 9-fluorenilmetilo, habitualmente designado por FMOC. Trata-se de um reagente introduzido na química laboratorial por Carpino e Yan [1972], com fins de protecção de grupos amina em processos de síntese peptídica, cuja utilidade para fins analíticos foi demonstrada alguns anos mais tarde por Moye e Boning [1979].

A reacção do FMOC com compostos aminados ocorre quase instantaneamente, a um pH ligeiramente alcalino (8,5-9), de acordo com o esquema da Figura 4.5. Os derivados obtidos caracterizam-se pela sua boa estabilidade, facto que associado à rapidez com que a reacção se desenvolve permite a fácil automatização do processo [Kirschbaum, 1994a,b]. Porém, apresentam máximos de excitação e de emissão a comprimentos de onda relativamente baixos, 266 e 310 nm, respectivamente, o que constitui uma desvantagem.

* O Capítulo 6 desta dissertação é dedicado ao desenvolvimento de um método de GC-MS para a análise de aminas biogénicas em vinhos baseado no uso de um composto deste tipo, o cloroformato de isobutilo, como agente derivatizante.

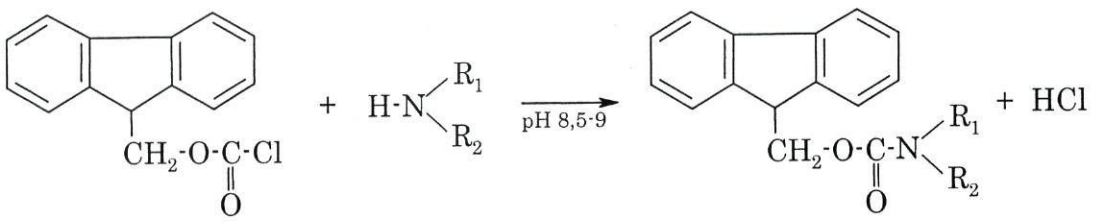


Figura 4.5. Reacção de derivatização de aminas primárias e secundárias por acção do cloroformato de 9-fluorenilmetilo (FMOC).

Segundo Bartók *et al.* [1992], que desenvolveram um método automatizado para a análise de di e poliaminas em tecidos vegetais, o FMOC reúne as vantagens habitualmente reconhecidas ao OPA e ao cloreto de dansilo sem as respectivas contrariedades, ou seja, reage rápida e quantitativamente com aminas primárias e secundárias dando origem a derivados estáveis e intensamente fluorescentes. Outros autores, porém, referem que o composto não é viável para a análise de matrizes complexas, como é o caso dos vinhos, pois a reacção com algumas aminas dá origem a múltiplos derivados para a mesma amina, impossibilitando assim não só a sua correcta quantificação como a correcta separação de outros compostos [Busto *et al.* 1996a].

A primeira referência ao uso do FMOC na determinação de aminas biogénicas em vinhos deve-se a Pfeiffer e Radler [1992] que usaram o composto, com aparente sucesso, na quantificação individual de etanolamina. Segundo os autores, a correcta resolução cromatográfica daquela amina só é conseguida após um processo de purificação da amostra por passagem por coluna de troca catiónica (SCX); de outra forma, é prejudicada pela co-eluição dos aminoácidos prolina e metionina, em especial do primeiro, habitualmente presente nas amostras em grande quantidade.

Mais recentemente, Bauza *et al.* [1995] desenvolveram um método baseado numa derivatização com aquele reagente, optimizado no sentido de permitir a quantificação da espermina e espermidina, poliaminas sobre as quais os resultados existentes são mais escassos em virtude de não serem analisadas quando o OPA é usado como agente derivatizante. Segundo estes autores, a derivatização daquelas poliaminas implica o uso de um excesso de reagente que leva a uma

diminuição da eficiência da reacção com outras aminas de interesse. Para minorar esse problema e, também, para permitir uma melhor resolução cromatográfica dos derivados formados, o excesso de reagente foi eliminado pela adição de uma solução de amoníaco 0,5 M, imediatamente após o final da reacção, cujo tempo foi fixado em três minutos. Embora não sejam referidos pelos autores os problemas atrás referidos sobre a formação de mais do que um derivado a partir da mesma amina, o cromatograma apresentado no seu trabalho, referente a uma amostra de vinho adicionada de quantidades conhecidas de nove aminas biogénicas e de quatro aminoácidos (4 a 6 mg/L cada), revela muitos problemas de separação. Esses problemas são particularmente evidentes no caso da cadaverina cujo pico se funde parcialmente com o pico de tirosina, e no caso da agmatina, da histamina e da tiramina, cuja separação é prejudicada pela presença de compostos interferentes não identificados.

Idênticos problemas tinham sido referidos por Kirschbaum *et al.* [1994a,b], após desenvolverem um método semelhante para a determinação simultânea de aminas biogénicas e aminoácidos, residindo a principal diferença no uso de uma solução de heptilamina para a eliminação do excesso de reagente. Numa tentativa de ultrapassar esses mesmos problemas de resolução, estes autores propuseram posteriormente o uso de dois outros cloroformatos, com diferentes características. No primeiro caso [Kirschbaum *et al.*, 1997], usaram o cloroformato de 2-naftilo (NOC-Cl), o qual proporcionou uma melhor resolução dos picos correspondentes à histamina, à putrescina e à cadaverina do que a obtida quando se usa FMOC como derivatizante; os limites de detecção obtidos foram, porém, mais elevados, especialmente no caso da histamina, cujo derivado apresentou uma intensidade fluorescente cerca de dez vezes inferior à dos restantes. Mais recentemente, os mesmos autores propuseram o uso do cloroformato de *p*-nitrobenzilo (PNZ-Cl), o qual dá origem à formação de derivados passíveis de serem detectados com boa sensibilidade por espectrofotometria de UV, a 265 nm [Kirschbaum *et al.*, 1999]. Os resultados obtidos foram sensivelmente idênticos aos do processo anterior, com a vantagem de, neste caso, ser possível a quantificação de triptamina e de serotonina. A grande desvantagem deste último método reside no aparecimento nos cromatogramas de um intenso pico correspondente ao derivado formado a partir da glicina, usada para eliminar o excesso de reagente derivatizante. Adicionalmente verificou-se a formação de 2 derivados diferentes para a histamina e a presença de vários picos não identificados, provavelmente correspondentes a produtos de hidrólise do reagente.

2.4.3.1.4. Fluorescamina

A fluorescamina (4-fenilspiro[2(*3H*)-furan-1'-ftalan]-3,3'-diona) é um reagente não fluorescente capaz de reagir facilmente com compostos com grupos funcionais nucleofílicos (aminas primárias e secundárias, alcoóis, etc.). O seu maior interesse reside no facto de dar origem a derivados fluorescentes a partir de aminas primárias, podendo considerar-se selectivo para estas sempre que a detecção seja feita por meio de um detector fluorimétrico. A reacção da fluorescamina com uma amina primária está esquematizada na Figura 4.6, correspondendo à formação de um produto intermediário por adição da amina à dupla ligação do composto, a que se segue um rearranjo com formação do composto fluorescente. A reacção tem lugar quase instantaneamente, à temperatura ambiente, a um pH de 8-9, geralmente na presença de acetona, sendo os derivados formados estáveis no meio reaccional.

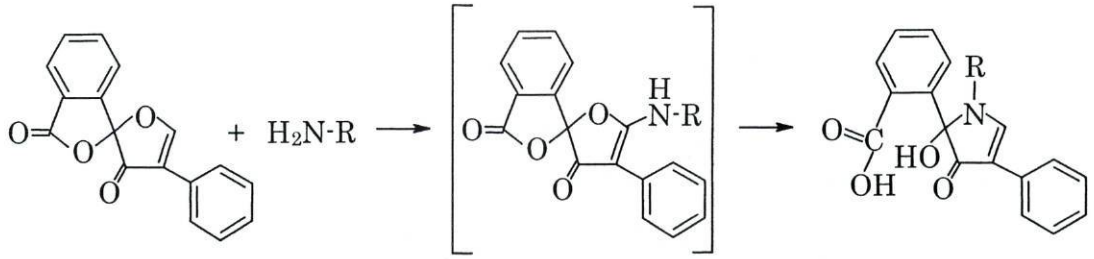


Figura 4.6. Reacção de derivatização de aminas primárias por acção da fluorescamina

O composto foi usado por Colagrande *et al.* [1983] para a determinação de histamina e por Ingles *et al.* [1985] para a determinação de histamina, tiramina e 2-feniletilamina. Em ambos os casos, o processo de derivatização usado foi o originalmente proposto por Udenfriend *et al.* [1972], que corresponde genericamente à adição de volumes iguais (0,5 ou 1,0 mL) de uma solução aquosa contendo as aminas, de uma solução tampão de fosfatos e de uma solução de fluorescamina em acetona a 0,5 ou 1 g/L. Colagrande *et al.* [1983] usaram, aparentemente com bom resultado, um processo de par-iónico para a separação cromatográfica fazendo uso do ião tetrabutilamónio, tendo a

detecção sido feita a 390 nm (λ Exc.) e 475 nm (λ Em.). Ingles *et al.* [1985] não dão referências acerca do processo cromatográfico usado, mas referem, entretanto, ter usado os mesmos derivados para a confirmação da identidade dos compostos estudados pela técnica de espectrometria de massa - - desorpção de campo (FD-MS).

Buteau *et al.* [1984b] fizeram um estudo comparativo do uso da fluorescamina, do cloreto de dansilo e do OPA como agentes derivatizantes para a determinação simultânea das aminas biogénicas presentes em vinhos, tendo optado pelo uso do OPA, como anteriormente referido. A rejeição da fluorescamina baseou-se no facto das diaminas e as poliaminas darem origem a mais do que um pico (correspondentes aos derivados mono e biderivatizados), impossibilitando a sua correcta quantificação.

2.4.3.1.5. Outros agentes derivatizantes

Para além dos já mencionados, outros reagentes derivatizantes foram ensaiados na determinação de aminas biogénicas em vinhos, geralmente com pouco êxito.

O fenilisotiocianato foi usado por Callul *et al.* [1991] para a determinação da histamina. O processo usado tinha a particularidade de a derivatização ser feita directamente sobre uma alíquota da amostra, sendo o meio reaccional posteriormente sujeito a um processo de extracção/purificação através de passagem por uma coluna de SPE de troca aniónica (Bond-Elut SAX), capaz de reter os derivados formados a partir de aminoácidos. A detecção foi feita por intermédio de um detector de díodos, a 254 nm, após separação numa coluna de C_{18} termostatizada a 52 °C. Em trabalhos posteriores do mesmo grupo (Busto e colaboradores) o abandono do método foi justificado pelo facto de não apresentar qualquer vantagem em relação a métodos com outros agentes derivatizantes, especialmente no que respeita à sensibilidade obtida. Baucom *et al.* [1986], por seu lado, tinham adoptado um sistema usado na análise de aminoácidos — "Waters Pico-Tag Amino Acid Analysis System" — baseado numa derivatização pré-coluna com o fenilisotiocianato e na detecção dos derivados formados por fluorimetria, tendo procedido à determinação de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina em diversas amostras de vinhos. A reacção apresentou o inconveniente de ser muito demorada, exigindo uma agitação vigorosa durante 24 horas.

O carbamato de 6-aminoquinoloil-*N*-hidroxisuccinimidilo (AQC) proposto pela primeira vez por Nimura *et al.* [1986] para a derivatização de compostos aminados, foi usado por Busto *et al.* [1996b, 1997a] que concluíram tratar-se de uma boa alternativa ao uso do OPA, com uma sensibilidade da mesma ordem de grandeza (5 a 50 μg/L e 100 a 500 μg/L como limites de detecção para soluções padrão e para vinhos, respectivamente) e com uma boa/razoável linearidade para as 15 aminas estudadas. O composto reage com aminas primárias e secundárias dando origem a derivados estáveis. Segundo os autores, os principais problemas resultam da presença nos cromatogramas de um intenso pico correspondente ao excesso de reagente e à presença de picos secundários resultantes do mesmo, o que impossibilita uma correcta separação de algumas aminas. Além disso, o reagente é agressivo para a fase estacionária da coluna cromatográfica, provocando a sua gradual hidrólise com a consequente diminuição da sua capacidade de separação.

O 2,2-difenil-1-oxa-3-oxonia-2-boratonaftaleno (DOOB), reagente específico para aminas primárias, foi ensaiado por Sanchez-Rodas *et al.* [1996], que desenvolveram um método bifásico (solução aquosa e éter etílico) caracterizado pela simultaneidade da reacção de derivatização e da extracção dos derivados formados. Após separação por um processo de cromatografia em fase normal numa coluna de sílica, os compostos foram detectados por espectrofotometria de UV a 280 nm. Os resultados obtidos, contudo, ficaram aquém do esperado pois o processo, além de demorar 2 horas, apenas permitiu a determinação, em padrões e numa amostra de vinho, de uma única amina biogénica: a tiramina. A triptamina, usada como padrão interno, também mostrou bom comportamento enquanto a etanolamina, também ensaiada, não pôde ser quantificada em virtude do rendimento da extracção se ter apresentado muito reduzido.

2.4.3.2. Agentes de par-iónico

Os processos de cromatografia de par-iónico caracterizam-se pela adição à fase móvel de compostos facilmente ionizáveis (contra-iões) capazes de se ligarem de forma estável e reprodutível a compostos com carga oposta, dando origem a compostos de adição habitualmente designados por pares-iónicos. De uma forma simplista, pode afirmar-se que o par-iónico, uma vez formado na fase móvel, se comporta como uma espécie neutra, ocorrendo o processo de separação por partilha do dessa espécie entre a fase móvel e a fase estacionária. A maior aplicação deste tipo de processos tem

lugar na separação de ácidos ou bases fracos, constituindo uma das formas de ultrapassar as dificuldades associadas à separação de substâncias orgânicas ionizadas. Geralmente usam-se como contra-iões, ou reagentes de par-iónico, substâncias dotadas de características apropriadas para o meio de detecção utilizado, por exemplo uma intensa capacidade de absorção de luz na zona do UV/VIS, permitindo dessa forma a detecção dos compostos em estudo com grande sensibilidade, mesmo quando por si próprios não possuem esse tipo de propriedades.

Um processo deste tipo foi proposto por Wheatley e Tipton [1987] para a análise de tiramina em cervejas, tendo sido posteriormente aplicado em amostras de vinhos pelo mesmo grupo de trabalho [Bháird *et al.*, 1990]. Como reagente de par-iónico, os autores usaram o ácido hexanosulfónico, adicionado a uma mistura de eluentes constituída por uma solução aquosa de Na_2HPO_4 70 mM tamponada a pH 4,9, contendo EDTA (1 mM) e metanol (6 %); a detecção foi feita por intermédio de um detector electroquímico regulado para um potencial de 0,72-0,85 V. As amostras eram previamente desproteinizadas por ultra-filtração e purificadas por passagem através de coluna de troca catiónica, sendo a eluição das aminas feita com ácido perclórico 1 M. Não obstante os autores afirmarem tratar-se de uma boa alternativa para a determinação da tiramina em bebidas alcoólicas, não apresentaram quaisquer dados indicativos da qualidade do método, nomeadamente quanto à linearidade, ao limite de quantificação e à percentagem de recuperação.

Proposta mais elaborada foi a de Gennaro e Abrigo [1991], que propuseram o uso de dois diferentes reagentes de par-iónico — ortofosfato de octilamina (cujos pares-iónicos podem ser detectados a 230, 254 e 280 nm) e salicilato de octilamina (detecção a 254 nm) — para a determinação simultânea de histamina, tiramina, 2-feniletilamina e triptamina em amostras de vinho tinto. O método, que foi aplicado directamente às amostras (diluídas 10 vezes) sem qualquer processo prévio de purificação/extracção, apresentou limites de detecção entre 20 μg/L para a triptamina (280 nm) e 900 μg/L para a histamina (230 nm) e uma boa linearidade apenas para a triptamina e a 2-feniletilamina. A sua aplicação a uma amostra de vinho tinto resultou, contudo, em resultados anormalmente elevados para estes compostos — 72 mg/L para a 2-feniletilamina e 4 mg/L para a triptamina — nunca verificados por outros autores.

O aperfeiçoamento da proposta anteriormente referida foi feito recentemente por Arlorio *et al.* [1998], que propuseram o uso simultâneo de dois reagentes de par-iónico num meio tamponado a pH 3 — heptanosulfonato de sódio, como reagente principal, e octilamina como reagente de

par-iónico secundário — com a função de melhorar a simetria dos picos obtidos. Com o uso de um espectrofotómetro de UV a 215 nm para a detecção dos pares-iónicos formados, foi possível a determinação simultânea das 4 aminas acima referidas e dos respectivos aminoácidos precursores: histidina, tirosina, fenilalanina e triptofano. Os dados obtidos respeitantes à caracterização do método foram satisfatórios, tendo os maiores problemas sido resultado dos processos de purificação/extracção da amostra utilizados. Os autores verificaram a necessidade de usarem uma coluna de troca catiónica para a extracção da histamina e da tiramina enquanto que para a extracção das outras duas aminas estudadas os melhores resultados foram obtidos pelo uso de um processo de extracção líquido/líquido com butanol sobre a amostra alcalinizada a pH 10 e saturada com cloreto de sódio. Outro problema, impeditivo de um maior ritmo na aplicação do método a amostras de vinhos, consistiu na necessidade de condicionar a coluna com uma quantidade de eluentes correspondente a 5 "corridas cromatográficas" antes da injecção de cada amostra.

Recentemente, tem-se verificado a aplicação a vinhos e outras matrizes alimentares, de um tipo diferente de metodologia baseada no acoplamento de um processo de separação com par-iónico com um processo de derivatização pós-coluna com OPA/mercaptoetanol. Proposta originalmente por Seiler e Knödgen [1980, 1985], esta metodologia visa ultrapassar o principal obstáculo dos processos baseados na derivatização pós-coluna com OPA/mercaptoetanol que é, como já anteriormente referimos, a difícil separação de algumas aminas quando não previamente derivatizadas. O agente de par-iónico usado é o octanosulfonato de sódio, adicionado a uma fase móvel tamponada a pH 4,5-5, e a detecção é feita por intermédio de um detector de fluorescência.

Glória *et al.* [1998] usaram um método deste tipo para a determinação de dez das mais importantes aminas biogénicas não voláteis (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, agmatina, histamina, tiramina, 2-feniletilamina, serotonina e triptamina) num elevado número de amostras de vinhos varietais produzidos nos Estados Unidos, cujos resultados foram apresentados no capítulo anterior. As amostras não foram alvo de qualquer processo de extracção/purificação, sendo injectadas directamente no aparelho após uma simples filtração, a separação e a derivatização foram feitas à temperatura ambiente e a detecção foi feita a 340 nm (λ Ex.) e a 445 nm (λ Em.). Não foram apresentadas, contudo, quaisquer indicações relativas à caracterização do processo analítico.

Método idêntico foi usado por Sass-Kiss *et al.* [2000] para a determinação de 7 aminas (putrescina, cadaverina, espermidina, agmatina, histamina, tiramina e 2-feniletilamina) em amostras de

vinhos e de mostos. Os vinhos foram analisados directamente, sem qualquer processo prévio extracção/purificação, enquanto os mostos foram sujeitos a uma homogeneização com ácido perclórico seguida de filtração. Os resultados obtidos na caracterização do método foram genericamente bons, no que respeita à linearidade e ao limite de detecção, mas o cromatograma apresentado respeitante a uma amostra de vinho faz adivinhar grandes dificuldades na correcta identificação de alguns compostos, dado o grande número de picos interferentes presentes.

2.4.4. Cromatografia gasosa

Até ao momento tem sido muito limitado o uso de métodos de cromatografia gasosa na análise de aminas biogénicas em vinhos e noutros produtos alimentares. Este facto contrasta fortemente com a prática seguida nas áreas da bioquímica analítica e da análise ambiental, nas quais são inúmeros os autores que descrevem o uso de técnicas de cromatografia gasosa, em muitos casos associada à espectrometria de massa, para a determinação de aminas nas mais variadas matrizes. Excelentes revisões sobre o tema foram feitas por Blau [1989] e por Muskiet *et al.* [1995], no campo das análises de fluidos biológicos, e por Kataoka [1996] na área das análises ambientais.

A maior dificuldade na aplicação da cromatografia gasosa na análise de aminas está relacionada com o seu carácter intensamente polar, facto já anteriormente referido neste capítulo. Essa característica, associada ao facto de a maioria deste tipo de compostos apresentar reduzida volatilidade, torna a sua análise directa extremamente difícil, ou até mesmo impossível, de realizar. Fenómenos de adsorção e decomposição dos compostos no interior do sistema cromatográfico, com as consequentes perdas, por vezes da totalidade da substância injectada, e o aparecimento de picos cromatográficos mal definidos e com problemas de "tailing" são frequentes nesse tipo de análise [Kataoka, 1996]. O problema é resolvido pelo recurso à derivatização dos compostos com um reagente apropriado, capaz não só de diminuir a polaridade das aminas, como também de aumentar a sua volatilidade e de proporcionar a sua detecção duma forma mais sensível e com maior selectividade. O facto das reacções de derivatização propostas serem muitas vezes demoradas e bastante exigentes no que respeita às condições reaccionais requeridas (ausência de água, p. ex., o que implica processos de isolamento dos compostos mais complexos do que o normal) servirá,

concerteza, de atenuante, que não de justificação, para a mencionada pouca utilização da técnica na análise dos compostos em estudo em matrizes alimentares.

Não obstante, e como pudemos documentar no capítulo anterior, são preciosos alguns dos resultados obtidos pelo uso da cromatografia gasosa na análise de aminas biogénicas em vinhos, nomeadamente na identificação de alguns compostos cuja presença era até então desconhecida. Tal facto não será de estranhar se atendermos à superior capacidade de resolução apresentada pelas colunas usadas em cromatografia gasosa em relação àquelas que são usadas em HPLC, à grande sensibilidade proporcionada por muitos dos detectores correntemente usados e à facilidade de associação da técnica a outras técnicas usadas essencialmente para a identificação e caracterização de compostos, nomeadamente a espectrometria de massa.

Puputti e Suomalainen [1969] podem considerar-se como os pioneiros no uso da cromatografia gasosa na análise de aminas biogénicas em vinhos. Sem recorrer a qualquer processo de derivatização e usando um detector de ionização de chama, os autores usaram a técnica para a confirmação da presença de algumas aminas voláteis em diversas amostras de vinhos, depois dos resultados previamente obtidos por meio de uma metodologia que envolvia a extracção das aminas por um solvente orgânico e a sua identificação por cromatografia em camada fina. Dessa forma conseguiram confirmar a presença de quantidades vestigiais de metilamina, n-butilamina e n-amilamina, de teores da ordem dos 50 μg/L de isopropilamina e de isobutilamina e de teores mais elevados de hexilamina (0,4-0,7 mg/L), de etilamina (0,5-2 mg/L), de 2-feniletilamina (0-9 mg/L) e de isoamilamina (1-28 mg/L). Estes resultados, contudo, observados à luz dos conhecimentos actuais, merecem sérias reservas, nomeadamente quanto à presença de hexilamina, normalmente não encontrada nos diversos trabalhos publicados sobre o assunto.

Posteriormente, Singer e Lijinsky [1976] referiram pela primeira vez a presença em vinhos de três aminas secundárias até então não identificadas: dimetilamina, pirrolidina e morfolina. A metodologia usada incluía a prévia destilação da amostra a pH alcalino, um processo contínuo de extracção com éter etílico de forma a remover interferentes de características neutras, a concentração da solução obtida e, finalmente, a separação cromatográfica das diversas aminas na forma de derivados tosilamídicos (obtidos por reacção com o cloreto de *p*-toluenosulfonilo) e a sua detecção por espectrometria de massa.

Usando como agente derivatizante o anidrido trifluoroacético, que tinha sido proposto alguns anos por Sen [1969] para a determinação da tiramina em diversos produtos alimentares, Neurath *et al.* [1977] detectaram a presença em vinhos de isoamilamina e de 2-feniletilamina, após destilação da amostra previamente alcalinizada, recolha do destilado numa solução ácida, derivatização e purificação por passagem em coluna de troca catiónica. A detecção foi feita por intermédio de um detector de captura de electrões.

O mesmo reagente derivatizante, o anidrido trifluoroacético, foi também usado por Chaytor *et al.* [1975] que, fazendo uso de uma metodologia de cromatografia gasosa – espectrometria de massa, detectaram a presença de 2-feniletilamina em diversos produtos alimentares, incluindo duas amostras de vinho da Madeira e uma de vinho do Porto.

A contribuição mais importante dada pela aplicação da técnica de cromatografia gasosa para o conhecimento da composição dos vinhos e dos mostos em aminas biogénicas foi, porém, dada pelo grupo de Ough e colaboradores que publicaram, no início da década de 80, uma série de trabalhos dedicados a este tema [Daudt e Ough, 1980; Ough *et al.* 1981; Ough e Daudt, 1981; Almy *et al.* 1983] cujos resultados já foram apresentados no capítulo anterior. Aproveitando algumas das propostas metodológicas feitas anteriormente por Neurath *et al.* [1977], o método desenvolvido por aqueles autores, complexo e laboratorialmente muito exigente, consistia na destilação de uma alíquota de 1 litro de vinho ou de mosto, previamente alcalinizada a pH 11-12, recolha do destilado obtido numa solução de HCl a 10 % imersa em gelo, evaporação à secura da solução ácida contendo as aminas sob a forma de sais, derivatização das aminas com anidrido trifluoroacético (4 mL) durante toda a noite e à temperatura ambiente, extracção dos derivados formados com 2 x 20 mL de éter etílico, após neutralização do meio reaccional pela adição de solução de bicarbonato de sódio a 5%, secagem da solução etérea pela adição de sulfato de sódio anidro seguida de filtração e, finalmente, evaporação do extracto até cerca de 1 mL, para posterior injecção no sistema cromatográfico. A separação dos derivados formados era feita numa coluna capilar (25 m x 0,20 mm d.i.) com fase estacionária polar – Carbowax 20 M ou SE-54 – e a detecção feita por um detector termoiónico específico para azoto e fósforo (NPD) ou, alternativamente, por espectrometria de massa, para fins de identificação.

Embora bastante laborioso e de execução demorada, pelo número de etapas envolvidas, o método permitiu a identificação pela primeira vez em vinhos de dois compostos, a dietilamina e a 2-metilbutilamina, para lá de um grande número de aminas voláteis identificados pela primeira vez em

mostos – metilamina, dimetilamina, etilamina, dietilamina, n-propilamina, isobutilamina, 2-metilbutilamina, isoamilamina, pirrolidina e 2-feniletilamina. O método revelou níveis de sensibilidade e selectividade muito elevados, permitindo a quantificação de 8 aminas em teores de poucos μg/L. Para alguns dos compostos, porém, a reprodutibilidade obtida apresentou valores pouco satisfatórios (desvio padrão relativo superior a 15 %), o que, segundo os autores, pode ter tido origem no deficiente rendimento do processo prévio de destilação, em especial no caso dos menos voláteis como a 2-feniletilamina e a etanolamina, ou também no facto dos derivados trifluoroacetilados apresentarem uma estabilidade reduzida na presença de água ou de quantidades vestigiais de ácidos ou bases.

Esta reduzida estabilidade dos derivados trifluoroacetilados das aminas biogénicas tinha já sido evidenciada por Makita *et al.* [1976], que propuseram, como alternativa, a derivatização dos compostos aminados com cloroformato de etilo, em meio aquoso alcalino. O método foi aplicado pelo mesmo grupo de autores na determinação de tiramina em diversos produtos fermentados, incluindo cerveja [Yamamoto *et al.*, 1980], e, posteriormente na determinação de putrescina e de cadaverina numa série de produtos alimentares de origem japonesa, incluindo o saké, bebida alcoólica com alguma similitude com o vinho, produzida a partir da fermentação do arroz [Yamamoto *et al.*, 1982]. As amostras eram sujeitas a um processo prévio de extracção/purificação através de passagem por uma coluna de troca catiónica e a reacção de derivatização tinha a vantagem de ser quase instantânea e de ter lugar na presença de água, dando origem a derivados estáveis durante largos períodos de tempo. O maior inconveniente residia na necessidade de purificar o meio reaccional, após o processo de derivatização, através de um processo extractivo com éter etílico, com o objectivo de eliminar compostos interferentes não removidos durante o processo de extracção/purificação inicial e capazes de prejudicar gravemente a separação cromatográfica dos compostos de interesse; a essa extracção seguia-se a evaporação do extracto obtido e a dissolução do resíduo em acetato de etilo. Mesmo na ausência de um bom padrão interno, pois nenhum dos compostos experimentados pelos autores demonstrou um comportamento idêntico ao da tiramina durante o processo de extracção/purificação, o método apresentou, no caso da determinação da tiramina, bons parâmetros analíticos, nomeadamente um coeficiente de variação de 6,2 % e um coeficiente de recuperação de 94 %. No trabalho de determinação da putrescina e de cadaverina os valores obtidos foram ligeiramente inferiores, mas mesmo assim, segundo os autores, suficientemente bons para a sua aplicação no tipo de amostras em estudo.

Nos últimos anos são praticamente inexistentes as referências respeitantes ao uso de técnicas de cromatografia gasosa na análise de aminas biogénicas em vinhos e outras bebidas alcoólicas. Os únicos desenvolvimentos dignos de registo referem-se geralmente à aplicação de metodologias deste tipo na determinação de algumas aminas em diferentes matrizes alimentares, tal como produtos cárneos, peixes e queijos. As propostas apresentadas, contudo, não conseguiram impor-se na prática analítica, provavelmente, e tendo em conta a pouca estabilidade dos derivados em questão, por dificuldades na obtenção de resultados reprodutíveis. É o caso do trabalho de Henion *et al.* [1981], que quantificaram histamina em amostras de atum por um processo de trimetilsililação *in situ* de um extracto da amostra, seguido de separação e detecção por cromatografia gasosa – espectrometria de massa. Slemr e Beyermann [1984], por seu lado, propuseram a determinação simultânea de putrescina, cadaverina e histamina em amostras de carne, fazendo uso de um processo de derivatização em duas etapas: inicialmente, os compostos eram convertidos nos respectivos derivados trifluoroacetilados e, em seguida, a histamina era convertida, por acção do cloroformato de etilo, em N^{α}-trifluoroacetil-N^{τ}--etoxicarbonil-histamina. O maior destaque vai para a metodologia adoptada como método oficial nos Estados Unidos para a determinação de cadaverina e putrescina em amostras de atum enlatado, inicialmente proposta por Staruszkiewicz e Bond [1981] e alvo de pequenas modificações introduzidas recentemente por proposta de Rogers e Staruszkiewicz [1997]. Resumidamente, baseia-se na extracção dos compostos com metanol a 75%, na sua derivatização com anidrido pentafluoropropiónico seguida de um processo de purificação do meio reaccional através de passagem por uma coluna de SPE com alumina e, finalmente, na sua separação em coluna de enchimento e detecção e quantificação por detector de captura de electrões.

A última referência que encontrámos referente ao uso da cromatografia gasosa na análise de aminas refere-se ao trabalho de Pfundstein *et al.* [1991b], amplamente citado no capítulo anterior, que consistiu na análise das aminas voláteis (primárias e secundárias) presentes em 264 amostras dos mais variados tipos de alimentos, incluindo algumas amostras de vinhos e de outras bebidas alcoólicas. O método usado, detalhadamente descrito em trabalho anterior dos mesmos autores [Pfundstein *et al.*, 1991a], consistiu na derivatização dos compostos com cloreto de benzilsulfonilo (directamente sobre a amostra no caso das bebidas e após destilação em meio alcalino no caso dos outros alimentos) com formação das correspondentes sulfonamidas e posterior separação das fracções correspondentes às aminas primárias e secundárias por uma versão modificada do método de Hinsberg, que se baseia na diferente solubilidade das referidas sulfonamidas em meio alcalino. A detecção dos compostos foi feita por intermédio de um detector termoiónico a operar em modo de azoto.

2.5. Outras técnicas analíticas

O interesse despertado pela presença das aminas biogénicas em vinhos aliado à inexistência de um método cromatográfico capaz de reunir em si todos os atributos necessários para a obtenção continuada de resultados analíticos de grande qualidade, tem levado alguns especialistas a propor o uso de metodologias não-cromatográficas para a respectiva determinação. Algumas das propostas apresentadas, nomeadamente as baseadas em técnicas de electroforese capilar, parecem possuir potencialidades para poderem vir a constituir-se como alternativas válidas para os métodos correntemente em uso.

Walther *et al.* [1987] propuseram o uso de uma técnica complexa de espectrometria de massa — "constant B^2E linked scan" — caracterizada por uma prévia derivatização das aminas com cloreto de dansilo, introdução directa no espectrómetro de massa com evaporação do solvente, fragmentação por meio de um processo de dissociação colisional induzida de forma a dar origem a um fragmento *m/z* 169, comum a todos os derivados dansilados e correspondente ao ião dimetilaminonaftaleno, e posterior pesquisa dos respectivos iões precursores. Com o uso de anilina e de etilenodiamina como padrões internos, aqueles autores obtiveram, na análise de um vinho tinto, teores entre 0 e 26 mg/L para as sete aminas estudadas (histamina, tiramina, 2-feniletilamina, putrescina, cadaverina, isoamilamina e etanolamina) com coeficientes de variação entre 12 e 17 %. Com o uso de padrões internos deuterados para quatro das aminas estudadas (tiramina, 2-feniletilamina, putrescina e cadaverina) os respectivos coeficientes de variação baixaram para 3 a 5 %. Segundo os autores, trata-se de um método rápido (o processo de derivatização dura 30 minutos e a análise em triplicado de cada amostra é feita em igual espaço de tempo) apropriado para fins de despistagem. Não foram publicados, entretanto, quaisquer desenvolvimentos do mesmo.

Um processo de determinação da histamina por espectrofluorimetria síncrona foi, por seu lado, proposto por Gutierrez *et al.* [1987]. O método incluía a prévia derivatização do composto com OPA e a obtenção dos espectros de primeira e segunda derivada por varrimento do monocromador de excitação entre 300 e 460 nm e do monocromador de excitação entre 380 e 540 nm. As curvas de calibração apresentaram-se lineares entre 0,2 e 2000 μg/L e entre 0,1 e 2000 μg/L, para a primeira e para a segunda derivada, respectivamente, e os limites de detecção obtidos foram de 0,16 e de 0,06 μg/L. O método foi aplicado a 6 amostras de vinho, aparentemente com bons resultados,

apresentando a vantagem de dispensar qualquer preparação prévia da amostra. Não temos conhecimento, contudo, da sua adopção por outros autores.

Rauch *et al.* [1992] propuseram um método imunoenzimático para a determinação de histamina em amostras de queijo, peixe, vinho e cerveja, tendo obtido bons níveis de sensibilidade (limite de detecção de 7 μg/L) e de selectividade (interferência da histidina, da tiramina e da triptamina inferior a 0,001 %) e uma precisão de cerca de 15 %.

Nos últimos anos têm assumido especial relevo as propostas baseadas na separação electroforética dos compostos, técnica que recentemente tem sido alvo de muitos desenvolvimentos. A grande capacidade de separação que é hoje possível atingir, em especial com as modernas técnicas de electroforese capilar de zona, tem sido aproveitada por alguns autores para o desenvolvimento de metodologias de determinação simultânea de aminas biogénicas passíveis de serem aplicadas a produtos alimentares e, consequentemente, também a vinhos.

A utilidade da electroforese na separação da histamina de amostras de vinhos e de mostos tinha sido já realçada por Mayer e Pause [1973b], que desenvolveram uma metodologia para a determinação do composto baseada na sua separação electroforética numa placa de gel de agar, a qual era em seguida revelada por adição de OPA, sendo a quantificação baseada na intensidade fluorescente da mancha correspondente à histamina.

Pioneiros na aplicação da electroforese capilar de zona na análise de aminas e de aminoácidos em vinhos foram, contudo, Rose Jr. e Jorgenson [1988] que desenvolveram um sistema baseado na derivatização dos compostos com OPA, após a sua separação electroforética, e consequente determinação da intensidade fluorescente (λ Exc.: 312 nm; λ Em.: 400 nm). A metodologia apresentou-se linear para alguns dos compostos estudados e bastante sensível mas, segundo os próprios autores, a necessitar de novos desenvolvimentos, nomeadamente o uso de uma fonte de laser para a excitação dos derivados.

Esse uso da detecção fluorimétrica induzida por uma fonte laser associada à separação electroforética de aminas e de aminoácidos em matrizes complexas tem vindo a ser desenvolvido por diversos autores. No que respeita à sua aplicação a vinhos, merece especial referência o trabalho feito por um grupo de autores franceses, numa parceria entre a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Toulouse e uma empresa fabricante desse tipo de tecnologia, do qual tem resultado a publicação de

vários artigos sobre o assunto [Arellano *et al.*, 1997; Nouadje *et al.*, 1995, 1996 (artigo de revisão), 1997]. Neste último trabalho, os autores reclamam para o seu método características de rapidez e de fiabilidade apropriadas para o seu uso em análises de rotina para o controlo de qualidade dos vinhos. O agente fluorogénico usado é o isotiocianato de fluoresceína e a separação de um conjunto de 8 aminas e de 20 aminoácidos é conseguida em menos de 30 minutos. Face à grande sensibilidade apresentada pelo método, torna-se possível efectuar a prévia diluição da amostra em 2000 vezes, o que evita a interferência de substâncias presentes no vinho dotadas de propriedades fluorescentes intrínsecas, como os flavonóides. O maior inconveniente reside na necessidade de prolongar a reacção de derivatização durante duas horas, dada a relativamente pequena reactividade do reagente derivatizante usado. Por outro lado, os autores apresentam os resultados obtidos na aplicação do método a diversas amostras de vinhos tintos em percentagem normalizada e não em teores absolutos, o que parece indiciar alguns problemas na obtenção dos mesmos. De maior gravidade, porém, parece-nos o facto de alguns dos resultados obtidos (em teores relativos) estarem em total discordância com a restante literatura: assim, os valores obtidos para a putrescina foram sistematicamente mais baixos (duas a quatro vezes) do que os obtidos para a 2-feniletilamina e os valores obtidos para a espermina foram cerca de dez vezes superiores a estes últimos, o que, muito provavelmente, deve ter resultado de um erro na identificação do respectivo pico.

Mahendradata e Schwedt [1996] adaptaram para uso em diversas matrizes alimentares, vinhos incluídos, um método previamente desenvolvido por Mopper e Sciacchitano [1994] para a determinação da histamina em amostras de peixes, caracterizado pelo uso como electrólito de uma solução de citrato de sódio tamponada a pH 2,5 e pela detecção directa do composto por UV a 210 nm. A comparação da metodologia desenvolvida com um processo clássico de HPLC com pré-derivatização com OPA e com um processo espectrofotométrico desenvolvido pelos mesmos autores, baseado na reacção da histamina com um sal de diazónio, o tetrafluoroborato de 4-nitrobenzenodiazónio, e medição da absorvência a 470 nm [Mahendradata e Schwedt, 1998] mostrou-se favorável em termos de rapidez, de selectividade e do limite de detecção obtido, em relação ao método de HPLC, e de simplicidade no tratamento da amostra, em relação ao método espectrofotométrico, pois apenas implica uma simples filtração dos vinhos enquanto que este último exige um processo prévio de extracção.

Outra proposta interessante surgida neste âmbito é a de Arce *et al.* [1998], que desenvolveram um sistema de electroforese capilar com detecção indirecta por UV a 214 nm, cuja principal novidade

consiste na utilização de um sistema automatizado com injecção por fluxo que integra no seu interior uma coluna de extracção em fase sólida. Desta forma, as etapas de purificação da amostra, pré-concentração dos compostos e introdução da amostra no sistema de electroforese capilar podem ser feitas de forma totalmente automatizada e com um mínimo de manipulação da amostra pelo operador, o que associado à rapidez com que é conseguida a separação electroforética dos compostos, permite a determinação de dez aminas biogénicas (histamina, tiramina, 2-feniletilamina, putrescina, cadaverina, metilamina, propilamina, isopropilamina, isoamilamina e etanolamina) em menos de quinze minutos. O método foi caracterizado em termos de sensibilidade — limites de quantificação variando entre 180 μg/L para a tiramina e 600 μg/L para a cadaverina — linearidade — $r^2 > 0,999$ para oito das aminas ensaiadas e $r^2 > 0,990$ para as duas restantes (isopropilamina e cadaverina) no intervalo de concentrações entre 0 e 10 mg/L — e recuperação — com obtenção de muito bons resultados para todas as aminas, variando em regra entre 95 e 105%, para três diferentes níveis de adição a 6 amostras de vinhos.

Finalmente, Kovacs *et al.* [1999] propuseram um processo para a determinação de sete das principais aminas biogénicas presentes em vinhos, baseado na derivatização das aminas com o AQC, separação electroforética dos derivados formados num tubo de sílica fundida de 50 cm x 50 μm d. i. a funcionar a 15 kv e detecção por espectrofotometria de UV a 254 nm. Os limites de detecção obtidos, após purificação da amostra por passagem em coluna de troca catiónica Dowex 50 e concentração num factor de 20 vezes, foram de 1 μM para a triptamina, 2,5 μM para a tiramina e a cadaverina, 5 μM para a putrescina, 25 μM para a espermina e a espermidina e 40 μM para a histamina e uma boa linearidade foi conseguida para todas as aminas em estudo, na zona de 50 μM a 1000 μM.

Bibliografia

Achili, G., Cellerino, G.P., d'Eril, G.M., Determination of amines in wines by high-performance liquid chromatography with electrochemical coulometric detection after precolumn derivatization. ***J. Chromatogr. A, 661,*** 201 (1994).

Addeo, F., Malorni, A., Sulla presenza di ammine biologiche nei mosti e nelle bevande fermentate: uno studio analitico. ***Scienza Tecnol. Alimenti, 4,*** 241 (1974).

Allenmark, S., Bergström, S., Enerbäck, L., A selective postcolumn o-phthaldehyde-derivatization system for the determination of histamine in biological material by high-performance liquid chromatography. ***Anal. Biochem., 144,*** 98 (1985).

Almy, J., Ough, C.S., Crowell, E.A., Identification of two new volatile amines in wine. ***J. Agric. Food Chem., 31,*** 911 (1983).

AOAC - ***Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,*** 15ª edição, (editado por K. Helrich - Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VI), p.876 (1990).

Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M., Direct determination of biogenic amines in wine by integrating continuous flow clean-up and capillary electrophoresis with indirect UV detection. ***J. Chromatogr. A, 803,*** 249 (1998).

Arellano, M., Siméon, N., Puig, P., Couderc, F., Diverses applications de l'électrophorèse capillaire à l'analyse des vins. Dosage des acids organiques et inorganiques, de cations minéraux, des acides aminés et amines biogènes. ***J. Int. Sci. Vigne Vin, 31,*** 213 (1997).

Arlorio, M., Coïsson, J.D., Martelli, A., Ion-pair HPLC determination of biogenic amines and precursor amino acids. Application of a method based on simultaneous use of heptanesulphonate and octylamine to some foods. ***Chromatographia, 48,*** 763 (1998).

Arlorio, M., Coïsson, J.D., Martelli, A., Extraction methods for biogenic amines in wine and beer. ***Ital. J. Food Sci., 11,*** 355 (1999).

Bartók, T., Börcsök, Sági, F., RP-HPLC separation of polyamines after automatic FMOC-Cl derivatization and precolumn sample clean-up using column switching. ***J. Liq. Chromatogr., 15,*** 777 (1992).

Battaglia, R., Frölich, D., HPLC determination of histamine in wine. ***J. High Res. Chromatogr. Commun., 2,*** 100 (1978).

Baucom, T.L., Tabacchi, M.H., Cottrell, T.H., Richmond, B.S., Biogenic amine content of New York state wines. ***J. Food Sci., 51,*** 1376 (1986).

Bauza, T., Blaise, A., Daumas, F., Cabanis, J.C., Determination of biogenic amines and their precursor amino acids of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. ***J. Chromatogr. A, 707,*** 373 (1995).

Beljaars, P.R., Van Dijk, R., Jonker, K.M., Schout, J., Liquid chromatographic determination of histamine in fish, sauerkraut, and wine: interlaboratory study. ***J. AOAC Int., 81, 991*** (1998).

Bhâird, N.N., McCrodden, J.M., Wheatley, A.M., Harrington, M.C., Sullivan, J.P., Tipton, K.F., Determination of amines, amine metabolites and some metabolizing enzymes by high-performance liquid chromatography. ***Biomed. Chromatogr., 4,*** 229 (1990).

Blau, K., in: ***Clinical biochemistry - principles, methods, applications. Volume 1 - Mass spectrometry*** (editado por A.M. Lawson — Walter de Gruyter, Berlim, N. York), Cap. 3 - Biogenic amines, p. 129 (1989).

Bockhardt, A., Krause, I., Klostermeyer, H., Ocurrence of free amino acids and biogenic amines in raw milk cheese. ***Lebensmittelchemie, 49,*** 105 (1995).

Bockhardt, A., Krause, I., Klostermeyer, H., Determination of biogenic amines by RP-HPLC of the dabsyl derivates. ***Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 203,*** 65 (1996).

Busto, O., Valero, Y., Guasch, J., Borrull, F., Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. ***Chromatographia, 38,*** 571 (1994).

Busto, O., Mestres, M., Guasch, J., Borrull, F., Determination of biogenic amines in wine after clean-up by solid-phase extraction. ***Chromatographia, 40,*** 404 (1995a).

Busto, O., Guasch, J., Borrull, F., Improvement of a solid-phase extraction method for determining biogenic amines in wines. ***J. Chromatogr. A, 718,*** 309 (1995b).

Busto, O., Guasch, J., Borrull, F., Biogenic amines in wine: a review of analytical methods. ***J. Internat. Sci. Vigne Vin, 30,*** 85 (1996a).

Busto, O., Guasch, J., Borrull, F., Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. ***J. Chromatogr. A, 737,*** 205 (1996b).

Busto, O., Miracle, M., Guasch, J., Borrull, F., Solid phase extraction of biogenic amines from wine before chromatographic analysis of their AQC derivatives. ***J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 20,*** 743 (1997a).

Busto, O., Miracle, M., Guasch, J., Borrull, F., Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. ***J. Chromatogr. A, 757,*** 311 (1997b).

Buteau, C., Duitschaever, C.L., Ashton, G.C., A study of the biogenesis of amines in a Villard Noir wine. ***Am. J. Enol. Vitic., 35,*** 228 (1984a).

Buteau, C., Duitschaever, C.L., Ashton, G.C., High-performance liquid chromatographic detection and quantitation of amines in must and wine. ***J. Chromatogr., 284,*** 201 (1984b).

Callul, M., Marce, R.M., Fabregas, J., Borrul, F., Method for determination of histamine in wine by HPLC with pre-column derivatization with phenyl isothiocyanate. ***Chromatographia, 31,*** 133 (1991).

Carpino, L., Yan, G., 9-Fluorenylchloroformate, a new reagent for the protection of amino groups during peptide synthesis. ***J. Org. Chem., 37,*** 3404 (1972).

Cerutti, G., Recherche et dosage de l'histamine dans les vins. ***Feuillet Vert OIV, nº 562,*** (1975).

Cerutti, G, Cassa, W., Finoli, C., Vecchio, A., Ammine biogene nel vino. ***Vignevini,*** 35 (1986).

Cerutti, G., Margheri, G., Bongini, F., Sulla correlazione tra fermentazione malolattica ed ammine biogene vasoattive. ***Vignevini,*** 39 (1987).

Cerutti, G., Cavazza, A., Benco, S., Ceppo di lievito e produzione di ammine nella fermentazione del mosto d'uva. ***Vignevini, 18,*** 67 (1991).

Chaytor, J.P., Crathorne, B., Saxby, M.J., The identification and significance of 2-phenylethylamine in foods. ***J. Sci. Food Agric., 26,*** 593 (1975).

Cillliers, J.D., Van Wik, C.J., Histamine and tyramine content of South African wine. ***S. Afr. J. Enol. Vitic, 6,*** 35 (1985).

Colagrande, O., Casoli, A., Bonatti, A., Silva, A., Détermination de l'histamine dans les vins par chromatographie en phase liquide à haute pression. ***Feuillet Vert OIV, nº 768,*** (1983).

Crespo, M.I., Lasa, M.V., Determination of biogenic amines and other amines in wines by an optimized HPLC method with polarity gradient elution. ***Am. J. Enol. Vitic., 45,*** 460 (1994).

Daudt, C.E., Ough, C.S., A method for detecting volatile amines in grapes and wines. ***Am. J. Enol. Vitic, 31,*** 356 (1980).

Gennaro, M.C., Abrigo, C. Separation of food-related biogenic amines by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. Tyramine, histamine, 2-phenylethylamine, tryptamine and precursor aminoacids. ***Chromatographia, 31,*** 381 (1991).

Droz, C., Tanner , H., Determination of biogenic amines in wine by reversed-phase HPLC. ***Schweiz Z. Obst. Weinbau., 119,*** 75 (1983).

Etter, R., Dietrich, S., Battaglia, R., Bestimmung von biogenen aminen in lebensmitteln. ***Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg., 81,*** 106 (1990).

Fröhlich, D., Battaglia, R., HPLC analyse von biogenen aminen in wein. ***Mitt. Geb. Lebensmitt. Hyg., 71,*** 38 (1980).

Gennaro, M.C., Giacosa, D., Abrigo, C., Biglino, P., Campi, E., in***: Handbook of Food Analysis. Vol. 1 - Physical Characterization and Nutrient Analysis*** (editado por L.M.L. Nollet — Marcel Dekker, N. York), Cap. 20 - Organic bases, p. 745 (1996).

Glória, M, Watson, B., Simon-Sarkadi, L., Daeschel, M., A survey of biogenic amines in Oregon Pinot Noir and Cabernet Sauvignon. ***Am. J. Enol. Vitic., 49,*** 279 (1998).

Gutierrez, C., Rubio, S., Gómez-Hens, A., Valcárcel, M., Determination of histamine by derivative synchronous fluorescence spectrometry. ***Anal. Chem., 59,*** 769 (1987).

Hataro, H., Sumizu, K., Rokushika, S., Murakami, F., Automatic liquid chromatography of primary, mono and diamines on a cation-exchange resin. ***Anal. Biochem., 35,*** 377 (1970).

Henion, J.D., Nosanchuk, J.S., Bilder, B.M., Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of histamine in tuna fish causing scombroid poisoning. ***J. Chromatogr., 213,*** 475 (1981).

Ibe, A., Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Fujinuma, K., Nishima, T., Quantitative determination of amines in wine by liquid chromatography. ***J. AOAC Int., 74,*** 695 (1991).

Ingles, D.L., Back, J.F., Gallimore, D., Tindale, R., Shaw, K.J., Estimation of biogenic amines in foods. ***J. Sci. Food Agric., 36,*** 402 (1985).

Jandera, P., Ventura, K., Hladonoková, R., Churácek, J., Comparison of various sorbents for the enrichment of samples of aliphatic amines using solid-phase extraction prior to the determination by HPLC with fluorimetric detection. ***J. Liq. Chromatogr., 17,*** 69 (1994).

Joosten, H.M.L.J., Olieman, C., Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermo-sensitized reaction detection. ***J. Chromatogr., 356,*** 311 (1986).

Kataoka, H., Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. ***J. Chromatogr. A, 733,*** 19 (1996).

Kirschbaum, J., Luckas, B., Beinert, W.D., Pre-column derivatization of biogenic amines and amino-acids with fluoren-9-ylmethyl chloroformate and heptylamine. ***J. Chromatogr., 661,*** 193 (1994a).

Kirschbaum, J., Luckas, B., Beinert, W.D., Application of automated pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate for determination of biogenic amines and amino-acids in food. ***Dtsch. Lebensm. Rundsch., 90,*** 224 (1994b).

Kirschbaum, J., Busch, I., Brückner, H., Determination of biogenic amines in food by automated pre-column derivatization with 2-naphthyloxycarbonyl chloride (NOC-Cl). ***Chromatographia, 45,*** 263 (1997).

Kirschbaum, J., Meier, A., Brückner, H., Determination of biogenic amines in fermented beverages and vinegars by pre-column derivatization with *para*-nitrobenzyloxycarbonyl chloride (PNZ-Cl) and reversed-phase LC. ***Chromatographia, 49,*** 117 (1999).

Kovacs, A., Simon-Sarkadi, L., Ganzler, K., Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. ***J. Chromatogr. A, 836,*** 305 (1999).

Krause, I., Bockhardt, A., Neckermann, H., Henle, T., Klostermeyer, H., Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. ***J. Chromatogr. A, 715,*** 67 (1995).

Lafon-Lafourcade, S., Dosage d'histamine. ***Feuillet Vert OIV, nº 499*** (1974).

Lafon-Lafourcade, S., L'histamine des vins. ***Connaiss. Vigne Vin, 9,*** 103 (1975).

Large, P.J., Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. ***Yeast, 2,*** 1 (1986).

Lehtonen, P., Saarinen, M., Vesanto, M., Riekkola, M.L., Determination of wine amines by HPLC using automated precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. ***Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 194,*** 434 (1992).

Lin, J.K., Chang, J.Y., Chromophoric labeling of amino acids with 4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride. ***Anal. Chem., 47,*** 1634 (1975).

Lin, J., Lai, C., High performance liquid chromatographic determination of naturally ocurring primary and secondary amines with dabsyl chloride. ***Anal. Chem., 52,*** 630 (1982).

Mack, D., Determination of histamine in wine with the automatic amino acid analyser. ***Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 152,*** 321 (1973).

Mafra, I., Herbert, P., Santos, L., Barros, P., Alves, A., Evaluation of biogenic amines in some portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. ***Am. J. Enol. Vitic., 50,*** 128 (1999).

Mahendradata, M., Schwedt, G., Histaminbestimmung in lebensmitteln mittels kapillarelektrophorese und HPLC im vergleich. ***Deutsche Lebensm.-Rundschau, 92,*** 218 (1996).

Mahendradata, M., Schwedt, G., Sample preparation for photometric determination of histamine in foodstuffs compared with capillary electrophoresis. ***Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 206,*** 246 (1998).

Makita, M., Yamamoto, S., Kõno, K., Gas-liquid chromatographic analysis of protein amino acids as N-isobutyloxycarbonylamino acid methyl esters. ***J. Cromatogr., 120,*** 129 (1976).

Marquardt, P., Werringloer, H., Toxicity of wine. ***Food Cosm. Toxicol., 3,*** 803 (1965).

Mayer, K., Pause, G., Détermination des amines non volatiles dans le vin. ***Feuillet Vert OIV, nº 449*** (1973a).

Mayer, K., Pause, G., Dosage de l'histamine dans les vins. ***Feuillet Vert OIV, nº 441*** (1973b).

Mayer, K., Pause, G., Dosage des amines biogènes dans le vin par chromatographie en phase liquide a haute performance. ***Feuillet Vert OIV, nº 781*** (1984).

Monteiro, M.J.P., Bertrand, A., Validation d'une méthode de dosage. Application à l'analyse des amines biogènes du vin. ***Bull. OIV, 765-766,*** 917 (1994).

Mopper, B., Sciacchitano, C., Capillary zone electrophoretic determination of histamine in fish. ***J. AOAC Int., 77,*** 881 (1994).

Moret, S., Bortolomeazzi, R., Lercker, G., Improvement of extraction procedure for biogenic amines in foods and their high-performance liquid chromatographic determination. ***J. Cromatogr., 591,*** 175 (1992).

Moret, S., Conte, L.S., High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods – An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. ***J. Cromatogr. A, 729,*** 363 (1996).

Moye, H., Boning, A., Determination of aminoacids with 9-fluorenylchloroformate and reversed phase high performance liquid chromatography. ***Anal. Lett., 12,*** 25 (1979).

Mueller-Seitz, E., Reimerdes, E., Highly specific method for determination of biogenic amines in foods and wines. ***Lebensmittellchem. Gerichtl. Chem., 42,*** 10 (1988).

Muskiet, F, Dorhout, B., van den Berg, G., Hessels, J., Investigation of polyamine metabolism by high-performance liquid chromatography and gas chromatographic profiling methods. ***J. Chromatogr. B, 667,*** 189 (1995).

Nelson, L., Bubb, F., Lax, P., Weg, M., Sandler, M. An improved method for the differential assay of 3-O-methylated catecholamines in human urine using ion-pair extraction and gas chromatography electron capture detection. ***Clin. Chim. Acta, 92,*** 235 (1979).

Neurath, G.N., Dunger, M., Pein, F.G., Ambiosius, D., Schreiber, O., Primary and secondary amines in the human environment. ***Food Cosmet. Toxicol., 15,*** 275 (1977).

Nimura, N., Iwaki, K., Kinoshita, T., Takeda, K., Ogura, H., Activated carbamate reagent as derivatizing agent for amino compounds in high performance liquid chromatography. ***Anal. Chem., 58,*** 2372 (1986).

Nouadje, G., Couderc, F., Puig, Ph., Hernandez, L., Combination of micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorscence detection for the determination of pressor amines and some principal amino-acids in wine. ***J. Capillary Electrophor., 2,*** 117 (1995).

Nouadje, G., Siméon, N., Nertz, M., Couderc, F., Électrophorèse capillaire et détection par fluorescence induite par laser: différents montages de détection et leur application à l'analyse de très haute sensibilité d'amines et d'acides aminés. ***Analusis, 24,*** 360 (1996).

Nouadje, G., Siméon, N., Dedieu, F., Nertz, M., Puig, Ph., Couderc, F., Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. ***J. Chromatogr. A, 765,*** 337 (1997).

Ough, C., Measurement of histamine in californian wines. ***J. Agric. Food Chem., 19,*** 241 (1971).

Ough, C.S., Daudt, C.E., Quantitative determination of volatile amines in grapes and wines. I. Effect of fermentation and storage temperature on amine concentrations. ***Am. J. Enol. Vitic., 32,*** 185 (1981).

Ough, C.S., Daudt, C.E., Crowell, E.A., Identification of new volatile amines in grapes and wines. ***J. AOAC Int., 29,*** 938 (1981).

Ough, C.S., Crowell, E., Kunkee, R., Vilas, M., Lagier, S., A study of histamine production by various wine bacteria in model solutions and in wine. ***J. Food Process. Preserv., 12,*** 63 (1987).

Petridis, K.D., Steinhart, H., Automated precolumn derivatisation o-phthaldialdehyde (OPA); a new RP-HPLC method for the determination of biogenic amines in food. ***Z. Lebensm. Unters-Forsch., 201,*** 256 (1995).

Pfeiffer, P., Determination of biogenic amines in wine by high-performance liquid chromatography following solid-phase extraction. ***Deutsche Lebensm.-Rundsch., 92,*** 39 (1996).

Pfeiffer, P., Radler, F., Determination of ethanolamine in wine by HPLC after derivatization with 9-fluorenyl--methoxycarbonylchloride. ***Am. J. Enol. Vitic., 43,*** 315 (1992).

Pfeiffer, R., Greulich, H.G., Erbersdobler, H., Determination of biogenic amines in wine with an amino-acid analyser. ***Lebensmittelchem Gerichtl Chem. Sep., 40,*** 118 (1986).

Pfundstein, B., Tricker, A.R., Theobald, E., Spiegelhalder, B., Preussmann, R., Analysis of primary and secondary amines in foodstuffs using gas chromatography and chemoluminescence detection with a modified thermal energy analyser. ***J. Chromatogr., 539,*** 141 (1991a).

Pfundstein, B., Tricker, A.R., Theobald, E., Spiegelhalder, B., Preussmann, R., Mean daily intake of primary and secondary amines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. ***Food Chem. Toxicol., 29,*** 733 (1991b).

Plumas, B., Sautier, C., Méthode de dosage simultanée de l'histidine et de l'histamine dans les liquides biologiques. Application aux vins. ***Ann. Fals. Chim., 65,*** 323 (1972).

Puputti, E., Suomalainen, H., Über die biogenen Amine der Weine. ***Mitt. Klosterneuburg, 19,*** 184 (1969) *(citado por Ough, 1971).*

Quevauviller, A., Mazière, M., Recherche et dosage biologique de l'histamine dans les vins. ***Annales Pharmaceut. Françaises, 27,*** 411 (1969).

Rauch, P., Rychetsky, P., Hochel, I., Bilek, R., Guesdon, J.L., Enzyme immunoassay of histamine in foods. ***Food Agric. Immunol., 4,*** 67 (1992).

Rivas-Gonzalo, J.C., Garcia, C., Gomez, A., Mariné-Font, A., Spectrofluorometric determination and thin layer chromatographic determination of tyramine in wine. ***J. AOAC Int., 62,*** 272 (1979).

Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Hernandez, J.F., Mariné-Font, A., Study of the evolution of tyramine content during the vinification process. ***J. Food Sci., 48,*** 417 (1983).

Roberts, M., Adam, H., New methods for the quantitative estimation of free and conjugated histamine in the body fluids. ***Br. J. Pharmacol. Chemother., 5,*** 526 (1950) *(citado por Quevauviller e Mazière, 1969).*

Rodrigues, L., Implementação de um método de HPLC para o doseamento de histamina em conservas de peixe. Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (1998).

Rogers, P.L., Staruszkiewicz Jr., Gas chromatographic method for putrescine and cadaverine in canned tuna and mahimahi and fluorometric method for histamine (Minor modification of AOAC official method 977.13): collaborative study. ***J. AOAC Int., 80,*** 591 (1997).

Romero, R., Gásquez, D., Bagur, M.G., Sánchez-Viñas, M., Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. ***J. Chromatogr. A, 871,*** 75 (2000).

Romero, R., Sánchez-Viñas, M., Gásquez, D., Bagur, M.G., Cuadros-Rodríguez, L., Robustness study for the determination of biogenic amines by HPLC. ***Chromatographia, 53,*** 481 (2001).

Rose Jr, D.J., Jorgenson, J.W., Post-capillary fluorescence detection in capillary zone electrophoresis using *o*-phthaldialdehyde. ***J. Chromatogr., 447,*** 117 (1988).

Roth, M., Fluorescence reaction for amino acids. ***Anal. Chem., 43,*** 880 (1971).

Saint-Blanquat, G., Derache, R., Présence de l'histamine dans le vin. ***Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier, 28,*** 23 (1968).

Sanchez-Rodas, D., Hohaus, E., Wenclawiak, B., High-performance liquid chromatographic determination of primary amines in aqueous solutions after extraction and derivatization with 2,2-diphenil-1-oxa-3-oxonia-2-boratanaphthalene (DOOB). ***Fresenius J. Anal. Chem., 355,*** 187 (1996).

Sass-Kiss, A., Szerdahelyi, E., Hajós, G., Study of biologically active amines in grapes and wines by HPLC. ***Chromatographia, 51,*** S-316, (2000).

Sayem-El-Daher, N., Simard, D.E., L'Heureux, L., Roberge, A.G., Determination of mono-, di- and polyamines in foods using a single column amino acid auto-analyzer. ***J. Chromatogr., 276,*** 45 (1983).

Seiler, N., in: ***Handbook of Derivatives for Chromatography,*** 2ª edição (Editado por K. Blau e J. Halket — J. Wiley & Sons, London), Cap. 9 - Fluorescence derivatives, p. 175 (1993).

Seiler, N., Knödgen, B., Determination of polyamines and related compounds by reversed-phase liquid chromatography. ***J. Chromatogr., 339,*** 45 (1985).

Sen, N.P., Analysis and significance of tyramine in foods. ***J. Food Sci., 34,*** 22 (1969).

Sherma, J., Raible, D., Brubaker, K., Determination of histamine in wines by quantitative HPTLC. ***J. Planar Chromatogr., 4,*** 253 (1991).

Shore, P., Burkhalter, A., Cohen, V., A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. ***J. Pharmacol. Exp. Ther., 127,*** 182 (1959) *(citado por Taylor, 1986).*

Shore, P., Fluorimetric assay of histamine. ***Methods Enzymol., 17B,*** 842 (1971) *(citado por Taylor, 1986).*

Singer, G.M., Lijinski, W., Naturally ocurring nitrosable compounds. I - Secondary amines in foodstuffs. ***J. Agric. Food Chem., 24,*** 550 (1976).

Slemr, J., Beyermann, K., Determination of biogenic amines in meat by combined ion-exchange and capillary gas chromatography. ***J. Chromatogr., 283,*** 241 (1984).

Soleas, G.J., Carey, M., Goldberg, M., Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wine. ***Food Chem., 64,*** 49 (1999).

Staruszkiewicz Jr., Fluorometric determination of histamine in tuna: collaborative study. ***J. AOAC Int., 60,*** 1131 (1977).

Staruszkiewicz Jr., W.F., Bond, J.F., Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine, and histamine in foods. ***J. AOAC Int., 64,*** 584 (1981).

Staruszkiewicz Jr., W.F., Waldron, E.M., Bond, J.F., Fluorometric determination of histamine in tuna: development of method. ***J. AOAC Int., 60,*** 1125 (1977).

Sternson, L., in: ***Chemical Derivatization in Analytical Chemistry, Vol. 1: Chromatography*** (Editado por R. Frei e J. Lawrence — Plenum Press, N. York), Cap. 3 - General aspects of precolumn derivatization with emphasis on pharmaceutical analysis, p. 127 (1981).

Subden, R.E., Brown, R.G., Noble, A.C., Determination of histamines in wines and musts by reversed-phase high-performance liquid chromatography. ***J. Chromatogr., 166,*** 310 (1978).

Subden, R.E., Duitschaever, C.L., Kaiser, K., Noble, A.C., Histamine content of canadian wines determined by reversed-phase liquid chromatography. ***Am. J. Enol. Vitic., 30,*** 19 (1979).

Tarantola, G., Separazione e identificazione cromatographica degli amino acid nei vini. ***Atti. Accad. Ital. Vite Vino, 6,*** 146 (1954).

Tarrach, F., Bestimmung geringer mengen histamin in wein und sekt. ***Deutsche Lebensmitt.-Rundsc., 91,*** 73 (1995).

Taylor, S., Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. ***CRC Crit. Rev. Toxicol., 17,*** 91 (1986).

Taylor, S., Lieber, E., Specificity and sensitivity of seven histamine detection methods. ***J. Food Sci., 42,*** 1584 (1977).

Tricard, C., Dosage de l'histamine dans les vins par spectrofluorimétrie. ***Feuillet Vert OIV, nº 767*** (1983).

Tricard, C., Cazabeil, J.M., Salagoity, M.H., Dosage des amines biogenes dans les vins par HPLC. ***Analusis, 19,*** M53 (1991).

Tricard, C., Sudraud, P., Dosage semi-quantitatif de l'histamine dans les vins. ***Feuillet Vert OIV, nº 764*** (1982a).

Tricard, C., Sudraud, P., Dosage semi-quantitatif de quelques amines biogènes dans les vins. ***Feuillet Vert OIV, nº 765*** (1982b).

Tricard, C., Sudraud, P., Teneurs en amines biogènes de quelques vins. ***Feuillet Vert OIV, nº 766*** (1982c).

Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Weigele, M., Fluorescamine: a reagent assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range. ***Science, 178,*** 871 (1972).

Umagat, H., Kucera, P., Wen, L.F., Total amino acid analysis using pre-column fluorescence derivatization. ***J. Chromatogr., 239,*** 463 (1982).

Vandekerckhove, P., Henderickx, H., A simple method for the separation of primary mono and diamines using a standard amino acid analyzer. ***J. Chromatogr., 82,*** 379 (1973).

Vechio, A., Finoli, C., Cerutti, G., Möller, F., Ammine biogene in vini italiani. ***Vignevini, 16,*** 57 (1989).

Vidal-Carou, M.C., Izquierdo-Pulido, M.L., Mariné-Font, A., Spectrofluorometric determination of histamine in wines and other alcoholic beverages. ***J. AOAC Int., 72,*** 412 (1989a).

Vidal-Carou, M.C., Isla-Gavin, M.J., Mariné-Font, A., Codony-Salcedo, R., Histamine and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider and vinegar. ***J. Food Composit. Analysis, 2,*** 219 (1989b).

Vidal-Carou, Ambatlle-Espunyes, A., Ulla-Ulla, M.C., Mariné-Font, A., Histamine and tyramine in spanish wines: their formation during the winemaking process. ***Am. J. Enol. Vitic., 41,*** 160 (1990a).

Vidal-Carou, M.C., Codony-Salcedo, R., Mariné-Font, A., Histamine and tyramine in spanish wines: relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. ***Food Chem., 35,*** 217 (1990b).

Vidal-Carou, M.C., Codony-Salcedo, R., Mariné-Font, A., Changes in the concentration of histamine and tyramine during wine spoilage at various temperatures. ***Am. J. Enol. Vitic., 42,*** 145 (1991).

Walther, H., Schlunegger, U.P., Friedli, F., Profiling and quantification of biogenic amines in wine by constant B2E linked scan mass spectrometry. ***Biomed. Environm. Mass Spectrom., 14,*** 229 (1987).

Wheatley, A.M, Tipton, K.F., Determination of tyramine in alcoholic and nonalcoholic beers by high-performance liquid chromatography. ***J. Food Biochem., 11,*** 133 (1987).

Woidich, H., Pfannhauser, W., Blaicher, G., Pechanek, U., Beitrag zur Untersuchung von biogenen aminen in rot und weiβweinen. ***Mitt. Klosterneuburg, 30,*** 27 (1980) *(citado por Radler e Fäth, 1992).*

Yamamoto, S., Kakuno, K., Okahara, S., Kataoka, H., Makita, M., Gas chromatography of phenolic amines, 3-methoxycatecholamines, indoleamines and related amines as their N,O-ethyloxycarbonyl derivatives. ***J. Cromatogr., 194,*** 399 (1980).

Yamamoto, S., Itano, H., Kataoka, H., Makita, M., Gas-liquid chromatographic method for analysis of di and polyamines. ***J. Agric. Food Chem., 30,*** 435 (1982).

Zappavigna, R., Brambati, E., Cerutti, G., Ricerca e determinazioni delle amine non volati in vini, succhi, birra e aceto. ***Riv. Viticolt. Enol., 27,*** 285 (1974).

Zee, J.A., Simard, R.E., Roy, A., A modified automated ion-exchange method for the separation and quantitation of biogenic amines. ***Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 14,*** 71 (1981).

PARTE EXPERIMENTAL

INTRODUÇÃO

A presença de aminas biogénicas em vinhos representa, como pensamos ter ficado bem visível nos capítulos precedentes, um factor negativo no que respeita à qualidade dos vinhos, entendida esta no seu sentido mais global. Pese embora o grande empenhamento de muitos investigadores, em especial dos oriundos de países com tradições vitivinícolas, no desenvolvimento de trabalhos conducentes a uma completa caracterização do fenómeno, em particular no que respeita à identificação dos factores associados à formação dos referidos compostos, continuavam, à data do início do nosso trabalho, e continuam, ainda hoje, a ser muitos os pontos por esclarecer.

Tendo-nos sido dada a possibilidade de darmos o nosso contributo nesta área e, tendo em atenção os meios técnicos que nos foram disponibilizados, a nossa acção obedeceu, como já foi referido na Introdução Geral, a dois vectores fundamentais. 1. Desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de permitir uma correcta quantificação das aminas biogénicas de interesse presentes nos vinhos e na respectiva matéria-prima, o mosto ou sumo de uvas. 2. Aplicação das metodologias desenvolvidas a amostras representativas de mostos monovarietais usados na elaboração de vinhos do Porto, aos respectivos vinhos monovarietais e a vinhos do Porto envelhecidos em diferentes

condições ambientais, correspondentes aos dois principais tipos do produto sujeitos a comercialização: vinhos do Porto "Tawny" e vinhos do Porto "Vintage".

No que se refere ao primeiro vector, respeitante ao desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação das aminas biogénicas neste tipo de matrizes, dois caminhos alternativos se perfilavam como hipóteses de trabalho. Por um lado, a adopção de metodologias baseadas na técnica de HPLC, amplamente usadas pela quase totalidade dos autores com trabalho nesta área, como se referiu no capítulo 2. Alternativamente, o desenvolvimento de metodologias baseadas na técnica de GC-MS, praticamente inexploradas nesta área mas potencialmente capazes de serem aplicadas com êxito.

A escolha feita, que consistiu no desenvolvimento deste último tipo de metodologias, teve como base alguns critérios de ordem racional e científica, designadamente:

1. As dificuldades descritas por muitos autores com trabalhos baseados em metodologias de HPLC em conseguir uma boa separação cromatográfica de um número elevado de aminas biogénicas neste tipo de matrizes complexas. Estas dificuldades, já salientadas no capítulo 2, reflectem-se directamente na extensa lista de diferentes metodologias propostas e também na inconsistência de alguns dos resultados obtidos, muitos dos quais, numa primeira análise, parecem ser afectados por erros analíticos ao nível da correcta identificação de algumas das aminas biogénicas.

2. O facto de se pretender trabalhar com matrizes mais complexas do que a generalidade dos vinhos — mostos e vinhos do Porto — caracterizadas pelo seu elevado teor em açúcares, logo mais exigentes do ponto de vista analítico.

3. A pretensão de abranger no estudo o maior número possível de aminas biogénicas, incluindo algumas habitualmente referidas como estando presentes em quantidades muito diminutas e outras normalmente "esquecidas" nos trabalhos realizados, de forma a caracterizar o melhor possível as amostras em estudo.

4. O facto de não estarem implementadas nesta área dos vinhos, assim como das restantes matrizes alimentares, em geral metodologias de referência capazes de ser

aplicadas a quaisquer tipo de amostras, por mais complexas e difíceis que se apresentem, capazes de dar uma contribuição decisiva para o esclarecimento definitivo de muitas dúvidas ainda em aberto.

A aposta feita no desenvolvimento de metodologias baseadas na técnica de GC-MS não deixou também de ser um reflexo directo das nossas próprias convicções quanto às imensas potencialidades da referida técnica quando aplicada a processos de quantificação multiparamétricos, destes como de outros tipos de compostos, em matrizes de grande complexidade como o são os alimentos, na sua generalidade, funcionando neste caso os vinhos e a respectiva matéria-prima como exemplo representativo desse tipo de matrizes. Cientes de que se trata de uma técnica dispendiosa, em especial ao nível do investimento inicial na aquisição dos equipamentos, pensamos que, precisamente por isso, se impõe uma exploração profunda e rigorosa de todas as suas potencialidades de forma a potenciar o melhor possível a sua rendibilidade e a justificar plenamente o referido investimento. As exigências colocadas pela técnica em si mesmo — na escolha dos processos mais adequados para a preparação das amostras e extracção dos compostos a estudar, na necessidade de se recorrer a processos com bom rendimento e grande reprodutibilidade para a derivatização dos compostos, na criteriosa escolha dos padrões internos a usar, nos diversos cuidados que exige ao operador a nível da operação e da manutenção do sistema em óptimas condições — constituem um desafio a todos os que trabalham na área da química analítica e não podem servir senão de um incentivo acrescido para o desenvolvimento de metodologias capazes de ultrapassar obstáculos de outra forma difíceis de serem superados. Acresce o facto de o "ambiente" intelectual que rodeia a elaboração duma dissertação de doutoramento, com a exigência acrescida de um trabalho rigoroso, tanto a nível de execução laboratorial como de explanação do trabalho desenvolvido e dos resultados obtidos, nos ter parecido o terreno propício para o desenvolvimento de trabalho que viesse a constituir um sinal de incentivo e de encorajamento para todos os que, na área da química alimentar, se deparem com a necessidade de usar metodologias baseadas neste tipo de técnica.

Uma vez delineadas as linhas de força principais do estudo a desenvolver, foi o mesmo afectado por vicissitudes várias, inerentes ao próprio desenvolvimento dos trabalhos e aos resultados que entretanto foram sendo obtidos, e que acabaram por ditar um rumo diferente daquele que inicialmente tinha sido por nós traçado.

A nossa intenção inicial, porventura demasiado optimista mas não totalmente desprovida de sentido, como os resultados finais, em parte, acabaram por demonstrar, foi a de desenvolver uma única metodologia capaz de permitir a análise da grande maioria, senão da totalidade, das aminas biogénicas de interesse presentes nas matrizes em estudo. Uma análise cuidada da literatura disponível associada à nossa recente experiência anterior, concretizada no estabelecimento de uma metodologia analítica aplicada à quantificação em produtos alimentares de um composto com algumas características similares à de algumas das aminas biogénicas – o 4-(5-)metilimidazol – [Fernandes e Ferreira, 1997]*, levou-nos a tomar a decisão de desenvolver os trabalhos no sentido de estabelecer um protocolo analítico baseado nas seguintes etapas fundamentais:

1. Extracção das aminas das matrizes em estudo por meio de um processo de par-iónico baseado no carácter básico das aminas, com o recurso ao hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo), dissolvido em clorofórmio, como agente extractor.

2. Derivatização dos compostos extraídos com cloroformato de isobutilo, efectuada directamente sobre o extracto aquoso (clorídrico) obtido.

3. Determinação quantitativa dos derivados formados por GC-MS no modo de monitorização selectiva de iões.

As indicações aparentemente positivas dadas pelos primeiros ensaios efectuados, tanto no que respeita ao método de extracção usado como ao processo de derivatização e subsequente análise cromatográfica, levaram-nos, infelizmente, a caminhar durante muito tempo numa direcção que, como veremos adiante, acabamos mais tarde por verificar não ser a mais correcta.

No que respeita ao processo de extracção usado — um método baseado na acção de um reagente de par-iónico, inicialmente desenvolvido por investigadores suecos (ver citações no capítulo 4) para a extracção de compostos orgânicos com características básicas, mas nunca antes aplicado a este tipo de matrizes nem sequer a muitos (a quase totalidade) dos compostos que nos propúnhamos

* Ver referência bibliográfica no capítulo 4.

estudar — os resultados inicialmente obtidos foram de molde a deixar-nos inteiramente satisfeitos e convencidos da sua extrema utilidade para este tipo de trabalho. Com efeito, o método apresentou um excelente rendimento para a generalidade das aminas biogénicas estudadas e os extractos obtidos apresentaram-se isentos ou praticamente isentos de muitos dos potenciais interferentes presentes neste tipo de matrizes, nomeadamente de açúcares, como se pôde comprovar pela análise de extractos por uma técnica de HPLC apropriada, de polifenóis e, em grande medida, de aminoácidos.

No que respeita ao uso de cloroformato de isobutilo como reagente derivatizante, a metodologia inicialmente desenvolvida, a qual foi durante muito tempo alvo de um trabalho gradual de optimização no sentido de se conseguir alcançar as melhores condições experimentais para a generalidade dos compostos, apresentou-se "perigosamente" sedutora em virtude de uma série de factores, a saber:

- Rapidez e facilidade de execução (a reacção de derivatização tinha lugar à temperatura ambiente e era praticamente instantânea; uma simples extracção com clorofórmio era suficiente para os derivados obtidos serem injectados no sistema cromatográfico).

- Fácil interligação com o processo de extracção usado (para a reacção de derivatização era usada directamente uma alíquota do extracto clorídrico obtido no processo de extracção, sem necessidade de se recorrer a nenhuma etapa de evaporação).

- Excelente comportamento cromatográfico da generalidade dos derivados obtidos, os quais davam origem a picos com muita boa definição, facilitando o trabalho correspondente à respectiva integração.

- Possibilidade de análise simultânea de um grande número das aminas biogénicas de interesse (ainda assim, este constituiu durante algum tempo o maior problema associado ao método, pois o mesmo não possibilitava a análise de alguns dos compostos alvo desta investigação: metilamina e dimetilamina, pela extrema volatilidade dos derivados obtidos; histamina, pelo baixo rendimento da reacção; espermidina e espermina, neste caso pela muito diminuta volatilidade dos respectivos derivados).

O grande problema associado ao uso da metodologia em causa teve a ver, contudo, com as manifestações de falta de reprodutibilidade, que se foram fazendo notar de uma forma extremamente irregular e, por isso, demoraram algum tempo a ser totalmente caracterizadas. Essa falta de reprodutibilidade dizia respeito apenas às aminas menos voláteis (diaminas e tiramina, essencialmente) enquanto para as restantes os resultados continuavam a caracterizar-se pela sua boa qualidade. Segundo cremos, tinha como motivo a acção agressiva do excesso do reagente derivatizante para com a coluna cromatográfica e restantes partes do aparelho passíveis de contactar com a amostra injectada. O facto do problema se manifestar, algumas vezes, ao fim de um pequeno número de injecções, mas, outras vezes, depois de uma limpeza adequada do sistema cromatográfico, apenas ao fim de algumas dezenas de injecções, fez com que durante muito tempo acreditássemos, erradamente, que as causas seriam outras e daí o tempo que infrutiferamente foi perdido no sentido de, persistentemente, as tentar ultrapassar.

Este fracasso da estratégia inicialmente delineada levou-nos, então, à procura de alternativas para o trabalho que nos propuséramos efectuar. Estas passaram, basicamente, pela associação do processo de extracção desenvolvido a processos de derivatização clássicos para este tipo de compostos, embora apenas esporadicamente aplicados a matrizes alimentares. Passaram também pelo uso de padrões internos adequados, capazes de mascarar as dificuldades causadas pelo elevado número de etapas dos procedimentos analíticos estabelecidos e de proporcionar resultados analíticos de boa qualidade. O resultado foi o estabelecimento de duas metodologias distintas dedicadas, a primeira, à determinação de diaminas, poliaminas e aminas aromáticas, e, a segunda, à determinação de histamina. A sua explicação detalhada bem como os resultados obtidos na sua validação é feita nos capítulos 4 e 5, que se seguem a um capítulo inteiramente dedicado à descrição dos materiais e dos reagentes usados. No capítulo 4 são referidos também os estudos de optimização do processo de extracção usado, comum a ambos os métodos.

Finalmente, e depois de cerca de um ano em que o trabalho experimental executado foi residual, devido a uma série de avarias consecutivas do equipamento até aí usado, (e se, como diz o ditado, tudo o que é mau tem o seu lado positivo, neste caso permitiu-nos debruçar com mais profundidade sobre as possibilidades de contornar os problemas anteriormente referidos) deu-se o regresso ao uso do cloroformato de isobutilo como agente derivatizante, agora através de um metodologia analítica diferente, baseada num processo bifásico com tolueno, capaz de dispensar a

fase prévia de extracção dos compostos. A metodologia estabelecida, embora menos interessante do que a original em termos de simplicidade de execução, acabou por se aproximar bastante daquele que era o objectivo inicial, ao permitir a quantificação da generalidade das aminas de interesse, excepção feita à espermidina e à espermina. Aos processos de derivatização com cloroformato de isobutilo é dedicado o capítulo 6, onde é feita uma descrição dos trabalhos de optimização efectuados e são apresentados os resultados obtidos na validação da metodologia finalmente estabelecida.

No que se refere ao segundo vector por que se orientou o trabalho realizado, ou seja, à aplicação dos procedimentos analíticos estabelecidos às amostras de mosto e de vinhos do Porto previamente seleccionadas, pode afirmar-se ter o trabalho experimental decorrido sem "sobressaltos" de maior, com excepção do facto da grande maioria das amostras ter sido analisada pelo método inicialmente desenvolvido com cloroformato de isobutilo, tendo os resultados obtidos nessas determinações sido rejeitados posteriormente na sua totalidade. Os resultados finalmente obtidos bem como o tratamento estatístico efectuado com base nos mesmos são apresentados nos capítulos 7 e 8.

CAPÍTULO 3

REAGENTES E EQUIPAMENTOS USADOS NA EXECUÇÃO DA PARTE EXPERIMENTAL DESTA DISSERTAÇÃO

3.1. Reagentes
- 3.1.1. Padrões de aminas
- 3.1.2. Padrões internos deuterados
- 3.1.3. Outros padrões internos
- 3.1.4. Reagentes derivatizantes
- 3.1.5. Outros reagentes
- 3.1.6. Reagentes usados no método de HPLC
- 3.1.7. Gases

3.2. Equipamentos
- 3.2.1. Sistemas de GC-MS
- 3.2.2. Sistema de HPLC
- 3.2.3. Outra aparelhagem
- 3.2.4. Consumíveis

3.1. Reagentes

3.1.1. Padrões de aminas

Para a preparação das soluções padrão das aminas em estudo usaram-se reagentes com o maior grau de pureza comercialmente disponíveis, alguns dos quais na sua forma livre e outros na sua forma hidroclorada. Amilamina, 1,6-diaminohexano.2HCl, dietilamina.HCl, dimetilamina.HCl, espermidina.3HCl, espermina.4HCl, feniletilamina.HCl, isopropilamina, isobutilamina, hexilamina, morfolina, piperidina.HCl, pirrolidina e propilamina foram fornecidos pela firma Aldrich (Milwaukee, WI, Estados Unidos)*. Butilamina, etilamina.HCl, metilamina.HCl foram fornecidos pela firma Fluka (Buchs, Suíça). Cadaverina.2HCl, 1,3-diaminopropano.2HCl, histamina.2HCl, isoamilamina, 2-metilbutilamina, putrescina.2HCl, tiramina.HCl foram fornecidos pela firma Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos). Após a primeira utilização, os reagentes foram conservados em atmosfera de azoto,

*Todos os reagentes das marcas Aldrich, Fluka e Sigma foram obtidos por intermédio da representação em Espanha do consórcio actualmente responsável por aquelas marcas: Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha).

à temperatura indicada pelo fabricante (dentro de um exsicador, no caso dos reagentes guardados à temperatura ambiente).

De cada um dos compostos, prepararam-se soluções a 2 g/L (composto livre) em solução aquosa de HCl 0,1 M, que foram armazenadas no frigorífico, a 4 °C, em frascos silanizados de 5 mL providos de rolha com membrana de Teflon®. A preparação de soluções diluídas com a concentração requerida pela metodologia em causa foi feita no momento da análise.

3.1.2. Padrões internos deuterados

Os compostos deuterados usados como padrões internos nas diferentes metodologias — [$^2H_5$] Etilamina, [α,α,β,β-$^2H_4$]Histamina, [$^2H_3$]Metilamina, [$^2H_8$]Pirrolidina e [$^2H_8$]Putrescina (todos na forma hidroclorada, com excepção da pirrolidina) — foram fornecidos pela firma CDN Isotopes (Quebec, Canadá), por intermédio da firma Interchim (Montluçon, França). A exemplo dos padrões de aminas, prepararam-se soluções a 2 g/L de cada (composto livre) em solução aquosa de HCl 0,1 M, e guardaram-se a 4 °C em frascos silanizados do mesmo tipo. A preparação de soluções de trabalho diluídas com a concentração requerida pela metodologia em causa foi feita no momento de utilização.

3.1.3. Outros padrões internos

Os restantes padrões internos utilizados foram adquiridos na Aldrich — 1,7-diaminoheptano.2HCl, *N*-(3-aminopropil)-1,3-propanodiamina [nor-espermidina] e *N*,*N*'-bis(-(3--aminopropil)-1,3-propanodiamina [nor-espermina] — e na Sigma — anfetamina e heptilamina.

A preparação de soluções destas substâncias foi feita como indicado acima.

3.1.4. Reagentes derivatizantes

Os reagentes derivatizantes usados nas metodologias de GC-MS desenvolvidas — anidrido heptafluorobutírico (HFBA), brometo de perfluorobenzilo (PFBBr) e cloroformato de isobutilo — foram fornecidos pela Aldrich, os dois primeiros, e pela Sigma, o terceiro, tendo sido armazenados a 4 °C. No caso do PFBBr, a respectiva solução de trabalho (uma solução a 25 % em acetonitrilo) foi preparada diariamente no momento da sua utilização.

3.1.5. Outros reagentes

A solução aquosa de HCl 0,1 M usada em várias etapas do trabalho experimental, em especial na preparação das soluções padrão das aminas em estudo e no processo de extracção por par-iónico, foi adquirida, já com a concentração referida, na Fluka, tendo diso armazenada no frigorífico, a 4 °C. Para a preparação de soluções diluídas de NaOH usaram-se soluções do composto em concentrações 10 M e 2 M, também fornecidas pela Fluka, as quais foram igualmente armazenadas no frigorífico, a 4 °C.

A *N*-diisopropiletilamina foi fornecida pela Aldrich e armazenada a 4 °C. A respectiva solução de trabalho (solução a 10 % numa mistura de acetonitrilo:isopropanol 1:1) foi preparada diariamente no momento da sua utilização.

O reagente de par-iónico hidrogenofosfato de bis-(2-etil-hexilo) foi fornecido pela Aldrich. A respectiva solução de trabalho (uma solução 0,1 M em clorofórmio) foi também preparada diariamente no momento da sua utilização.

O acetato de etilo, o acetonitrilo, o clorofórmio, o diclorometano, o isopropanol, o metanol e o tolueno (todos com pureza ≥ 99,5% e protegidos da humidade por crivo molecular[*]) foram adquiridos à Fluka.

[*] Over molecular sieve, na designação anglo-saxónica

Os sais de fosfatos usados na preparação de tampões foram adquiridos à Merck (Darmstad, Alemanha) com um grau de pureza correspondente à designação p.a. O NaOH usado na preparação da solução de metanol alcalino teve idêntica origem e a pureza era também a mesma.

O Carbowax 1000 ou polietilenoglicol 1000 foi adquirido à Fluka.

A água usada na generalidade do trabalho, em particular na preparação de soluções dos reagentes usados, de tampões, de soluções de ácidos e bases, etc., foi água destilada sujeita a um processo de desionização num aparelho apropriado (Seralpur Pro 90 CN).

3.1.6. Reagentes usados no método de HPLC

Os padrões utilizados de ácido láctico, ácido acético, ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico e ácido cítrico foram fornecidos pela Fluka e pela Aldrich. Todos eles apresentavam uma pureza superior a 98 %. O padrão interno utilizado, o ácido benzilmalónico, foi também fornecido pela marca Fluka.

A resina de troca catiónica Dowex-50W-X8 (100-200 mesh) foi adquirida na Fluka. Esta resina foi activada por uma sequência de lavagens, com metanol, água destilada, ácido clorídrico 0,1 M e novamente água destilada.

O reagente derivatizante usado — *O*-(4-nitrobenzil)-*N,N'*-diisopropilisourea — foi fornecido por três diferentes empresas: Sigma, Fluka e Regis (Morton Grove, IL, EUA). O reagente da Fluka tinha um grau de pureza superior a 90 %, enquanto nos outros casos o grau de pureza não era mencionado. Nos três casos, o reagente foi usado sem qualquer processo adicional de purificação.

Os eluentes utilizados no processo cromatográfico — acetonitrilo, de grau Lichrosolv, adquirido na Merck (Darmstadt, Alemanha) e água (idêntica à atrás referida) — foram filtrados por uma membrana de 0,22 μm de porosidade da marca Shleicher & Schull (Dassel, Alemanha) e desgaseificados por um sistema de vácuo, durante 15 minutos. O dioxano também foi adquirido à Merck, apresentando um grau pureza p.a..

3.1.7. Gases

Como gás de arraste nos processos de cromatografia gasosa usou-se hélio do tipo N60, que corresponde ao mais alto grau de pureza daquele gás que se encontra comercialmente disponível: 99,9999 % de pureza. Para a evaporação das amostras usou-se azoto do tipo alphagaz 2, com um grau de pureza de 99,9995 %. Ambos os gases foram fornecidos pela Ar-Líquido (Maia, Portugal).

3.2. Equipamentos

3.2.1. Sistemas de GC-MS

Na execução deste trabalho usaram-se dois aparelhos distintos de GC-MS, ambos da marca Hewlett-Packard (HP; Palo Alto, CA, Estados Unidos).

O primeiro era constituído por um cromatógrafo de gases, modelo HP GC-5890, equipado com um injector do tipo "split-splitless" e associado a um detector selectivo de massa, modelo HP MSD-5970B. O injector estava equipado com um septo pré-furado de 9 mm de diâmetro, um "insert" de 4 mm de diâmetro interno e 8 cm de comprimento, com uma constrição em cada umas extremidades, e um divisor de fluxo revestido com um banho de ouro; as duas primeiras peças, septo e insert, foram substituídas após cada série de injecções – padrões mais amostras – o que, em regra, correspondeu a cerca de 30-40 injecções; a outra peça, divisor do fluxo, foi substituída com menor periodicidade, em função da observação visual do seu aspecto. A ligação do cromatógrafo de gases ao detector de massa era feita através de uma interface directa sujeita a aquecimento, 280 °C em regra, no interior da qual era colocada a extremidade da coluna cromatográfica. O aparelho estava acoplado a um sistema de controlo, aquisição e tratamento de dados fornecido pela HP – "MS Chemstation software G1034" – instalado num computador HP Vectra XM 5/120. Este sistema foi usado no desenvolvimento e na aplicação a todas as amostras estudadas das metodologias analíticas baseadas no uso de anidrido heptafluorobutírico e de brometo de perfluorobenzilo como reagentes derivatizantes. Foi também usado, durante grande parte do processo de desenvolvimento da metodologia analítica baseada no uso de cloroformato de isobutilo como reagente derivatizante.

O segundo aparelho, adquirido em Agosto de 2000 pelo Serviço de Bromatologia da FFUP, e que foi fundamental para a conclusão da parte experimental desta dissertação, tendo em conta a inoperacionalidade entretanto verificada com o aparelho anterior, era constituído por um cromatógrafo de gases, modelo HP GC-6890, equipado com um injector "split-splitless" e com um sistema electrónico de controlo do fluxo gasoso e associado a um detector selectivo de massa, modelo Agilent* MSD-5973N. As peças móveis do injector eram iguais às referidas para o outro aparelho e a sua substituição feita com os mesmos critérios anteriormente assinalados. A ligação do cromatógrafo de gases ao detector de massa era feita igualmente através de uma interface directa sujeita a idêntico aquecimento. O controlo do aparelho era assegurado por um sistema de controlo, aquisição e tratamento de dados fornecido pela Agilent – MS Chemstation G2578A – instalado num computador HP Kayak XM 600 PC. Este aparelho foi usado na fase final do desenvolvimento e na totalidade da aplicação às amostras em estudo da metodologia analítica baseada no uso de cloroformato de isobutilo como reagente derivatizante.

Em ambos os aparelhos, a calibração das massas foi feita de forma automatizada com recurso à perfluorotributilamina e os cromatogramas iónicos totais (ou traçados iónicos totais) foram obtidos por impacto electrónico a 70 eV. A temperatura da interface foi mantida a 280 °C e a tensão do multiplicador de electrões ajustada para um valor superior em 200 V ao valor obtido no processo de sintonização automática próprio de cada aparelho. Outras condições relevantes usadas na obtenção dos cromatogramas, designadamente as massas seleccionadas nos processos de monitorização selectiva de iões e os parâmetros mais relevantes em cromatografia gasosa (temperaturas, fluxos, etc.) serão consideradas em pormenor aquando da abordagem de cada uma das metodologias desenvolvidas.

As características das colunas usadas para a separação cromatográfica dos compostos serão mencionadas nos capítulos dedicados às metodologias analíticas desenvolvidas.

* A marca Agilent corresponde à nova designação comercial de toda a gama analítica anteriormente designada por HP.

3.2.2. Sistema de HPLC

Usou-se um crómatografo líquido de alta resolução da marca Gilson (Villiers le Bel, França), equipado com duas bombas, modelo 305 e 306, e com um injector manual Rheodyne (Cotati, CA, EUA), modelo 7125, provido de um loop de 10 µL. O detector UV utilizado foi igualmente da marca Gilson, modelo 118, de comprimento de onda variável acoplado a um integrador marca Varian (Harbor City, CA, EUA) modelo 4290.

Para a separação dos ácidos orgânicos usou-se uma coluna da marca Waters (Milford, MS, EUA), modelo Spherisorb ODS-2 (150 x 4,6 mm, 3 µm de diâmetro de partícula) e uma pré-coluna da marca Macherey-Nagel (Düren, Alemanha), modelo Nucleosil C_{18} (30 x 4 mm, 3 µm).

3.2.3. Outra aparelhagem

As determinações de pH foram executadas num aparelho de medição de pH da marca Metromh (Herisao, Suíça), modelo 632, equipado com um eléctrodo de junção líquida da marca Russell (Fife, Escócia). A calibração do aparelho foi feita com tampões de pH (4, 7 e 9) fornecidos pela Russel.

As reacções de derivatização a quente foram executadas num aparelho próprio, da marca Pierce (Rockford, IL, Estados Unidos), modelo "reacti-therm" 18790, com capacidade para 9 tubos e com um sistema de evaporação de solventes alimentado a azoto.

Todas as operações de centrifugação foram executadas num aparelho da marca Heraeus Sepatek (Osterode, Alemanha), modelo Labofuge Ae. Tendo em atenção as dimensões do rotor, uma velocidade de rotação de 5000 rpm correspondia a 3500 g.

A agitação mecânica dos tubos foi executada num agitador do tipo vortex, da marca Heidolph (Alemanha), modelo Reax 2000.

As pesagens foram feitas em balanças da marca Mettler Toledo (Greifensee, Suíça), modelos AE 200 e AG 204.

Para a limpeza das seringas (feita no final de cada injecção) usou-se um sistema de limpeza a quente com funcionamento a pressão reduzida, da marca Hamilton Company (Reno, NE, Estados Unidos).

As pipetas usadas ao longo do trabalho foram da marca Gilson (Villiers le Bel, França), tendo-se usado pontas descartáveis da mesma marca.

3.2.4. Consumíveis

Para as reacções de derivatização usaram-se frascos de vidro silanizado de 5 mL com rolhas internamente cobertas com Teflon®, da marca Supelco (Bellefonte, PA, Estados Unidos).

Para a injecção no sistema cromatográfico usaram-se seringas da marca Hamilton (Bonaduz, Suíça) de 10 μL de volume total, com uma agulha de 7 cm de comprimento e ponta em forma de bisel.

Nos sistemas de injecção dos aparelhos de GC-MS usaram-se septos pré-furados da marca Supelco, modelo Thermogreen LB-2. Todos os restantes consumíveis respeitantes às referidas aparelhagens foram da marca HP/Agilent.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DE DIAMINAS, POLIAMINAS E AMINAS AROMÁTICAS EM VINHOS DO PORTO E EM MOSTOS

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA BASEADA NUM PROCESSO DE EXTRACÇÃO POR PAR-IÓNICO E NA ANÁLISE POR GC-MS, NA FORMA DE DERIVADOS HEPTAFLUOROBUTÍRICOS

4.1. Introdução

4.2. Procedimento analítico

4.2.1. Processo de extracção

4.2.1.1. Vinhos

4.2.1.2. Mostos

4.2.2. Processo de derivatização

4.2.3. Condições operatórias

4.2.4. Quantificação

4.3. Desenvolvimento do método e discussão

4.3.1. Processo de extracção

4.3.1.1. Extracção de aminas por agentes de par-iónico. Considerações prévias

4.3.1.2. Ensaios executados para o desenvolvimento do processo extractivo usado

4.3.2. Processo de derivatização

4.3.2.1. Derivatização de aminas com agentes acilantes. Considerações prévias

4.3.2.2. Ensaios executados para o desenvolvimento do processo de derivatização usado

4.3.3. Processo cromatográfico

4.3.3.1. Escolha dos padrões internos

4.3.3.2. Condições operatórias

4.4. Validação do método

4.4.1. Linearidade

4.4.2. Precisão

4.4.3. Recuperação

4.4.4. Limites de detecção e de quantificação

4.5. Conclusões

Bibliografia

Anexo 1. Espectros de massa dos derivados heptafluorobutíricos das aminas biogénicas estudadas

Breve estudo dos espectros de massa apresentados

Anexo 2. Curvas de recuperação das aminas biogénicas estudadas referentes a amostras de vinho do Porto e de mosto

4.1. Introdução

O presente capítulo é dedicado ao método de GC-MS desenvolvido para a determinação de diaminas, poliaminas e aminas aromáticas em vinhos do Porto e em mostos. O método pode ser dividido em três partes fundamentais:

- Extracção das aminas por um processo de par-iónico, com hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo)
- Derivatização dos compostos com anidrido heptafluorobutírico
- Análise dos derivados obtidos por GC-MS em modo SIM

Tendo em vista a clareza da explanação, optámos por esquematizar o capítulo da seguinte forma:

a) Inicialmente é feita a descrição do procedimento analítico desenvolvido e das condições operatórias estabelecidas a título definitivo (posteriormente usadas na análise das amostras em estudo).

b) Em seguida, é feita a discussão do referido procedimento. Nessa discussão estão incluídas breves revisões da literatura sobre os processos usados para a extracção dos compostos e para a sua derivatização, de forma a permitir ao leitor um bom enquadramento em ambos os tópicos. São relatadas as experiências executadas durante a fase de desenvolvimento do método e é feita a discussão das opções tomadas.

c) Finalmente, são relatados os testes efectuados para a validação do método, os resultados obtidos nos mesmos e a respectiva avaliação.

d) Em anexo, são apresentados:

- Os espectros de massa referentes aos derivados heptafluorobutíricos obtidos e um breve estudo sobre a respectiva elucidação.
- As curvas de recuperação obtidas para todas as aminas estudadas em duas matrizes distintas: vinho do Porto e mosto.

4.2. Procedimento analítico

4.2.1. Processo de extracção

4.2.1.1. Vinhos

A uma alíquota de 10 mL de amostra colocada em tubo de polipropileno de 15 mL, adicionou-se 300 μL de HCl 0,1 M e 100 μL de uma solução em HCl 0,1 M contendo os padrões internos ([$^2H_8$]putrescina a 200 μg/mL; anfetamina a 100 μg/mL; 1,7-diaminoheptano a 100 μg/mL; nor-espermidina a 20 μg/mL e nor-espermina a 20 μg/mL) de forma a obter-se concentrações finais de, respectivamente, 2,0, 1,0, 1,0, 0,2 e 0,2 mg/L. Acidificou-se a amostra com 1,0 mL de HCl 2 M e deixou-se em repouso durante toda a noite (cerca de 12 horas) de forma a promover a precipitação de material de origem proteica e de polifenóis. Centrifugou-se, então, a amostra, durante 10 minutos a 5000 rpm (correspondente a 3500 g na centrífuga utilizada) e decantou-se, em seguida, para tubo idêntico.

A amostra assim tratada foi seguidamente evaporada sob uma corrente de azoto, à temperatura ambiente, até 8-8,5 mL, de forma a promover a quase total eliminação do etanol presente. Ajustou-se o pH a 7,4 pela adição gota a gota de uma solução concentrada de KOH, inicialmente, e de uma solução diluída do mesmo composto, em seguida, e, finalmente, adicionou-se 2 mL de uma solução tampão de fosfatos 0,5 M a pH 7,4, de forma a tamponar convenientemente o meio.

Uma alíquota de 5,0 mL da amostra desalcoolisada e tamponada foi então colocada num outro tubo idêntico aos anteriores e extraída com 5,0 mL de uma solução de hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo) (BEHPA)* 0,1 M em clorofórmio, por agitação manual durante 5 minutos seguida de uma agitação em vortex durante 30 segundos. Centrifugou-se a mistura durante 5 minutos a 5000 rpm e retirou-se cuidadosamente uma porção de cerca de 4 mL da fase clorofórmica (fase inferior) para um tubo idêntico ao qual se adicionou a mesma quantidade de HCl 0,1 M. Procedeu-se, então, ao processo de reextracção dos compostos, agitando-se e centrifugando-se como anteriormente. A fase aquosa resultante (fase superior) ficou apta para ser sujeita ao processo de derivatização.

4.2.1.2. Mostos

A uma alíquota de 8,0 mL de amostra (previamente descongelada e centrifugada de forma a permitir a separação das partes sólidas), colocada em tubo de 15 mL, adicionou-se 100 μL de uma solução em HCl 0,1 M dos padrões internos (os mesmos usados nas amostras de vinhos). De forma idêntica à descrita para os vinhos, acidificou-se a amostra com 1,0 mL de HCl 2 M e deixou-se em repouso durante toda a noite (cerca de 12 horas) de forma a promover a precipitação de material de origem proteica e de polifenóis. Centrifugou-se, então, a amostra, durante 10 minutos a 5000 rpm e decantou-se, em seguida, para tubo idêntico.

Ajustou-se o pH a 7,4 pela adição gota a gota de uma solução concentrada de KOH, inicialmente, e de uma solução diluída do mesmo composto, em seguida, e, finalmente, adicionou-se 2 mL de uma solução tampão de fosfatos 0,5 M a pH 7,4 de forma a tamponar convenientemente o meio. O processo restante foi executado de forma exactamente igual à descrita para os vinhos.

*A designação BEHPA é usualmente empregue, correspondendo às iniciais da denominação do reagente em língua inglesa — Bis(ethylhexyl)phosphate.

4.2.2. Processo de derivatização

Em frasco de vidro silanizado de 5 mL, evaporou-se até à secura, sob uma ligeira corrente de azoto e a 70 °C, uma alíquota de 100 μL do extracto clorídrico obtido no processo extractivo. Após evaporação total, adicionou-se ao resíduo 200 μL de acetonitrilo e 200 μL de anidrido heptafluorobutírico, agitou-se ligeiramente, de forma a promover a total dissolução do resíduo, fechou-se o tubo com uma tampa revestida com Teflon® e procedeu-se à derivatização dos compostos por aquecimento a 80 °C durante 60 minutos (após os primeiros 5 minutos de aquecimento deu-se um ligeiro aperto na tampa, de forma a garantir a estanquicidade do tubo; em cada 15-20 minutos, agitou-se ligeiramente o tubo durante alguns segundos, de forma a facilitar o desenvolvimento da reacção). Uma vez concluído o processo reaccional, deixou-se arrefecer o tubo e o respectivo conteúdo e evaporou-se o meio reaccional até à secura, de novo sob uma ligeira corrente de azoto, mas a frio. Uma vez obtido o resíduo que continha os derivados formados, dissolveu-se o mesmo com 1,0 mL de tampão fosfato 0,5 M a pH 7 e extraíram-se os derivados com 3,0 mL de diclorometano, agitando-se durante cerca de 1 minuto. Transferiu-se, então, a maior quantidade possível, em geral cerca de 2,5 mL, do extracto orgânico (diclorometano) para um tubo idêntico, no qual tinha sido colocada uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (cerca de 100 mg). Agitou-se durante cerca de 1 minuto, de modo a promover a completa desidratação do extracto, deixou-se em repouso durante 2-3 minutos e transferiu-se o extracto para novo tubo igual, com o cuidado de evitar a passagem de restos de sulfato de sódio. Finalmente, evaporou-se o extracto até à secura, mais uma vez sob uma ligeira corrente de azoto e a frio, e dissolveu-se o resíduo em 100 μL de acetato de etilo, contendo 0,2 % (m/v) de Carbowax 1000 M. Guardaram-se as soluções a -20 °C até ao momento da injecção no sistema cromatográfico.

4.2.3. Condições operatórias

Introduziu-se, manualmente, no aparelho de GC-MS 1,0-1,5 μL da solução contendo os compostos derivatizados, no modo de splitless (purge-off time: 60 s), com o injector à temperatura de 280 °C. Para a separação cromatográfica usou-se uma coluna capilar* de sílica fundida, revestida com

*Designam-se por colunas capilares as colunas tubulares abertas, construídas em vidro ou sílica fundida. Neste texto, será usada a 1ª designação, que é a mais frequentemente usada na gíria cromatográfica, como sublinhado por outros autores [Chaves das Neves e Freitas, 1996a].

uma fase ligada de dimetilsiloxano com 5 % de grupos fenilo – DB-5MS da J&W Scientific (Folsom, CA, Estados Unidos) – com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase estacionária. Usou-se também uma pré-coluna, com igual diâmetro interno, com cerca de 2,5 metros de comprimento e da qual periodicamente eram cortados os primeiros trinta centímetros. A união entre a pré-coluna e a coluna foi feita com um ligador de vidro apropriado*. A pressão do gás de arraste à entrada da coluna foi de 80 kPa e usou-se um gradiente de temperatura, programado da seguinte forma:

Temperatura inicial: 80 °C, mantida durante 1 minuto

Incremento de 15 °C/minuto, até 210 °C

Incremento de 20 °C/minuto, até 290 °C

Constante a 290 °C, durante 5 minutos

Tempo total: 18 minutos

Como é norma sempre que se procede ao desenvolvimento de uma metodologia de GC-MS usaram-se, em tempos diferentes, dois modos distintos de aquisição de dados cromatográficos.

Inicialmente, de forma a estabelecer o tempo de retenção de cada composto e a obter o respectivo espectro de massa, a aquisição de dados foi feita em modo de varrimento contínuo, numa gama de massas de *m/z* 50 a *m/z* 700.

Uma vez estabelecidas as condições de separação cromatográfica, e tendo como objectivo a quantificação dos compostos em análise, a aquisição de dados foi feita em modo de monitorização selectiva de iões, tendo-se usado três grupos diferentes de iões diferenciados no tempo, de acordo com o indicado na Tabela 4.1. A escolha dos iões a monitorizar foi feita em função da respectiva abundância no espectro de massa dos compostos em estudo (aminas mais padrões internos) e da sua especificidade, num mínimo de 3 iões para cada composto. O tempo de monitorização de cada ião foi de 30 ms por ciclo tendo-se mantido o detector desligado durante os primeiros 5 minutos, de forma a proteger a fonte iónica das perturbações causadas pela passagem do excesso de solvente.

*Press-fit union, na designação inglesa.

TABELA 4.1

PROGRAMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS EM MODO DE MONITORIZAÇÃO SELECTIVA DE IÕES USADO PARA A QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS EM ESTUDO

	Valores de *m/z*
Grupo 1 (5 min – 8,3 min)	91, 104, 118, 226, 228, 240, 254, 466, 480, 488
Grupo 2 (8,3 min – 10 min)	107, 120, 226, 280, 303, 316, 339, 353, 494, 508
Grupo 3 (10 min – 18 min)	130, 226, 254, 266, 326, 339, 356, 536, 564, 576

4.2.4. Quantificação

Para a quantificação das aminas em estudo, construíram-se curvas de calibração a partir de soluções padrão sujeitas a um tratamento rigorosamente igual ao das amostras. As soluções padrão foram preparadas pela adição da quantidade requerida de cada uma das aminas e dos padrões internos a matrizes sintéticas preparadas de forma a mimetizar os diferentes tipos de amostras em estudo. A composição das referidas matrizes é apresentada na Tabela 4.2.

Tendo em vista a maximização da qualidade dos resultados obtidos e atendendo ao tipo de funcionamento dos detectores de massa, que exigem uma optimização periódica dos diversos parâmetros relevantes para o seu funcionamento (calibração das massas, regulação das diversas lentes electrónicas, tensão do multiplicador de electrões, etc.), todo o trabalho analítico visando a quantificação dos compostos em estudo foi realizado por "séries". A cada série correspondeu um branco ou padrão zero (matriz sintética adicionada apenas de padrões internos), um conjunto de cinco ou seis soluções padrão (com concentrações crescentes de cada uma das aminas a quantificar, mas não necessariamente iguais para todas elas, de forma a cobrir a gama de teores esperados nas amostras) e um número de amostras (vinhos ou mostos) a analisar variando geralmente entre dez e quinze.

Na prática, as soluções padrão foram preparadas no início do procedimento analítico, por adição à matriz sintética usada (10 mL no caso dos vinhos e 8 mL no caso dos mostos) de volumes fixos (em regra 100 μL) de misturas de aminas em HCl 0,1 M previamente preparadas com as concentrações pretendidas (em regra, usaram-se três diferentes tipos de misturas correspondentes a diaminas, a poliaminas e a aminas aromáticas, o que perfazia um total de 300 μL). Em seguida mediu-se a mesma quantidade das amostras a analisar (10 mL no caso dos vinhos e 8 mL no caso dos mostos) e adicionou-se uma quantidade de HCl 0,1 M igual à usada na adição de soluções de aminas (300 μL) de forma a igualar os volumes (no caso especial das amostras usadas para ensaios de recuperação, a sua preparação foi igual à das soluções padrão, não havendo naturalmente lugar à adição de solução de HCl). A partir daí, todo o conjunto, padrões mais amostras, foi tratado em simultâneo, rigorosamente da mesma forma, desde a adição dos padrões internos até ao momento da injecção no sistema cromatográfico.

TABELA 4.2

COMPOSIÇÃO DAS MATRIZES SINTÉTICAS USADAS PARA A PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PADRÃO

	Vinho do Porto	**Vinho de mesa**	**Mosto**
Etanol	200 mL	120 mL	—
Glicerol	6,0 g	6,0 g	—
Frutose	70 g	0,2 g	125 g
Glucose	40 g	—	125 g
Ácido tartárico	1,75 g	2 g	3,0 g
Ácido málico	1,0 g	0,5 g	1,5 g
Ácido láctico	0,25 g	1,0 g	—
Ácido cítrico	0,4 g	0,4 g	0,4 g
Ácido acético	0,5 g	0,5 g	—
Ácido succínico	0,5 g	1,0 g	—
Ácido fosfórico	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Ácido tânico	1,8 g	1,8 g	1,8 g
Acetaldeído	0,1 g	0,1 g	—
Cloreto de sódio	0,1 g	0,1 g	0,1 g
pH	ajustar até 3,5	ajustar até 3,4	ajustar até 3,8
Água	q.b.p. 1000 mL	q.b.p. 1000 mL	q.b.p. 1000 mL

A análise cromatográfica do conjunto de soluções preparado dentro da mesma série foi feita em duplicado, numa sequência que começava pala 1ª injecção dos padrões, por ordem crescente de concentração, continuava pela 1ª injecção de cada uma das amostras, depois pela 2ª injecção das mesmas amostras, em regra pela ordem inversa da usada na 1ª injecção, e terminava com a 2ª injecção de cada um dos padrões, de novo por ordem crescente de concentrações. Na mudança de padrões para amostras e vice-versa era injectado e imediatamente verificado o branco, de forma a garantir a inexistência de resíduos provenientes das injecções anteriores. Durante o procedimento analítico correspondente a uma série, todas as condições do aparelho de GC-MS relevantes para os resultados obtidos permaneceram constantes. No caso de se tornar obrigatório mudar essas condições, em função de imponderáveis como falhas de energia ou avarias no aparelho, a sequência normal de injecções era interrompida, sendo considerados apenas os resultados obtidos na 1ª injecção de padrões e amostras caso a mesma tivesse sido completada, ou sendo eliminados totalmente no caso de ainda se estar na 1ª injecção.

Uma vez obtidos os cromatogramas correspondentes a padrões e amostras, usou-se para fins quantitativos o sinal analítico proveniente de cromatogramas de massa*, diferentes para cada composto. A escolha do valor de *m/z* foi feita de acordo com a abundância do ião respectivo no espectro de massa do composto em causa, a sua especificidade e a ausência de interferentes. No caso das aminas para as quais se usou os respectivos isótopos deuterados como padrão interno, usaram-se valores de *m/z* correspondentes à mesma fragmentação, para o composto e para o respectivo padrão interno (Tabela 4.3).

A integração das áreas foi feita na opção de modo manual permitida pelo "software" usado para o efeito. A partir dos valores obtidos nos cromatogramas relativos aos padrões para cada uma das aminas e para o respectivo padrão interno, construíram-se curvas de calibração, colocando-se como ordenadas os valores correspondentes à relação área do pico de composto/área do pico de padrão interno e como abcissas as respectivas concentrações do composto. A determinação do teor de cada amina nas amostras foi então feita pela interpolação da relação área do pico de composto/área do pico de padrão interno na curva de calibração respectiva. Em cada série analítica, construíram-se duas curvas de calibração, uma para cada injecção, obtendo-se, consequentemente,

* Designam-se por cromatogramas de massa ou cromatogramas iónicos reconstruídos os gráficos em função do tempo da intensidade registada a um valor de *m/z* específico.

para cada amostra também dois resultados. Os resultados finais considerados corresponderam à média dos dois valores obtidos.

TABELA 4.3

IÕES USADOS COM FINS QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS PARA AS AMINAS BIOGÉNICAS ENSAIADAS E PARA OS RESPECTIVOS PADRÕES INTERNOS

Composto	Tempo de Retenção (min)	Ião Q[a] (*m/z*)	Outros iões[b] (*m/z*)
1,3-Diaminopropano	6,81	254	226, 240, 466
2-Feniletilamina	7,00	104	91, 226
Putrescina	7,91	480	226, 240, 254
Cadaverina	8,66	494	226, 280
Tiramina	8,93	316	226, 303
1,6-Diaminohexano	9,20	508	226, 339
Espermidina	11,14	254	226, 266, 536, 564
Espermina	13,03	254	226, 576
Anfetamina	6,97	118	91, 240
[$^2H_8$]Putrescina	7,87	488	228
1,7-Diaminoheptano	9,79	353	226
nor-Espermidina	10,70	254	226, 254
nor-Espermina	12,56	254	226, 254

[a] ião usado para a quantificação
[b] iões usados para confirmar a identidade do composto

4.3. Desenvolvimento do método e discussão

4.3.1. Processo de extracção

4.3.1.1. Extracção de aminas por agentes de par-iónico. Considerações prévias

De uma forma genérica, pode afirmar-se que os processos de extracção por par-iónico correspondem à extracção de compostos ionizáveis presentes em soluções aquosas por intermédio de solventes orgânicos aos quais se adiciona um ião de carga contrária (contra-ião), capaz de formar com os compostos a extrair um par-iónico cujas características de solubilidade favorecem a sua transferência para a fase orgânica em detrimento da sua permanência na fase aquosa. Os pares iónicos podem definir-se como espécies neutras formadas pela atracção electrostática entre partículas em solução carregadas com cargas de sinal oposto, as quais podem apresentar lipofilicidade suficiente para se dissolverem predominantemente em solventes não-aquosos [Eksborg *et al.*, 1973]. Embora essa interacção seja geralmente representada de acordo com a lei de acção de massas, é de enfatizar o facto de não haver qualquer tipo de ligação química entre os dois componentes de um par-iónico, antes uma mera interacção de carácter electrostático [Quintanar-Guerrero *et al.*, 1997].

No caso da extracção de aminas, o processo pode ser esquematicamente representado da seguinte forma:

$$AH^{+}_{aq} + HX_{org} \longrightarrow AHX_{org} + H^{+}_{aq}$$

Conhecidos de há muito pelo seu uso na extracção de iões metálicos, os processos de extracção por par-iónico sofreram um grande incremento na sequência dos trabalhos realizados por Schill e colaboradores no decurso dos anos 60, tendo sido alvo de inúmeros desenvolvimentos que deram origem a uma extensa bibliografia sobre o assunto*. O seu principal interesse reside na

* As melhores fontes bibliográficas para o estudo aprofundado deste tema serão, provavelmente, dois livros do autor [Schill, 1974; Schill *et al.*, 1984] (ver bibliografia) citados abundantemente por diversos autores, mas aos quais, infelizmente, não conseguimos ter acesso. Em compensação, foi-nos possível aceder facilmente aos trabalhos originais do autor e seus colaboradores, na sua grande maioria publicados na revista "Acta Pharmaceutica Suecica", existente no acervo documental da FFUP. Outra boa fonte para o estudo deste tema corresponde ao capítulo 11 - "Ion-pair extraction in chromatography", da autoria de Schill e Persson - de um livro várias vezes mencionado neste trabalho: "Handbook of derivatives for chromatography", Blau e Halket [1994].

possibilidade de "desenhar" processos extractivos extremamente selectivos para determinado composto ou grupo de compostos, simultaneamente dotados de um elevado rendimento e de grande reprodutibilidade e, não menos importante, de extrema facilidade no que respeita à execução laboratorial. De entre os compostos alvo deste tipo de extracção, os compostos aminados mereceram sempre uma atenção especial, tendo sido desde o início objecto de grande número de trabalhos, nos quais foram ensaiados diversos agentes extractivos [Borg e Westerlund, 1970; Gustavii *et al.*, 1971; Gustavii e Schill, 1966; Schill, 1965 e referências aí citadas; Persson, 1971 e referências aí citadas].

Uma das principais consequências do trabalho desenvolvido por aqueles investigadores, foi o estabelecimento de processos que consistem no uso de agentes extractivos com massa molecular elevada capazes de actuar simultaneamente como contra-iões e como agentes capazes de formar aductos com o par-iónico entretanto formado [Modin e Tilly 1968; Modin 1971, 1972]. A extracção de aminas por um processo deste tipo pode ser esquematicamente representada da seguinte forma:

$$AH^{+}_{aq} + n\,HX_{org} \longrightarrow AHX.(HX)_{n\text{-}1\,org} + H^{+}_{aq}$$

O agente de eleição para a extracção de aminas fortemente hidrofílicas por intermédio de um processo deste tipo é o hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo)(BEHPA) [Modin e Johansson, 1971; Modin e Schill, 1975]. Em estudos feitos com uma série de drogas de estrutura aminada (imipramina, cocaína, procaína, prometazina, etc.) verificou-se que o uso deste composto associado ao clorofórmio como solvente orgânico proporcionava extracções quantitativas numa gama bastante alargada de valores de pH [Hoogewijs e Massart, 1979]. A influência de outros factores, como a força iónica do meio e a concentração do agente extractivo foi também estudada em detalhe pelos mesmos autores.

O uso de processos extractivos com BEHPA/clorofórmio associado com a determinação por HPLC dos aductos formados esteve na génese de metodologias para a determinação de aminofenóis [Eksborg *et al.*, 1973] e de cafeína, teofilina e outras metilxantinas [Scott *et al.*, 1986]. Baseados no mesmo princípio, Hoogewijs e Massart publicaram uma série de artigos sobre o desenvolvimento de uma estratégia analítica global para a determinação de drogas básicas em diferentes formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos [Hoogewijs e Massart, 1983, 1984, 1986 e referências citadas neste último trabalho].

A utilidade dos processos de extracção com BEHPA como etapa prévia para a determinação de compostos aminados por cromatografia gasosa foi demonstrada por Nelson *et al.* [1979], que desenvolveram uma metodologia para a determinação de catecolaminas 3-*O*-metiladas em urina baseada numa extracção com BEHPA/éter etílico e posterior análise sob a forma de derivados pentafluoropropiónicos. O grupo de Leferink e colaboradores, por seu lado, desenvolveu metodologias para a determinação de diversos agentes simpaticomiméticos (salbutamol, isoprenalina, terbutalina, fenoterol e outros) baseadas em extracções com BEHPA/acetato de etilo e subsequente análise dos compostos sob a forma de derivados sililados [Brandts *et al.*, 1982 e referências aí citadas].

Enquanto nestes últimos trabalhos a derivatização dos compostos era feita directamente no resíduo obtido após evaporação à secura do extracto orgânico obtido (acetato de etilo), salientando os autores que eram necessários cuidados especiais no que respeita à concentração do agente extractor devido à sua interferência no processo cromatográfico, já no trabalho anteriormente citado [Nelson *et al.*, 1979] os autores recorreram a um processo prévio de reextracção* dos compostos em estudo com uma solução diluída de ácido fórmico, sendo a fase aquosa posteriormente liofilizada e sujeita, então, ao processo de derivatização.

O uso desta etapa complementar de reextracção dos compostos com uma solução aquosa ácida foi também proposto, posteriormente, em metodologias baseadas na análise dos compostos em estudo por HPLC. Foi o caso do trabalho de Thomsen e Willumsen [1981] que desenvolveram um método para a determinação do 4-(5-)metilimidazol em amostras de corante caramelo baseado numa extracção com BEHPA/clorofórmio, reextracção com solução diluída de ácido fosfórico e posterior análise por um processo de cromatografia líquida com um agente de par-iónico apropriado, o dodecanosulfonato de sódio.

Mais recentemente, o grupo de Brunner e colaboradores desenvolveu um método para a determinação de histamina, baseado num processo de extracção com BEHPA/heptano seguido de uma reextracção com uma solução diluída de HCl e análise por HPLC, após derivatização com OPA, inicialmente aplicado à quantificação daquela amina biogénica em produtos alimentares [Velásquez *et al.*, 1992] e depois em tecidos e fluidos biológicos [Tsikas *et al.*, 1993]. Significativamente, o método foi desenvolvido para substituir um outro método anteriormente desenvolvido pelo mesmo grupo de autores [Czerwonka *et al.*, 1988], cuja única diferença se situava precisamente ao nível do processo

*Back-extraction, na designação inglesa

extractivo, que era feito com n-butanol, e que se caracterizava, segundo os próprios autores, pelo grande número de interferências impeditivas de uma correcta determinação do composto.

A nossa primeira experiência com o uso do BEHPA como agente extractivo ocorreu, no período imediatamente anterior ao início dos trabalhos experimentais conducentes à elaboração desta dissertação, durante o desenvolvimento de um método de GC-MS para o doseamento do 4-(5-)metilimidazol [Fernandes e Ferreira, 1997]. O processo de extracção desenvolvido baseou-se na proposta de Thomsen e Willumsen [1981] anteriormente referida, tendo sido feitas algumas modificações relativas à relação dos volumes de amostra e de solução extractiva e, mais importante, em relação à solução ácida usada no processo de reextracção, tendo-se substituído a solução de ácido fosfórico proposta por aqueles autores por uma solução de ácido clorídrico.

Os bons resultados obtidos nesse trabalho, tanto ao nível do rendimento e da reprodutibilidade obtidos, como da efectiva remoção de muitos interferentes, em especial dos açúcares, extremamente abundantes nas amostras de caramelo, levou-nos a investigar a possibilidade da sua aplicação à extracção das aminas consideradas neste estudo.

4.3.1.2. Ensaios executados para o desenvolvimento do processo extractivo usado

Os primeiros ensaios relativos ao desenvolvimento do processo extractivo usado foram realizados com soluções padrão das aminas em estudo e basearam-se na aplicação do processo anteriormente desenvolvido e acima referido. A quantificação dos compostos foi feita por intermédio da metodologia cromatográfica inicialmente desenvolvida, que correspondia à determinação dos compostos por GC-MS após derivatização com cloroformato de isobutilo, na presença de piridina, isobutanol e acetonitrilo, e extracção com clorofórmio. Os resultados obtidos foram extremamente positivos para todas as aminas em estudo, à excepção de duas aminas sulfuradas – cistina e cisteína – cujo estudo acabou por ser abandonado. Os problemas de irreprodutibilidade do método cromatográfico usado, já referidos na introdução à parte experimental, e que motivaram o seu posterior abandono, acabaram, porém, por prejudicar fortemente o trabalho de optimização efectuado, já com recurso a amostras de vinhos e de mostos, tornando difícil a tradução em números das várias experiências então realizadas.

Cabe aqui abrir um parêntesis para dizer que neste tipo de estudos é comum o recurso a técnicas de quantificação simples, designadamente a processos espectrofotométricos. A opção, que adivinhávamos arriscada, por uma metodologia ainda em fase de validação — ou seja, na prática, a opção pelo desenvolvimento em simultâneo do processo de extracção e do processo de derivatização, que se veio a revelar errada — deveu-se ao número elevado de compostos em estudo e à diversificação dos mesmos, o que tornava difícil a utilização de métodos de análise mais expeditos.

De qualquer forma, os resultados obtidos, apesar de não serem aqui apresentados (porque obtidos por uma metodologia não validada), deram-nos indicações extremamente válidas sobre o comportamento de algumas aminas, em particular das mais voláteis, para as quais o processo cromatográfico em causa sempre originou resultados reprodutíveis. Foi assim possível estabelecer as linhas mestras do referido processo extractivo, a saber:

a) Acidificação das amostras e conservação durante a noite a 4 °C, de forma a promover a precipitação de material proteico e polifenólico, posteriormente separado por centrifugação, e de forma a promover a total salificação das aminas em estudo, evitando assim possíveis perdas na fase seguinte de evaporação da amostra.

b) Evaporação parcial das amostras sob uma corrente de azoto (apenas no caso dos vinhos), de forma a promover a eliminação do etanol presente, cuja presença se verificou poder influenciar negativamente o rendimento do processo extractivo.

c) Tamponização do meio ao pH mais adequado para a generalidade dos compostos.

d) Extracção de uma alíquota da amostra assim preparada (sujeita a evaporação parcial e tamponada) com igual volume de solução 0,1 M de BEHPA em clorofórmio (agitação manual durante 10 min).

e) Centrifugação.

f) Reextracção de uma porção da fase clorofórmica com igual volume de HCl 0,1 M.

g) Centrifugação.

h) Utilização de uma alíquota da fase aquosa clorídrica para a derivatização dos compostos.

Uma vez abandonado o referido método cromatográfico, a fase final de optimização do processo de extracção das aminas pelo sistema BEHPA/clorofórmio foi feita com a utilização do processo de derivatização com anidrido heptafluorobutírico descrito neste capítulo, que entretanto tinha sido desenvolvido, e também com o processo de derivatização com brometo de pentafluorobenzilo desenvolvido para a determinação de histamina e que é descrito no capítulo seguinte.

O estudo realizado consistiu na escolha das melhores condições de pH para a execução do processo. Para o efeito procedeu-se da seguinte forma:

1. Prepararam-se soluções contendo as oito aminas em estudo (1,3-diaminopropano, putrescina, cadaverina, 1,6-diaminohexano, espermidina, espermina, 2-feniletilamina e tiramina) numa concentração de 2 mg/L, em duas matrizes distintas: água e matriz artificial de vinho do Porto*.
2. A alíquotas de 1,0 mL de cada solução adicionou-se 1,0 mL de soluções tampão de fosfatos com diferentes valores de pH: 5,8; 6,2; 6,6; 7,0; 7,4; 7,8 no caso da matriz artificial de vinho: 6,6; 7,0; 7,4; 7,8 no caso das soluções feitas em água. Cada solução ficou assim com uma concentração de 1 mg/L para cada uma das aminas.
3. Procedeu-se ao processo de extracção para cada uma das soluções, de acordo com o esquema acima indicado, usando os seguintes volumes: 2,0 mL de cada solução foram extraídos com igual volume da solução clorofórmica contendo o agente de par-iónico; após centrifugação, retirou-se a maior porção possível da fase clorofórmica, mediu-se em seguida, rigorosamente, 1,5 mL e extraiu-se com 1,5 mL de solução aquosa de HCl 0,1 M. Retirou-se 1,0 mL de fase aquosa, adicionou-se 100 μL de uma solução contendo os padrões internos e procedeu-se ao processo de derivatização com anidrido heptafluorobutírico sobre uma alíquota de 100 μL (como os volumes usados nas duas etapas do processo extractivo foram sempre iguais para as duas fases, as soluções clorídricas a derivatizar correspondiam a uma concentração de 1/1,1 mg/L para cada amina, caso o processo de extracção tivesse tido um rendimento de 100 %).

*Ver composição na Tabela 4.2.

4. Simultaneamente, preparou-se uma solução em HCl 0,1 M, contendo as mesmas oito aminas em estudo numa concentração de 1 mg/L. A uma alíquota de 1,0 mL dessa solução adicionou-se, como anteriormente, 100 μL de uma solução contendo os padrões internos e procedeu-se, de igual forma, ao processo de derivatização com anidrido heptafluorobutírico sobre uma alíquota de 100 μL (neste caso, a solução clorídrica a derivatizar tinha uma concentração rigorosa de 1/1,1 mg/L para cada amina).

5. Injectaram-se, em duplicado, as soluções contendo as aminas derivatizadas e compararam-se os resultados obtidos (área da amina/área do respectivo padrão interno) das soluções que foram sujeitas ao processo extractivo, com os resultados obtidos com a solução clorídrica não sujeita ao referido processo. A relação, para cada amina, entre o primeiro e o segundo resultado era correspondente ao rendimento do processo extractivo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.1.

Da leitura dos resultados pode concluir-se que o processo de extracção pode considerar-se quantitativo para todas as aminas em estudo para uma gama alargada de pH, abrangendo os valores usados na experiência. A independência do rendimento da extracção em relação ao pH da fase aquosa tinha sido verificada na extracção de drogas como a procaína e similares com o par BEHPA/clorofórmio, uma vez verificadas determinadas condições: concentração do agente extractor pelo menos cem vezes superior à concentração do composto a extrair e pH situado entre o pKa da amina e o pKa do BEHPA [Hoogewijs e Massart, 1979]. Para alguns compostos, contudo, essa independência do pH não se verifica, como é o caso do 4-(5-)metilimidazol anteriormente referido [Thomsen e Willumsen, 1981; Fernandes e Ferreira, 1997]. Nesse caso, verificou-se que a pH 6,0 o rendimento da extracção era máximo e que havia uma diminuição notória para valores de pH superiores a 7.

Atendendo aos resultados, a escolha do pH finalmente usado foi fundamentada principalmente com a possibilidade de usar, em simultâneo, o mesmo processo extractivo para a determinação de histamina por meio de um método cromatográfico diferente (capítulo 5). A extracção da histamina apresentou um maior rendimento a pH 7,4, o que confirmou os resultados obtidos por outros autores [Velásquez *et al.*, 1992; Tsikas *et al.*, 1993].

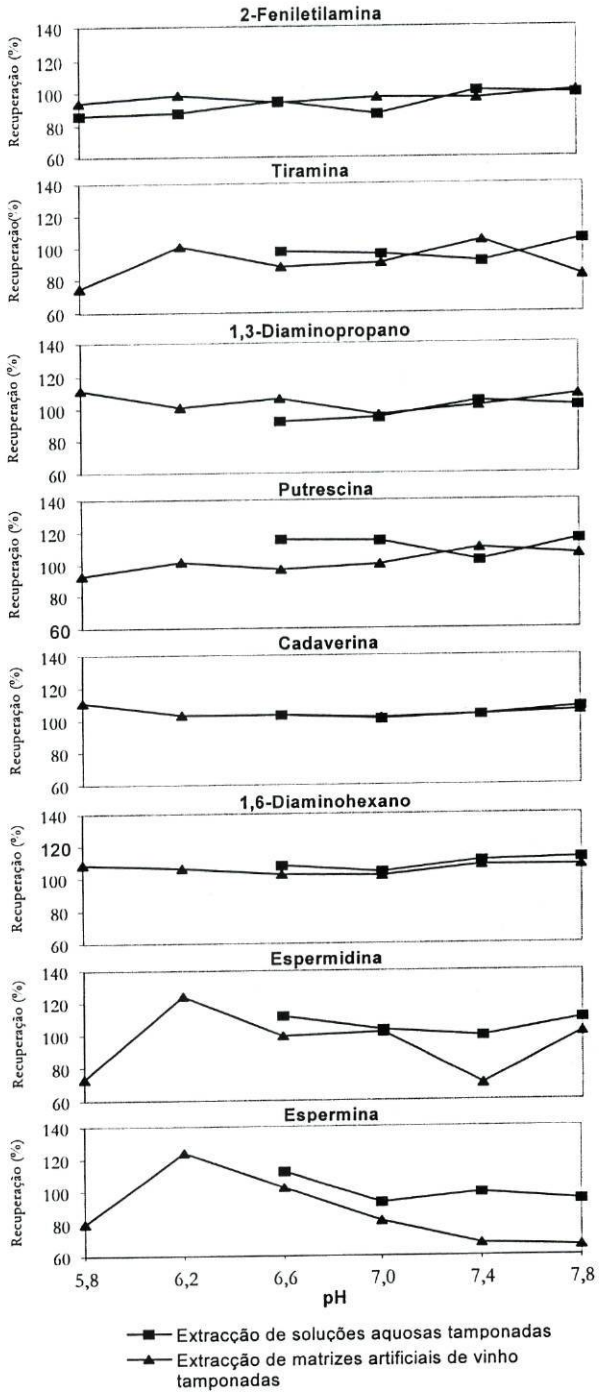


Figura 4.1. Rendimento do processo de extracção para as diferentes aminas estudadas a diferentes valores de pH

4.3.2. Processo de derivatização

4.3.2.1. Derivatização de aminas com agentes acilantes. Considerações prévias

A natureza da cromatografia gasosa como técnica analítica impõe a necessidade das substâncias a analisar apresentarem um certo grau de volatilidade, de forma a permitir a sua deslocação ao longo da coluna cromatográfica. Mesmo quando dotadas de suficiente volatilidade, muitas substâncias apresentam um mau comportamento cromatográfico, o qual geralmente está associado à presença de grupos funcionais de características polares. Infelizmente, a maioria dos compostos de interesse biológico e toxicológico, tais como ácidos, aminas, aminoácidos, açúcares, fenóis, etc., encontram-se numa daquelas duas situações, o que, à partida, impediria a aplicação da técnica à sua determinação nas diversas matrizes em que se encontram.

A forma de contornar estas dificuldades consiste no recurso às técnicas de derivatização, isto é, à modificação química dos grupos funcionais através de reacções apropriadas por meio de técnicas especiais, de modo a produzir derivados suficientemente voláteis e dotados de propriedades adequadas para a sua análise cromatográfica [Chaves das Neves e Freitas, 1996b]. A derivatização pode também funcionar com outro tipo de propósitos, como melhorar a resolução entre compostos ou melhorar a sua detectabilidade, o que é muito comum quando se usam detectores selectivos.

No caso particular da análise de aminas por cromatografia gasosa, a prática da derivatização encontra-se perfeitamente documentada na imensa bibliografia dedicada ao tema, sendo muitos e de vários tipos os reagentes derivatizantes que já foram propostos para o efeito [Blau, 1989, 1994; Drozd, 1981; Kataoka, 1996; Knapp, 1979]. Entre eles, o destaque especial vai para os designados reagentes acilantes, os quais se caracterizam pela capacidade de introduzir grupos acilo em moléculas com um ou mais átomos de hidrogénio reactivos [Blau, 1994]. No caso das aminas, o produto resultante da reacção com um reagente deste tipo é uma amida, de acordo com o esquema seguinte:

$$R\text{-}NH_2 + X\text{-}CO\text{-}R' \longrightarrow R\text{-}NH\text{-}CO\text{-}R'$$

A transformação de uma amina na amida correspondente por acção de um agente acilante adequado apresenta várias vantagens tendo em vista a sua análise por cromatografia gasosa. Com efeito, os derivados obtidos são menos polares do que os compostos iniciais e, com a substituição dos hidrogénios activos característicos da função amina, a sua tendência para formar pontes de hidrogénio diminui substancialmente e a sua volatilidade aumenta [Drozd, 1981]. Em consequência, o respectivo comportamento cromatográfico é francamente melhorado, havendo lugar a uma redução nítida do habitual fenómeno de "tailing", característico da análise de aminas na sua forma original e que tem a sua origem em fenómenos de adsorção causados pela presença de um grupo com acentuada polaridade. Para além disso, a acilação torna possível a análise de alguns compostos (poliaminas, p. ex.) que não possuem volatilidade suficiente para ser analisados como tal, aumenta a estabilidade de outros e, finalmente, permite a separação de alguns compostos impossíveis ou difíceis de separar [Blau, 1994].

Como reagentes acilantes usam-se, em regra, os cloretos ou os anidridos dos correspondentes ácidos. Os anidridos são normalmente os escolhidos devido à sua maior rectividade e também à sua maior volatilidade, o que facilita a sua remoção no final do processo reactivo. Para além de reagirem com a função amina — aminas primárias, secundárias e, nalguns casos, aminas terciárias — estes reagentes são capazes de reagir com outros grupos funcionais, nomeadamente com hidroxilos, fenóis e tióis, dando origem aos respectivos derivados *O*-acilados e *S*-acilados. Regra geral, os compostos formados são mais instáveis do que os compostos *N*-acilados, o que impõe um maior cuidado nas operações que se seguem à reacção de derivatização.

Muito populares, devido às excelentes características que apresentam no que respeita à volatilidade, estabilidade e facilidade de preparação dos respectivos derivados, são os anidridos perfluoroacilados, em particular o anidrido trifluoroacético, o anidrido pentafluoropropiónico e o anidrido heptafluorobutírico. Propostos inicialmente devido à elevada sensibilidade que os derivados a que dão origem normalmente apresentam perante o detector de captura de electrões (ECD), o uso deste tipo de reagentes tem-se igualmente difundido rapidamente em metodologias baseadas no uso de GC-MS, dado o facto de proporcionarem fragmentos iónicos com massas moleculares mais elevadas, logo mais favoráveis para trabalhos de quantificação em modo de monitorização selectiva de iões [Halket, 1994].

O principal aspecto negativo relacionado com o uso de reagentes acilantes, quer se tratem de compostos simples ou fluorados, está relacionado, pode afirmar-se que paradoxalmente, com um dos factores que leva à sua utilização intensiva: a sua grande reactividade. Esta é normalmente responsável por inúmeros problemas quando o excesso de reagente é introduzido no sistema cromatográfico juntamente com os derivados a analisar. Alguns deles provocam danos irreversíveis na fase estacionária das colunas cromatográficas usadas além de, na sua generalidade, poderem dar origem a picos "fantasmas" provenientes da derivatização "in-situ" de resíduos não-voláteis acumulados na porção inicial das colunas, em consequência de anteriores injecções [Kataoka, 1996].

Devido a isso, é usual a evaporação do meio reaccional uma vez terminada a reacção de derivatização, de forma a eliminar o excesso de reagente. Como afirmamos atrás, os anidridos ácidos, em especial quando fluorados, são os mais facilmente removíveis, devido à sua maior volatilidade, mas mesmo nestes casos a necessidade dessa operação coloca um problema inultrapassável neste tipo de processos que é o de o processo de evaporação originar a perda, total ou parcial, dos derivados mais voláteis presentes no meio reaccional, impedindo assim a respectiva análise.

Conscientes desta limitação, impeditiva da determinação das aminas voláteis que faziam parte do nosso plano de estudo, a nossa opção pelo desenvolvimento de uma metodologia analítica baseada no uso de um agente acilante foi desde o início dirigida no sentido de permitir a correcta quantificação de todas as aminas não-voláteis (ou dotadas de reduzida volatilidade) de interesse, presentes nas amostras em estudo. De entre estas mereceram-nos particular atenção as di e poliaminas, que pela presença de mais do que um grupo aminado apresentavam à partida dificuldades adicionais no que respeita à respectiva derivatização, e as duas aminas aromáticas de maior interesse, a tiramina e a 2-feniletilamina. A presença do agrupamento fenólico no caso da tiramina implicava, por seu lado, a necessidade de um processo capaz de promover a respectiva derivatização de uma forma suficientemente estável, de maneira a permitir a respectiva análise.

Os reagentes acilantes apresentam-se como agentes derivatizantes de primeira escolha no que se refere à análise de di e poliaminas por cromatografia gasosa. A literatura apresenta exemplos do uso dos mais variados reagentes deste tipo na análise daqueles compostos. Seiler [1986], em artigo de revisão, refere seis diferentes propostas para a análise de di e poliaminas sob a forma de derivados trifluoroacetilados, quatro propostas para a análise sob a forma de derivados heptafluorobutíricos e ainda um trabalho em que a análise é feita sob a forma de derivados pentafluoropropiónicos e outro

em que os compostos são transformados nos respectivos derivados pentafluorobenzoílicos. Como detectores é referido o uso do detector de ionização de chama (FID), do detector de captura de electrões (ECD) e do detector de massa.

Uma análise da tendência dominante nesta área analítica, dá-nos conta de uma gradual preferência dos diversos autores pelos anidridos fluorados de maior massa molecular em detrimento do anidrido trifluoroacético, cujo uso praticamente se restringe aos primeiros trabalhos datados dos anos setenta. A principal razão poderá estar associada à maior instabilidade demonstrada por estes a que acresce o facto dos derivados com maior número de átomos de flúor apresentarem maior sensibilidade perante o detector de ECD e de serem mais apropriados para serem analisados por detectores de massa, dado proporcionarem fragmentos com maior massa molecular.

Assim, no que respeita ao anidrido pentafluoropropiónico são várias as referências ao seu uso, das quais salientamos um trabalho pioneiro para a quantificação de di e poliaminas em urina com detecção por ECD [Rattenbury *et al.*, 1979], e outro dedicado à determinação simultânea de di e poliaminas e também de aminas aromáticas (m-tiramina e p-tiramina) por GC-MS [Ohki *et al.*, 1982]. Tal como já foi referido no capítulo 2, a última proposta para método cromatográfico oficial da AOAC para a análise de putrescina e de cadaverina em amostras de produtos alimentares é baseada na derivatização dos compostos com este reagente [Staruszkiewicz Jr. e Bond, 1981; Rogers e Staruszkiewicz Jr, 1997].

No que diz respeito ao anidrido heptafluorobutírico, o mesmo foi usado pela primeira vez na quantificação de poliaminas por Fujihara *et al.*, [1983], depois de uma proposta inicial que tinha em vista a identificação por GC-MS da isoputreanina, um metabolito da espermidina [Muskiet *et al.*, 1982]. Depois dessa data, merece destaque especial o trabalho desenvolvido pelo grupo de Muskiet e colaboradores, dedicado à análise de di e poliaminas em fluidos biológicos. Este grupo de autores foi responsável por uma série de trabalhos tendentes à optimização das condições reaccionais mais apropriadas para o processo de derivatização daqueles compostos (e do procedimento analítico, no seu todo) no sentido de conseguirem a quantificação simultânea de um grande número de poliaminas e respectivos metabolitos [Muskiet *et al.*, 1984; Berg *et al.*, 1986, p. ex.]. Metodologias baseadas no uso daquele reagente passaram então a ser usadas de forma sistemática nos diferentes trabalhos do referido grupo [Dorhout *et al.*, 1997; Muskiet *et al.*, 1995 e referências aí citadas].

Com ligeiras alterações de pormenor no que respeita ao "design" do processo de derivatização, o mesmo reagente tem sido usado por outros autores interessados na determinação de poliaminas em urina [Suh *et al.*, 1995, 1997] e em material biológico [Nitsu *et al.*, 1993]. Estes últimos autores justificam a opção pelo anidrido heptafluorobutírico em detrimento do anidrido pentafluorobutírico, também ensaiado, pela instabilidade demonstrada pelos derivados obtidos com este último, o que dava origem ao aparecimento de picos correspondentes a compostos resultantes da respectiva decomposição, mesmo quando a análise era feita apenas 24 horas após a reacção e os derivados armazenados a -20 °C. Pelo contrário, os derivados heptafluorobutíricos apresentaram-se estáveis durante pelo menos 1 mês, quando armazenados à mesma temperatura, dissolvidos em éter etílico. Estas indicações, associadas aos bons resultados obtidos nos ensaios prévios que realizámos, estiveram na origem da nossa escolha ter recaído no anidrido heptafluorobutírico como agente derivatizante para o trabalho em questão.

4.3.2.2. Ensaios executados para o desenvolvimento do processo de derivatização usado

O trabalho experimental realizado durante a fase de desenvolvimento do processo derivativo teve como principal objectivo o estabelecimento das melhores condições reaccionais para a derivatização simultânea das diaminas, das poliaminas e também de outras aminas de interesse nos vinhos, dotadas de reduzida volatilidade, nomeadamente da tiramina.

O processo usado para a derivatização dos compostos pode considerar-se como dividido em duas partes: derivatização propriamente dita e posterior tratamento da solução contendo os derivados.

No que diz respeito às condições reaccionais, usou-se desde o princípio volumes iguais de acetonitrilo e de anidrido heptafluorobutírico, tendo-se experimentado três diferentes conjugações de tempo e de temperatura: 60 min/60 °C; 60 min/80 °C; 30 min/100 °C. As experiências foram feitas com soluções contendo todos os compostos a ensaiar numa concentração de 10 mg/L, sendo a detecção feita pelo espectrómetro de massa em modo de varrimento total e sem recurso a qualquer padrão interno. Os resultados obtidos apresentaram-se muito idênticos nos três casos, tendo-se optado pelo segundo conjunto de condições — 60 min/80 °C – face aos resultados obtidos para as duas aminas menos voláteis, espermidina e espermina, terem sido ligeiramente melhores.

No que respeita ao tratamento posteriormente feito à solução contendo os derivados, foram experimentadas duas propostas alternativas: a) a simples evaporação do meio sob um fluxo de azoto, seguido da redissolução dos derivados em acetato de etilo, de acordo com a sugestão de Suh *et al.* [1997]; b) a extracção dos derivados com diclorometano após tamponização do meio a pH 7, de acordo com as condições propostas por Dorhout *et al.* [1997]. Pese embora ser desfavorável em termos de labor experimental (tempo, trabalho, material), a opção final recaiu nesta última proposta, face ao muito melhor comportamento dos extractos obtidos no que respeita à reprodutibilidade, à definição dos picos e, também, à presença de interferentes.

A adição de uma pequena quantidade de metanol para facilitar a evaporação da solução, proposta por aqueles autores, foi, contudo, eliminada, tendo em consideração alguns problemas manifestados na derivatização da tiramina. Com efeito verificou-se o aparecimento de dois picos referentes ao composto, um dos quais biderivatizado (na função amina e na função fenólica) e o outro monoderivatizado (apenas na função amina), tendo-se notado que o fenómeno era bastante atenuado quando não se usava metanol. Não obstante, os vestígios de pico monoderivatizado apresentaram, também, uma certa correlação com o tempo que mediava entre a preparação dos derivados e a respectiva análise, o que é sinal de uma menor estabilidade do derivado formado em relação aos restantes.

Finalmente, uma saliência especial para a importância assumida pela pequena quantidade de Carbowax 1000 M (0,2 % v/v) adicionada ao acetato de etilo usado como solvente final, proposta por Berg *et al.* [1986]. Não usado por nós nas experiências iniciais, veio a revelar-se determinante na melhoria do comportamento cromatográfico da generalidade dos compostos. A sua acção provavelmente terá a ver com a redução dos sítios activos no sistema cromatográfico, em particular no interior do injector e da pré-coluna, diminuindo dessa forma a adsorção dos derivados em estudo.

4.3.3. Processo cromatográfico

4.3.3.1. Escolha dos padrões internos

Uma das maiores dificuldades quando se desenvolvem metodologias cromatográficas multi-paramétricas aplicadas a matrizes complexas consiste na escolha adequada de padrões internos

capazes de apresentar um comportamento similar ao dos analitos durante as várias etapas do processo analítico. Na ausência de um bom padrão interno, a quantificação rigorosa de cada composto torna-se extremamente difícil de realizar, independentemente da eficiência do método, na sua globalidade.

Nos métodos baseados na técnica de GC-MS, os padrões internos mais efectivos correspondem a análogos isotopicamente marcados e estáveis das substâncias a analisar. Estes compostos, que, do ponto de vista físico-químico, apresentam propriedades idênticas às dos correspondentes analitos, compensam de uma forma efectiva todas as perdas que possam ocorrer durante as etapas de extracção e derivatização e as variações que sempre ocorrem nos volumes injectados e na eficiência do processo de detecção [Gilbert, 1987]. O maior obstáculo ao seu uso situa-se na sua disponibilidade — muitas vezes não estão comercialmente disponíveis os isótopos pretendidos, o que implica a necessidade da sua síntese, e esta normalmente é extremamente difícil de realizar — e no preço, quando comercialmente disponíveis.

Tendo em atenção esses factores, o desenvolvimento deste método iniciou-se com o uso de dois padrões-internos: anfetamina e 1,7-diaminoheptano. O primeiro foi usado para a monitorização da 2-feniletilamina enquanto o segundo foi usado para monitorizar todos as outras aminas em estudo.

A opção, logo à partida, por um padrão interno específico para a 2-feniletilamina teve a ver com a observação cedo efectuada de que, devido à sua volatilidade, o comportamento do respectivo derivado era extremamente dependente das condições em que tinha lugar o processo de evaporação posterior à reacção de derivatização; se, por algum motivo, o processo era mais demorado ou se o fluxo de azoto era mais forte notava-se de imediato uma diminuição da área do pico respectivo. A escolha da anfetamina foi feita em função da analogia estrutural – os dois compostos apenas diferem na presença de um grupo metilo no carbono α da molécula da anfetamina e, obviamente, partindo do facto de ser conhecida a sua ausência nas matrizes em estudo. O seu uso tinha já sido experimentado com êxito nos trabalhos iniciais efectuados com cloroformato de isobutilo como agente derivatizante e o seu bom comportamento no processo de extracção usado tinha sido mesmo por nós aproveitado para o estabelecimento de um método para a determinação de anfetamina em amostras de urina de ratinhos, no qual o composto era igualmente sujeito a um processo de extracção com BEHPA e derivatizado com cloroformato de isobutilo. A validade da escolha feita pode ser facilmente comprovada com os resultados obtidos nos ensaios de linearidade efectuados, os quais, como

veremos adiante, apresentaram uma qualidade de nível idêntico ao normalmente obtido quando se usam análogos isotópicos.

O outro padrão interno, o 1,7-diaminoheptano, inicialmente escolhido em função da sua semelhança estrutural com as diaminas em estudo, apresentou resultados de boa qualidade no que respeita à monitorização dessas diaminas (1,3-diaminopropano, putrescina, cadaverina e 1,6-diaminohexano) e apenas satisfatórios no que respeita à monitorização da tiramina, o que não é de estranhar se atendermos às diferenças estruturais. Os resultados obtidos relativos às duas poliaminas em estudo, a espermidina e a espermina, apresentaram-se, contudo, de muito má qualidade. Estas duas aminas apresentaram níveis de reprodutibilidade e de linearidade intrínsecas (sem uso de padrão interno) bastante inferiores aos verificados para os outros compostos em estudo, provavelmente devido à polaridade remanescente mesmo após a derivatização, em resultado da presença de vários átomos de azoto (três e quatro, respectivamente) com o seu característico par de electrões disponível para interacções com partículas carregadas positivamente. Como seria de esperar, essas variações apresentaram-se mais pronunciadas no caso do composto com mais átomos de azoto, a espermina, e, ao contrário do verificado para as diaminas, não eram acompanhadas por variações idênticas do padrão interno.

Por esse motivo, foi necessário introduzir no método mais dois padrões internos, tendo a escolha recaído em dois compostos com analogia estrutural com as referidas diaminas, não presentes nas matrizes em estudo, e disponíveis comercialmente: nor-espermidina e nor-espermina*. O seu comportamento veio a revelar-se bastante satisfatório para o objectivo em causa, promovendo uma melhoria nítida na qualidade dos resultados obtidos. Ainda assim, principalmente no caso da espermina, subsistiram ainda algumas dificuldades, pelo que o ideal seria a utilização de análogos isotópicos; os mesmos, contudo, não se encontram, tanto quanto conseguimos saber, disponíveis comercialmente, daí a sua não utilização.

O quinto padrão interno usado correspondeu ao isótopo octadeuterado da putrescina, o qual conseguimos adquirir e resolvemos experimentar no sentido de verificar o grau de melhoria obtido para a monitorização daquele composto, regra geral, o mais abundante nas amostras em estudo. A melhoria na qualidade dos resultados foi evidente, embora os resultados obtidos com o

* A designação das poliaminas é muitas vezes feita, de forma simplificada, em função do número de átomos de carbono entre cada função aminada. Com essa notação torna-se mais fácil evidenciar a semelhança estrutural existente entre a espermidina (3-4) e a nor-espermidina (3-3) e entre a espermina (3-4-3) e a nor-espermina (3-3-3).

1,7-diaminoheptano tivessem já, como atrás referido, um bom nível de qualidade. Sem surpresa, devido à maior semelhança estrutural no que respeita ao tamanho das moléculas, o referido isótopo deuterado da putrescina mostrou-se mais adequado não só para a monitorização da putrescina como também do 1,3-diaminopropano e da cadaverina (não tanto para o 1,6-diaminohexano).

Na prática, o uso do padrão interno original, o 1,7-diaminoheptano, deixou praticamente de fazer sentido, acabando por ser usado apenas na monitorização da tiramina. Pese embora as manifestas diferenças na estrutura dos dois compostos, o facto de apresentarem um tempo de retenção semelhante, logo uma volatilidade idêntica, permitiu que o seu uso reflectisse, pelo menos, variações resultantes das perdas inerentes às diferentes etapas de evaporação e ao processo de injecção, sempre problemático em cromatografia gasosa. Infelizmente, e na ausência de análogos isotópicos da tiramina nos catálogos por nós consultados, a descoberta de um bom padrão interno para a tiramina foi por nós feita muito tardiamente, já depois de todas as amostras terem sido analisadas, aquando da implementação definitiva do método referido mais adiante no capítulo 6. A escolha, contudo, era óbvia no contexto em questão e teria permitido concerteza a obtenção de melhores resultados para este composto: trata-se da hidroxianfetamina, cuja diferença estrutural para a tiramina corresponde exactamente à mesma diferença que distingue a anfetamina da 2-feniletilamina.

Como exemplo da importância da escolha do padrão interno na qualidade dos resultados obtidos, apresentam-se na Figura 4.2 duas curvas de calibração relativas à 2-feniletilamina, obtidas na mesma experiência mas usando dois padrões internos diferentes: anfetamina e 1,7-diaminoheptano. Pela observação das duas curvas torna-se facilmente visível a diferença dos resultados obtidos com o uso de padrões internos diferentes e será fácil inferir da importância crucial que a escolha dos mesmos tem na qualidade dos resultados obtidos. Exemplos destes podiam naturalmente ser apresentados para as outras aminas estudadas.

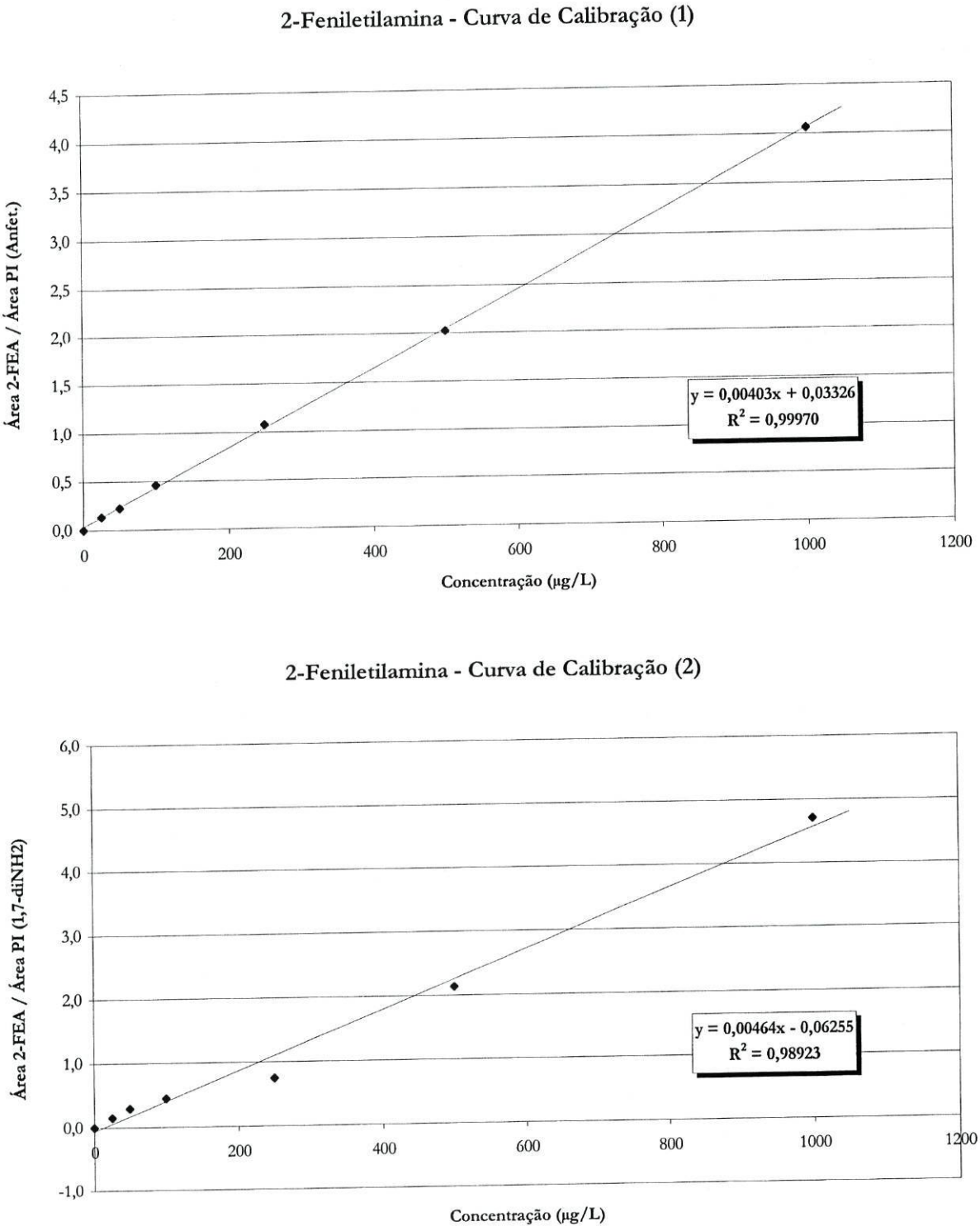


Figura 4.2. Curvas de calibração da 2-feniletilamina obtidas na mesma experiência com o uso, respectivamente, de anfetamina (1) e de 1,7-diaminoheptano (2) como padrões internos.

4.3.3.2. Condições operatórias

Para a separação cromatográfica dos compostos, optou-se por uma coluna dotada de características marcadamente apolares especialmente adequada para o trabalho com detectores de massa, dadas as suas características de reduzido "bleeding" (indicadas pela sigla MS). A referida coluna mostrou-se perfeitamente adequada para os objectivos em vista. Ainda assim é de salientar a importância, já referida anteriormente, da adição de uma pequena quantidade de Carbowax 1000 M (0,2 % v/v) ao acetato de etilo usado como solvente final dos derivados a analisar. Nas soluções injectadas sem a adição do referido composto foi comum o aparecimento de duplos picos, mais ou menos intensos de acordo com os programas de gradiente de temperatura que foram sendo ensaiados, e de fenómenos de "tailing" pronunciados, principalmente nas di e poliaminas. Verificou-se também que o uso de uma pré-coluna contribuiu igualmente para uma melhoria na definição dos picos, de acordo com as indicações referidas na literatura por vários autores. De forma a manter intacta a qualidade dos cromatogramas obtidos, após cada "série" analítica cortou-se a porção inicial da referida pré-coluna (cerca de 25 a 30 cm) substituindo-se a mesma passadas 3 a 4 "séries".

O programa de temperatura finalmente estabelecido teve como objectivo conciliar condições capazes de permitir uma boa separação dos picos de interesse em relação aos interferentes presentes nas amostras com a realização da análise no menor tempo possível. A temperatura inicial da coluna mostrou grande influência no formato dos picos obtidos. Com efeito, temperaturas iniciais inferiores a 80 °C (70 e 60 °C, p. ex.) apresentaram-se melhores para a separação dos compostos com menor tempo de retenção, 1,3-diaminopropano e 2-feniletilamina nomeadamente, enquanto temperaturas superiores a esse valor proporcionaram picos mais bem definidos no que respeita aos compostos menos voláteis como a espermidina e a espermina. O valor finalmente escolhido, 80 °C, foi aquele que se verificou corresponder ao melhor compromisso entre essas duas situações.

O uso do modo de monitorização selectiva de iões para a quantificação dos compostos foi feito de acordo com a prática corrente quando se usa a detecção por espectrometria de massa com fins quantitativos. O critério usado para a definição dos três grupos distintos de iões usados para a monitorização dos compostos (Tabela 4.1) foi apenas o de maximizar o uso de iões comuns a mais do que uma substância e, simultaneamente, permitir a obtenção de picos perfeitamente definidos.

Nas Figuras 4.3 a 4.13 são apresentados cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de mosto. O primeiro (Figura 4.3) corresponde ao cromatograma iónico total, correspondendo os seguintes aos cromatogramas de massa obtidos a partir daquele, usados para a integração dos picos de interesse. De um modo geral, é notória a boa definição da generalidade dos picos; a única excepção é, talvez, o pico correspondente à espermidina (Figura 4.13), o qual apresenta alguma deformação na base do pico, a qual poderia ser resolvida, como assinalado acima, por um aumento da temperatura inicial da coluna. De notar também a perfeita resolução, conseguida através do uso de cromatogramas de massa apropriados, de picos que aparecem sobrepostos no cromatograma inicial, nomeadamente do par putrescina/[$^2H_8$]putrescina e do par 2-feniletilamina/anfetamina.

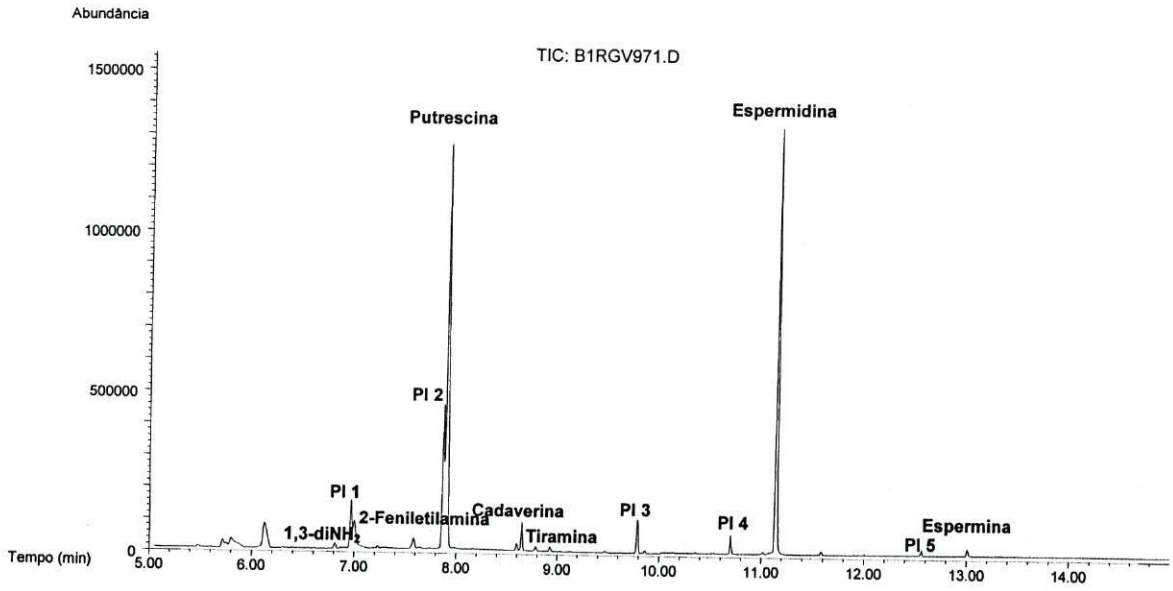


Figura 4.3. Cromatograma iónico total* obtido nas condições usadas para a quantificação dos compostos (monitorização selectiva de três diferentes grupos de iões) correspondente a uma amostra de mosto contendo 1,3-diaminopropano (0,036 mg/L), 2-feniletilamina (0,272 mg/L), putrescina (3,096 mg/L), cadaverina (0,232 mg/L), tiramina (0,013 mg/L), espermidina (3,036 mg/L) e espermina (0,232 mg/L).

Os padrões internos usados foram adicionados à amostra nas seguintes concentrações: PI 1 – Anfetamina (1 mg/L); PI 2 – [$^2H_8$]Putrescina (1 mg/L); PI 3 – 1,7-diaminoheptano (1 mg/L); PI 4 – Nor-espermidina (0,2 mg/L); PI 5 – Nor-espermina (0,2 mg/L).

*Deste cromatograma foram extraídos os cromatogramas de massa (ou cromatogramas iónicos reconstruídos) que se apresentam nas Figuras seguintes.

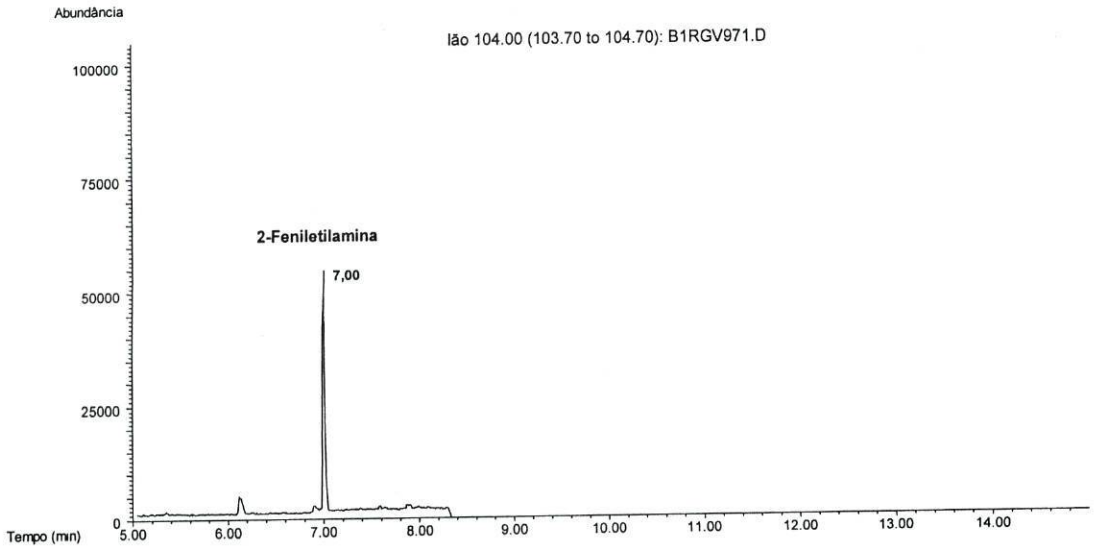


Figura 4.4. Cromatograma de massa do ião *m/z* 104, usado para a quantificação da 2-feniletilamina.

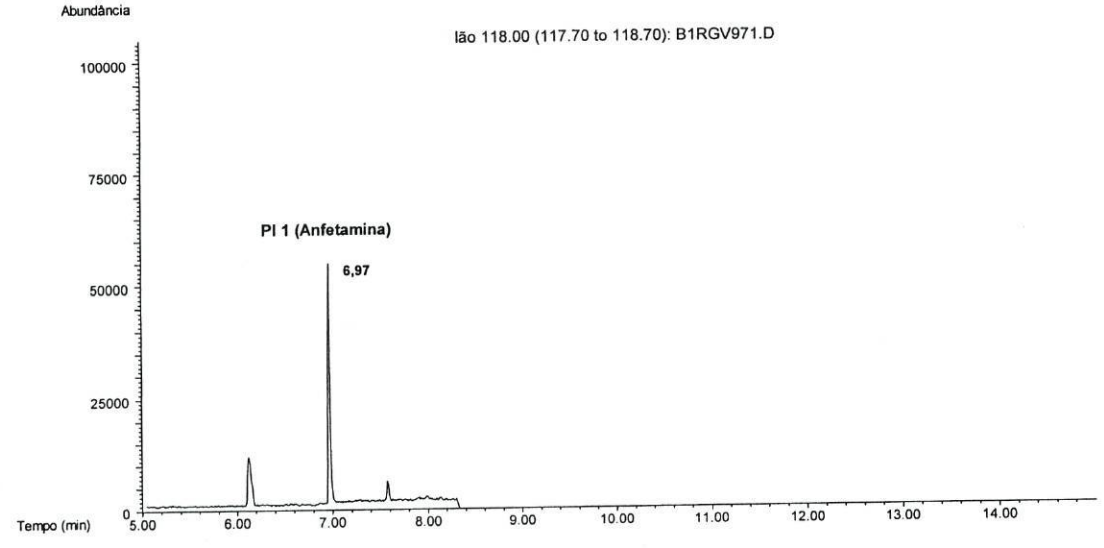


Figura 4.5. Cromatograma de massa do ião *m/z* 118, usado para a "quantificação" da anfetamina (padrão interno 1).

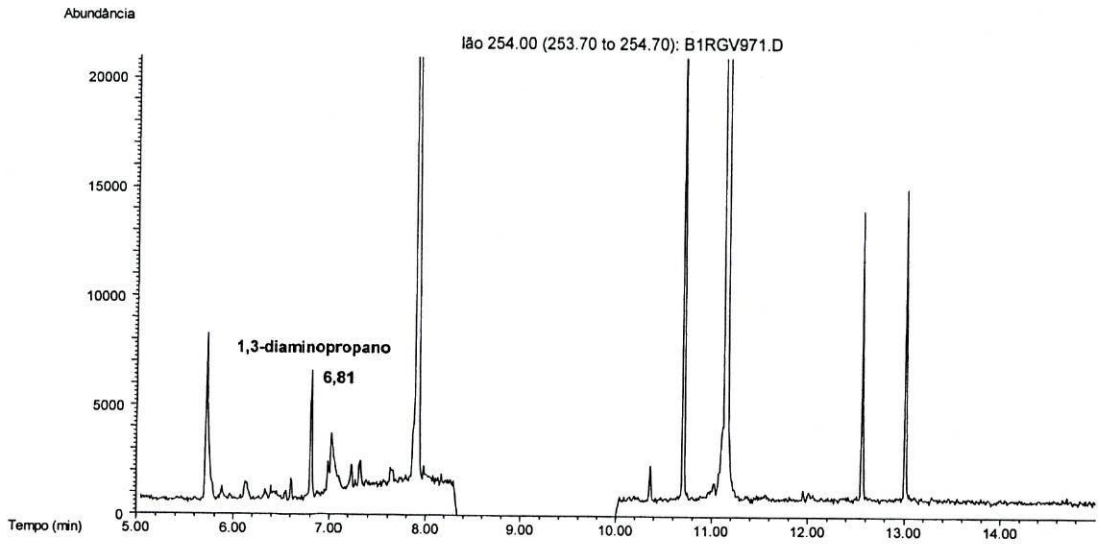


Figura 4.6. Cromatograma de massa do ião *m/z* 254, usado para a quantificação do 1,3-diaminopropano.

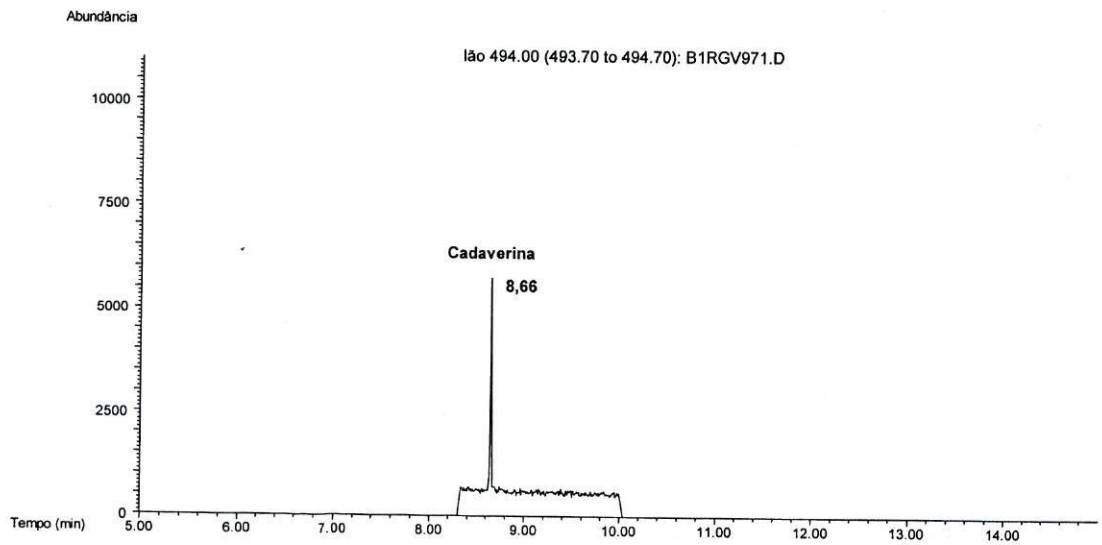


Figura 4.7. Cromatograma de massa do ião *m/z* 494, usado para a quantificação da cadaverina.

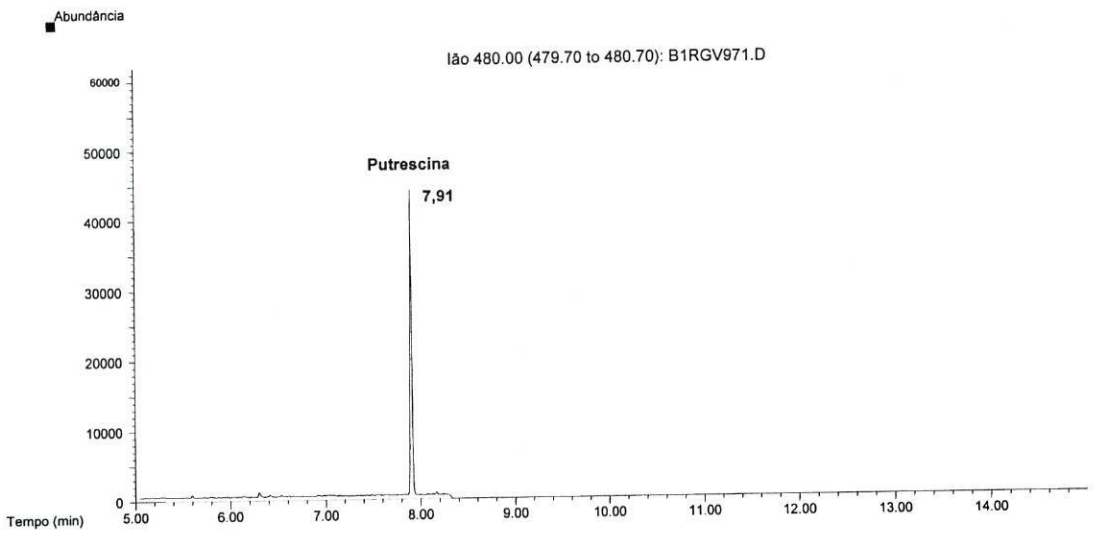


Figura 4.8. Cromatograma de massa do ião *m/z* 480, usado para a quantificação da putrescina.

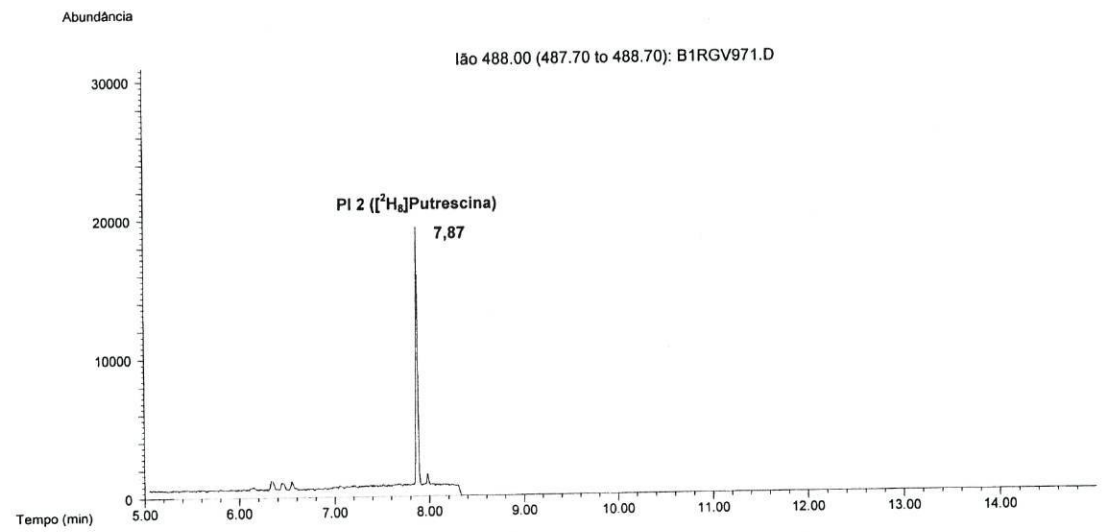


Figura 4.9. Cromatograma de massa do ião *m/z* 488, usado para a quantificação da [$^2H_8$]Putrescina (padrão interno 2).

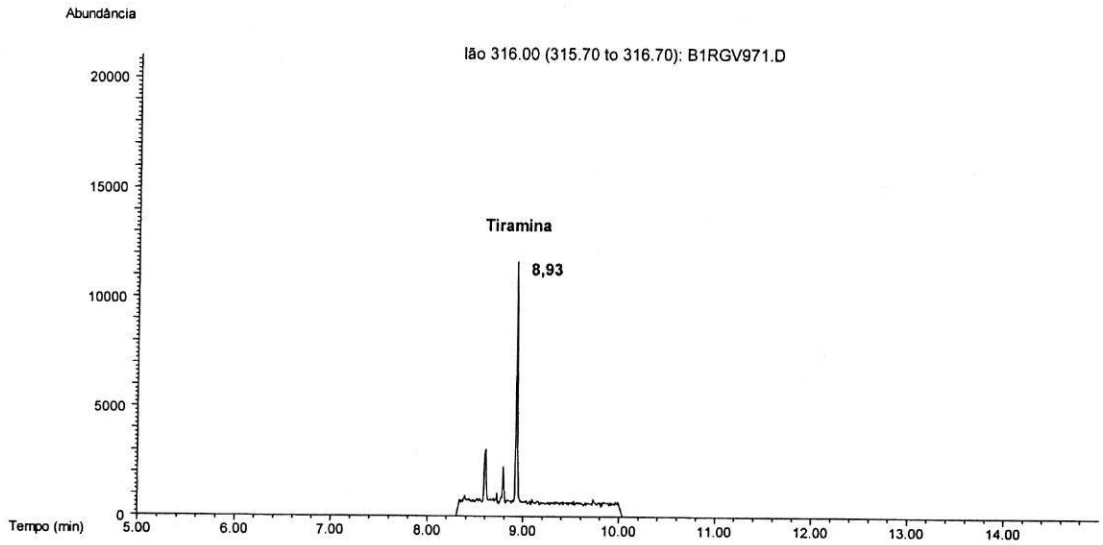


Figura 4.10. Cromatograma de massa do ião *m/z* 316, usado para a quantificação da tiramina.

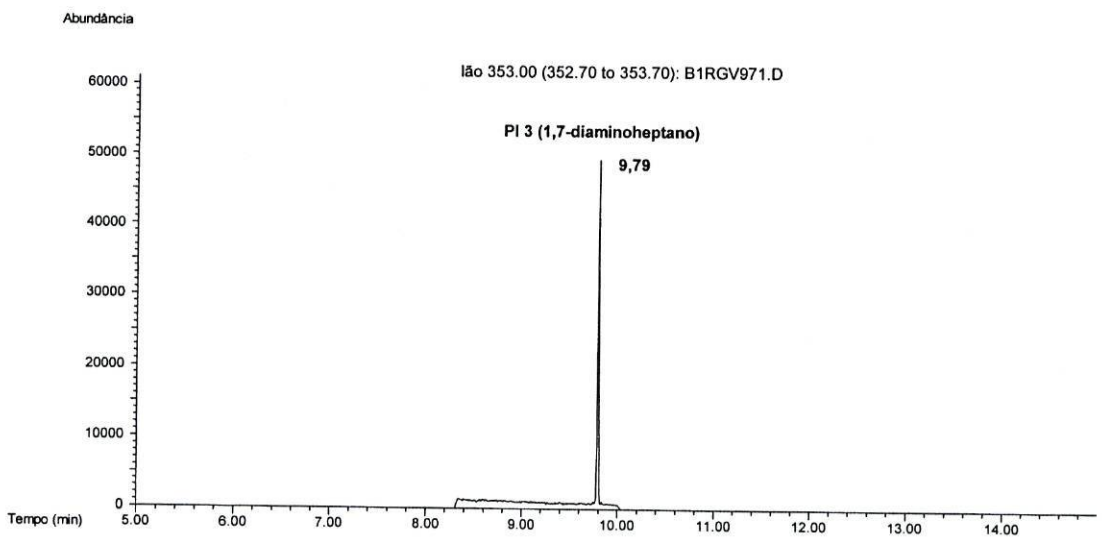


Figura 4.11. Cromatograma de massa do ião *m/z* 353, usado para a "quantificação" do 1,7-diaminoheptano (padrão interno 3).

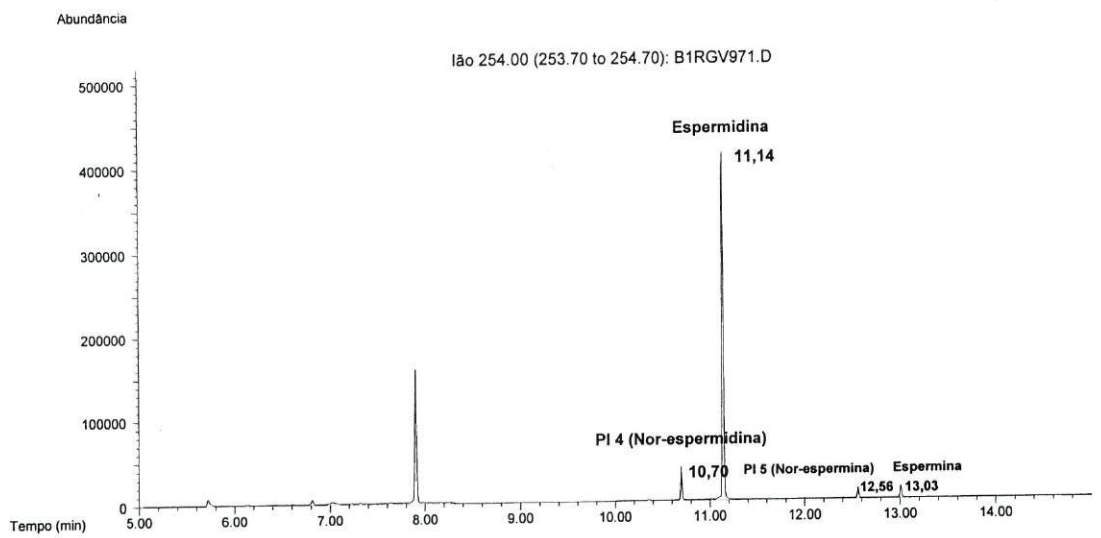


Figura 4.12. Cromatograma de massa do ião *m/z* 254, usado para a quantificação da espermidina, da espermina e dos respectivos padrões internos (nor-espermidina e nor-espermina).

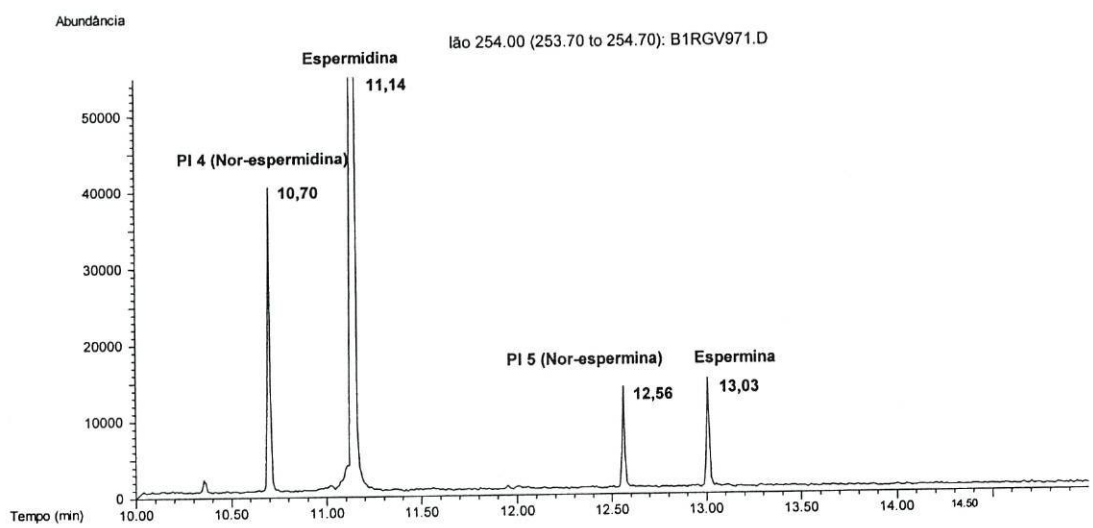


Figura 4.13. O mesmo cromatograma da Figura anterior, visto numa outra escala, de forma a permitir uma correcta visão dos três picos mais pequenos.

4.4. Validação do método

4.4.1. Linearidade

Como é do conhecimento geral, a linearidade representa uma medida da proporcionalidade existente entre os resultados obtidos e a concentração do analito [Jenke, 1996]. Nos métodos cromatográficos, como em muitos outros, para a sua determinação recorre-se à construção de curvas de calibração com soluções padrão de concentração conhecida, com o respectivo coeficiente de correlação (r) a servir de indicador da linearidade do método, sendo esta tanto maior quanto mais aquele se aproximar da unidade [Bressole *et al.*, 1996].

Tendo em conta que para cada série de ensaios (incluindo os ensaios correspondentes ao estudo da precisão e da recuperação) foram preparadas e sujeitas ao procedimento analítico global novas soluções padrão, pode afirmar-se que o estudo da linearidade da metodologia desenvolvida foi feito por várias vezes, tantas quantas as curvas de calibração construídas. Cada curva de calibração foi feita com cinco a seis pontos abrangendo, para cada amina, a gama de concentrações esperada nas amostras a analisar. A amplitude de concentrações geralmente usada foi de 0,010 mg/L a 1 mg/L para o 1,3-diaminopropano, o 1,6-diaminohexano, a espermidina (excepto para os mostos) e a espermina; de 0,010 mg/L a 2 ou 5 mg/L para a cadaverina, a 2-feniletilamina, a tiramina e a espermidina (apenas nos mostos); de 0,100 mg/L a 10 ou 15 mg/L para a putrescina. Os coeficientes de correlação obtidos foram usualmente superiores a 0,99950 para a cadaverina, a putrescina, o 1,3-diaminopropano e a espermidina, superiores a 0,99900 para o 1,6-diaminohexano e para a tiramina e superiores a 0,99500 para a espermina.

O estudo da linearidade do método em condições "reais" de análise, entrando em consideração com a especificidade das matrizes foi feito a par com os estudos de recuperação (ver 4.4.3.).

4.4.2. Precisão

A precisão de um método analítico pode definir-se como a concordância entre uma série de valores experimentais obtidos a partir da análise da mesma amostra sob condições analíticas idênticas [Jenke, 1996].

Para determinar a precisão da metodologia desenvolvida, fizeram-se seis determinações em paralelo a duas amostras de vinho do Porto, a uma amostra de vinho tinto e a uma amostra de mosto, escolhidas de forma a abranger diferentes níveis das aminas em estudo. Fez-se ainda o estudo da precisão na mesma amostra de mosto mas adicionada de 0,250 mg/L de cada amina (1 mg/L, no caso da putrescina). Em todos os casos partiu-se de seis alíquotas da mesma amostra e procedeu-se à sua análise como de um conjunto de seis amostras diferentes se tratasse, em simultâneo com uma série de padrões usados para a construção das curvas de calibração necessárias, como referido em 4.4.1. A exemplo do referido para as amostras, cada extracto final foi injectado em duplicado, considerando-se como resultado final a média dos dois resultados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.4.

No que respeita à putrescina, à cadaverina e à 2-feniletilamina os resultados podem considerar-se de excelente qualidade, tendo em consideração os baixos teores em questão e a complexidade das matrizes em estudo. Para isso contribuiu, naturalmente, a eficácia demonstrada pelos respectivos padrões internos. Para todas as outras aminas, os resultados foram de qualidade inferior mas ainda assim muito positivos, com coeficientes de variação sistematicamente inferiores a 10 %.

TABELA 4.4

PRECISÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA NAS DIFERENTES MATRIZES ESTUDADAS: VINHO DO PORTO (2 AMOSTRAS), VINHO DE MESA, MOSTO E MOSTO ADICIONADO DE 0,250 mg/L DE CADA AMINA[a] (n=6)

		V. Porto (a)	V. Porto (b)	V. Tinto	Mosto	Mosto + 0,250[a]
1,3-diaminopropano	Média (mg/L)	nd	0,025	nd	nd	0,190
	Desvio-padrão	—	0,002	—	—	0,009
	C. V. (%)	—	**8,0**	—	—	**4,5**
Putrescina	Média (mg/L)	1,639	4,456	11,952	2,239	4,179
	Desvio-padrão	0,011	0,060	0,228	0,062	0,157
	C. V. (%)	**0,7**	**1,4**	**1,9**	**2,8**	**3,8**
Cadaverina	Média (mg/L)	0,073	0,200	0,234	0,263	0,524
	Desvio-padrão	0,002	0,007	0,005	0,004	0,014
	C. V. (%)	**2,7**	**3,5**	**2,1**	**1,5**	**2,6**
Espermidina	Média (mg/L)	0,023	0,058	0,469	2,011	2,258
	Desvio-padrão	0,002	0,005	0,020	0,069	0,124
	C. V. (%)	**8,7**	**8,6**	**2,1**	**3,4**	**5,5**
Espermina	Média (mg/L)	nd	nd	nd	nd	0,206
	Desvio-padrão	—	—	—	—	0,007
	C. V. (%)	—	—	—	—	**3,4**
Feniletilamina	Média (mg/L)	0,186	0,721	1,386	0,350	0,604
	Desvio-padrão	0,006	0,020	0,038	0,005	0,005
	C. V. (%)	**3,2**	**2,8**	**2,7**	**1,4**	**0,8**
Tiramina	Média (mg/L)	0,309	0,037	2,354	0,038	225,3
	Desvio-padrão	0,017	0,006	0,090	0,004	0,007
	C. V. (%)	**5,5**	**16,2**	**3,8**	**10,5**	**3,0**

[a] Mosto + 1 mg/L, no caso da putrescina

nd - não detectado

4.4.3. Recuperação

Na ausência de amostras certificadas, que permitam comparar os resultados obtidos pela aplicação do método em estudo com os valores existentes nas mesmas, a melhor forma de avaliar a exactidão de um método consiste na execução de ensaios de recuperação. Estes ensaios consistem em sujeitar ao procedimento analítico global amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito, sendo o processo tanto mais exacto quanto mais próximo de 100 % se situar a relação entre a quantidade de analito adicionada e a quantidade de analito recuperada.

Efectuaram-se dois ensaios de recuperação, usando-se para o efeito uma amostra de vinho do Porto e uma amostra de mosto, cujo teor nas aminas em estudo tinha sido determinado no ensaio de precisão. No caso da amostra de vinho do Porto, usaram-se quatro diferentes alíquotas, às quais foram adicionadas quatro diferentes quantidades de cada uma das aminas, enquanto no caso do mosto o número de alíquotas usado foi de cinco. O tratamento das amostras foi feito como referido em 4.2.4., em paralelo com uma série de soluções padrão usadas para a construção das curvas de calibração necessárias para a quantificação. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.5 e na Tabela 4.6.

Da análise das referidas tabelas, pode inferir-se que os valores obtidos foram globalmente muito bons para a amostra de vinho do Porto, enquanto no ensaio realizado na amostra de mosto os resultados obtidos foram de qualidade inferior, com um número significativo de compostos (1,3-diaminopropano, espermidina, espermina e tiramina) a apresentar valores médios de recuperação inferiores a 90 %.

Deve aqui salientar-se que, tendo em atenção o uso de padrões internos na quantificação dos compostos, os valores obtidos neste tipo de ensaio, embora de grande importância para a avaliação da exactidão do método, não correspondem em bom rigor, àquilo que habitualmente se entende por ensaio de recuperação, ou seja, à quantidade de composto que em termos absolutos é recuperada após ser sujeita ao procedimento analítico em questão. Neste caso, o valor obtido significa antes a variação existente, entre as amostras e os padrões, da relação analito/padrão interno. Uma recuperação de 90 % significará, pois, que a quantidade de analito recuperada foi de 90 % em relação à quantidade de padrão interno recuperada, independentemente dos valores absolutos para cada um dos compostos. Uma recuperação superior a 100 %, por seu lado, significará apenas que a

recuperação absoluta do analito é superior à do respectivo padrão interno e não, como à primeira vista se poderia pensar, que a quantidade de analito recuperada nas amostras é maior do que a quantidade de analito recuperada nos padrões.

Desta forma, torna-se óbvia mais uma vez, a extrema importância da escolha do padrão interno usado na quantificação de determinado analito. Neste caso, os resultados obtidos confirmam aquilo que já foi afirmado a propósito da qualidade dos padrões internos usados neste trabalho: em ambas as matrizes, os melhores resultados foram os referentes à putrescina e à 2-feniletilamina, o que comprova o atrás referido acerca do bom desempenho dos respectivos padrões internos.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de recuperação, construíram-se gráficos (um para cada matriz e para cada amina) relacionando os teores obtidos (ordenadas) em função dos teores adicionados (abcissas). Estes gráficos, que correspondem àqueles que se obtêm quando se usa o método das adições para a quantificação das amostras, foram por nós designados por "curvas de recuperação". O coeficiente de correlação obtido indica-nos a linearidade da metodologia em condições "reais" de análise, entrando em conta com a especificidade das matrizes analisadas. As curvas de recuperação obtidas para cada uma das aminas, incluindo as respectivas equações das rectas de regressão e o valor de R^2 (coeficiente de determinação) são apresentadas em anexo (anexo 2). Em cada um dos gráficos apresentados é apresentado o valor correspondente ao teor da amina na amostra em estudo (teor inicial), o qual corresponde ao teor obtido nos ensaios de precisão, já que as amostras usadas foram as mesmas. Da análise dos gráficos pode concluir-se da boa adequação do método desenvolvido para a determinação dos compostos em estudo nas duas matrizes ensaiadas.

TABELA 4.5

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE VINHO DO PORTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação* (%)	Recuperação média (%)
1,3-diaminopropano	nd	0,100	0,091	91,0	**94,4**
		0,250	0,225	90,0	
		0,500	0,487	97,4	
		1,000	0,992	99,2	
Putrescina	1,639	0,250	1,889	100,0	**100,7**
		0,500	2,155	103,2	
		1,000	2,629	99,0	
		2,000	3,646	100,4	
Cadaverina	0,073	0,100	0,187	114,2	**109,0**
		0,250	0,347	109,7	
		0,500	0,598	105,1	
		1,000	1,143	107,0	
Espermidina	0,023	0,100	0,115	92,0	**105,2**
		0,250	0,290	106,8	
		0,500	0,542	103,8	
		1,000	1,203	118,0	
Espermina	nd	0,100	0,117	117,0	**102,9**
		0,250	0,252	100,8	
		0,500	0,512	102,4	
		1,000	0,912	91,2	
2-Feniletilamina	0,186	0,100	0,275	89,0	**97,3**
		0,250	0,442	102,4	
		0,500	0,675	97,8	
		1,000	1,184	99,8	
Tiramina	0,309	0,100	0,413	104,0	**100,9**
		0,250	0,522	85,2	
		0,500	0,822	102,6	
		1,000	1,425	111,6	

* Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

TABELA 4.6

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE MOSTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação* (%)	Recuperação média (%)
1,3-diaminopropano	nd	0,025	0,021	84,0	**79,7**
		0,050	0,041	82,0	
		0,100	0,076	76,0	
		0,250	0,190	76,0	
		0,500	0,403	80,6	
Putrescina	2,239	0,200	2,429	95,0	**96,3**
		0,500	2,684	89,0	
		1,000	3,200	96,1	
		2,000	4,179	97,0	
		5,000	7,461	104,4	
Cadaverina	0,263	0,025	0,287	96,0	**104,4**
		0,050	0,312	98,0	
		0,100	0,374	111,0	
		0,250	0,524	104,4	
		0,500	0,826	112,6	
Espermidina	2,011	0,025	2,033	88,0	**85,1**
		0,050	2,048	74,0	
		0,100	2,093	82,0	
		0,250	2,228	86,8	
		0,500	2,484	94,6	
Espermina	0,206	0,025	0,231	100,0	**89,2**
		0,050	0,249	86,0	
		0,100	0,294	88,0	
		0,250	0,412	82,4	
		0,500	0,655	89,8	
2-Feniletilamina	0,350	0,025	0,375	100,0	**100,6**
		0,050	0,389	78,0	
		0,100	0,469	119,0	
		0,250	0,604	101,6	
		0,500	0,872	104,4	
Tiramina	0,038	0,025	0,058	80,0	**88,0**
		0,050	0,098	120,0	
		0,100	0,118	80,0	
		0,250	0,225	74,8	
		0,500	0,463	85,0	

* Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

4.4.4. Limites de detecção e de quantificação

Não foram executados estudos exaustivos tendo em vista a determinação dos limites de detecção e de quantificação. Todavia, verificou-se ser possível detectar facilmente todas as aminas em estudo quando analisados padrões contendo 10 μg/L de cada, os quais foram usados para a construção das curvas de calibração. Um ensaio de precisão efectuado com um destes padrões revelou coeficientes de variação da ordem dos 15% para a maioria das aminas, com excepção da tiramina e da espermina, que apresentaram valores superiores. Estes resultados foram genericamente confirmados aquando da análise de amostras contendo teores de aminas dessa ordem de grandeza. Usualmente, foi possível determinar teores de 5-10 μg/L de 1,3-diaminopropano, cadaverina, espermidina e 2-feniletilamina (nenhuma amostra analisada apresentou tão baixos teores de putrescina) com um coeficiente de variação inferior a 15%. O valor de 10 μg/L foi, por isso, adoptado como limite de quantificação para essas aminas. Para a tiramina e para a espermina, coeficientes de variação desta ordem de grandeza apenas foram atingidos quando o teor das amostras era de 20-30 μg /L. Abaixo destes níveis, o coeficiente de variação era sistematicamente superior.

De notar que houve a intenção de optimizar a metodologia de forma a obter-se linearidade numa zona de trabalho até 10-15 mg/L, dado os teores de putrescina apresentados por algumas amostras. Caso houvesse necessidade de se baixar o limite de quantificação poder-se-ia eventualmente alterar alguns dos volumes usados, em especial aumentar a quantidade de extracto hidroclorídrico sujeita ao processo de derivatização (100 μL).

4.5. Conclusões

O método desenvolvido demonstrou boas características para uma rigorosa quantificação dos compostos em estudo — diaminas, poliaminas e duas das mais importantes aminas aromáticas: tiramina e 2-feniletilamina — em matrizes dotadas de elevado grau de complexidade como são os vinhos do Porto e os mostos. As principais vantagens que lhe estão associadas são a grande sensibilidade e os bons níveis de linearidade, precisão e exactidão demonstrados. Apresenta também a capacidade, inerente aos métodos de quantificação por GC-MS, de fornecer, para além do tempo de

retenção cromatográfico, dados adicionais relativos à identificação dos compostos em estudo, normalmente suficientes para proporcionar a sua identificação inequívoca sempre que, por qualquer motivo, possam surgir dúvidas quanto à sua identidade.

Como principal desvantagem podemos referir o facto da metodologia requerer bastante trabalho laboratorial, o que torna necessariamente lento o ritmo analítico alcançado. Adicionalmente, é de referir alguns problemas ligados à determinação da tiramina, nomeadamente uma certa tendência para o aparecimento de um segundo pico correspondente ao derivado monoderivatizado, provavelmente em consequência de uma degradação do composto biderivatizado mais rápida do que seria desejável. Acresce o facto de na altura do desenvolvimento do método não ter sido usado um padrão interno com boas propriedades para a monitorização do composto, falha essa, contudo, passível de ser ultrapassada com facilidade.

Bibliografia

Berg, G. van den, Muskiet, F., Kingma, A.W., Slik, W. van der, Halie, M.R., Simultaneous gas-chromatographic determination of free and acetyl-conjugated polyamines in urine. ***Clin. Chem., 32,*** 1930 (1986).

Bressolle, F., Bromet-Petit, M., Audran, M., Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Application to pharmacokinetics. ***J. Chromatogr. B, 686,*** 3 (1996).

Blau, K. in: ***Clinical Biochemistry - Principles, Methods, Applications. Volume 1 - Mass Spectrometry*** (editado por A.M. Lawson — Walter de Gruyter, Berlim, N. York), Cap. 3 - Biogenic amines, p. 129 (1989).

Blau, K. in: ***Handbook of Derivatives for Chromatography***, 2ª Edição, (editado por K. Blau e J. Halket — Wiley, Chichester), Cap. 3 – Acylation, p. 31 (1994).

Brandts, P.M., Maes, R.A.A., Leferink, J.G., Ligny, C.L., Nieuwdorp, G.H.E., Ion-pair extraction of some sympathomimetics. Description of an extraction model for terbutaline and investigation of some factors influencing the recovery of sympathomimetics. ***J. Chromatogr., 135,*** 85 (1982).

Borg, K.O., Westerlund, D., Fluorimetric determination of non-fluorescent amines by ion pair extraction. ***Z. Anal. Chem., 252,*** 275 (1970).

Chaves das Neves, H.J., Freitas, A.M.C. in: ***Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução*** (editado por Dias de Sousa, Lda., Póvoa de Santa Iria), Cap. 1 - Introdução à teoria da separação cromatográfica, p. 11 (1996a).

Chaves das Neves, H.J., Freitas, A.M.C. in: ***Introdução à cromatografia gás-líquido de alta resolução*** (editado por Dias de Sousa, Lda., Póvoa de Santa Iria), Cap. 8 - Derivatização analítica, p. 177 (1996b).

Czerwonka, R., Tsikas, D., Brunner, G., Hochdruck-flüsigkeits-chromatographische bestimmung von histamin in plasma bei lebererkrankungen mit vorsäulen-derivatisierung mit o-phthaldialdehyd. ***Chromatographia, 25,*** 219 (1988).

Dorhout, B., Kingma, A.W., de Hoog, E., Muskiet, F., Simultaneous determination of polyamines, N-acetylated polyamines and the polyamine analogues BE-3-3-3 and BE-4-4-4-4 by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphurus detection. ***J. Chromatogr. B, 700,*** 23 (1997).

Drozd, J. in: ***Chemical Derivatization in Gas Chromatography (Vol. 19 da Colecção Journal of Chromatography Library)***, (editado por Elsevier, Amsterdam), Cap. 4 – Most frequent derivatives and methods for their preparation, p. 53 (1981).

Eksborg, S., Lagerström, P.-O., Modin, R., Schill, G., Ion-pair chromatography of organic compounds. ***J. Chromatogr., 83,*** 99 (1973).

Fernandes, J.O., Ferreira, M., Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 4-(5-)methylimidazole in ammonia caramel colour using ion-pair extraction and derivatization with isobutylchloroformate. ***J. Chromatogr. A, 786,*** 299 (1997).

Fujihara, S., Nakashima, T., Kurogochi, Y., Determination of polyamines in human blood by electron-capture gas-liquid chromatography. ***J. Chromatogr., 277,*** 53, (1983).

Gilbert, J., in: ***Applications of Mass Spectrometry in Food Science*** (editado por J. Gilbert — Elsevier, Londres-N. York), Cap. 2 - Applications of quantitative mass spectrometry in food science, p. 73 (1987).

Gustavii, K., Brandstrom, A., Allansson, S., Ion pair extraction in preparative organic chemistry. Part VII. Separation and purification of amines from reaction mixtures. ***Acta Chem. Scand., 25,*** 77, (1971).

Gustavii, K., Schill, G., Determination of amines and quaternary ammonium ions as complexes with picrate. Part 1. Constantes needed in the calculation of extraction conditions; Part 2. Disturbances by foreign anions. ***Acta Pharm. Suecica, 3,*** 259 (1966).

Halket, J.M., in: ***Handbook of Derivatives for Chromatography,*** 2ª Edição, (editado por K. Blau e J. Halket — Wiley, Chichester), Cap. 14 - Derivatives for gas chromatography-mass spectrometry, p. 297 (1994).

Hoogewijs, G., Massart, D.L., Ion-pair extraction of basic drugs with di(2-ethylhexyl)phosphoric acid. ***Anal. Chim. Acta, 106,*** 271 (1979).

Hoogewijs, G., Massart, D.L., Development of a standardized analysis strategy for basic drugs using ion-pair extraction and high-performance liquid chromatography – I. Philosophy and selection of extraction technique. ***J. Pharm. Biom. Anal., 1,*** 321 (1983).

Hoogewijs, G., Massart, D.L., Development of a standardized analysis strategy for basic drugs using ion-pair extraction and high-performance liquid chromatography – III. Analysis of Pharmaceutical dosage forms. ***J. Pharm Biom. Anal., 2,*** 449 (1984).

Hoogewijs, G., Massart, D.L., Development of a standardized analysis strategy for basic drugs using ion-pair extraction and high-performance liquid chromatography – VIII. Method construction for the determination of mebeverine in tablets and biological fluids. ***J. Chromatogr., 377,*** 391 (1986).

Jenke, D.R., Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. ***J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 19,*** 737 (1996).

Kataoka, H., Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. ***J. Chromatogr. A, 733,*** 19 (1996).

Knapp, D.R., in: ***Handbook of Analytical Derivatization Reactions,*** (editado por Willey, N. Iorque), Cap. 2 - Amino compounds, p. 65 (1979).

Modin, R., Tilly, A., Quantitative determinations by ion pair extraction. Part 3. Ion pairs between quaternary ammonium ions and carboxylic acids and phenol. ***Acta Pharm. Suecica, 5,*** 311 (1968).

Modin, R., Quantitative determinations by ion pair extraction. Part 7. Extraction of ionizable organic compounds with ion-pairing and adduct-forming agents. ***Acta Pharm. Suecica, 8,*** 509 (1971).

Modin, R., Studies on the isolation and determinations of ionizable organic compounds by the use of ion-pairing and adduct-forming agents. ***Acta Pharm. Suecica, 9,*** 157 (1972).

Modin, R., Johansson, M., Quantitative determinations by ion pair extraction. Part 8. Extraction of aminophenols and aminoalcohols by bis(2-ethylhexyl)phosphoric acid. ***Acta Pharm. Suecica, 8,*** 561 (1971).

Modin, R., Schill, G., Selective extraction of organic compounds as ion-pairs and adducts. ***Talanta, 22,*** 1017 (1975).

Muskiet, F., Stratingh, C.M., A.W., Fremouw-Ottevangers, D.C., Halie, M.R., Mass spectrometric identification of isoputreanine, a metabolite of spermidine and/or spermine, in human urine. ***J. Chromatogr., 230,*** 142, (1982).

Muskiet, F., van den Berg, G., Kingma, A.W., Fremouw-Ottevangers, D.C., Halie, M.R., Total polyamines and their non-α-amino acid metabolites simultaneously determined by gas chromatography, with nitrogen-phosphurus detector, and some clinical applications. ***Clin. Chem., 30,*** 687 (1984).

Muskiet, F, Dorhout, B., van den Berg, G., Hessels, J., Investigation of polyamine metabolism by high-performance liquid chromatography and gas chromatographic profiling methods. ***J. Chromatogr. B, 667,*** 189 (1995).

Nelson, L.M., Bubb, F.A., Lax, P.M., Weg, M.W., Sandler, M., An improved method for the differential assay of 3-O-methylated catecholamines in human urine using ion-pair extraction and gas chromatography electron capture detection. ***Clin. Chim. Acta, 92,*** 235 (1979).

Niitsu, M., Samejima, K., Matsuzaki, S., Hamana, K., Systematic analysis of naturally occurring linear and branched polyamines by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. ***J. Chromatogr., 641,*** 115, (1993).

Ohki, T., Saito, A., Ohta, K., Niwa, T., Maeda, K., Sakakibara, J., Amine metabolite profile of normal and uremic urine using gas chromatography-mass spectrometry. ***J. Chromatogr., 233,*** 1 (1982).

Persson, B.-A., Studies on the isolation of ammonium compounds by ion pair partition. ***Acta Pharm. Suecica, 8,*** 217 (1971).

Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E., Applications of the ion-pair concept to hydrophilic substances with special emphasis on peptides. ***Pharmaceut. Research, 14,*** 119 (1997).

Rattenbury, J.M., Lax, P.M., Blau, K., Sandler, M., Separation and quantification of urinary di- and polyamines by gas chromatography with electron capture detection. ***Clin. Chim. Acta, 95,*** 61 (1979).

Rogers, P.L., Staruszkiewicz Jr., Gas chromatographic method for putrescine and cadaverine in canned tuna and mahimahi and fluorometric method for histamine (Minor modification of AOAC official method 977.13): collaborative study. ***J. AOAC Int., 80,*** 591 (1997).

Schill, G., Isolation and determination of amines and quaternary ammonium ions as complexes. ***Acta Pharm. Suecica, 2,*** 177 (1965).

Schill, G., ***Ion Exchange and Solvent Extraction, Vol. 6*** (editado por Marinsky, J.A. e Marcus, Y. — Marcel Dekker, N. Iorque) (1974).

Schill, G., Ehrsson, H., Vessman, J., Westerlund, D., ***Separation Methods for Drugs and Related Organic Compounds*** (Swedish Pharmaceutical Press, Estocolmo), (1984).

Scott, N.R., Chakraborty, J., Marks, V., Determination of the urinary metabolites of caffeine and theophylline by high-performance liquid chromatography. A comparative study of a direct injection and an ion-pair extraction procedure. ***J. Chromatogr., 375,*** 321 (1986).

Seiler, N., Review - Polyamines. ***J. Chromatogr., 379,*** 157 (1986).

Staruszkiewicz Jr., W.F., Bond, J.F., Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine, and histamine in foods. ***J. AOAC Int., 64,*** 584 (1981).

Suh, J.W., Lee, S.H., Park, Y.H, Chung, B.C., Park, J., Comparative free and acetylated polyamine profiles in the urine of normal subjects and various cancer patients. ***Anal. Sci. Technol., 8,*** 895 (1995).

Suh, J.W., Lee S., Chung B.C., Park, J., Urinary polyamine evaluation for effective diagnosis of various cancers. ***J. Chromatogr. B, 688,*** 179 (1997).

Thomsen, M., Willumsen, D. Quantitative ion-pair extraction of 4-(5)-methylimidazole from caramel colour and its determination by reversed-phase ion-pair liquid chromatography. ***J. Chromatogr., 211,*** 213 (1981).

Tsikas, D., Velásquez, R., Toledano, C., Brunner, G., Ion-pair extraction of histamine from biological fluids and tisúes for its determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. ***J. Chromatogr., 614,*** 37 (1993).

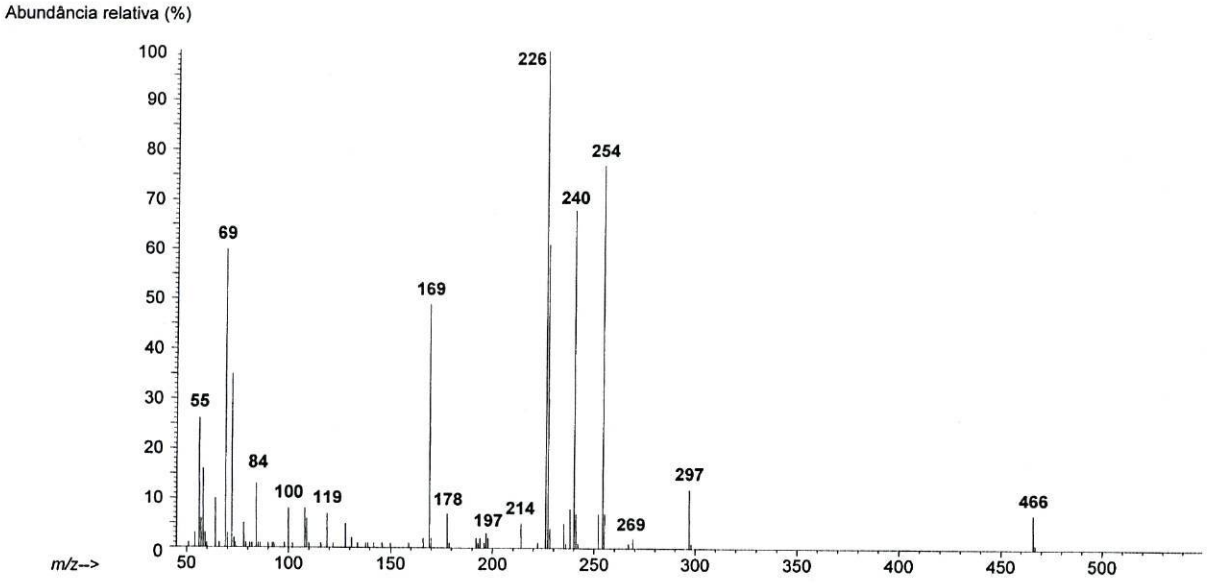
Velásquez, R., Tsikas, D., Brunner, G., Determination of histamine in food by combined ion-pair extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. ***Fresenius J. Anal. Chem., 343,*** 78 (1992).

CAPÍTULO 4

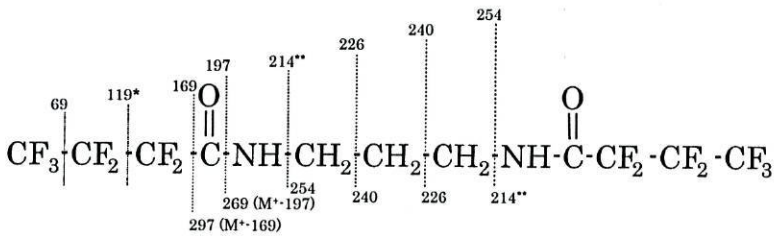
ANEXO 1

ESPECTROS DE MASSA DOS DERIVADOS HEPTAFLUOROBUTÍRICOS DAS AMINAS BIOGÉNICAS ESTUDADAS

1,3-DIAMINOPROPANO

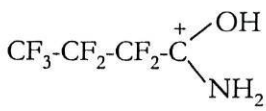


$M^+ = 466$



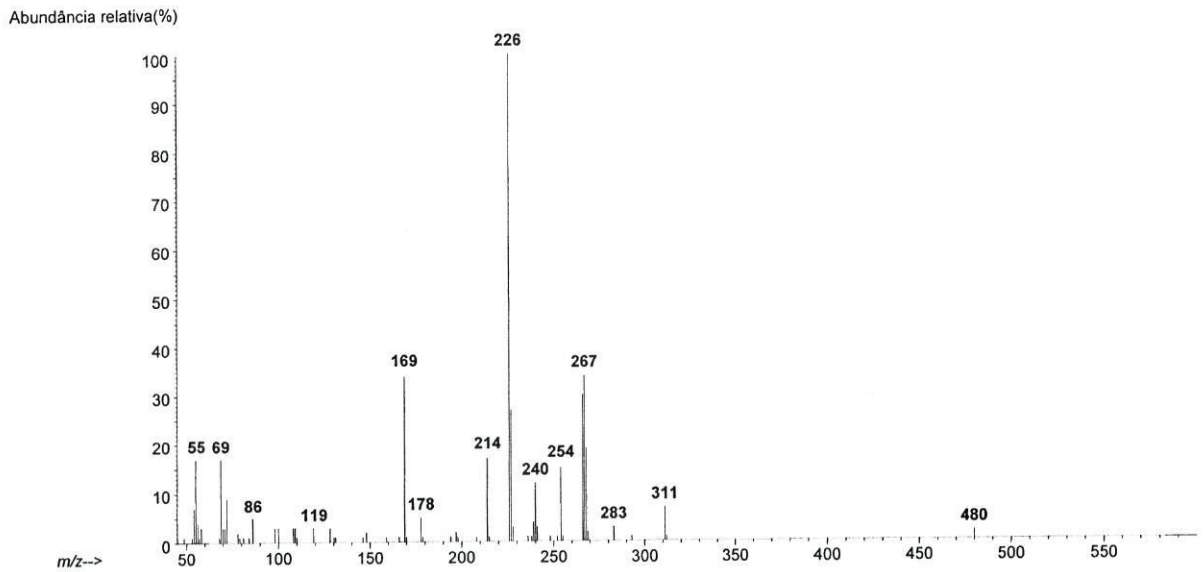
* Este fragmento C_2F_5 (*m/z* 119) dá origem ao fragmento C_2F_4 (*m/z* 100) por perda de um átomo de flúor.

** Fragmento que resulta de ruptura seguida de estabilização com dois átomos de hidrogénio adicionais, com a provável estrutura de:

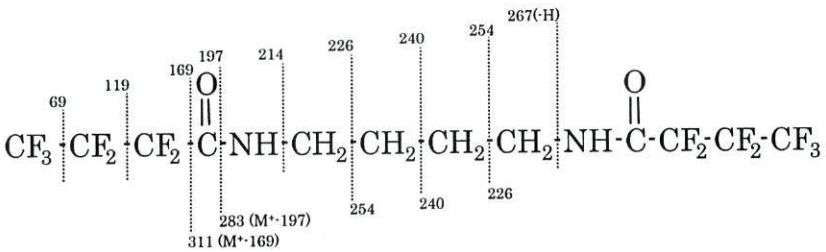


Nota: as particularidades do espectro acima mencionadas são comum à maioria dos espectros que se apresentam a seguir, pelo que as indicações dadas servem também para os restantes.

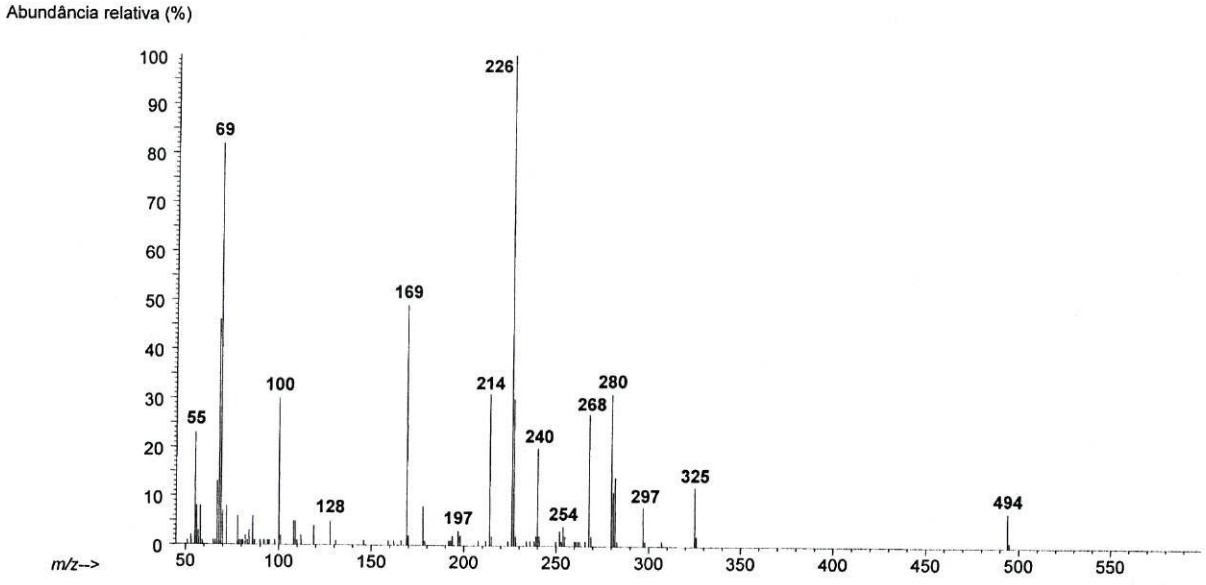
PUTRESCINA



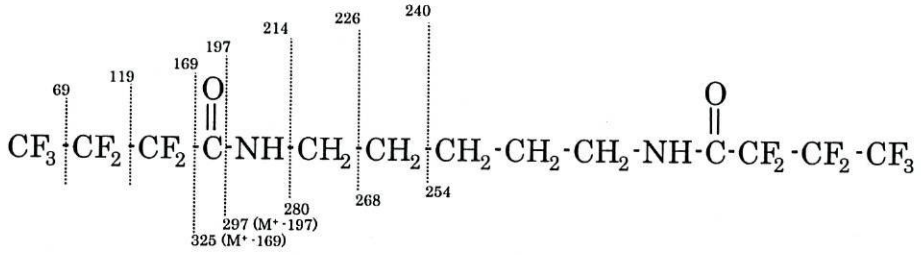
$M^+ = 480$



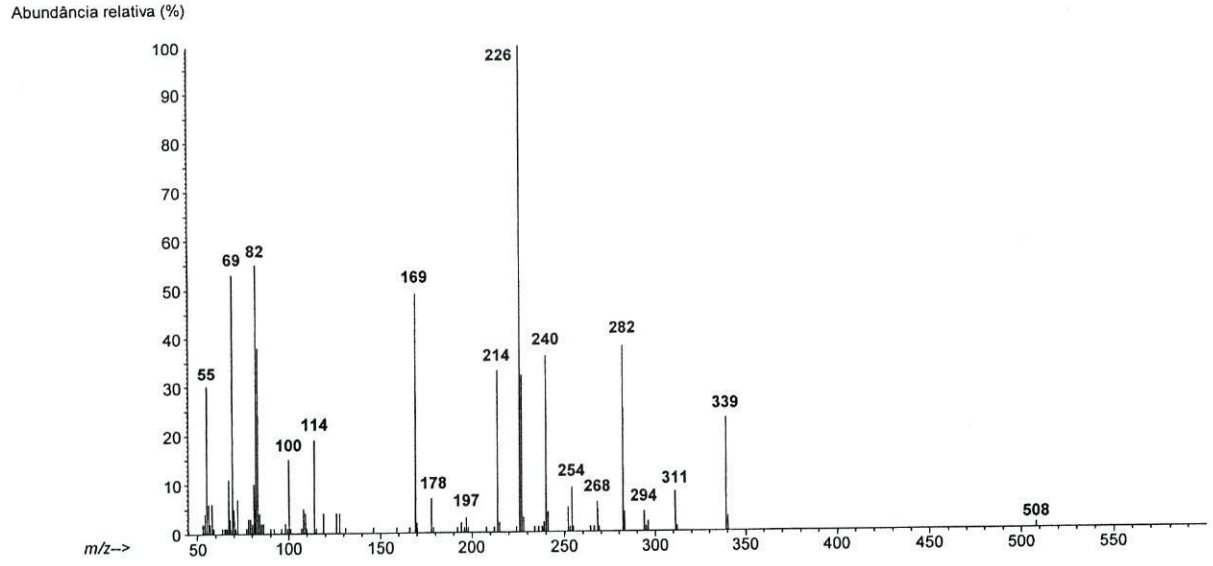
CADAVERINA



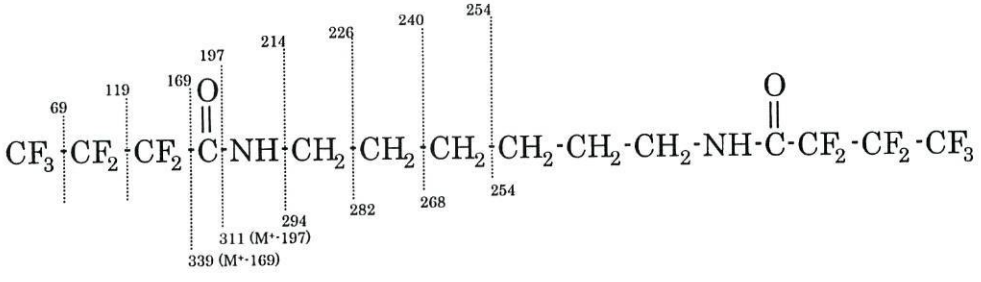
$M^+ = 494$



1,6-DIAMINOHEXANO

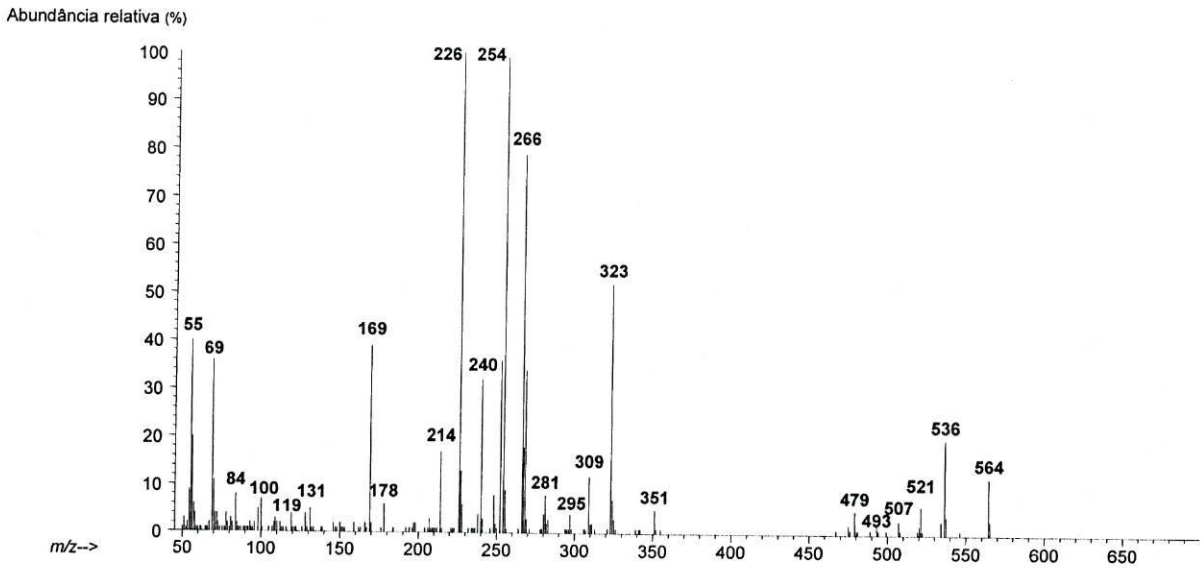


$M^+ = 508$

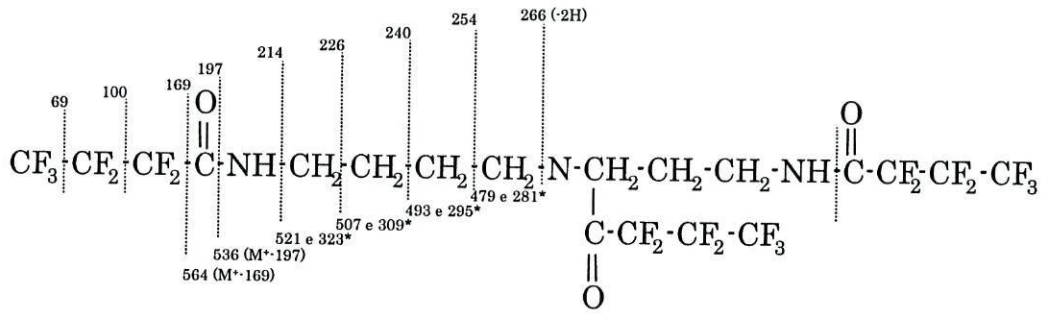


Possível estrutura do fragmento *m/z* 82 — CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CN

ESPERMIDINA

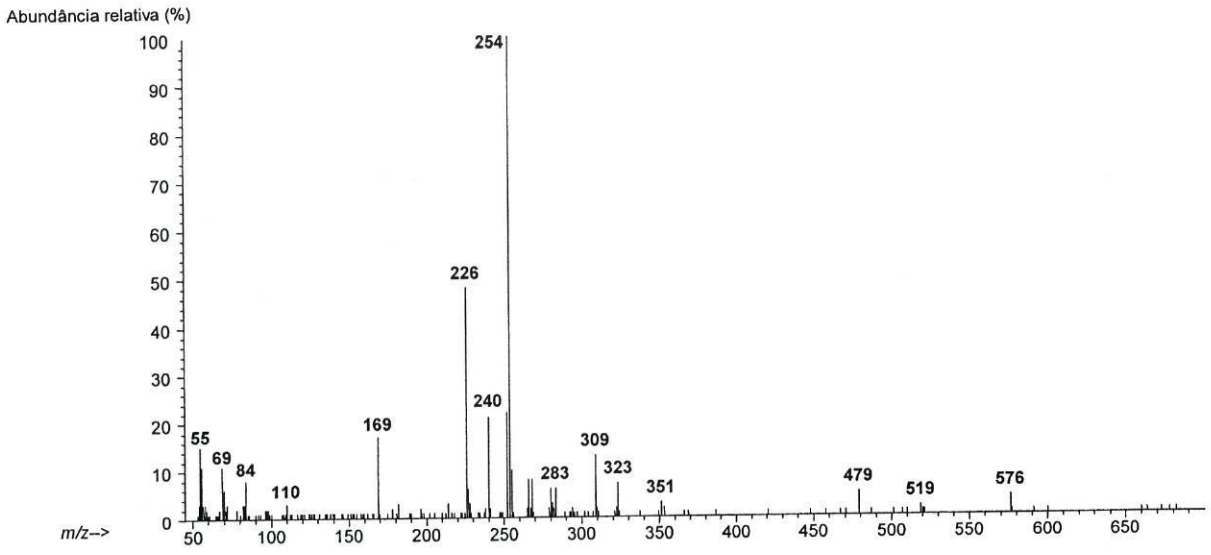


$M^+ = 733$

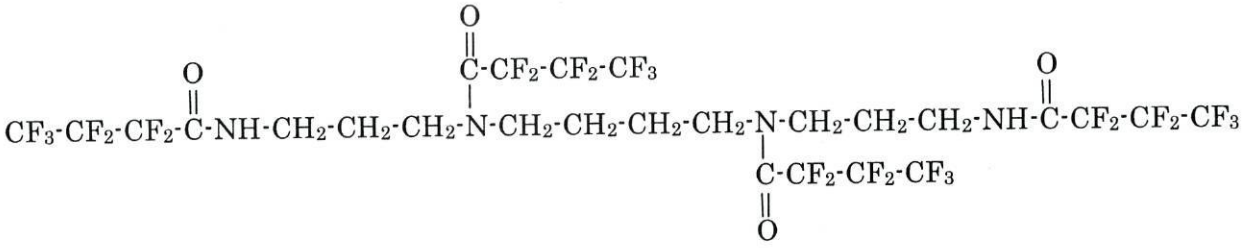


* Fragmentos que resultam da perda, a partir do fragmento anterior, de um dos grupos derivatizantes terminais (*m/z* 197), e subsequente estabilização por perda de um átomo de hidrogénio

ESPERMINA

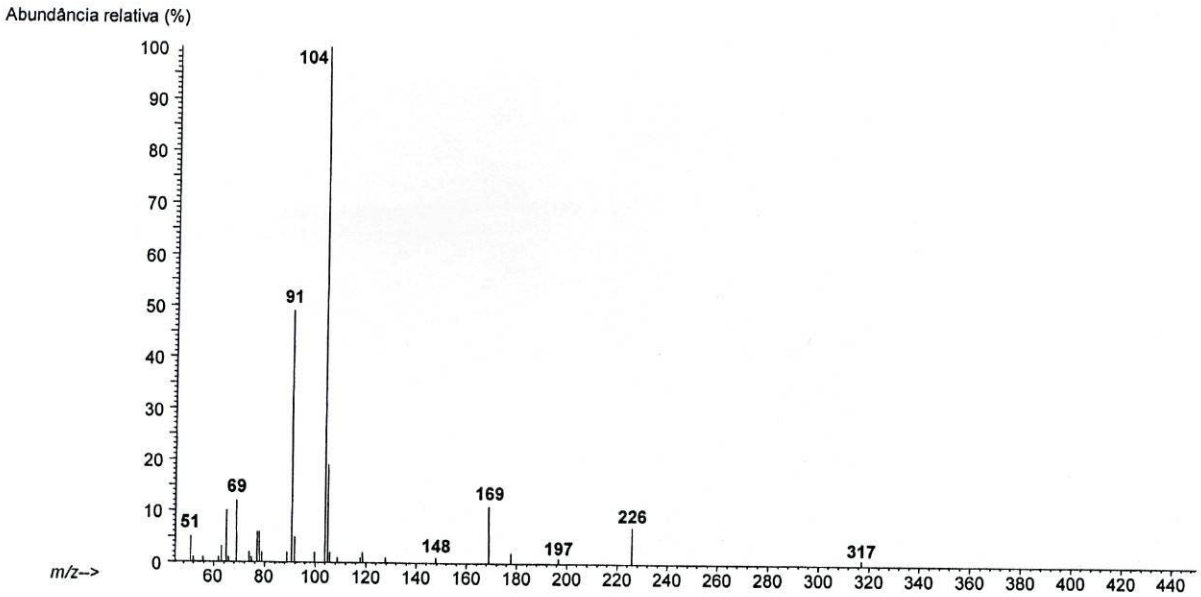


$M^+ = 986$

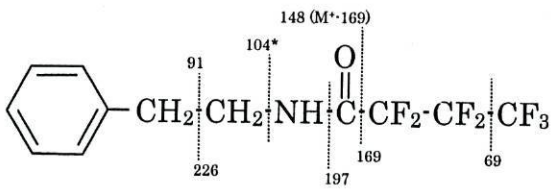


O padrão de fragmentação da espermina é idêntico ao da espermina, apresentado na página anterior. O ião *m/z* 576 tem uma origem semelhante ao ião *m/z* 323 do espectro da espermidina (M^+-212-197-1H).

2-FENILETILAMINA

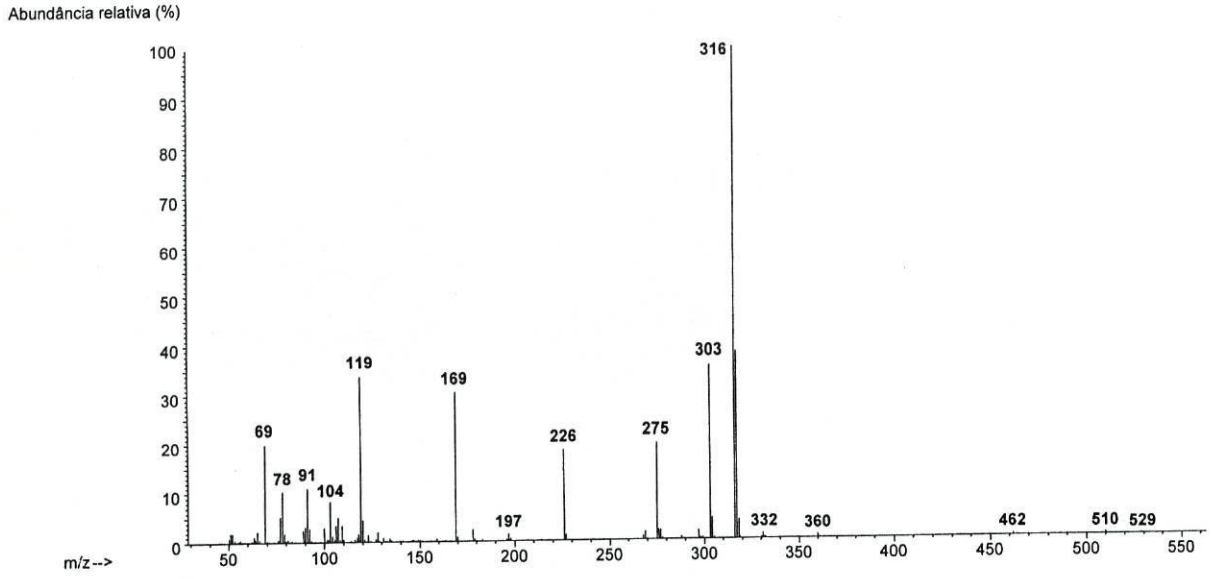


M^{+}= 317

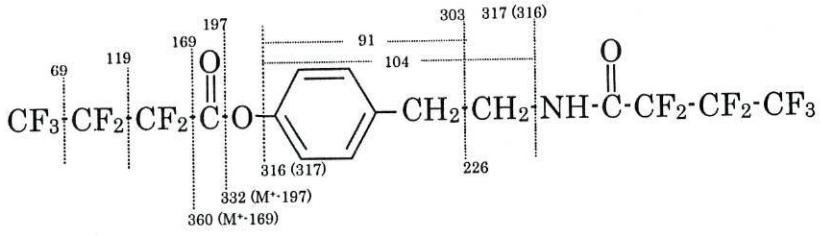


* Fragmento resultante de ruptura e perda de 1 átomo de hidrogénio

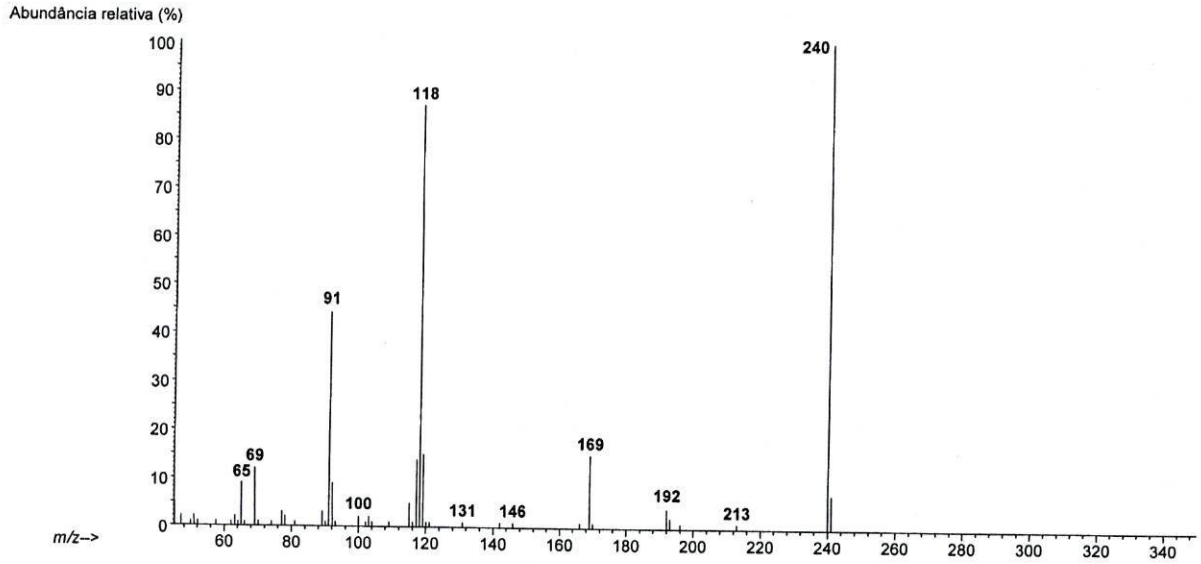
TIRAMINA



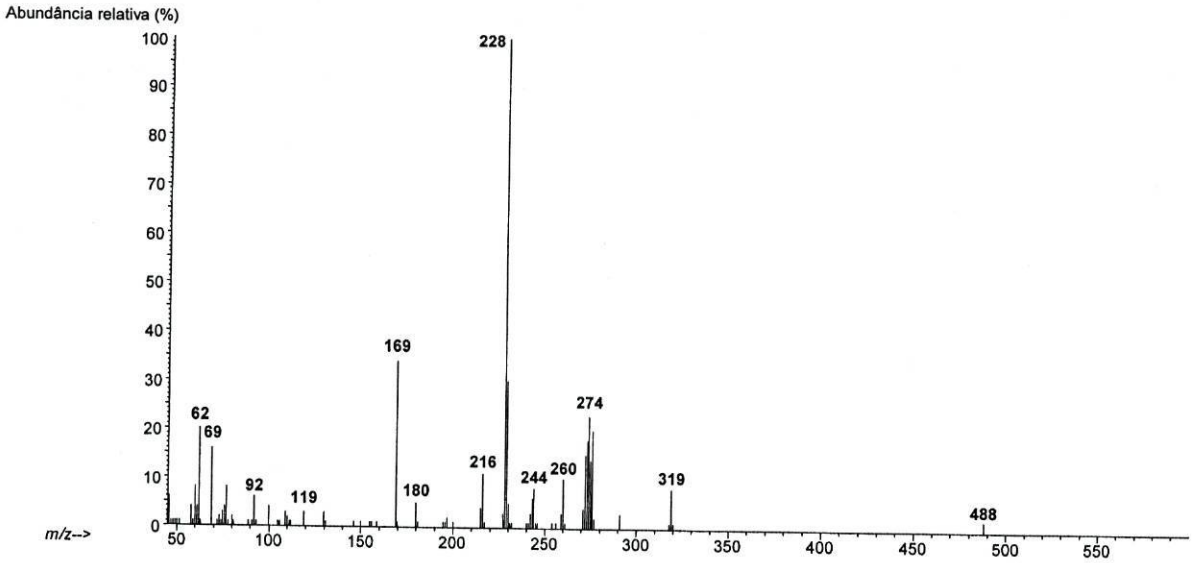
$M^+ = 529$



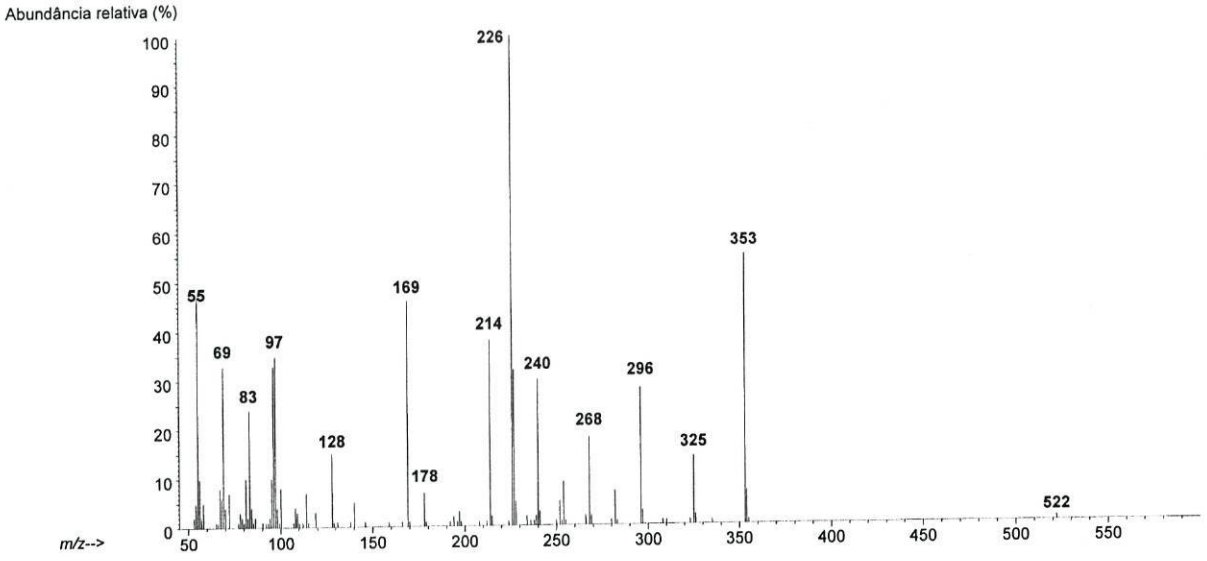
ANFETAMINA



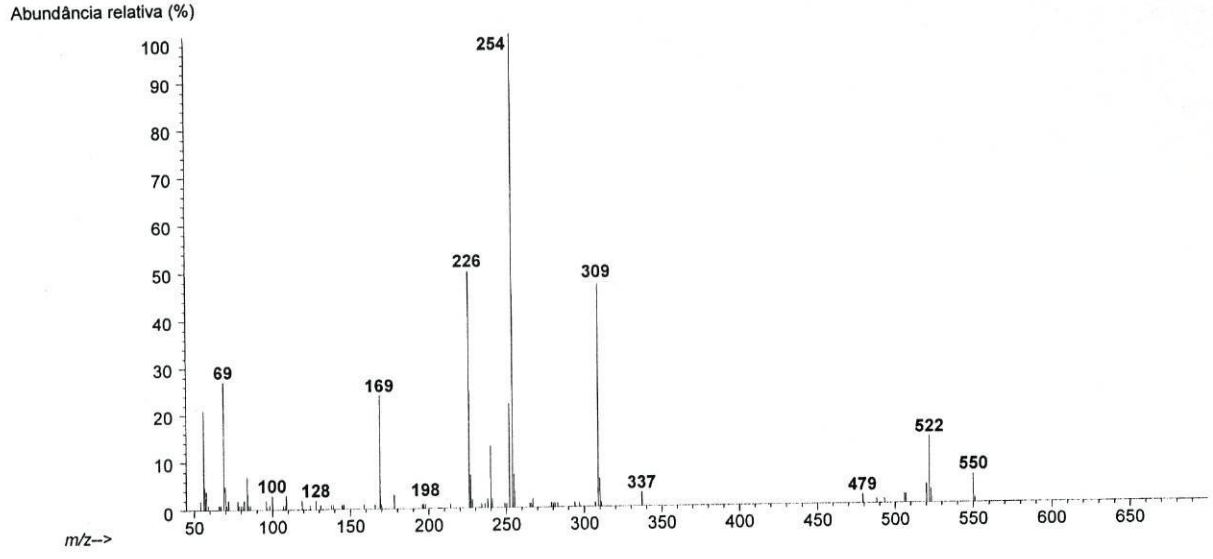
[$^2H_8$]PUTRESCINA



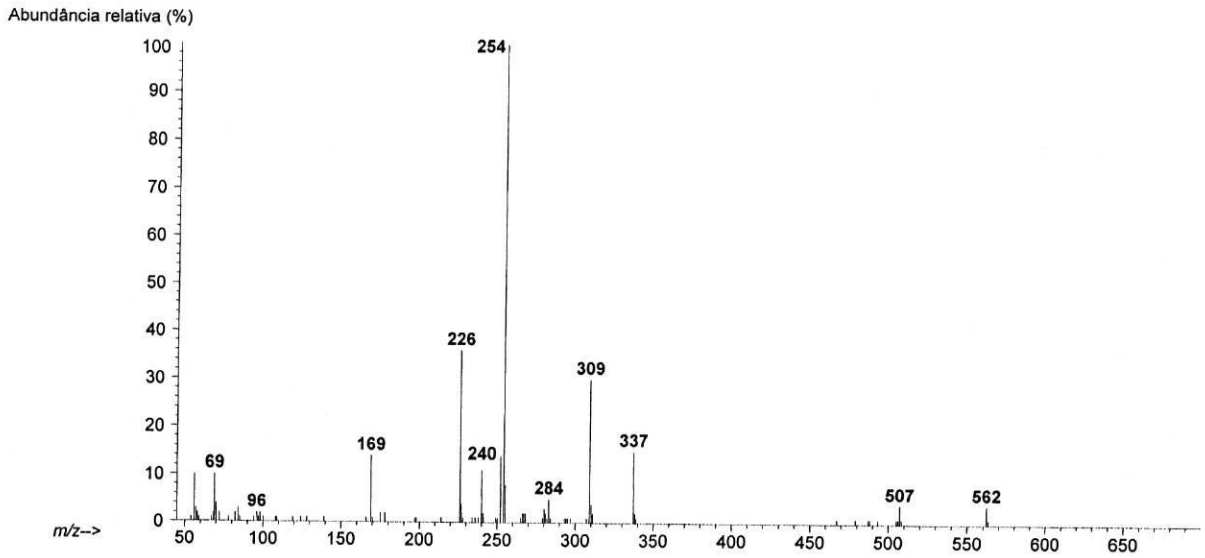
1,7-DIAMINOHEPTANO



NOR-ESPERMIDINA



NOR-ESPERMINA



Breve estudo dos espectros de massa apresentados

Na Tabela 4.A1.1 é apresentado um resumo dos principais fragmentos, em termos de valores de *m/z* e respectiva percentagem relativa, dos espectros de massa apresentados nas páginas anteriores, relativos aos derivados heptafluorobutíricos das aminas biogénicas em estudo. Os compostos estão divididos em 3 grupos, correspondentes, respectivamente, a diaminas, poliaminas e aminas aromáticas. Todos os espectros foram obtidos com o aparelho de GC-MS a funcionar em modo de varrimento total, numa gama de massas entre *m/z* 50 e *m/z* 700.

De uma breve leitura dos referidos espectros parece-nos ser de salientar os seguintes pontos:

1. A presença do ião molecular é comum às quatro diaminas, permitindo uma fácil identificação dos derivados formados, a partir da respectiva massa molecular. O mesmo se passa com a 2-feniletilamina mas não com a tiramina, onde o ião molecular tem uma intensidade muito reduzida (<<1%). Neste caso, contudo, é visível a presença de um ião

TABELA 4.A1.1

PRINCIPAIS IÕES DOS ESPECTROS DE MASSA DOS DERIVADOS HEPTAFLUOROBUTÍRICOS DAS AMINAS BIOGÉNICAS ESTUDADAS

Amina	MM	[M+]	Ião Base	M-169	M-197	169	214	226	240	254	Outros iões importantes
1,3-Diaminopropano	74	466(7)	226	297(12)	269(2)	(49)	(5)	(100)	(68)	(77)	227(61), 69(60), 72(35), 84(13), 100(8), 178(7),
Putrescina	88	480(2)	226	311(8)	283(3)	(17)	(34)	(100)	(12)	(15)	267(34), 55(17), 69(17), 86(5), 178(5)
Cadaverina	102	494(7)	226	325(12)	297(7)	(49)	(31)	(100)	(20)	(4)	69(82), 68(46), 280(31), 100(30), 268(27), 55(23)
1,6-Diaminohexano	116	508(1)	226	339(23)	311(9)	(49)	(33)	(100)	(36)	(9)	82(55), 69(53), 282(38), 55(30), 114(19, 100(15)
Espermidina	145	733(a)	226	564(12)	536(20)	(39)	(17)	(100)	(32)	(98)	323(52), 55(40), 69(36), 253(36), 267(34), 536(20), 564(12), 521(7), 479(6), 351(5)
Espermina	212	996(a)	254	(a)	(a)	(18)	(3)	(48)	(22)	(100)	253(23), 55(15), 309(14), 609(11), 268(9), 323(8), 479(6), 576(5)
2-Feniletilamina	121	317(1)	104	148(1)	120(-)	(11)	(-)	(7)	(-)	(-)	91(48), 105(19), 69(12), 65(10),
Tiramina	137	529(<1)	316	360(1)	332(1)	(30)	(-)	(18)	(-)	(-)	303(35), 119(33), 69(20), 275(19), 226(18), 91(11), 104(8)

Entre parêntesis são apresentadas as percentagens relativas do respectivo ião
a - não registado

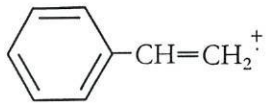
com um valor de *m/z* correspondente a M^+-19, correspondente à perda de um átomo de flúor. No que respeita às duas poliaminas, não foi possível confirmar a presença de ião molecular dado que em ambos os casos apresentariam um valor de *m/z* superior a 700.

2. Como se pode observar nas figuras que acompanham os espectros obtidos, verifica-se a existência em cada uma das moléculas de diversos pontos de ruptura, daí resultando um padrão geral de fragmentação caracterizado pela abundância do número de diferentes fragmentos. O principal ponto de ruptura, porém, tem em muitos casos lugar na ligação C–C entre os carbonos situados em posições α e β em relação ao átomo de azoto, o que é característico dos compostos azotados. Um dos fragmentos resultantes dessa cisão, correspondente à porção terminal da molécula [CH_2–NH–CO–CF_2–CF_2–CF_3], apresenta um valor de *m/z* 226, e está presente em todos os espectros, constituindo mesmo o ião base em todas as diaminas ensaiadas e também na espermidina. Na espermina, o ião base apresenta um valor de *m/z* 254, sendo também resultado duma fragmentação a nível de uma ligação C–C do mesmo tipo (ruptura da ligação entre os carbonos α e β em relação ao segundo átomo de azoto). O mesmo fragmento, aliás, aparece também nas outras di e poliaminas com grande intensidade relativa.

   Outros iões comuns às di e poliaminas, resultam de rupturas de outras ligações C–C que não as indicadas, correspondendo, como se pode facilmente observar nas figuras apresentadas, a fragmentos com *m/z* 214, 240, 268 (ou 266) e 282 (ou 280).

3. Outro ponto importante de ruptura em todas as moléculas situa-se a nível da ligação C_3F_7–CO daí resultando um fragmento com *m/z* 169, presente em todos os espectros com uma intensidade relativa importante (entre 11 e 49 %), e fragmentos correspondentes a *m/z* M^+-169, que também se podem observar em todos os espectros, embora com menor intensidade, provavelmente em resultado de fragmentações subsequentes. No caso da tiramina e da 2-feniletilamina, esse fragmento M^+-169 é quase inexistente, ao contrário do fragmento *m/z* 169. Da observação dos respectivos espectros, pode concluir-se que provavelmente o mesmo será imediatamente cindido em estruturas mais estáveis, que vão constituir os iões base dos respectivos espectros. No caso da tiramina forma-se um fragmento com *m/z* 316, que corresponde à perda de CO_2 do referido fragmento. No caso da 2-feniletilamina forma-se o fragmento *m/z* 104,

resultante da perda do grupo NH–CO e de um átomo de H. De acordo com a literatura, este fragmento, que também é característico do espectro de massa da 2-feniletilamina não derivatizada, apresenta a seguinte estrutura:



O mesmo fragmento é também observado, embora com uma intensidade relativa menor, no espectro de massa da tiramina.

Nos espectros destes dois compostos, mas com maior relevância para a 2-feniletilamina, aparece também um ião de *m/z* 91, que resulta da perda de CH do fragmento anterior e também é característico do espectro de massa da 2-feniletilamina não derivatizada.

4. Outro ponto de ruptura, embora com menor importância do que os anteriores, corresponde à ligação N–C , ligação essa que caracteriza a formação deste tipo de derivados. Daí resulta a formação de fragmentos com *m/z* M^+-197, visíveis em quase todos os espectros. Porém, o fragmento *m/z* 197, que corresponde ao grupo derivatizante, aparece sempre com uma intensidade relativa muito diminuta, provavelmente por dar de imediato lugar à formação do fragmento *m/z* 169 por perda do grupo CO. Daqui se pode também explicar o facto deste fragmento *m/z* 169 aparecer sempre com maior intensidade do que o correspondente M^+-169, como assinalámos atrás.

5. Para além dos fragmentos com *m/z* 169 e 197 acima referidos, abundam nos espectros estudados outros fragmentos mais pequenos, resultantes de fragmentações daqueles, e que são característicos dos derivados obtidos pela acção de reagentes acilantes perfluoroalquílicos. É o caso dos fragmentos com *m/z* 119, 100 e 69.

Nota: As principais fontes bibliográficas usadas para o estudo apresentado foram:

Kitson, F.G., Larsen, B.S., McEwen, C.N., ***Gas Chromatography and Mass Spectrometry — A Practical Guide*** (editado pela Academic Press, Londres) (1996).

McLafferty, F.W., Tureček, F., ***Interpretation of Mass Spectra***, 4ª edição (editado pela University Science Books, M. Valley, CA) (1993).

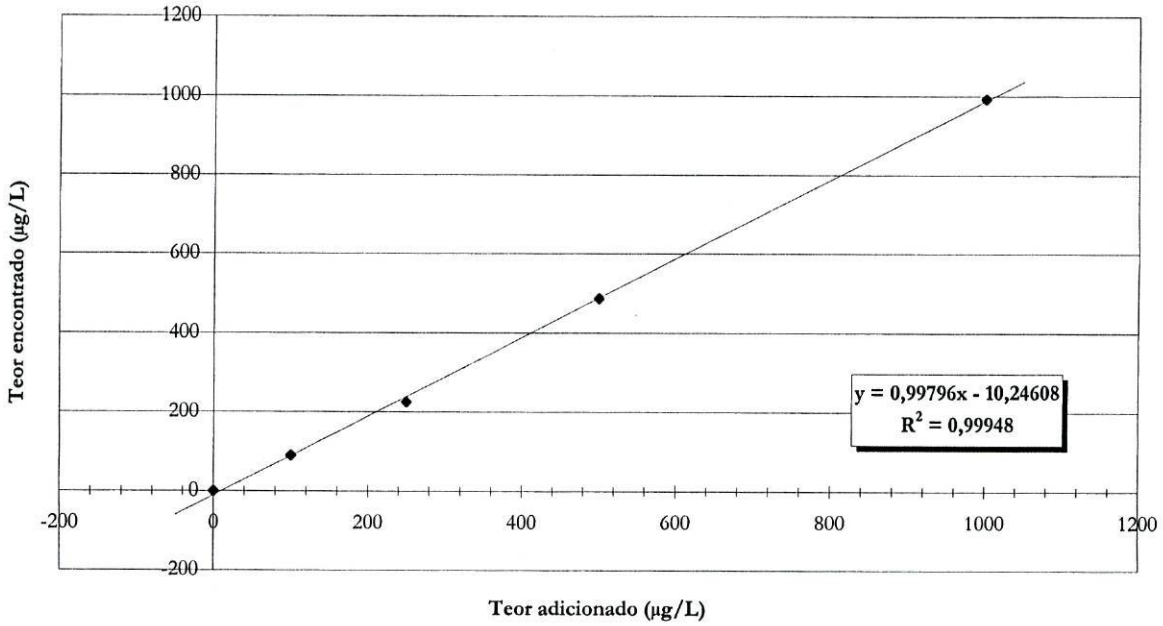
CAPÍTULO 4

ANEXO 2

CURVAS DE RECUPERAÇÃO DAS AMINAS ESTUDADAS REFERENTES A AMOSTRAS DE VINHO DO PORTO E DE MOSTO

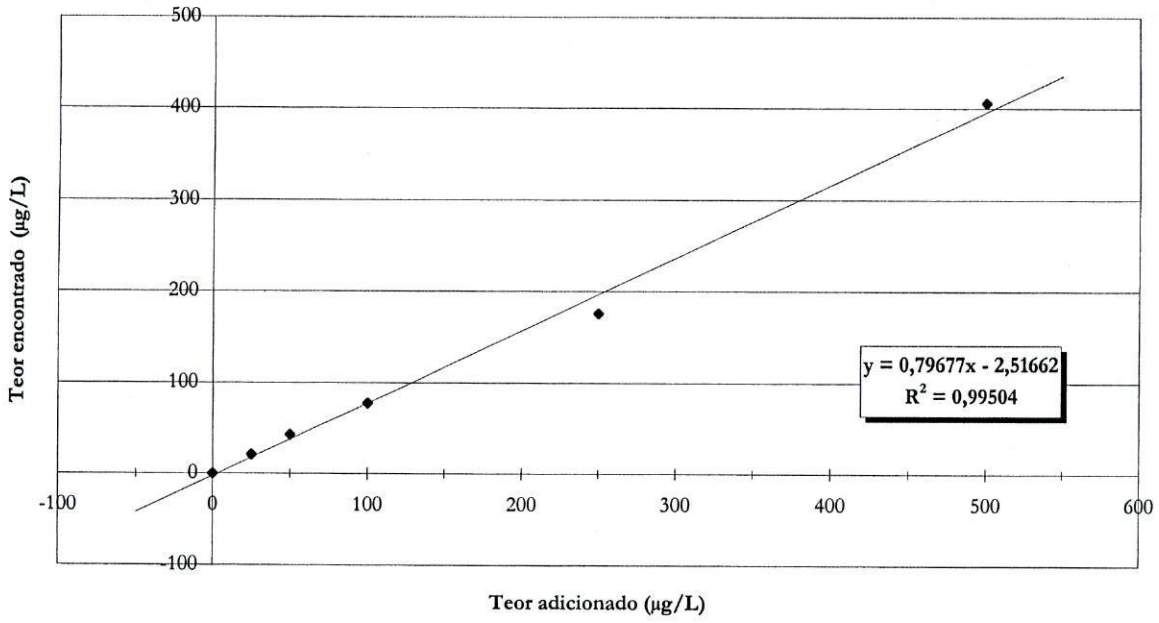
1,3-Diaminopropano - Recuperação (Vinho do Porto)

Teor inicial: 0

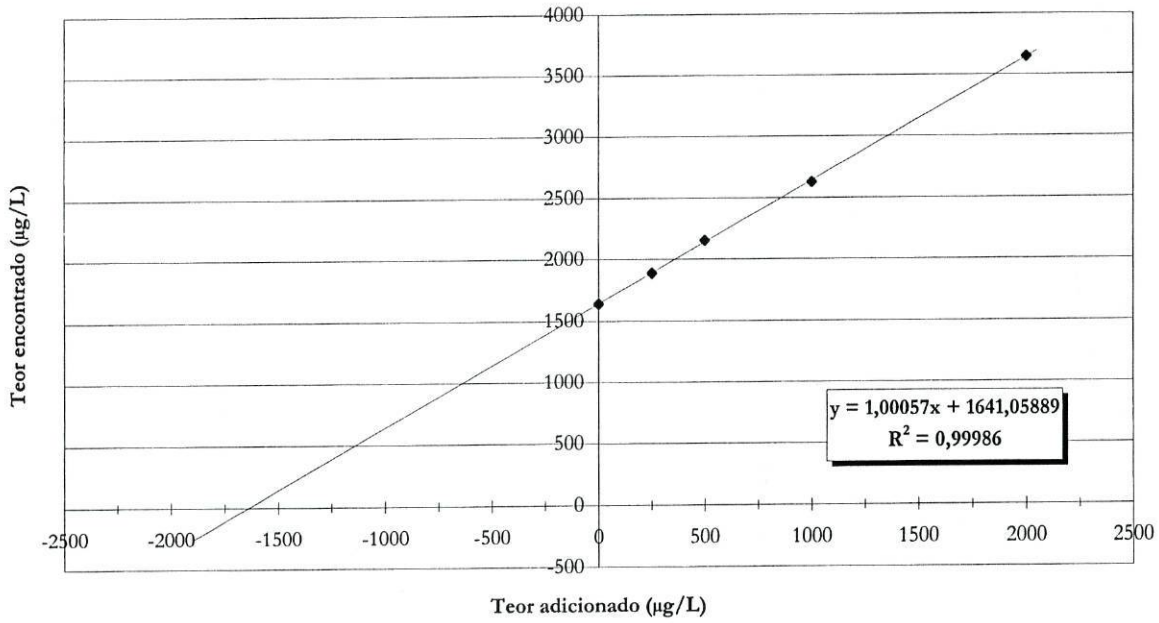


1,3-Diaminopropano - Recuperação (Mosto)

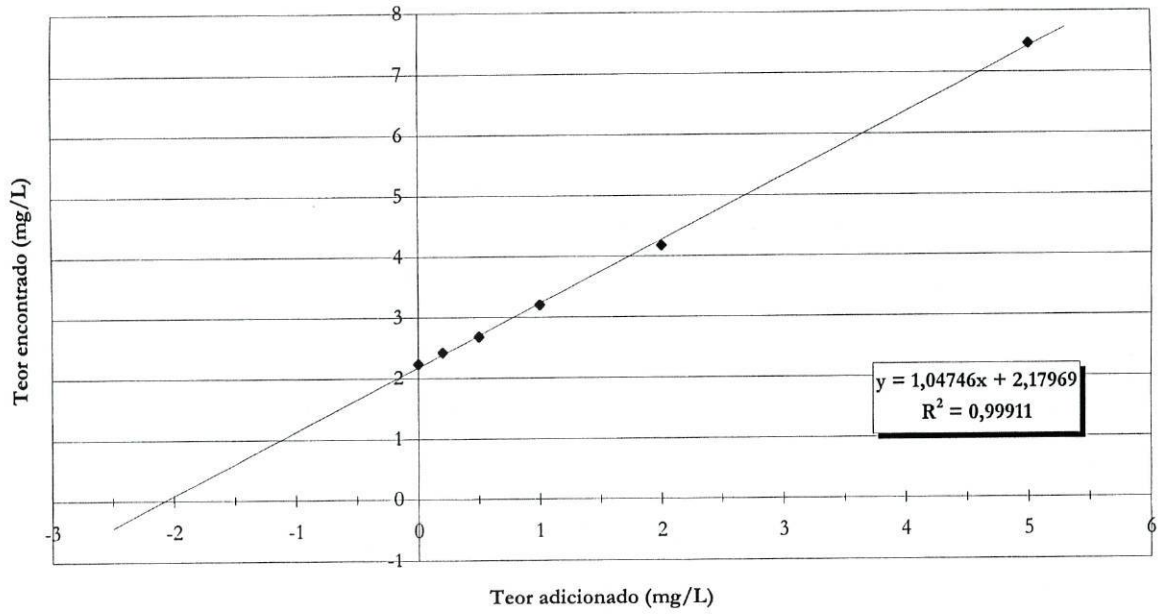
Teor inical: 0



Putrescina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 1,639 mg/L

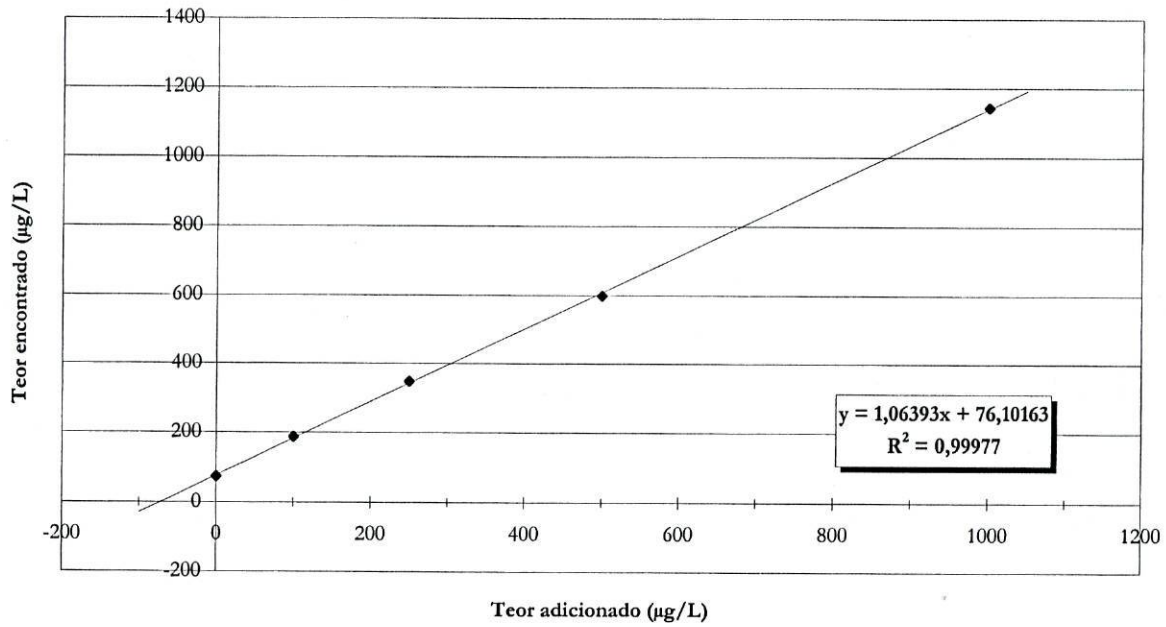


Putrescina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 2,239 mg/L



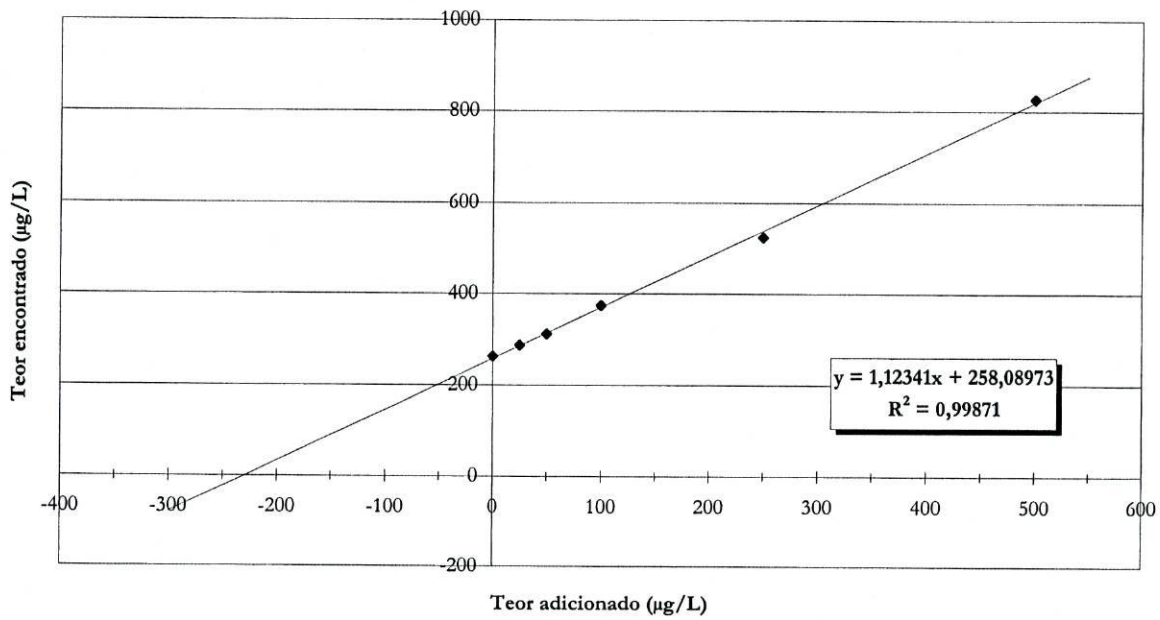
Cadaverina - Recuperação (Vinho do Porto)

Teor inicial: 0,073 mg/L

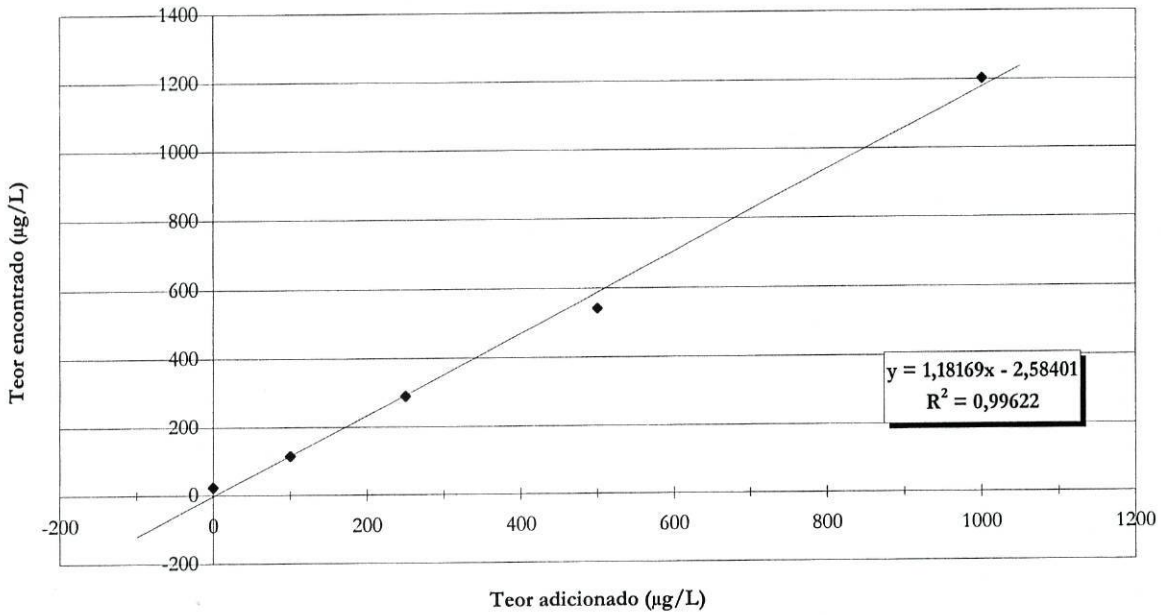


Cadaverina - Recuperação (Mosto)

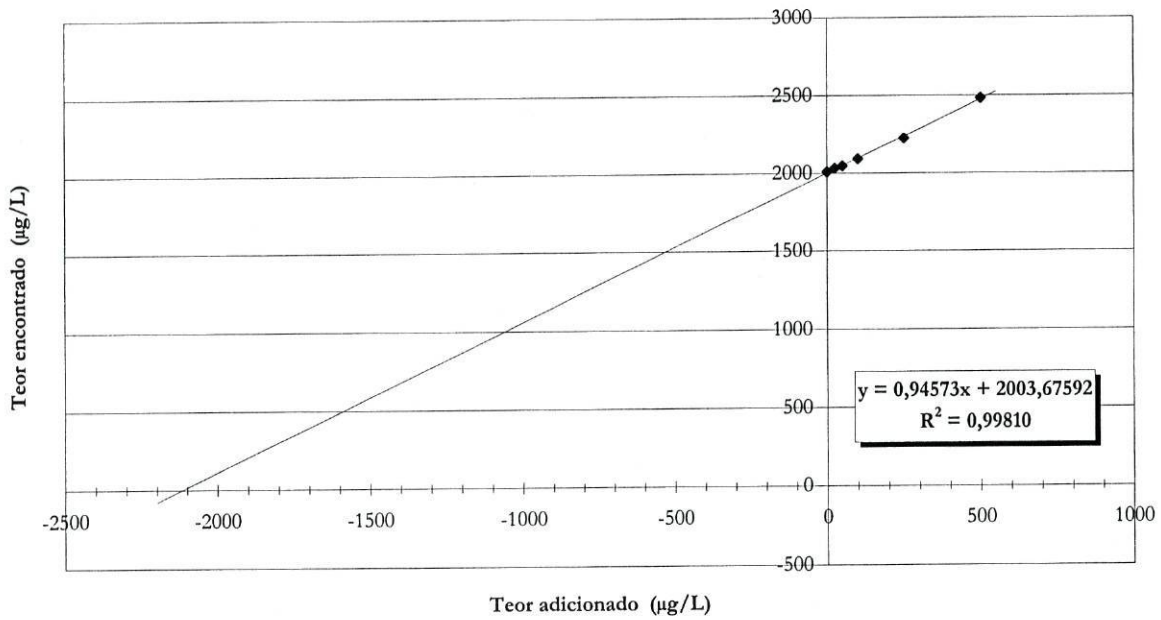
Teor inicial: 0,263 mg/L



Espermidina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,023 mg/L

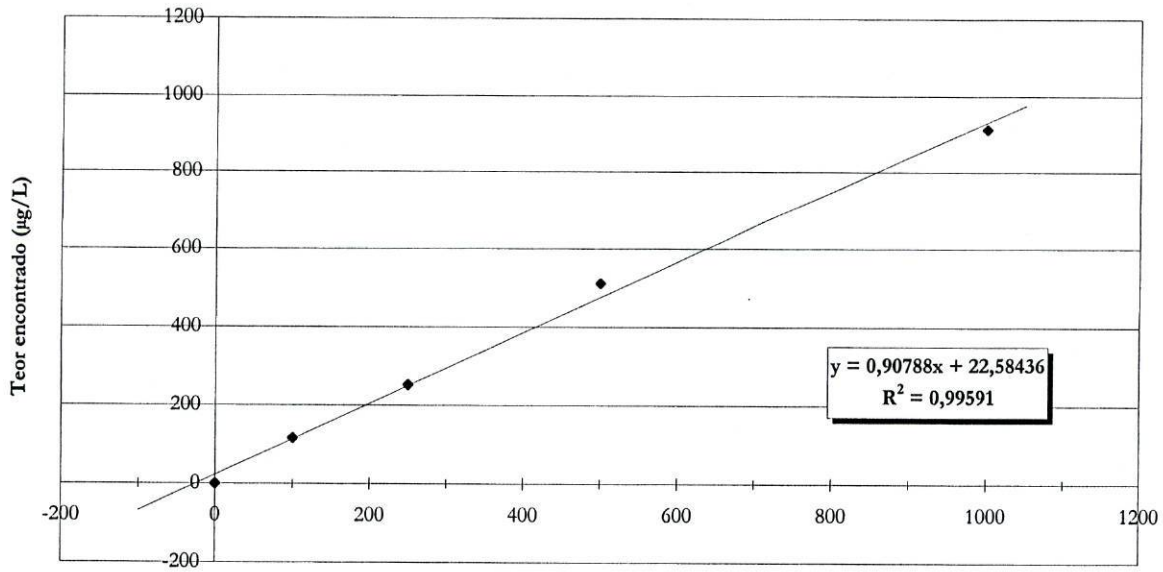


Espermidina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 2,011 mg/L



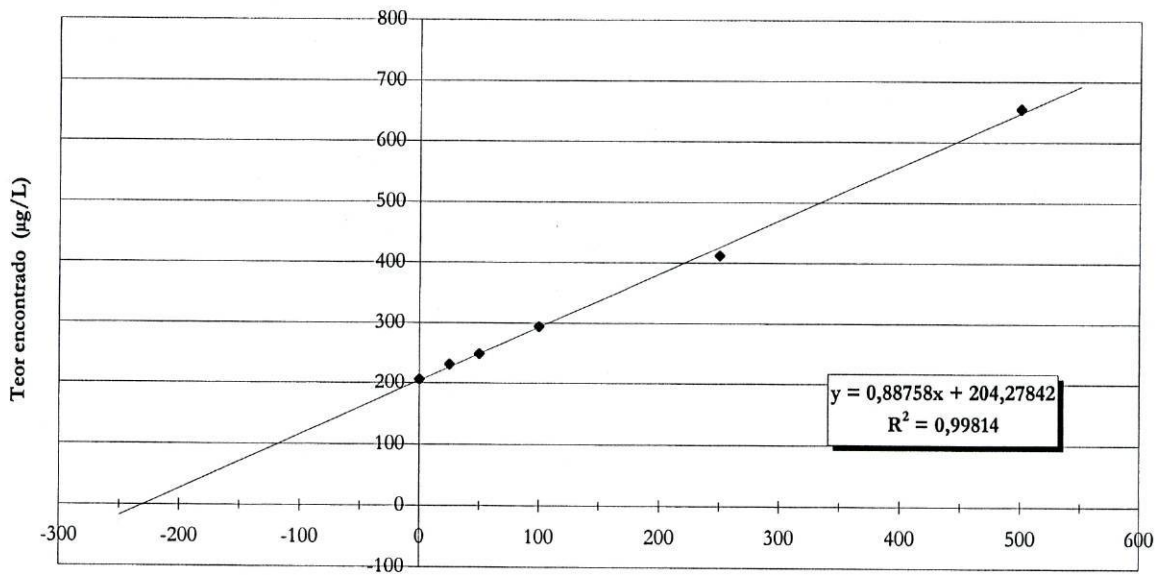
Espermina - Recuperação (Vinho do Porto)

Teor inicial: 0



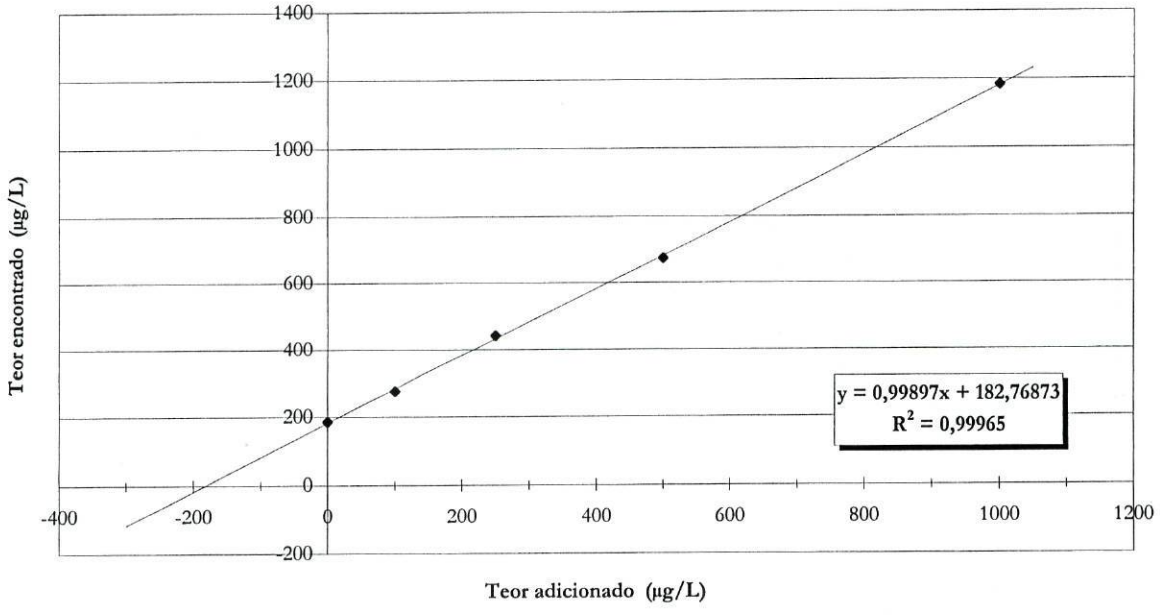
Espermina - Recuperação (Mosto)

Teor inicial: 0,206 mg/L



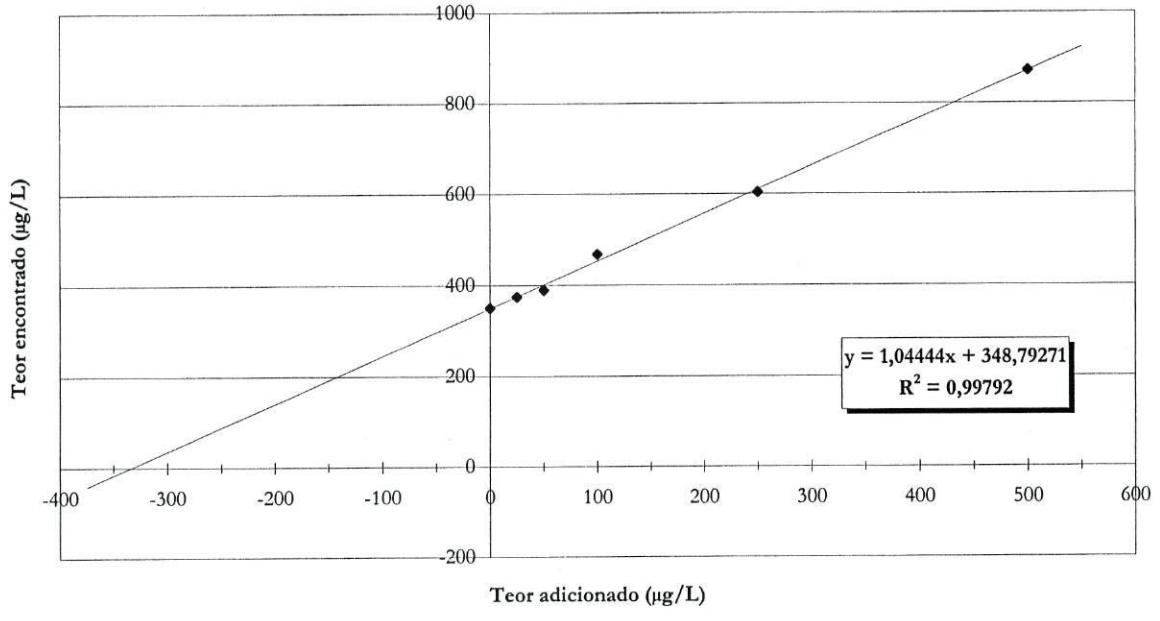
2-Feniletilamina - Recuperação (Vinho do Porto)

Teor inicial: 0,186 mg/L

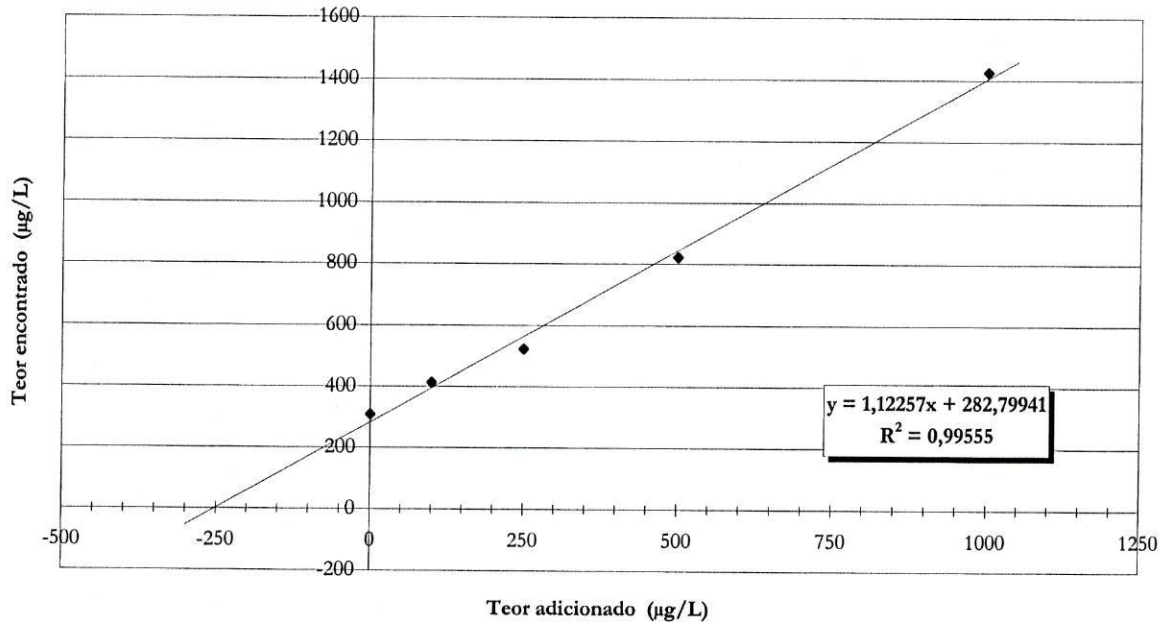


2-Feniletilamina - Recuperação (Mosto)

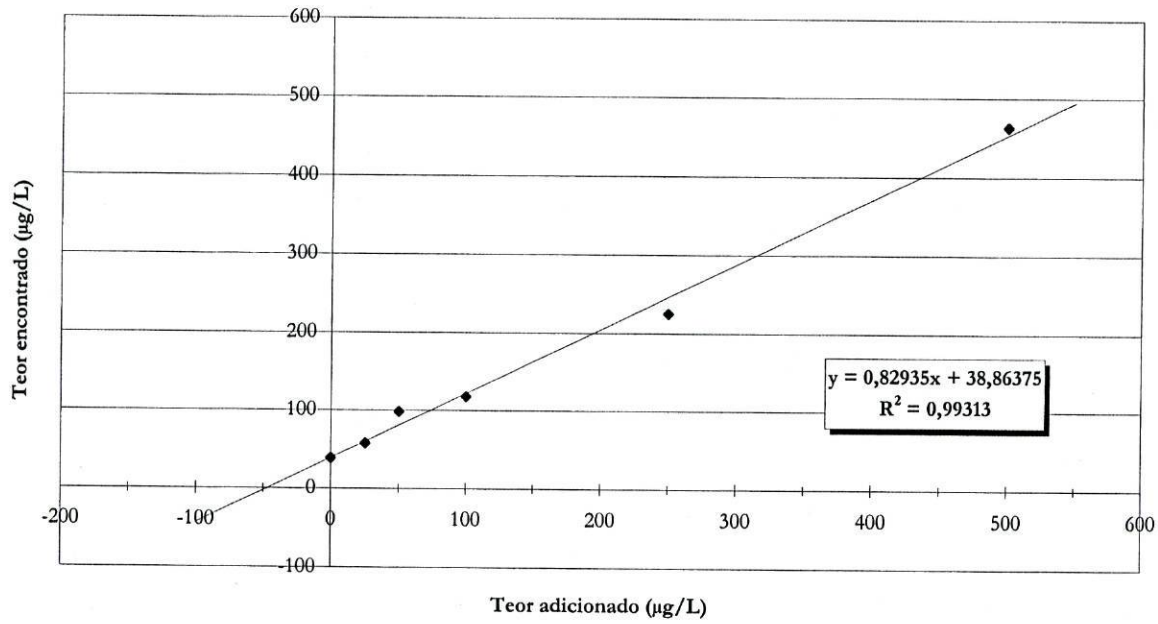
Teor inicial: 0,350 mg/L



Tiramina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,309 mg/L



Tiramina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,038 mg/L



CAPÍTULO 5

DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM VINHOS DO PORTO E EM MOSTOS

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA BASEADA NUM PROCESSO DE EXTRACÇÃO POR PAR-IÓNICO E NA ANÁLISE POR GC-MS, NA FORMA DE TRI(PENTAFLUOROBENZIL)HISTAMINA

5.1. Introdução

5.2. Procedimento analítico
- 5.2.1. Processo de extracção
- 5.2.2. Processo de derivatização
- 5.2.3. Processo cromatográfico
- 5.2.4. Quantificação

5.3. Análise de histamina por cromatografia gasosa. Considerações prévias

5.4. Desenvolvimento do método e discussão

5.5. Validação do método
- 5.5.1. Linearidade
- 5.5.2. Precisão
- 5.5.3. Recuperação
- 5.5.4. Limites de detecção e de quantificação

5.6. Conclusões

Bibliografia

5.1. Introdução

O presente capítulo é dedicado ao método de GC-MS desenvolvido para a determinação de histamina em vinhos do Porto e em mostos. Tal como o método referido no capítulo anterior, este método pode ser dividido em três partes fundamentais:

- Extracção da histamina (e do seu isótopo tetradeuterado [α,α,β,β-$^2H_4$]histamina, usado como padrão interno) por um processo de par-iónico
- Derivatização dos compostos com anidrido heptafluorobutírico
- Análise dos derivados obtidos por GC-MS em modo SIM

O capítulo está esquematizado da seguinte forma:

a) Inicialmente, é feita a descrição do procedimento analítico desenvolvido e das condições operatórias estabelecidas a título definitivo (posteriormente usadas na análise das amostras em estudo).

b) Em seguida, é feita uma breve síntese sobre os métodos descritos na literatura para a análise de histamina por cromatografia gasosa.

c) Depois, são relatadas as experiências executadas durante a fase de desenvolvimento do método e é feita a respectiva discussão.

d) Finalmente, são apresentados os testes de validação efectuados, os resultados obtidos nos mesmos e a respectiva avaliação.

5.2. Procedimento analítico

5.2.1. Processo de extracção

A extracção de histamina das amostras de vinhos e de mostos foi feita pelo processo de extracção descrito no capítulo anterior, baseado na acção do reagente de par-iónico BEHPA. Como padrão interno usou-se a histamina tetradeuterada — [α,α,β,β-$^2H_4$]histamina — tendo-se adicionado a cada amostra (vinhos: 10 mL; mostos: 8 mL) e a cada padrão (idem) 100 μL ou 80 μL, respectivamente, de uma solução a 100 μg/mL, de forma a obter-se uma concentração final de aproximadamente 1 mg/L.

5.2.2. Processo de derivatização

Em frasco de vidro silanizado de 5 mL, evaporou-se até à secura, sob uma ligeira corrente de azoto e a 70 °C, uma alíquota de 500 μL do extracto clorídrico obtido no processo extractivo (adicionada de uma quantidade de metanol sensivelmente igual, cerca de 500 μL, de forma a aumentar a rapidez do processo). Após evaporação total, adicionou-se ao resíduo 150 μL de uma mistura de acetonitrilo:isopropanol (1:1) e 50 μL de uma solução a 10 % de diisopropiletilamina na mesma mistura de solventes. Após ligeira agitação, de forma a promover a total dissolução do resíduo, adicionou-se 75 μL de uma solução a 25 % do reagente derivatizante – brometo de pentafluorobenzilo – em acetonitrilo. Fechou-se então o tubo com uma tampa revestida com Teflon®

e promoveu-se o seu aquecimento a 40 °C durante 60 minutos (após os primeiros 5 minutos de aquecimento deu-se um ligeiro aperto na tampa, de forma a garantir a estanquicidade do tubo; em cada 15-20 minutos, agitou-se ligeiramente o tubo durante alguns segundos). Depois de se ter deixado arrefecer o tubo e o respectivo conteúdo, evaporou-se o meio reaccional até à secura, de novo sob uma corrente de azoto, mas a frio. Uma vez obtido o resíduo que continha os derivados formados, dissolveu-se o mesmo com 250 μL de uma solução a 10 % de carbonato de sódio e extraiu-se os derivados com 750 μL de diclorometano, agitando-se durante cerca de 1 minuto. Transferiu-se então a maior quantidade possível, em geral cerca de 500 μL, do extracto orgânico (diclorometano) para um tubo idêntico, no qual tinha sido colocada uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (cerca de 100 mg). Agitou-se durante cerca de 1 minuto, de modo a promover a completa desidratação do extracto, e transferiu-se o extracto para novo tubo igual, com o cuidado de evitar a passagem de restos de sulfato de sódio. Finalmente, evaporou-se o extracto até à secura, mais uma vez sob uma corrente de azoto e a frio, e dissolveu-se o resíduo em 100 μL de acetato de etilo. As soluções foram guardadas a -20 °C até ao momento da injecção no sistema cromatográfico.

5.2.3. Processo cromatográfico

A introdução das soluções a analisar no aparelho de GC-MS foi feita manualmente, no modo de splitless (purge-off time: 60 s), com o injector à temperatura de 250 °C. Para a separação cromatográfica usou-se uma coluna capilar revestida com uma fase ligada de dimetilsiloxano com 5 % de grupos fenilo – DB-5MS da J&W Scientific (Folsom, CA, Estados Unidos) – com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase estacionária. Usou-se também uma pré-coluna, com igual diâmetro interno, com cerca de 2 metros de comprimento e da qual periodicamente eram cortados os primeiros 20-25 centímetros. A união entre a pré-coluna e a coluna foi feita com um ligador de vidro apropriado.

A pressão do gás de arraste à entrada da coluna foi de 80 kPa e usou-se um gradiente de temperatura, programado da seguinte forma:

Temperatura inicial: 160 °C, mantida durante 1 minuto

Incremento de 20 °C/minuto, até 290 ° C

Constante a 290 °C, durante 10 minutos

Tempo total: 17,5 minutos

A temperatura da linha de transferência foi de 280 °C.

A aquisição de dados foi feita inicialmente em modo varrimento contínuo, numa gama de massas de *m/z* 50 a *m/z* 450, de forma a estabelecer o tempo de retenção de cada composto e a obter o respectivo espectro de massa.

Uma vez estabelecidas as condições de separação cromatográfica, e tendo como objectivo a quantificação dos compostos em análise, a aquisição de dados foi feita em modo de monitorização selectiva de iões, tendo-se usado os iões *m/z* 181, 290, 292, 470 e 474. O tempo de monitorização de cada ião foi de 50 milisegundos por ciclo. O detector manteve-se desligado durante os primeiros 7 minutos.

5.2.4. Quantificação

A quantificação foi feita seguindo o mesmo modelo por "séries" detalhadamente descrito no capítulo anterior. Monitorizaram-se os valores obtidos pela integração das áreas correspondentes ao pico do derivado da histamina no cromatograma de massa do ião *m/z* 470 e ao pico do derivado da [α,α,β,β-$^2H_4$]histamina (padrão interno) no cromatograma de massa do ião *m/z* 474. A integração foi feita na opção de modo manual permitida pelo "software" usado para o efeito. O valor correspondente à relação área da histamina/área do padrão interno foi então interpolado numa curva de calibração construída pela análise de soluções padrão sujeitas a um tratamento rigorosamente igual ao das amostras. As soluções padrão foram preparadas pela adição da quantidade requerida de histamina e do padrão interno [α,α,β,β-$^2H_4$]histamina às mesmas matrizes sintéticas referidas no capítulo anterior.

5.3. Análise de histamina por cromatografia gasosa. Considerações prévias

São relativamente escassas as referências feitas na literatura à análise de histamina por cromatografia gasosa. A maior dificuldade parece estar relacionada com a presença do anel imidazólico, o qual apresenta uma estrutura química tautomérica que o torna pouco reactivo na presença dos reagentes derivatizantes normalmente usados para a derivatização de compostos aminados. Quando cromatografada com o anel imidazólico intacto, a histamina apresenta um comportamento muito pobre que é consequência de fenómenos de adsorção intensos no interior do sistema cromatográfico, os quais resultam em picos com "tailing" pronunciado e em respostas caracterizadas pela não-linearidade [Navert *et al.*, 1986; Staruszkiewicz e Bond, 1981]. Por esse motivo, metodologias baseadas na análise do composto após derivatização com reagentes sililantes [Mahy e Gelpi, 1977] e acilantes, como o anidrido heptafluorobutírico [Navert, 1975] e o anidrido trifluoroacético [Cancalon e Klingman, 1972], foram rapidamente abandonadas.

Um das poucas classes de reagentes capazes de reagir eficazmente com o anel imidazólico da histamina é a dos cloroformatos. Essa característica foi aproveitada por Mita *et al.* [1979] que propuseram e mais tarde aperfeiçoaram [Mita *et al.*, 1980a; Mita *et al.*, 1980b] uma metodologia baseada num processo de derivatização em duas etapas, a primeira com anidrido heptafluorobutírico e a segunda com cloroformato de etilo, que dava origem a um derivado, N^{α}-heptafluorobutiril-N^{τ}--etoxicarbonil-histamina, com boas propriedades cromatográficas. Além de pouco simples na sua execução, o processo apresentava um rendimento global relativamente baixo, da ordem dos 70 %. Slemr e Beyermann [1984] usaram um processo semelhante para a determinação da histamina em produtos cárneos, substituindo o anidrido heptafluorobutírico pelo anidrido acético. O derivado formado, N^{α}-trifluoroacetil-N^{τ}-etoxicarbonil-histamina, apresentou-se, contudo, muito instável, degradando-se rapidamente.

Uma metodologia idêntica à desenvolvida por Mita e colaboradores foi proposta por Keyzer e colaboradores [Keyzer *et al.*, 1983; Keyzer *et al.*, 1984]. Estes autores usaram cloroformato de metilo em vez de cloroformato de etilo na segunda etapa de derivatização, e fizeram uso da técnica de GC-MS com ionização química para a detecção do composto. Pese embora o baixo rendimento global obtido, cerca de 50 % entrando em consideração com as 2 etapas de extracção envolvidas, o processo passou a ser usado pelo mesmo grupo de autores em diversos trabalhos posteriores

dedicados à quantificação de histamina e metabolitos relacionados em fluidos biológicos [Oosting e Keyzer, 1991; Keyzer *et al.*, 1985, p. ex.].

Um outro processo baseado numa dupla derivatização da histamina foi proposto por Wollin e Navert [1985] e Navert *et al.* [1986]. Neste caso, a molécula era previamente derivatizada com anidrido heptafluorobutírico, que reagia com a função amina primária da cadeia lateral, e, em seguida, com anidrido acético, o qual, nas condições reaccionais usadas pelos autores era capaz de reagir com o azoto do anel imidazólico e, dessa forma, dar origem ao derivado N^{α}-heptafluorobutiril-N^{τ}-acetil--histamina.

O uso do brometo de pentafluorobenzilo como reagente capaz de dar origem a um derivado da histamina com boas propriedades cromatográficas foi sugerido pela primeira vez por Roberts II [1984]. Este autor demonstrou que aquele reagente era capaz de, em determinadas condições reaccionais, promover uma tripla alquilação da histamina, por substituição dos dois hidrogénios ligados ao azoto da cadeia lateral e também do hidrogénio reactivo do anel imidazólico, dando origem a um composto que se pode designar por tri(pentafluorobenzil)histamina (Figura 5.1). As condições reaccionais propostas caracterizavam-se pelo uso de acetonitrilo como solvente e de diisopropiletilamina como aceitador do ácido brómico libertado durante a reacção, a qual era realizada durante 30 minutos, à temperatura ambiente. No final, o excesso de reagentes era evaporado à secura, o resíduo dissolvido em Na_2CO_3 a 10 %, o derivado extraído com diclorometano e, finalmente, após evaporação, dissolvido em acetato de etilo. O derivado obtido apresentou boas propriedades cromatográficas, tendo o processo sido utilizado numa metodologia desenvolvida para a determinação de histamina em urina por GC-MS com ionização química negativa, fazendo uso de um análogo isotópico da histamina, [α,α,β,β-$^2H_4$]histamina, como padrão interno [Roberts II e Oates, 1984].

Este processo de derivatização foi alguns anos mais tarde estudado e optimizado por Payne *et al.* [1989] que estabeleceram um protocolo analítico com algumas modificações em relação à proposta original. Assim, de forma a melhorar o rendimento do processo, foram aumentadas tanto a duração da reacção, que passou de 30 para 60 minutos, como a temperatura usada, que passou de temperatura ambiente para 40 °C. Por outro lado, foi reduzida a quantidade relativa de diisopropiletilamina usada, de forma a diminuir as reacções de decomposição verificadas. A etapa de extracção dos derivados

obtidos foi, por sua vez, substituída por um processo de purificação/extracção baseado na passagem da solução por uma micro-coluna de gel de sílica.

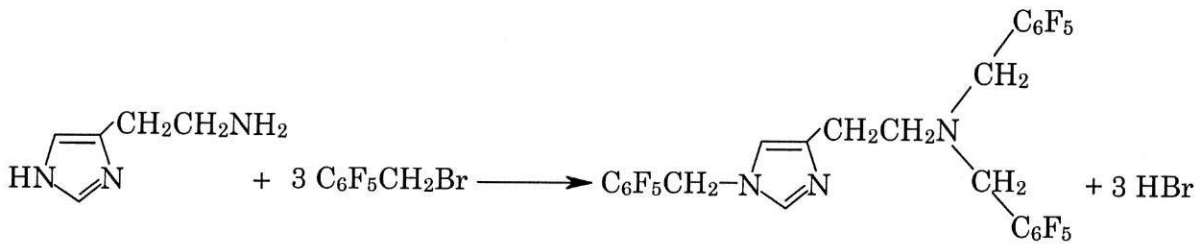


Figura 5.1. Reacção de derivatização da histamina com brometo de pentafluorobenzilo.

Sem grandes alterações do ponto de vista da análise cromatográfica, nomeadamente no que diz respeito à detecção do composto por GC-MS com ionização química negativa, a metodologia passou a ser usada pelos autores na análise de histamina em diferentes fluidos biológicos [Payne e Gerber, 1997].

5.4. Desenvolvimento do método e discussão

A metodologia desenvolvida teve como ponto de partida as propostas atrás mencionadas baseadas no uso do brometo de pentafluorobenzilo com agente derivatizante. O objectivo foi o de estabelecer um método capaz de permitir, de uma forma exacta e reprodutível, a identificação e a quantificação da histamina nas matrizes em estudo.

O trabalho experimental realizado teve como principais metas:

a) Confirmar a exequibilidade do brometo de pentafluorobenzilo como reagente derivatizante para a análise de histamina por cromatografia gasosa, nas condições reaccionais indicadas pelos autores atrás referidos.

b) Avaliar a possibilidade de usar o mesmo processo de extracção com BEHPA/clorofórmio que tinha sido usado para as aminas referidas no capítulo anterior, tanto no que respeita ao rendimento do processo para a extracção de histamina como no que respeita à eliminação de potenciais interferentes do processo cromatográfico.

c) Em consequência do ponto anterior, avaliar a necessidade, ou não, de se recorrer a uma coluna de gel de sílica para purificar o meio reaccional no final do processo de derivatização.

d) Avaliar a possibilidade de efectuar a análise por GC-MS por impacto electrónico, de acordo com o equipamento disponível, e não por ionização química negativa como proposto pelos autores acima referidos.

e) Optimizar o volume de extracto a derivatizar, tendo em conta os teores de histamina presentes nas amostras.

f) Finalmente, avaliar a necessidade, ou não, do uso de um análogo isotópico do composto como padrão interno.

No que respeita ao processo de derivatização em si, as experiências efectuadas durante esta fase de desenvolvimento do método permitiram-nos concluir que:

1. O brometo de pentafluorobenzilo constitui, efectivamente, um reagente adequado para a derivatização da histamina, apresentando-se as condições reaccionais propostas por Payne *et al.* [1989] como as mais adequadas para a obtenção de bons níveis de reprodutibilidade.

2. O processo extractivo baseado na acção do BEHPA/clorofórmio, pormenorizadamente descrito no capítulo anterior, permite uma extracção de forma quantitativa e reprodutível da histamina presente nas amostras, em simultâneo com as aminas analisadas pela metodologia baseada na derivatização com anidrido heptafluorobutírico, também apresentada no capítulo anterior. Dessa forma tornou-se possível a conjugação dos dois

métodos analíticos desenvolvidos, sujeitando as amostras a analisar a uma única extracção, e dividindo-se posteriormente o extracto clorídrico obtido em duas porções, cada uma sujeita a um dos dois processos de derivatização em questão. Tendo em conta os baixos teores de histamina presentes nas amostras, optou-se, neste caso, por um volume de 0,5 mL de extracto clorídrico a ser sujeito ao processo derivativo.

3. Em consequência do grau de purificação atingido pelo referido processo extractivo, torna-se possível analisar os derivados obtidos sem os sujeitar ao processo de purificação do meio reaccional por passagem por uma micro-coluna de gel de sílica, como preconizado por Payne *et al.* [1989]. Alternativamente, optou-se pelo processo de extracção dos derivados, a partir do meio reaccional, proposto por Roberts II e Oates [1984]. Este, contudo, revelou-se como o aspecto menos conseguido da metodologia estabelecida, dado o facto de ser muito difícil a separação da fase de diclorometano, que contém os derivados formados, da fase aquosa (Na_2CO_3 a 10 %) devido à inexistência de uma suficiente diferença de densidade entre as duas fases. Inclusivamente, pequenas alterações dos volumes propostos pelos autores para as duas soluções (150 μL de solução aquosa de Na_2CO_3 a 10 % e 250 μL de diclorometano) provocam a inversão das duas fases. Depois de várias tentativas de optimização, com diferentes volumes de cada uma das soluções e com diferentes concentrações da solução de Na_2CO_3 usada verificou-se que a solução finalmente adoptada (250 μL de solução aquosa de Na_2CO_3 a 10 % e 750 μL de diclorometano) era a que proporcionava melhores resultados.

No que respeita ao processo cromatográfico, verificou-se que o uso do equipamento de GC-MS disponível, com ionização por impacto electrónico, permitia níveis suficientes de sensibilidade para os teores de histamina apresentados pelas amostras.

Na Figura 5.2 são apresentados os espectros de massa obtidos nas condições experimentais usadas relativos à histamina e ao respectivo padrão interno, [α,α,β,β-$^2H_4$]histamina. Como se pode observar, em ambos os espectros não é visível o sinal correspondente aos iões moleculares — *m/z* 651 e *m/z* 655, respectivamente — o que confirma as indicações referidas na literatura [Roberts II, 1984]. O ião base — *m/z* 181 — corresponde a um fragmento característico do agente derivatizante, $[CH_2C_6F_5]^+$, daí não ter sido usado no trabalho de quantificação, dada a sua falta de selectividade.

Os iões escolhidos para o trabalho de quantificação em modo SIM — *m/z* 470 e 474, respectivamente — são interpretados como sendo formados em resultado da perda do fragmento acima referido, $[CH_2C_6F_5]^+$, a partir do ião molecular (*m/z* 470: M^+ (651) - 181; *m/z* 474: M^+ (655) – 181). Não obstante apresentarem uma baixa intensidade relativa (cerca de 25-30 % da intensidade do ião base), aqueles iões apresentaram-se altamente selectivos para os compostos em questão e suficientemente sensíveis para os teores de histamina presentes neste tipo de amostras. Este facto pode ser observado nos cromatogramas apresentados na Figura 5.3, correspondentes a uma amostra de vinho do Porto contendo 31,2 μg/L de histamina. Da sua observação, pode avaliar-se igualmente o bom comportamento cromatográfico de ambos os compostos.

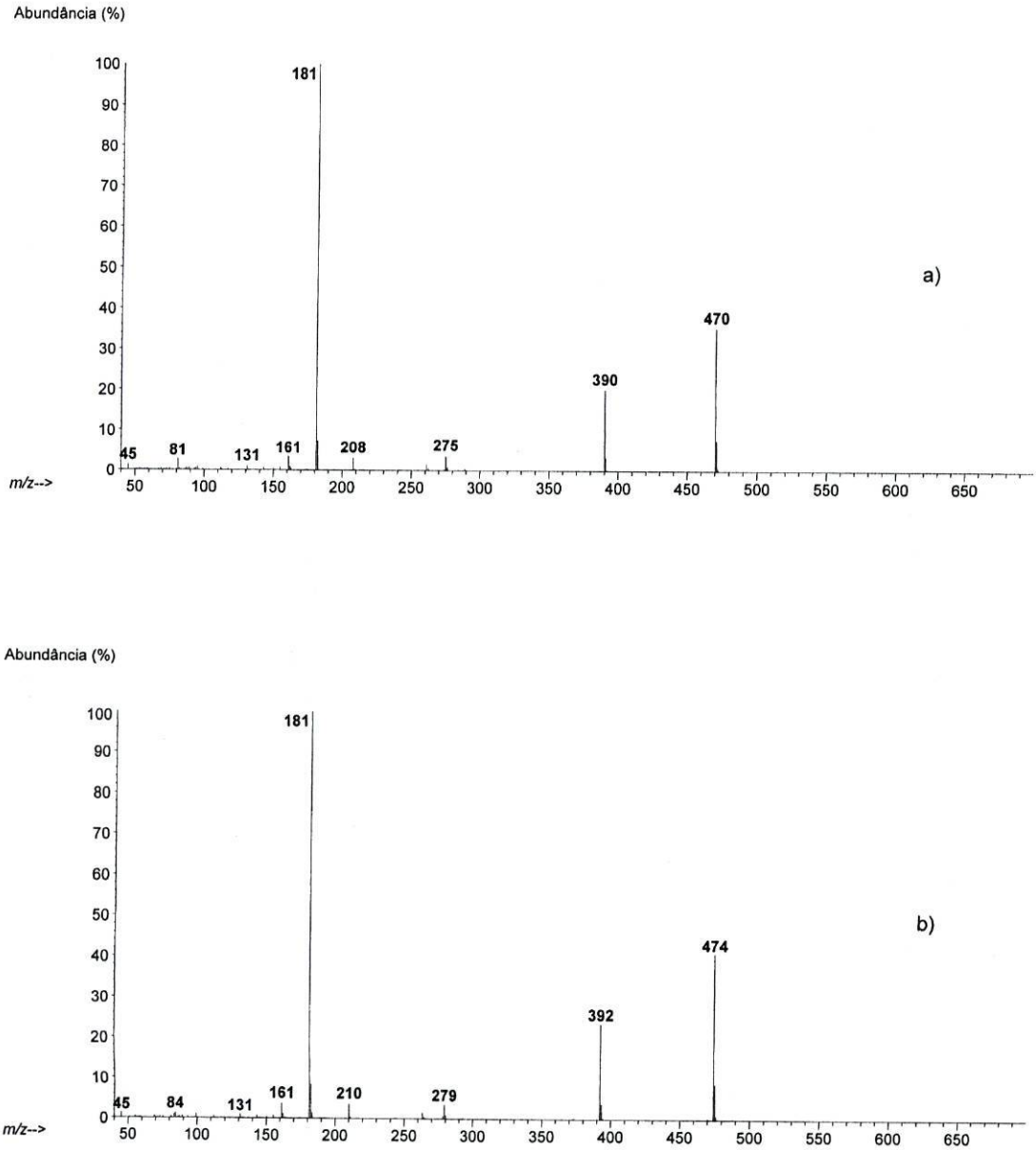


Figura 5.2. Espectros de massa dos derivados obtidos pela reacção do brometo de pentafluorobenzilo com histamina (a) e com a [α,α,β,β-$^2H_4$]histamina (PI) (b) obtidos, nas condições estabelecidas, por impacto electrónico a 70 ev.

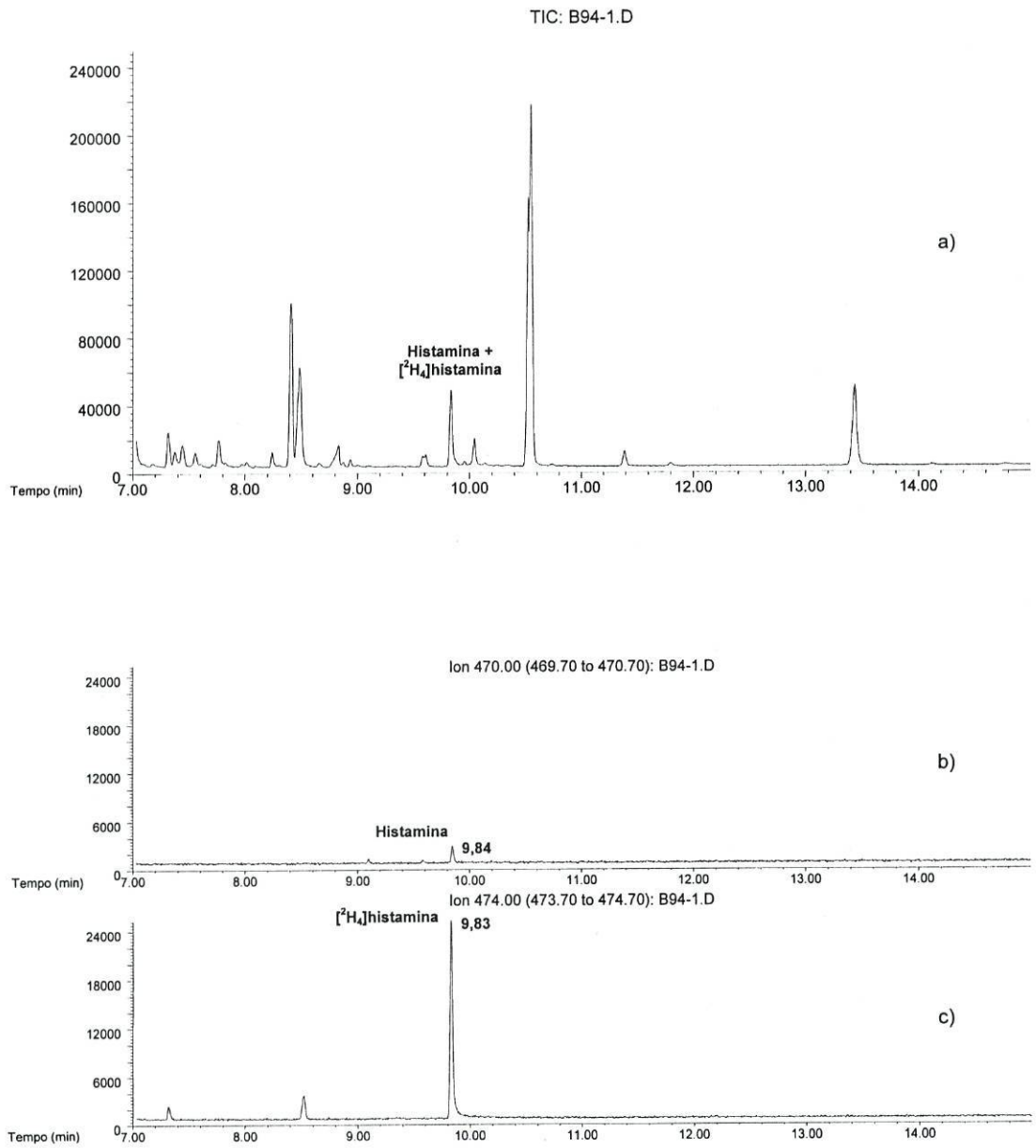


Figura 5.3. Cromatogramas de uma amostra de vinho do Porto contendo 31,2 µg/L de histamina obtidos nas condições estabelecidas para a quantificação: monitorização selectiva dos iões *m/z* 181, *m/z* 290, *m/z* 292, *m/z* 470 e *m/z* 474.

a) Cromatograma iónico total
b) Cromatograma de massa do ião *m/z* 470 (histamina)
c) Cromatograma de massa do ião *m/z* 474 ([α,α,β,β-$^2H_4$]histamina)

5.5. Validação do método

5.5.1. Linearidade

Para estudar a linearidade do método no que respeita ao processo cromatográfico (derivatização e análise por GC-MS) prepararam-se, numa fase inicial do trabalho, soluções padrão de histamina em HCl 0,1 M (adicionadas do padrão interno: 1 mg/L), das quais se derivatizou directamente alíquotas de 500 μL, sem as sujeitar ao processo de extracção. Usaram-se cinco níveis de concentração (mais o branco) — 0; 0,100; 0,500; 1,000; 2,500 e 5,000 mg/L — tendo-se obtido uma recta definida pela equação — y = 1,00242 x - 0,03003 — com um coeficiente de correlação de 0,99986.

A exemplo do referido no capítulo anterior, o estudo da linearidade global da metodologia desenvolvida foi feito por várias vezes, tantas quantas as curvas de calibração construídas (para cada ensaio, correspondente a cerca de dez a quinze amostras, construiu-se uma nova curva de calibração). O número de pontos das curvas de calibração foi de 5 ou 6, numa gama de 0,010 a 2,000 mg/L para os vinhos do Porto e os mostos e de 0,025 a 5,000 mg/L para alguns vinhos de mesa que também foram analisados. Os coeficientes de correlação obtidos foram sempre superiores a 0,99950, tendo em alguns ensaios sido superiores a 0,99990.

5.5.2. Precisão

Para determinar a precisão da metodologia desenvolvida, fizeram-se 6 determinações em paralelo a duas amostras de vinho do Porto, a uma amostra de vinho tinto e a uma amostra de mosto, escolhidas de forma a abranger diferentes teores de histamina. Nos três casos, partiu-se de seis alíquotas da mesma amostra e procedeu-se à sua análise como de um conjunto de seis amostras diferentes se tratasse, em simultâneo com uma série de padrões usados para a construção das curvas de calibração necessárias. Cada extracto final foi injectado em duplicado, considerando-se como resultado final a média dos dois resultados obtidos. Os resultados são apresentados na Tabela 5.1.

No caso dos mostos, atendendo ao baixo teor da amostra sujeita ao ensaio de precisão, efectuou-se um outro estudo de precisão relativo à mesma amostra mas agora adicionada de uma quantidade de histamina correspondente a 250 μg/L. Para o efeito retiraram-se 6 alíquotas de 8 mL da amostra em estudo, adicionou-se a cada uma igual quantidade de solução padrão de histamina e procedeu-se como acima descrito. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.2.

5.5.3. Recuperação

Efectuaram-se dois ensaios de recuperação, usando-se para o efeito uma amostra de vinho do Porto e uma amostra de mosto cujos teores de histamina tinham sido determinados no ensaio de precisão. No caso da amostra de vinho do Porto, o estudo da recuperação foi feito com quatro níveis de adição, enquanto no caso do mosto esse número foi de cinco. O tratamento das amostras foi feito em paralelo com padrões usados para a construção da curva de calibração. Cada extracto final foi injectado em duplicado, considerando-se como resultado final a média dos dois resultados obtidos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.3.

Com base nos resultados obtidos, construíram-se gráficos (um para cada matriz) relacionando os teores obtidos (ordenadas) em função dos teores adicionados (abcissas). Como referido anteriormente, o coeficiente de correlação obtido dá-nos uma ideia da linearidade da metodologia em condições "reais" de análise, na qual entra em conta a especificidade das matrizes analisadas. Os gráficos obtidos assim como as respectivas equações das rectas obtidas e os valores de R^2 são apresentados nas Figuras 5.4 e 5.5.

5.5.4. Limites de detecção e de quantificação

Não foram executados estudos exaustivos tendo em vista a determinação dos limites de detecção e de quantificação. Contudo, verificou-se ser possível fazer a determinação de amostras contendo cerca de 10 μg/L de histamina com um coeficiente de variação ligeiramente inferior a 15 %, pelo que tomámos esse valor como indicativo para o limite de quantificação da metodologia. De notar que houve a intenção de optimizar a metodologia de forma a obter-se linearidade numa zona de

trabalho até 5 mg/L. Caso houvesse necessidade de se baixar o limite de quantificação poder-se-ia eventualmente alterar alguns dos volumes usados, em especial diminuir a quantidade final de acetato de etilo usada para a dissolução final dos derivados obtidos.

TABELA 5.1

RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE PRECISÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA NAS DIFERENTES MATRIZES ESTUDADAS: VINHO DO PORTO (2 AMOSTRAS), VINHO DE MESA E MOSTO (n=6)

Amostra	Média (µg/L)	Desvio-padrão	C. V. (%)
Vinho do Porto (a)	19,1	1,7	**9,0**
Vinho do Porto (b)	175,1	4,3	**2,3**
Vinho tinto	3 748,0	216,9	**5,8**
Mosto	37,4	4,2	**11,2**

TABELA 5.2

RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE PRECISÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA NUMA AMOSTRA DE MOSTO ADICIONADA DE 250 µg/L DE HISTAMINA (n=6)

Amostra	Média (µg/L)	Desvio-padrão	C. V. (%)
Mosto (+250 µg/L)	300,5	2,8	**0,9**

TABELA 5.3

RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO EFECTUADOS COM UMA AMOSTRA DE VINHO DO PORTO E UMA AMOSTRA DE MOSTO

	Histamina			
	Teor inicial (μg/L)	Teor adicionado (μg/L)	Teor encontrado (μg/L)	**Recuperação (%)**
Vinho do Porto	19,1	100,0	114,7	**95,6**
		250,0	284,6	**106,2**
		500,0	557,3	**107,6**
		1000,0	1129,3	**111,0**
Mosto	37,4	25,0	54,3	**67,5**
		50,0	89,4	**104,0**
		100,0	136,4	**99,0**
		250,0	301,1	**105,5**
		500,0	536,8	**99,9**

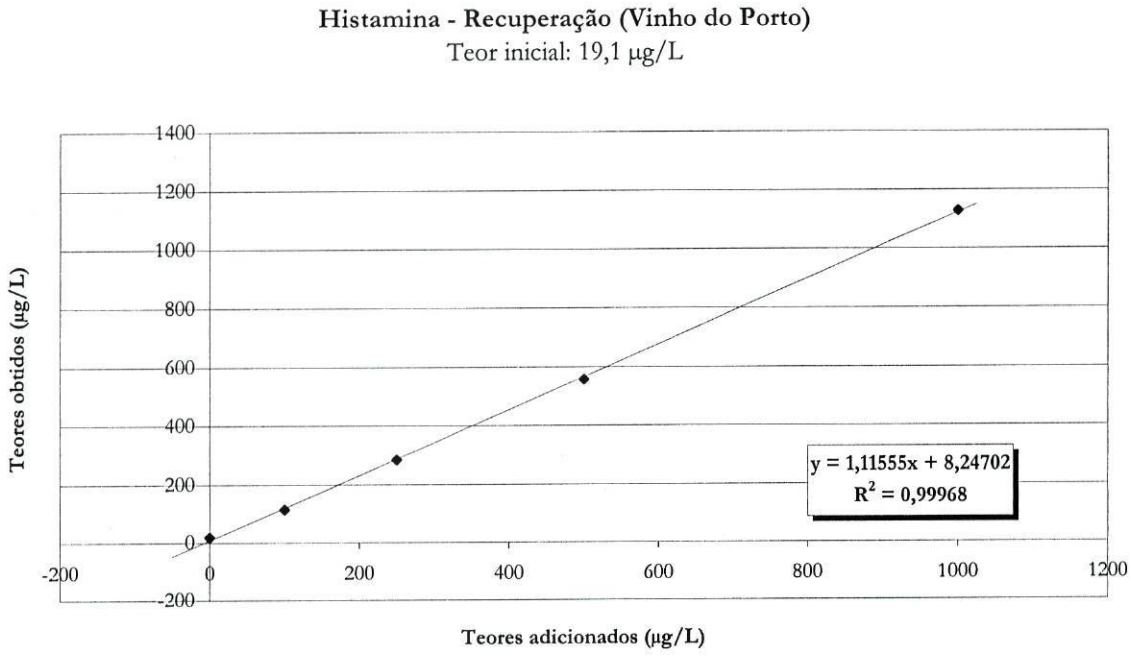


Figura 5.4. Curva de recuperação obtida pela adição de quantidades conhecidas de histamina a uma amostra de vinho do Porto.

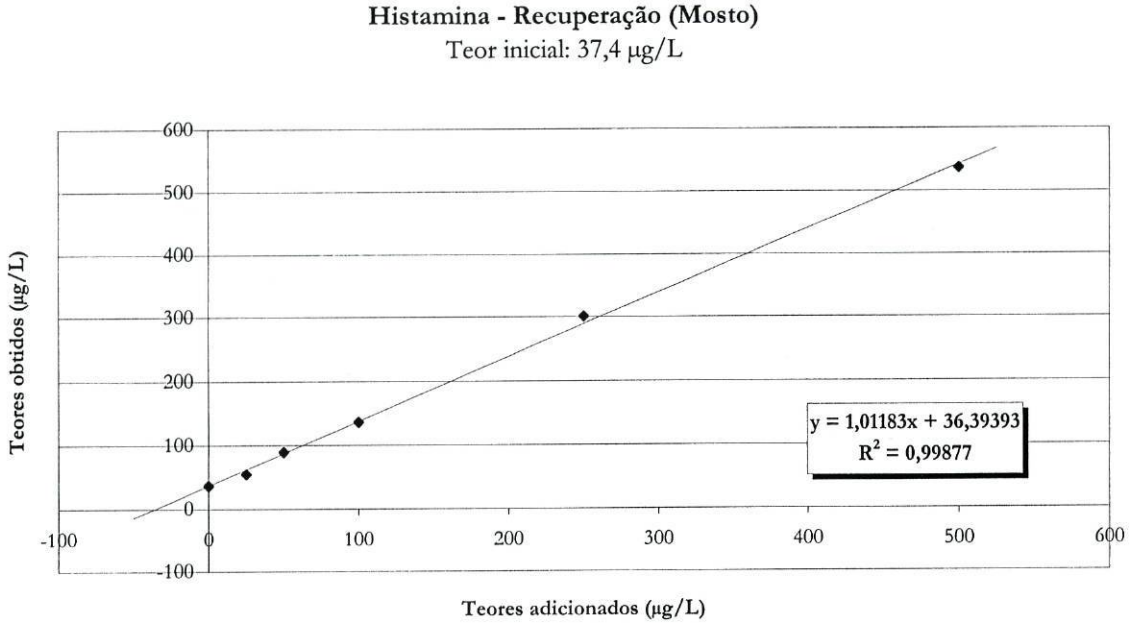


Figura 5.5. Curva de recuperação obtida pela adição de quantidades conhecidas de histamina a uma amostra de mosto.

5.6. Conclusões

A análise dos resultados obtidos nos ensaios de validação efectuados demonstra que a metodologia analítica desenvolvida correspondeu inteiramente aos pressupostos fundamentais que estiveram na sua origem: desenvolvimento de um método dedicado à determinação quantitativa de histamina em amostras de vinhos do Porto e de mostos, dotado de elevados níveis de sensibilidade, de precisão e de exactidão, e passível de ser usado como método de referência sempre que necessário, nomeadamente para a confirmação de resultados obtidos por diferentes métodos ou para a respectiva validação.

Para além das boas características apresentadas pelo método no que respeita aos ensaios de validação efectuados, podem salientar-se outros aspectos positivos que julgamos relevantes:

a) O excelente desempenho do método de extracção usado, facilmente verificável, entre outros aspectos, pelo facto dos níveis de linearidade obtidos com soluções padrão sujeitas ao processo de extracção serem da mesma ordem de grandeza dos obtidos com soluções padrão não sujeitas ao referido processo.

b) O facto de ter sido possível executar o trabalho com recurso ao modo mais simples de GC-MS, que corresponde à ionização por impacto electrónico, em contraste com as propostas anteriores, todas elas baseadas na técnica de GC-MS com ionização química negativa, muito mais exigente sob o ponto de vista do equipamento necessário. Apesar de a sensibilidade obtida ser, teoricamente, significativamente inferior, devido às diferenças no tipo de espectros obtidos em ambas as técnicas, a metodologia desenvolvida apresentou-se perfeitamente adequada aos teores de histamina presentes neste tipo de amostras.

c) O bom comportamento cromatográfico apresentado pelos derivados obtidos, correspondentes à histamina e ao seu isótopo tetradeuterado usado com padrão interno, e a boa separação cromatográfica obtida.

Como aspectos menos positivos da metodologia, na sua essência não mensuráveis porque baseados na experiência entretanto adquirida na sua aplicação a um elevado número de amostras, pensamos ser nosso dever realçar dois em particular:

O primeiro prende-se com o facto de a metodologia ser morosa, dispendiosa no que respeita ao uso de consumíveis e de execução laboratorial algo difícil. Neste último aspecto, deve referir-se, em particular, as dificuldades existentes no processo de extracção dos derivados obtidos com diclorometano, já atrás referidas. Para além disso, durante a totalidade da metodologia há quatro (três no caso dos mostos) etapas de evaporação de solventes, todas elas exigindo cuidados especiais por parte do operador no que respeita à intensidade do fluxo de azoto, de forma a limitar quaisquer possíveis perdas dos compostos de interesse.

O segundo aspecto menos positivo a destacar, é, em parte, consequência do elevado número de etapas da metodologia, consistindo numa variação maior do que o desejável das áreas obtidas em picos correspondentes à mesma quantidade de composto na amostra inicial. O facto é mais evidente no que respeita às áreas do padrão interno, que apresentaram uma variação maior do que o habitual neste tipo de metodologias (por exemplo, na metodologia referida no capítulo anterior).

Contudo, para além das perdas irreprodutíveis que porventura possam ter ocorrido durante a sequência de etapas analíticas executadas e também da irreprodutibilidade inerente ao processo de injecção manual utilizado, o facto tem também a ver com um fenómeno por vezes referido na literatura quando se usam análogos isotópicos como padrões internos, que é o da presença de quantidades crescentes de um deles (regra geral, o correspondente ao analito cuja concentração se quer determinar) implicar um aumento do sinal analítico correspondente ao outro (regra geral, o correspondente ao padrão interno). Para melhor compreensão deste fenómeno, apresentamos na Tabela 5.4 os dados brutos correspondentes a uma das curvas de calibração obtidas, os quais nos pareceram exemplares para ilustrar esta questão. Com efeito, é perfeitamente visível, pela análise da tabela, o aumento da área correspondente ao pico de padrão interno com o aumento da concentração de histamina nos padrões. Não obstante, nesta como nas outras curvas de calibração construídas, é notável o grau de linearidade obtida. No exemplo da tabela o coeficiente de correlação obtido foi de r = 0,99999. Para a obtenção destes níveis de linearidade parece-nos evidente o papel essencial desempenhado pelo uso de um análogo isotópico da histamina como padrão interno.

Finalmente, é de considerar o facto de ser possível que a metodologia desenvolvida possa ser usada na determinação simultânea de outras aminas não voláteis. Da mesma forma que reage com a função amina da cadeia lateral da molécula de histamina, provavelmente o reagente derivatizante usado será capaz de reagir com as funções amina de outras aminas biogénicas e dar origem a

derivados com uma volatilidade pouco intensa, e, por isso, passíveis de não serem eliminados durante as várias etapas de evaporação a que é submetido o meio reaccional após a reacção de derivatização. Infelizmente, contudo, esse estudo não chegou a ser feito, em parte porque tínhamos acabado de estabelecer um método adequado para a determinação desses compostos, em parte porque o desenvolvimento da metodologia se deu numa altura em que as avarias no aparelho de GC-MS começaram a suceder de uma forma contínua. A sua realização futura parece-nos, porém, de todo o interesse.

TABELA 5.4.

VALORES OBTIDOS NA INTEGRAÇÃO DAS ÁREAS DOS PICOS CORRESPONDENTES À HISTAMINA E À [α,α,β,β-$^2H_4$]HISTAMINA (P.I.) USADOS PARA A CONSTRUÇÃO DE UMA CURVA DE CALIBRAÇÃO

	Histamina Área(ião 470)[1]	**Hd_4 (PI)*** Área (ião 474)[1]	**Área H/ Área Hd_4**
Padrões (µg/L)			
0,0	0	162935	**0,000**
25,0	10665	201548	**0,053**
50,0	27352	229762	**0,119**
100,0	88759	375290	**0,237**
500,0	691156	572657	**1,207**
1000,0	1566702	652022	**2,403**

[1] As áreas são expressas em unidades arbitrárias definidas pelo "software" usado

*Hd_4 - a [α,α,β,β-$^2H_4$]histamina

Bibliografia

Cancalon, P., Klingman, J. D., Simultaneous determination of biogenic and non-biogenic amines by gas-liquid chromatography. ***J. Chromatogr Sci., 10,*** 253 (1972).

Keyzer, J. J., Breukelman, H., Elzinga, H., Koopman, B. J., Wolthers, B. G., Bruins, A. P., Determination of histamine by chemical-ionization mass spectrometry: application to human urine. ***Biomed-Mass-Spectrom., 10,*** 480 (1983).

Keyzer, J. J., Wolthers, B. G., Muskiet, F. A. J., Breukelman, H., Kauffman, H., de Vries, K., Measurement of plasma histamine by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: methodology and normal values. ***Anal. Biochem., 139,*** 474 (1984).

Keyzer, J. J., Breukelman, H., Wolthers, B. G., Richardson, F. J., de Monchy, J. G. R., Measurement of N-methylhistamine concentrations in plasma and urine as a parameter for histamine release during anaphylactoid reactions. ***Agents Actions., 16,*** 76 (1985).

Mahy, N., Gelpi, E., Gas chromatography separation of histamine and its metabolites. ***J. Chromatogr., 130,*** 237 (1977).

Mita, H., Yasueda, H., Shida, T., Histamine derivative for quantitative determination by gas chromatography. ***J. Chromatogr., 175,*** 339 (1979).

Mita, H., Yasueda, H., Shida, T., Simultaneous determination of histamine and N-methylhistamine in human plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry. ***J. Chromatogr., 221,*** 1 (1980a).

Mita, H., Yasueda, H., Shida, T., Quantitative analysis of histamine in biological samples by gas chromatography mass spectrometry. ***J. Chromatogr., 181,*** 153 (1980b).

Navert, H., New approach to the separation and identification of some methylated histamine derivatives by gas chromatography. ***J. Chromatogr., 106,*** 218 (1975) (citado por Mita *et al.*, 1979).

Navert, H., Dupuis, G., Wollin, A., Improved chromatographic characteristics of histamine and some of its analogues by ring acetylation. ***J. Chromatogr., 383,*** 128 (1986).

Oosting, E., Keyzer, J. J., Measurement of urinary N-methylhistamine excretion: cortrelation of a newly developed radio-immunoaqssay (RIA) with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). ***Agents Actions., 33,*** 215 (1991).

Payne, N. A., Gerber, J. G., Effect of adenosine and histamine receptor stimulation on canine histamine release to pentagastrin. ***Digestion, 58,*** 352 (1997).

Payne, N. A., Zirrolli, J. A., Gerber, J. G., Analysis of histamine and N-methylhistamine in plasma by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. ***Anal. Biochem., 178,*** 414 (1989).

Roberts II, L. J., Pentafluorobenzyl derivative of histamine for determination by gas chromatography-negative ion chemical ionisation mass spectrometry. ***J. Chromatogr., 287,*** 155 (1984).

Roberts II, L. J., Oates, J., Accurate and efficient method for quantification of urinary histamine by gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry. ***Anal. Biochem., 136,*** 258 (1984).

Slemr, J., Beyermann, K., Determination of biogenic amines in meat by combined ion-exchange and capillary gas chromatography. ***J. Chromatogr., 283,*** 241 (1984).

Staruszkiewicz Jr, W. F., Bond, J. F., Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine, and histamine in foods. ***J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64,*** 584 (1981).

Wollin, A., Navert, H., Quantitation of histamine and some of its basic methylated metabolites in biological materials by gas-liquid chromatography. ***Anal. Biochem., 145,*** 73 (1985).

CAPÍTULO 6

DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS EM VINHOS DO PORTO E EM MOSTOS

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA BASEADA NUM PROCESSO BIFÁSICO DE DERIVATIZAÇÃO COM CLOROFORMATO DE ISOBUTILO E ANÁLISE POR GC-MS

6.1. Introdução

6.2. Procedimento analítico

6.2.1. Processo de derivatização

6.2.2. Condições operatórias

6.2.3. Quantificação

6.3. Desenvolvimento do método e discussão

6.3.1. Processo de derivatização

6.3.1.1. Uso de cloroformatos na derivatização de aminas

6.3.1.2. Desenvolvimento inicial de uma metodologia para a determinação de aminas em vinhos após derivatização com cloroformato de butilo. Razões do insucesso obtido

6.3.1.3. Trabalho experimental realizado para a definição das condições de derivatização usadas

6.3.2. Processo cromatográfico

6.3.2.1. Escolha dos padrões internos

6.3.2.2. Condições operatórias

6.4. Validação do método

6.4.1. Linearidade

6.4.2. Precisão

6.4.3. Recuperação

6.4.4. Limites de detecção e de quantificação

6.4.5. Comparação de métodos

6.5. Conclusões

Bibliografia

Anexo 1. Espectros de massa dos derivados isobutoxicarbonílicos das aminas biogénicas estudadas
Breve estudo dos espectros de massa apresentados

Anexo 2. Curvas de recuperação das aminas biogénicas estudadas referentes a amostras de vinho do Porto e de mosto

6.1. Introdução

O presente capítulo é dedicado ao método de GC-MS baseado no uso de cloroformato de isobutilo como agente derivatizante, desenvolvido e usado na determinação da generalidade das aminas biogénicas estudadas (com excepção da histamina, da espermidina e da espermina) em vinhos do Porto e em mostos.

Atendendo mais uma vez àquilo que nos pareceu melhor do ponto de vista de clareza da explanação, o capítulo está esquematizado de seguinte forma:

a) Inicialmente, é feita a descrição do procedimento analítico desenvolvido e das condições operatórias estabelecidas a título definitivo (posteriormente usadas na análise das amostras em estudo).

b) Em seguida, são relatadas as diversas etapas porque passou o desenvolvimento do método e é feita a respectiva discussão. De forma a familiarizar o leitor com a temática em discussão, este item é iniciado por uma breve síntese sobre as

propostas existentes na literatura para o uso de cloroformatos como agentes derivatizantes, seguindo-se a descrição de uma primeira metodologia inicialmente desenvolvida e a justificação do seu posterior abandono e, finalmente, o relato das experiências executadas durante a fase final de desenvolvimento do método e a discussão das opções tomadas.

c) Finalmente, são apresentados e comentados os resultados obtidos nos testes de validação efectuados.

d) Em anexo são apresentados:

- Os espectros de massa referentes a todos os derivados obtidos e um breve estudo sobre a respectiva elucidação
- As curvas de recuperação obtidas para todas as aminas ensaiadas em duas matrizes diferentes: vinhos do Porto e mostos.

6.2. Procedimento analítico

6.2.1. Processo de derivatização

Mediu-se uma alíquota de 5,0 mL de amostra (previamente centrifugada no caso dos mostos) e adicionou-se 100 μL de uma solução em HCl 0,1 M contendo os 8 padrões internos usados — [$^2H_5$]etilamina, [$^2H_3$]metilamina, [$^2H_8$]pirrolidina, [$^2H_8$]putrescina, [α,α,β,β-$^2H_4$]histamina*, anfetamina, hidroxianfetamina e heptilamina — numa concentração de 50 mg/L cada, de forma a obter uma concentração na amostra de 1 mg/L*. Transferiu-se então uma alíquota de 1,0 mL da amostra para um frasco de vidro silanizado de 5 mL, adicionou-se 1,0 mL de tolueno, alcalinizou-se a mistura com 1,0 mL de solução tampão fosfato 0,5 M a pH 12 e, finalmente, adicionou-se 25 μL do reagente derivatizante, o cloroformato de isobutilo. Agitou-se manualmente durante 10 minutos (seguidos de cerca de 30 segundos de agitação em vórtex) e centrifugou-se a 5000 rpm durante 5 minutos. Nos

* Embora no final se tenha verificado a inviabilidade do método para a quantificação de histamina, todos os procedimentos analíticos foram efectuados tendo em vista esse fim, daí o uso do padrão interno respectivo.

* Alternativamente, adicionou-se 50 μL de uma solução em HCl 0,1 M contendo alguns dos padrões internos numa concentração de 100 mg/L e 50 μL de uma solução em HCl 0,1 M contendo os restantes na mesma concentração.

casos em que a separação das fases se apresentou difícil, destruiu-se com uma micro-espátula a membrana sólida normalmente formada entre as duas fases e voltou a centrifugar-se. Dividiu-se então a fase toluénica (fase superior) em duas porções:

a) Uma porção da fase toluénica (500 μL) foi transferida para outro frasco de 5 mL e adicionada de igual quantidade de metanol alcalino (uma solução de metanol saturada de hidróxido de potássio, filtrada por filtro de 0,45 μm). Agitou-se manualmente o tubo durante 5 minutos, adicionou-se 1,5 mL de NaOH 5 M e voltou a agitar-se manualmente durante mais 5 minutos. Centrifugou-se a 5000 rpm durante 5 minutos. Usou-se a fase toluénica (fase superior) para a determinação de todas as aminas em estudo, com excepção da tiramina.

b) Uma segunda porção da fase toluénica (250 μL) foi transferida para um tubo idêntico ao anterior e evaporada à secura sob uma ligeira corrente de azoto, a 80 °C. O resíduo foi redissolvido em 100 μL de tolueno, tendo-se usado a solução obtida para a determinação da tiramina.

6.2.2. Condições operatórias

A introdução das soluções a analisar no aparelho de GC-MS foi feita manualmente, no modo de "splitless", com um pulso de pressão (32 psi; 45 s). Usou-se um "insert" de 4 mm de diâmetro interno com uma constrição em cada umas extremidades e a temperatura do injector foi de 250 °C. Para a separação cromatográfica experimentaram-se duas colunas: a primeira correspondeu a uma DB-1701 da J&W Scientific (Folsom, CA, Estados Unidos) – coluna revestida com dimetilsiloxano contendo 14 % de grupos fenilo e 14 % de grupos cianopropilo – com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase estacionária; a segunda foi uma HP5 da Agilent (Palo Alto, CA, Estados Unidos) – coluna revestida com dimetilsiloxano contendo 5 % de grupos fenilo – com as mesmas dimensões da anterior. A escolha final acabou por recaír nesta segunda, por motivos indicados adiante na discussão do método. Usaram-se dois programas com gradiente de temperatura, programados da seguinte forma:

a) Determinação das aminas após derivatização com cloroformato de isobutilo e eliminação do excesso de reagente por adição de metanol alcalino:

Temperatura inicial: 100 °C, mantida durante 1 minuto

Incremento de 10 °C/minuto, até 160 °C

Incremento de 25 °C/minuto, até 280 °C

Constante a 280 °C, durante 13,3 minutos

Tempo total: 25 minutos

b) Determinação da tiramina (e da histamina) após derivatização com cloroformato de isobutilo e eliminação do excesso de reagente por evaporação da amostra:

Temperatura inicial: 120 °C, mantida durante 1 minuto

Incremento de 15 °C/minuto, até 280 °C

Constante a 280 °C, durante 8,3 minutos

Tempo total: 20 minutos

De acordo com a prática habitualmente seguida neste tipo de métodos, usaram-se, em tempos diferentes, dois modos distintos de aquisição de dados cromatográficos.

Inicialmente, de forma a estabelecer o tempo de retenção de cada composto e a obter o respectivo espectro de massa, a aquisição de dados foi feita em modo de varrimento contínuo, numa gama de massas de *m/z* 50 a *m/z* 700.

Uma vez estabelecidas as condições de separação cromatográfica, e tendo como objectivo a quantificação dos compostos em análise, a aquisição de dados foi feita em modo de monitorização selectiva de iões. A escolha dos iões a monitorizar foi feita em função da respectiva abundância no espectro de massa dos compostos em estudo e da sua especificidade, num mínimo de 3 iões para cada composto (Tabelas 6.1 e 6.2). O tempo de monitorização de cada ião foi de 30 ms por ciclo, tendo-se mantido o detector desligado durante os primeiros 3,2 minutos, de forma a proteger a fonte iónica das perturbações causadas pela passagem do solvente.

TABELA 6.1

PROGRAMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS EM MODO DE MONITORIZAÇÃO SELECTIVA DE IÕES USADO PARA A QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS EM ESTUDO (MÉTODO A)

	Valores de *m/z*
Grupo 1 (3,2 min-5,0 min)	58, 61, 72, 76, 77, 79, 86, 88, 90, 95, 104, 130, 144, 145
Grupo 2 (5,0 min-8,0 min)	72, 86, 100, 102, 104, 118, 130, 158, 173
Grupo 3 (8,0 min-11,0 min)	98, 106, 112, 114, 116, 124, 128, 130, 132, 187
Grupo 4 (11,0 min-15,1 min)	91, 101, 104, 130, 144, 146, 148, 160, 201, 221, 274
Grupo 5 (15,1 min-25 min)	84, 129, 130, 144, 170, 176, 288, 296, 302, 316

TABELA 6.2

PROGRAMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS EM MODO DE MONITORIZAÇÃO SELECTIVA DE IÕES USADO PARA A QUANTIFICAÇÃO DA TIRAMINA E DA HISTAMINA (MÉTODO B)

	Valores de *m/z*
Grupo 1 3 min-20 min	107, 120, 144, 176, 182, 184, 194, 197, 237, 311, 315, 337

6.2.3. Quantificação

Para a quantificação das aminas em estudo, procedeu-se como indicado nos capítulos anteriores a respeito dos outros métodos desenvolvidos. Construíram-se assim curvas de calibração a partir de soluções padrão sujeitas a um tratamento rigorosamente igual ao das amostras, preparadas pela adição da quantidade requerida de cada uma das aminas e dos padrões internos às matrizes sintéticas cuja composição foi apresentada no capítulo 4 — Tabela 4.2. Os cuidados tidos com os problemas de diluição que habitualmente surgem quando se preparam padrões foram idênticos aos referidos anteriormente. De igual forma, e tendo em vista a maximização da qualidade dos resultados obtidos, optou-se por realizar o trabalho analítico por "séries", num esquema semelhante ao descrito no capítulo 4.

Uma vez obtidos os cromatogramas correspondentes a padrões e amostras, usou-se para fins quantitativos o sinal analítico proveniente de cromatogramas de massa, diferentes para cada composto. A escolha do valor de *m/z* foi feita novamente de acordo com a abundância do ião respectivo no espectro de massa do composto em causa, a sua especificidade e a ausência de interferentes. No caso das aminas para as quais se usou os respectivos isótopos deuterados como padrão interno, usaram-se valores de *m/z* correspondentes à mesma fragmentação, para o composto e para o respectivo padrão interno. Os iões usados tanto para fins quantitativos como para identificação dos compostos são referidos nas Tabelas 6.3 e 6.4.

A integração das áreas foi feita na opção de modo manual permitida pelo "software" usado para o efeito. A partir dos valores obtidos nos cromatogramas relativos aos padrões para cada uma das aminas e para o respectivo padrão interno, construíram-se curvas de calibração, colocando-se como ordenadas os valores correspondentes à relação área do pico de composto/área do pico de padrão interno e como abcissas as respectivas concentrações do composto. A determinação do teor de cada amina nas amostras foi então feita pela interpolação da relação área do pico de composto/área do pico de padrão interno na curva de calibração respectiva. Em cada série analítica, construíram-se duas curvas de calibração, uma para cada injecção, obtendo-se, consequentemente, para cada amostra também dois resultados. Os resultados finais considerados para cada amostra correspondem à média dos dois valores obtidos.

TABELA 6.3

IÕES USADOS COM FINS QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS PARA AS AMINAS BIOGÉNICAS ENSAIADAS E PARA OS RESPECTIVOS PADRÕES INTERNOS (MÉTODO A)

Composto	Tempo de Retenção (min)	Ião Q[a] (*m/z*)	Outros iões[b] (*m/z*)
Metilamina	3,63	76	58, 88
Dimetilamina	3,78	72	90, 145
Etilamina	4,20	90	72, 130
Isopropilamina	4,50	144	86, 104
Dietilamina	5,21	118	72, 100, 102, 158, 173
Propilamina	5,41	104	86, 130
Isobutilamina	6,26	118	100, 130, 158, 173
Butilamina	7,21	118	100, 130, 158, 173
2-Metilbutilamina	8,53	187	114, 130, 132
Isoamilamina	8,65	132	114, 130, 187
Pirrolidina	8,67	98	114, 116
Morfolina	9,53	116	114, 130, 187
Amilamina	9,67	132	114, 130, 187
Piperidina	9,75	128	112, 130
Hexilamina	11,33	146	130, 201
2-Feniletilamina	13,48	221	91, 104, 130, 148
1,3-diaminopropano	14,87	101	144, 201, 274
Putrescina	15,40	170	130, 288
Cadaverina	15,81	130	84, 129, 302
1,6-diaminohexano	16,23	130	316
[$^2H_3$]Metilamina	3,62	79	61
[$^2H_5$]Etilamina	4,16	95	77
[$^2H_8$]Pirrolidina	8,55	106	124
Heptilamina	12,35	144	130
Anfetamina	13,49	160	91
[$^2H_8$]Putrescina	15,37	176	296

[a] ião usado para a quantificação

[b] iões usados para confirmar a identidade do composto

TABELA 6.4

IÕES USADOS COM FINS QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS PARA A ANÁLISE DE TIRAMINA E PARA O RESPECTIVO PADRÃO INTERNO (MÉTODO B)

Composto	Tempo de Retenção (min)	Ião Q[a] (*m/z*)	Outros iões[b] (*m/z*)
Tiramina	10,34	120	107, 176, 237, 337
Hidroxianfetamina	10,22	144	107

[a] ião usado para a quantificação

[b] iões usados para confirmar a identidade do composto

6.3. Desenvolvimento do método e discussão

6.3.1. Processo de derivatização

6.3.1.1. Uso de cloroformatos na derivatização de aminas

Como ficou evidente nos dois capítulos anteriores, a derivatização corresponde usualmente à etapa mais demorada e mais exigente em termos de execução laboratorial de um método de cromatografia gasosa. No caso das aminas, a preparação dos derivados acilados mais usados requer condições rigorosas de ausência de água no meio reaccional, pela sua incompatibilidade com os reagentes usados, o que constitui, desde logo, um óbice ao desenvolvimento de processos rápidos e simples de executar. O mesmo se passa, aliás, com outros processos de derivatização alternativos, como as sililações, pouco usadas no caso das aminas, ou as alquilações, como é exemplo o método apresentado no capítulo anterior para a derivatização da histamina.

O uso de cloroformatos como reagentes derivatizantes apresenta-se, neste contexto, como especialmente atraente, dada as boas características que apresentam. Com efeito, estes reagentes — que correspondem a ésteres do ácido clorofórmico, com a estrutura geral [R–O–CO–Cl] — são capazes de reagir facilmente com aminas na presença de água e à temperatura ambiente, dando origem a derivados (carbamatos) dotados de boas propriedades para a respectiva análise por cromatografia gasosa. No caso de uma amina primária, a reacção pode ser esquematizada do seguinte modo:

$$R\text{–}O\text{–}CO\text{–}Cl + R'NH_2 \longrightarrow R\text{–}O\text{–}CO\text{–}NH\text{–}R' + HCl$$

Os cloroformatos são também capazes, em condições reaccionais apropriadas, de reagir com outros grupos funcionais, nomeadamente com grupos fenólicos, sulfídricos, imínicos e imidazólicos, como demonstrado nos trabalhos iniciais do grupo de Makita e colaboradores [Makita *et al.*, 1976]. No caso dos grupos fenólicos, o esquema reaccional é o seguinte:

$$R\text{-}O\text{-}CO\text{-}Cl + Ar\text{-}OH \longrightarrow R\text{-}O\text{-}CO\text{-}O\text{-}Ar + HCl$$

Embora de uma forma menos intensiva do que os reagentes acilantes alquil-halogenados, mencionados no capítulo 4, os cloroformatos têm vindo a ser usados com regularidade desde o início dos anos oitenta em métodos desenvolvidos para a determinação de compostos aminados nas mais variadas matrizes. Como reagentes mais usados surgem os cloroformatos de massa molecular mais baixa — cloroformatos de metilo, etilo, propilo e isobutilo — em virtude das propriedades de volatilidade que são capazes de transmitir aos derivados formados. Há também diversas referências ao uso de cloroformatos halogenados, os quais, a exemplo do referido a propósito dos reagentes acilantes, se apresentam mais apropriados para determinados tipos de detectores*.

De uma forma um tanto simplificada, pode considerar-se a existência de três distintas linhas de actuação no que respeita ao uso de cloroformatos como reagentes derivatizantes em métodos de cromatografia gasosa. Respeitando uma certa ordem cronológica, podemos considerar em primeiro lugar os métodos baseados na acção dos cloroformatos sobre aminas em meios aquosos simples, normalmente tamponados a pH alcalino dependente do tipo de compostos a analisar. Em segundo lugar, surgem os processos bifásicos, caracterizados por a reacção de derivatização ter lugar num meio reaccional composto por uma fase aquosa e uma fase orgânica, imiscíveis entre si, o que, entre outras características, promove a simultaneidade da derivatização e da extracção dos derivados formados. Em terceiro e último lugar, porque desenvolvidos mais recentemente, surgem os processos caracterizados pela reacção de derivatização ter lugar num meio reaccional complexo formado por quantidades apropriadas de água, de acetonitrilo e de "catalisadores" vários, nomeadamente piridina e o álcool correspondente ao cloroformato usado. Qualquer destes três diferentes tipos de processos tem aplicação actualmente, como veremos adiante.

Os processos baseados na simples acção de cloroformatos adicionados a um meio aquoso contendo os compostos em estudo foram propostos, quase em simultâneo, em meados da década de setenta, por dois grupos diferentes de autores: Hartvig e colaboradores, da Universidade de Uppsala

* Cloroformatos com grupos aromáticos volumosos têm vindo, por seu lado, a ser usados na derivatização de aminas como etapa prévia à sua análise por HPLC, dadas as suas características de fluorescência ou de absorção no UV-VIS; o seu uso foi referido com algum pormenor no capítulo 2.

na Suécia [Hartvig e Vessman, 1974a, 1974b] e Makita e colaboradores, da Universidade de Okayama no Japão [Makita *et al.*, 1976].

A reacção dos cloroformatos com aminas em meio aquoso tamponado foi alvo de intenso trabalho de investigação e teorização [Ahnfelt e Hartvig, 1980; Ahnfelt e Hartvig, 1982], tendo sido feitas propostas para o seu uso na determinação de diferentes compostos aminados, designadamente de aminas alifáticas primárias e secundárias [Ahnfelt e Hartvig, 1980], de poliaminas [Makita *et al.*, 1978; Yamamoto *et al.*, 1982; Yamamoto *et al.*, 1984], de catecolaminas [Gyllenhaal *et al.*, 1980], de aminas fenólicas, incluindo a tiramina e a 2-feniletilamina, de interesse particular para nós [Yamamoto *et al.*, 1980], e até de uma amina terciária, a petidina, neste caso com exigência de aquecimento do meio reaccional [Hartvig *et al.*, 1976a]. Regra geral, o esquema reaccional proposto pelos diversos autores baseia-se na adição de uma pequena quantidade do reagente derivatizante escolhido (sendo o cloroformato de etilo e o cloroformato de isobutilo os mais usados) a uma solução aquosa contendo as aminas, previamente alcalinizada com Na_2CO_3 a 10 % ou devidamente tamponada a um pH alcalino (≥ 9), seguida de agitação durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Este tipo de processos é ainda hoje correntemente aplicado, em particular como primeira etapa de métodos bietápicos usados na determinação de aminoácidos, que têm constituído o eixo principal do trabalho realizado pelo grupo de Makita e colaboradores. Nestes processos, uma primeira derivatização (tanto da função amina característica dos aminoácidos como de outras funções polares presentes nas respectivas cadeias laterais) é feita com o cloroformato de isobutilo, seguindo-se uma esterificação da função ácida, regra geral com diazometano, dando origem a derivados com a estrutura *N(O, S)*-isobutoxicarbonil metilésteres [Makita *et al.*, 1976, 1982; Matsumura *et al.*, 1996; Kataoka *et al.*, 1997a, 1997b e outras referências mencionadas nestes últimos trabalhos].

Um esquema analítico semelhante, no que respeita às condições reaccionais para a derivatização da função aminada, foi ainda recentemente proposto para a determinação de anfetamina e derivados em urina [Ugland *et al.*, 1997]: a 1,5 mL de amostra tamponada a pH 10,8, os autores adicionaram uma pequena quantidade de cloroformato de propilo ou butilo (2 μL mostraram-se suficientes), tendo-se a reacção apresentado completa ao fim de 1 minuto de agitação em vórtex. A variação de pH de 9,5 a 14 não provocou qualquer alteração significativa no rendimento da mesma.

Uma segunda linha de acção no que respeita ao uso de cloroformatos como reagentes derivatizantes consiste no uso de processos bifásicos, ou seja, processos nos quais a reacção tem lugar

num meio reaccional composto por uma fase aquosa — na qual se dissolvem preferencialmente as aminas em estudo — e por uma fase orgânica imiscível com a anterior — na qual se dissolvem preferencialmente tanto o reagente derivatizante como os derivados entretanto formados à medida que se desenvolve a reacção. A principal atracção neste tipo de processos reside no facto de a derivatização e a extracção dos compostos formados terem lugar simultaneamente; além disso, são diminuídos os problemas relacionados com a rápida hidrólise a que os cloroformatos são sujeitos em meio alcalino.

Os processos bifásicos surgiram como uma evolução das propostas atrás referidas do grupo de Hartvig e colaboradores, tendo sido inicialmente estudada a sua utilização na determinação de aminas terciárias [Karlsson, 1981; Karlsson e Hartvig, 1981] e de aminas alifáticas [Ahnfelt *et al.*, 1982], neste último caso através de um sistema bifásico que consistia numa fase aquosa tamponada a 10,3 e em diclorometano como solvente orgânico. O desenvolvimento e aperfeiçoamento deste tipo de sistemas tem vindo, entretanto, a ser gradualmente conseguido por outros grupos de investigadores, curiosamente quase todos do mesmo país. Entre as diversas propostas apresentadas podemos salientar as referentes à determinação de: a) piperazina em urina e em atmosferas de trabalho — cloroformato de etilo ou de butilo, solução aquosa tamponada a pH 10 / tolueno, amónia como catalisador [Skarping *et al.*, 1986]; b) 1,6-hexanodiamina em urina — cloroformato de trifluoroetilo, solução aquosa tamponada a pH 12 / tolueno, tributilamina como catalisador [Dalene *et al.*, 1994]; c) aminas primárias e secundárias de baixa massa molecular (metilamina, etilamina, dimetilamina e metiletilamina) em urina — cloroformato de butilo, solução aquosa tamponada a pH 12 / tolueno, sem catalisador [Lundh e Akesson, 1993]; d) anfetaminas e análogos em urina — cloroformato de metilo, solução aquosa tamponada a pH 9 / isooctano, sem catalisador [Jonsson *et al.*, 1996; Kronstrand *et al.*, 1996].

Kim *et al.* [1997], por seu lado, desenvolveram um método baseado num sistema bifásico água/diclorometano capaz de permitir a análise qualitativa de 57 diferentes compostos aminados, mas com diferentes características em relação aos anteriores: a reacção de derivatização é feita em dois tempos, inicialmente a pH 7,5, de forma a optimizar a derivatização de grupos fenólicos e, em seguida, a pH 12,0, de forma a garantir a derivatização das funções aminadas; depois de uma purificação dos derivados formados através de passagem por uma cartucha de extracção em fase sólida (Chromosorb P), os compostos são ainda sujeitos a um processo de sililação com *N*-metil-*N*-

-tercbutildimetilsilil trifluoroacetamida, de forma a garantir a derivatização dos grupos hidroxilo remanescentes.

A terceira e última linha de acção referente ao uso de cloroformatos como agentes derivatizantes caracteriza-se, como foi referido atrás, pelo uso de condições reaccionais específicas, a saber: água, acetonitrilo, piridina e um álcool, em regra o correspondente ao cloroformato usado, em quantidades relativas dependentes do tipo de compostos a analisar. Estas condições reaccionais distinguem-se por dois aspectos essenciais: a) permitem a derivatização não só da função amina e das outras funções atrás mencionadas, como também da função carboxílica. b) a derivatização dos compostos é praticamente instantânea, permitindo ganhos de tempo consideráveis. Introduzida por um investigador checo [Husek *et al.*, 1990; Husek, 1991a,b], esta nova abordagem do uso de cloroformatos constituiu uma pequena revolução no universo da derivatização analítica dadas as possibilidades abertas num campo tradicionalmente difícil como é o da derivatização de aminoácidos. A sua aplicação a estes compostos bem como a ácidos carboxílicos diversos foi já alvo, no curto espaço temporal entretanto decorrido, de várias dezenas de trabalhos por parte do mesmo autor (com colaborações diversas) bem como de muitos outros investigadores*.

O novo processo abriu também as portas à possibilidade de determinação simultânea de aminas (incluindo catecolaminas), fenóis e de ácidos como demonstrado por dois trabalhos do mesmo autor [Husek *et al.*, 1992; Husek, 1993]. Pela sua relevância para o nosso trabalho, refira-se que no primeiro destes trabalhos, o autor comparou os resultados obtidos pela aplicação do seu método a 10 aminas (catecolaminas na sua maior parte), duas poliaminas (espermidina e espermina), quatro ácidos (escolhidos por serem produtos metabólicos de algumas das aminas em questão) e dois compostos fenólicos, com os resultados obtidos com o esquema reaccional clássico proposto por Yamamoto *et al.* [1980] para a determinação de aminas, tendo obtido rendimentos sensivelmente idênticos para todas as aminas e para os dois fenóis, com excepção das duas poliaminas, para as quais o novo processo não se apresentou viável.

Para lá das diferenças notórias entre os diferentes tipos de abordagem referentes ao uso de cloroformatos como agentes derivatizantes, um pormenor adicional separa os processos inicialmente desenvolvidos — acção dos cloroformatos sobre uma solução aquosa ou sobre uma mistura bifásica

* Para um estudo mais aprofundado do tema, consultar um artigo de revisão recentemente publicado pelo autor, com 112 citações [Husek, 1998].

— dos processos baseados nas propostas de Husek. Essa diferença, para a qual ainda não conseguimos arranjar uma explicação capaz, e que acabou por afectar negativamente o trabalho por nós desenvolvido nesta área, situa-se na possibilidade ou não de se injectar no sistema cromatográfico o excesso de reagente derivatizante, face à sua possível acção perniciosa no processo cromatográfico.

Os problemas causados pela presença desse excesso de cloroformato no final do processo reactivo têm constituído, com efeito, um dos maiores, senão o maior, obstáculo encontrado pela generalidade dos autores atrás referidos para o desenvolvimento de processos mais rápidos e fáceis de executar. Para lá da referência expressa feita por vários autores [Dalene *et al.*, 1994; Lundh e Akesson, 1993; Skarping *et al.*, 1986, 1989], o facto torna-se evidente ao analisar com cuidado os diferentes esquemas reaccionais propostos, nos quais tem presença obrigatória uma etapa destinada a promover a eliminação do excesso de derivatizante.

A forma mais simples de remover esse excesso consiste em aproveitar a sua volatilidade, promovendo a sua evaporação. Usualmente, os derivados são previamente extraídos com um solvente orgânico — nos processos bifásicos este passo não é necessário, pois os derivados já se encontram dissolvidos num solvente orgânico no final da reacção — a solução é evaporada à secura e o resíduo redissolvido num solvente com boas características cromatográficas [Dalene *et al.*, 1994; Gyllenhaal *et al.*, 1980; Makita *et al.*, 1978; Skarping *et al.*, 1986, 1989; Yamamoto *et al.*, 1980, 1982, 1984]. Obviamente, este tipo de procedimento inviabiliza a análise das aminas mais voláteis, cujos derivados também são eliminados durante o processo de evaporação. A sua aplicação restringe-se, pois, aos casos em que os compostos de interesse apresentam derivados com baixa volatilidade.

Quando se pretende a análise de compostos mais voláteis, existe a possibilidade de se recorrer a uma metodologia desenvolvida originalmente por Hartvig *et al.* [1976b] baseada no tratamento do meio reaccional com uma solução saturada de metanol alcalino, seguido da adição de uma solução concentrada de NaOH. A solução orgânica alcalina promove a rápida destruição do excesso de cloroformato com formação do correspondente álcool enquanto a solução alcalina concentrada é usada para promover a separação de uma fase aquosa e de uma fase orgânica. Este processo, durante muito tempo esquecido, foi recuperado por Lundh e Akesson [1993], na sua proposta para a determinação de aminas voláteis atrás referida e, mais recentemente, nos trabalhos sobre anfetaminas de Jonsson *et al.* [1996] e de Kronstrand *et al.* [1996].

Outras formas de se eliminar o excesso de cloroformato consistem em submeter o meio reaccional a uma passagem por uma cartucha de SPE, como proposto por Kim *et al.* [1997] ou, ainda, no uso de fibras de SPME, colocadas em contacto directo com o meio, como sugerido por Ugland *et al.* [1997]. Em ambos os casos, os autores referem a selectividade dos suportes sólidos usados para os derivados em estudo, permanecendo o excesso de cloroformato no meio reaccional.

Contrariamente a estes cuidados, em todos os trabalhos referentes ao esquema reaccional proposto por Husek, não existe qualquer referência à eliminação do excesso de derivatizante, o que naturalmente diminuiria as características de rapidez e simplicidade que lhe estão associadas. Os derivados formados são geralmente extraídos por um solvente orgânico, em regra clorofórmio, no qual os cloroformatos usados como reagentes derivatizantes também são solúveis, e injectados nessa forma. Em nenhum desses trabalhos é feita qualquer referência a problemas daí resultantes, mas foi precisamente esse o problema que acabou por condicionar de forma decisiva o desenvolvimento do nosso trabalho, como será relatado em seguida.

6.3.1.2. Desenvolvimento inicial de uma metodologia para a determinação de aminas em vinhos após derivatização com cloroformato de butilo. Razões do insucesso obtido

Como foi referido no capítulo introdutório à parte experimental, a nossa primeira experiência com o uso de cloroformatos ocorreu durante um estudo sobre a presença de 4-(5-)metilimidazol em caramelos amoniacais, tendo dado lugar a uma proposta metodológica para a determinação do referido composto por GC-MS [Fernandes e Ferreira, 1997]. A ideia de usar um cloroformato como reagente derivatizante teve origem no facto de se tratar de uma das raras classes de reagentes derivatizantes capazes de reagir eficazmente com o átomo de azoto imidazólico, com a vantagem adicional desta reacção se dar na presença de água, o que facilitava o acoplamento ao processo de extracção usado. A aplicação dos princípios desenvolvidos por Husek pareceu-nos interessante pela simplicidade com que o processo de derivatização era descrito: na presença de água, à temperatura ambiente, praticamente instantâneo.

Tendo como base alguns dos princípios teóricos explanados por aquele autor em vários dos seus trabalhos quanto à importância, de acordo com o tipo de compostos a derivatizar, das quantidades relativas de água, acetonitrilo, piridina e do álcool no meio reaccional, o trabalho

experimental então realizado permitiu-nos concluir que num meio reaccional composto por solução aquosa de HCl 0,1 M (50 %), acetonitrilo (25 %), isobutanol (15 %) e piridina (10 %) a reacção de derivatização apresentava um rendimento máximo, sendo o derivado formado facilmente extraído com clorofórmio, após alcalinização do meio, de acordo com a proposta geral apresentada pelo autor [Husek, 1992]. O comportamento cromatográfico do derivado obtido, bem como de outros imidazóis ensaiados para serem usados como padrão interno, apresentou-se muito satisfatório (com a particularidade de dar origem a dois picos, que se concluiu serem resultado da existência de duas formas tautómeras do composto). A precisão dos resultados obtidos foi boa, não se notando aparentemente interferências provenientes da injecção do excesso de reagente derivatizante.

A referência aqui a esse trabalho justifica-se pelo facto de o mesmo ter servido como ponto de partida para o método que se pretendia desenvolver respeitante à determinação dos compostos aminados estudados nesta dissertação. A ambição era a de pegar num modelo de derivatização que apresentava excelentes características nos mais diversos parâmetros, mas que até aí praticamente não tinha sido testado em trabalhos com fins quantitativos, e utilizá-lo com esse fim na determinação de aminas. A versatilidade do processo poderia permitir, numa fase posterior, fazer tentativas no sentido de alargar a simultaneidade da determinação a outros compostos, nomeadamente aminoácidos.

Nesse sentido, foi desenvolvido trabalho experimental com o intuito de verificar a aplicabilidade do processo às diversas aminas potencialmente presentes nos mostos e vinhos em estudo e de, subsequentemente, optimizar as condições de derivatização das mesmas. Foi experimentado o uso de cloroformato de etilo e de cloroformato de isobutilo, foram ensaiadas diferentes condições reaccionais, tendo acabado por concluir-se que:

- O uso de cloroformato de butilo era preferível ao de cloroformato de etilo, devido à volatilidade demasiado elevada apresentada pelos derivados correspondentes às aminas de mais baixa massa molecular; contudo, mesmo com o cloroformato de butilo não era possível a quantificação das duas aminas mais voláteis, metilamina e dimetilamina, dado o facto de não ser possível separar os respectivos picos cromatográficos do pico correspondente ao excesso de reagente.
- As melhores condições reaccionais para a generalidade dos compostos eram as seguintes:

- Adição de 500 μL de HCl 0,1 M contendo as aminas a analisar (nas amostras eram 500 μL do extracto clorídrico obtido no processo de extracção) a 500 μL de uma mistura de acetonitrilo, isobutanol e piridina (50:30:20)
- Adição de 50 μL de cloroformato de isobutilo (correspondente a metade do volume de piridina presente no meio)
- Agitação durante uns breves segundos
- Alcalinização do meio com 1,0 mL de solução de $NaHCO_3$ 1 M
- Extracção com 500 μL de clorofórmio

♦ Não era possível determinar a histamina, a espermidina e a espermina; pese embora ter sido possível verificar a formação dos respectivos derivados, identificados pelos respectivos espectros de massa, o rendimento da reacção para estes compostos apresentou-se muito inferior aos demais e o seu comportamento demasiado irreprodutível para poder usar-se o processo com fins quantitativos. No caso da histamina, curiosamente, verificou-se o aparecimento de dois picos tal como no caso do 4-(5-)metilimidazol, o que, obviamente, tem a ver com a existência das duas estruturas tautómeras características do anel imidazólico

O método assim desenvolvido chegou a ser objecto de duas comunicações em congressos internacionais [Fernandes e Ferreira, 1996, 1998] mas, como foi referido anteriormente, a sua aplicação a amostras e os ensaios de validação efectuados foram acompanhados de manifestações de irreprodutibilidade estranhas, porque imprevisíveis, e que afectavam quase exclusivamente os compostos com menor volatilidade — diaminas e tiramina — enquanto os restantes compostos continuavam a ter um bom comportamento e a originar bons resultados. Após grande volume de trabalho laboratorial e muitas colunas, pré-colunas e "inserts" experimentados decidimos finalmente pôr de lado o desenvolvimento do método e optar pelas soluções analíticas descritas nos capítulos anteriores (significativamente, numa das últimas tentativas feitas, que consistiu no uso de uma coluna com uma fase estacionária diferente de todas as usadas até então – DB 35 MS da J&W Scientific – a coluna, que se apresentou em bom estado aquando do teste inicial, degradou-se imediatamente após a

simples injecção de brancos, nunca tendo permitido a obtenção de qualquer tipo de cromatograma digno desse nome).

Como também já foi referido na parte introdutória, circunstâncias várias fizeram com que apenas passado mais de um ano nos pudéssemos dedicar de novo aos processos de derivatização com cloroformatos, desta vez com maior êxito, mas de uma forma menos inovadora. Depois de um estudo aprofundado da bibliografia existente, nomeadamente no que respeita às formas de eliminação do excesso de cloroformato do meio reaccional, e de algum trabalho preliminar que incluiu algumas tentativas menos bem conseguidas, verificamos que, genericamente, as condições usadas por Lundh e Akesson [1993] na sua proposta atrás referida para a determinação de quatro aminas voláteis, podiam ser usadas com sucesso na determinação não só das aminas mais voláteis como também daquelas que apresentaram problemas no processo inicialmente desenvolvido. Embora se apresente mais complexo no plano da execução laboratorial do que o processo inicialmente desenvolvido, o método apresenta a vantagem, característica dos processos bifásicos, de dispensar a etapa prévia de extracção dos compostos, com as vantagens daí decorrentes.

6.3.1.3. Trabalho experimental realizado para a definição das condições de derivatização usadas

No que respeita ao processo de derivatização, o trabalho de desenvolvimento do método que finalmente veio a ser estabelecido baseado no uso de cloroformato de isobutilo como reagente derivatizante consistiu basicamente na adaptação da proposta de Lundh e Akesson [1993] para a determinação de quatro aminas voláteis em amostras de urina.

Sumariamente, a proposta daqueles autores consistia na adição, para um tubo de 10 mL, de 2 mL de tolueno a 2 mL de amostra (urina no seu caso) a que se seguia a adição de 20 μL de cloroformato de isobutilo, a alcalinização do meio com 2 mL de tampão fosfato 0,5 M a pH 12, e uma agitação durante 10 minutos. Após centrifugação, a fase toluénica era transferida para um segundo tubo idêntico ao primeiro, adicionava-se 1 mL de metanol alcalino e agitava-se durante 5 minutos e, finalmente, adicionava-se 3 mL de solução de NaOH 5 M, agitava-se de novo durante 5 minutos e injectava-se 1 μL da fase toluénica no sistema cromatográfico.

Numa fase inicial, o trabalho executado consistiu basicamente em verificar a possibilidade de adaptação do método ao tipo de compostos em estudo. Tendo em atenção a indisponibilidade de tubos de vidro silanizados com o volume adequado, que a experiência nos mostrara serem essenciais para a obtenção de bons resultados quantitativos quando se trabalha com aminas, os ensaios foram feitas com metade dos volumes indicados. As experiências iniciais foram efectuadas com soluções aquosas contendo as aminas em estudo em concentrações de 1 a 10 mg/L, sendo a detecção feita em modo de varrimento total.

Os resultados obtidos permitiram desde logo confirmar a validade da proposta no que respeita à eliminação do excesso de reagente derivatizante, tendo-se notado o desaparecimento total do pico correspondente ao cloroformato de isobutilo. Este facto permitiu a obtenção de picos perfeitamente separados correspondentes às duas aminas mais voláteis, a metilamina e a dimetilamina, que anteriormente não podiam ser detectadas. Para além disso, foi possível verificar:

a) A possibilidade de fazer a determinação da grande maioria das aminas em estudo, incluindo as diaminas, menos voláteis, que tantos problemas tinham causado com a metodologia anteriormente desenvolvida.

b) Um aumento do rendimento do processo, em relação ao processo por nós anteriormente desenvolvido, para algumas das aminas em estudo, nomeadamente para a dietilamina e para a isopropilamina (este aumento não chegou a ser quantificado, mas a comparação com cromatogramas anteriores não deixou lugar a quaisquer dúvidas).

c) O não aparecimento do pico correspondente à tiramina

d) Um comportamento irregular da histamina.

Não foram efectuadas experiências para a determinação do rendimento da reacção para cada uma das aminas, as quais exigiriam a síntese e purificação de quantidades significativas dos respectivos derivados. Contudo, atendendo aos valores determinados pelos autores suecos para a metilamina, a dimetilamina e a etilamina (superiores a 90 %) e comparando visualmente o tamanho e a área dos picos obtidos em varrimento total para estes compostos e para os restantes concluiu-se, com alguma segurança, que o rendimento seria da mesma ordem de grandeza para a generalidade das aminas mais voláteis e ligeiramente inferior (5 a 10 % para as menos voláteis).

Tendo em atenção os bons resultados obtidos nas experiências iniciais, logo confirmados por experiências posteriores em que se usou, em vez de água, as matrizes artificiais simulando vinho do Porto já referidas nos capítulos anteriores, foram poucas as alterações introduzidas no processo tal como acima descrito. Basicamente, optimizou-se:

a) a quantidade de reagente derivatizante a usar, tendo-se concluído por aumentar a quantidade proposta, 10 μL, para 25 μL, o que permitiu ligeiros aumentos das áreas dos picos correspondentes a algumas das aminas menos voláteis (putrescina, p. ex.).

b) a molaridade e a quantidade da solução de NaOH usada no final do processo para repor uma correcta separação entre a fase aquosa e fase toluénica (que na presença de metanol alcalino formam uma mistura esbranquiçada na qual é impossível qualquer distinção entre fases), tendo-se optado por manter a proposta original, dado ser a que melhores resultados proporcionou.

A ausência nos cromatogramas obtidos dos picos correspondentes à tiramina, ao respectivo padrão interno, hidroxianfetamina, e à histamina (neste caso era visível a presença de vestígios do composto bem como do respectivo análogo deuterado) foi por nós ponderada de duas diferentes formas: ou os compostos não eram derivatizados nas condições de ensaio devido ao pH usado, fortemente alcalino, o que no caso dos dois primeiros compostos estava de acordo com algumas indicações da literatura respeitantes à reacção do grupo fenólico com os cloroformatos; ou, alternativamente, os derivados formados eram destruídos durante o tratamento com metanol alcalino a que a solução era sujeita para a eliminação do excesso de cloroformato. A questão foi esclarecida no resultado da injecção de uma solução toluénica contendo os derivados, não sujeita ao referido tratamento com metanol alcalino: juntamente com todas as outras aminas estudadas (com excepção da metilamina e da dimetilamina, tornadas "invisíveis" pela presença do excesso de derivatizante) eram visíveis picos perfeitamente definidos, de tamanho idêntico ao da generalidade das outras aminas, correspondentes à tiramina e à hidroxianfetamina; no caso da histamina, os picos obtidos foram significativamente mais pequenos, sendo dois correspondentes ao composto e dois correspondentes ao respectivo análogo deuterado, o que tem justificação, como já foi referido, na estrutura tautomérica do anel imidazólico.

Deste facto surgiu a ideia de aproveitar uma pequena porção da fase toluénica, submetê-la a evaporação em corrente de azoto (um dos processos mencionados na literatura para remoção do excesso de cloroformato quando se pretende analisar compostos pouco voláteis), retomá-la com um solvente orgânico, no caso o próprio tolueno que se revelou eficaz para o papel, e, numa segunda série de injecções, fazer a determinação da tiramina e da histamina. Este segundo processo apresentou-se excelente para a determinação da tiramina, apresentando nomeadamente:

a) picos cromatográficos de excelente qualidade, tanto para o composto como para a hidroxianfetamina, usada como padrão interno.

b) muito boa reprodutibilidade, mesmo em termos absolutos (grande regularidade nos valores de área correspondentes ao padrão interno, correspondentes, como é sabido, a uma quantidade sempre igual de composto).

c) muito bons níveis de linearidade.

Já no que respeita à determinação da histamina, o processo apresentou algumas debilidades, que fizeram com que finalmente não considerássemos os resultados obtidos para aquele composto na aplicação do processo a amostras. O problema reside, em princípio, na falta de estabilidade do(s) derivado(s), o que já anteriormente tinha levado alguns autores a desistirem da sua utilização e a promover um processo de derivatização adicional. Contudo, atendendo ao facto de o isótopo deuterado da histamina apresentar um comportamento rigorosamente igual, logo ser um excelente padrão interno para o caso em questão, tivemos durante algum tempo a sensação de que seria possível a quantificação do composto. Esta ideia alicerçou-se no facto de, independentemente de variações maiores do que o normal na área do padrão interno, ser possível obter níveis de linearidade muito bons quando da aplicação do método às matrizes de "vinho artificial" usadas para a construção das curvas de calibração. Inclusivamente, a aplicação do método mostrou-se perfeitamente possível durante um trabalho executado em simultâneo com amostras de cerveja, para as quais os resultados obtidos referentes ao teor de histamina se apresentaram muito bem correlacionados com os obtidos anteriormente pela aplicação às mesmas amostras do método descrito no capítulo anterior [Fernandes *et al.*, 2001]. Em amostras de vinhos, contudo, o método mostrou-se pouco eficaz, acontecendo que,

nalgumas amostras, pura e simplesmente apenas aparecessem picos vestigiais não só do composto como do padrão interno, pese embora este estar numa concentração de 1 mg/L.

Uma outra característica menos positiva desta metodologia alternativa usada para a quantificação da tiramina teve a ver com o facto de a evaporação não se ter mostrado como um processo totalmente eficaz para a remoção de excesso de cloroformato de isobutilo, mesmo quando executada a 80 °C. Por esse motivo, era sempre possível visualizar nos cromatogramas obtidos um pequeno pico correspondente ao composto, embora não se tenham notado quaisquer alterações no comportamento das colunas cromatográficas, característicos, como vimos, da acção deletéria do reagente.

A última fase de desenvolvimento do processo consistiu em confirmar a possibilidade de efectuar a reacção de derivatização directamente sobre as amostras, como preconizado pelos autores (para amostras de urina) ou, em alternativa, verificar se era conveniente continuar a usar o processo de extracção já testado nos outros métodos por nós desenvolvidos. Para o efeito compararam-se os resultados obtidos em 3 amostras de vinhos, aplicando-se o processo de derivatização directamente sobre as amostras e sobre os extractos hidroclorídricos obtidos após sujeição das mesmas amostras ao referido processo extractivo.

Não foram observadas grandes diferenças entre os dois tipos de procedimento, nomeadamente no que respeita à presença de interferentes impeditivos de uma correcta quantificação das aminas em estudo, pelo que se concluiu ser desnecessária a etapa correspondente ao referido processo extractivo, com as consequentes vantagens em termos de tempo e de labor experimental. O único problema digno de registo teve a ver com uma certa dificuldade na separação das duas fases no final do processo de derivatização, mesmo após centrifugação, devido à formação de uma película de partículas sólidas na zona de interfase, mais nítida no caso de amostras de vinhos com cor carregada e nalguns mostos; a solução encontrada, quase sempre com êxito, consistiu na destruição da referida partícula com uma pequena espátula, seguida de mais uns minutos de centrifugação. Verificou-se também que com o uso de volumes maiores de cada uma das fases o problema assumia muito menos gravidade, mas a solução acabou por não poder ser adoptada em tempo útil devido à já referida ausência de tubos apropriados.

6.3.2. Processo cromatográfico

6.3.2.1. Escolha dos padrões internos

Como salientado nos dois capítulos precedentes, a escolha adequada de padrões internos, capazes de apresentarem um comportamento similar ao dos analitos durante as várias etapas do processo analítico, constitui uma exigência fundamental quando se pretende desenvolver e implementar metodologias cromatográficas multi-paramétricas aplicadas a matrizes complexas. Como também já foi amplamente referido e discutido, nos métodos baseados na técnica de GC-MS os padrões internos mais efectivos correspondem a análogos isotopicamente marcados e estáveis das substâncias a analisar.

Na escolha dos padrões internos usados neste método, foi naturalmente importante a experiência que entretanto tinha sido adquirida na análise de aminas biogénicas, pelo que as opções tomadas apareceram de forma natural.

Assim, para a generalidade das monoaminas alifáticas em estudo usou-se como padrão interno a heptilamina, composto reconhecidamente ausente nas amostras em estudo, e com um comportamento químico e cromatográfico semelhante; a hexilamina poderia constituir uma possível alternativa, talvez melhor por apresentar uma volatilidade ligeiramente maior (tempos de retenção mais semelhantes aos das aminas a quantificar), não tendo sido usada apenas pelo facto de haver umas vagas referências à sua presença em vinhos.

Desde as primeiras experiências verificou-se que a efectividade da heptilamina como padrão interno para as quatro aminas mais voláteis (metilamina, dimetilamina, etilamina e dietilamina) não era a mais conveniente, muito provavelmente devido à diferença de comportamento durante o processo de injecção em "splitless", provocada pela grande diferença de volatilidade. Face à dificuldade de encontrar compostos com um comportamento idêntico que pudessem ser usados, optou-se pelo uso de isótopos deuterados. Do uso de um único composto deste tipo ao uso de quatro, um para cada amina em estudo, várias hipóteses se colocavam. A opção acabou por recair na utilização da [$^2H_3$]metilamina, usada para a monitorização da metilamina e da dimetilamina, e da [$^2H_5$]etilamina, usada para monitorizar a etilamina e a dietilamina. Os resultados verificados ao longo da aplicação do método às amostras acabaram por mostrar que os resultados obtidos com um ou outro destes

padrões internos eram muito idênticos (em ambos os casos de muito boa qualidade) pelo que bastaria o uso de apenas um deles.

A opção pela anfetamina, para a monitorização da 2-feniletilamina, e pelo isótopo deuterado da putrescina, [$^2H_8$]putrescina, para a monitorização das diversas diaminas teve as mesmas motivações já descritas no capítulo 4, a propósito do método desenvolvido com o uso de anidrido heptafluorobutírico como agente derivatizante. O mesmo se pode dizer do uso de [α,α,β,β-$^2H_4$]--histamina como padrão interno para a quantificação de histamina.

Finalmente, optou-se, com bons resultados, por usar-se um isótopo deuterado da pirrolidina, a [$^2H_8$]pirrolidina, na monitorização não só da pirrolidina como também dos outros compostos heterocíclicos ensaiados, piperidina e morfolina, estruturalmente diferentes de todos os outros compostos em estudo, e usou-se a hidroxianfetamina como padrão interno da tiramina, o que se revelou também uma escolha bastante acertada, a qual, como então referimos, deveria ter sido também usada no método descrito no capítulo 4.

Ao contrário do que possa aparentemente parecer numa abordagem imediatista da questão, o uso de muitos padrões internos não causa transtornos de maior na execução laboratorial de trabalhos de quantificação multiparamétricos, do género do aqui descrito. Pelo contrário, a experiência entretanto adquirida leva-nos a pensar ser esta a opção mais válida sempre que se enfrentam problemas analíticos de alguma complexidade, e a única forma de se evitar erros grosseiros nos resultados apresentados, porventura mais comuns do que aquilo que seria desejável. Este processo de controlo passa também pela adopção de esquemas de trabalho bem definidos. Para além da execução do trabalho em "séries", já amplamente referida, podemos referir, a título de exemplo, o facto da adição dos padrões internos às amostras e às soluções usadas como padrões dever ser feita simultaneamente e usando as mesmas pipetas para a medição dos volumes em questão, e o facto de nunca se dever usar soluções contendo todos os padrões internos mas sim soluções contendo apenas dois ou três destes compostos, de forma a que qualquer erro casual de medição possa ser facilmente detectado. A utilização de folhas de cálculo em que facilmente se comparam os resultados obtidos com o uso de um ou outro dos padrões internos usados constitui, além disso, um meio eficaz de detectar e identificar precocemente erros que possam ter ocorrido durante a execução laboratorial do método, desde a toma da amostra a analisar até à integração das áreas correspondentes aos picos de interesse.

6.3.2.2. Condições operatórias

Tal como é amplamente salientado pelos autores com trabalhos nesta área, os carbamatos obtidos pela reacção de aminas com cloroformatos — cloroformato de isobutilo neste caso — apresentam, regra geral, boas propriedades cromatográficas, dando lugar ao aparecimento de picos cromatográficos bem definidos e com elevado grau de simetria. Isso mesmo foi por nós demonstrado durante a realização deste trabalho.

Durante o desenvolvimento do método e a respectiva aplicação às amostras foram experimentadas duas colunas com diferente polaridade: DB 5 MS e DB 1701. Ambas se mostraram adequadas para a separação dos compostos, sem que nenhuma delas tenha apresentado qualquer vantagem relevante sobre a outra. A diferença mais significativa consistiu na troca da ordem de eluição de alguns compostos (amilamina e piperidina, mais concretamente), ou em pequenas alterações nos tempos de retenção relativos de alguns compostos: por exemplo, na coluna DB 1701 é possível uma separação quase completa da 2-feniletilamina e do respectivo padrão interno anfetamina ($TR_{2\text{-FEA}}$ 9,03 min e TR_{Anf} 8,94 min, com um dos programas de temperatura usados e $TR_{2\text{-FEA}}$ 13,75 min e TR_{Anf} 13,67 min com outro programa de temperatura) enquanto na coluna DB 5 MS os picos são praticamente coincidentes ($TR_{2\text{-FEA}}$ 10,39 min e TR_{Anf} 10,38 min ou $TR_{2\text{-FEA}}$ 13,49 min e TR_{Anf} 13,48 min). Neste como noutros casos semelhantes é naturalmente necessária uma grande atenção na escolha dos valores de massa usados para a integração dos picos, tendo em atenção a possível presença de fragmentos comuns a ambas as substâncias.

Uma das características mais vantajosas do uso do espectrómetro de massa como detector reside, como é do conhecimento geral, na possibilidade de quantificar (integrar) picos sobrepostos de uma forma perfeitamente correcta, desde que os mesmos apresentem no seu espectro de massa fragmentos específicos com massas diferentes. Essa é a situação dos análogos isotópicos, cujo tempo de retenção é praticamente coincidente com o do composto original que se pretende quantificar: desde que a diferença de massas seja suficientemente alargada, de forma a evitar a interferência dos usuais fragmentos M^{+1} e M^{+2}, característicos dos compostos carbonados, é possível obter cromatogramas de massa com picos perfeitamente bem definidos sem qualquer interferência causada pela sobreponibilidade dos dois compostos.

Quando os picos total ou parcialmente sobrepostos correspondem a compostos diferentes sem qualquer relação entre si, a possibilidade da sua correcta integração está dependente, como se disse em cima, da presença nos respectivos espectros de massa de fragmentos específicos para cada um dos compostos, de modo a que os respectivos cromatogramas de massa não apresentem qualquer tipo de interferência resultante da presença dos compostos adjacentes. O problema agrava-se, naturalmente, nas amostras dada a complexidade das mesmas, logo a potencial presença de dezenas ou até centenas de compostos interferentes.

Por este motivos, a escolha dos fragmentos usados para a quantificação dos compostos baseou-se, como se pôde observar na Tabela 6.3, principalmente na sua especificidade e menos na sua intensidade no respectivo espectro de massa. Por esse motivo, em alguns casos o ião escolhido foi o correspondente ao ião molecular pese embora a sua fraca intensidade relativa no espectro do composto. Este facto não provocou grandes problemas em termos de sensibilidade, dado os níveis mesmo assim atingidos terem sido perfeitamente suficientes para os teores geralmente encontrados.

Tal como no método referido no capítulo 4, a detecção dos compostos foi feita por monitorização selectiva de iões, tendo-se usado neste caso cinco grupos distintos de iões, diferidos no tempo, de acordo com o referido na Tabela 6.1. O critério usado foi basicamente o de usar 3 ou 4 iões característicos de cada composto (no caso dos menos importantes, tentando maximizar o uso de iões comuns a mais do que um composto) e de constituir grupos homogéneos em termos de número de iões (cerca de 10), de forma a manter elevados níveis de sensibilidade. No caso do método usado para a quantificação da tiramina, usou-se apenas um grupo constituído por 10 iões (Tabela 6.2), suficientes para caracterizar a presença não só da tiramina e do respectivo padrão interno, hidroxianfetamina, como também da histamina e do seu isótopo tetradeuterado, pese embora os resultados obtidos para a histamina tenham acabado por ser rejeitados, pelos motivos já apontados.

Nas Figuras 6.1 a 6.28 são apresentados cromatogramas obtidos na análise de soluções de calibração correspondentes a uma concentração de cada amina de 100 μg/L. Como as soluções de calibração preparadas não apresentavam igual concentração de cada amina, são apresentados dois cromatogramas iónicos totais (Figura 6.1 e Figura 6.2) e os cromatogramas de massa usados para a quantificação, retirados de um dos dois cromatogramas totais apresentados (Figuras 6.3 a 6.26). Nas Figuras 6.27 e 6.28 são apresentados cromatograma de massa correspondentes a uma solução de calibração com 100 μg/L de tiramina.

A apresentação gráfica destes cromatogramas, embora discutível por se tratar de soluções de calibração e não de amostras reais, pareceu-nos importante não só para se poderem observar os picos correspondentes a compostos que se mostraram inexistentes nas amostras analisadas mas também para fornecer uma ideia visual (que nos parece importante de acordo com o velho princípio de que uma imagem vale mil palavras ou, neste caso, mil números) do limite de detecção do método para cada composto, cuja ordem de grandeza é possível extrapolar pela observação dos referidos cromatogramas.

Nas Figuras 6.29 a 6.44 são apresentados o cromatograma iónico total e os respectivos cromatogramas de massa usados para fins quantitativos (apenas das aminas encontradas e dos padrões internos) de uma amostra de um vinho do Porto. Finalmente, nas Figuras 6.45 e 6.47 são apresentados o cromatograma iónico total e os cromatogramas de massa usado para fins quantitativos respeitantes à determinação de tiramina numa outra amostra de vinho do Porto.

De um modo geral, é notória a boa qualidade cromatográfica proporcionada pelos derivados isobutoxicarbonílicos (carbamatos) obtidos. É de salientar a boa qualidade dos cromatogramas de massa obtidos a partir de pares de compostos mal resolvidos, logo com tempos de retenção muito idênticos, como é o caso das aminas em que se usou o respectivo isótopo deuterado como padrão interno e também do quarteto formado pela 2-metilbutilamina, isoamilamina, pirrolidina e [$^{2}H_{8}$]pirrolidina. Nestes casos, tornam-se evidentes as vantagens associadas ao uso de um detector com as características de selectividade do detector de massa. Com outro detector tornar-se-ia impossível uma correcta quantificação dos referidos compostos.

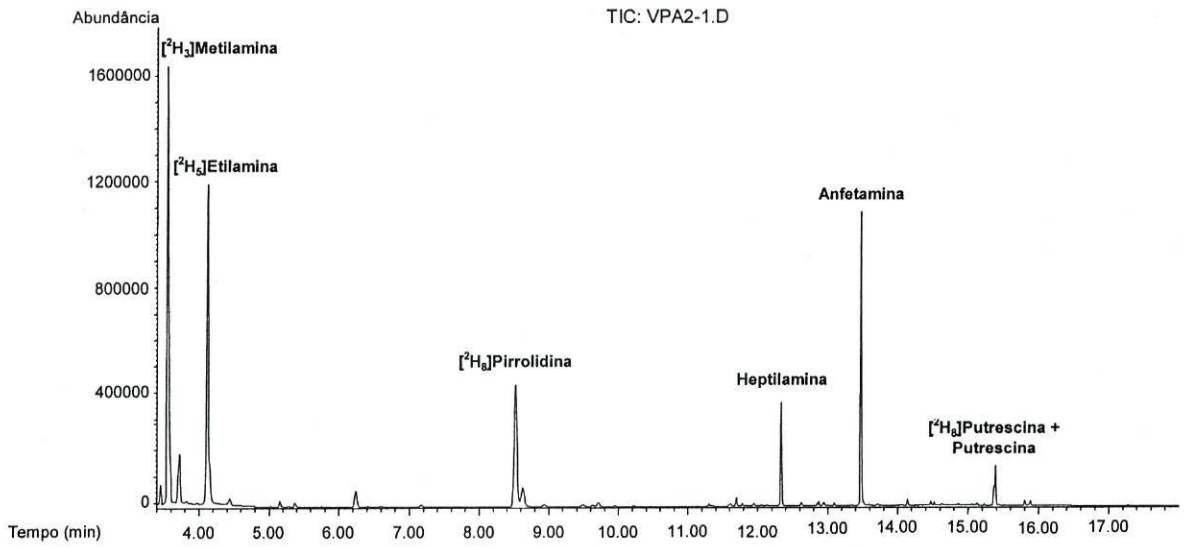


Figura 6.1. Cromatograma iónico total* obtido nas condições usadas para a quantificação dos compostos (monitorização selectiva de cinco diferentes grupos de iões) correspondente a uma solução de calibração contendo todas as aminas em estudo nas seguintes concentrações - putrescina: 0,500 mg/L; metilamina, dimetilamina, etilamina, isoamilamina, pirrolidina, cadaverina e 2-feniletilamina: 0,100 mg/L; restantes aminas: 0,025 mg/L).

Os padrões internos usados foram adicionados à solução de calibração na concentração de 1,0 mg/L: PI 1 - [$^2H_3$]metilamina; PI 2 - [$^2H_5$]etilamina; PI 3 - [$^2H_8$]pirrolidina; PI 4 - heptilamina; PI 5 - anfetamina; PI 6 - [$^2H_8$]putrescina.

*Deste cromatograma foram extraídos os cromatogramas de massa (ou cromatogramas iónicos reconstruídos) que se apresentam nas Figuras 6.3, 6.4, 6.5, 6.10, 6.11, 6.16 e 6.19 (aminas presentes numa concentração de 0,1 mg/L).

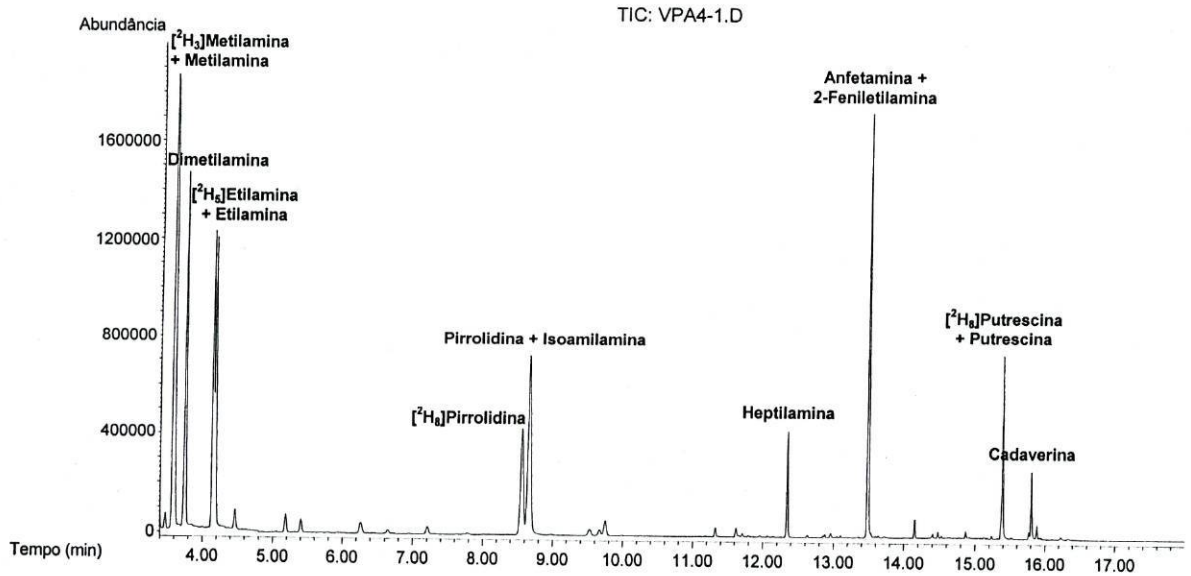


Figura 6.2. Cromatograma iónico total* obtido nas condições usadas para a quantificação dos compostos (monitorização selectiva de cinco diferentes grupos de iões) correspondente a uma solução de calibração contendo todas as aminas em estudo nas seguintes concentrações - putrescina: 2,500 mg/L; metilamina, dimetilamina, etilamina, isoamilamina, pirrolidina, cadaverina e 2-feniletilamina: 1,000 mg/L; restantes aminas: 0,100 mg/L).

Os padrões internos usados foram adicionados à solução de calibração na concentração de 1,0 mg/L: PI 1 - [²H₃]metilamina; PI 2 - [²H₅]etilamina; PI 3 - [²H₈]pirrolidina; PI 4 - heptilamina; PI 5 - anfetamina; PI 6 - [²H₈]putrescina.

*Deste cromatograma foram extraídos os cromatogramas de massa (ou cromatogramas iónicos reconstruídos) que se apresentam nas Figuras 6.6 6.7, 6.8, 6.9, 6.12, 6.13, 6.14, 6.15, 6.17 e 6.20 (aminas presentes numa concentração de 0,1 mg/L).

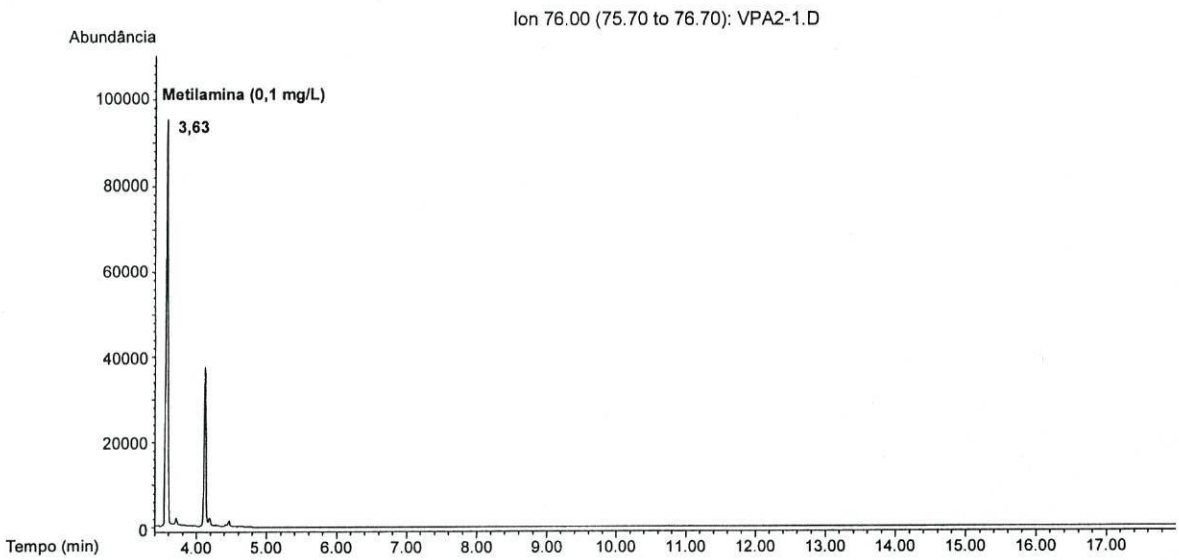


Figura 6.3. Cromatograma de massa do ião *m/z* 76, usado para a quantificação da metilamina.

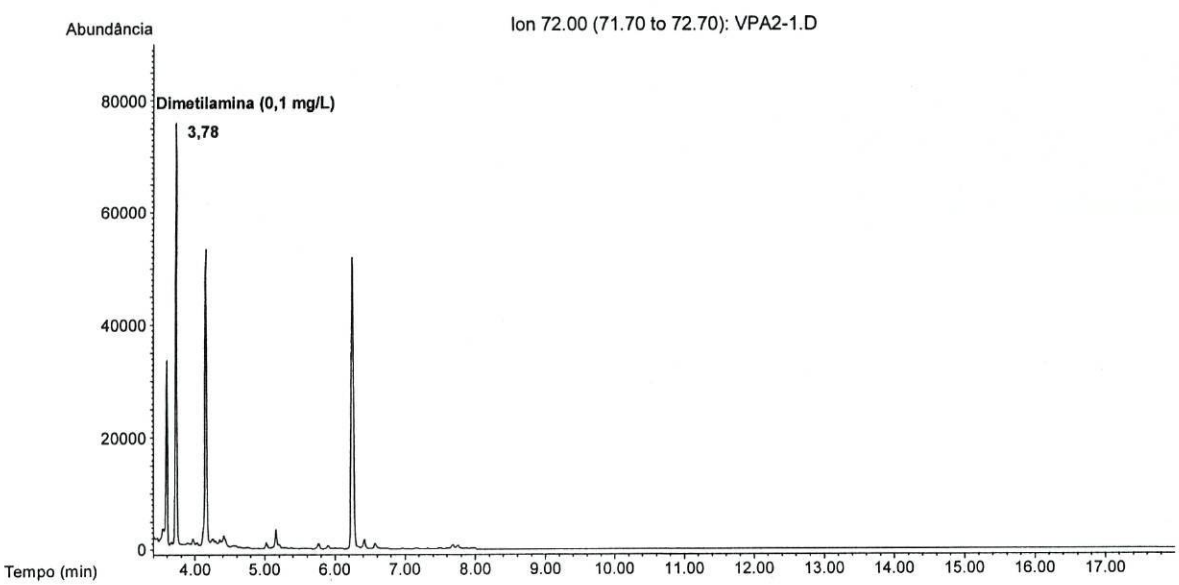


Figura 6.4. Cromatograma de massa do ião *m/z* 72, usado para a quantificação da dimetilamina.

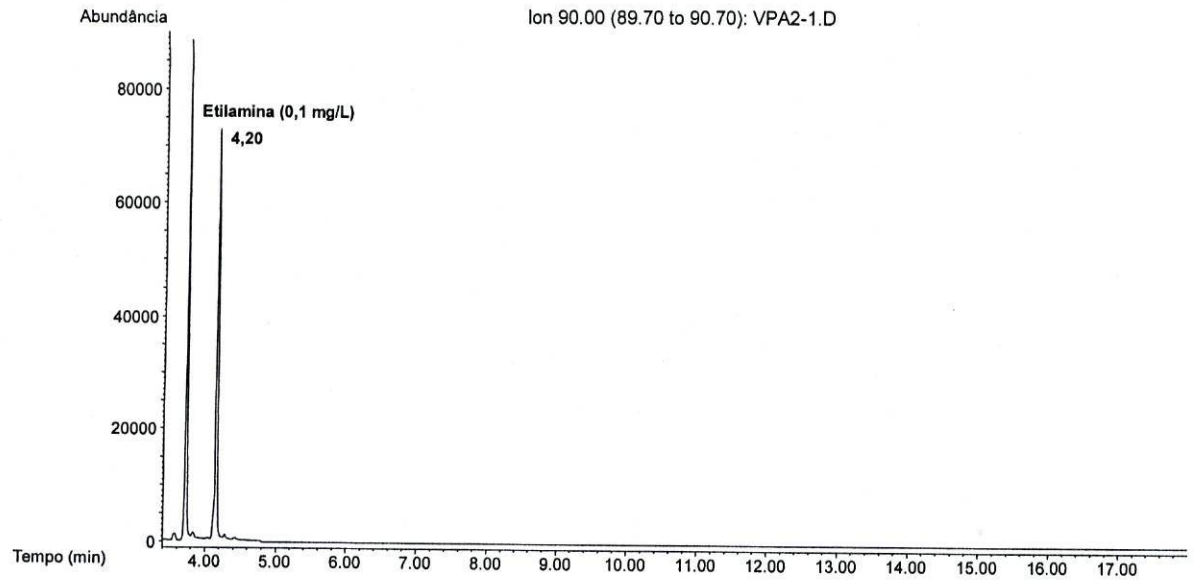


Figura 6.5. Cromatograma de massa do ião *m/z* 90, usado para a quantificação da etilamina.

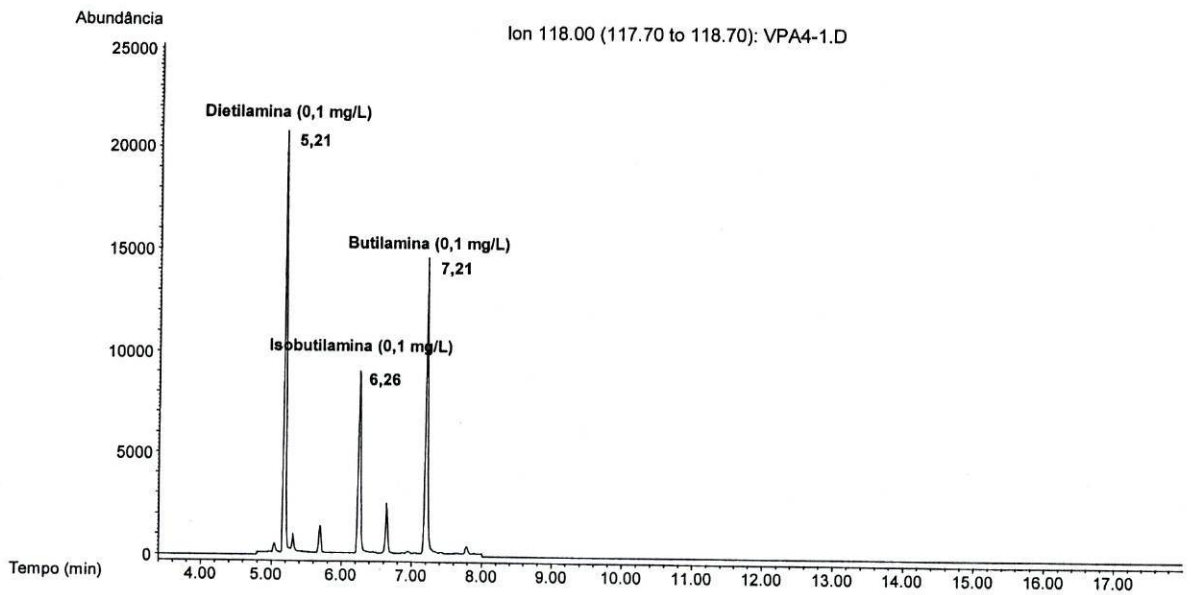


Figura 6.6. Cromatograma de massa do ião *m/z* 118, usado para a quantificação da dietilamina, da isobutilamina e da butilamina.

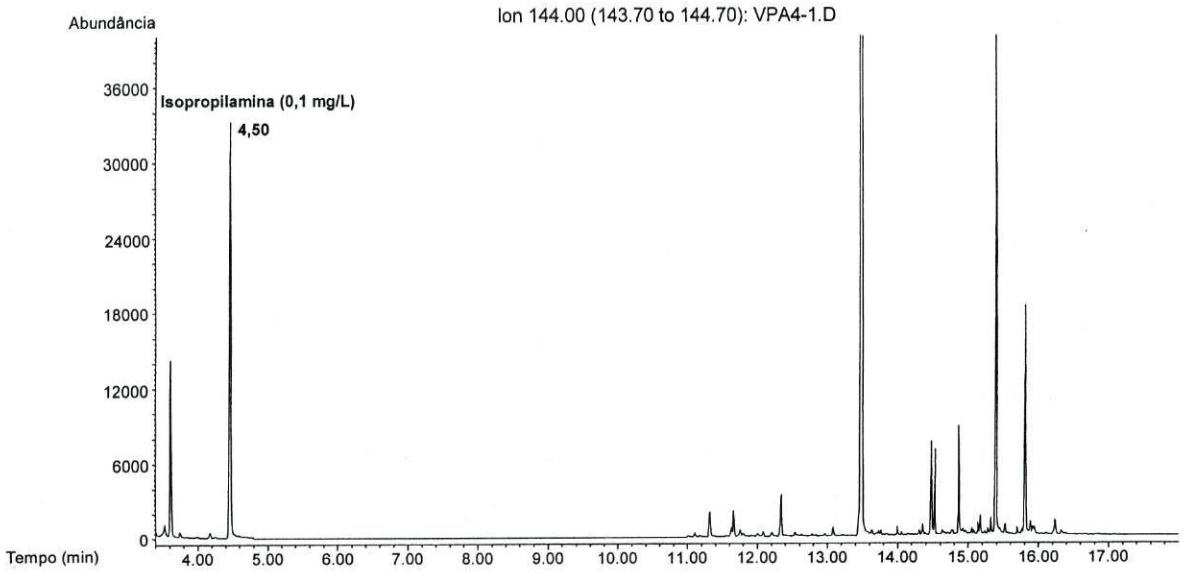


Figura 6.7. Cromatograma de massa do ião *m/z* 144, usado para a quantificação da isopropilamina.

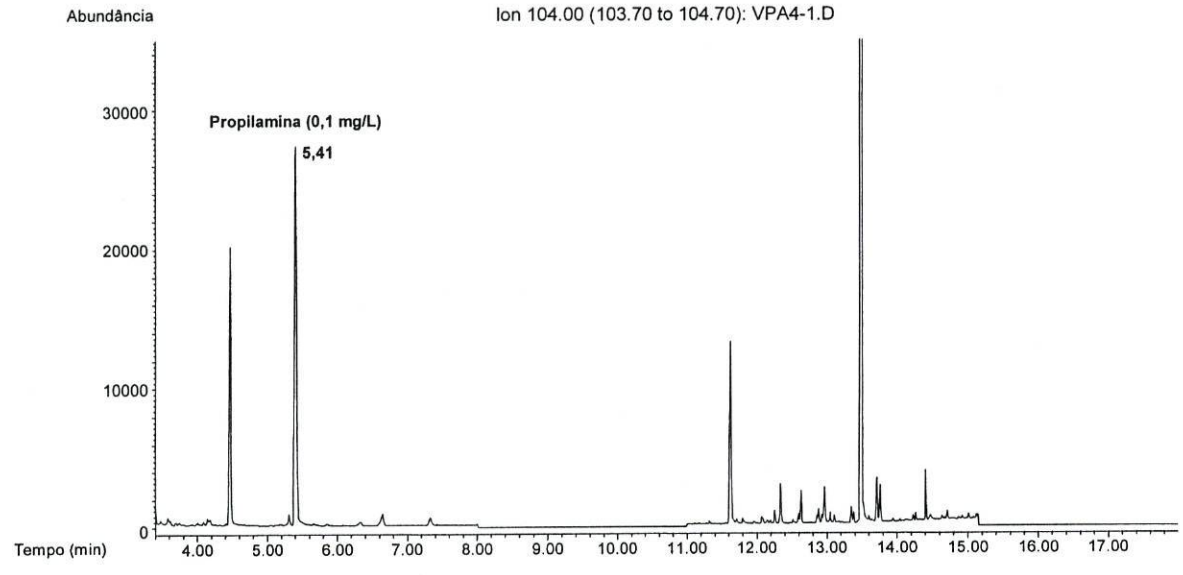


Figura 6.8. Cromatograma de massa do ião *m/z* 104, usado para a quantificação da propilamina.

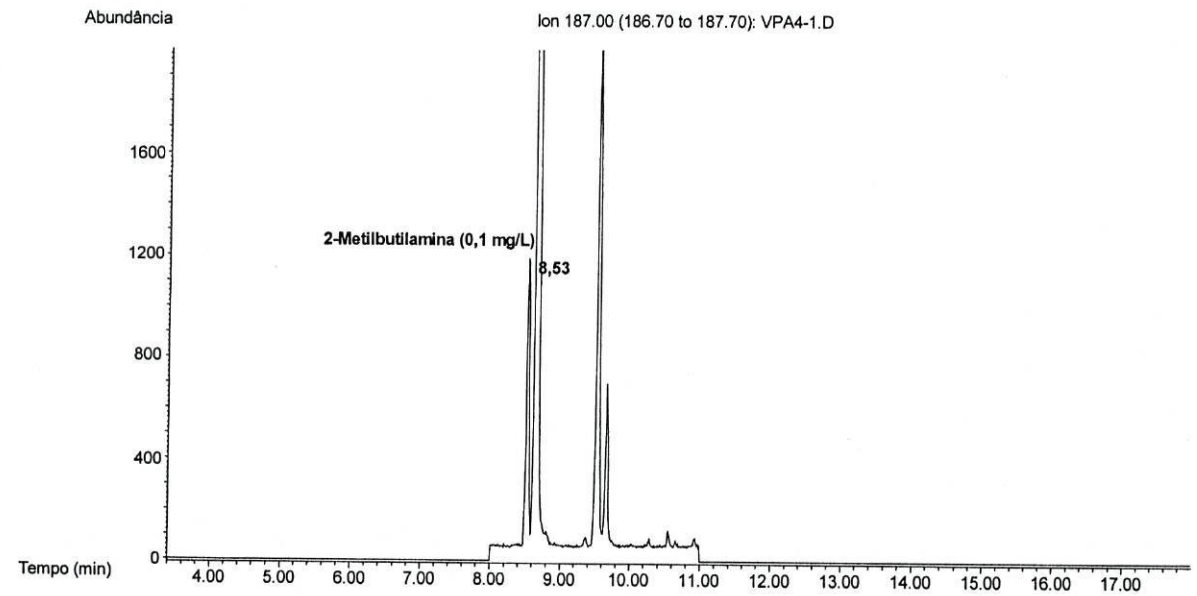


Figura 6.9. Cromatograma de massa do ião *m/z* 187, usado para a quantificação da 2-metilbutilamina.

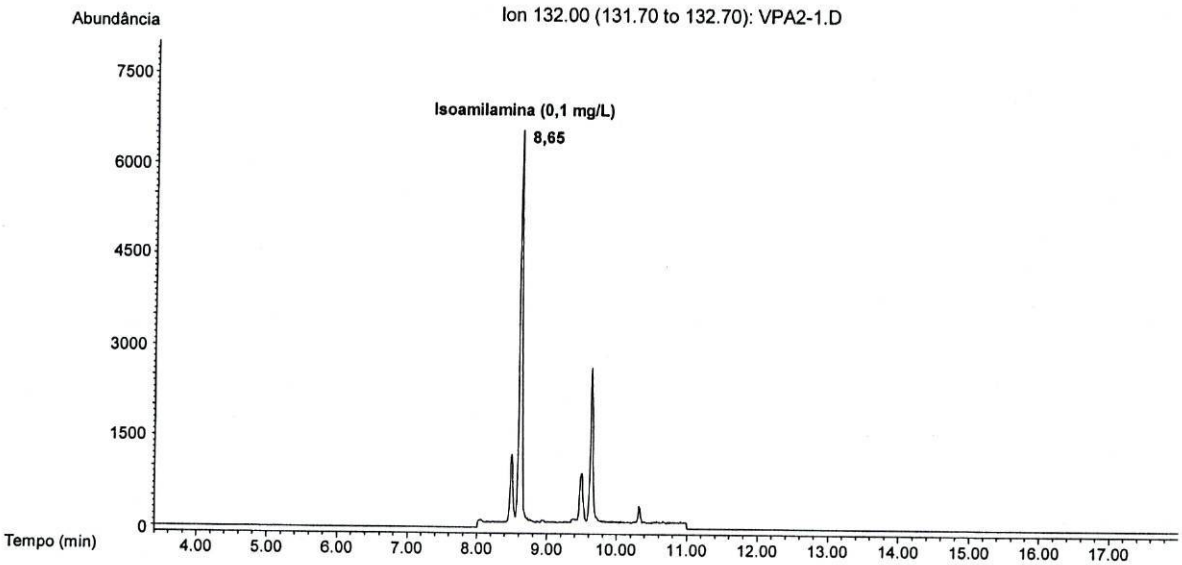


Figura 6.10. Cromatograma de massa do ião *m/z* 132, usado para a quantificação da isoamilamina.

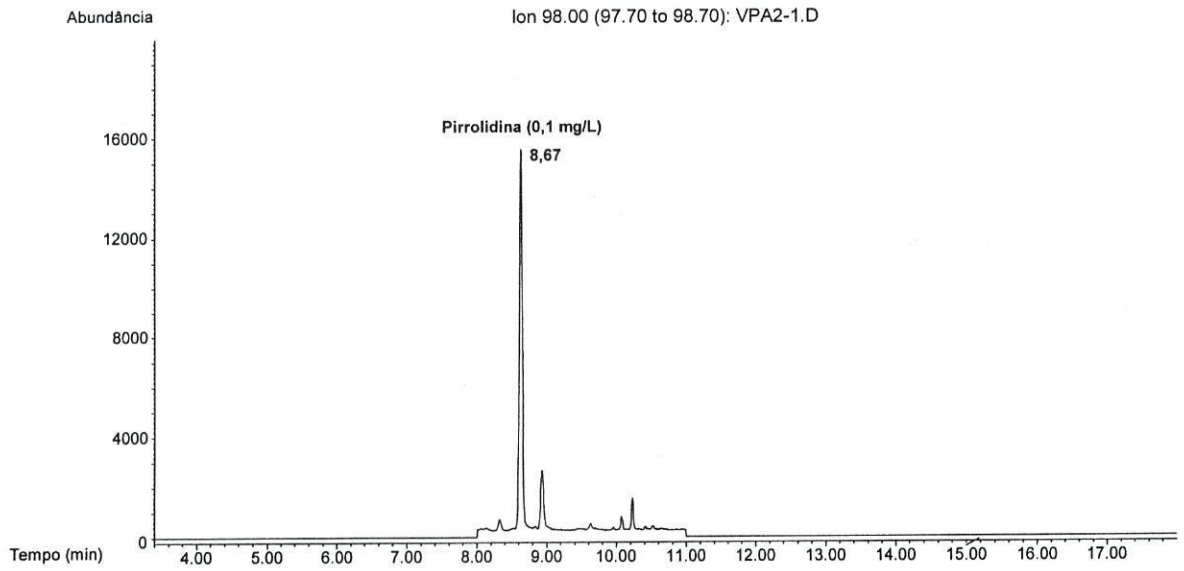


Figura 6.11. Cromatograma de massa do ião *m/z* 98, usado para a quantificação da pirrolidina.

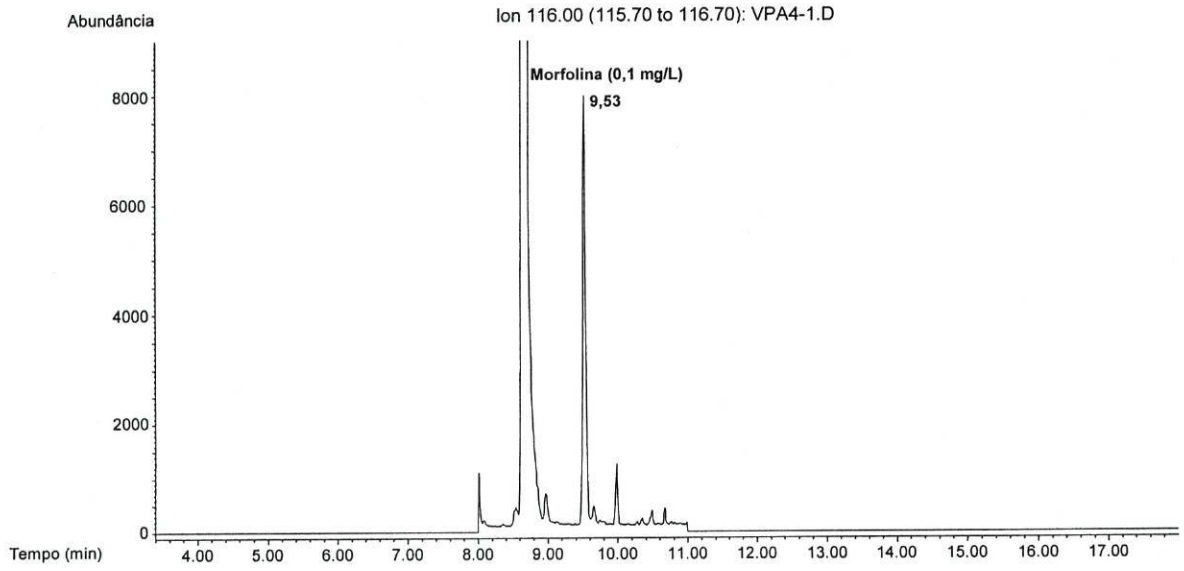


Figura 6.12. Cromatograma de massa do ião *m/z* 116, usado para a quantificação da morfolina.

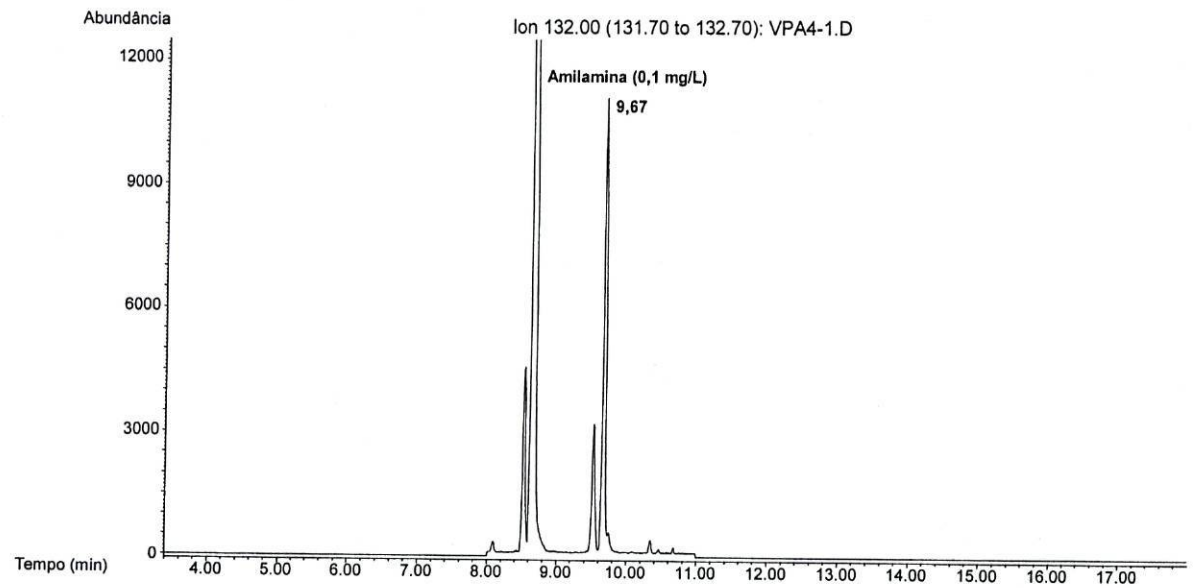


Figura 6.13. Cromatograma de massa do ião *m/z* 132, usado para a quantificação da amilamina.

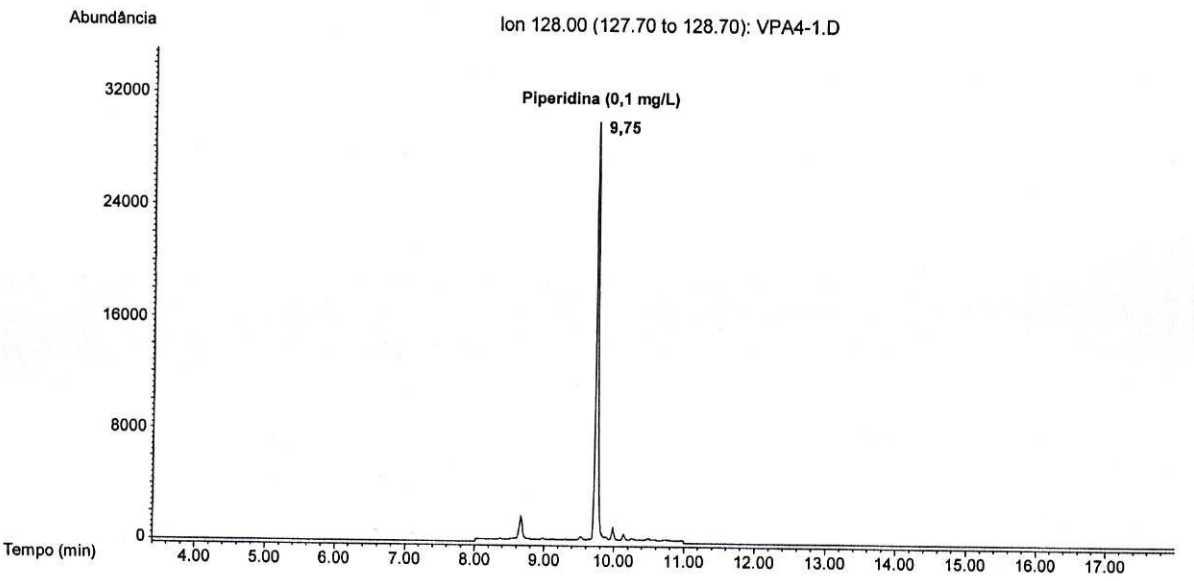


Figura 6.14. Cromatograma de massa do ião *m/z* 128, usado para a quantificação da piperidina.

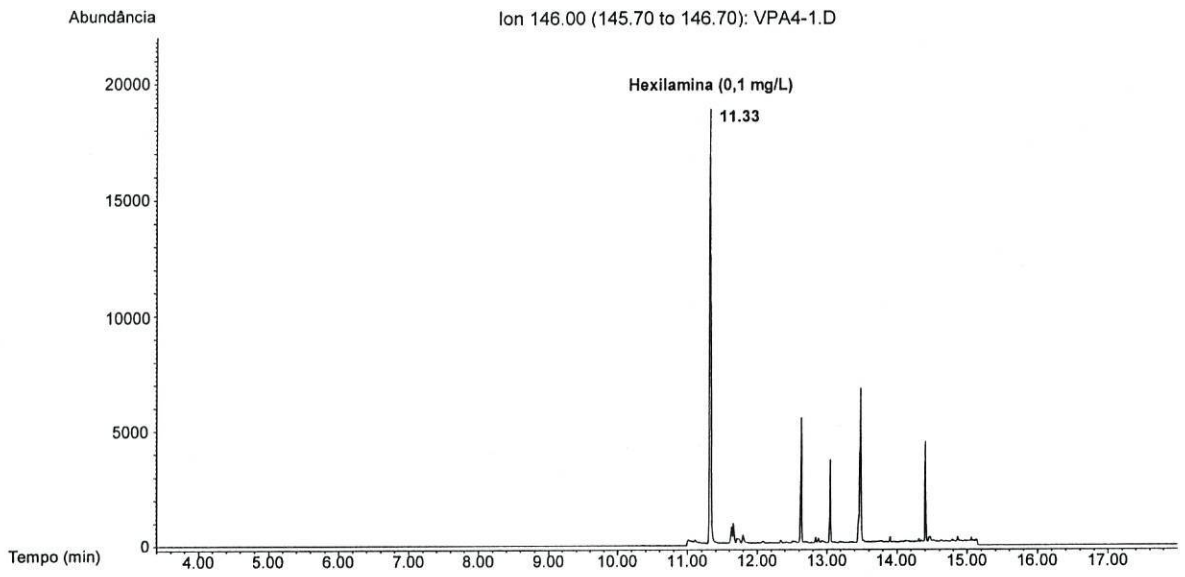


Figura 6.15. Cromatograma de massa do ião *m/z* 146, usado para a quantificação da hexilamina.

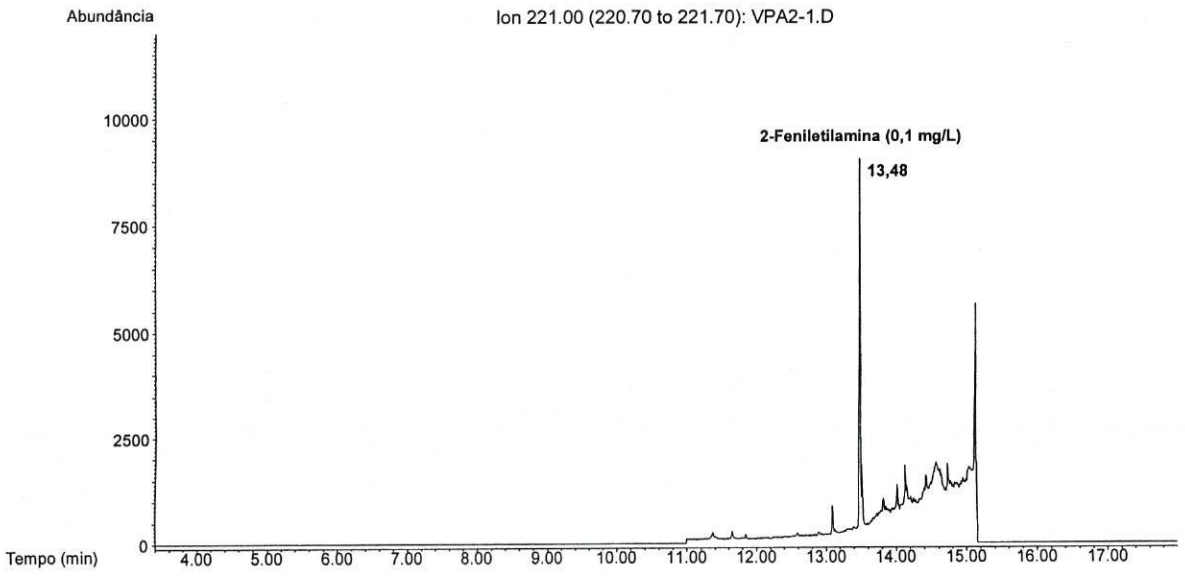


Figura 6.16. Cromatograma de massa do ião *m/z* 221, usado para a quantificação da 2-feniletilamina.

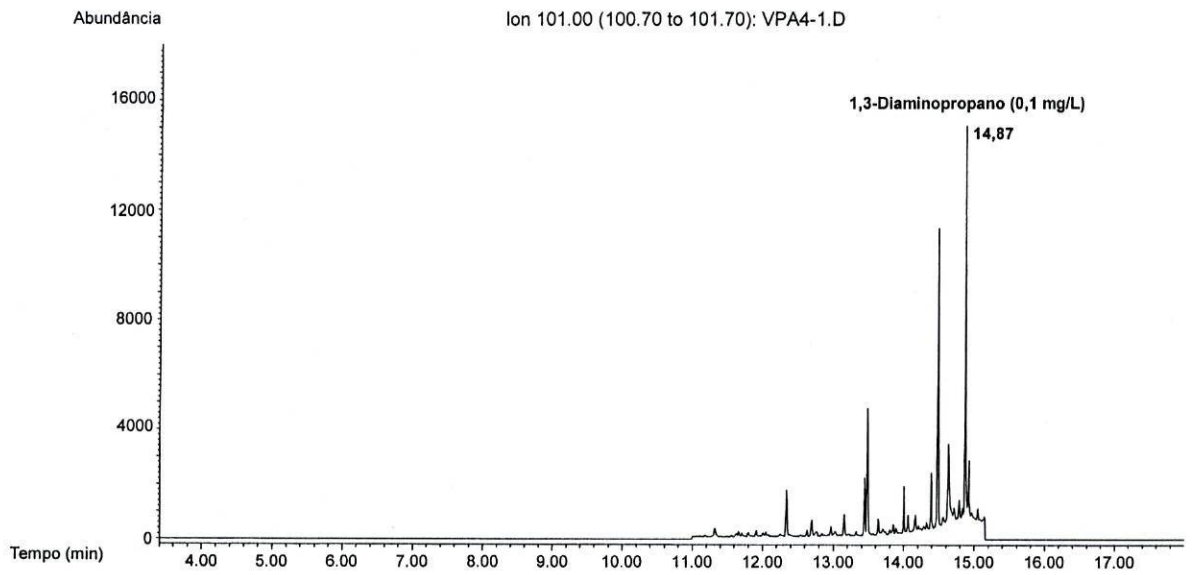


Figura 6.17. Cromatograma de massa do ião *m/z* 101, usado para a quantificação do 1,3-diaminopropano.

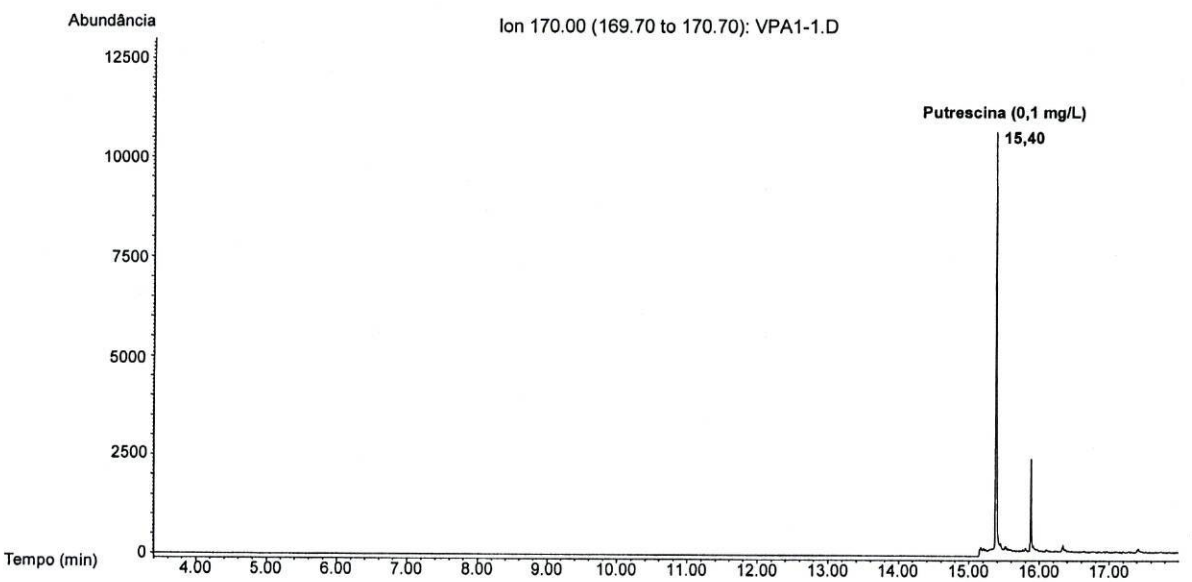


Figura 6.18. Cromatograma de massa do ião *m/z* 170, usado para a quantificação da putrescina (este cromatograma corresponde a uma solução de calibração com 0,100 mg/L de putrescina e 0,010 ou 0,025 mg/L das outras aminas).

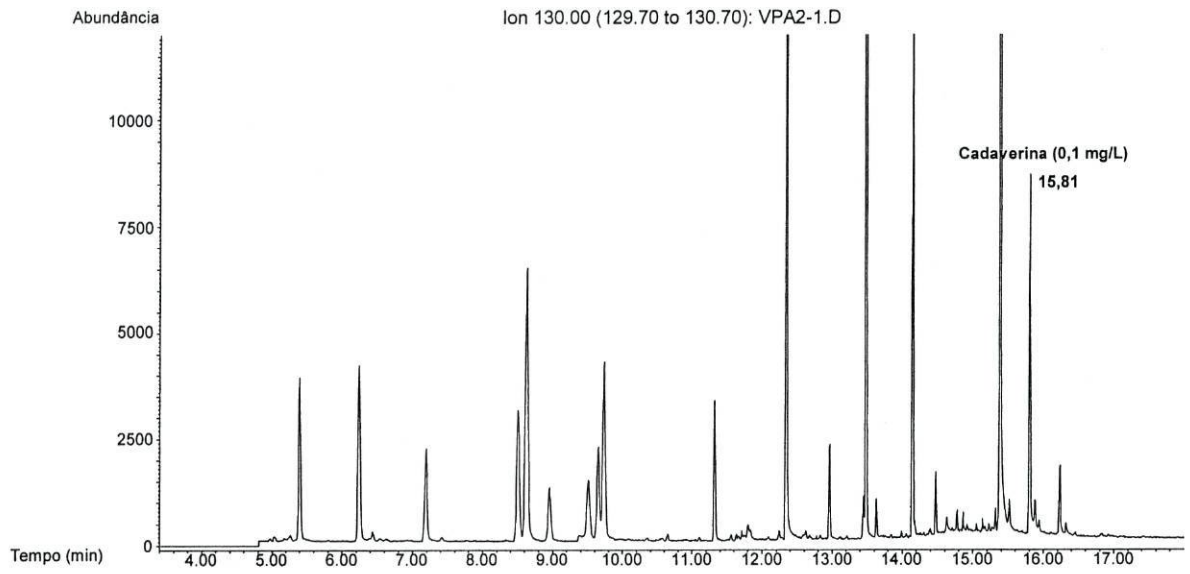


Figura 6.19. Cromatograma de massa do ião *m/z* 130, usado para a quantificação da cadaverina.

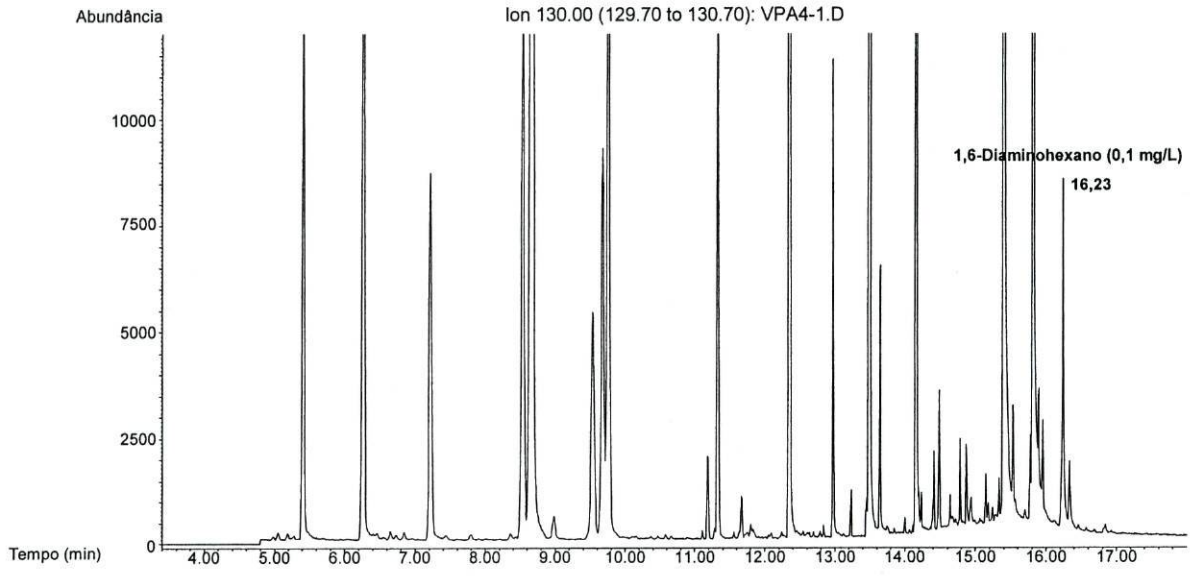


Figura 6.20. Cromatograma de massa do ião *m/z* 130, usado para a quantificação do 1,6-diaminohexano.

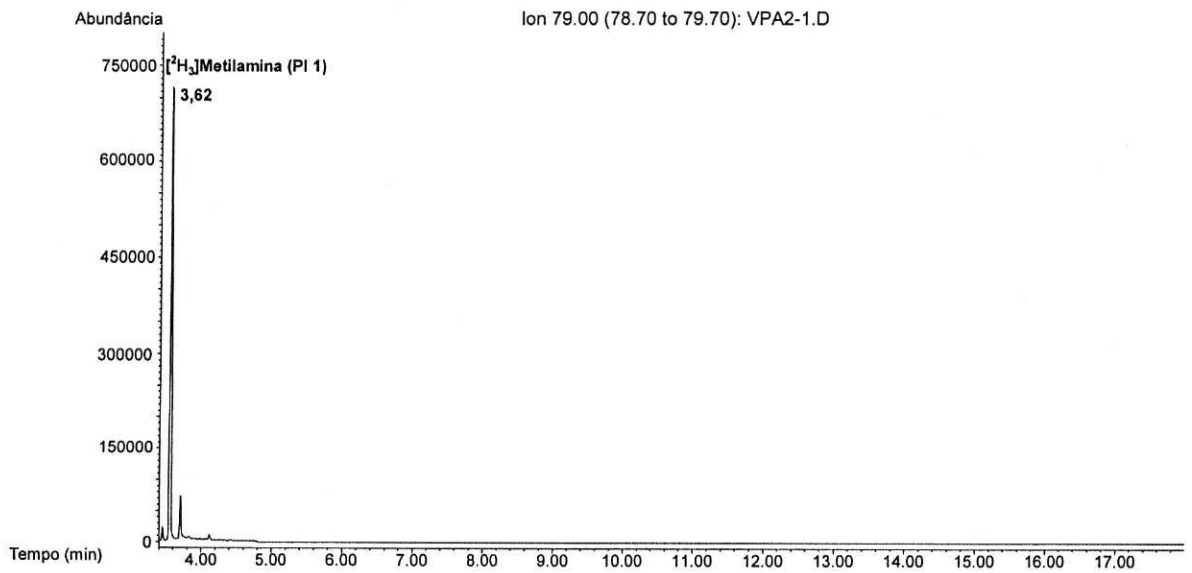


Figura 6.21. Cromatograma de massa do ião *m/z* 79, usado para a "quantificação" da [$^2H_3$]metilamina (PI 1).

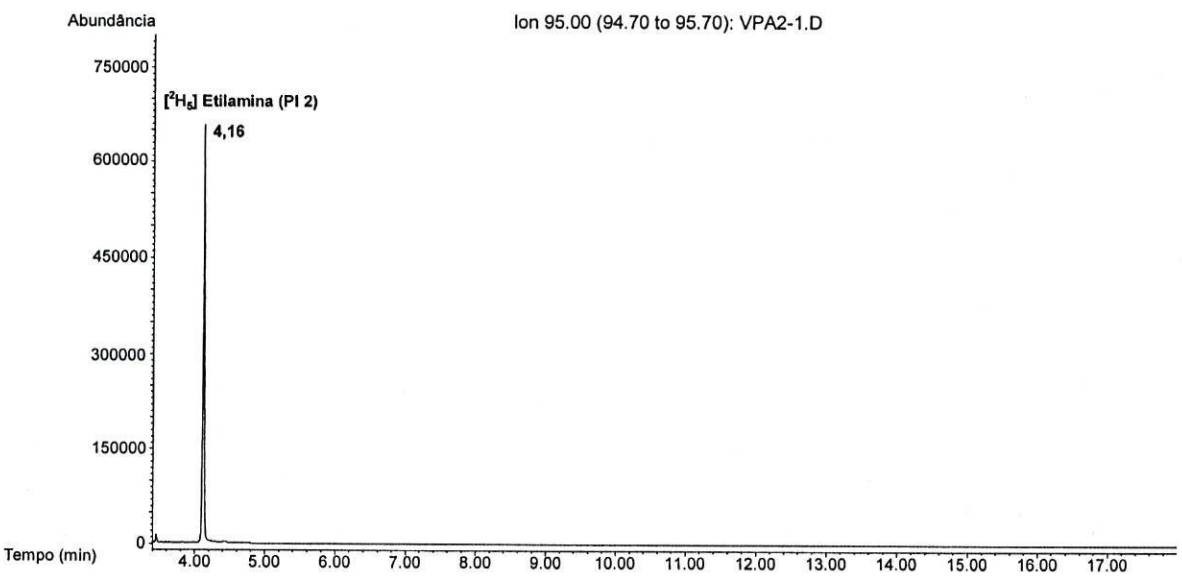


Figura 6.22. Cromatograma de massa do ião *m/z* 79, usado para a "quantificação" da [$^2H_5$]etilamina (PI 2).

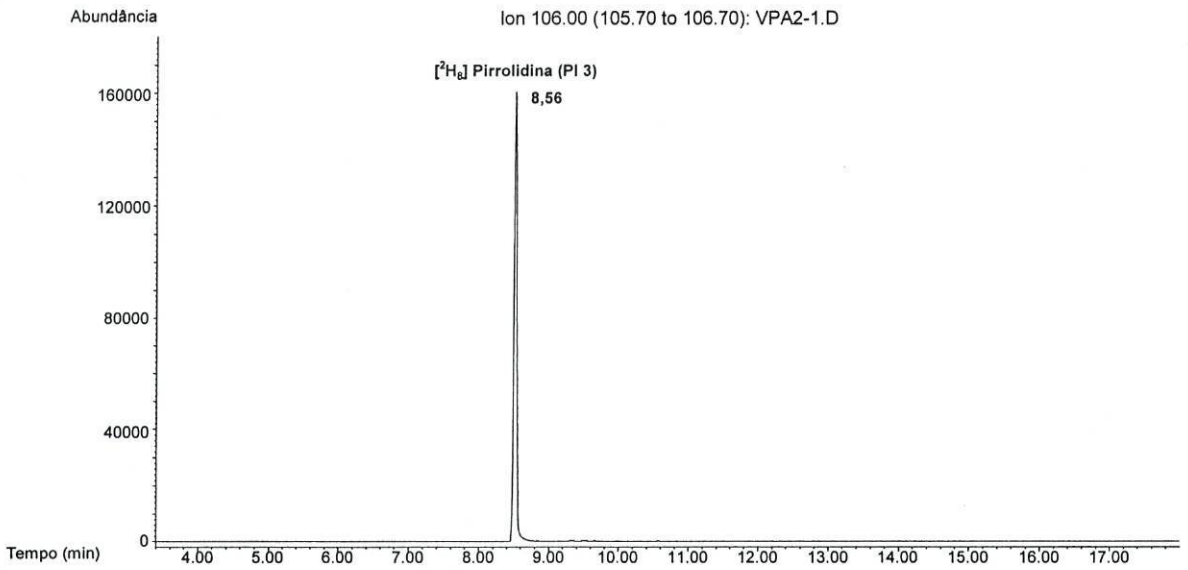


Figura 6.23. Cromatograma de massa do ião *m/z* 106, usado para a "quantificação" da [$^2H_8$]pirrolidina (PI 3).

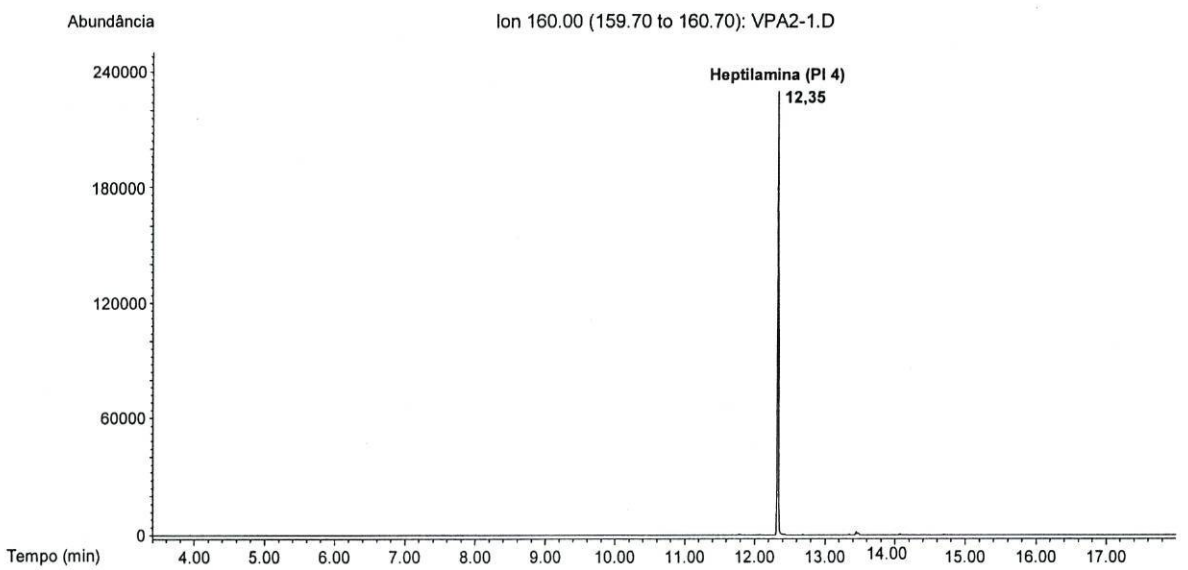


Figura 6.24. Cromatograma de massa do ião *m/z* 160, usado para a "quantificação" da heptilamina (PI 4).

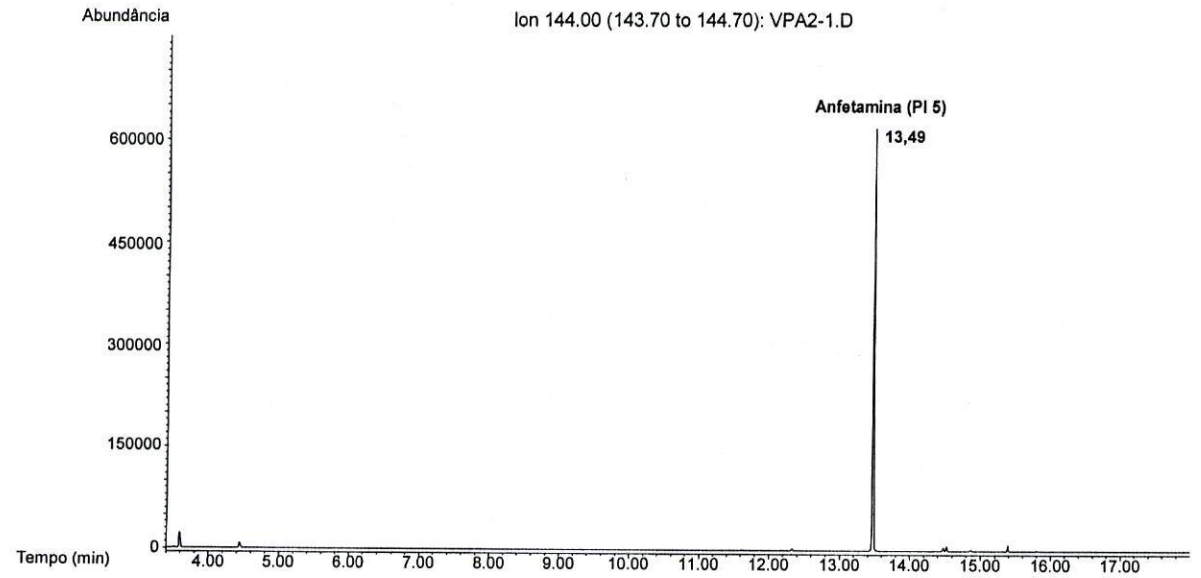


Figura 6.25. Cromatograma de massa do ião *m/z* 144, usado para a "quantificação" da anfetamina (PI 5).

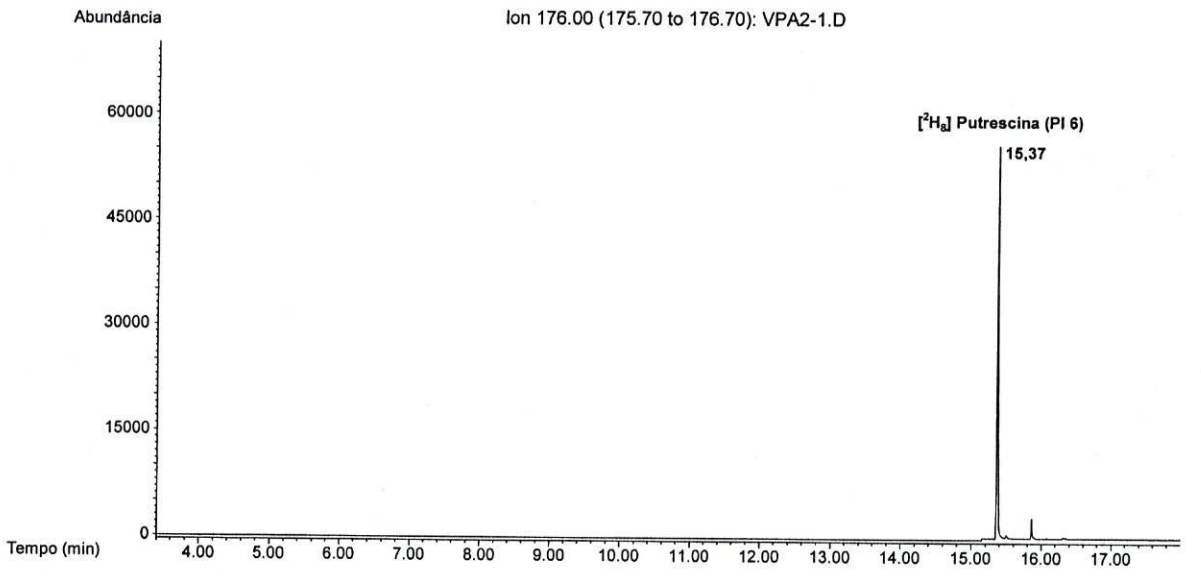


Figura 6.26. Cromatograma de massa do ião *m/z* 176, usado para a "quantificação" da [$^2H_8$]putrescina (PI 6).

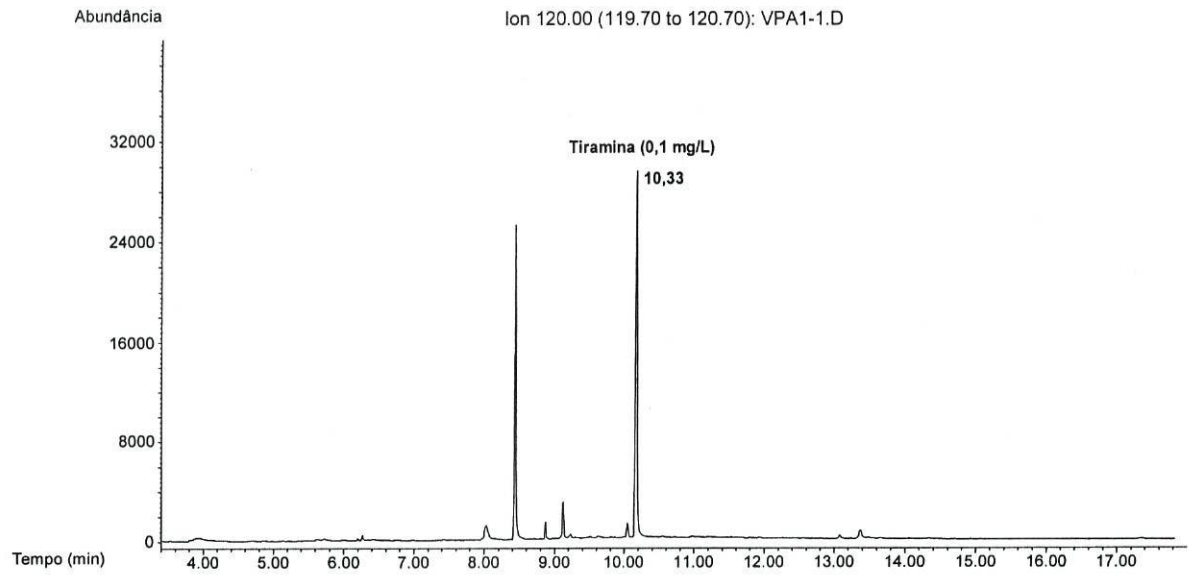


Figura 6.27. Cromatograma de massa do ião *m/z* 120 (correspondente a uma solução de calibração com 0,1 mg/L de tiramina) usado para a quantificação da tiramina.

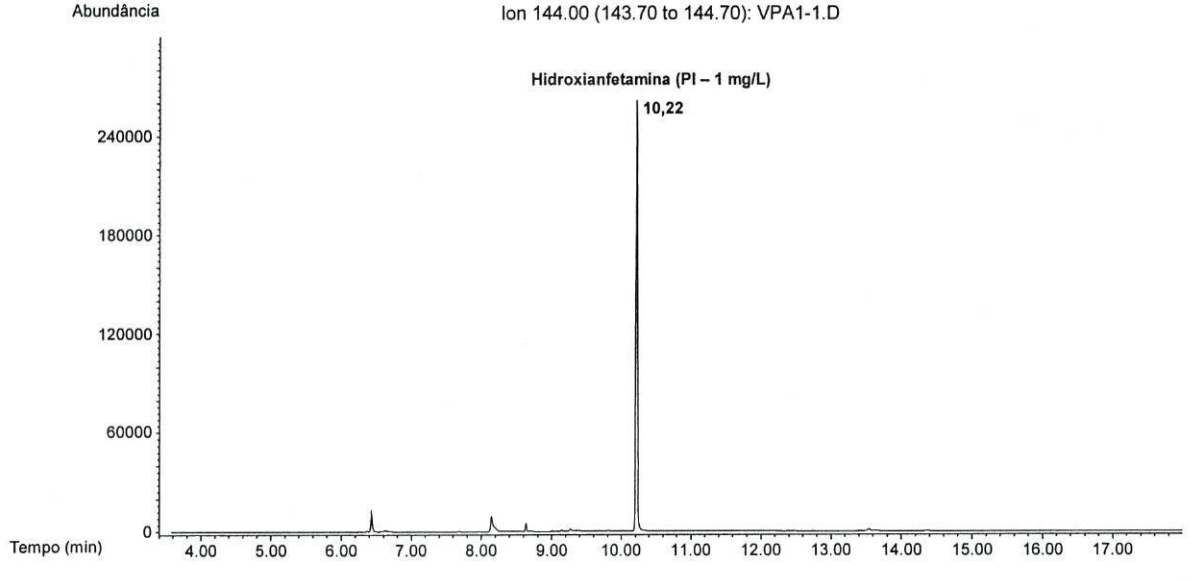


Figura 6.28. Cromatograma de massa do ião *m/z* 144 (correspondente à mesma solução de calibração da figura anterior) usado para a "quantificação" da hidroxianfetamina (PI).

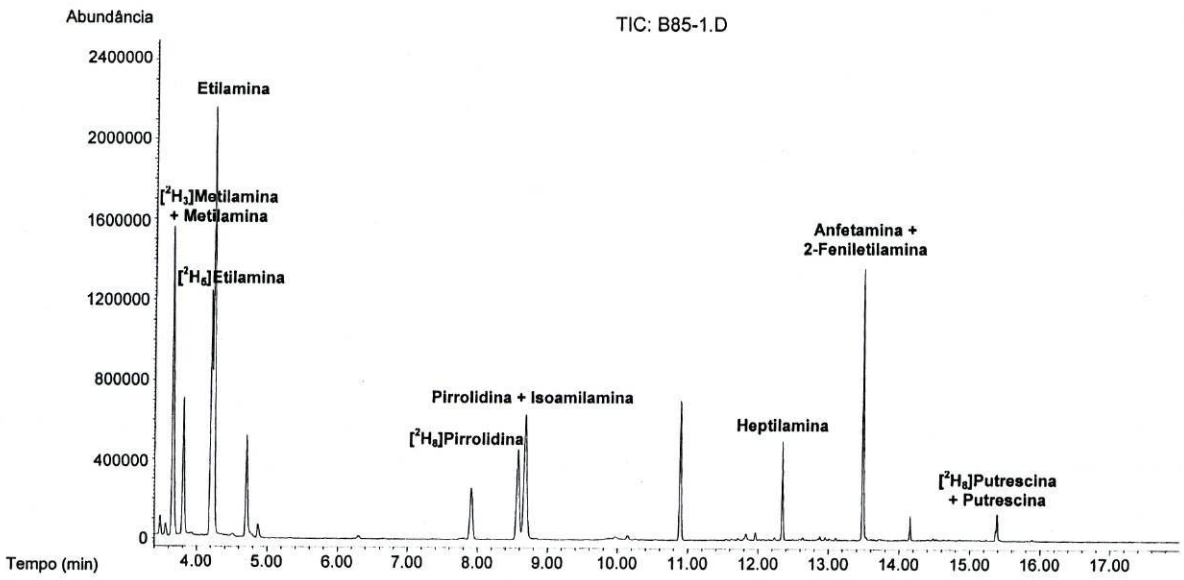


Figura 6.29. Cromatograma iónico total* obtido nas condições usadas para a quantificação dos compostos (monitorização selectiva de cinco diferentes grupos de iões) correspondente a uma amostra de vinho do Porto contendo as seguintes aminas – metilamina: 0,258 mg/L; dimetilamina: 0,094 mg/L; etilamina: 1,835 mg/L; 2-metilbutilamina: 0,018 mg/L; isoamilamina: 0,378 mg/L; pirrolidina: 0,894 mg/L; 2-feniletilamina: 0,356 mg/L; putrescina: 0,773 mg/L; cadaverina: 0,043 mg/L.

Os padrões internos usados foram adicionados à amostra na concentração de 1,0 mg/L: PI 1 - [$^2H_3$]metilamina; PI 2 - [$^2H_5$]etilamina; PI 3 - [$^2H_8$]pirrolidina; PI 4 - heptilamina; PI 5 - anfetamina; PI 6 - [$^2H_8$]putrescina.

* Deste cromatograma foram extraídos os cromatogramas de massa que se apresentam nas Figuras 6.30 a 6.44.

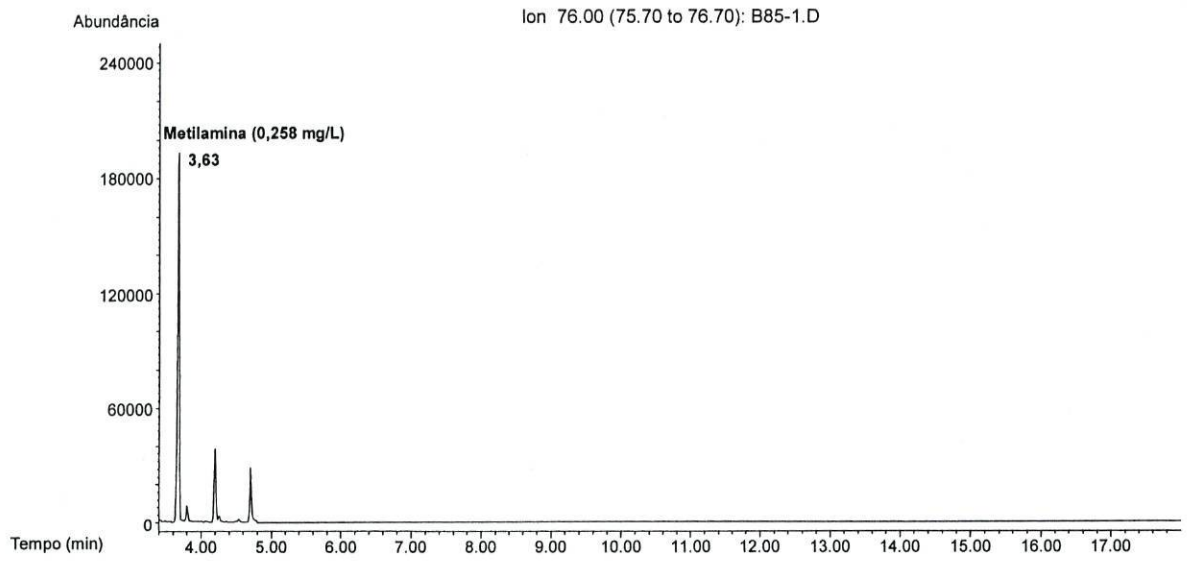


Figura 6.30. Cromatograma de massa do ião *m/z* 76, usado para a quantificação da metilamina.

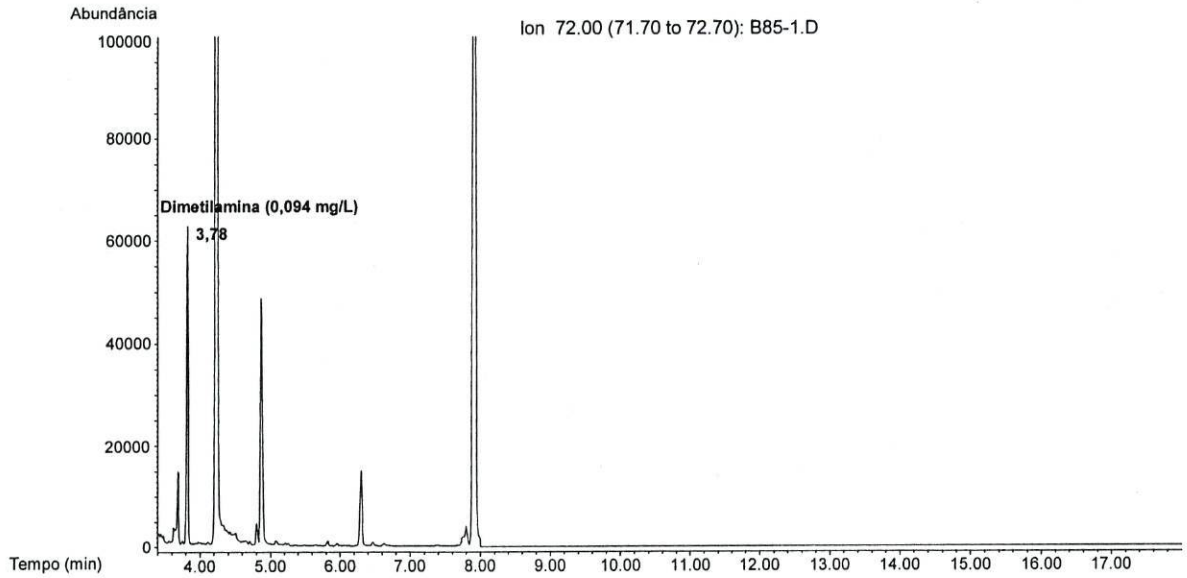


Figura 6.31. Cromatograma de massa do ião *m/z* 72, usado para a quantificação da dimetilamina.

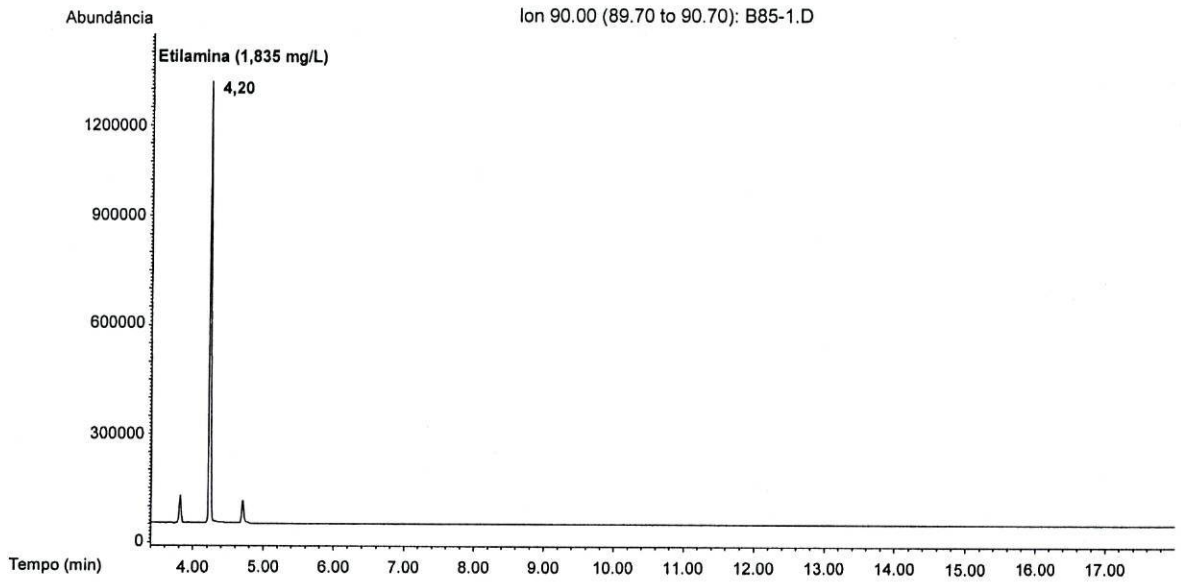


Figura 6.32. Cromatograma de massa do ião *m/z* 90, usado para a quantificação da etilamina.

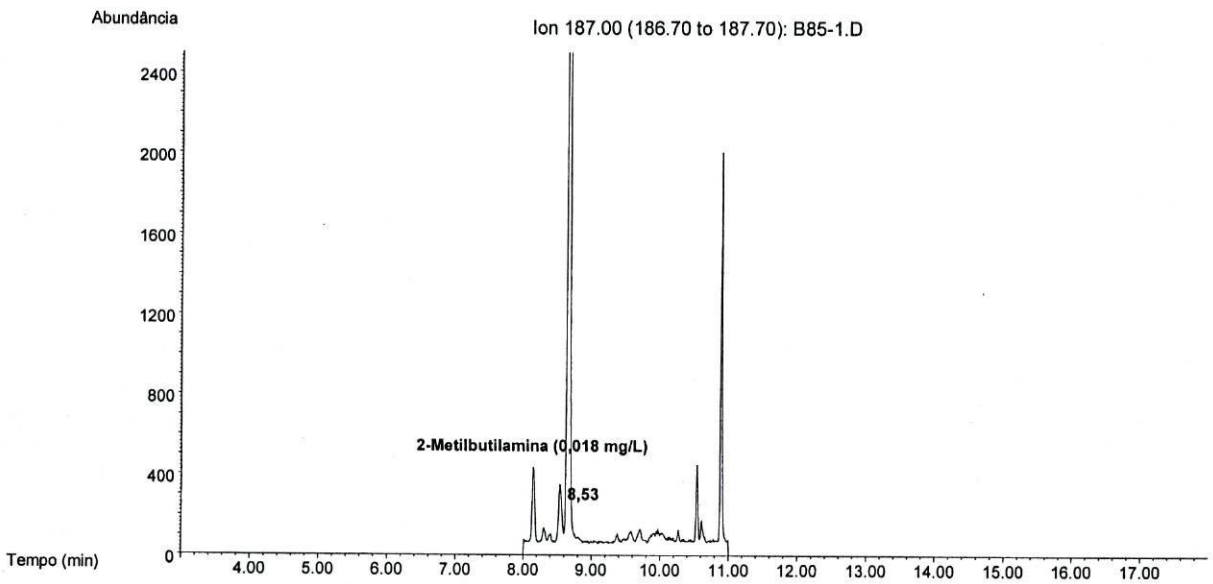


Figura 6.33. Cromatograma de massa do ião *m/z* 98, usado para a quantificação da 2-metilbutilamina.

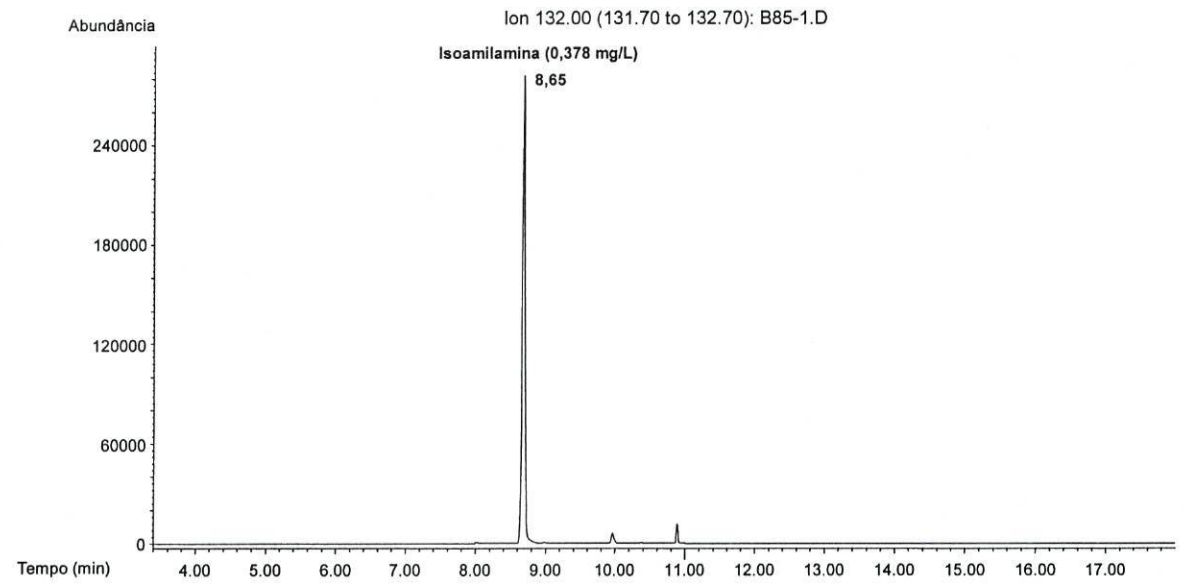


Figura 6.34. Cromatograma de massa do ião *m/z* 132, usado para a quantificação da isoamilamina.

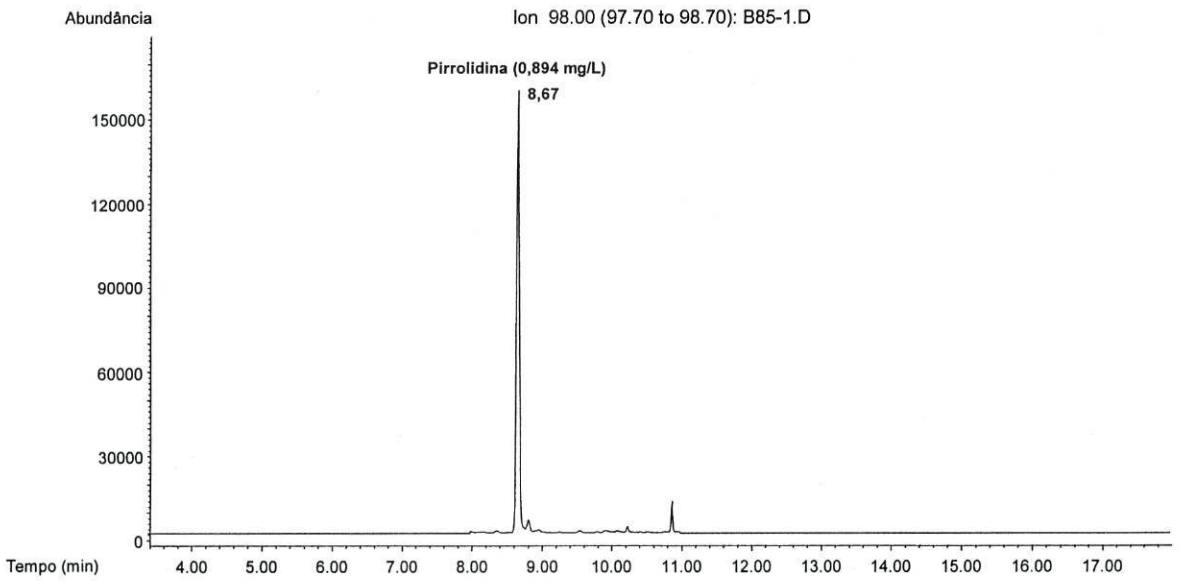


Figura 6.35. Cromatograma de massa do ião *m/z* 98, usado para a quantificação da pirrolidina.

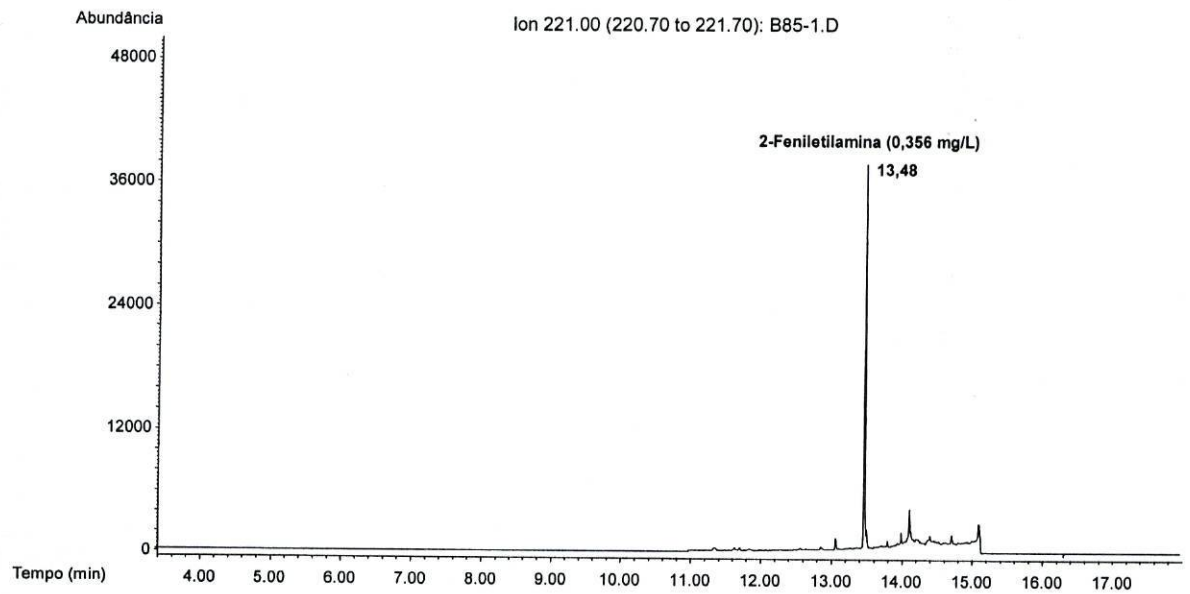


Figura 6.36. Cromatograma de massa do ião *m/z* 221, usado para a quantificação da 2-feniletilamina.

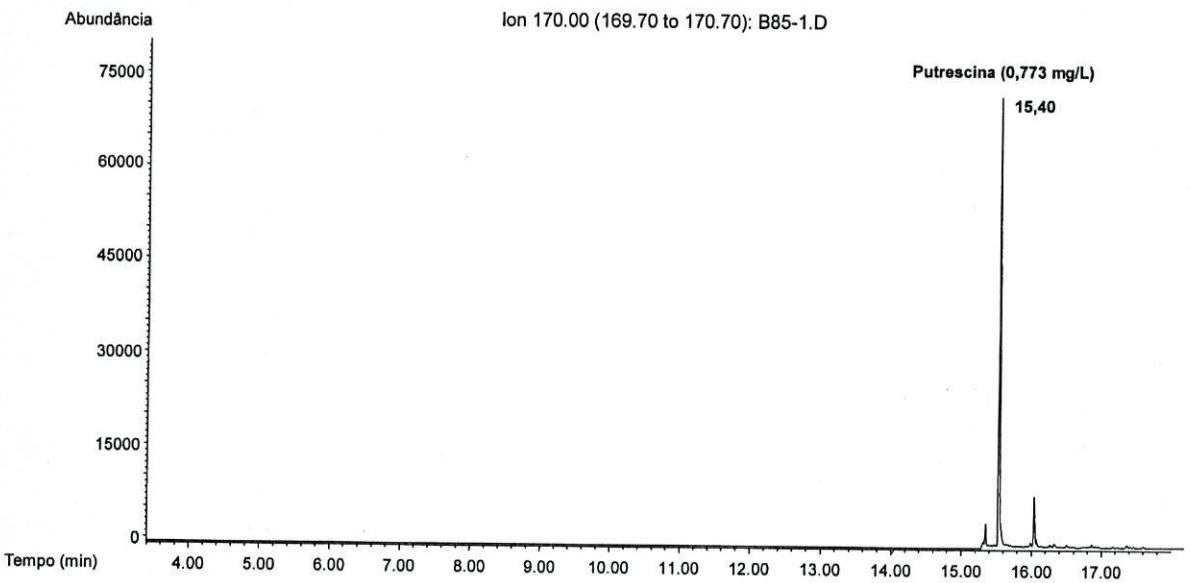


Figura 6.37. Cromatograma de massa do ião *m/z* 170, usado para a quantificação da putrescina.

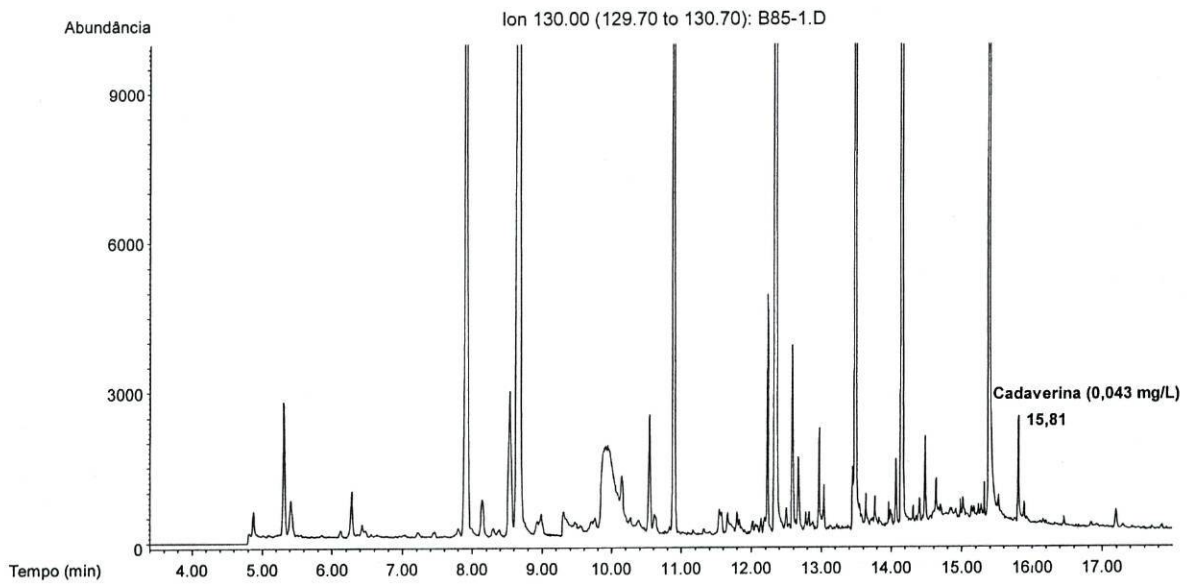


Figura 6.38. Cromatograma de massa do ião *m/z* 130, usado para a quantificação da cadaverina.

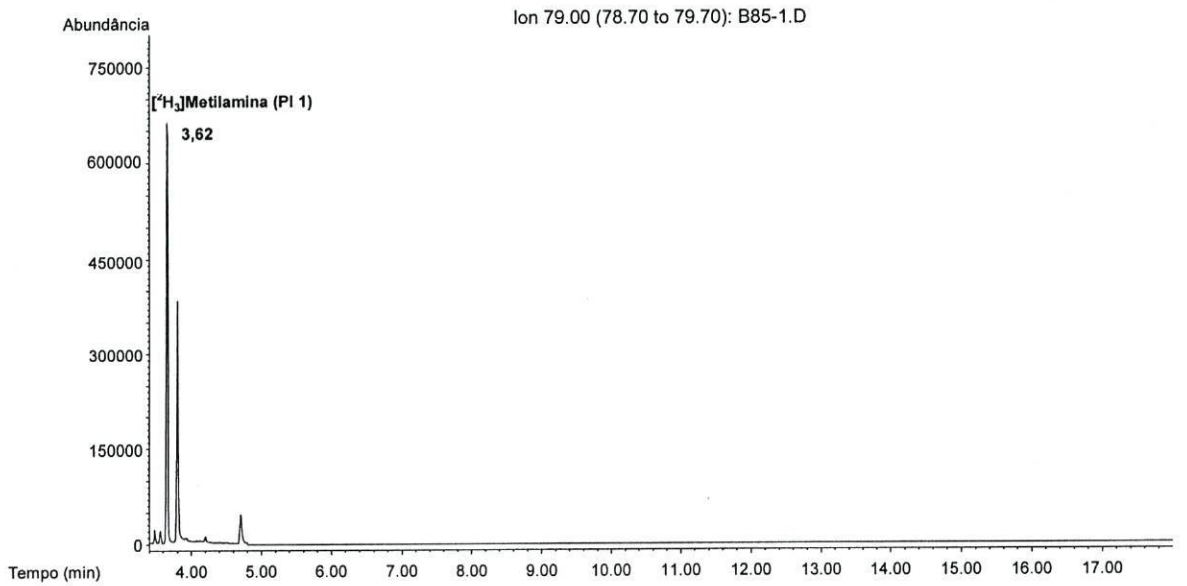


Figura 6.39. Cromatograma de massa do ião *m/z* 79, usado para a "quantificação" da [$^2H_3$]metilamina (PI 1).

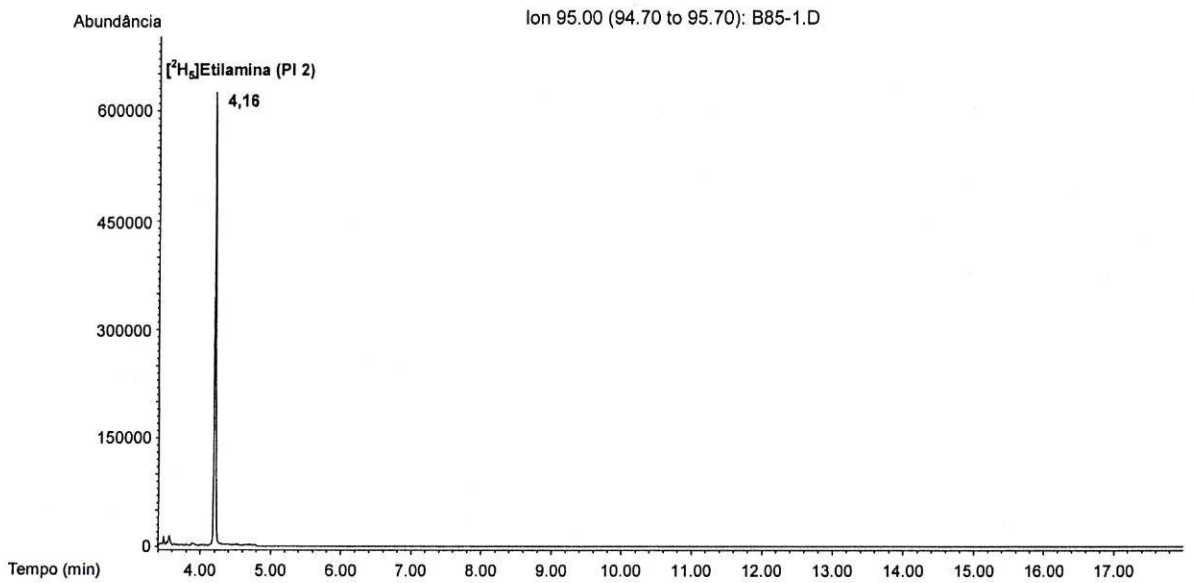


Figura 6.40. Cromatograma de massa do ião *m/z* 95, usado para a "quantificação" da [$^2H_5$]etilamina (PI 2).

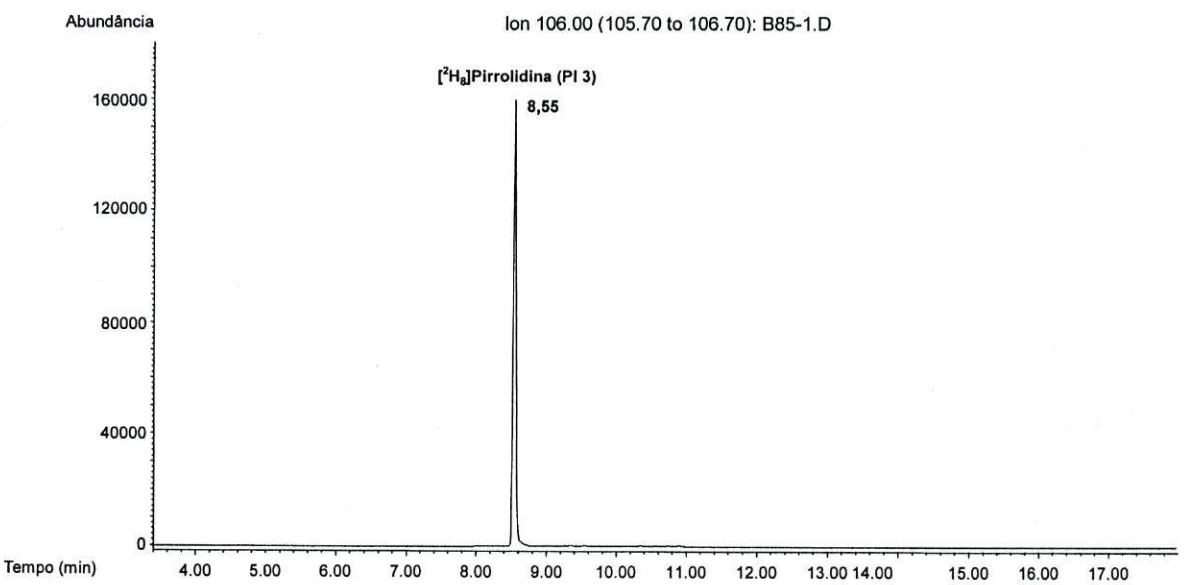


Figura 6.41. Cromatograma de massa do ião *m/z* 106, usado para a "quantificação" da [$^2H_8$]pirrolidina (PI 3).

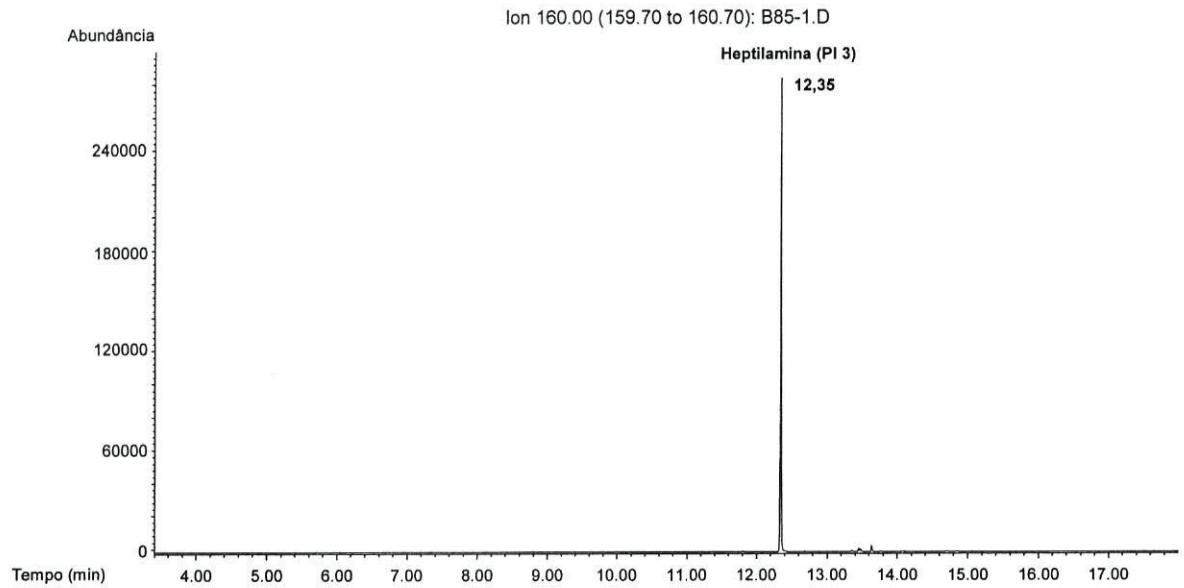


Figura 6.42. Cromatograma de massa do ião *m/z* 160, usado para a "quantificação" da heptilamina (PI 4).

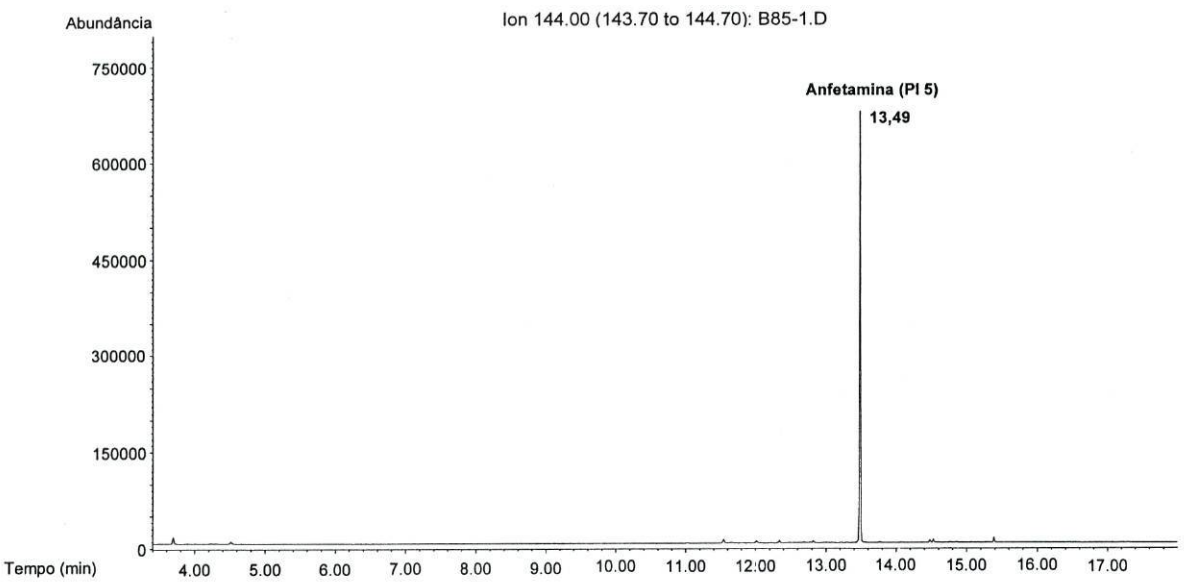


Figura 6.43. Cromatograma de massa do ião *m/z* 144, usado para a "quantificação" da anfetamina (PI 5).

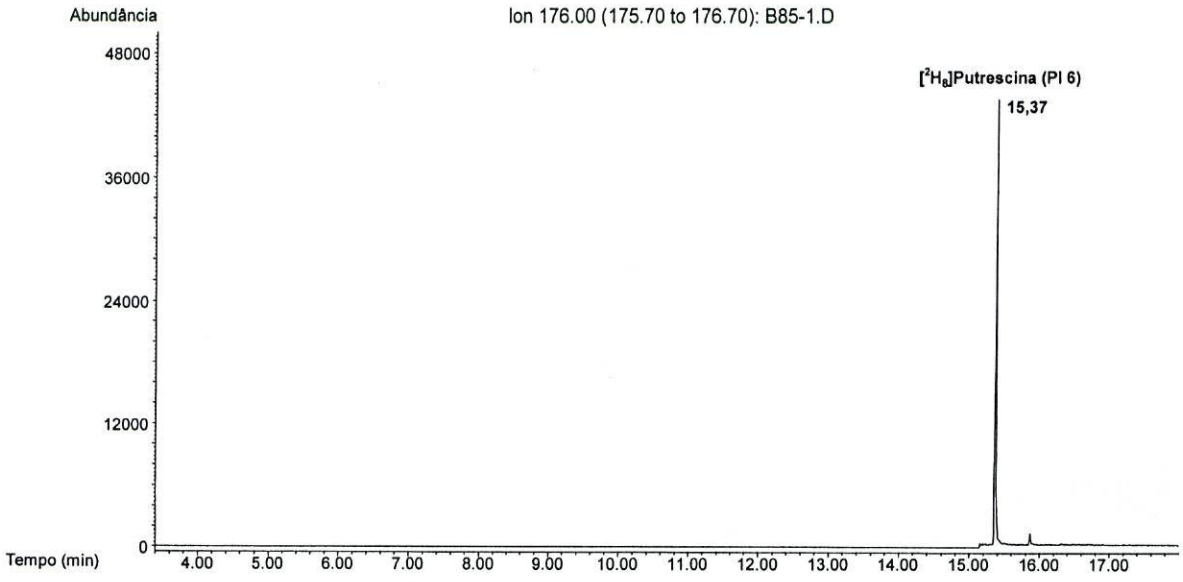


Figura 6.44. Cromatograma de massa do ião *m/z* 176, usado para a "quantificação" da [$^2H_8$]putrescina (PI 6).

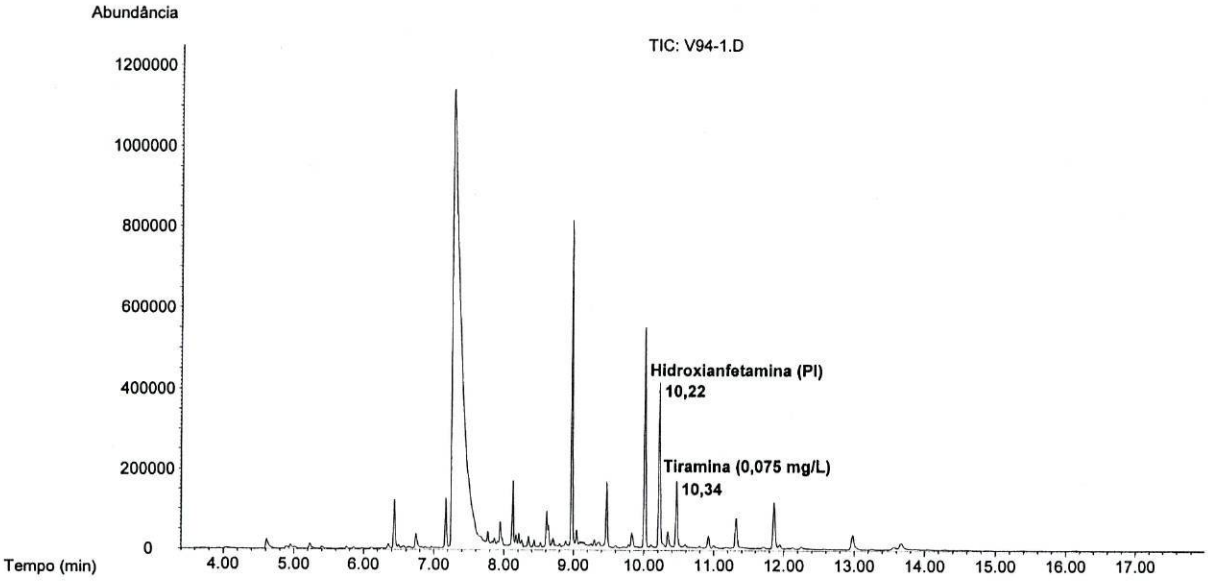


Figura 6.45. Cromatograma iónico total* obtido nas condições usadas para a quantificação da tiramina correspondente a uma amostra de vinho do Porto com um teor de tiramina de 0,075 mg/L. O padrão interno usado foi a hidroxianfetamina (1 mg/L).

* Deste cromatograma foram extraídos os cromatogramas de massa que se apresentam nas figuras 6.46 e 6.47.

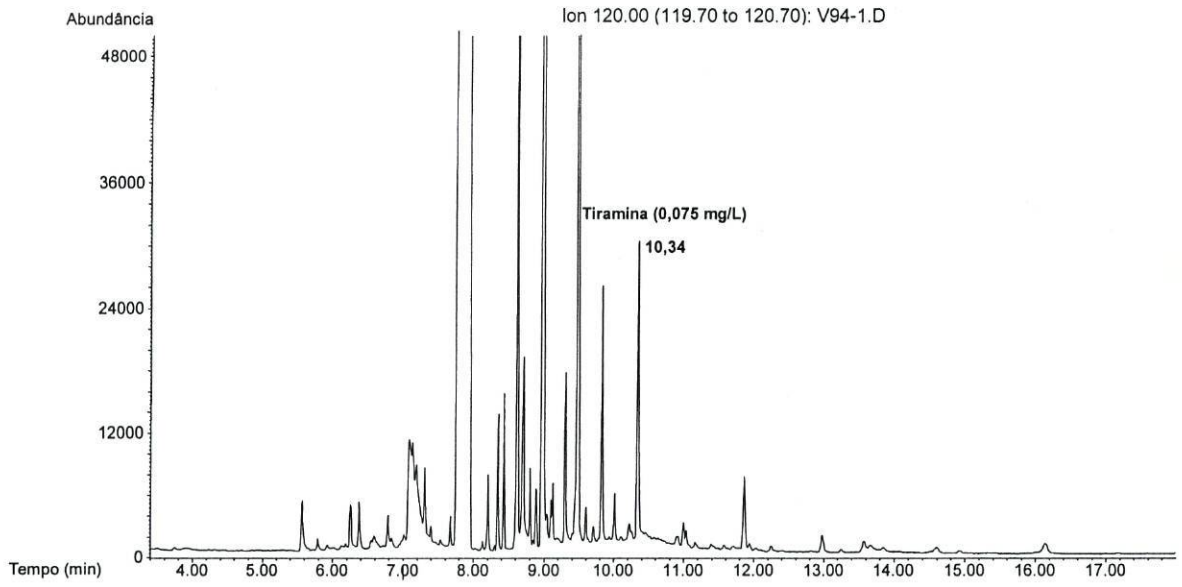


Figura 6.46. Cromatograma de massa do ião *m/z* 120, usado para a quantificação da tiramina.

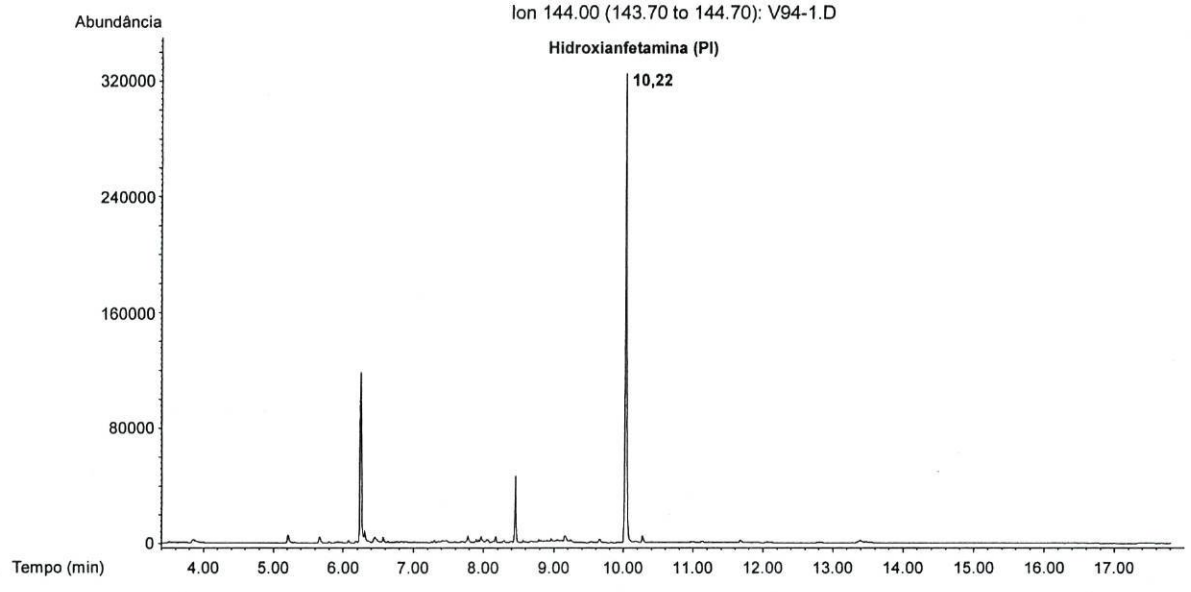


Figura 6.47. Cromatograma de massa do ião *m/z* 144, usado para a "quantificação" da hidroxianfetamina (PI).

6.4. Validação do método

6.4.1. Linearidade

À semelhança do referido nos dois capítulos anteriores, a linearidade do método foi testada a três diferentes níveis: em soluções aquosas, numa fase inicial de desenvolvimento do método; em matrizes sintéticas usadas para a construção das curvas de calibração aplicadas na quantificação dos compostos; finalmente, através daquilo que designamos por "curvas de recuperação" construídas a partir dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação (ver 6.4.3.) e nas quais se entra em consideração com a especificidade das matrizes.

No primeiro caso, o estudo reportou-se apenas a 18 compostos (a hexilamina e a 1,6-hexano--diamina foram então usadas como padrões internos) e o processo alternativo para a tiramina e a histamina não chegou a ser testado. Para todas as aminas usaram-se dez níveis de concentração (onze com o branco) — 0; 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500; 1,000; 2,500, 5,000 e 10,000 mg/L. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.5.

A linearidade do método quando aplicado às matrizes sintéticas usadas para a quantificação dos compostos foi testada tantas vezes quantas as "séries" analíticas realizadas, pois para cada "série" construiu-se uma curva de calibração diferente, resultante da média de duas injecções de cada solução padrão. A gama de concentrações usadas foi diferente para cada uma das aminas, de acordo com os teores esperados nas amostras a analisar. Em regra, usou-se uma gama de concentrações de 0,010 a 1,000 mg/L para as aminas presentes em menor quantidade e de 0,025 a 5,000 mg/L para as restantes. Os valores de r obtidos para todas as aminas em estudo foram excelentes, tanto para a análise de vinhos como de mostos, tendo-se obtido sistematicamente valores da ordem de 0,9999, em todo o caso nunca inferiores a 0,9990. Regra geral o coeficiente de correlação obtido era maior ao retirar o ponto de calibração correspondente à maior concentração (1 ou 5 mg/L).

TABELA 6.5

INDICADORES DA LINEARIDADE DO MÉTODO OBTIDOS PELA ANÁLISE DE 11 SOLUÇÕES PADRÃO COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE CADA UMA DAS AMINAS (0; 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500; 1,000; 2,500, 5,000 e 10,000 mg/L)

	Padrão interno	Coef. correlação (r)	Equação da recta
Metilamina	[$^2H_3$]Metilamina	0,99999	y = 1,02861x + 0,04104
Dimetilamina	[$^2H_3$]Metilamina	0,99989	y = 0,78384x + 0,02104
Etilamina	[$^2H_5$]Etilamina	0,99997	y = 0,79732x + 0,01264
Dietilamina	[$^2H_5$]Etilamina	0,99951	y = 0,37594x + 0,00828
Propilamina	[$^2H_5$]Etilamina	0,99802	y = 0,59518x - 0,03991
Isopropilamina	[$^2H_5$]Etilamina	0,99997	y = 0,54578x - 0,00054
Butilamina	Hexilamina	0,99983	y = 1,32849x + 0,06106
Isobutilamina	Hexilamina	0,99995	y = 1,28751x + 0,04613
Amilamina	Hexilamina	0,99994	y = 1,16111x - 0,03461
Isoamilamina	Hexilamina	0,99993	y = 0,09674x + 0,00088
2-Metilbutilamina	Hexilamina	0,99997	y = 0,12131x - 0,00204
Pirrolidina	[$^2H_8$]Pirrolidina	0,99992	y = 1,04195x - 0,01222
Piperidina	[$^2H_8$]Pirrolidina	0,99990	y = 1,86339x - 0,03500
Morfolina	[$^2H_8$]Pirrolidina	0,99801	y = 0,54582x - 0,03436
1,3-Diaminopropano	[$^2H_8$]Putrescina	0,99864	y = 2,94845x - 0,08761
Putrescina	[$^2H_8$]Putrescina	0,99996	y = 2,23167x - 0,03497
Cadaverina	[$^2H_8$]Putrescina	0,99934	y = 1,94822x - 0,08891
2-Feniletilamina	Anfetamina	0,99991	y = 0,41875x - 0,00621

6.4.2. Precisão

Para determinar a precisão da metodologia desenvolvida, fizeram-se dez determinações em paralelo a uma amostra de vinho do Porto e a uma amostra de mosto. Em ambos os casos retirou-se dez alíquotas da mesma amostra, e procedeu-se à sua análise em simultâneo com uma série de padrões usados para a construção das curvas de calibração necessárias. A exemplo do referido para as amostras, cada extracto final foi injectado em duplicado, considerando-se como resultado final a média dos dois resultados obtidos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.6.

6.4.3. Recuperação

De forma a estudar a exactidão do processo efectuaram-se dois ensaios de recuperação usando-se para o efeito uma amostra de vinho do Porto e uma amostra de mosto cujo teor nas aminas em estudo tinha sido determinado no ensaio de precisão. Em ambos os casos fez-se a adição de aminas às amostras a seis níveis diferentes de concentração, tendo o tratamento das amostras sido feito em paralelo com uma série de padrões usados para a construção das curvas de calibração necessárias para a quantificação. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 6.7 e 6.8.

Com base nos resultados obtidos neste ensaio de recuperação, construíram-se gráficos (um para cada matriz e para cada amina) relacionando os teores obtidos (ordenadas) em função dos teores adicionados (abcissas). O coeficiente de correlação obtido dá-nos uma ideia da linearidade da metodologia em condições "reais" de análise, entrando em conta com a especificidade das matrizes analisadas. Os gráficos obtidos assim como as respectivas equações das rectas correspondentes e o valor de R^2 são apresentados em anexo (anexo 6.2).

6.4.4. Limites de detecção e de quantificação

Tal como nos métodos anteriormente referidos, não foram executados estudos exaustivos para a determinação dos limites de detecção e de quantificação. Em condições normais de funcionamento do aparelho de GC-MS foi possível detectar todas as aminas em estudo numa

concentração de 1 μg/L (considerando alturas de pico pelo menos três vezes superiores à altura média da linha de base). Como limite de quantificação considerou-se o valor de 5 μg/L, acima do qual foi possível obter sistematicamente para todas as aminas valores de coeficientes de variação inferiores a 15 %.

TABELA 6.6

PRECISÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA EM AMOSTRAS DE VINHO DO PORTO E DE MOSTO (n=10)

		Vinho do Porto	Mosto
Metilamina	Média (mg/L)	0,318	0,664
	Desvio-padrão	0,006	0,013
	C. V. (%)	**1,74**	**1,90**
Dimetilamina	Média (mg/L)	0,086	0,067
	Desvio-padrão	0,001	0,003
	C. V. (%)	**1,54**	**5,15**
Etilamina	Média (mg/L)	2,426	1,266
	Desvio-padrão	0,019	0,015
	C. V. (%)	**1,20**	**1,22**
Dietilamina	Média (mg/L)	—	0,053
	Desvio-padrão	—	0,001
	C. V. (%)	—	**2,49**
Isopropilamina	Média (mg/L)	0,003	0,005
	Desvio-padrão	0,0001	0,0001
	C. V. (%)	**3,62**	**1,66**
Isobutilamina	Média (mg/L)	0,010	0,039
	Desvio-padrão	0,002	0,002
	C. V. (%)	**17,53**	**4,18**
2-Metilbutilamina	Média (mg/L)	0,019	0,117
	Desvio-padrão	0,001	0,003
	C. V. (%)	**3,32**	**2,15**
Isoamilamina	Média (mg/L)	0,430	1,168
	Desvio-padrão	0,008	0,017
	C. V. (%)	**1,90**	**1,44**
Pirrolidina	Média (mg/L)	0,635	0,005
	Desvio-padrão	0,005	0,0005
	C. V. (%)	**0,73**	**11,89**
1,3-Diaminopropano	Média (mg/L)	0,027	0,016
	Desvio-padrão	0,001	0,001
	C. V. (%)	**1,78**	**3,40**
Putrescina	Média (mg/L)	2,297	1,479
	Desvio-padrão	0,052	0,045
	C. V. (%)	**2,25**	**3,05**
Cadaverina	Média (mg/L)	0,131	0,064
	Desvio-padrão	0,005	0,004
	C. V. (%)	**4,23**	**5,84**
2-Feniletilamina	Média (mg/L)	0,281	0,535
	Desvio-padrão	0,003	0,011
	C. V. (%)	**1,09**	**2,06**
Tiramina	Média (mg/L)	0,508	—
	Desvio-padrão	0,021	—
	C. V. (%)	**4,13**	—

TABELA 6.7

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE VINHO DO PORTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação[a] (%)	Recuperação média (%)
Metilamina	0,318	0,050	0,367	98,3	**100,6**
		0,100	0,419	100,6	
		0,250	0,573	102,2	
		0,500	0,820	100,3	
		1,000	1,322	100,4	
		2,500	2,859	101,6	
Dimetilamina	0,086	0,050	0,135	98,9	**105,2**
		0,100	0,186	100,4	
		0,250	0,361	109,8	
		0,500	0,615	105,8	
		1,000	1,147	106,1	
		2,500	2,709	104,9	
Etilamina	2,426	0,050	2,471	90,6	**101,2**
		0,100	2,535	108,6	
		0,250	2,694	107,4	
		0,500	2,912	97,1	
		1,000	3,472	104,6	
		2,500	4,905	99,2	
Dietilamina	nd	0,025	0,027	106,5	**104,7**
		0,050	0,052	104,3	
		0,100	0,103	103,3	
		0,250	0,256	102,3	
		0,500	0,528	105,6	
		1,000	1,061	106,1	
Propilamina	nd	0,025	0,024	94,3	**99,0**
		0,050	0,048	95,5	
		0,100	0,097	96,9	
		0,250	0,247	98,7	
		0,500	0,516	103,2	
		1,000	1,052	105,2	
Isopropilamina	0,003	0,025	0,029	103,3	**102,5**
		0,050	0,055	103,1	
		0,100	0,104	100,8	
		0,250	0,253	100,1	
		0,500	0,518	103,0	
		1,000	1,047	104,4	

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

[a] Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

TABELA 6.7 (cont.)

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE VINHO DO PORTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação[a] (%)	Recuperação média (%)
Butilamina	nd	0,025	0,028	113,5	**109,6**
		0,050	0,056	111,2	
		0,100	0,109	109,3	
		0,250	0,265	106,1	
		0,500	0,556	111,2	
		1,000	1,062	106,2	
Isobutilamina	0,010	0,025	0,034	97,9	**108,7**
		0,050	0,067	113,7	
		0,100	0,123	112,8	
		0,250	0,281	108,2	
		0,500	0,571	112,3	
		1,000	1,082	107,2	
Amilamina	nd	0,025	0,027	107,7	**102,4**
		0,050	0,050	99,0	
		0,100	0,101	100,2	
		0,250	0,249	99,6	
		0,500	0,520	103,9	
		1,000	1,039	103,9	
Isoamilamina	0,430	0,050	0,478	96,6	**98,9**
		0,100	0,520	90,3	
		0,250	0,687	102,8	
		0,500	0,926	99,2	
		1,000	1,476	104,6	
		2,500	2,928	99,9	
2-Metilbutilamina	0,019	0,025	0,042	93,9	**97,6**
		0,050	0,065	91,5	
		0,100	0,115	96,0	
		0,250	0,258	95,8	
		0,500	0,540	104,2	
		1,000	1,063	104,4	
Hexilamina	nd	0,025	0,024	95,0	**97,2**
		0,050	0,047	93,2	
		0,100	0,095	94,8	
		0,250	0,242	96,8	
		0,500	0,506	101,3	
		1,000	1,020	102,0	

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

[a] Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

TABELA 6.7 (cont.)

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE VINHO DO PORTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação[a] (%)	Recuperação média (%)
Pirrolidina	0,635	0,050	0,675	80,1	**97,3**
		0,100	0,732	97,3	
		0,250	0,901	106,5	
		0,500	1,131	99,2	
		1,000	1,660	102,5	
		2,500	3,082	97,9	
Piperidina	0,004	0,025	0,029	100,1	**102,8**
		0,050	0,055	102,6	
		0,100	0,106	102,4	
		0,250	0,257	101,5	
		0,500	0,531	105,6	
		1,000	1,050	104,6	
Morfolina	nd	0,025	0,025	100,0	**108,1**
		0,050	0,054	107,1	
		0,100	0,112	112,2	
		0,250	0,272	108,7	
		0,500	0,559	111,7	
		1,000	1,067	106.7	
2-Feniletilamina	0,281	0,050	0,320	78,9	**92,2**
		0,100	0,369	88,1	
		0,250	0,517	94,6	
		0,500	0,761	96,0	
		1,000	1,250	96,9	
		2,500	2,743	98,5	
1,3-Diaminopropano	0,006	0,025	0,031	97,6	**110,7**
		0,050	0,057	100,2	
		0,100	0,114	107,2	
		0,250	0,287	112,4	
		0,500	0,604	119,4	
		1,000	1,280	127,3	
Putrescina	2,297	0,100	2,467	169,7	**120,1 (110,2)[b]**
		0,250	2,607	124,0	
		0,500	2,873	115,2	
		1,000	3,401	110,4	
		2,500	4,824	101,1	
		5,000	7,308	100,2	

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

[a] Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

[b] valor médio calculado sem entrar em consideração com o primeiro valor

TABELA 6.7 (cont.)

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE VINHO DO PORTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação[a] (%)	Recuperação média (%)
Cadaverina	0,131	0,050	0,175	87,3	**96,9**
		0,100	0,223	92,2	
		0,250	0,372	96,4	
		0,500	0,632	100,1	
		1,000	1,143	101,2	
		2,500	2,740	104,4	
1,6-Diaminohexano	nd	0,025	0,026	103,4	**104,9**
		0,050	0,052	104,4	
		0,100	0,093	93,4	
		0,250	0,262	104,9	
		0,500	0,523	104,5	
		1,000	1,184	118,4	
Tiramina	0,508	0,050	0,554	92,3	**98,9**
		0,100	0,601	93,3	
		0,250	0,768	104,1	
		0,500	0,993	97,0	
		1,000	1,498	99,1	
		2,500	3,207	108,0	

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

[a] Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

TABELA 6.8

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE MOSTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação[a] (%)	Recuperação média (%)
Metilamina	0,664	0,050	0,717	106,0	**102,9**
		0,100	0,769	105,5	
		0,250	0,922	103,4	
		0,500	1,171	101,5	
		1,000	1,662	99,8	
		2,500	3,185	100,8	
Dimetilamina	0,067	0,050	0,120	105,4	**99,7**
		0,100	0,172	105,2	
		0,250	0,321	101,7	
		0,500	0,555	97,5	
		1,000	1,015	94,8	
		2,500	2,407	93,6	
Etilamina	1,266	0,050	1,329	124,5	**106,4**
		0,100	1,360	93,4	
		0,250	1,542	110,3	
		0,500	1,807	108,2	
		1,000	2,303	103,6	
		2,500	3,721	98,2	
Dietilamina	0,053	0,010	0,062	90,9	**93,8**
		0,025	0,077	95,8	
		0,050	0,101	95,8	
		0,100	0,148	94,4	
		0,250	0,287	93,4	
		0,500	0,517	92,7	
Propilamina	nd	0,010	0,014	138,2	**112,4**
		0,025	0,032	128,1	
		0,050	0,054	108,9	
		0,100	0,102	102,3	
		0,250	0,245	98,0	
		0,500	0,496	99,2	
Isopropilamina	0,005	0,010	0,014	89,7	**98,3**
		0,025	0,030	98,5	
		0,050	0,055	99,7	
		0,100	0,106	101,0	
		0,250	0,254	99,5	
		0,500	0,512	101,4	

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

[a] Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

TABELA 6.8 (cont.)

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE MOSTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação[a] (%)	Recuperação média (%)
Butilamina	nd	0,010	0,009	88,6	**92,4**
		0,025	0,022	88,3	
		0,050	0,046	92,0	
		0,100	0,095	95,4	
		0,250	0,235	93,8	
		0,500	0,481	96,2	
Isobutilamina	0,039	0,010	0,048	89,1	**95,9**
		0,025	0,064	99,6	
		0,050	0,086	95,2	
		0,100	0,137	98,6	
		0,250	0,278	95,8	
		0,500	0,523	96,9	
Amilamina	nd	0,010	0,009	90,2	**97,9**
		0,025	0,025	101,7	
		0,050	0,049	98,0	
		0,100	0,095	94,8	
		0,250	0,251	100,3	
		0,500	0,512	102,4	
Isoamilamina	1,168	0,050	1,208	80,3	**94,9**
		0,100	1,264	95,6	
		0,250	1,414	98,3	
		0,500	1,690	104,5	
		1,000	2,127	95,9	
		2,500	3,541	94,9	
2-Metilbutilamina	0,117	0,010	0,135	199,9	**120,1 (104,2)[b]**
		0,025	0,144	107,0	
		0,050	0,179	111,9	
		0,100	0,224	107,0	
		0,250	0,362	97,8	
		0,500	0,604	97,0	
Hexilamina	nd	0,010	0,011	109,3	**105,8**
		0,025	0,026	102,3	
		0,050	0,052	103,2	
		0,100	0,103	102,8	
		0,250	0,263	105,4	
		0,500	0,560	112,0	

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

[a] Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

[b] valor médio calculado sem entrar em consideração com o primeiro valor

TABELA 6.8 (cont.)

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE MOSTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação[a] (%)	Recuperação média (%)
Pirrolidina	0,005	0,050	0,048	86,1	**97,8**
		0,100	0,102	97,4	
		0,250	0,266	104,4	
		0,500	0,512	101,5	
		1,000	0,999	99,4	
		2,500	2,456	98,0	
Piperidina	nd	0,010	0,009	91,8	**98,0**
		0,025	0,025	99,2	
		0,050	0,051	101,1	
		0,100	0,100	100,2	
		0,250	0,249	99,6	
		0,500	0,481	96,2	
Morfolina	nd	0,010	0,006	55,8	**94,6**
		0,025	0,027	108,8	
		0,050	0,055	109,2	
		0,100	0,103	103,3	
		0,250	0,245	98,1	
		0,500	0,463	92,6	
2-Feniletilamina	0,535	0,050	0,586	103,0	**105,2**
		0,100	0,644	108,8	
		0,250	0,808	109,3	
		0,500	1,054	104,0	
		1,000	1,575	104,0	
		2,500	3,091	102,2	
1,3-Diaminopropano	0,016	0,010	0,026	95,3	**93,8**
		0,025	0,039	91,3	
		0,050	0,060	88,6	
		0,100	0,104	88,3	
		0,250	0,268	100,5	
		0,500	0,510	98,8	
Putrescina	1,479	0,100	1,626	146,6	**103,7**
		0,250	1,701	88,5	
		0,500	1,945	93,2	
		1,000	2,431	95,2	
		2,500	3,931	98,1	
		5,000	6,503	100,5	

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

[a] Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

TABELA 6.8 (cont.)

VALORES OBTIDOS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO EFECTUADO COM UMA AMOSTRA DE MOSTO

	Teor inicial (mg/L)	Teor adicionado (mg/L)	Teor encontrado (mg/L)	Recuperação[a] (%)	Recuperação média (%)
Cadaverina	0,064	0,050	0,103	77,8	**97,4**
		0,100	0,160	96,5	
		0,250	0,322	103,4	
		0,500	0,577	102,7	
		1,000	1,071	100,8	
		2,500	2,636	102,9	
1,6-Diaminohexano	nd	0,010	0,012	115,9	**101,1**
		0,025	0,025	100,0	
		0,050	0,051	101,5	
		0,100	0,096	95,9	
		0,250	0,239	95,8	
		0,500	0,486	97,3	
Tiramina	—	—	—	—	—

nd – não detectado (considerado como 0 para os cálculos efectuados)

[a] Para o cálculo da recuperação, usou-se a seguinte fórmula: Recuperação = [(teor encontrado – teor inicial) / teor adicionado] x 100

6.4.5. Comparação de métodos

Atendendo ao facto da grande maioria das amostras de mostos e de vinhos do Porto em estudo que foram analisadas pelo método descrito neste capítulo, terem sido previamente analisadas pela método apresentado no capítulo 4 (derivatização com anidrido heptafluorobutírico), foi possível fazer uma análise comparativa dos dois métodos para as aminas passíveis de ser analisadas por ambos os métodos: 1,3-diaminopropano, putrescina, cadaverina, 2-feniletilamina e tiramina. Os resultados obtidos são apresentados sob a forma de gráfico, incluindo a linha de tendência obtida, a respectiva equação e o coeficiente de determinação, nas Figuras 6.48 a 6.52.

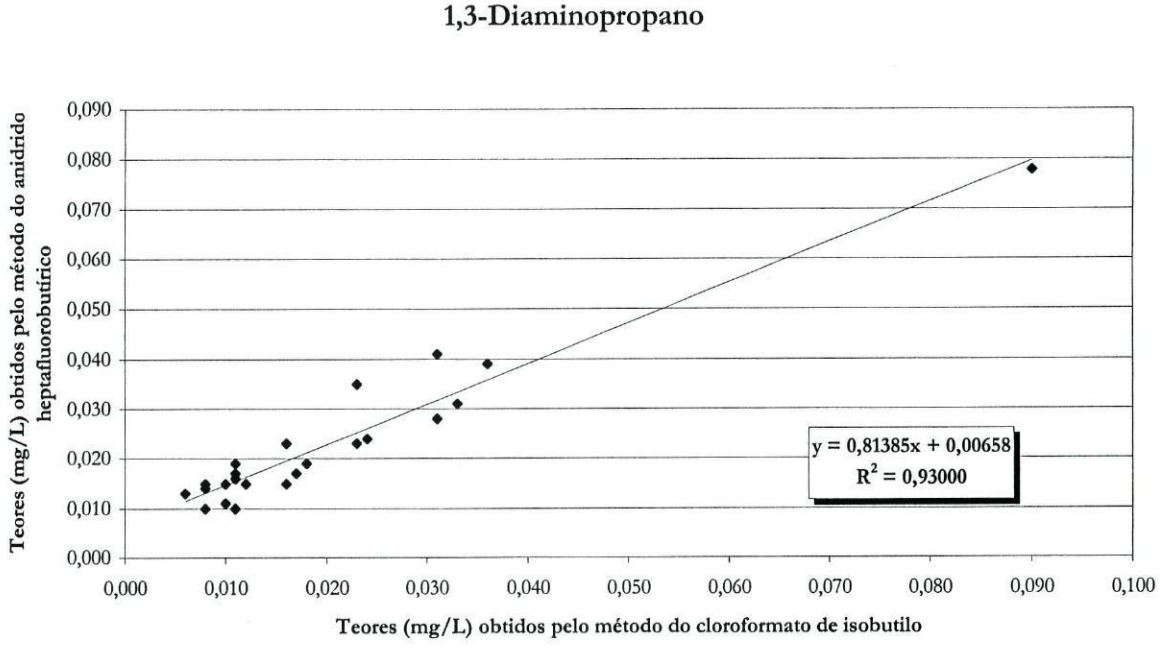


Figura 6.48. Correlação entre os resultados obtidos na determinação dos teores de 1,3-diaminopropano em amostras de vinhos e de mostos pelo método descrito neste capítulo (derivatização com cloroformato de isobutilo) e pelo método descrito no capítulo 4 (derivatização com anidrido heptafluorobutírico).

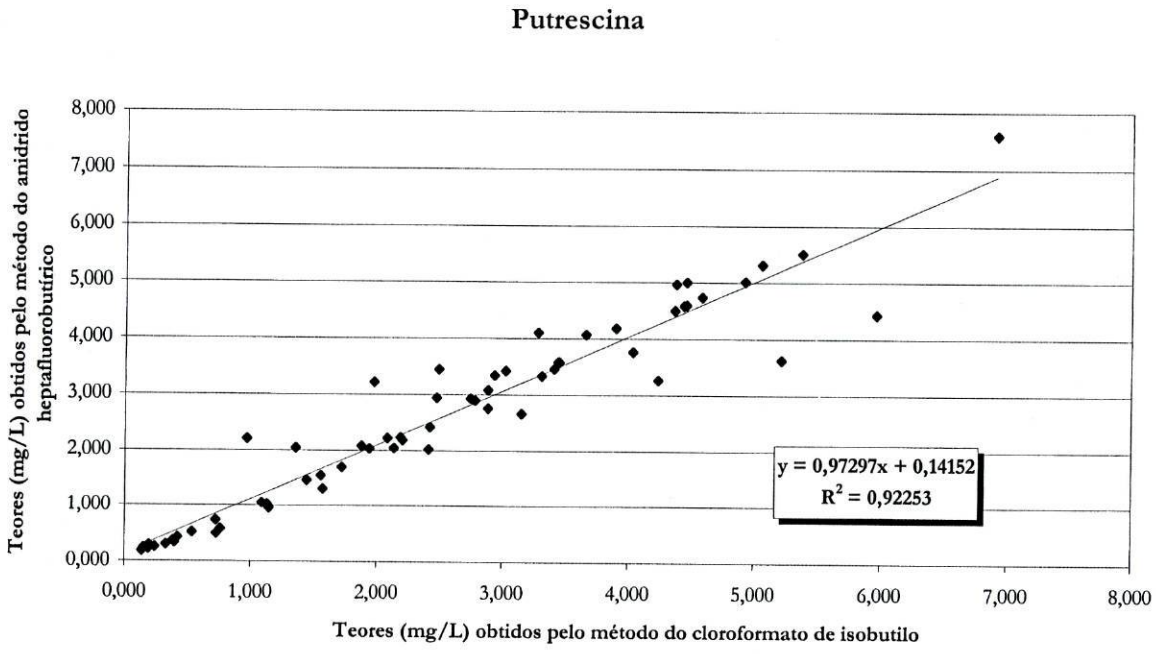


Figura 6.49. Correlação entre os resultados obtidos na determinação dos teores de putrescina em amostras de vinhos e de mostos pelo método descrito neste capítulo (derivatização com cloroformato de isobutilo) e pelo método descrito no capítulo 4 (derivatização com anidrido heptafluorobutírico).

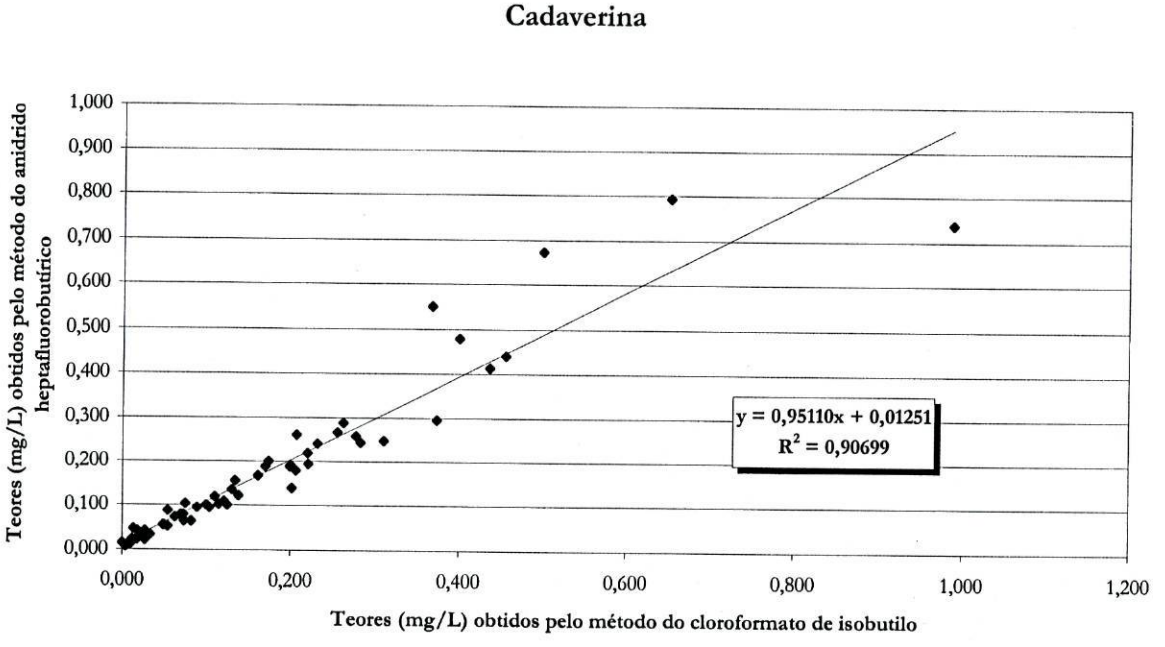


Figura 6.50. Correlação entre os resultados obtidos na determinação dos teores de cadaverina em amostras de vinhos e de mostos pelo método descrito neste capítulo (derivatização com cloroformato de isobutilo) e pelo método descrito no capítulo 4 (derivatização com anidrido heptafluorobutírico).

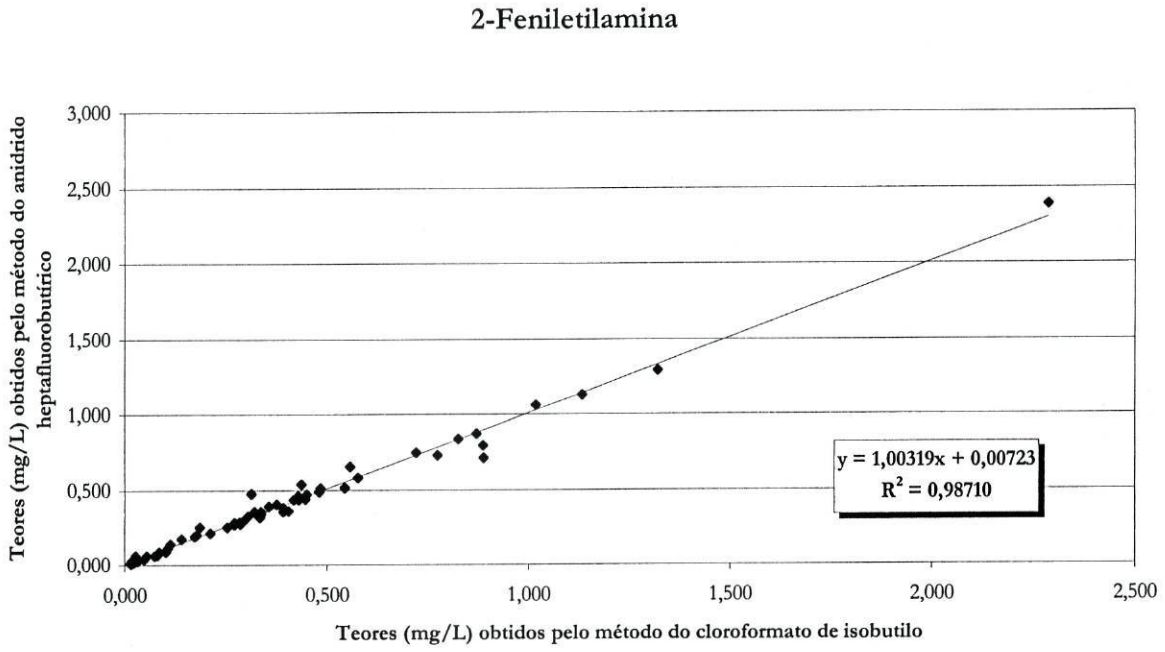


Figura 6.51. Correlação entre os resultados obtidos na determinação dos teores de 2-feniletilamina em amostras de vinhos e de mostos pelo método descrito neste capítulo (derivatização com cloroformato de isobutilo) e pelo método descrito no capítulo 4 (derivatização com anidrido heptafluorobutírico).

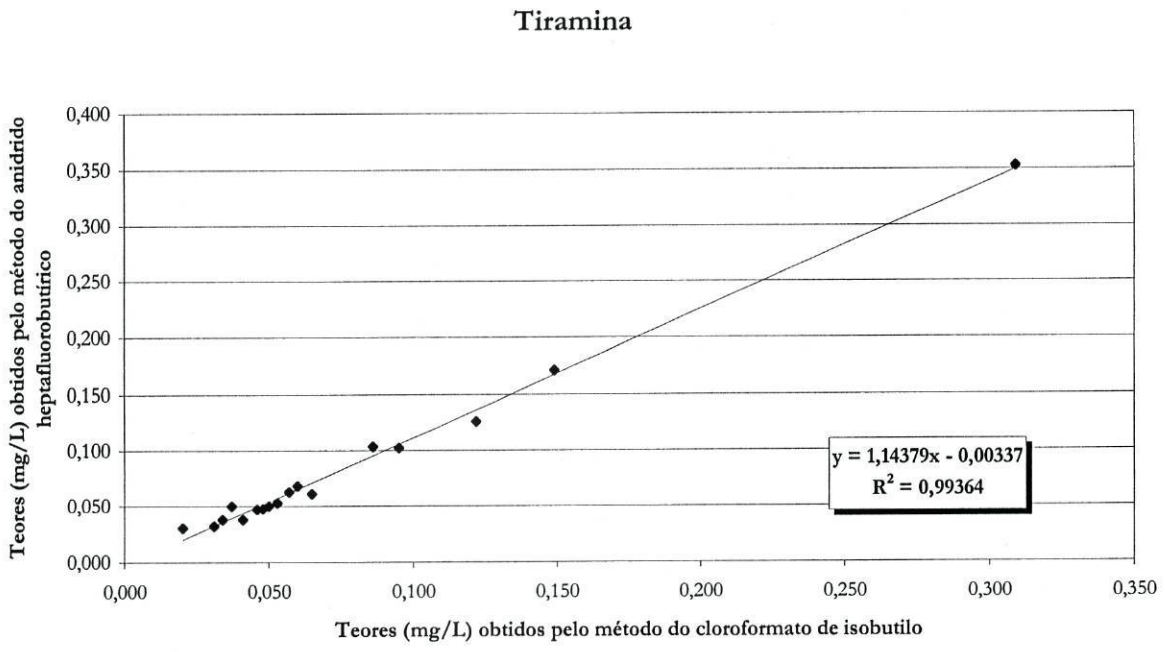


Figura 6.52. Correlação entre os resultados obtidos na determinação dos teores de tiramina em amostras de vinhos e de mostos pelo método descrito neste capítulo (derivatização com cloroformato de isobutilo) e pelo método descrito no capítulo 4 (derivatização com anidrido heptafluorobutírico).

6.5. Conclusões

O método desenvolvido acabou por confirmar as excelentes características apresentadas pelos cloroformatos como reagentes derivatizantes de eleição para a análise de aminas por cromatografia gasosa. As principais vantagens que pensamos serem merecedoras de um destaque especial, consistem em:

a) Possibilidade de se efectuar o processo de derivatização directamente sobre a amostra, dispensando qualquer processo prévio de extracção das aminas em estudo.

b) Possibilidade de se quantificar simultaneamente a grande maioria das aminas biogénicas de interesse dos vinhos, incluindo compostos quimicamente muito diferentes no que respeita à respectiva volatilidade.

c) Excelente comportamento cromatográfico dos derivados obtidos, o que confirma a opinião da generalidade dos autores com trabalho nesta área.

d) Excelentes níveis de sensibilidade, precisão e exactidão demonstrados nos ensaios de validação efectuados para a generalidade dos compostos, para os quais contribuiu a escolha criteriosa efectuada dos padrões internos a usar.

Em relação aos métodos descritos nos dois capítulos anteriores, é de salientar as vantagens apresentadas pelo método aqui em análise no que respeita ao número de aminas passíveis de serem determinadas em simultâneo e à maior simplicidade na execução laboratorial, o que permite atingir rendimentos de trabalho muito superiores.

Tendo em conta as características apresentadas, pensamos tratar-se de um método adequado para se estabelecer como método de referência para a análise de aminas biogénicas no tipo de matrizes em estudo.

Bibliografia

Ahnfelt, N.O., Hartvig, P., Gas chromatographic analysis of primary and secondary amines after derivatization with chloroformates in buffered aqueous solution. ***Acta Pharm. Suec., 17,*** 307 (1980).

Ahnfelt, N.O., Hartvig, P., Two-step derivatization of aminobutyric acids and determination by electron capture gas chroamtography. ***Acta Pharm. Suec., 19,*** 367 (1982).

Ahnfelt, N.O., Hartvig, P., Karlsson, K.-E., Derivatization of amines with chloroformate esters for gas chromatographic analysis. ***Chromatographia, 16,*** 60 (1982).

Dalene, M., Skarping, G., Tinnerberg, H., Biological monitoring of hexamethylene diisocyanate by determination of 1,6-hexamethylene diamine as the trifluoroethyl chloroformate derivative using capillary gas chromatography with thermoionic and selective-ion monitoring. ***J. Cromatogr. B, 656,*** 319 (1994).

Fernandes, J.O., Ferreira, M.A., Determinação simultânea de histamina e de outras aminas biogénicas por cromatografia gasosa na forma de derivados isobutiloxicarbonílicos. Comunicação oral apresentada no X Encontro Luso-Galego de Química, Química Fina e Aplicada, Matosinhos, 27-29 Novembro, 1996.

Fernandes, J.O., Ferreira, M.A., Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 4-(5-)methylimidazole in ammonia caramel colour using ion-pair extraction and derivatization with isobutylchloroformate. ***J. Cromatogr. A, 786,*** 299 (1997).

Fernandes, J.O., Ferreira, M.A., Détermination simultanée de 22 amines biogènes dans les vins de Porto – développement d'une méthode par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrometrie de masse. Comunicação em painel apresentada no XXIII Congrés Mondial de la Vigne et du Vin, Lisboa, 22-27 Junho, 1998.

Fernandes, J.O., Judas, I.C., Oliveira, M.B., Ferreira, Ferreira I.O., Ferreira, M.A., A GC-MS method for the quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. ***Chromatographia, 53,*** S-327 (2001).

Gyllenhaal, O., Johansson, L., Vessman, J., Gas chromatography of epinephrine and norepinephrine after derivatization with chloroformates in aqueous media. ***J. Cromatogr., 190,*** 347 (1980).

Hartvig, P., Karlsson, K.-E., Johansson, L., Lindberg, C., Determination of pethidine in plasma by electron capture gas chromatography after reaction with trichloroethyl chloroformate. ***J. Cromatogr., 121,*** 235 (1976a).

Hartvig, P., Handl, W., Vessman, J., Svahn, C.M., Electron capture gas chromatography of tertiary amines as pentafluorobenzyl carbamates. ***Anal. Chem., 48,*** 390 (1976b).

Hartvig, P., Vessman, J., Electron capture gas chromatography of tertiary amines after a demethylation reaction. II. Studies of different chloroformates and alternative hydrolysis. ***Acta Pharm. Suec., 11,*** 115 (1974a).

Hartvig, P., Vessman, J., ***Anal. Lett., 7,*** 223 (1974b) (citado por Hartvig *et al.*, 1976b).

Hartvig, P., Vessman, J., ***J. Cromatog. Sci., 12,*** 722 (1974c) (citado por Hartvig *et al.*, 1976b).

Husek, P., Amino acid derivatization and analysis in five minutes. ***FEBS Letters, 280,*** 354 (1991a).

Husek, P., Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. ***J. Chromatogr., 552,*** 289 (1991b)

Husek, P., Fast derivatization with chloroformates for gas chromatographic analysis. ***LC-GC Int., 5,*** 43 (1992).

Husek, P., Capillary GC analysis of biogenic amines, their precursors and catabolytes after fast derivatization with ethyl chloroformate. ***J. Microcol. Sep., 5,*** 101 (1993).

Husek, P., Review – Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. ***J. Cromatogr. B, 717,*** 57 (1998).

Husek, P., Rijks, J.A., Leclercq, P.A., Cramers, C.A., Fast esterification of fatty acids with alkyl chloroformates. Optimization and application in gas chromatography. ***J. High. Resolut. Chromatogr., 13,*** 633 (1990).

Husek, P., Huang, Z.-H., Sweeley, C., Gas chromatographic determination of amines, aminoalcohols and acids after treatment with alkyl chloroformates. ***Anal. Chim. Acta, 259,*** 185 (1992).

Jonsson, J., Kronstrand, R., Hatanpää, M., A convenient derivatization method for the determination of amphetamine and related drugs in urine. ***J. Forens. Sci, 41,*** 148 (1996).

Karlsson, K.-E., ***J. Chromatogr., 219,*** 373 (1981) (citado por Ahnfelt *et al.*, 1982)

Karlsson, K.-E., Hartvig, P., ***Acta Pharm. Suec., 18,*** 337 (1981) (citado por Ahnfelt *et al.*, 1982)

Kataoka, H., Matsumura, S., Koizumi, H., Makita, M, Rapid and simultaneous analysis of protein and non-protein amino acids as N(O,S)-isobutoxycarbonyl methyl ester derivatives by capillary gas chromatography. ***J. Chromatogr. A, 758,*** 167 (1997a).

Kataoka, H., Matsumura, S., Makita, M, Determination of amino acids in biological fluids by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphurus selective detection. ***J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 15,*** 1271 (1997b).

Kim, K.R., Paik, M.J., Kim, J.H., Dong, S.W., Jeong, D.H., Rapid gas chromatographic profiling and screening of biologically active amines. ***J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 15,*** 1309 (1997).

Kronstrand, R., Hatanpää, M., Jonsson, J., Determination of phenmetrazine in urine by gas chromatography-mass spectrometry. ***J. Anal. Toxicol., 20,*** 277 (1996).

Lundh, T., Akesson, B., Gas chromatographic determination of primary and secondary low-molecular-mass aliphatic amines in urine using derivatization with isobutyl chloroformate. ***J. Cromatogr., 617,*** 191 (1993).

Makita, M., Yamamoto, S., Kõno, K., Gas-liquid chromatographic analysis of protein amino acids as N-isobutyloxycarbonyl amino acid methyl esters. ***J. Cromatogr., 120,*** 129 (1976).

Makita, M., Yamamoto, S., Miyake, M., Masamoto, K., Practical gas chromatographic method for the determination of urinary poliamines. ***J. Cromatogr., 156,*** 340 (1978).

Makita, M., Yamamoto, S., Kiyama, S., Improved gas-liquid chromatographic method for the determination of protein amino acids. ***J. Cromatogr., 237,*** 279 (1982).

Matsumura, S., Kataoka, H., Makita, M., Determination of amino acids in human serum by capillary gas chromatography. ***J. Cromatogr. B, 681,*** 375 (1996).

Skarping, G., Bellander, T., Mathiasson, L., Determination of piperazine in working atmosphere and in human urine using derivatization and capillary gas chromatography with nitrogen and mass selective detection. ***J. Cromatogr., 370,*** 245 (1986).

Skarping, G., Dalene, M., Brorson, T., Sandström, J.F., Sangö, C., Tiljander, A., Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to the biological monitoring of isocyanates and amines. 1. Determination of 1,6-hexamethylenediamine using glass capillary gas chromatography and thermionic specific detection. ***J. Cromatogr., 479,*** 125 (1989).

Ugland, H.G., Krogh, M., Rasmussen, K.E., Aqueous alkylchloroformate derivatization and solid-pahse microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. ***J. Cromatogr. B, 701,*** 29 (1997).

Yamamoto, S., Kakuno, K., Okahara, S., Kataoka, H., Makita, M., Gas chromatography of phenolic amines, 3-methoxycatecholamines, indoleamines and related amines as their N,O-ethyloxycarbonyl derivatives. ***J. Cromatogr., 194,*** 399 (1980).

Yamamoto, S., Itano, H., Kataoka, H., Makita, M., Gas-liquid chromatographic method for analysis of di-and polyamines. ***J. Agric. Food Chem., 30,*** 435 (1982).

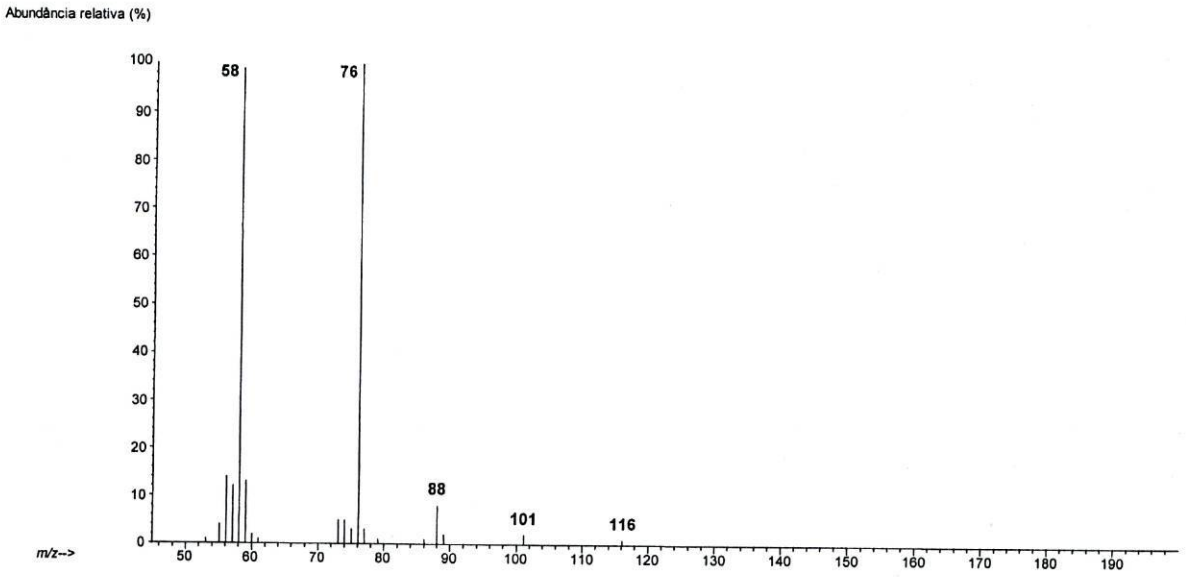
Yamamoto, S., Iwado, A., Hashimoto, Y., Aoyama, Y., Makita, M., Gas chromatography-mass spectrometry of polyamines as their N-ethyloxycarbonyl derivatives and identification of sym-homospermidine and sym-norspermine in mosses and ferns. ***J. Cromatogr., 303,*** 99 (1984).

CAPÍTULO 6

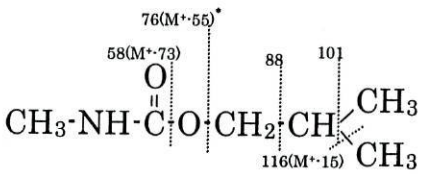
ANEXO 1

ESPECTROS DE MASSA DOS DERIVADOS ISOBUTOXICARBONÍLICOS (CARBAMATOS) DAS AMINAS BIOGÉNICAS ESTUDADAS

METILAMINA

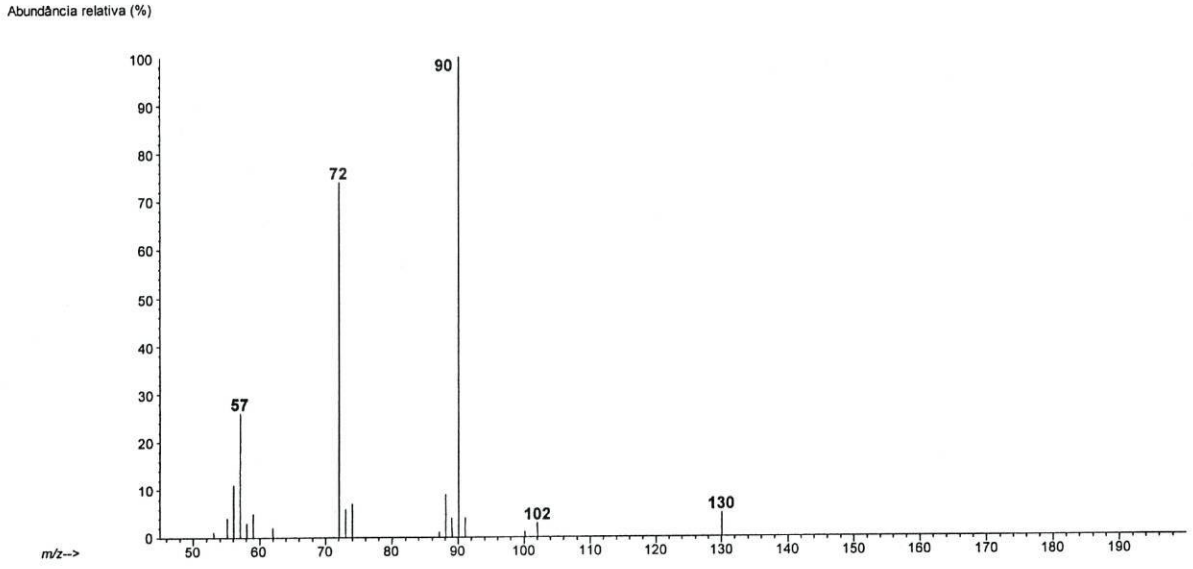


$M^+ = 131$

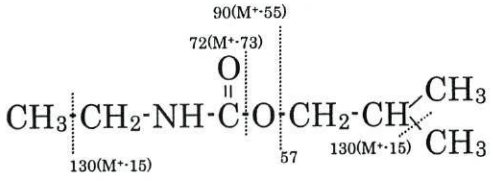


* Fragmento que resulta de ruptura seguida de estabilização com dois átomos de hidrogénio adicionais. Ver estrutura no texto final. Em muitos casos é acompanhado pela presença com menor intensidade dos iões correspondentes a M^+-56 e M^+-57. Como se trata de uma característica comum à maioria dos espectros que se apresentam a seguir, esta indicação serve também para os restantes.

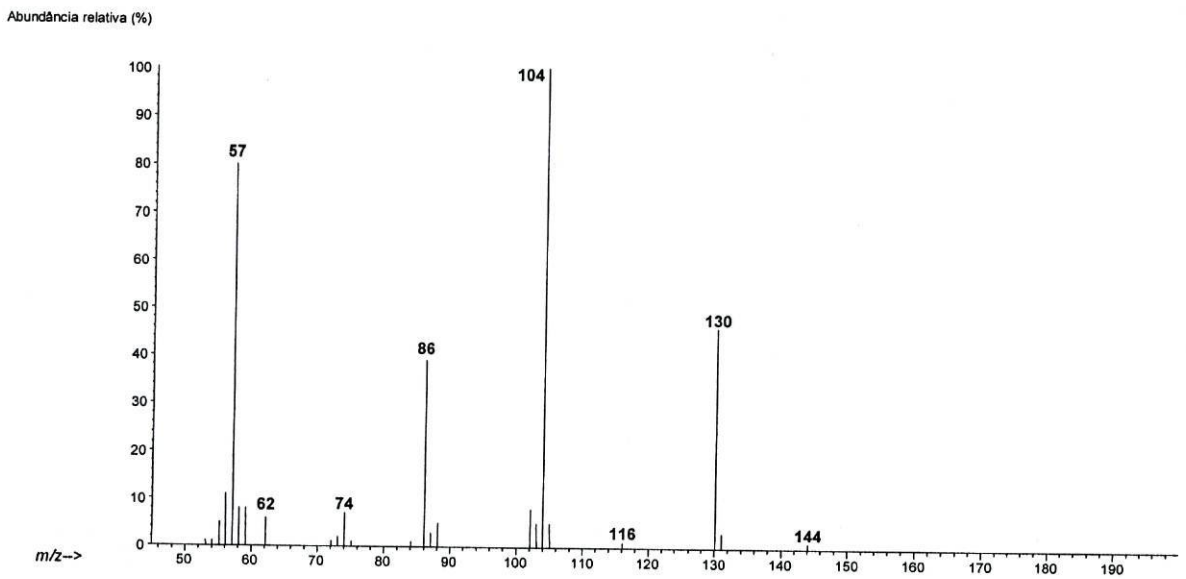
ETILAMINA



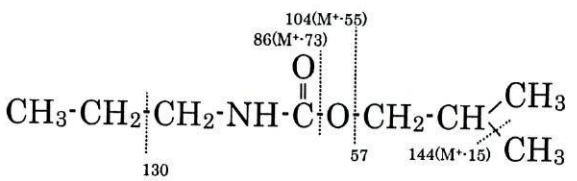
$M^+ = 145$



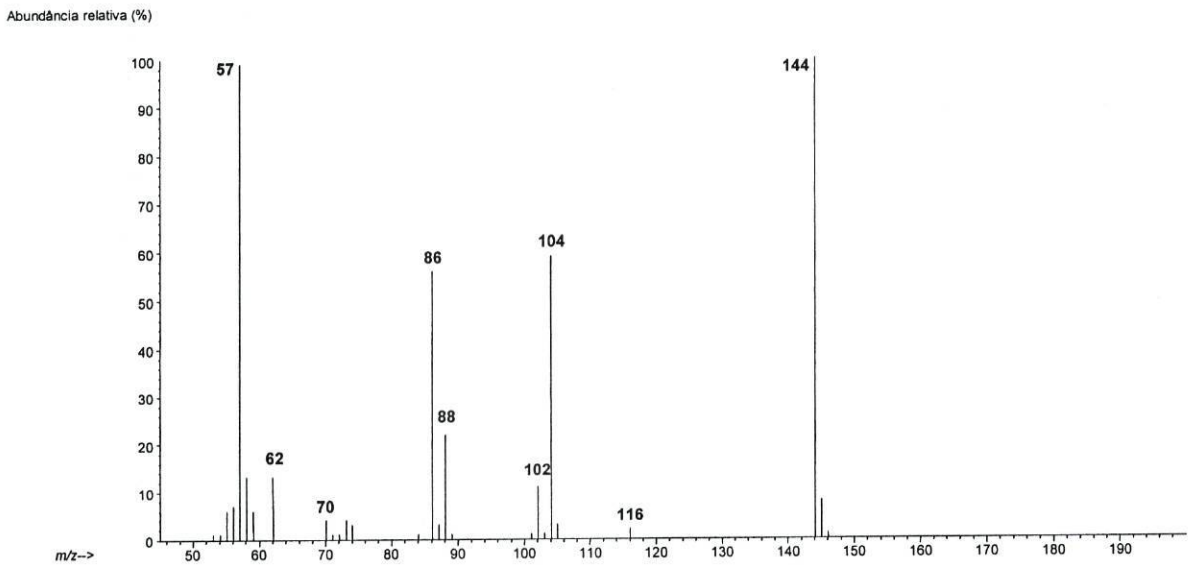
PROPILAMINA



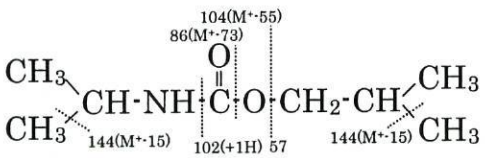
$M^+ = 159$



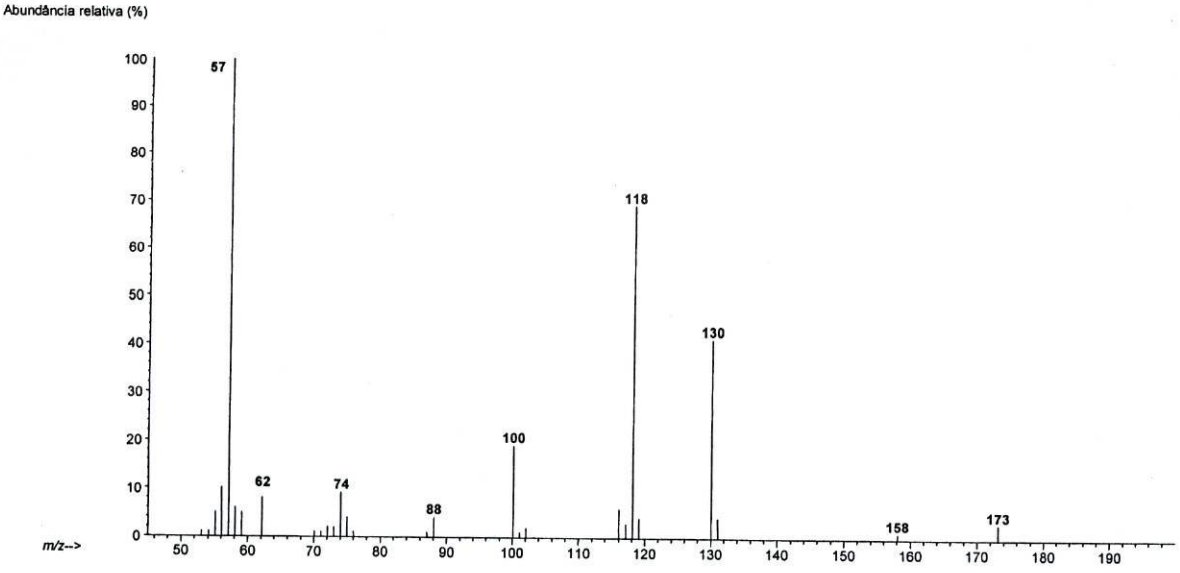
ISOPROPILAMINA



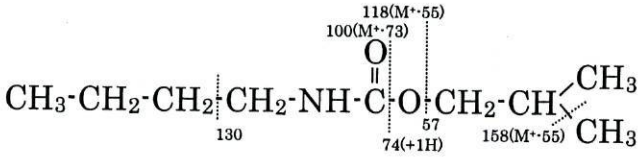
$M^+ = 159$



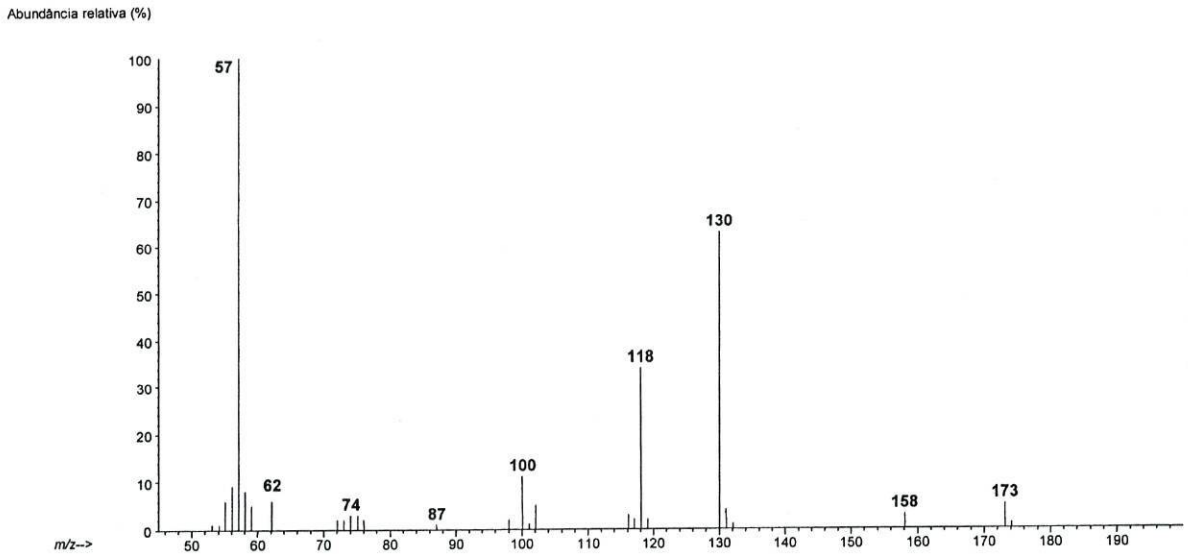
BUTILAMINA



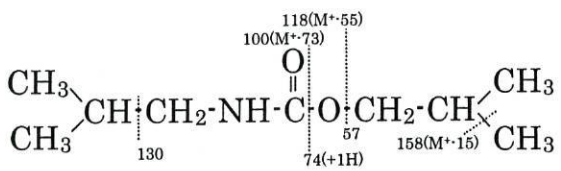
$M^+ = 173$



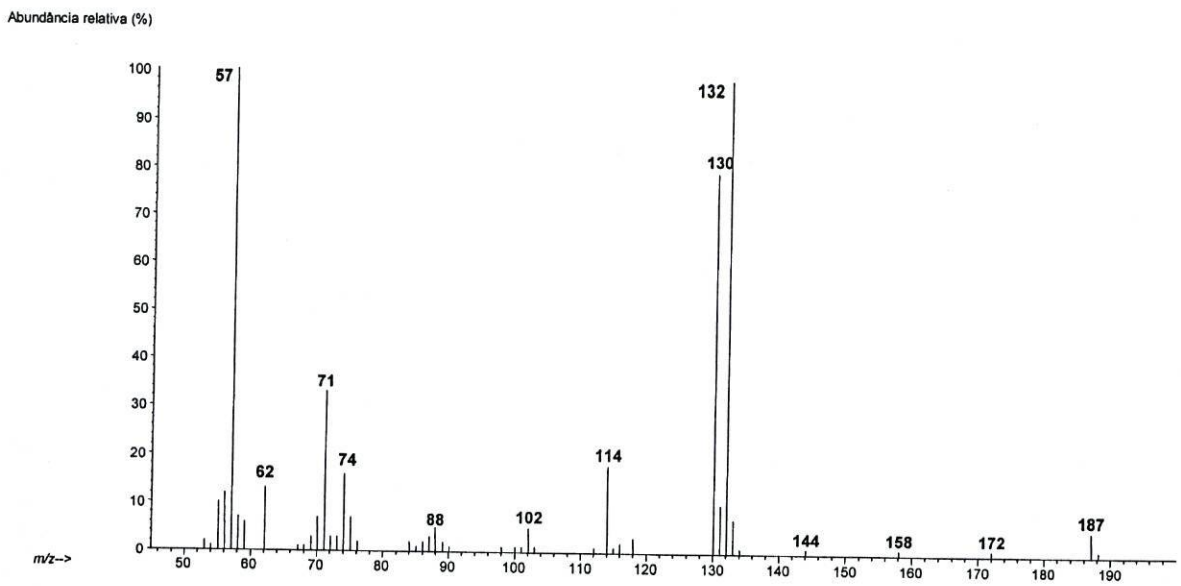
ISOBUTILAMINA



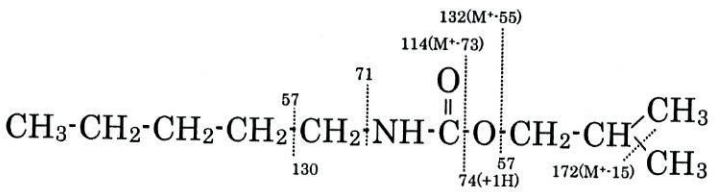
$M^+ = 173$



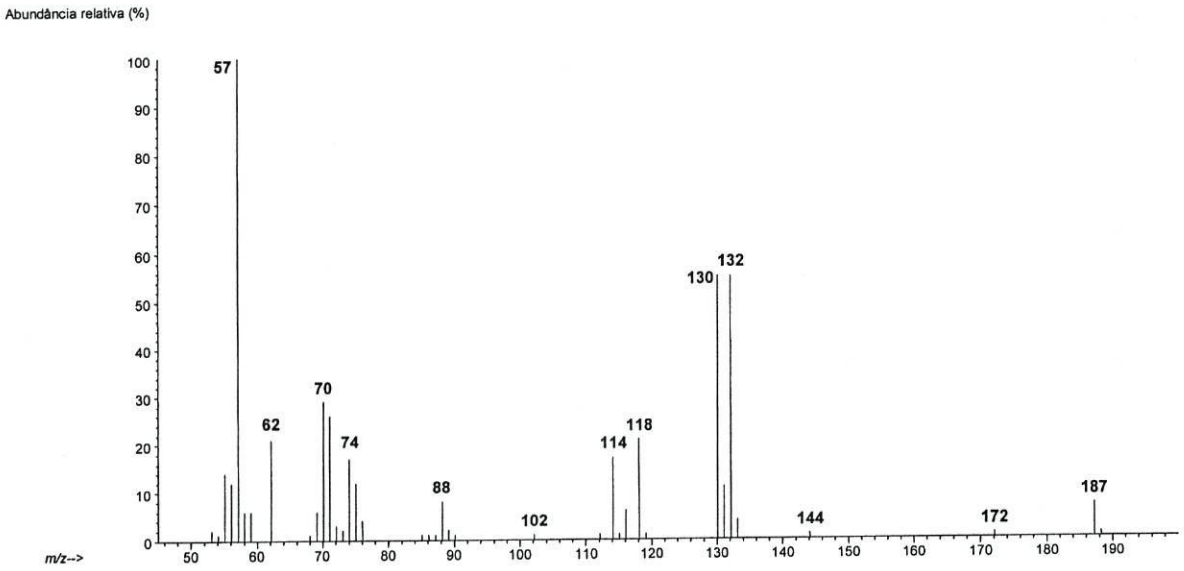
AMILAMINA



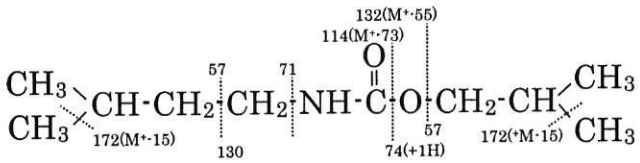
$M^+ = 187$



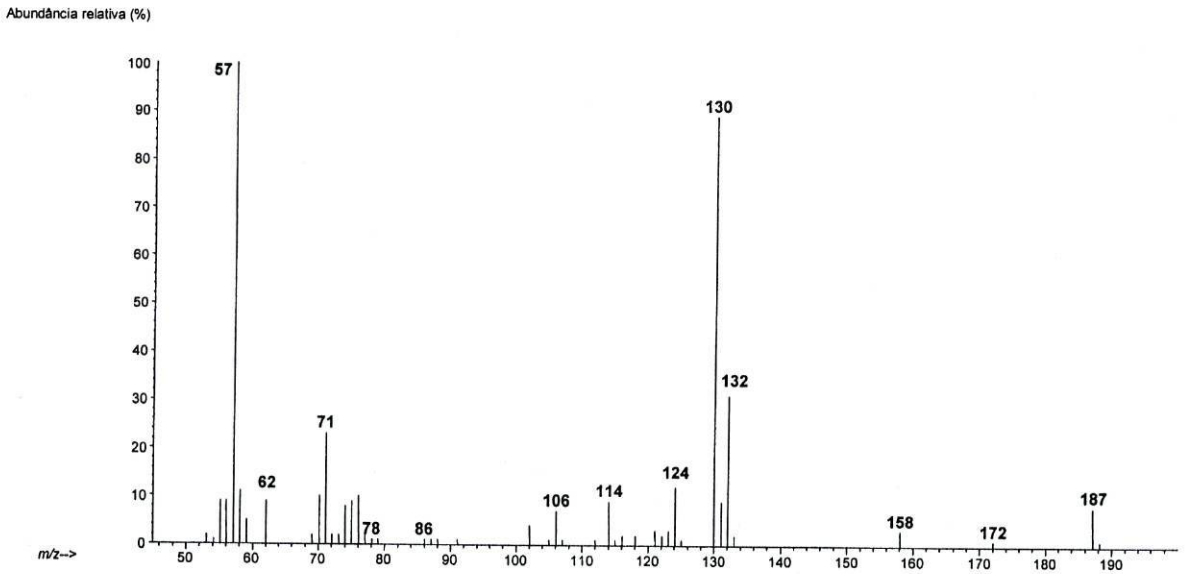
ISOAMILAMINA



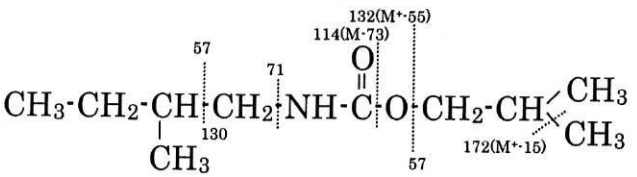
$M^+ = 187$



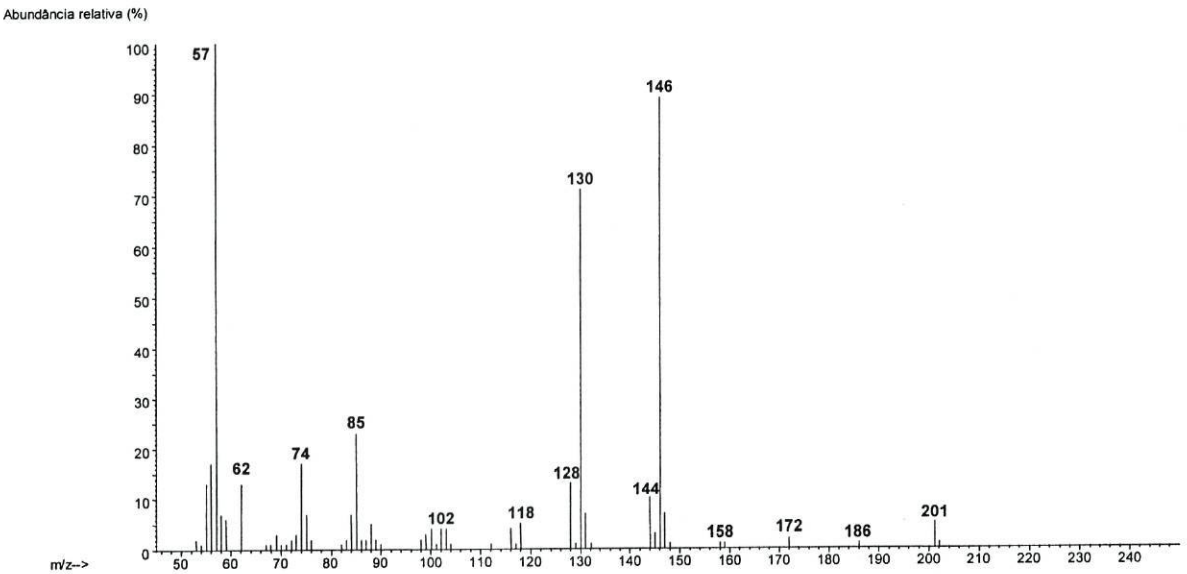
2-METILBUTILAMINA



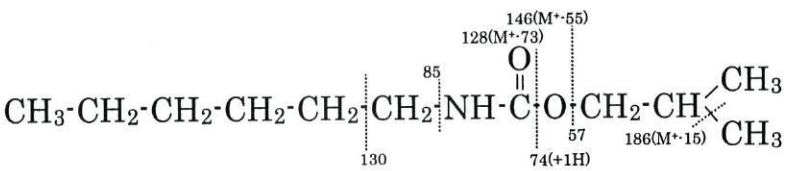
$M^+ = 187$



HEXILAMINA

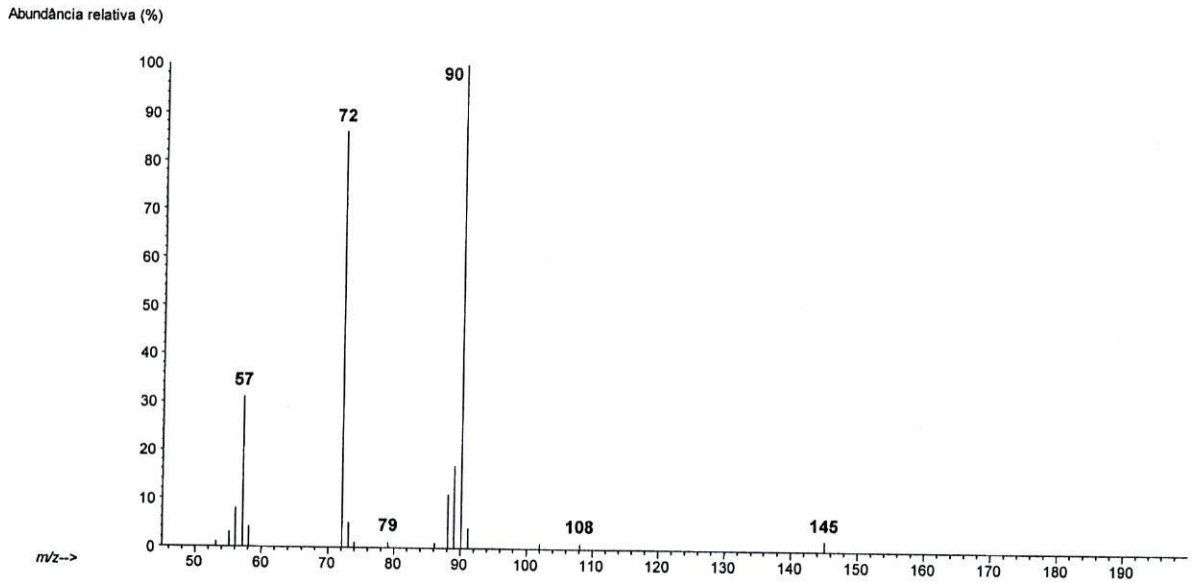


$M^+ = 201$

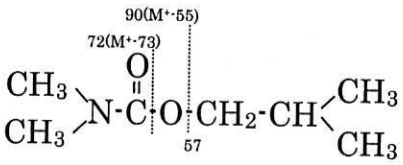


Não conseguimos encontrar explicação para o facto de não se encontrar no espectro qualquer ião complementar do ião *m/z* 130 (*m/z* 70 ou 71), que é um dos mais abundantes, e, pelo contrário, se verificar a presença com uma intensidade razoável do ião *m/z* 85, correspondente à ruptura da ligação C–N.

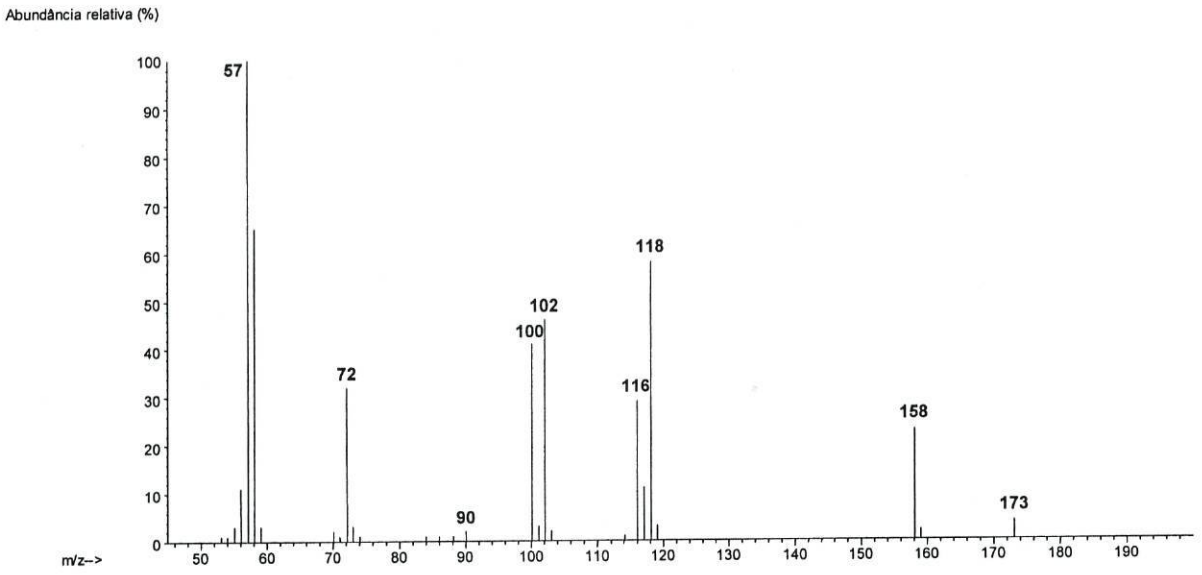
DIMETILAMINA



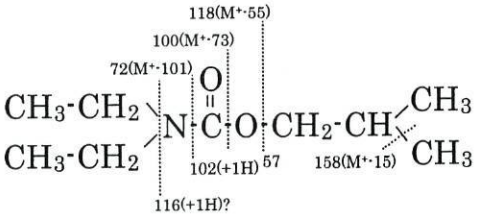
$M^+ = 145$



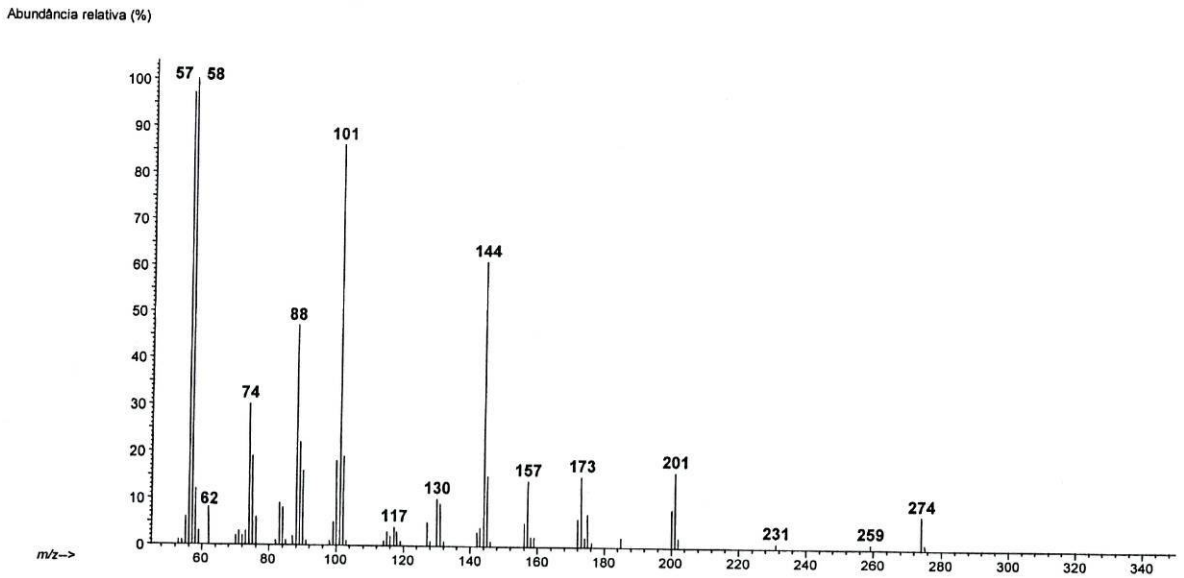
DIETILAMINA



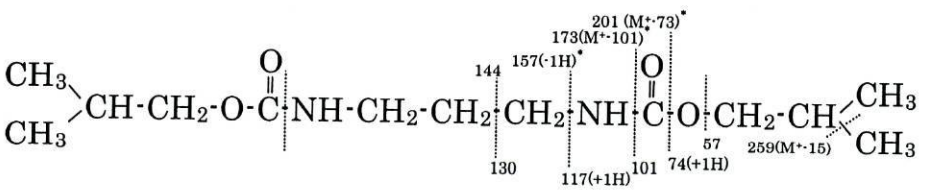
$M^+ = 173$



1,3-DIAMINOPROPANO

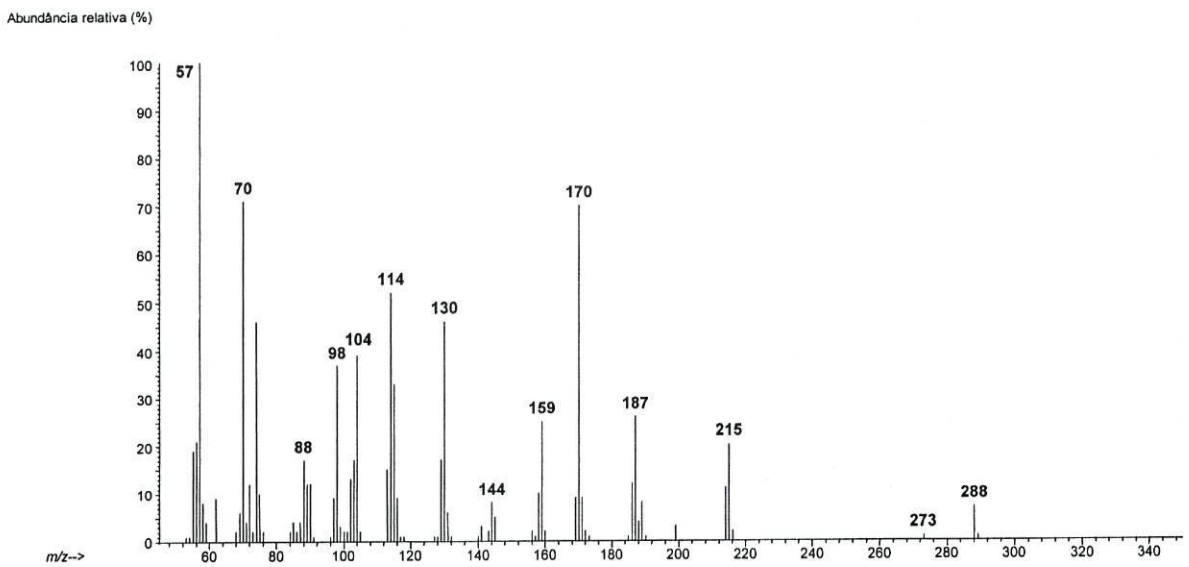


$M^+ = 274$

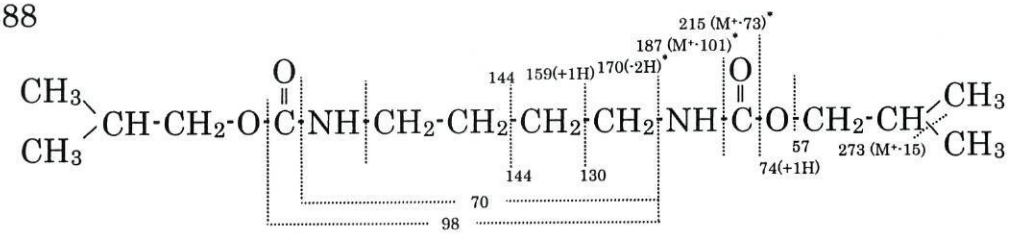


* Os iões *m/z* 58, *m/z* 74 e *m/z* 101 resultam, muito provavelmente, da perda da porção terminal do respectivo fragmento, correspondente ao grupo derivatizante (*m/z* 101), com estabilização subsequente por captação de 1 ou 2 átomos de hidrogénio.

PUTRESCINA



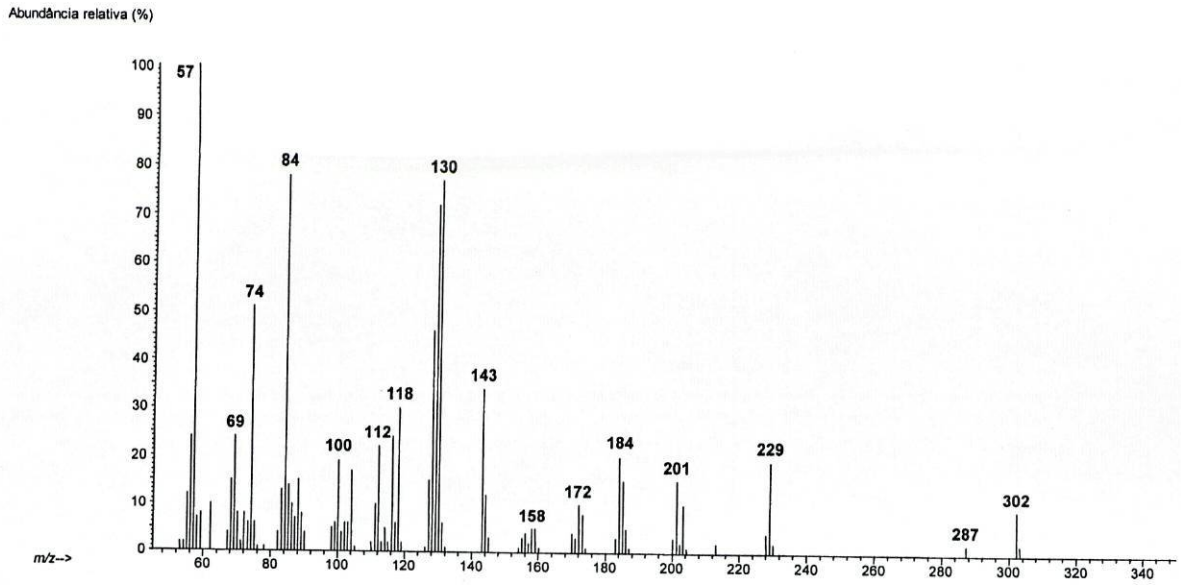
$M^+ = 288$



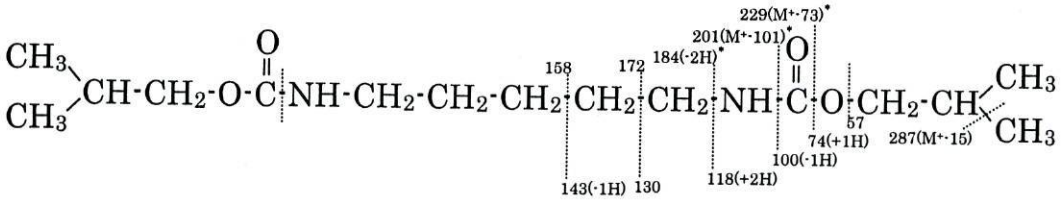
* Os iões *m/z* 70, *m/z* 88 e *m/z* 114 resultam, provavelmente, da perda da porção terminal do respectivo fragmento, correspondente ao grupo derivatizante (*m/z* 101), com estabilização subsequente por captação de 1 ou 2 átomos de hidrogénio.

Os fragmentos com *m/z* 70 (170) e 98, apresentam, provavelmente, uma estrutura cíclica com 4 átomos de carbono e um átomo de azoto, idênticas às apresentadas no espectro de massa do derivado da pirrolidina. Daí o facto de o espectro de massa da [$^2H_8$]putrescina (ver na página 391) não apresentar um ião com *m/z* 78 (+ 8 dalton provenientes dos 8 átomos de deutério) mas antes, iões com intensidades relativas semelhantes, com *m/z* 76 e *m/z* 77, um pouco à semelhança com o observado para o isótopo octadeuterado da pirrolidina (embora nesse caso apenas se observasse o ião *m/z* 77). Por outro lado, o referido composto apresenta um ião com *m/z* 106, neste caso com a esperada diferença de 8 dalton.

CADAVERINA

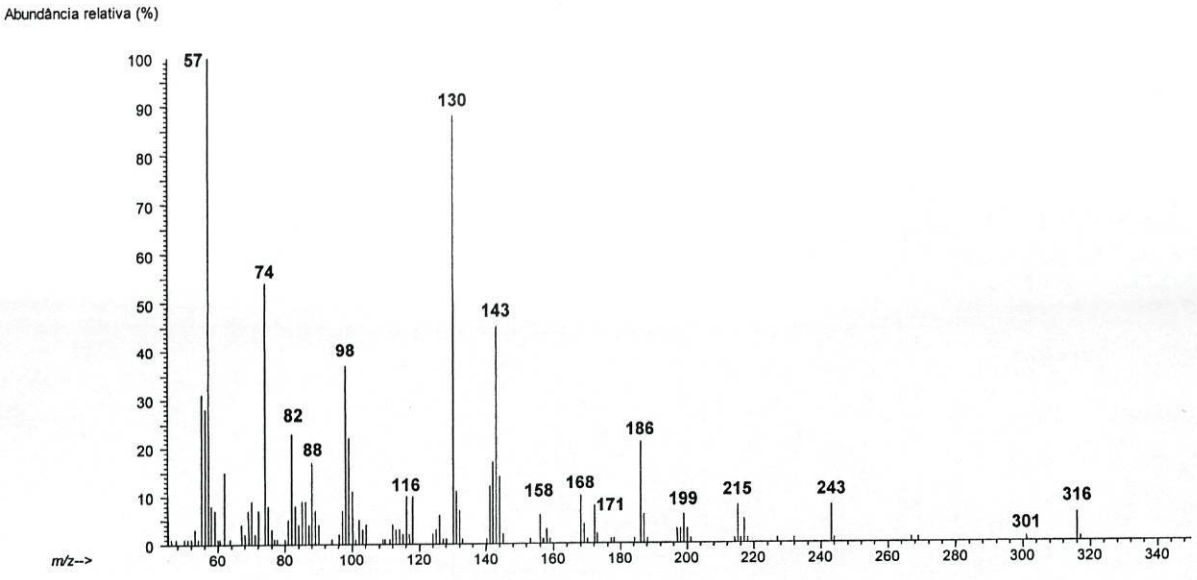


$M^+ = 302$

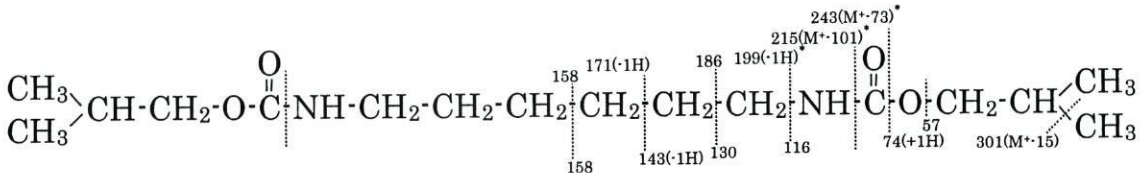


* A exemplo do referido nos dois espectros anteriores, os iões *m/z* 84, *m/z* 100 e *m/z* 129 resultam, provavelmente, da perda do grupo derivatizante (*m/z* 101) a partir dos iões assinalados.

1,6-DIAMINOHEXANO



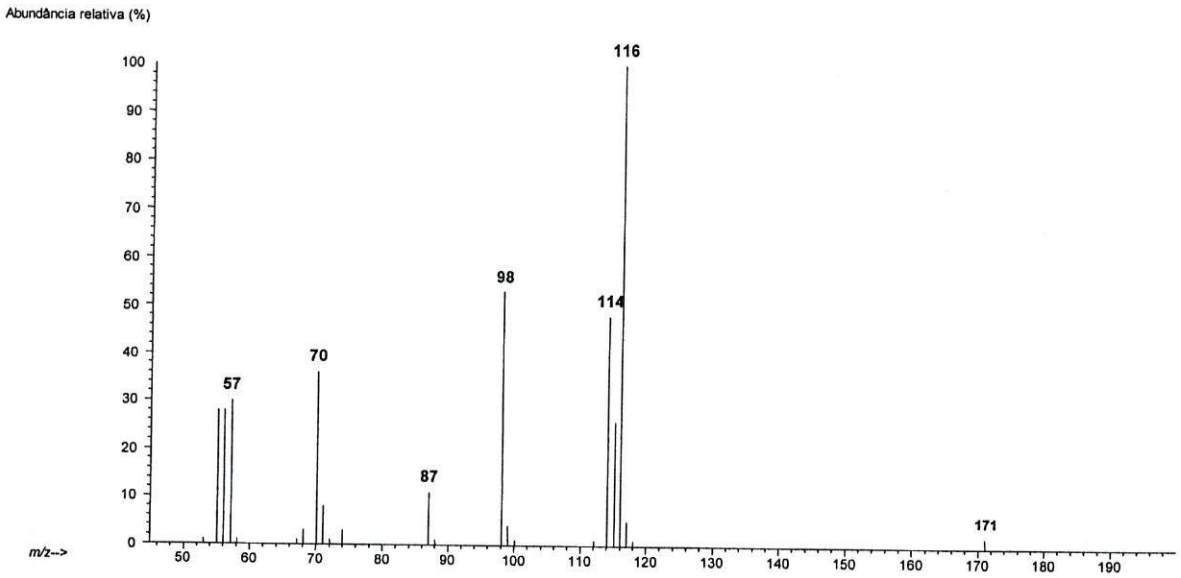
$M^+ = 316$



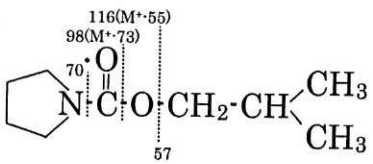
* A exemplo do referido para as outras diaminas, os iões *m/z* 98, *m/z* 116 e *m/z* 143 podem resultar da perda do grupo derivatizante (*m/z* 101) a partir dos iões assinalados.

Possível estrutura do fragmento *m/z* 82 — CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CN

PIRROLIDINA



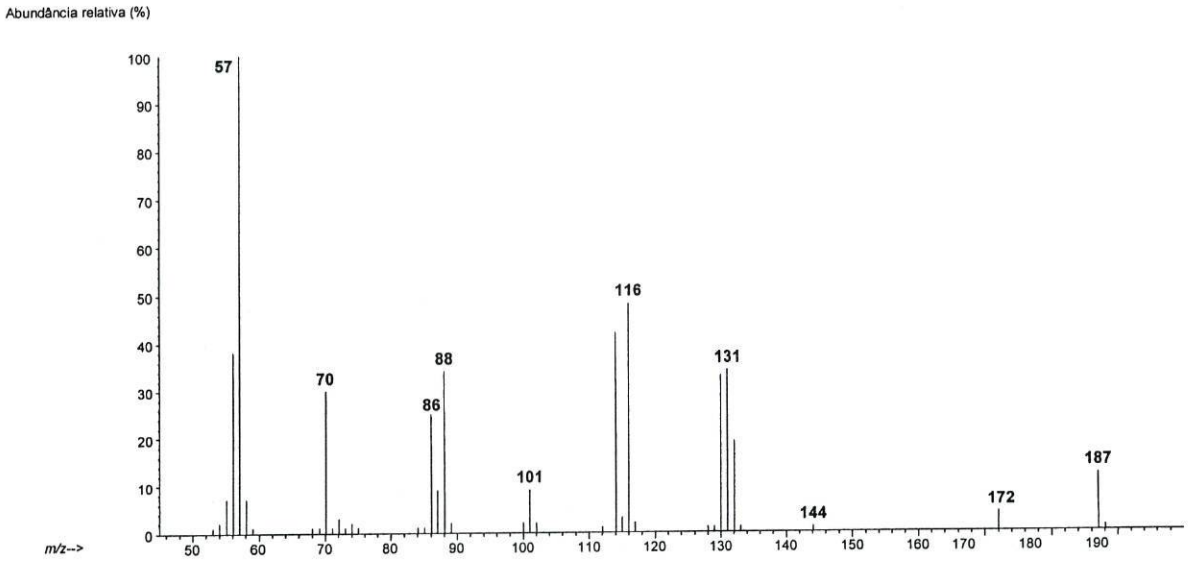
$M^+ = 171$



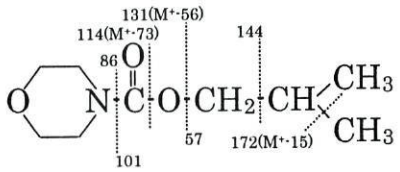
* O facto do espectro de massa do isótopo [$^2H_8$]pirrolidina (ver na página 392) apresentar um fragmento correspondente com *m/z* 77 e não 78, como seria de esperar atendendo à presença de 8 átomos de deutério, indica-nos que a estabilização do fragmento deverá ser conseguida à custa da perda de um átomo de hidrogénio ligado a um dos átomos de carbono da estrutura cíclica, ficando este carregado positivamente, enquanto o átomo de azoto é protonado com um hidrogénio proveniente de outra porção da molécula.

O ião *m/z* 87 deverá corresponder a um fragmento proveniente da fragmentação do ião *m/z* 116 por ruptura da estrutura heterocíclica.

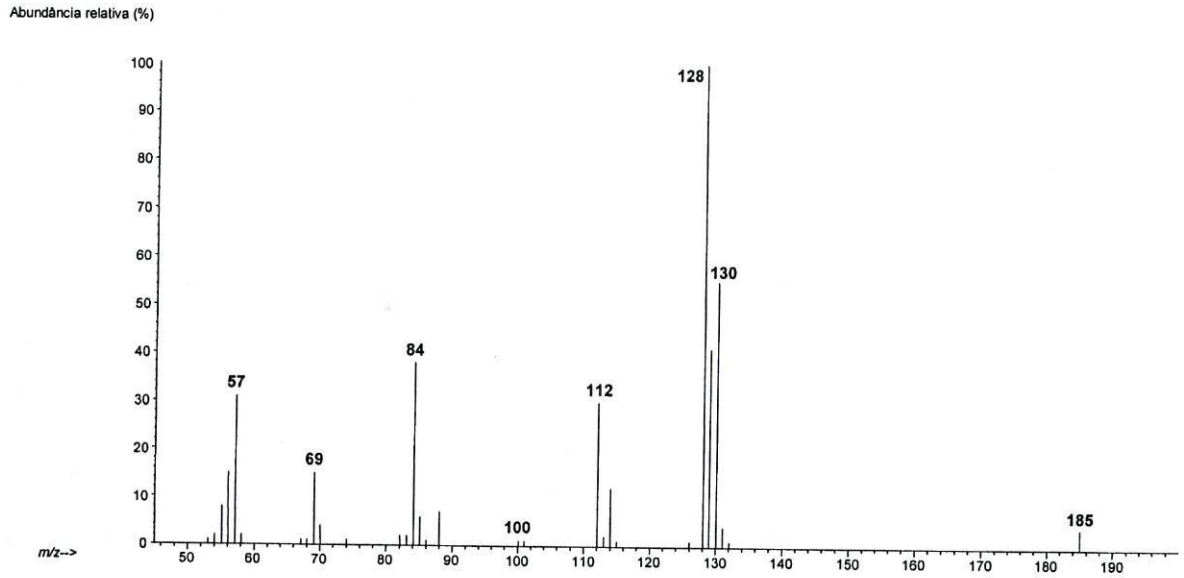
MORFOLINA



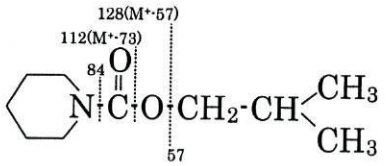
$M^+ = 187$



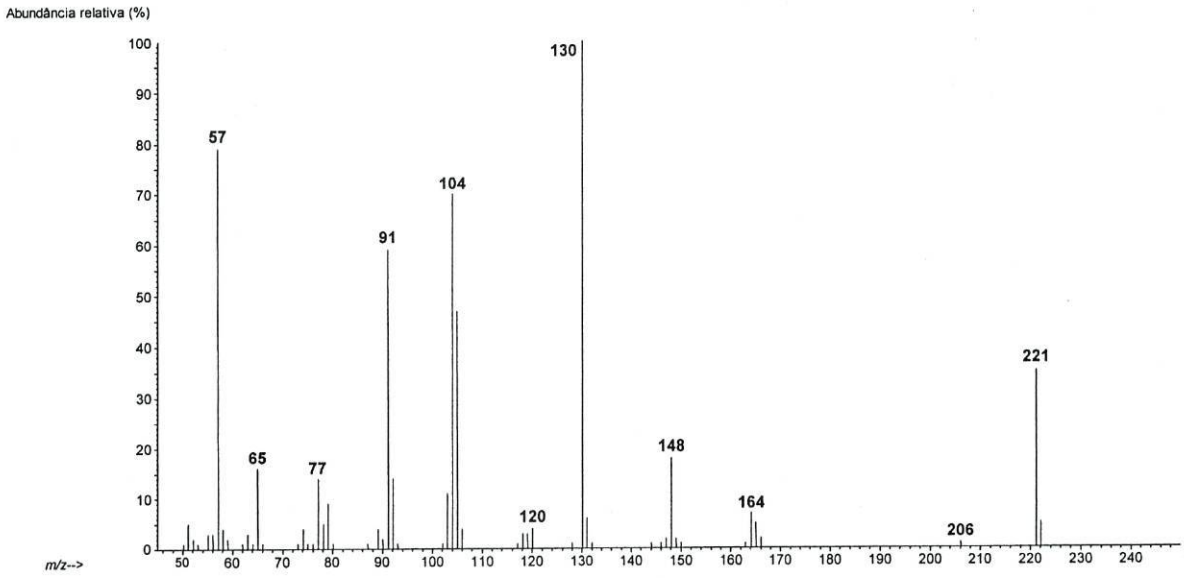
PIPERIDINA



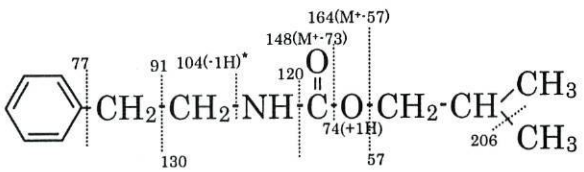
$M^+ = 185$



2-FENILETILAMINA

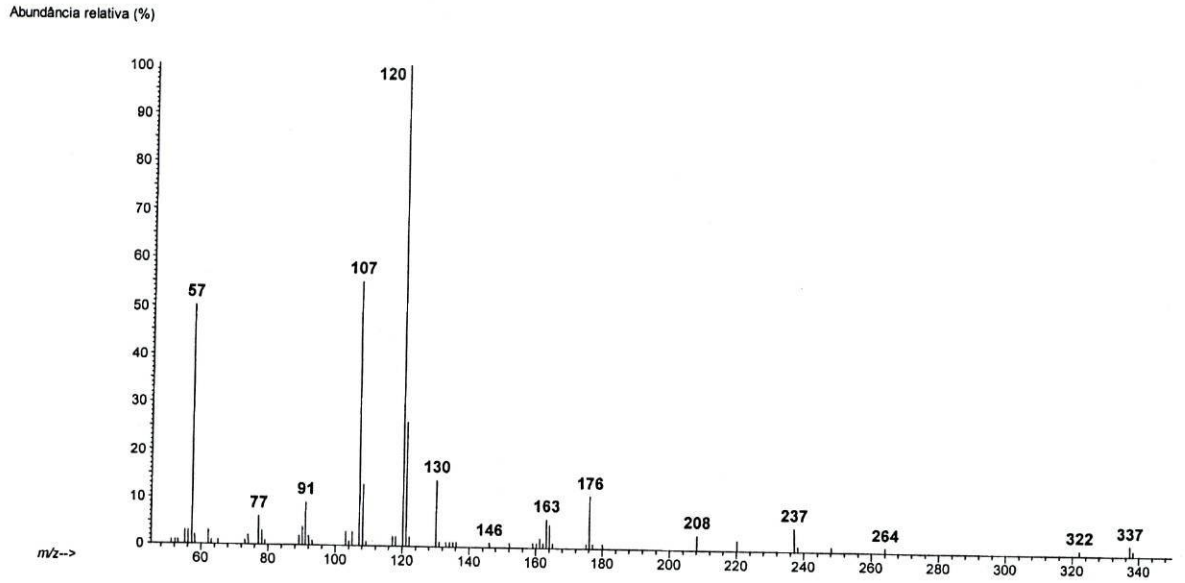


$M^+ = 221$

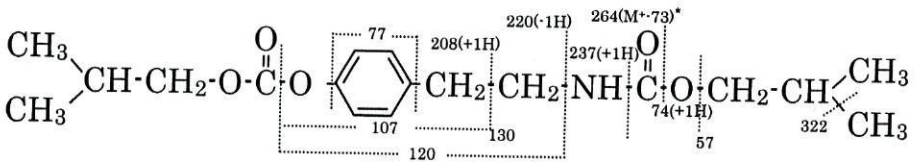


* Para estrutura do ião *m/z* 104 ver texto no final.

TIRAMINA

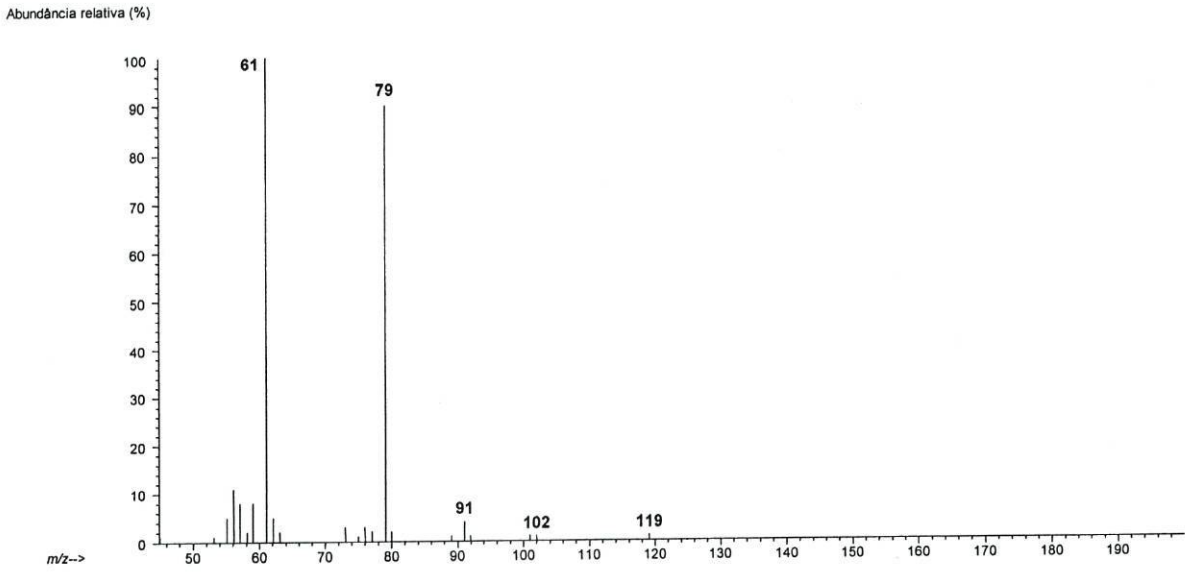


$M^+ = 337$

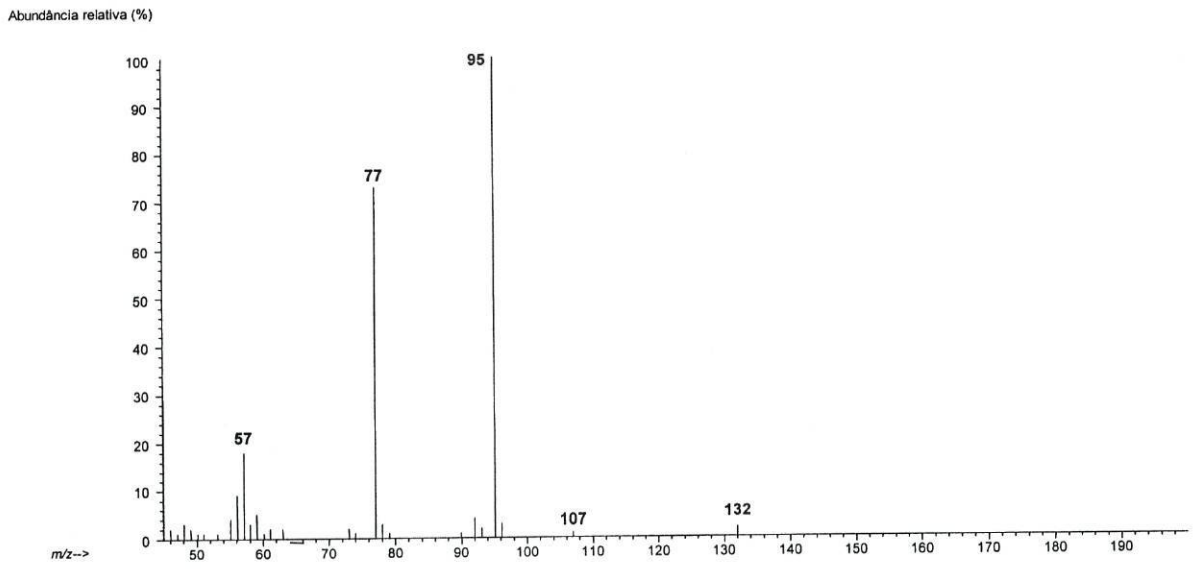


* O ião *m/z* 163 pode resultar da perda do grupo derivatizante (*m/z* 101) a partir do ião assinalado. O mesmo se passa com os pares de iões *m/z* 220 / *m/z* 120 e *m/z* 208 / *m/z* 107, embora nesses casos os tenhamos assinalado na figura.

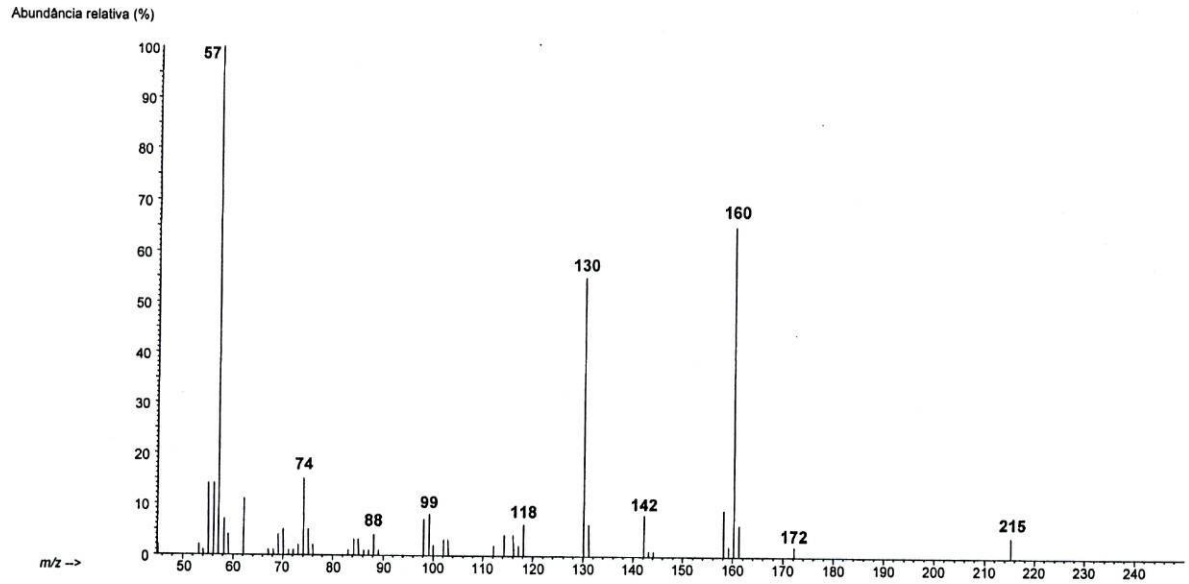
[$^2H_3$]METILAMINA



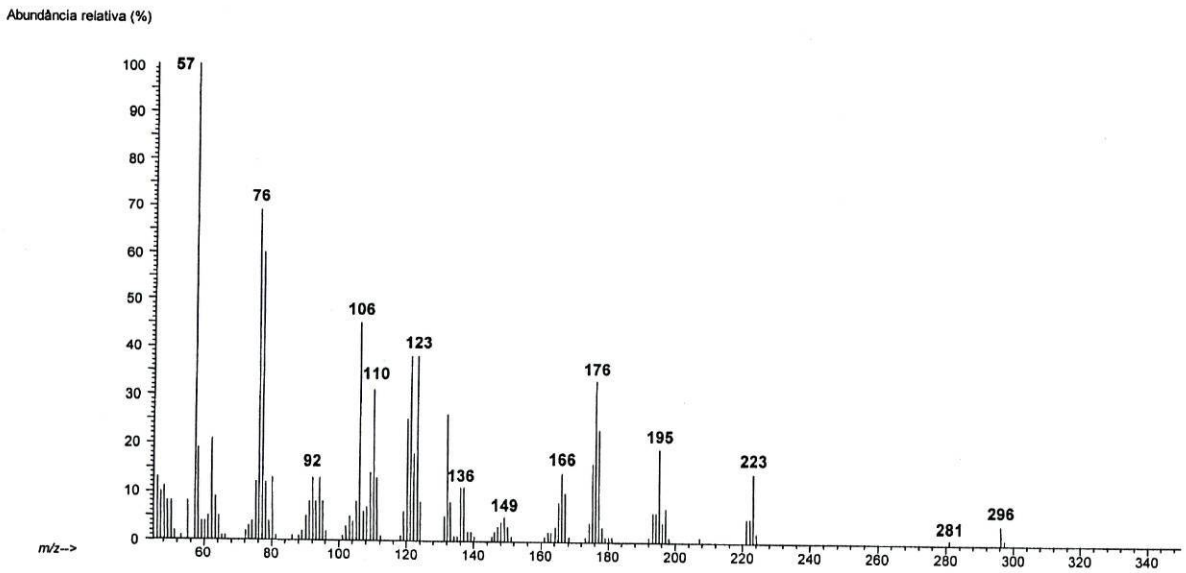
[$^2H_5$]ETILAMINA



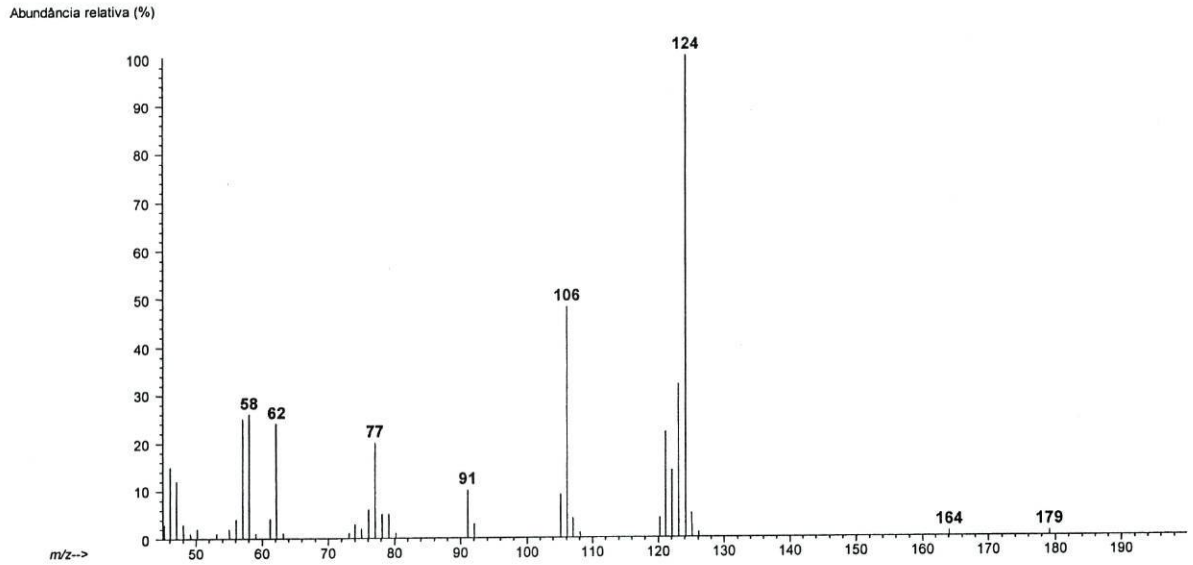
HEPTILAMINA



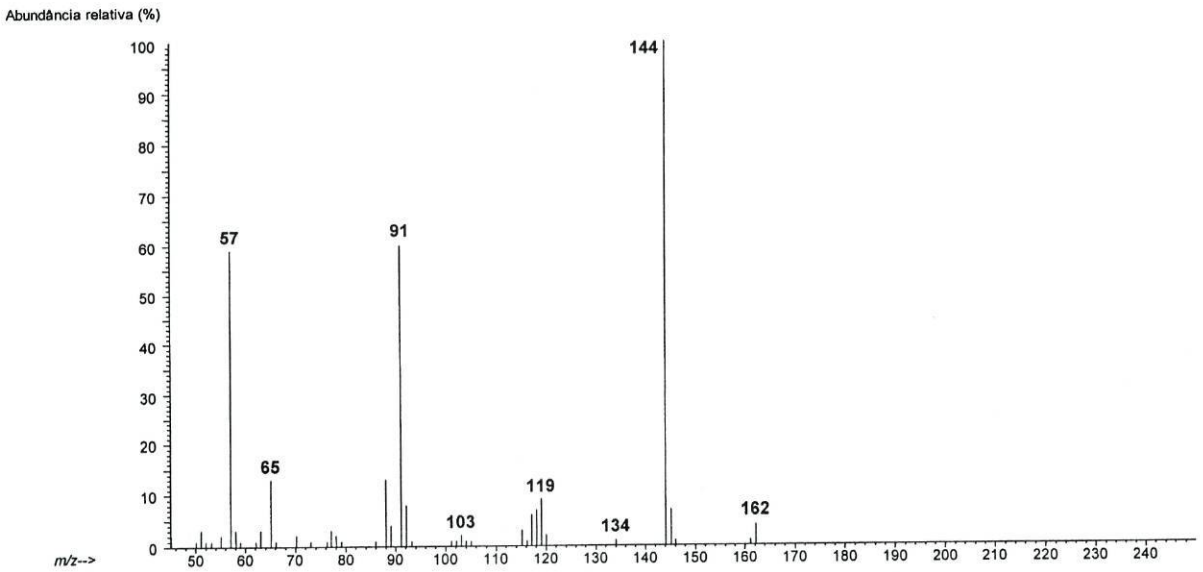
[$^2H_8$]PUTRESCINA



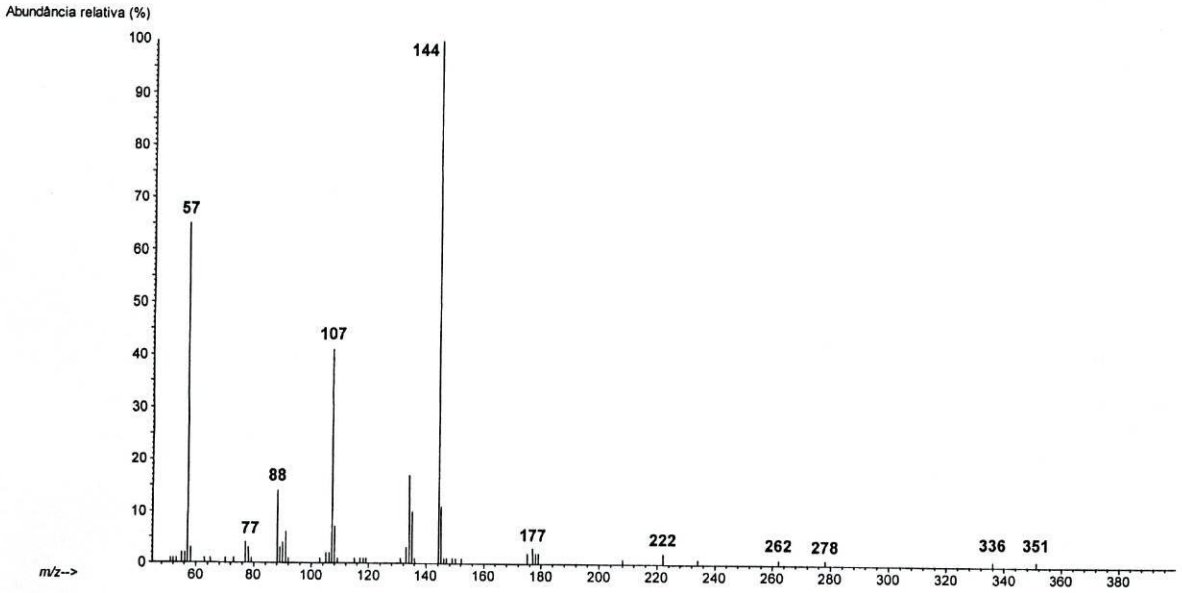
$[^2H_8]$PIRROLIDINA



ANFETAMINA



HIDROXIANFETAMINA



Breve estudo dos espectros de massa apresentados

Na Tabela 6.A1.1 são apresentados de forma esquemática, em termos de valores de *m/z* e da respectiva intensidade relativa, os principais fragmentos dos espectros de massa das moléculas dos derivados isobutoxicarbonílicos (carbamatos) usados para fins analíticos. De forma a facilitar a leitura, dividiram-se os compostos em 5 grupos, correspondentes, respectivamente, a aminas alifáticas primárias, aminas alifáticas secundárias, diaminas, aminas alicíclicas e aminas aromáticas.

Os aspectos que nos parecem mais relevantes nos espectros obtidos resumem-se nos seguintes pontos:

1. A presença do ião molecular é comum à generalidade dos compostos, embora com uma intensidade relativa pequena, geralmente inferior a 10 %. As excepções correspondem às aminas primárias de mais baixa massa molecular – metilamina, etilamina, propilamina e isopropilamina – nas quais não se conseguem observar os respectivos iões moleculares, e à morfolina e 2-feniletilamina, que apresentam iões moleculares com intensidade relativa superior a 10 %, com particular evidência para a última (35 %).

TABELA 6.A1.1

PRINCIPAIS IÕES DOS ESPECTROS DE MASSA DOS DERIVADOS ISOBUTOXICARBONÍLICOS DAS AMINAS BIOGÉNICAS ESTUDADAS

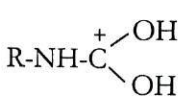
Amina	MM	[M⁺]	Ião Base	M-15	M-55	M-57	M-73	M-101	M-173	Outros iões importantes
Metilamina	31	131(-)	76	116(1)	76(100)	74(5)	58(99)	30(a)	-	56(14), 57(12), 88(8), 101(2)
Etilamina	45	145(-)	90	130(6)	90(100)	88(9)	72(74)	44(a)	-	57(26), 56 (11), 88(9), 74(7)
Propilamina	59	159(-)	104	144(1)	104(100)	102(9)	86(39)	58(8)	-	57(80), 130(47), 74(8)
Isopropilamina	59	159(-)	144	144(100)	104(60)	102(11)	86(57)	58(13)	-	57(99), 88(22), 62(13)
Butilamina	73	173(3)	57	158(1)	118(70)	116(5)	100(20)	72(2)	-	130(41), 74(9), 62(8), 88(4)
Isobutilamina	73	173(5)	57	158(3)	118(34)	116(3)	100(11)	72(2)	-	130(63), 62(6), 102(5)
Amilamina	87	187(5)	57	172(1)	132(99)	130(80)	114(18)	86(2)	-	71(33), 74(16), 62(13), 88(5), 102(5)
Isoamilamina	87	187(8)	57	172(1)	132(56)	130(56)	114(17)	86(1)	-	70(29), 71(27), 62(21), 118(21), 74(18), 88(8)
2-Metilbutilamina	87	187(8)	57	172(1)	132(31)	130(89)	114(10)	86(1)	-	71(24), 124(12), 62(9), 106(8), 102(4), 158(3)
Hexilamina	101	201(6)	57	186(1)	146(90)	144(11)	128(13)	100(4)	-	130(72), 85(23), 74(17), 62(13)
Dimetilamina	45	145(2)	90	-	90(100)	88(11)	72(86)	44(a)	-	57(31)
Dietilamina	73	173(4)	57	158(24)	118(58)	116(30)	100(41)	72(32)	-	58(65), 102(46)
1,3-Diaminopropano	74	274(8)	58	259(1)	-	-	201(16)	173(15)	101(86)	57(97), 144(62), 88(47), 74(30) 157(14), 130(10)
Putrescina	88	288(8)	57	273(1)	-	-	215(21)	187(26)	115(33)	70(72), 170(71), 114(52), 74(46) 130(46),104(39), 98(37),159(26)
Cadaverina	102	302(9)	57	287(2)	-	-	229(20)	201(15)	129(72)	84(78), 130(76), 74(51), 128(46) 143(34),118(30),116(24),184(20)
1,6-Diaminohexano	116	316(6)	57	301(1)	-	-	243(8)	215(8)	143(45)	130(88), 74(54), 98(37), 55(31), 186(21)
Pirrolidina	71	171(2)	116	-	116(100)	114(48)	98(53)	70(36)	-	57(30), 115(26), 55(28), 56(28), 87(11)
Piperidina	85	185(4)	128	-	130(56)	128(100)	112(30)	84(38)	-	129(42), 57(31), 69(15), 56(15), 114(12)
Morfolina	87	187(12)	57	172(4)	132(19)	130(34)	114(42)	86(25)	-	116(48) ,131(35), 56(38), 88(34) 70(30), 101(9)
2-Feniletilamina	121	221(35)	130	206(1)	166(2)	164(7)	148(18)	120(4)	-	57(78), 104(70), 91(59), 105(47), 65(16), 77(14)
Tiramina	137	337(2)	120	322(1)	-	-	264(1)	-	164(5)	107(55), 57(50), 121(26),130(14) 176(12), 91(10), 163(5), 237(5)

Entre parêntesis são apresentadas as percentagens relativas do respectivo ião
a - não registado

2. O ião base corresponde em mais de metade dos casos ao fragmento *m/z* 57, cuja massa corresponde ao grupo isobutilo proveniente do cloroformato usado como derivatizante. Nos casos em que o referido ião não é o de maior intensidade no espectro, apresenta geralmente uma intensidade relativa elevada. Os únicos derivados que apresentam para este ião intensidades relativas inferiores a 30 % correspondem às duas aminas de massa molecular mais baixa - metilamina (12 %) e etilamina (26 %). Na dimetilamina e nas aminas alicíclicas pirrolidina e piperidina o referido ião apresenta também uma intensidade relativa baixa mas ainda bastante significativa, da ordem dos 30 %. O facto deste ião ser característico da grande maioria dos cloroformatos mostrou ser desaconselhável o seu uso para fins quantitativos, dada a pouca especificidade manifestada.

3. O padrão geral de fragmentação observado tem a sua génese na presença da função carbamato [R–NH–CO–O–Isobutilo], a qual apresenta pontos de ruptura ao nível de todas as suas ligações mais importantes, com a natural excepção da dupla ligação carbonílica. Adicionalmente, é de realçar a ocorrência de fragmentação por ruptura da ligação C–C a nível do carbono α, ruptura essa característica dos compostos aminados, como já foi assinalado anteriormente a propósito dos espectros de massa dos derivados heptafluorobutíricos. Assim, temos:

3.1. A ruptura da ligação O–Isobutilo dá origem ao fragmento *m/z* 57, característico do grupo isobutilo, cuja importância foi já assinalada no ponto 2. O fragmento resultante da restante porção da molécula pode apresentar o valor de M^+-57 ou de M^+-55, predominando este último na maioria dos compostos, nomeadamente em todas as aminas alifáticas, primárias e secundárias, e na pirrolidina. A formação do fragmento M^+-55 deverá resultar, em nossa opinião, de uma dupla protonação do fragmento original, o qual ficará com a seguinte estrutura:



No espectro da 2-feniletilamina o fragmento M^+-57 é ligeiramente mais intenso do que o fragmento M^+-55 (embora ambos apresentem reduzida intensidade relativa), o mesmo

acontecendo no caso das aminas alicíclicas morfolina e piperidina; neste último composto o fragmento M^+-57 constitui mesmo o ião base do respectivo espectro.

Nos compostos que são resultado de uma dupla derivatização — diaminas e tiramina — nota-se a ausência destes fragmentos.

3.2. A ruptura da ligação CO−O dá origem a fragmentos de *m/z* M^+-73 e a fragmentos de *m/z* 74. Os primeiros, que se poderá afirmar que apresentam a estrutura de isocianatos [R−N−CO] são comuns a todos os compostos estudados, apresentando nalguns casos uma intensidade relativa muito elevada. O fragmento *m/z* 74 pode ser observado em muitos dos espectros, sendo resultado, naturalmente, da protonação do grupo [Isobutilo−O].

3.3. A ruptura da ligação NH−CO, a qual é resultante da própria reacção de derivatização, dá origem a fragmentos de *m/z* M^+-101. Estes fragmentos são comuns a todos os compostos estudados, com excepção da tiramina, apresentando uma intensidade relativa digna de registo no caso das diaminas, das aminas alicíclicas, da dietilamina (não foi registado no caso da dimetilamina, pois o seu valor de *m/z*, neste caso, é de 44) e também da propilamina e da isopropilamina. A restante porção da molécula, correspondente ao grupo derivatizante, dá origem a pequenos fragmentos de *m/z* 102 visíveis na generalidade dos espectros, resultantes da respectiva protonação. A sua pequena intensidade, porém, leva a crer que os mesmos serão alvo de uma fragmentação posterior, provavelmente com saída do grupo CO_2 e formação do fragmento *m/z* 57.

Nos compostos que são resultado de uma dupla derivatização — diaminas e tiramina — é visível a presença de fragmentos correspondentes a *m/z* M^+-173, os quais têm a sua origem na dupla perda de 101 e de 73, com posterior protonação. Nas diaminas esses fragmentos apresentam intensidades relativas muito elevadas.

3.4. Os fragmentos resultantes da ruptura da ligação R−NH correspondentes a *m/z* M^+-116, também são comuns à grande maioria dos compostos, embora de uma forma não tão clara como alguns dos fragmentos anteriormente referidos.

No caso das aminas alifáticas primárias podem observar-se importantes fragmentos deste tipo na amilamina, na isoamilamina e na 2-metilbutilamina — *m/z* 71 — e na hexilamina — *m/z* 85. Na butilamina e na isobutilamina o fragmento em causa corresponde ao grupo isobutilo — *m/z* 57 — já de si resultante da fragmentação da porção da molécula proveniente do grupo derivatizante e que corresponde ao ião base (a intensidade deste resultará provavelmente do somatório dos fragmentos *m/z* 57 provenientes das duas extremidades da molécula).

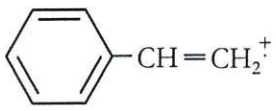
Nas aminas de cadeia carbonada mais curta o referido fragmento, a existir, não poderia ser detectado devido a apresentar um *m/z* inferior a 50.

Nas diaminas, o referido fragmento *m/z* M^+-116 é visível no 1,3-diaminopropano, *m/z* 157 (rearranjo com perda de 1 átomo de H), na putrescina, *m/z* 170 (rearranjo com perda de 2 átomos de H), na cadaverina, *m/z* 184 (rearranjo com perda de 2 átomos de H) e na 1,6-hexanodiamina, *m/z* 199 (rearranjo com perda de 1 átomo de H). Os átomos de hidrogénio que estão na base destes rearranjos são átomos da estrutura carbonada das diaminas, de acordo com as indicações dadas pelo espectro da [$^2H_8$]putrescina, que apresenta um fragmento similar com *m/z* 176, ou seja, com apenas 6 átomos de deutério. Nos espectros de massa das diaminas é também visível a presença de fragmentos com uma diferença de -100 *m/z* em relação aos fragmentos acima descritos, provavelmente em resultado da posterior perda de uma porção correspondente ao grupo derivatizante (*m/z* 101) com rearranjo por adição de um átomo de hidrogénio. No caso da putrescina o referido fragmento tem *m/z* 70 (76 no caso do isótopo deuterado) e constitui juntamente com o fragmento *m/z* 170, um dos mais importantes do respectivo espectro; no caso da cadaverina, temos o fragmento *m/z* 84 e no caso da 1,6-diaminohexano o fragmento *m/z* 98 (-101). No caso do 1,3-diaminopropano, o fragmento em causa é muito provavelmente o correspondente a *m/z* 58 (M^+-116-100), que é precisamente o ião base do respectivo espectro.

Nas aminas com anel aromático, 2-feniletilamina e tiramina, dois dos mais importantes fragmentos observados, *m/z* 104 e *m/z* 120 (ião base) respectivamente, resultam

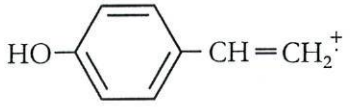
também, muito provavelmente, da ruptura da ligação R–NH com perda de 1 átomo de hidrogénio, pelo que as estruturas prováveis são as seguintes:

m/z 104



2-Feniletilamina

m/z 120



Tiramina

De salientar que o mesmo fragmento *m/z* 104 foi já referido a propósito do espectro de massa do derivado heptafluorobutírico da 2-feniletilamina (capítulo 4).

3.5. A ocorrência de fragmentação por ruptura da ligação C–C a nível do carbono α (em relação ao átomo de azoto), acima salientada como característica dos compostos aminados, dá lugar a um fragmento *m/z* 130, visível na grande maioria dos espectros estudados, com uma intensidade relativa geralmente elevada. No caso da 2-feniletilamina trata-se mesmo do fragmento correspondente ao ião base. As excepções correspondem à metilamina e à dimetilamina, que não possuem essa ligação, à pirrolidina, onde os átomos de carbono em questão estão incluídos numa estrutura ciclíca e à dietilamina e à isopropilamina, onde a ruptura da ligação dá lugar não a um fragmento *m/z* 130 mas antes a fragmentos *m/z* 158 e *m/z* 144, respectivamente.

No caso das diaminas, é visível não só a presença do ião *m/z* 130, embora com uma intensidade muito variável, como a presença de um ião correspondente à restante porção da molécula: *m/z* 144 para a 1,3-diaminopropano, *m/z* 159 (+1H) para a putrescina, *m/z* 172 para a cadaverina e *m/z* 186 para a 1,6-diaminohexano. O mesmo acontece com a 2-feniletilamina e com a tiramina, que apresentam iões com grande intensidade com *m/z* 91 e *m/z* 107, respectivamente (neste último caso o fragmento *m/z* 107 corresponde a M^+-130-100).

3.6. Finalmente, como se pode observar na Tabela 6.A1.1, é característica nos espectros estudados a presença de um ião de pequena intensidade correspondente ao fragmento M^+-15 (perda de um grupo metilo), o qual assume muitas vezes uma grande importância

para, em conjunto com o ião molecular, permitir uma correcta identificação do composto em questão. Esse fragmento apenas não é visível nos derivados obtidos a partir de uma amina secundária, a dimetilamina, e de duas aminas alicíclicas, a pirrolidina e a piperidina, por razões estruturais que não conseguimos elucidar. Pelo contrário, assume particular relevância no caso da isopropilamina, onde constitui o ião base, e no caso da dietilamina, onde apresenta uma intensidade relativa de 24 %.

Uma questão pertinente que se poderia colocar é se a formação do referido fragmento M^+-15 tem sempre lugar por saída de um grupo metilo da porção terminal do grupo isobutilo do agente derivatizante. A resposta é negativa. Com efeito, embora nalguns dos compostos a perda do grupo metilo seja obviamente, por razões estruturais, nessa porção terminal da molécula — caso das diaminas e da 2-feniletilamina, por ex. — a análise do espectro de massa correspondente ao isótopo deuterado da etilamina mostra a presença de um fragmento M^+-18 (*m/z* 132) e não de um fragmento M^+-15, prova de que a fragmentação se dá, nesse caso, na outra extremidade da molécula. Já no caso do espectro de massa correspondente ao isótopo deuterado da etilamina passa-se o contrário, ou seja, obtém-se um ião correspondente ao fragmento M^+-15 (*m/z* 119) e não M^+-18. A justificação para esta diferença resulta provavelmente do facto de no caso da etilamina, a fragmentação que verificámos ser preferencial se dar ao nível do carbono α, num ponto da molécula que, como assinalámos acima, é de particular fragilidade. Essa mesma particularidade serve para justificar a grande intensidade do fragmento M^+-15 verificada nos espectros da isopropilamina e da dietilamina, pois também nesses dois casos, e só nesses, corresponde a rupturas ao nível do carbono α.

Nota: Para o estudo apresentado sobre os espectros de massa dos derivados isobutoxicarbonílicos obtidos, as principais fontes bibliográficas usadas foram:

Huang, Z.-H., Wang, J., Gage, D.A., Watson, J.T., Sweeley, C.C., Husek, P., Characterization of N-ethoxycarbonyl ethyl esters of amino acids by mass spectrometry. ***J. Chromatography, 635,*** 271 (1993).

Kitson, F.G., Larsen, B.S., McEwen, C.N., ***Gas Chromatography and Mass Spectrometry — A Practical Guide*** (editado pela Academic Press, Londres) (1996).

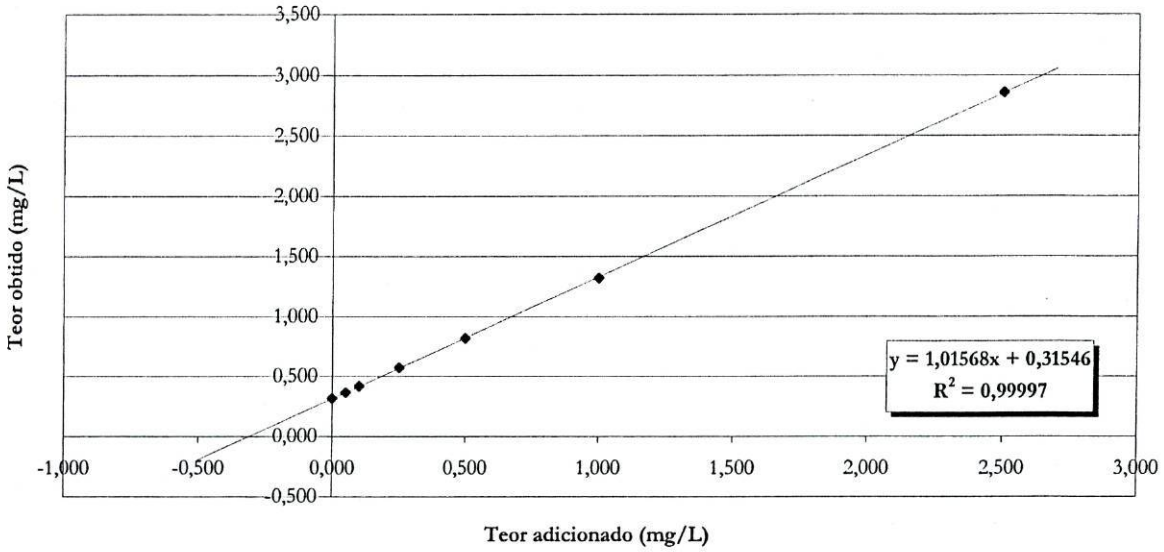
McLafferty, F.W., Tureček, F., ***Interpretation of Mass Spectra***, 4ª edição (editado pela University Science Books, M. Valley, CA) (1993).

CAPÍTULO 6

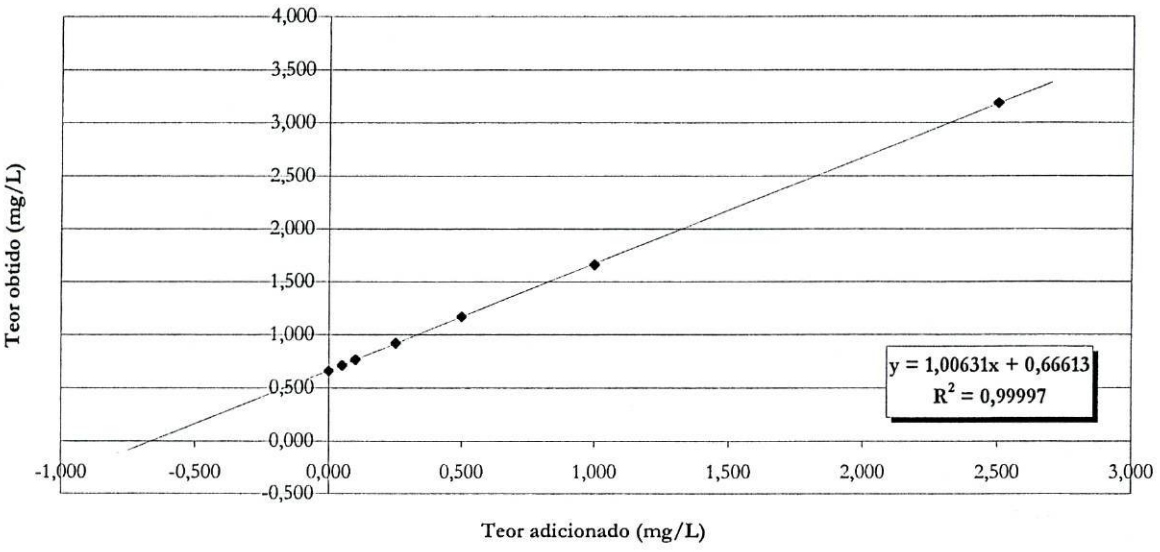
ANEXO 2

CURVAS DE RECUPERAÇÃO DAS AMINAS BIOGÉNICAS ESTUDADAS REFERENTES A AMOSTRAS DE VINHO DO PORTO E DE MOSTO

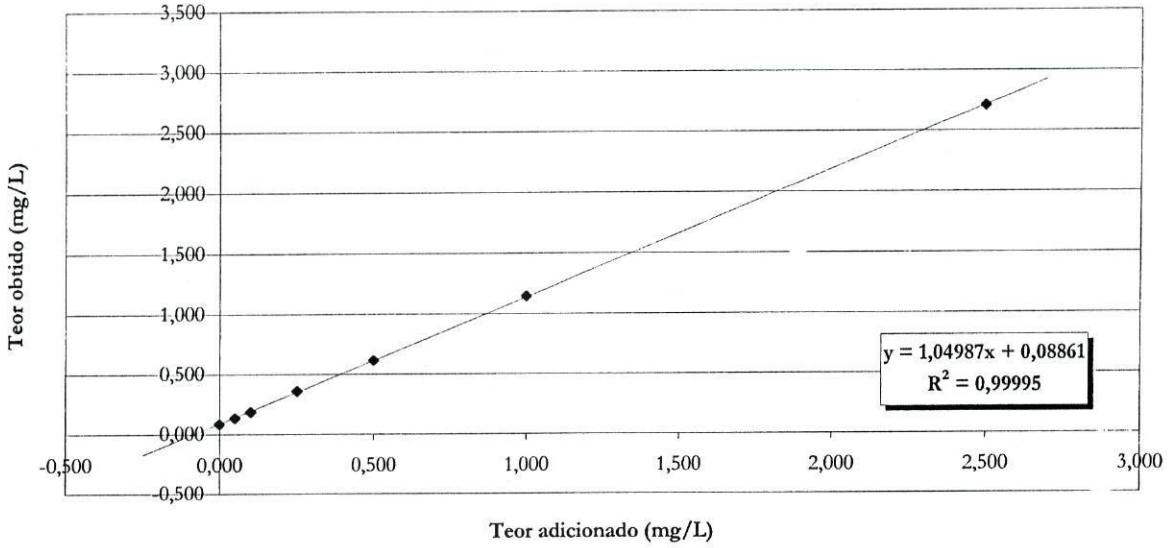
Metilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,318 mg/L



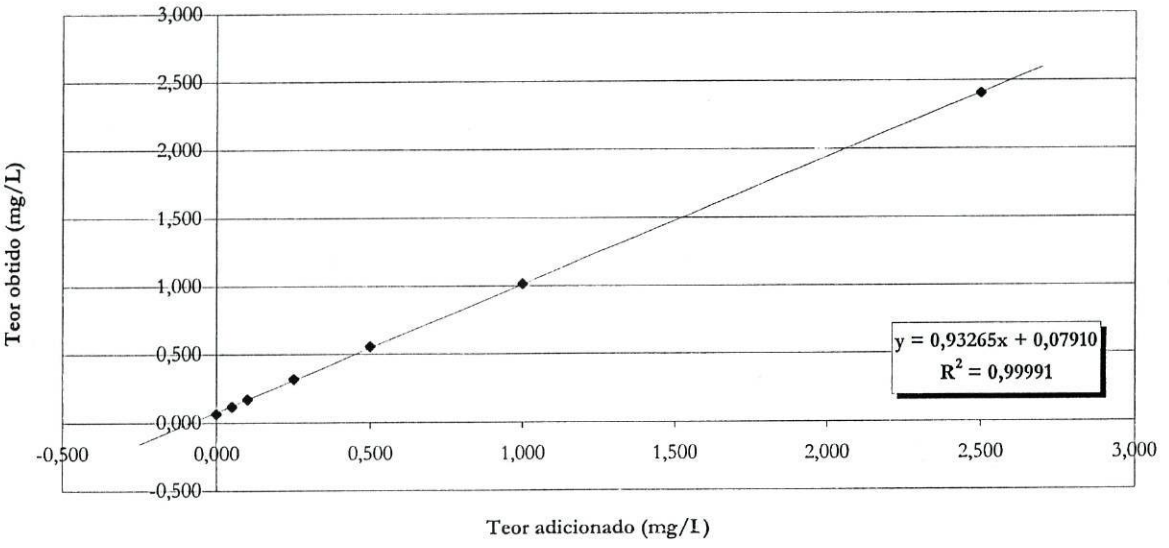
Metilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,664 mg/L



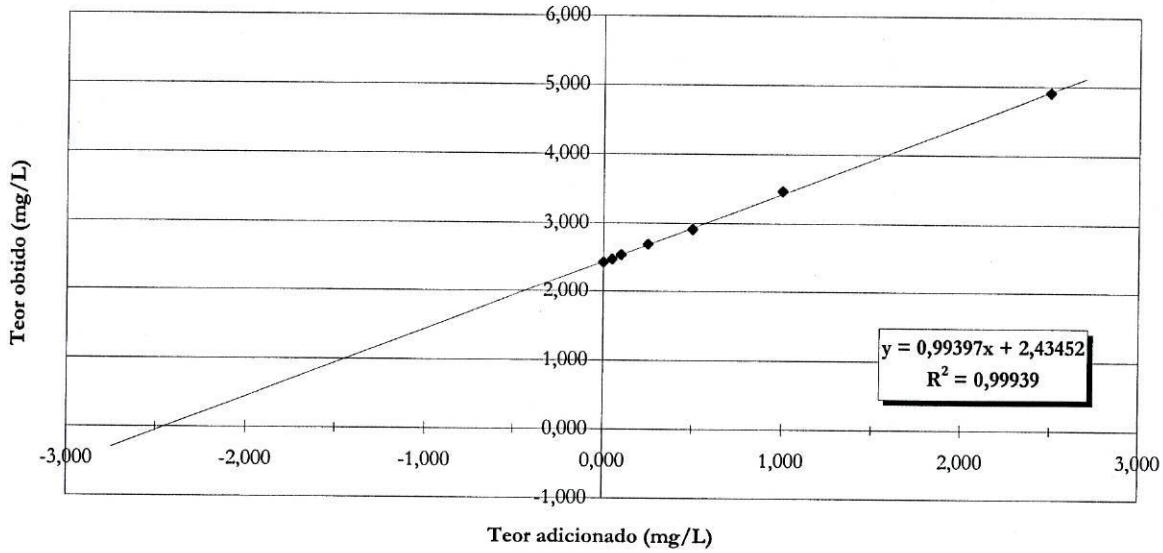
Dimetilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,086 mg/L



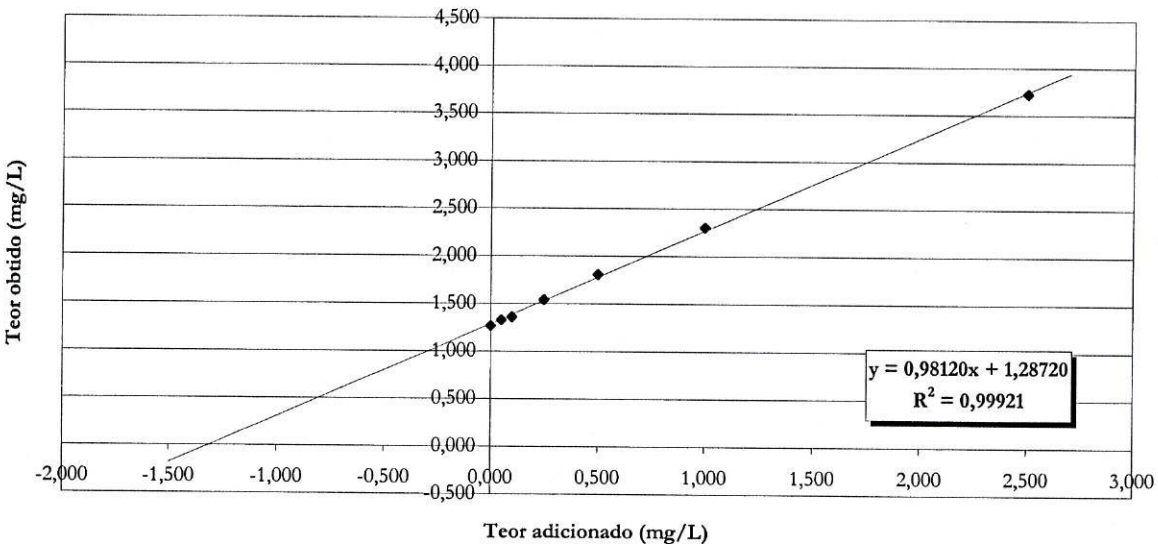
Dimetilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,067 mg/L



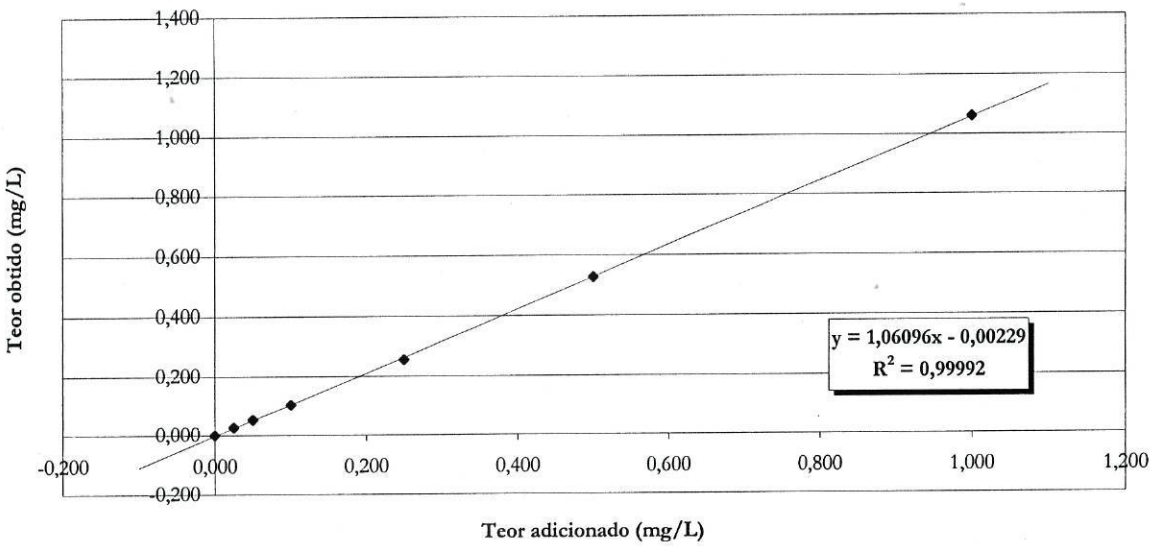
Etilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 2,426 mg/L



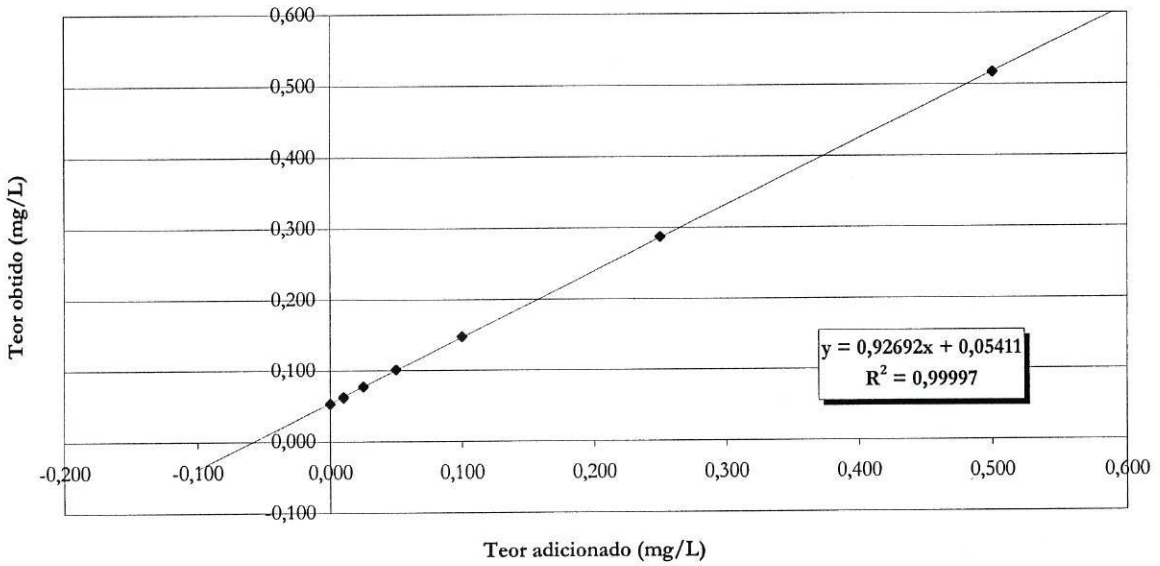
Etilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 1,266 mg/L



Dietilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0

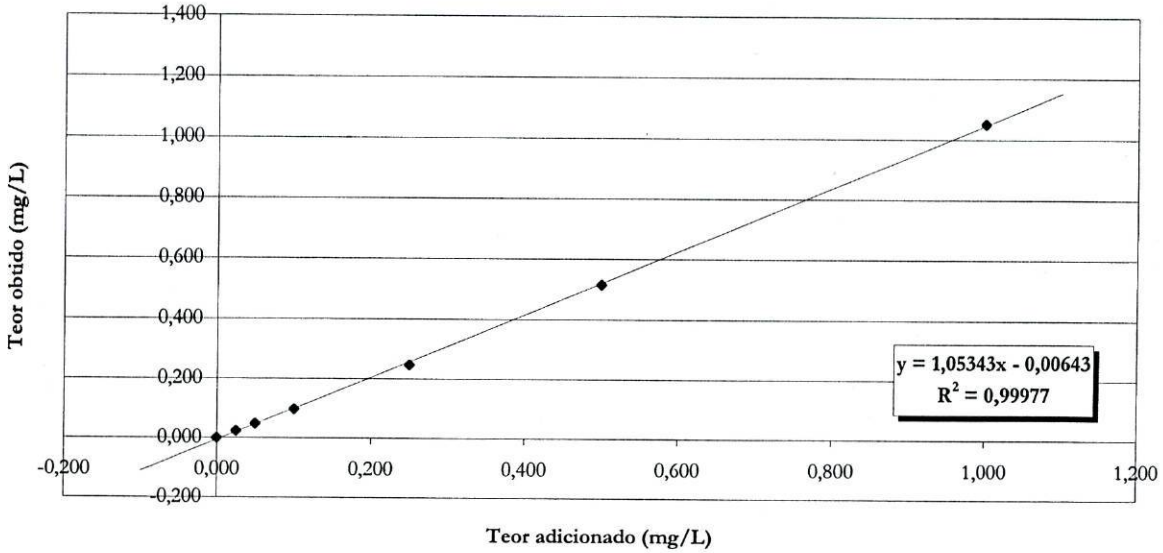


Dietilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,053 mg/L



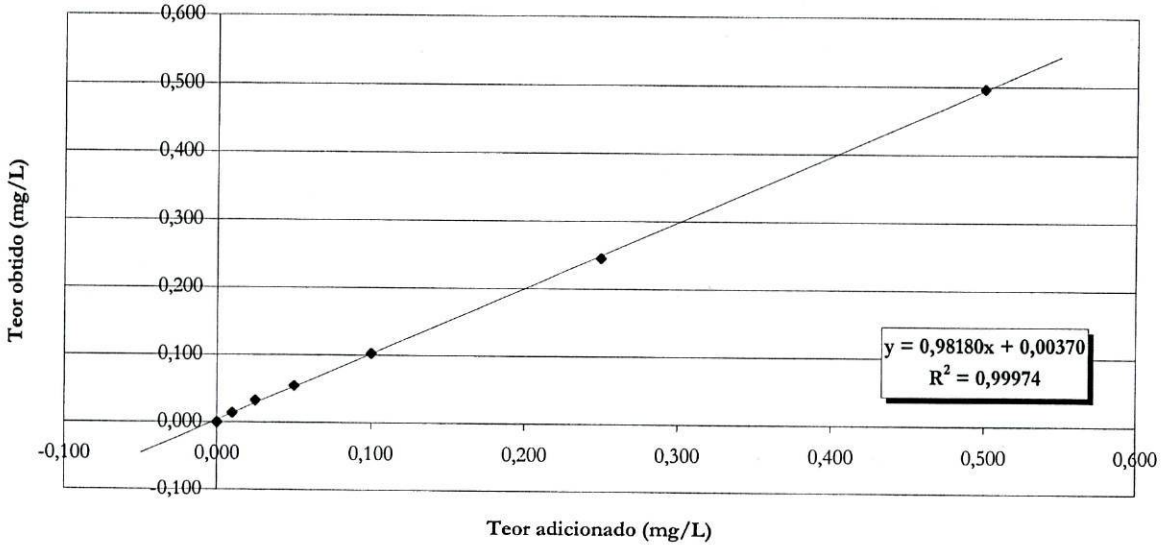
Propilamina - Recuperação (Vinho do Porto)

Teor inicial: 0

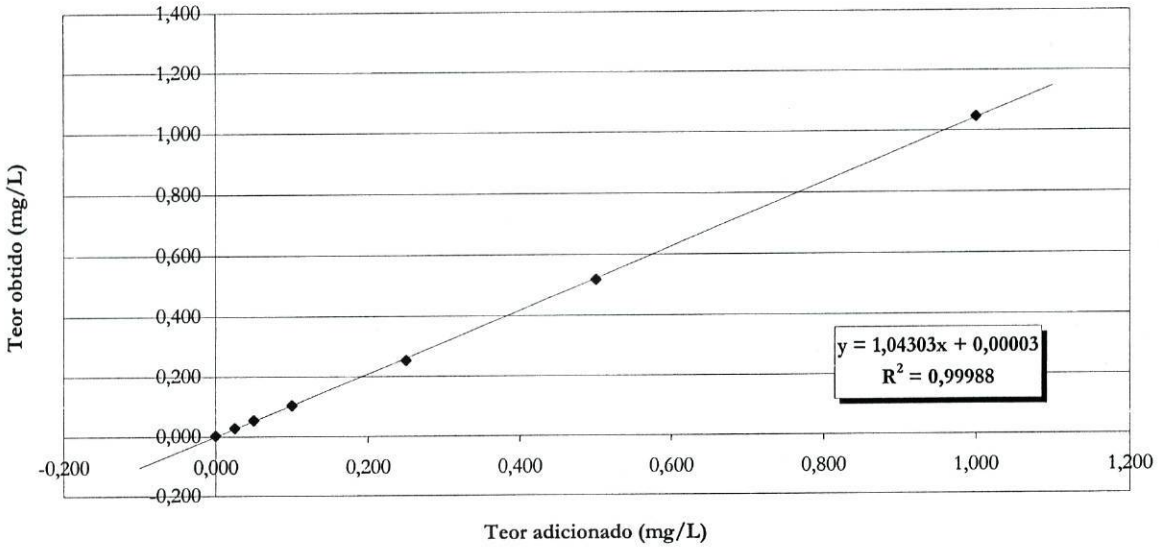


Propilamina - Recuperação (Mosto)

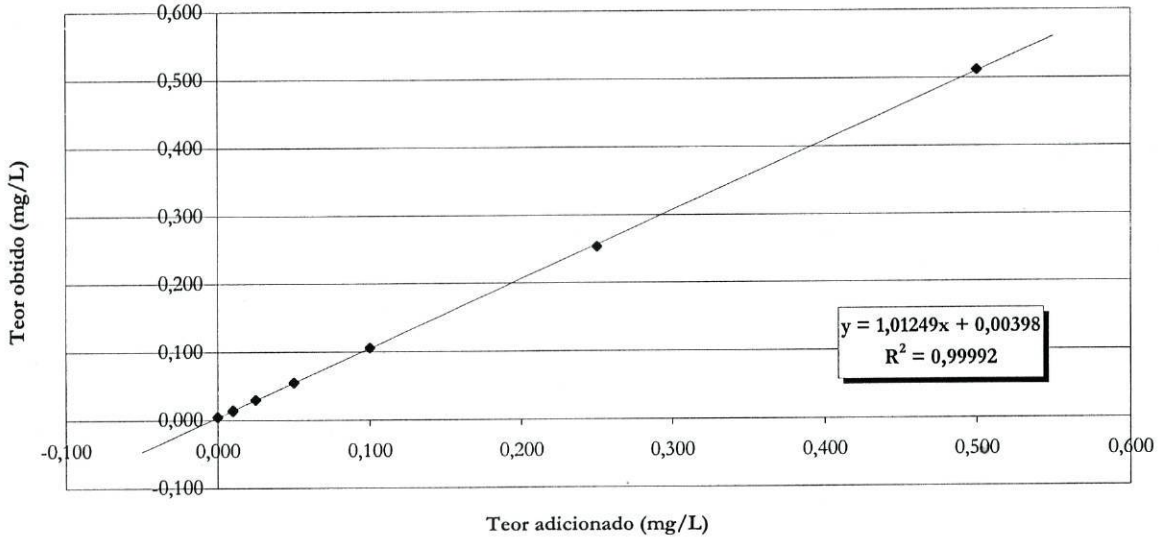
Teor inicial: 0



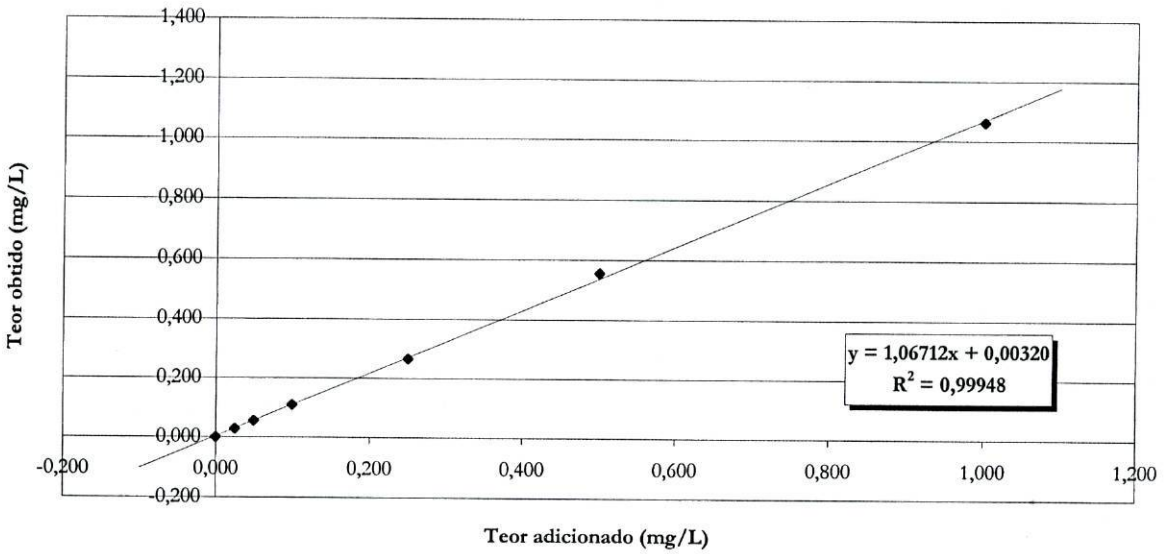
Isopropilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,003 mg/L



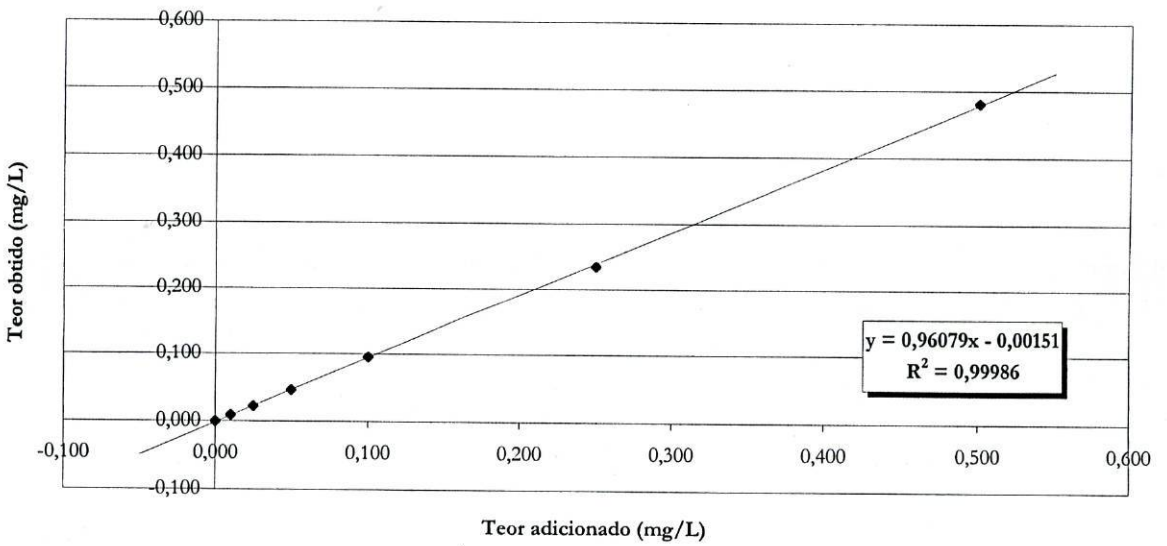
Isopropilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,005 mg/L



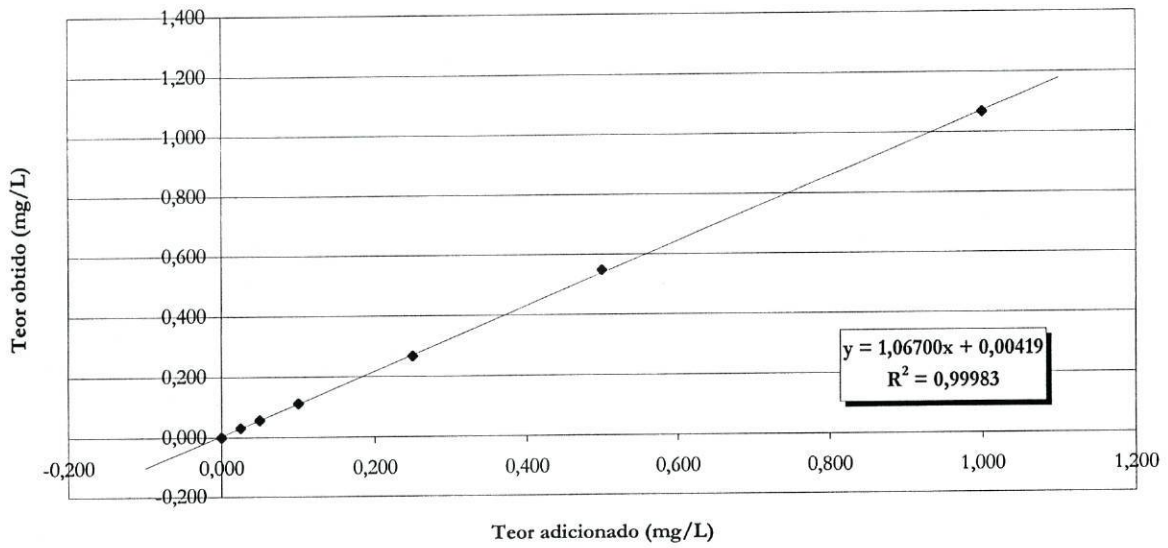
Butilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0



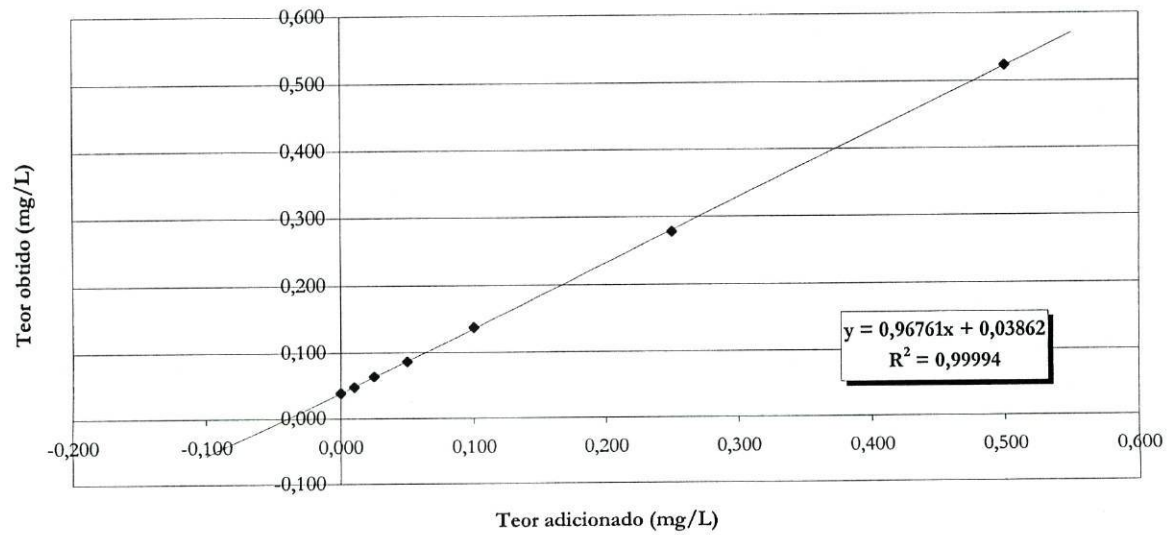
Butilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0



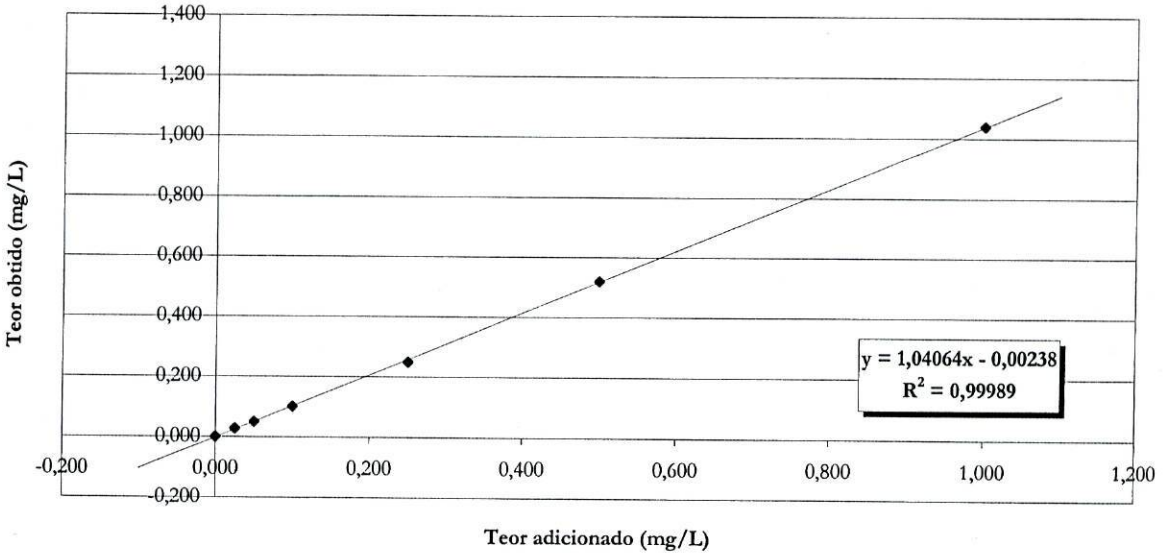
Isobutilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,010 mg/L



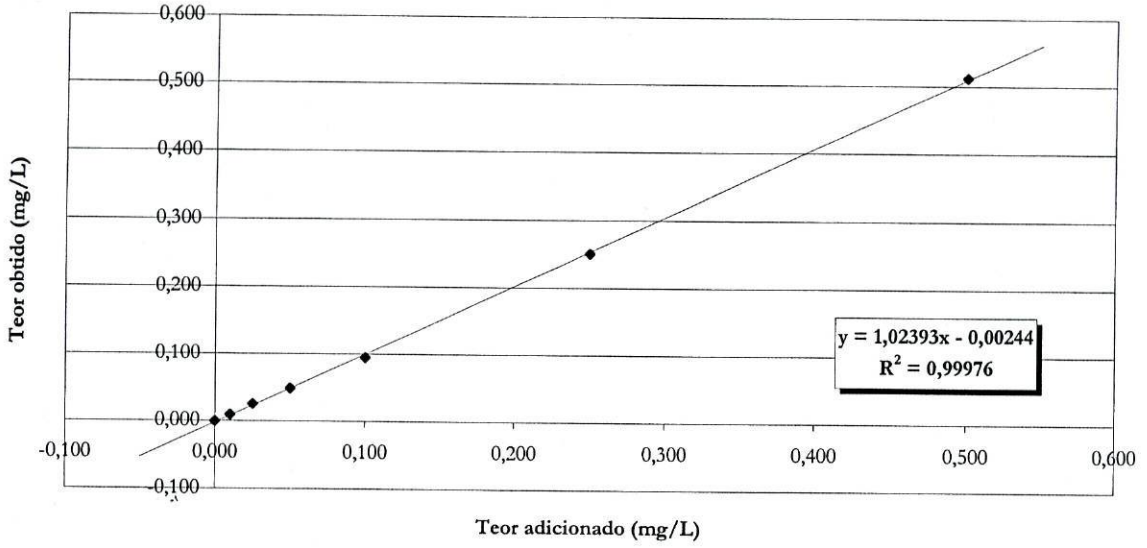
Isobutilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,039 mg/L



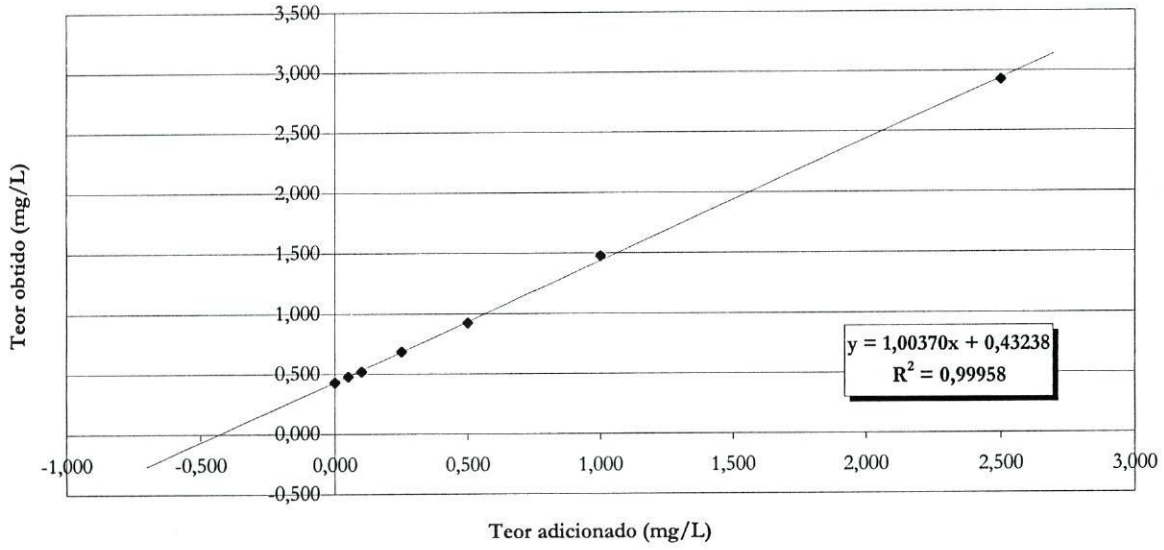
Amilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0



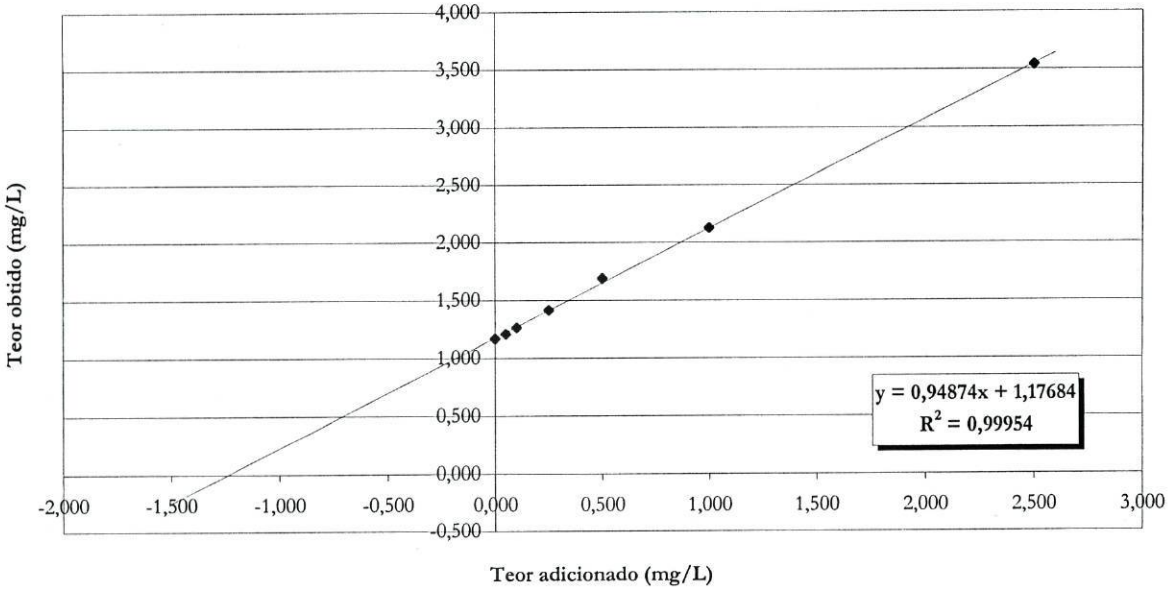
Amilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0



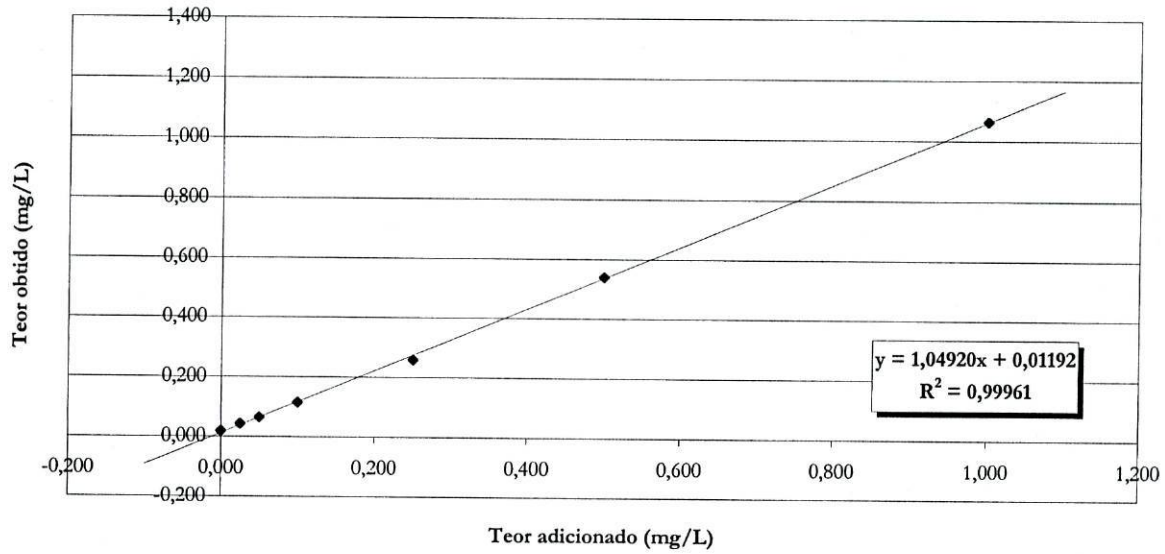
Isoamilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,430 mg/L



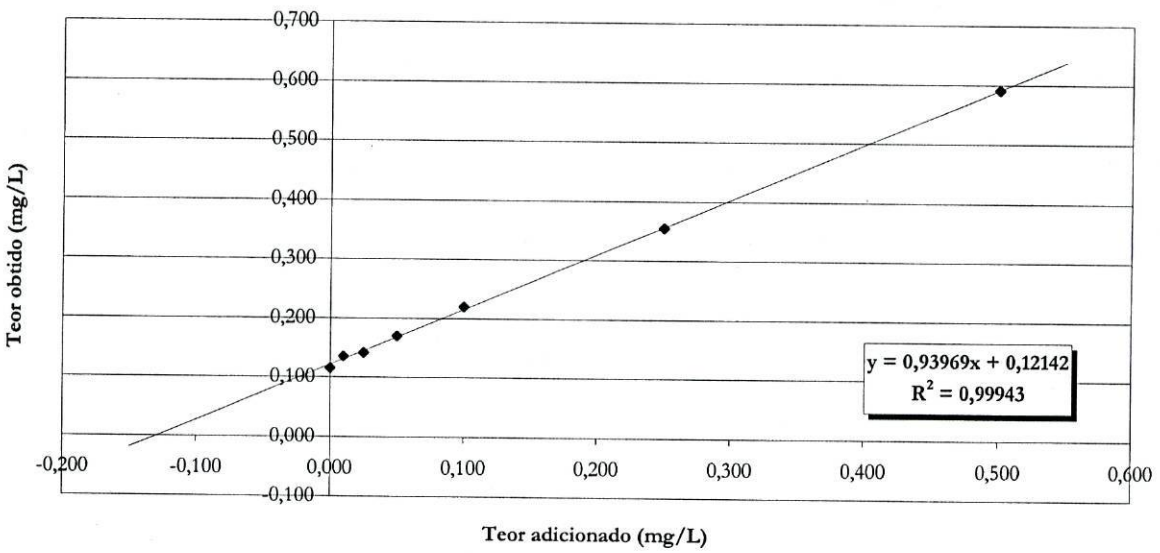
Isoamilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 1,168 mg/L



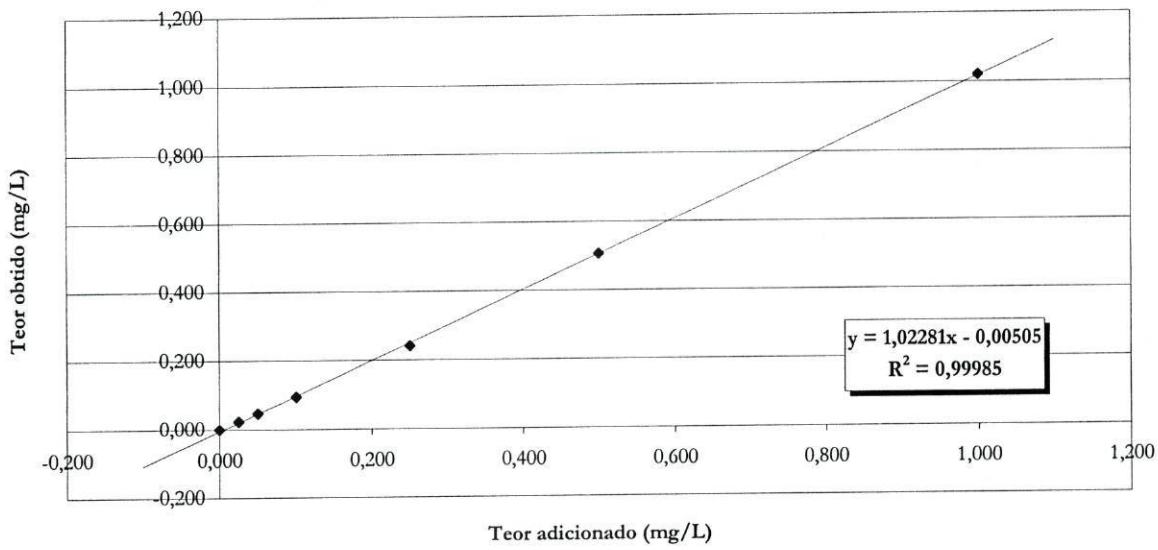
2-Metilbutilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,019 mg/L



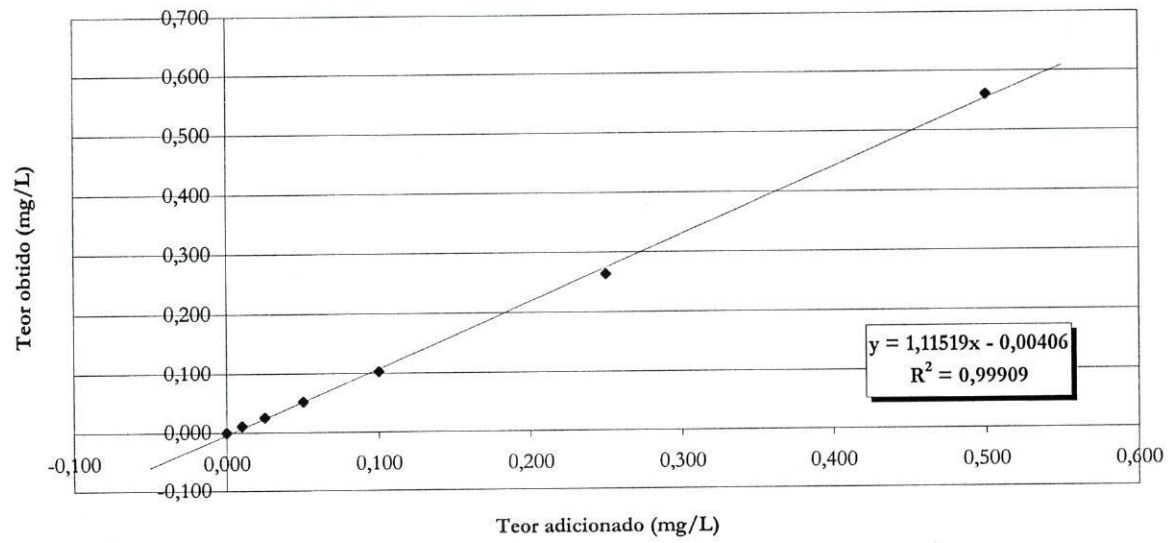
2-Metilbutilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,117 mg/L



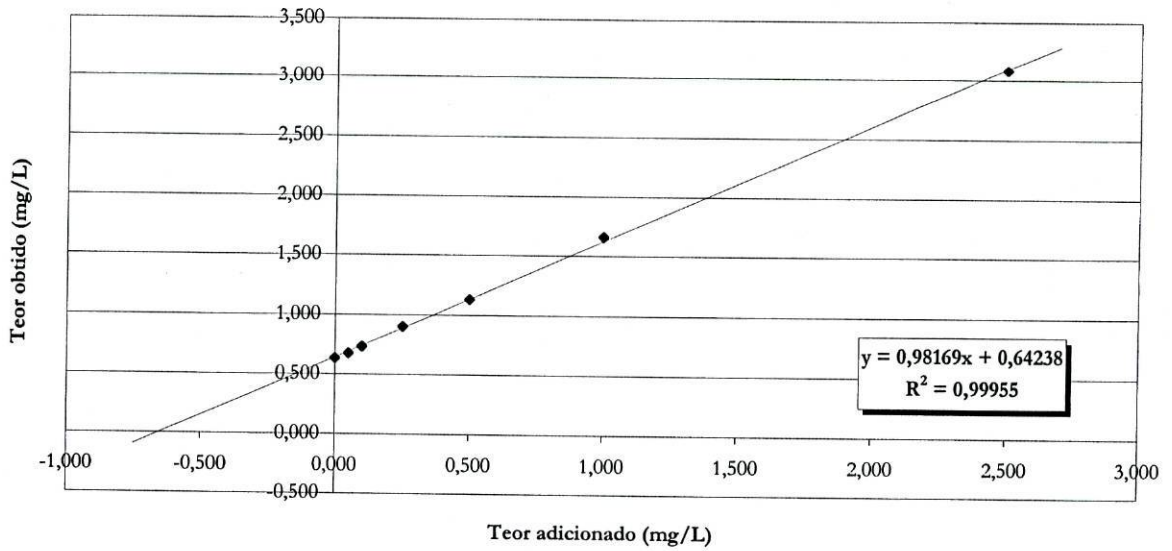
Hexilamina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0



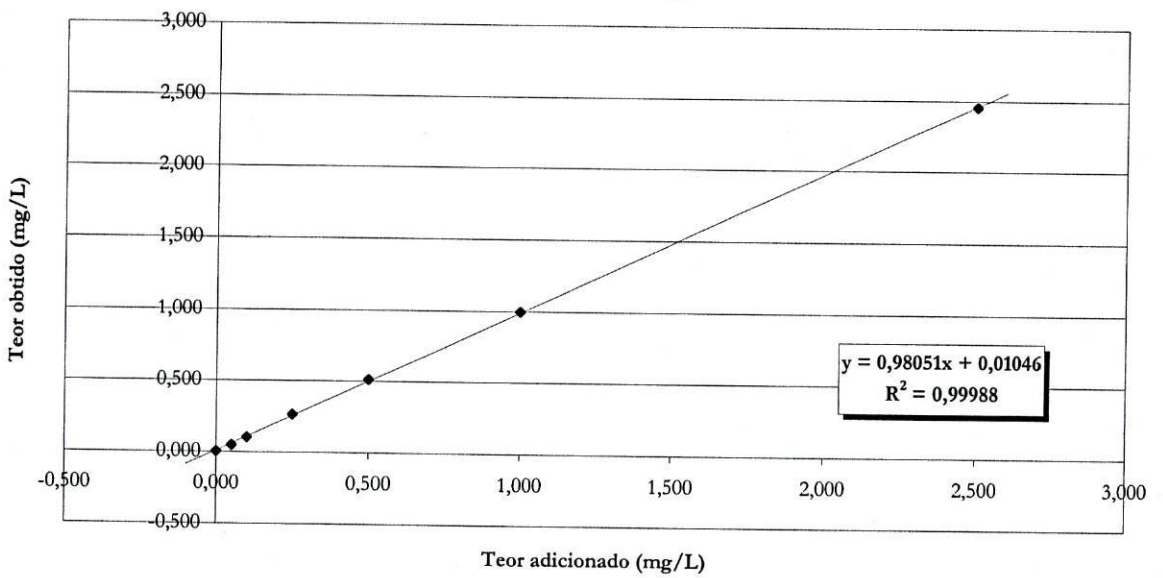
Hexilamina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0



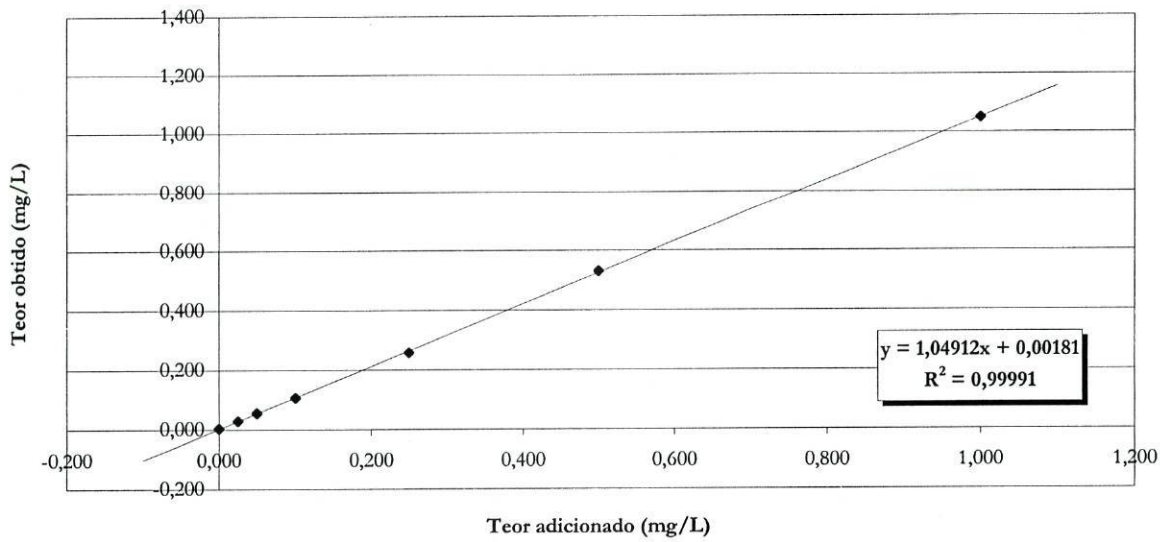
Pirrolidina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,635 mg/L



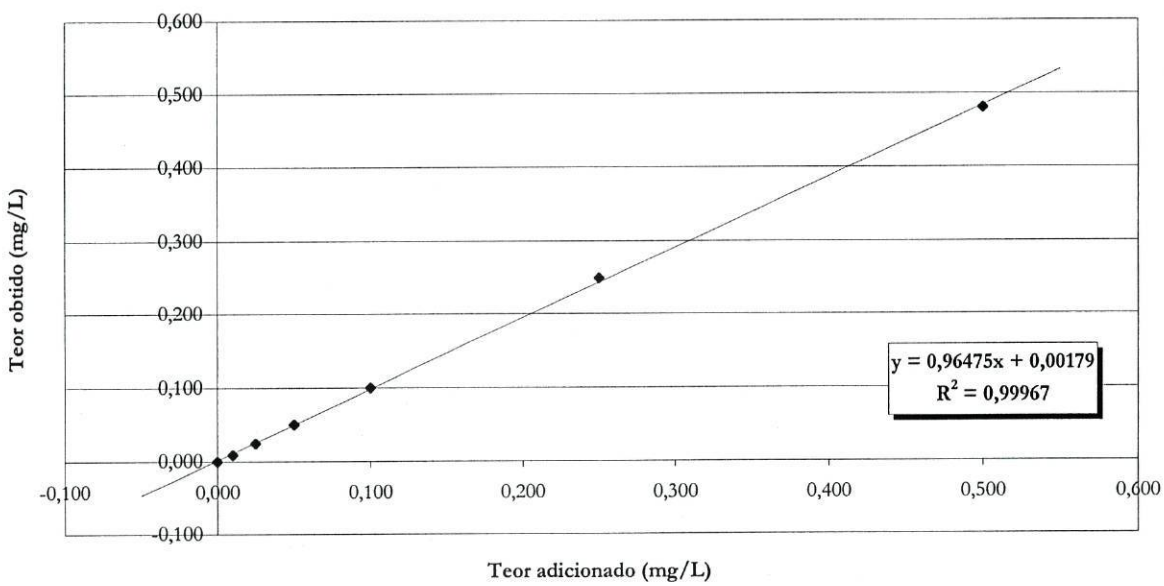
Pirrolidina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,005 mg/L



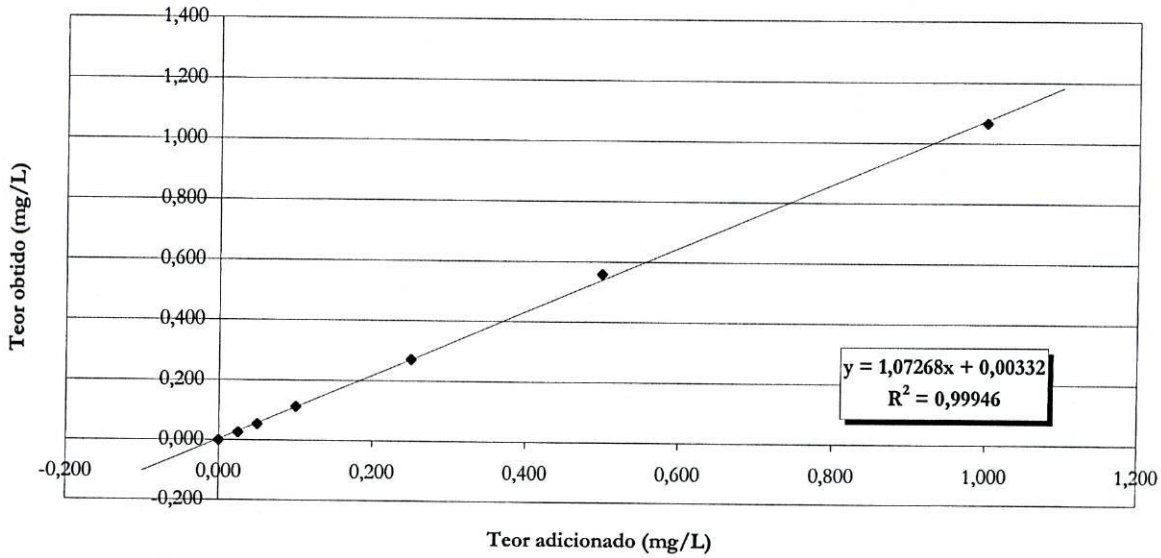
Piperidina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,004 mg/L



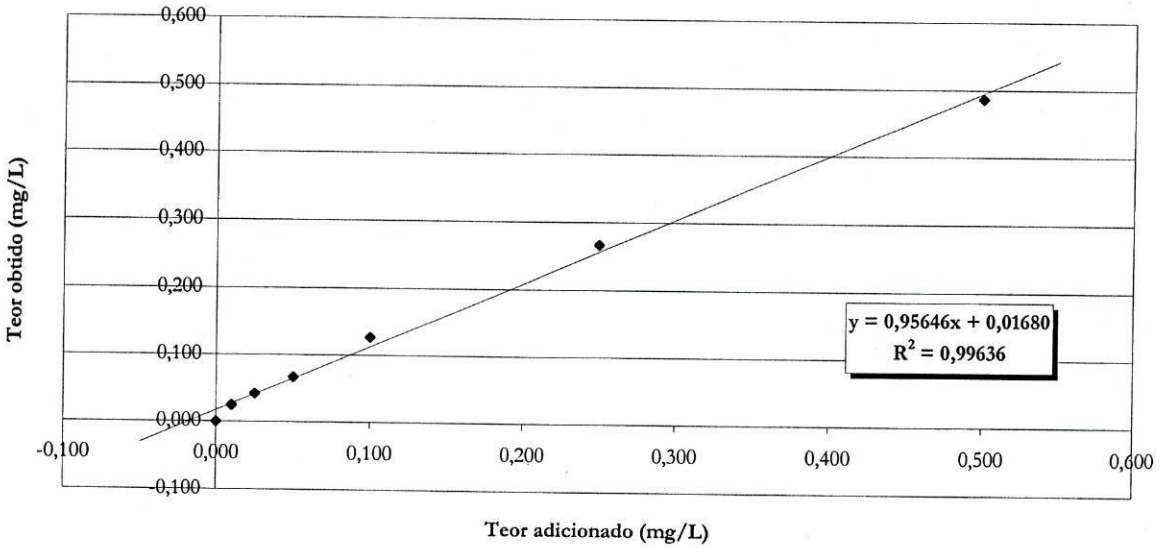
Piperidina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0



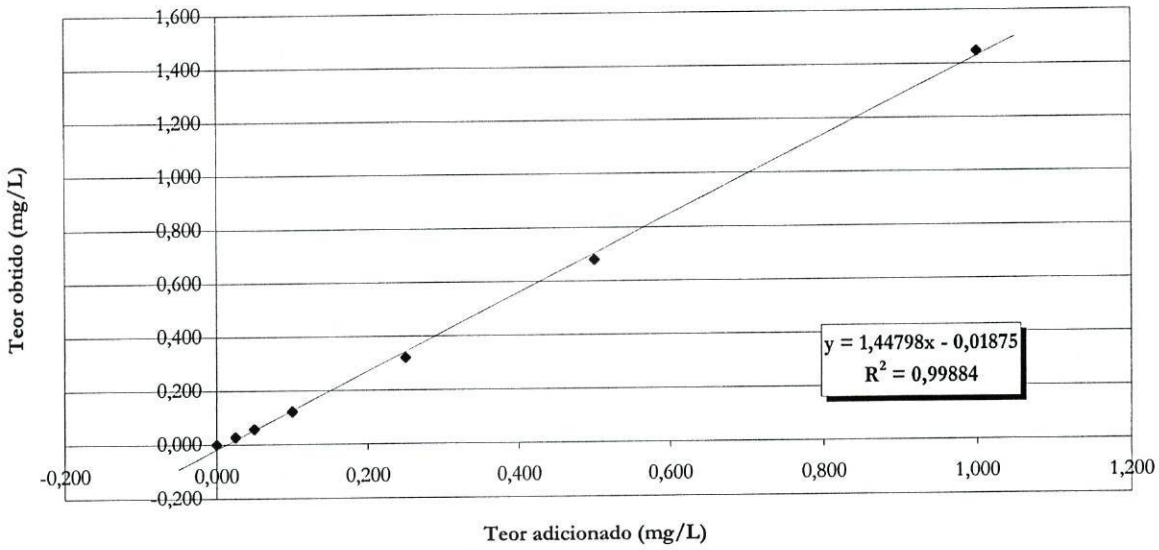
Morfolina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0



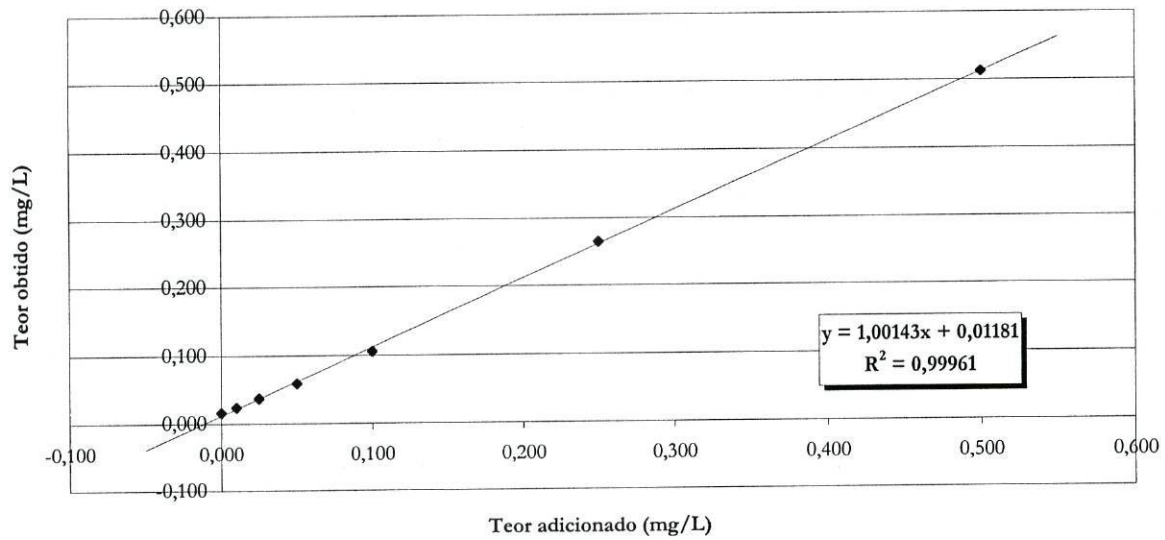
Morfolina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0



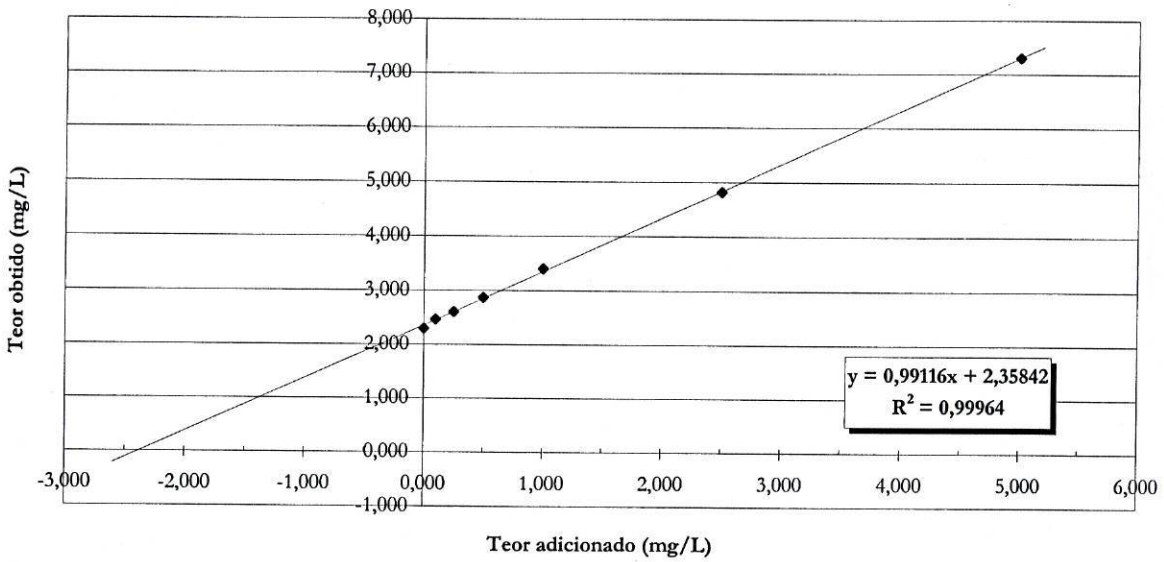
1,3-Diaminopropano - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,007 mg/L



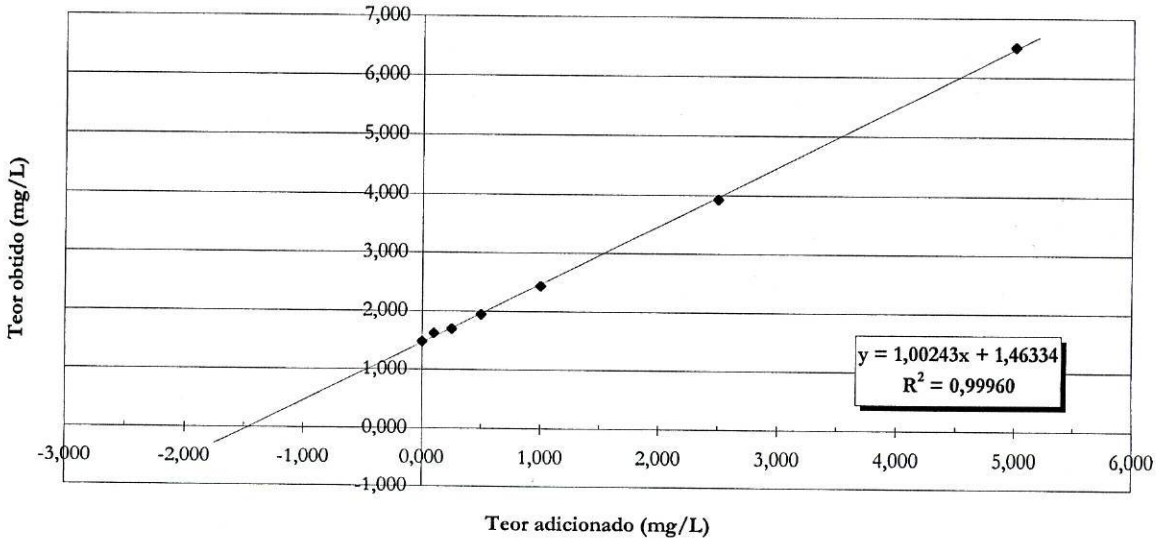
1,3-Diaminopropano - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,016 mg/L



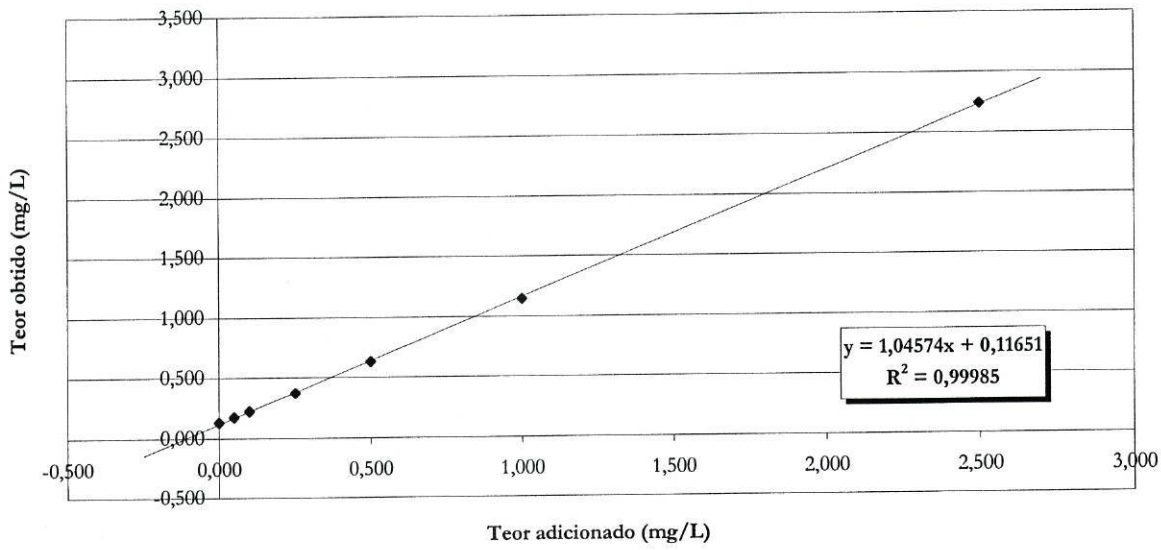
Putrescina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 2,297 mg/L



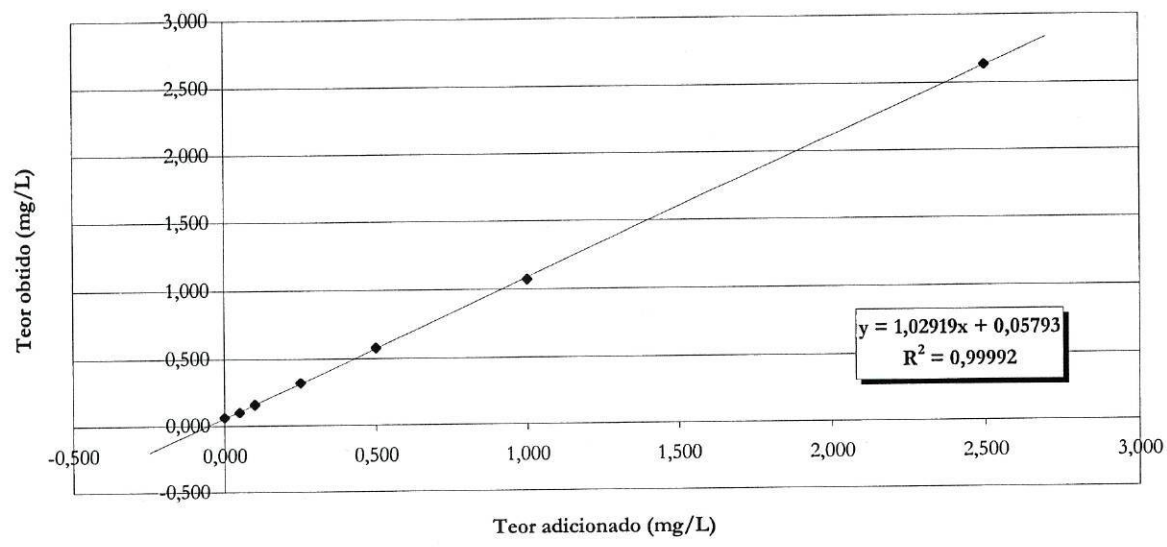
Putrescina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 1,479 mg/L



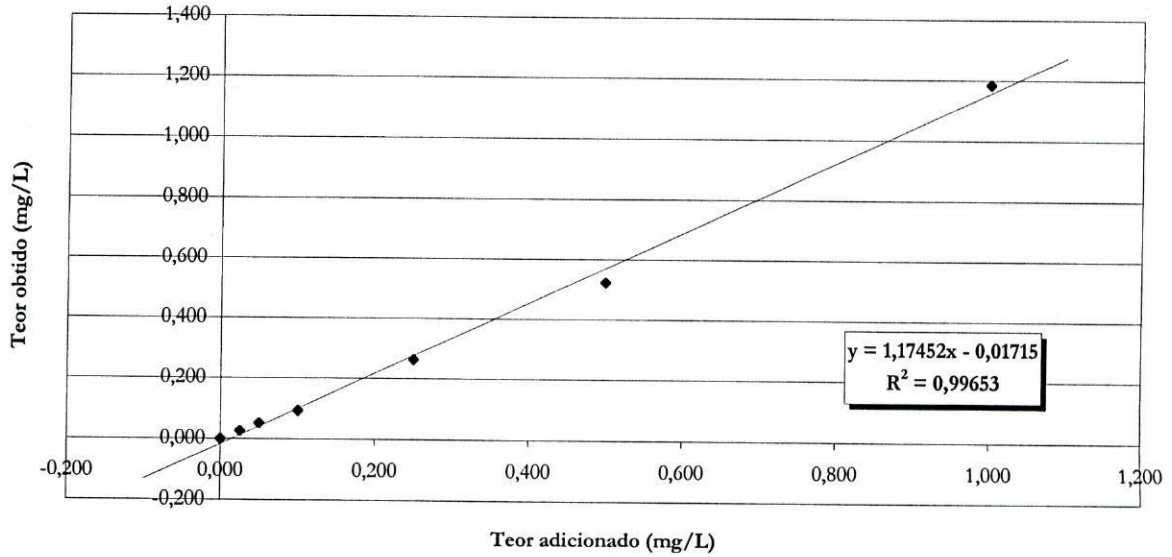
Cadaverina - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0,131 mg/L



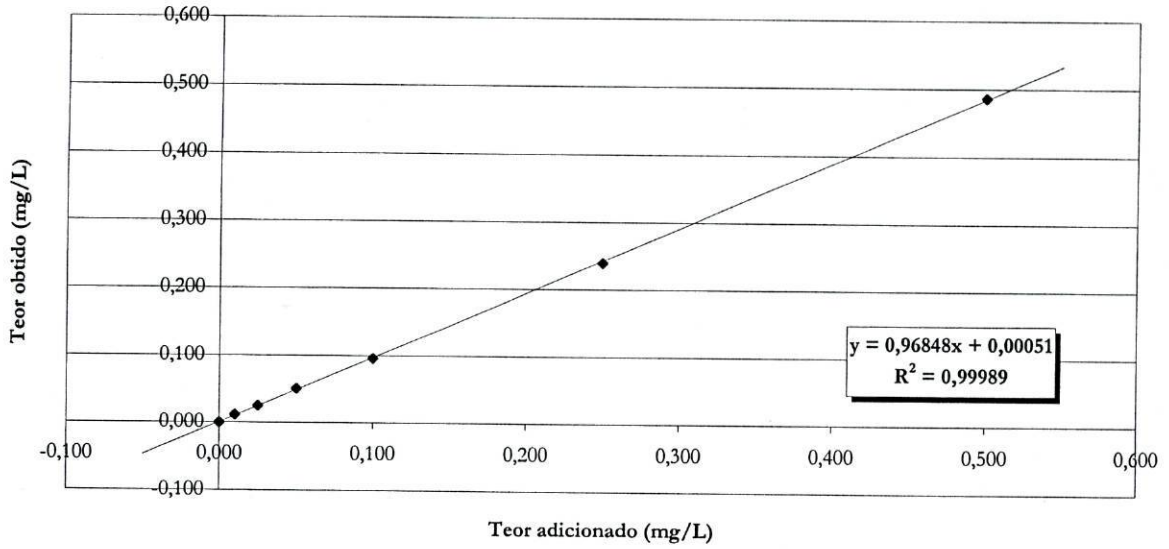
Cadaverina - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0,064 mg/L



1,6-Diaminohexano - Recuperação (Vinho do Porto)
Teor inicial: 0

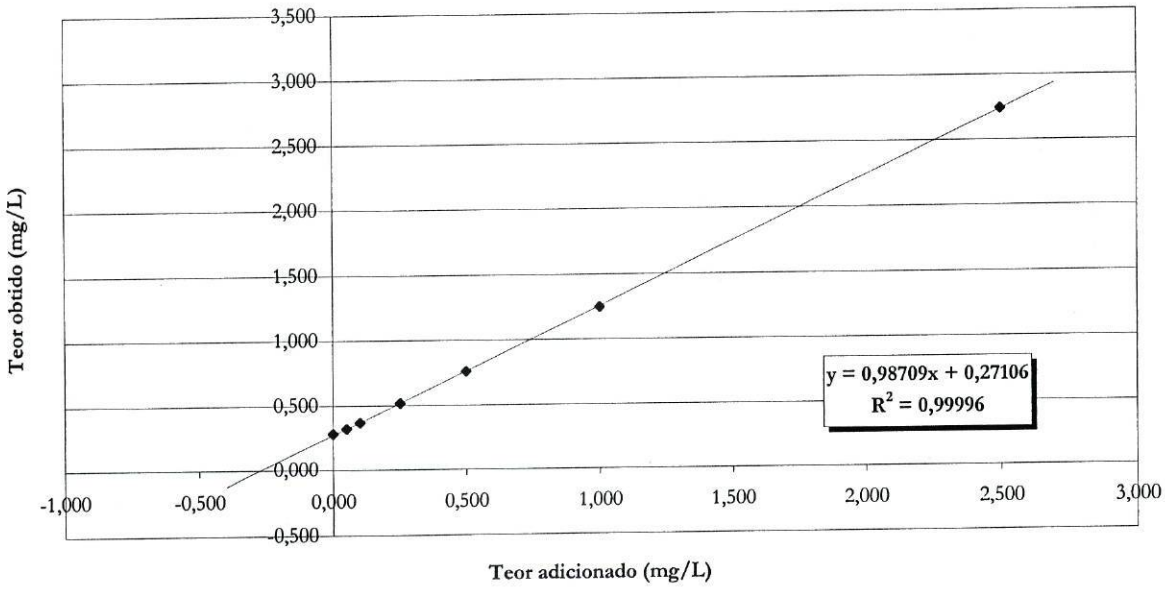


1,6-Diaminohexano - Recuperação (Mosto)
Teor inicial: 0



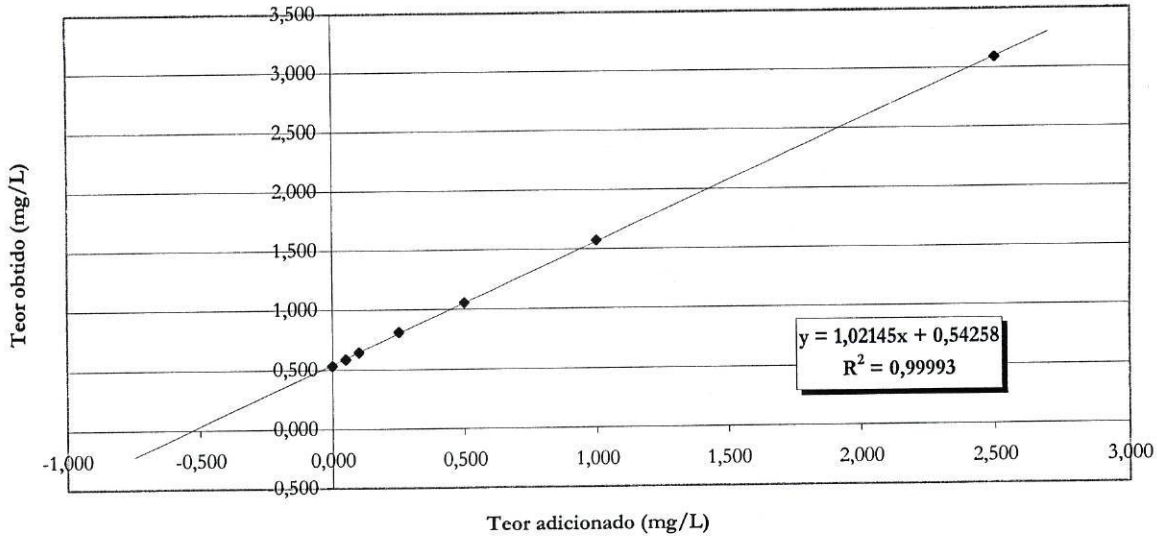
2-Feniletilamina - Recuperação (Vinho do Porto)

Teor inicial: 0,281 mg/L



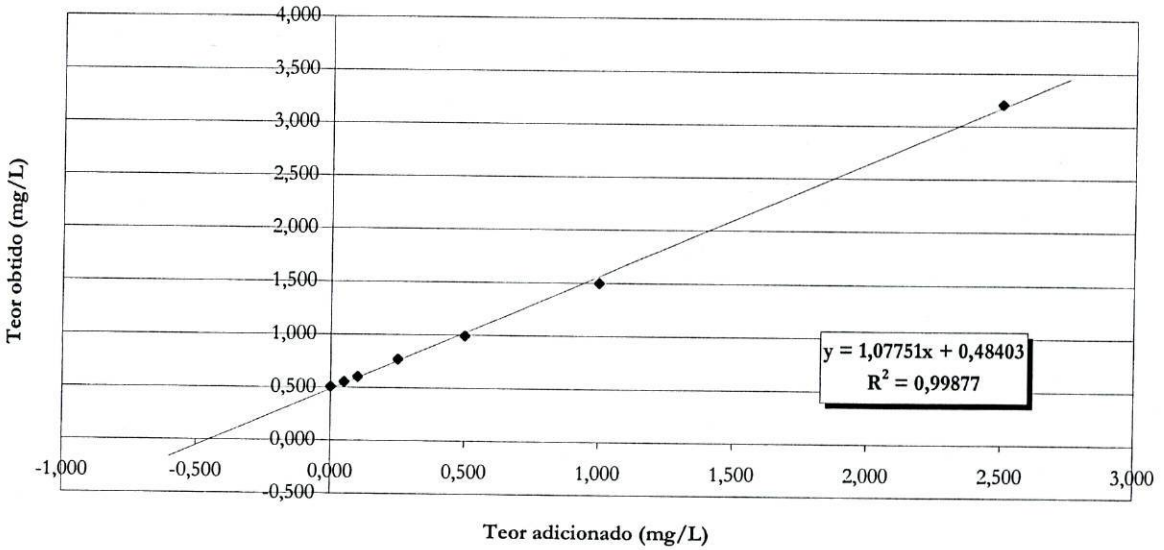
2-Feniletilamina - Recuperação (Mosto)

Teor inicial: 0,535 mg/L



Tiramina - Recuperação (Vinho do Porto)

Teor inicial: 0,508 mg/L



CAPÍTULO 7

ESTUDOS SOBRE A PRESENÇA DE AMINAS BIOGÉNICAS EM MOSTOS E EM VINHOS DO PORTO ELEMENTARES RECÉM-ELABORADOS

7.1. Introdução

7.2. Aminas biogénicas em mostos representativos das cinco castas mais usadas na elaboração de vinho do Porto: Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão

7.2.1. Caracterização das amostras

7.2.2. Resultados obtidos

7.2.3. Discussão dos resultados

7.3. Aminas biogénicas em vinhos elementares das cinco castas mais usadas na elaboração de vinho do Porto: Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão

7.3.1. Caracterização das amostras

7.3.2. Resultados obtidos

7.3.3. Discussão dos resultados

7.4. Análise discriminante

7.4.1. Análise discriminante de mostos por castas

7.4.2. Análise discriminante de mostos por anos

7.4.3. Análise discriminante de vinhos por castas

7.4.4. Análise discriminante de vinhos por anos

7.5. Conclusões gerais sobre a presença de aminas biogénicas em mostos e vinhos do Porto recém-elaborados

Bibliografia

7.1. Introdução

Como afirmado nos capítulos introdutórios, o desenvolvimento das metodologias analíticas detalhadamente referidas nos capítulos precedentes teve como objectivo principal a sua aplicação ao estudo da presença de aminas biogénicas em vinhos do Porto e nos mostos usados na sua elaboração.

No caso dos mostos, foram estudadas, durante três anos consecutivos, amostras representativas das cinco castas mais usadas na elaboração de vinho do Porto — Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão.

No caso dos vinhos, foram estudados vinhos monovarietais recém-vinificados, elaborados a partir dos mostos atrás referidos, e vinhos envelhecidos, representativos dos dois principais tipos de vinho do Porto: "Tawnies" e "Vintages".

O trabalho realizado teve como objectivos:

1. Verificar a contribuição dos mostos usados como matéria-prima nos teores de aminas biogénicas observados nos vinhos.

2. Verificar a possível existência de variações significativas entre as diversas castas e/ou entre as diferentes colheitas, no que respeita à presença de aminas biogénicas.

3. Verificar a composição em aminas biogénicas de vinhos monovarietais recém vinificados e, de igual forma, a possível existência de variações significativas entre as diversas castas e/ou entre os diferentes anos de colheita.

4. Estudar o processo evolutivo (formação/degradação) de aminas biogénicas ao longo do processo de envelhecimento dos vinhos do Porto, tanto em garrafa (meio redutor) como em vasilhame de madeira (meio oxidativo).

Neste capítulo iremos abordar o trabalho realizado com mostos e com vinhos monovarietais. O estudo referente ao comportamento das aminas biogénicas ao longo do envelhecimento dos vinhos será referido no capítulo seguinte.

7.2. Aminas biogénicas em mostos representativos das cinco castas mais usadas na elaboração de vinho do Porto: Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão

7.2.1. Caracterização das amostras

De acordo com um protocolo firmado com uma empresa produtora de Vinho do Porto, recolheram-se numa quinta do Douro, durante três anos consecutivos — 1996 a 1998 — no momento da vindima, amostras de uvas representativas das cinco castas mais usadas na elaboração de vinho do Porto: Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão. Nos dois primeiros anos, colheram-se, de algumas castas, distintas amostras referentes a diferentes parcelas do terreno, tendo-se optado, no último ano, por fazer apenas uma única amostragem por cada casta. As amostras eram constituídas por aproximadamente 5 kg de uvas em bom estado de conservação, tendo sido transportadas para o laboratório em arcas térmicas, em sacos de plástico envoltos em gelo.

De cada amostra obteve-se de imediato, em escala laboratorial, cerca de 1 litro de mosto, por prensagem numa prensa de Colá após desengace praticamente total. O mosto assim obtido foi

acondicionado em duas embalagens de 500 ml, adicionado de conservante (100 mg/L de azida sódica) e colocado de imediato em arca frigorífica a -20 °C, até ao momento da análise.

No momento da análise, procedeu-se à descongelação de cada amostra por colocação da embalagem em água à temperatura ambiente (cerca de 20 °C), homogeneizou-se por forte agitação manual e retirou-se de imediato a quantidade necessária, voltando a congelar-se o restante.

Para além da determinação do teor de aminas biogénicas, as amostras foram caracterizadas no que respeita ao seu pH e à sua constituição em ácidos orgânicos. Para a determinação dos ácidos orgânicos usou-se uma nova metodologia desenvolvida no âmbito de um trabalho de dissertação de Mestrado co-orientado pelo autor desta dissertação [Cunha, 2000]. Para lá de duas publicações referentes à aplicação da referida metodologia a outro tipo de matrizes, a sua aplicação a mostos e vinhos do Porto, baseada fundamentalmente no trabalho efectuado com as amostras aqui em estudo foi, entretanto, alvo específico de uma publicação que se encontra neste momento em fase de impressão [Cunha *et al.*, 2001]. Resumidamente, o método baseia-se na derivatização dos ácidos com *O*-(4-nitrobenzil)-*N,N'*-diisopropilisourea (1 hora, a 80 °C, na presença de dioxano) e na separação dos derivados obtidos numa coluna C_{18} e subsequente detecção por UV a 265 nm. A preparação da amostra resume-se a um contacto durante 15 minutos com uma resina de troca catiónica, essencial para a total protonação dos ácidos e para a eliminação de catiões interferentes em virtude da sua capacidade de quelatação de alguns dos ácidos. A mesma resina é usada no final para remoção do excesso de reagente derivatizante, que fica irreversivelmente ligado ao suporte sulfónico da mesma. Outros pormenores relevantes do método em questão, nomeadamente os relacionados com o equipamento e os reagentes usados, foram referidos no capítulo 3. Os resultados obtidos para o pH e para os ácidos orgânicos são apresentados na Tabela 7.1.

TABELA 7.1

pH E TEORES* DE ÁCIDOS NAS AMOSTRAS DE MOSTOS ESTUDADAS

	pH	Acético	Cítrico	Láctico	Málico	Succínico	Tartárico
			Touriga Nacional				
1996 a	3,14	n.d.	0,354	0,201	1,688	nd	5,514
1996 b	3,28	0,040	0,242	0,270	2,738	nd	4,792
1996 c	3,93	0,314	0,314	0,195	2,682	nd	3,601
1996 d	3,71	0,245	0,245	0,147	1,988	nd	3,328
1997 a	3,91	0,248	0,581	0,094	1,362	nd	4,097
1997 b	3,80	0,320	0,405	0,068	2,384	nd	3,506
1998	4,16	0,373	0,500	0,201	2,462	nd	3,027
			Touriga Francesa				
1996 a	3,42	0,111	0,767	0,223	1,896	nd	3,526
1996 b	3,44	0,089	0,792	0,178	1,770	nd	3,008
1997 a	3,55	0,208	0,284	0,131	1,401	nd	2,068
1997 b	3,98	0,069	0,500	0,194	1,931	nd	2,896
1997 c	3,38	0,300	0,510	0,177	2,892	nd	4,554
1998	3,95	0,180	0,419	0,386	2,189	nd	3,745
			Tinta Barroca				
1996	3,65	0,063	0,904	0,248	3,263	nd	2,832
1997	4,25	0,176	0,729	0,311	3,959	nd	2,878
1998	3,95	0,207	0,368	0,342	2,448	nd	4,205
			Tinta Roriz				
1996	3,51	nd	0,173	0,143	1,748	nd	2,063
1997 a	4,22	0,198	0,320	0,330	1,721	nd	3,496
1997 b	3,84	nd	0,417	0,326	2,966	nd	3,914
1998	3,80	nd	0,512	0,184	3,611	nd	2,785
			Tinto Cão				
1996 a	4,07	0,042	0,482	0,314	3,553	nd	2,109
1996 b	3,97	nd	0,421	0,224	4,434	nd	2,168
1996 c	3,87	nd	0,493	0,201	3,870	nd	2,499
1998	3,82	na	na	na	na	na	na

* Teores em g/L
nd - não detectado
na - não analisado

7.2.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos para o teor das diversas aminas biogénicas nas diferentes amostras de mosto analisadas são apresentados na Tabela 7.2. Todas as amostras foram sujeitas, em tempos diferentes, às três metodologias analíticas desenvolvidas. No caso das diaminas (1,3-diaminopropano, putrescina e cadaverina) e da 2-feniletilamina apresenta-se a média dos resultados obtidos pelo método do anidrido heptafluorobutírico e pelo método do cloroformato de isobutilo.

Na Tabela 7.2 as amostras estão agrupadas pelas cinco castas estudadas, sendo apresentadas para cada casta e para cada amina a respectiva média dos resultados obtidos. De forma a facilitar a interpretação dos resultados, apresenta-se na Tabela 7.3 a média dos resultados obtidos por ano de colheita.

TABELA 7.2

AMINAS BIOGÉNICAS — RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE MOSTOS

	MA	DMA	EA	DEA	IPA	IBA	2-MBA	IAA	PIR
					Touriga Nacional				
1996 a	0,997	0,090	0,989	0,057	0,013	nd	0,020	0,147	0,008
1996 b	0,783	0,076	0,653	0,012	0,010	nd	0,020	0,142	0,006
1996 c	0,438	0,080	0,441	0,059	0,003	nd	0,016	0,005	0,006
1996 d	0,412	0,070	0,662	0,012	0,003	nd	0,017	0,033	0,004
1997 a	0,774	0,106	2,250	0,010	0,007	0,034	0,081	0,473	0,011
1997 b	0,706	0,067	1,597	0,015	0,005	0,032	0,076	0,097	0,007
1998	0,362	0,116	1,249	0,072	0,002	0,002	0,051	0,291	0,008
Média	**0,639**	**0,086**	**1,120**	**0,034**	**0,006**	**0,010**	**0,040**	**0,170**	**0,007**
					Touriga Francesa				
1996 a	0,507	0,102	1,565	0,022	0,003	0,006	0,040	0,543	0,006
1996 b	0,451	0,086	1,140	0,022	0,003	0,003	0,024	0,063	0,006
1997 a	0,512	0,077	1,143	0,010	0,007	0,021	0,066	0,139	0,005
1997 b	0,586	0,103	0,795	0,011	0,003	0,008	0,030	0,293	0,008
1997 c	0,798	0,091	3,071	0,011	0,007	0,004	0,037	0,329	0,006
1998	0,768	0,090	2,410	0,008	0,002	0,014	0,044	0,333	0,008
Média	**0,604**	**0,092**	**1,687**	**0,014**	**0,004**	**0,009**	**0,040**	**0,283**	**0,007**

* Teores em mg/L
nd – não detectado

TABELA 7.2 (cont.)

AMINAS BIOGÉNICAS — RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE MOSTOS

	1,3-DAP	PUT	CAD	EPMD	EPM	2-FEA	TIR	HIST	Total
Touriga Nacional									
1996 a	0,014	2,210	0,100	2,311	0,545	0,068	0,039	0,138	**7,746**
1996 b	0,013	1,582	0,092	2,290	0,438	0,044	nd	0,054	**6,215**
1996 c	0,012	1,059	0,071	1,900	0,282	0,023	nd	0,113	**4,505**
1996 d	0,030	2,152	0,109	2,632	0,856	0,028	nd	0,086	**7,106**
1997 a	0,036	3,141	0,115	7,899	3,738	0,281	0,023	0,082	**19,061**
1997 b	0,029	2,834	0,133	4,866	2,093	0,327	0,016	0,067	**12,967**
1998	0,032	3,867	0,262	1,234	0,182	0,102	nd	0,043	**7,875**
Média	**0,024**	**2,406**	**0,126**	**3,305**	**1,162**	**0,125**	**0,011**	**0,083**	**9,354**
Touriga Francesa									
1996 a	0,011	2,601	0,460	1,316	0,044	0,059	nd	0,121	**7,406**
1996 b	0,009	2,832	0,440	0,895	0,035	0,043	nd	0,140	**6,192**
1997 a	0,014	2,194	0,219	2,250	0,225	0,375	0,011	0,109	**7,377**
1997 b	0,015	2,707	0,723	0,989	0,067	0,087	nd	0,105	**6,530**
1997 c	0,010	2,089	0,276	2,011	0,206	0,312	0,038	0,036	**9,332**
1998	0,020	2,896	0,234	3,198	0,653	0,189	nd	0,059	**10,926**
Média	**0,013**	**2,553**	**0,392**	**1,777**	**0,205**	**0,178**	**0,008**	**0,095**	**7,961**

* Teores em mg/L
nd – não detectado

TABELA 7.2 (cont.)

AMINAS BIOGÉNICAS — RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE MOSTOS

	MA	DMA	EA	DEA	IPA	IBA	2-MBA	IAA	PIR
Tinta Barroca									
1996	0,349	0,094	1,177	0,030	0,024	nd	0,022	0,090	0,006
1997	0,664	0,067	1,266	0,053	0,005	0,039	0,117	1,168	0,005
1998	0,388	0,061	1,100	0,011	0,002	nd	0,016	0,025	0,005
Média	**0,467**	**0,074**	**1,181**	**0,031**	**0,010**	**0,013**	**0,052**	**0,428**	**0,005**
Tinta Roriz									
1996	0,246	0,041	0,322	0,009	0,002	nd	0,016	0,022	0,003
1997 a	0,596	0,072	3,211	0,011	0,002	0,038	0,092	0,508	0,009
1997 b	0,943	0,058	4,547	0,011	0,003	0,010	0,032	0,465	0,006
1998	0,580	0,048	0,337	0,009	0,001	nd	0,016	0,006	0,005
Média	**0,591**	**0,055**	**2,104**	**0,010**	**0,002**	**0,012**	**0,039**	**0,250**	**0,006**
Tinto Cão									
1996 a	0,600	0,071	1,674	0,010	0,002	0,009	0,032	0,153	0,005
1996 b	0,602	0,091	0,576	0,008	0,002	nd	0,018	0,027	0,003
1996 c	0,732	0,090	1,523	0,009	0,002	0,004	0,032	0,456	0,005
1998	0,764	0,058	1,182	0,009	0,009	nd	0,018	0,009	0,003
Média	**0,675**	**0,078**	**1,239**	**0,009**	**0,004**	**0,003**	**0,025**	**0,161**	**0,004**

* Teores em mg/L
nd – não detectado

TABELA 7.2. (cont.)

AMINAS BIOGÉNICAS — RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE MOSTOS

	1,3-DAP	PUT	CAD	EPMD	EPM	2-FEA	TIR	HIST	Total
Tinta Barroca									
1996	0,011	3,310	0,587	0,688	0,136	0,071	0,018	0,102	**6,715**
1997	0,014	1,485	0,069	2,289	0,395	0,486	0,015	0,131	**8,268**
1998	0,017	4,150	0,070	3,501	0,847	0,020	nd	0,077	**10,290**
Média	**0,014**	**2,982**	**0,242**	**2,159**	**0,459**	**0,192**	**0,011**	**0,103**	**8,424**
Tinta Roriz									
1996	0,011	1,075	0,074	1,579	0,109	0,103	nd	0,017	**3,539**
1997 a	0,038	3,695	0,236	3,036	0,232	0,271	0,013	0,028	**12,088**
1997 b	0,084	7,254	0,263	2,070	0,202	0,094	nd	0,024	**16,066**
1998	0,023	1,979	0,073	1,795	0,201	0,030	nd	0,026	**5,129**
Média	**0,039**	**3,501**	**0,162**	**2,120**	**0,186**	**0,102**	**0,003**	**0,024**	**9,206**
Tinto Cão									
1996 a	0,019	4,671	0,030	1,236	0,288	0,102	0,066	0,054	**9,022**
1996 b	0,011	1,700	0,030	1,780	0,285	0,022	0,071	0,047	**5,273**
1996 c	0,016	3,900	0,034	1,840	0,409	0,110	0,067	0,078	**9,307**
1998	0,024	4,433	0,025	2,504	0,183	0,014	nd	0,054	**9,289**
Média	**0,018**	**3,676**	**0,030**	**1,840**	**0,291**	**0,062**	**0,051**	**0,058**	**8,223**

* Teores em mg/L
nd – não detectado

TABELA 7.3

AMINAS BIOGÉNICAS

RESULTADOS* MÉDIOS OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE MOSTOS POR ANO DE COLHEITA

	MA	DMA	EA	DEA	IPA	IBA	2-MBA	IAA	PIR
1996	0,556	0,081	0,975	0,023	0,006	0,002	0,023	0,153	**0,005**
1997	0,697	0,080	2,235	0,017	0,005	0,023	0,066	0,434	**0,007**
1998	0,572	0,075	1,256	0,022	0,003	0,003	0,029	0,133	**0,006**
	1,3-DAP	**PUT**	**CAD**	**EPMD**	**EPM**	**2-FEA**	**TIR**	**HIST**	**TOTAL**
1996	0,014	2,463	0,184	1,679	0,312	0,053	0,024	0,086	**6,639**
1997	0,030	3,175	0,254	3,176	0,895	0,279	0,015	0,073	**11,461**
1998	0,023	3,465	0,133	2,446	0,413	0,071	0	0,052	**8,702**

* Teores em mg/L

7.2.3. Discussão dos resultados

Da leitura dos resultados obtidos parece-nos ser de salientar os seguintes aspectos:

1. Encontraram-se nos mostos 17 das 22 aminas estudadas. As excepções corresponderam à propilamina, à butilamina, à piperidina, à morfolina e à 1,6-diaminohexano, que não foram encontradas em nenhuma das amostras estudadas.

2. O somatório dos teores das 17 aminas biogénicas encontradas nas 24 amostras de mostos estudadas variou entre 4,505 e 19,061 mg/L, com um teor médio global de 8,676 mg/L.

   Os teores médios obtidos para cada casta apresentaram-se extremamente homogéneos, com um máximo de 9,354 mg/L para a casta T. Nacional e um mínimo de 7,961 mg/L para a casta T. Francesa.

   No que respeita aos três anos em estudo, verificou-se uma maior diferenciação; as amostras correspondentes a 1997 apresentaram um teor médio de 11,461 mg/L (encontrando-se aqui as 5 amostras com teores mais elevados), enquanto as amostras de 1998 apresentaram um teor médio de 8,702 mg/L e as de 1996 um teor médio de 6,639 mg/L (incluindo-se neste ano 5 das 6 amostras com mais baixos teores).

3. De entre as 17 aminas encontradas, a putrescina e a espermidina apresentaram-se como as mais abundantes.

   A putrescina apresentou um teor médio global de 2,909 mg/L, tendo apresentado um máximo de 7,254 mg/L e um mínimo de 1,059 mg/L. Os teores médios obtidos para cada casta apresentaram uma certa homogeneidade, variando entre 3,676 mg/L (T. Cão) e 2,406 (T. Nacional). O mesmo se poderá dizer para os teores médios correspondentes aos 3 anos em estudo — 1996: 2,463 mg/L; 1997: 3,175 mg/L; 1998: 3,465 mg/L.

   No caso da espermidina verificou-se um teor médio global de 2,338 mg/L, com um máximo de 7,899 mg/L e um mínimo de 0,688 mg/L. Também neste caso não se verificaram grandes diferenças entre as cinco castas estudadas, embora a casta T. Nacional tenha apresentado o maior teor médio, 3,305 mg/L, enquanto o menor foi observado na casta T. Francesa, 1,777 mg/L. No que respeita aos 3 anos em estudo, a variação verificada

apresentou um certo paralelismo com a observada nos teores de aminas totais apresentados no ponto 2. Assim, no ano de 1997 o teor médio foi mais elevado — 3,176 mg/L — seguindo-se o ano de 1998 — 2,446 mg/L — e, por fim, o de 1996 — 1,679 mg/L.

4. De entre as outras aminas estudadas, a única a apresentar teores sistematicamente superiores a 1 mg/L foi a etilamina. O teor médio global encontrado foi de 1,453 mg/L, com um máximo de 4,547 mg/L e um mínimo de 0,322 mg/L. Os teores médios obtidos para cada casta variaram entre 2,104 mg/L (T. Roriz) e 1,142 mg/L (T. Nacional). Os teores médios obtidos para cada ano foram de 2,235 mg/L (1997), 1,256 mg/L (1998) e 0,975 mg/L (1996).

5. O somatório das 3 aminas mais abundantes — putrescina, espermidina e etilamina — representa em média 77,2 % do total de aminas encontrado, variando entre um mínimo de 60,9 % e um máximo de 87,4 %.

6. No grupo das aminas voláteis, para além da etilamina, o destaque vai para a presença da metilamina e da isoamilamina.

   A metilamina apresentou teores muito homogéneos, variando entre um máximo de 0,997 mg/L e um mínimo de 0,246 mg/L, com um teor médio de 0,607 mg/L. Os teores médios observados para cada casta e para cada ano foram muito semelhantes entre si, da mesma ordem de grandeza do teor médio global.

   A isoamilamina apresentou teores entre 1,168 e 0,006 mg/L, com um teor médio de 0,242 mg/L. Os teores médios por casta foram algo semelhantes — máximo de 0,283 mg/L na T. Francesa; mínimo de 0,161 mg/L na T. Cão — com excepção da casta T. Barroca, que apresentou um teor médio mais elevado, mas sem grande significado, pois uma da amostras apresentou o teor máximo verificado, 1,168 mg/L, enquanto as outras duas apresentaram teores inferiores a 0,100 mg/L. No que respeita aos 3 anos em estudo, o teor médio das amostras de 1997 foi substancialmente mais elevado — 0,434 mg/L — do que os teores médios dos restantes anos: 1996: 0,153 mg/L; 1998: 0,133 mg/L.

7. No grupo das di e poliaminas, para além da putrescina e da espermidina, é de assinalar também a presença de níveis consideráveis de espermina e de cadaverina.

A espermina apresentou teores com uma amplitude relativamente elevada, incluindo duas amostras com teores substancialmente superiores às restantes — 3,738 e 2,093 mg/L — e três amostras com teores inferiores a 0,100 mg/L. O teor médio encontrado foi de 0,527 mg/L. Os teores médios obtidos para cada casta variaram entre 1,162 mg/L (T. Nacional) e 0,186 mg/L (T. Roriz) enquanto os teores médios obtidos para cada ano foram de 0,895 mg/L (1997), 0,413 mg/L (1998) e 0,312 mg/L (1996). Em ambos os casos, estes valores médios são fortemente influenciados pelos elevados teores apresentados por duas amostras, acima indicados, ambas da casta T. Nacional e de 1997.

A cadaverina apresentou um teor médio de 0,197 mg/L, com uma amplitude algo elevada, com 4 amostras a apresentar teores muito reduzidos (inferiores a 0,040 mg/L) e outras 4 amostras a apresentar teores superiores a 0,400 mg/L. Analisando por castas, verifica-se um teor médio significativamente inferior nas amostras de T. Cão — 0,030 mg/L — enquanto as amostras de T. Francesa apresentaram o teor médio mais elevado: 0,392 mg/L. A análise dos resultados por anos apresenta valores mais homogéneos, concordantes com o padrão verificado para as restantes aminas deste grupo: teor médio mais elevado em 1997 — 0,254 mg/L — e inferior nos outros 2 anos: 0,184 mg/L em 1996 e 0,133 mg/L em 1998.

8. As aminas consideradas normalmente como mais problemáticas do ponto de vista de segurança alimentar — histamina, 2-feniletilamina e tiramina — apresentaram genericamente teores muito reduzidos.

9. Não se encontrou qualquer tipo de relação entre a presença de aminas biogénicas e a presença de ácidos orgânicos nas amostras.

7.3. Aminas biogénicas em vinhos elementares das cinco castas mais usadas na elaboração de vinho do Porto: Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão

7.3.1. Caracterização das amostras

Estudaram-se vinhos elementares das cinco castas em estudo — Touriga Nacional, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinta Barroca e Tinto Cão — correspondentes aos anos de 1995 a 1998. Os vinhos foram vinificados, à escala empresarial, em cubas de cimento, a partir de mostos constituídos por uvas idênticas às recolhidas (cada vinho elementar foi produzido a partir de uvas da mesma casta colhidas na mesma Quinta mas sem distinção da parcela de terreno). A fermentação teve uma duração de cerca de 60 horas, tendo sido interrompida pela adição de uma quantidade de aguardente vínica correspondente a 110-115 litros para cada 550 litros de vinho, de forma a dar origem a vinhos com um teor alcoólico de 19-20°. Os vinhos foram armazenados durante 3-4 meses em cascos de madeira de 550 litros, sujeitos apenas a uma ligeira sulfitação (60 a 80 mg/L de SO_2 total; 0 de SO_2 livre) e posteriormente enviados para o laboratório, onde foram armazenados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ainda na adega, duas das amostras (Touriga Nacional 1997 e Tinta Barroca 1997) foram entretanto sujeitas a um processo de pasteurização, devido à verificação de níveis elevados de acidez volátil.

Tal como no caso dos mostos, as amostras foram caracterizadas em termos de pH e de constituição nos principais ácidos orgânicos. Os resultados obtidos nessas determinações são apresentados na Tabela 7.4.

TABELA 7.4

pH E TEORES* DE ÁCIDOS NAS AMOSTRAS DE VINHOS ELEMENTARES ESTUDADAS

Ano	pH	Acético	Cítrico	Láctico	Málico	Succínico	Tartárico
			Touriga Nacional				
1995	3,44	0,244	0,319	0,324	1,581	0,416	1,507
1996	3,64	0,085	0,204	0,114	0,652	0,162	1,043
1997	3,58	0,543	0,368	0,217	0,858	0,308	1,084
1998	3,71	0,112	0,329	0,190	1,370	0,262	1,168
			Touriga Francesa				
1995	3,86	0,362	0,533	0,212	1,450	0,510	1,081
1996	3,52	0,141	0,371	0,126	0,919	0,276	1,616
1997	3,60	0,295	0,551	0,188	0,994	0,334	1,182
1998	3,45	0,101	0,718	0,172	0,827	0,347	1,534
			Tinta Barroca				
1995	3,80	0,277	0,432	0,329	1,606	0,454	1,081
1996	3,44	0,255	0,399	0,221	1,595	0,429	1,616
1997	3,62	0,445	0,308	0,538	0,949	0,399	1,182
1998	3,45	0,119	0,302	0,188	1,032	0,026	1,534
			Tinta Roriz				
1995	3,79	0,100	0,196	0,230	1,150	0,360	1,579
1996	3,88	0,087	0,293	0,335	1,217	0,256	1,444
1998	3,55	0,189	0,354	0,363	1,315	0,390	1,352
			Tinto Cão				
1996	3,97	0,160	0,471	0,199	1,705	0,407	1,229
1998	3,83	0,167	0,431	0,233	1,464	0,369	1,092

* Teores em g/L

7.3.2. Resultados obtidos

Os resultados obtidos para o teor das diferentes aminas biogénicas nas amostras de vinhos elementares analisadas são apresentados na tabela 7.5. Tal como no caso dos mostos, todas as amostras foram sujeitas às três metodologias analíticas desenvolvidas. No caso das diaminas (1,3-diaminopropano, putrescina e cadaverina) e das aminas aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) apresenta-se novamente a média dos resultados obtidos pela aplicação de dois diferentes métodos.

A exemplo do critério seguido para a apresentação dos resultados obtidos nos mostos, as amostras estão agrupadas pelas cinco castas estudadas, sendo apresentadas para cada casta e cada amina a respectiva média dos resultados obtidos. De forma a facilitar a interpretação dos resultados, apresenta-se na Tabela 7.6 a média dos resultados obtidos por ano de colheita.

TABELA 7.5

AMINAS BIOGÉNICAS — RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE VINHOS MONOVARIETAIS

Ano	MA	DMA	EA	DEA	IPA	IBA	2-MBA	IAA	PIR
					Touriga Nacional				
1995	0,312	0,106	2,644	nd	0,005	nd	nd	0,442	0,330
1996	0,327	0,093	1,540	nd	0,010	nd	0,002	0,235	0,037
1997	0,622	0,086	5,480	nd	0,018	0,073	0,267	3,523	0,256
1998	0,493	0,095	3,569	nd	0,006	0,029	0,225	3,528	0,154
Média	**0,439**	**0,095**	**3,308**	—	**0,010**	**0,026**	**0,124**	**1,932**	**0,194**
					Touriga Francesa				
1995	0,301	0,158	6,376	nd	0,006	0,012	0,016	1,143	0,654
1996	0,294	0,132	3,244	nd	0,005	0,028	0,133	3,361	0,077
1997	0,414	0,098	4,296	nd	0,023	0,015	0,053	2,168	0,261
1998	0,361	0,084	2,742	nd	0,004	0,010	0,092	3,574	0,166
Média	**0,343**	**0,118**	**4,165**	—	**0,010**	**0,016**	**0,074**	**2,562**	**0,290**
					Tinta Barroca				
1995	0,174	0,090	3,310	nd	0,004	nd	0,002	0,399	0,429
1996	0,198	0,073	1,950	nd	0,007	nd	0,015	1,404	0,336
1997	0,306	0,076	2,676	nd	0,007	0,006	0,065	2,125	0,282
1998	0,313	0,066	2,277	nd	0,009	0,002	0,035	1,744	0,189
Média	**0,248**	**0,076**	**2,553**	—	**0,007**	**0,002**	**0,029**	**1,418**	**0,309**
					Tinta Roriz				
1995	0,287	0,082	2,608	nd	0,008	nd	nd	0,069	0,553
1996	0,269	0,055	0,777	nd	0,003	nd	0,008	0,402	0,059
1998	0,454	0,084	5,932	nd	0,005	0,012	0,051	1,464	0,201
Média	**0,337**	**0,074**	**3,106**	—	**0,005**	**0,004**	**0,020**	**0,645**	**0,271**
					Tinto Cão				
1996	0,289	0,102	1,668	nd	0,003	nd	nd	0,266	0,458
1998	0,298	0,091	1,667	nd	0,006	nd	0,014	0,309	0,125
Média	**0,294**	**0,097**	**1,668**	—	**0,005**	—	**0,007**	**0,288**	**0,292**

* Teores em mg/L
nd – não detectado

TABELA 7.5 (cont.)

AMINAS BIOGÉNICAS — RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE VINHOS MONOVARIETAIS

	1,3-DAP	PUT	CAD	EPMD	EPM	2-FEA	TIR	HIST	TOTAL
					Touriga Nacional				
1995	0,008	3,515	0,164	0,009	nd	0,334	0,025	0,035	**7,929**
1996	0,021	2,981	0,187	0,016	nd	0,392	0,050	0,080	**5,971**
1997	0,021	5,439	0,268	0,079	nd	0,872	0,124	0,342	**17,470**
1998	0,032	4,524	0,196	0,058	nd	0,734	0,044	0,175	**13,862**
Média	**0,021**	**4,115**	**0,204**	**0,041**	—	**0,583**	**0,061**	**0,158**	**11,308**
					Touriga Francesa				
1995	0,011	3,752	0,336	0,008	nd	0,847	0,064	0,042	**13,726**
1996	0,027	5,197	0,863	0,008	nd	1,308	0,099	0,138	**14,914**
1997	0,020	4,967	0,448	0,030	nd	0,831	0,331	0,566	**14,521**
1998	0,035	4,729	0,425	0,016	nd	1,133	0,047	0,249	**13,667**
Média	**0,023**	**4,661**	**0,518**	**0,016**	—	**1,030**	**0,135**	**0,249**	**14,207**
					Tinta Barroca				
1995	0,008	3,321	0,090	0,013	nd	0,428	0,040	0,033	**8,341**
1996	0,014	3,435	0,208	0,013	nd	0,799	0,063	0,086	**8,601**
1997	0,010	3,509	0,145	0,039	nd	1,039	0,160	0,387	**10,832**
1998	0,022	4,657	0,171	0,022	nd	0,751	0,048	0,134	**10,440**
Média	**0,014**	**3,731**	**0,154**	**0,022**	—	**0,754**	**0,078**	**0,160**	**9,554**
					Tinta Roriz				
1995	0,008	4,419	0,194	0,006	nd	0,127	0,036	0,024	**8,421**
1996	0,008	1,984	0,179	0,014	nd	0,158	0,032	0,028	**3,976**
1998	0,046	5,180	0,280	0,025	nd	0,443	0,053	0,163	**14,393**
Média	**0,021**	**3,861**	**0,218**	**0,015**	—	**0,243**	**0,040**	**0,072**	**8,930**
					Tinto Cão				
1996	0,009	2,902	0,075	nd	nd	0,394	0,095	0,038	**6,299**
1998	0,032	4,510	0,130	0,035	nd	0,531	0,060	0,195	**8,003**
Média	**0,021**	**3,706**	**0,103**	**0,018**	—	**0,463**	**0,078**	**0,117**	**7,151**

* Teores em mg/L
nd – não detectado

TABELA 7.6

AMINAS BIOGÉNICAS

RESULTADOS* MÉDIOS OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE VINHOS ELEMENTARES POR ANO DE COLHEITA

	MA	DMA	EA	DEA	IPA	IBA	2-MBA	IAA	PIR
1995	0,269	0,109	3,735	—	0,006	0,003	0,005	0,513	0,492
1996	0,275	0,091	1,836	—	0,006	0,006	0,032	1,134	0,193
1997	0,447	0,087	4,151	—	0,016	0,031	0,128	2,605	0,266
1998	0,384	0,084	3,237	—	0,006	0,011	0,083	2,124	0,167

	1,3-DAP	PUT	CAD	EPMD	EPM	2-FEA	TIR	HIST	TOTAL
1995	0,009	3,752	0,196	0,009	—	0,434	0,041	0,034	**9,604**
1996	0,016	3,300	0,302	0,010	—	0,610	0,068	0,074	**7,952**
1997	0,017	4,638	0,287	0,049	—	0,914	0,205	0,432	**14,274**
1998	0,033	4,720	0,240	0,031	—	0,718	0,050	0,183	**12,073**

* Teores em mg/L

7.3.3. Discussão dos resultados

Uma adequada leitura e a consequente discussão dos resultados obtidos para os teores das diferentes aminas biogénicas nos vinhos monovarietais estão condicionadas por dois tipos de factores, que terão de ser previamente referidos.

O primeiro desses factores está relacionado com o processo de elaboração de vinho do Porto, o qual se caracteriza pela paragem da fermentação por adição de uma quantidade significativa de aguardente (no caso em questão, e como é norma, cerca de 110-115 L de aguardente para um total de 550 L de vinho). Essa adição implica uma diluição dos constituintes do mosto/vinho no momento em que a mesma tem lugar, diluição essa que deve ser tida em conta ao comparar-se os teores de aminas nos vinhos obtidos com os teores encontrados nos mostos.

O segundo dos factores a considerar tem a ver com o facto da análise não ter sido efectuada de imediato logo após a elaboração dos vinhos, mas somente após alguns meses de estágio do vinho na adega e mais alguns meses (mais do que um ano, em regra) no laboratório. Aqui, como atrás foi referido, as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente, sendo palco do natural processo evolutivo a que os vinhos são sujeitos. Desta forma, os resultados obtidos não reflectem necessariamente a composição dos vinhos no momento exacto do final do processo fermentativo, pelo que as ilações a retirar sobre a formação ou degradação de algumas aminas durante a etapa fermentativa devem ser analisadas com as devidas precauções. No caso de algumas das aminas, inclusivamente, é possível verificar sinais de início de um processo evolutivo que se verificou ser característico das mesmas (ver capítulo 8), o que é normal atendendo a que todas as amostras foram sujeitas simultaneamente aos métodos analíticos desenvolvidos, pelo que a diferença de idades das mesmas se reflecte nos resultados obtidos.

Ainda assim, alguns dos resultados obtidos reflectem com nitidez fenómenos ocorridos durante o processo fermentativo com influência nos teores de algumas das aminas estudadas. Sucintamente, pode afirmar-se que:

1. Encontraram-se nos vinhos estudados apenas 15 das 17 aminas biogénicas encontradas nos mostos. Não foram detectadas a dietilamina, cuja presença nos mostos era residual, e a espermina, presente nos mostos em quantidades relativamente importantes.

2. O somatório dos teores das 15 aminas encontradas nas 17 amostras de vinhos elementares estudadas variou entre 3,976 e 17,470 mg/L.

   Os teores médios obtidos para cada uma das cinco castas em estudo variaram entre 14,207 mg/L para a T. Francesa e 7,151 mg/L para a T. Cão. No que respeita aos 4 anos em estudo, os teores médios variaram entre 14,274 mg/L para os vinhos de 1997 e 7,952 mg/L para os vinhos de 1996.

   O teor médio global foi de 10,472 mg/L o que, em comparação com o teor médio global observado para os mostos, de 8,676 mg/L, indica um balanço ligeiramente positivo para o teor de aminas biogénicas durante o processo fermentativo e o período imediatamente subsequente.

3. Ao nível da cada uma das aminas estudadas, são várias e importantes as diferenças observadas entre os vinhos e os mostos:

   - verifica-se o desaparecimento praticamente total da espermidina e da espermina, duas das aminas mais abundantes nos mostos. Esta observação é concordante com algumas referências da literatura (citadas no capítulo 1) acerca da utilização destas aminas como fonte azotada por parte dos microorganismos responsáveis pelo processo fermentativo.

   - verifica-se igualmente, embora em muito menor grau, uma diminuição dos teores de metilamina, a qual não pode ser completamente justificada pelo efeito de diluição provocado pela adição de aguardente.

   - de modo inverso, é de salientar a observação de sinais claros sobre a formação de algumas aminas biogénicas durante o processo fermentativo.

     O caso mais evidente é o da pirrolidina, amina raramente referida nos estudos deste tipo, e que pensámos ser a primeira vez que é identificada em vinhos do Porto. Enquanto os mostos apresentam teores residuais insignificantes do composto, em regra inferiores a 10 μg/L, os vinhos apresentam sistematicamente teores da ordem das centenas de mg/L. Para lá da formação de pirrolidina que possa ter lugar no decorrer do processo fermentativo, a mesma continua a ocorrer durante o

envelhecimento dos vinhos, como se pode verificar nos estudos relatados no capítulo seguinte. Uma certa tendência para a observação de teores tanto mais elevados quanto maior a idade do vinho é também já notória nas amostras de vinhos elementares aqui em análise, resultando não de especificidades próprias das diferentes colheitas mas sim do facto já assinalado dos vinhos terem sido analisados em simultâneo, logo com diferentes tempos de evolução.

As outras aminas biogénicas cuja ocorrência durante o processo fermentativo parece evidente podem dividir-se em dois grupos.

O primeiro é constituído pela etilamina, a isoamilamina e a 2-feniletilamina, cujos teores nos vinhos são substancialmente superiores aos observados nos mostos; juntamente com a pirrolidina, são estas aminas as principais responsáveis pelo facto, atrás referido, de os vinhos apresentarem teores globais superiores aos mostos.

Um segundo grupo é constituído pelas aminas que habitualmente despertam maior interesse pelas suas implicações de ordem fisiológica e toxicológica, ou seja, a putrescina, a cadaverina, a tiramina e a histamina; os teores destas aminas encontrados nos vinhos são, em regra, apenas ligeiramente superiores aos encontrados nos mostos, sinal evidente da reduzida capacidade demostrada pelas leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica na sua formação, como salientado por outros autores. Na análise dos teores observados nestes compostos há dois factos que merecem um destaque particular.

No caso da putrescina, é evidente uma tendência para o decréscimo dos teores com a idade dos vinhos; embora a tendência seja inversa, a justificação é exactamente a mesma apontada para a pirrolidina, ou seja, o facto de os vinhos terem sido analisados em simultâneo e reflectirem já uma tendência geral para a evolução dos teores de putrescina com a idade, que será referida com mais pormenor no capítulo seguinte, dedicado ao estudo de vinhos envelhecidos.

No caso da histamina e da tiramina, é notória a presença de teores mais elevados — embora só num dos casos ultrapassando os 0,5 mg/L — nos vinhos de 1997. Como referido anteriormente, dois destes vinhos — T. Nacional e T. Barroca — foram

objecto de um processo de pasteurização durante a sua estadia na adega, devido à verificação de níveis de acidez volátil acima do normal, logo sintomáticos do desenvolvimento de microorganismos indesejáveis (níveis estes de certa forma confirmados nos teores obtidos para o ácido acético apresentados na Tabela 7.4). A formação de histamina e de tiramina em quantidades superiores ao normal estará, em nosso entender, ligada não ao processo de pasteurização mas sim ao desenvolvimento microbiano que implicou o recurso ao mesmo. De notar que a amostra de T. Barroca do mesmo ano, apesar de não ter sido pasteurizada, apresenta sinais de idêntico fenómeno, isto é, teores de histamina, de tiramina e, também, de ácido acético, superiores à média e idênticos ao das amostras de T. Nacional e de T. Barroca do mesmo ano.

4. Tal como nos mostos, não foram encontradas quaisquer correlações entre a presença de aminas biogénicas e a constituição dos vinhos em ácidos orgânicos.

7.4. Análise discriminante

Tendo como objectivo verificar a existência de possíveis correlações entre a ocorrência de aminas biogénicas no tipo de mostos e de vinhos alvo do nosso estudo e as diferentes castas estudadas ou, alternativamente, as diferentes colheitas analisadas, procedeu-se à análise discriminante dos dados obtidos tanto no caso dos mostos como dos vinhos monovarietais.

A análise discriminante calcula uma matriz de correlações totais entre as variáveis (aminas, neste caso) considerando a não existência de agrupamentos, e calcula uma matriz de correlações entre as aminas intra-grupos (castas ou anos, neste caso). Por diferença calcula uma matriz de correlações entre-grupos. No essencial, a análise discriminante baseia-se num rácio entre as correlações entre-grupos e as correlações intra-grupos. Enquanto as variações entre-grupos forem superiores às variações intra-grupos, a análise discriminante pode definir variáveis latentes, isto é, novas variáveis semelhantes a rectas de regressão (eixos, dimensões, variáveis discriminantes, variáveis canónicas). Estas variáveis são combinações de características (aminas) que possibilitam uma aproximação

máxima das observações dentro de cada grupo e, simultaneamente, um máximo afastamento entre as observações de diferentes grupos.

De acordo com Mardia *et al.* [1979], existem essencialmente três métodos para efectuar a análise discriminante: "forward analysis ", "backward analysis " e "standard analysis". No método de "forward analysis", que foi o usado neste trabalho, verifica-se qual a característica (amina) que melhor aproxima as observações dentro de cada grupo e mais afasta as observações entre grupos. Uma vez identificada a referida característica, procura-se em seguida uma segunda característica, depois uma terceira e assim por diante, até que todas as variáveis sejam introduzidas no modelo, por ordem decrescente de capacidade discriminante. No método "backward analysis", incluem-se inicialmente todas as variáveis, e vão-se retirando sucessivamente as que menos alteram o modelo. Ambos os métodos são, evidentemente, iterativos. Por último, o método "standard analysis" considera todas as variáveis em simultâneo, sem retirar ou adicionar quaisquer variáveis, sendo conhecido por análise de variáveis canónicas. A diferença entre este método e os dois anteriores consiste na inexistência de uma selecção prévia de variáveis.

A partir dos métodos "forward" ou "backward", pode seleccionar-se um conjunto de variáveis com maior poder discriminante (as primeiras) e proceder-se a uma análise de variáveis canónicas. O número de variáveis canónicas definidas é igual ao número de variáveis (aminas) ou ao número de grupos menos 1 (o que for mais pequeno). A importância relativa de cada variável canónica é dada pelo seu valor próprio ("eigen value"). Só se devem considerar as variáveis cujo valor próprio seja superior a 1, pois tal significa que correspondem a situações nas quais a variação entre-grupos é superior à variação intra-grupos. A vantagem de efectuar uma análise de variáveis canónicas reside no facto de se poder fazer uma representação dos dados em um ou dois gráficos. Nesses gráficos projectam-se as observações individuais (mostos ou vinhos) e também as variáveis canónicas (que são representadas como linhas rectas). As variáveis canónicas interpretam-se através das correlações entre as variáveis iniciais (aminas) e cada uma das variáveis canónicas.

Todas as análises foram efectuadas de forma a englobar no modelo um número mínimo de parâmetros necessário para distinguir as diferentes castas (ou anos) e, simultaneamente, manter a significância estatística.

7.4.1. Análise discriminante de mostos por castas

Os resultados obtidos no que respeita à discriminação dos mostos em estudo por castas são apresentados nos gráficos da Figura 7.1 (a e b).

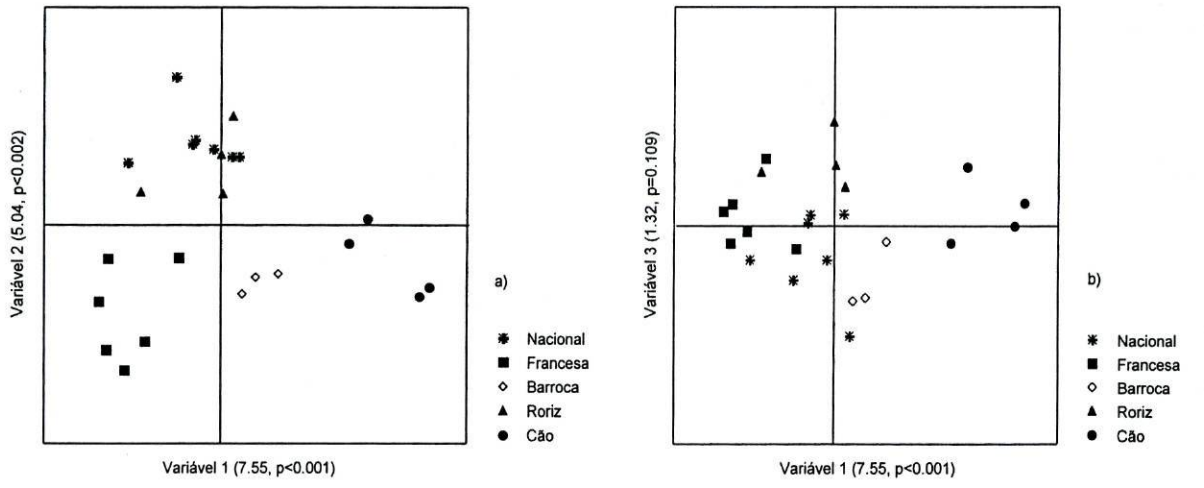


Figura 7.1. Análise discriminante de mostos por castas — a) variáveis canónicas 1 e 2; b) variáveis canónicas 1 e 3. Os valores entre parêntesis correspondem ao valor próprio e à significância de cada variável.

Da observação dos gráficos obtidos pode concluir-se que:

1. Através da variável canónica 1 (eixo horizontal) é possível separar os mostos da casta T. Cão e, secundariamente, os mostos da casta T. Barroca — ambos situados na parte positiva do referido eixo — dos mostos das restantes castas. As características (aminas) responsáveis pela definição desta variável são, fundamentalmente, a tiramina — cujos teores aumentam da esquerda para a direita, ou seja, encontra-se presente em maior quantidade nos mostos das casta T. Cão e T. Barroca — e a cadaverina — cujo comportamento é, de certo modo, inverso.
2. Através da variável canónica 2 (eixo vertical) é possível, fundamentalmente, obter uma separação dos mostos da casta T. Francesa — situados na parte negativa do referido eixo — dos mostos das restantes castas. As características (aminas) responsáveis pela definição desta variável são, fundamentalmente, a 1,3-diaminopropano — cujos teores aumentam ao longo

do eixo (de baixo para cima), ou seja, encontra-se presente em menor quantidade nos mostos da casta T. Francesa — e a cadaverina — cujo comportamento é, de novo, inverso. De notar que a cadaverina assume igual importância na definição das duas variáveis canónicas referidas, aumentando para a esquerda e para baixo, ou seja, é maior nos mostos da casta T. Francesa do que em todos os restantes.

4. A variável canónica 3 foi também considerada, pese embora apresentar um "eigen value" próximo de 1 e uma significância reduzida. Tal deve-se ao facto de a mesma apenas discriminar os mostos das castas T. Nacional e T. Roriz. As características (aminas) responsáveis pela definição desta variável são, fundamentalmente, a histamina e a isopropilamina — cujos teores diminuem ao longo do eixo, ou seja, encontra-se em menor quantidade nos mostos da casta T. Roriz — e, com menor importância, a putrescina e a 1,3-diaminopropano — cujos teores aumentam ao longo do eixo, ou seja, encontram-se presente em maior quantidade nos mostos da casta T. Roriz.

7.4.2. Análise discriminante de mostos por anos

Os resultados obtidos no que respeita à discriminação dos mostos em estudo por ano são apresentados no gráfico da Figura 7.2.

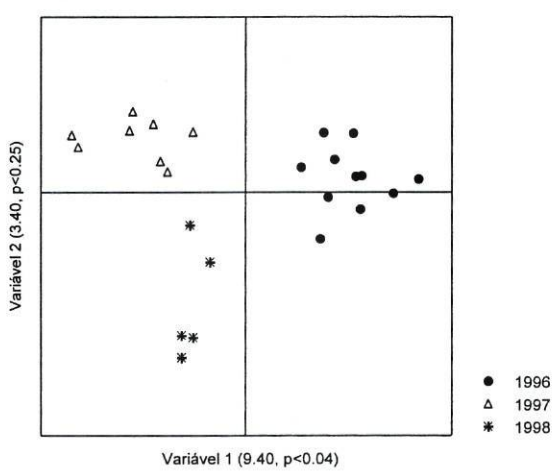


Figura 7.2. Análise discriminante de mostos por anos. Os valores entre parêntesis correspondem ao valor próprio e à significância de cada variável.

Da observação do gráfico pode concluir-se ser possível uma boa discriminação dos mostos estudados pelo ano de colheita, sendo essa discriminação maior do que a obtida em relação à casta (observada no item anterior).

A separação dos mostos pelos três anos de colheita estudados é obtida através das variáveis canónicas 1 (eixo horizontal) e 2 (eixo vertical). As características (aminas) com maior responsabilidade pela definição de ambas as variáveis são, embora com pesos diferentes, as mesmas: a isobutilamina, a 2-feniletilamina, a 2-metilbutilamina e, com menor importância, a etilamina. Todas estas aminas apresentam um comportamento idêntico: os seus teores diminuem ao longo do eixo horizontal (da esquerda para a direita) e aumentam ao longo do eixo vertical (de baixo para cima). Na prática formam um eixo virtual que corresponderia a teores crescentes diagonalmente para a esquerda e para cima, ou seja apresentam-se em maiores quantidades nos mostos de 1997 do que nos restantes.

7.4.3. Análise discriminante de vinhos por castas

A análise discriminante relativa aos vinhos monovarietais e à sua separação por castas resultou no gráfico apresentado na Figura 7.3.

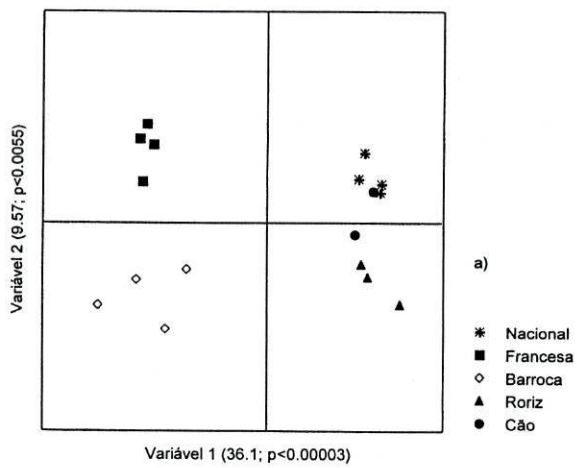


Figura 7.3. Análise discriminante de vinhos por castas. Os valores entre parêntesis correspondem ao valor próprio e à significância de cada variável.

Da sua observação pode concluir-se que:

1. Através da variável canónica 1 (eixo horizontal da Figura 7.3) é possível separar os vinhos da casta T. Francesa e da casta T. Barroca — ambos situados na parte negativa do referido eixo — dos vinhos das restantes castas. As características (aminas) responsáveis pela definição desta variável são, fundamentalmente, a 2-feniletilamina e a cadaverina — cujos teores aumentam da direita para a esquerda, ou seja, encontram-se presentes em maior quantidade nos vinhos das castas T. Francesa e T. Barroca.

2. Através da variável canónica 2 (eixo vertical da Figura 7.3) torna-se possível separar os vinhos das castas T. Francesa e T. Nacional — situados na parte positiva do referido eixo — dos vinhos das castas T. Barroca e T. Roriz — situados na parte negativa do referido eixo. As características (aminas) responsáveis pela definição desta variável são, de novo, a cadaverina e a 2-feniletilamina, neste caso juntamente com a 2-metilbutilamina.

   De notar que, tal como em casos anteriores, a cadaverina e a 2-feniletilamina assumem igual importância na definição das duas variáveis canónicas referidas, aumentando para a esquerda e para cima, ou seja, os respectivos teores são maiores nos mostos da casta T. Francesa do que em todos os restantes.

7.4.4. Análise discriminante de vinhos por anos

A análise discriminante dos vinhos por ano de colheita apresentou, tal como no caso dos mostos, resultados mais conclusivos do que a respectiva discriminação por castas. Os resultados obtidos podem ser observados no gráfico apresentado na Figura 7.4.

Da observação do gráfico, no qual as indicações gráficas de algumas amostras se encontram sobrepostas, pode concluir-se que:

1. Através da variável canónica 1 (eixo horizontal da Figura 7.4) é possível separar perfeitamente os vinhos de 1997 — situados na parte negativa do referido eixo — dos vinhos de 1996 — situados na parte positiva do mesmo eixo. A principal característica (amina) responsável pela definição desta variável é a histamina — cujos teores aumentam da direita

para a esquerda, ou seja, encontra-se presente em maior quantidade nos vinhos de 1997. Secundariamente, contribuem para a definição desta variável a tiramina, a isopropilamina e a espermidina, que apresentam um comportamento idêntico ao da histamina.

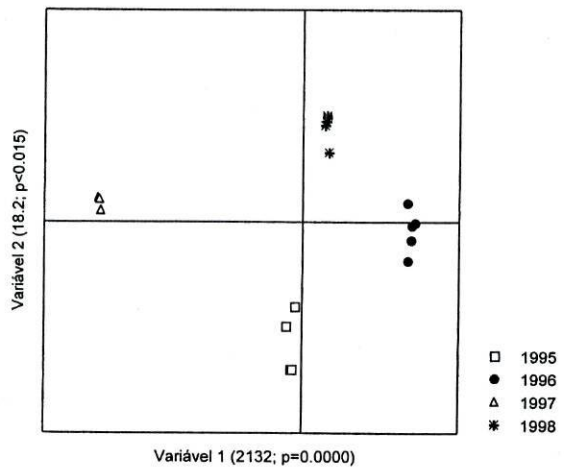


Figura 7.4. Análise discriminante de vinhos por anos. Os valores entre parêntesis correspondem ao valor próprio e à significância de cada variável.

2. Através da variável canónica 2 (eixo vertical da Figura 7.4) torna-se possível separar os vinhos de 1998 — situados na parte positiva do referido eixo — dos vinhos de 1995 — situados na sua parte negativa. As características (aminas) responsáveis pela definição desta variável são, principalmente, a 1,3-diaminopropano e a histamina, cujos teores aumentam ao longo da variável de baixo para cima, ou seja, encontram-se presente em maior quantidade nos vinhos de 1998. Secundariamente, contribuem para a definição desta variável a isoamilamina, que apresenta um comportamento idêntico, e a pirrolidina, cujos teores, inversamente, aumentam ao longo da variável de cima para baixo, ou seja, encontra-se presente em maior quantidade nos vinhos de 1995.

De realçar que esta análise deve ser interpretada à luz do facto anteriormente referido de as amostras terem sido analisadas em simultâneo, daí reflectirem já alterações nos teores de algumas aminas durante os primeiros tempos de armazenamento.

7.5. Conclusões gerais sobre a presença de aminas biogénicas em mostos e vinhos do Porto recém-elaborados

De uma leitura comparativa dos resultados obtidos nas amostras de mostos e de vinhos do Porto analisadas com os dados até agora existentes na literatura é possível destacar alguns aspectos que nos parecem especialmente relevantes. Alguns desses aspectos correspondem à confirmação de resultados obtidos noutros estudos deste tipo enquanto outros há que se nos afiguram constituir novos avanços no domínio em questão.

Assim, e no que respeita à confirmação de dados já referidos na literatura, temos:

1. Há uma presença importante nos mostos de espermidina e espermina, diminuindo os seus teores significativamente ao longo do processo fermentativo, de forma que a sua presença nos vinhos é meramente residual.

2. A presença nos mostos das aminas consideradas mais relevantes do ponto de vista de segurança alimentar, histamina e tiramina, é meramente residual, da ordem das dezenas de μg/L.

3. As aminas voláteis presentes nos mostos em maior quantidade são, por ordem decrescente, a etilamina, a metilamina e a isoamilamina, como tinha sido verificado nos trabalhos do grupo de Ough, citados no capítulo 1.

No que respeita aos aspectos que nos parecem constituir novidade face às referências existentes na literatura, temos:

1. A contribuição dos mostos para os teores de aminas biogénicas apresentados pelos vinhos é maior do que o até agora considerado pela generalidade dos autores. Para lá das poliaminas acima referidas, a principal contribuição para os teores encontrados nos mostos é dada pela aminas voláteis e, em particular, pela putrescina, cujos teores observados na grande maioria das amostras de mosto analisadas são superiores às poucas referências existentes na literatura (ver cap. 1 - ponto 1.2.5.3).

2. Verificou-se a presença nos mostos de uma série de outras aminas geralmente não referidas pelos restantes autores. Os teores encontrados são geralmente muito baixos, salientando-se a presença em quantidades sistematicamente superiores a 100 μg/L de 2-feniletilamina e de cadaverina.

3. Em condições normais de elaboração de vinhos do Porto é muita reduzida a formação de aminas biogénicas durante o período que engloba o processo fermentativo e as primeiras etapas de estágio dos vinhos obtidos. Merecem particular destaque os casos da histamina e da tiramina, aminas que se apresentam nos vinhos em teores pouco superiores aos observados nos mostos. Embora superiores, os teores de putrescina são também provenientes maioritariamente dos mostos e não do processo de vinificação.

4. As aminas cujos teores, em termos relativos, mais aumentam ao comparar-se os vinhos com os mostos são a pirrolidina, a 2-feniletilamina, a isoamilamina e a etilamina. No caso da pirrolidina pensámos ser a primeira vez que é referida a sua presença em vinhos do Porto. Os teores verificados nos vinhos analisados para estas três aminas são genericamente reduzidos, da ordem das centenas de μg/L; apenas no caso da 2-feniletilamina se observaram teores superiores a 1 mg/L e somente em três amostras.

Todas estas conclusões, nomeadamente as referentes à formação de aminas biogénicas durante a transformação do mosto em vinho devem ser lidas à luz do facto de se ter tratado de um estudo realizado apenas com vinhos do Porto. O processo tecnológico usado na produção deste tipo de vinhos, caracterizado por um curto período de fermentação seguido de um rápido e substancial aumento do teor alcoólico do meio, proporciona condições menos propícias para a ocorrência de contaminações bacterianas do que as que ocorrem durante a produção normal de vinhos não fortificados. A ausência de fermentação maloláctica no processo de vinificação, confirmada pelos resultados obtidos na análise dos ácidos láctico e málico presentes nos vinhos em estudo, é um factor adicional que contribui para essa reduzida actividade microbiana.

Os resultados obtidos apontam para que a ocorrência em vinhos de teores mais elevados do que os observados no estudo realizado para muitas das aminas biogénicas, em especial daquelas que habitualmente são alvo de uma maior atenção por parte dos diversos autores — histamina, tiramina e putrescina — será provavelmente uma consequência de actividade microbiana indesejável.

Finalmente, de referir que a aplicação da técnica de análise discriminante permitiu a separação, baseada apenas nos teores das aminas biogénicas estudadas, da maioria das 5 castas em estudo, de outra forma difícil de visualizar. A cadaverina foi, de entre todas as aminas, a que assumiu um papel mais importante na discriminação conseguida. Não obstante, verificou-se, tanto em mostos como em vinhos, serem maiores as diferenças observadas entre as diferentes colheitas do que entre as diversas castas, o que torna difícil uma sistematização dos resultados obtidos para colheitas de outros anos. Uma amostragem maior, correspondente a mais anos de estudo proporcionaria, provavelmente, a obtenção de resultados discriminantes mais significativos.

Bibliografia

Cunha, SC, Fernandes, J.O., Faria, M.A., Ferreira, I.O., Ferreira, M.A., High-performance liquid chromatographic determination of organic acids in Port wines, table wines and grape musts as their p-nitrobenzyl esters. ***Am. J. Enol. Vitic.*** (aceite para publicação).

Mardia, K.V., Kent, J.T., Bibby, J.M., (Editado por Z.W. Birnbaum, E. Lukacs — Academic Press, Londres), 1ª Edição, Cap. 11 - Discriminant analysis, p. 300 (1979).

CAPÍTULO 8

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DAS AMINAS BIOGÉNICAS DURANTE O ENVELHECIMENTO DO VINHO DO PORTO

8.1. Introdução. Breve abordagem sobre os diferentes tipos de envelhecimento do vinho do Porto

8.2. Caracterização das amostras analisadas

8.3. Resultados obtidos

8.4. Discussão dos resultados e conclusões

8.1. Introdução. Breve abordagem sobre os diferentes tipos de envelhecimento do vinho do Porto

O vinho do Porto é uma bebida alcoólica que se caracteriza pela sua longevidade, constituindo o envelhecimento uma etapa obrigatória do respectivo processo de elaboração. Uma vez vinificados e sujeitos às operações de acabamento habituais, os vinhos, em particular os de maior qualidade, apenas atingem o seu auge alguns anos depois, sendo este período maior ou menor de acordo com parâmetros diversos que vão desde as características do produto inicial até ao tipo de armazenamento a que os mesmos são sujeitos.

Está consagrada, tanto na prática enológica como nas leis que regulamentam o sector, a prática de dois distintos processos de envelhecimento, os quais se caracterizam por diferentes processos evolutivos, dando origem a produtos finais totalmente distintos.

O primeiro, reservado apenas a vinhos considerados à partida como de qualidade superior, e como tal classificados pelas entidades competentes (IVP), caracteriza-se por decorrer no interior de garrafas devidamente rolhadas, num ambiente que se pode caracterizar do ponto de vista

físico-químico como redutor, pois tem lugar na ausência praticamente total de oxigénio atmosférico (a pequena quantidade de oxigénio atmosférico que fica no momento do engarrafamento entre a base da rolha e o topo do vinho é rapidamente gasta em reacções de carácter oxidativo, decorrendo depois todo o processo na ausência do mesmo). Os vinhos deste tipo são designados pela expressão "Vintage", sendo o seu engarrafamento obrigatório num período de dois a três anos subsequente ao processo de vinificação. Durante esse período são normalmente armazenados em recipientes de madeira e sujeitos a um mínimo de operações de acabamento, basicamente uma adequada sulfitação e processos de transfega, que têm o objectivo de separar o vinho dos constituintes que, devido à instabilidade física, vão precipitando. Embora sejam escassos os estudos de caracterização físico-química de vinhos deste tipo, é conhecido que, do ponto de vista organoléptico, a sua evolução é praticamente ininterrupta, sendo conhecidas notas de prova com vinhos com algumas dezenas de anos em que os provadores sustentam que os mesmos se encontram ainda num processo de evolução positiva, logo com potencialidades para ainda melhorarem do ponto de vista sensorial.

O outro tipo de envelhecimento a que os vinhos do Porto são sujeitos tem lugar em vasilhame de madeira e dá lugar aos designados vinhos "Tawny". Neste processo, a evolução do vinho tem lugar num ambiente que do ponto de vista físico-químico se pode classificar como oxidativo, pois, ao contrário do anterior, tem lugar na presença de oxigénio atmosférico. O vasilhame usado para a conservação dos vinhos pode apresentar tamanhos diversos, desde as designadas pipas, com um volume de 550 L, até aos designados balseiros, que podem comportar algumas dezenas de milhares de litros de vinho. Tal como no caso dos vinhos do tipo "Vintage", este processo de envelhecimento pode ter lugar durante várias dezenas de anos.

Importantes diferenças entre os dois tipos de vinhos são facilmente encontradas, mesmo sem recurso a qualquer tipo de procedimento analítico. Desde logo, é notória a diferente evolução que os mesmos sofrem em termos de cor: enquanto os vinhos "Vintage" conservam durante longo tempo a cor escura característica dos vinhos jovens, os vinhos "Tawny" sofrem uma evolução que os leva, gradualmente, a tomarem uma coloração amarelo-torrado ou aloirada. As operações a que os vinhos "Tawny" estão sujeitos durante o envelhecimento são mais importantes, pois enquanto nestes o enólogo pode intervir a qualquer momento, no sentido de condicionar e dirigir o processo evolutivo, nos vinhos "Vintage" a sua capacidade de intervenção resume-se ao curto período que antecede o respectivo engarrafamento. São comuns, entre outros, os processos periódicos de sulfitação bem

como a adição de pequenas quantidades de álcool de forma a compensar as perdas por evaporação que sempre ocorrem num ambiente aberto.

8.2. Caracterização das amostras analisadas

De um ponto de vista estritamente científico, o estudo do comportamento das aminas biogénicas durante o envelhecimento do vinho, deveria ser feito sobre a mesma amostra (no caso dos vinhos "Vintage" sobre diferentes garrafas do mesmo vinho), a qual seria periodicamente sujeita aos procedimentos analíticos adequados, durante um período de tempo que, para ser representativo, teria sempre de ser de algumas dezenas de anos. Na impossibilidade, óbvia, de se poder proceder a um tal estudo no âmbito de uma dissertação de doutoramento, a opção tomada consistiu em:

a) determinar o teor de aminas biogénicas em amostras de vinhos "Tawny" fornecidas por uma empresa do sector, representativas de 21 colheitas consecutivas de 1974 a 1994 e armazenadas em vasilhame de madeira no mesmo local (armazém), logo em idênticas condições ambientais. Os vinhos foram sujeitos durante o tempo de armazenamento a um mínimo de manipulações (basicamente sulfitações periódicas).

b) analisar igualmente um número representativo de amostras de vinhos "Vintage", representativos de várias colheitas distintas, logo com diferentes idades. Neste caso, os vinhos foram fornecidos por um particular, tendo sido escolhidos 15 vinhos de diversas marcas comerciais, adquiridos imediatamente após o engarrafamento e armazenados no mesmo local (neste caso, uma cave com boas condições para o armazenamento dos vinhos, nomeadamente no que respeita a temperatura, humidade e ausência de luminosidade).

As amostras de vinhos "Tawny" foram colocadas em garrafas de 0,5 L e armazenadas no laboratório à temperatura ambiente e em condições de ausência de luz, até serem analisadas. À semelhança do referido para as amostras de vinhos monovarietais cujo estudo foi descrito no capítulo anterior, a sua caracterização resumiu-se à verificação do pH e à determinação dos principais ácidos orgânicos. Os resultados obtidos nesses ensaios são apresentados na Tabela 8.1.

As amostras dos vinhos "Vintage" foram, por sua vez, retiradas das garrafas originais por intermédio de uma seringa (de forma a evitar a abertura das garrafas) numa quantidade de cerca de 10 ml, tendo sido colocadas em tubo de ensaio, conservadas a 4 °C e analisadas passados alguns dias. Tendo em consideração a pequena quantidade disponível de cada amostra, não foram sujeitas a qualquer tipo de caracterização analítica, tendo sido apenas usadas na determinação do teor de aminas biogénicas. A determinação foi feita apenas pelo método de análise descrito no capítulo 6, pelo que não são apresentados resultados referentes à espermidina e à espermina e, também, à histamina. Neste último caso, porém, tendo em conta que a análise foi efectuada, sendo os resultados posteriormente não considerados pelos motivos atrás apontados, podemos referir que as quantidades encontradas eram muito baixas, da mesma ordem de grandeza das encontradas nos vinhos "Tawny".

TABELA 8.1

TEORES* DE ÁCIDOS NAS AMOSTRAS DE VINHO DO PORTO DO TIPO TAWNY

	pH	Acético	Cítrico	Láctico	Málico	Succínico	Tartárico
1974	3,60	0.398	0.751	0.398	1.355	0.253	1.131
1975	3,60	0.222	0.241	0.222	1.446	0.224	1.181
1976	3,62	0.315	0.349	0.315	1.372	0.268	1.139
1977	3,56	0.189	0.258	0.189	1.441	0.211	1.203
1978	3,56	0.197	0.305	0.197	1.308	0.226	1.096
1979	3,63	0.498	0.248	0.498	0.762	0.197	1.077
1980	3,57	0.386	0.270	0.386	1.053	0.206	1.115
1981	3,55	0.422	0.257	0.422	0.958	0.227	1.267
1982	3,56	0.569	0.326	0.569	0.750	0.144	1.055
1983	3,60	0.423	0.291	0.423	1.159	0.224	1.134
1984	3,59	0.352	0.287	0.352	1.182	0.242	1.106
1985	3,64	0.490	0.319	0.490	1.110	0.208	1.207
1986	3,56	0.203	0.327	0.203	1.236	0.267	1.267
1987	3,64	0.288	0.347	0.288	1.085	0.271	1.197
1988	3,69	0.344	0.366	0.344	1.097	0.266	1.007
1989	3,47	0.437	0.268	0.437	1.102	0.225	1.248
1990	3,67	0.300	0.318	0.300	0.940	0.158	1.041
1991	3,59	0.231	0.298	0.231	0.958	0.274	1.350
1992	3,56	0.277	0.285	0.277	0.871	0.224	1.633
1993	3,66	0.202	0.230	0.202	1.416	0.260	1.092
1994	3,61	0.421	0.305	0.421	0.926	0.241	1.441

* Teores em g/L

8.3. Resultados obtidos

Os resultados obtidos para o teor das diversas aminas biogénicas nas diferentes amostras de vinhos "Tawny" e "Vintage" analisadas são apresentados nas Tabelas 8.2 e 8.3, respectivamente. No caso de algumas das diaminas e das aminas aromáticas em que foram obtidos resultados por dois métodos distintos (apenas para os vinhos "Tawny") optou-se pela apresentação da média dos dois resultados obtidos, seguindo o mesmo critério usado no capítulo anterior.

A fim de permitir uma leitura mais fácil dos resultados, em especial do padrão de evolução de cada uma das aminas biogénicas ao longo do processo de envelhecimento, decidimos fazer a sua apresentação também sob a forma de gráficos de barras, que são apresentados a seguir às referidas tabelas.

Nalguns desses gráficos efectuou-se um ajustamento de linhas rectas ou curvas por forma a verificar alguma tendência existente nos dados a partir da linha determinada em cada caso e do coeficiente de determinação. O coeficiente de determinação (R^2), que corresponde ao quadrado do coeficiente de correlação, pode ser visto como uma percentagem do ajustamento máximo possível, sendo então usado para verificar a maior ou menor validade da tendência.

Nos dados disponíveis neste trabalho, e como poderia ser esperado, nem sempre as evoluções dos teores dos compostos parecem lineares em ordem ao tempo. Este facto coloca problemas porque se a evolução parecer assumir a forma de uma curva, a escolha do tipo de curva, que não é automática, pode também introduzir imprecisões nas análises. Como salienta Pierre Dagnelie [1971], "A escolha (...) pode fazer-se com base em considerações teóricas ou em bases puramente empíricas. Contudo, é difícil fornecer regras absolutamente gerais sobre este assunto".

Assim, sempre que possível, o ajustamento foi efectuado com uma linha recta (regressão linear simples) e, quando tal se mostrou inadequado, ajustou-se uma linha exponencial ou logarítmica, já que são as linhas mais simples, no sentido em que contêm menos parâmetros estimados, evitando-se assim problemas de "overfitting" (sobre-ajustamento) que conduzem a retirar dos dados conclusões que os dados de facto poderão não suportar. Utilizou-se para o efeito o programa Excel, fornecendo-se sempre o valor de R^2 como medida genérica de ajustamento. Nos casos em que o valor do coeficiente de correlação se apresentou muito baixo para qualquer das curvas ensaiadas, optou-se pela não apresentação de qualquer curva.

TABELA 8.2

AMINAS BIOGÉNICAS

RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE VINHO DO PORTO DO TIPO TAWNY

	MA	DMA	EA	DEA	IPA	IBA	2-MBA	IAA	PIR
1974	0,174	0,067	0,963	nd	nd	0,021	0,076	1,271	1,109
1975	0,161	0,056	0,895	nd	nd	0,014	0,047	1,106	0,968
1976	0,160	0,088	1,484	nd	nd	0,010	0,025	0,591	1,233
1977	0,174	0,063	1,469	nd	nd	0,010	0,022	0,572	1,276
1978	0,184	0,067	1,740	nd	nd	0,007	0,011	0,275	1,052
1979	0,179	0,066	1,178	nd	nd	0,006	0,009	0,308	0,708
1980	0,204	0,079	1,519	nd	nd	0,009	0,021	0,478	1,012
1981	0,215	0,024	1,216	nd	nd	0,005	0,017	0,353	0,963
1982	0,276	0,095	3,339	nd	nd	0,002	0,012	0,249	1,202
1983	0,184	0,093	1,588	nd	nd	0,005	0,017	0,375	0,758
1984	0,245	0,094	1,623	nd	nd	0,003	0,016	0,371	1,064
1985	0,258	0,094	1,835	nd	nd	0,002	0,018	0,378	0,894
1986	0,180	0,095	1,552	nd	nd	0,004	0,020	0,440	0,591
1987	0,314	0,105	3,057	nd	nd	nd	0,009	0,180	0,733
1988	0,302	0,091	2,397	nd	nd	0,001	0,009	0,127	0,701
1989	0,278	0,098	1,628	nd	nd	0,003	0,003	0,101	0,452
1990	0,322	0,099	3,742	nd	nd	0,002	0,035	0,169	0,444
1991	0,327	0,083	3,954	nd	nd	nd	0,014	0,351	0,422
1992	0,318	0,086	2,426	nd	nd	0,010	0,019	0,375	0,635
1993	0,269	0,066	1,043	nd	nd	0,032	0,289	5,393	0,466
1994	0,189	0,068	1,899	nd	nd	0,006	0,008	0,155	0,585

* Teores em mg/L
nd – não detectado

TABELA 8.2 (cont.)

AMINAS BIOGÉNICAS

RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE VINHO DO PORTO DO TIPO TAWNY

	1,3-DAP	PUT	CAD	EPMD	EPM	2-FEA	TIR	HIST	TOTAL
1974	0,009	0,203	0,011	nd	nd	0,607	0,060	nd	**4,571**
1975	0,007	0,162	0,007	0,006	nd	0,498	0,037	nd	**3,964**
1976	0,010	0,207	0,010	0,004	nd	0,580	0,041	nd	**4,443**
1977	0,008	0,372	0,021	0,003	nd	0,462	0,036	nd	**4,488**
1978	0,011	0,317	0,012	0,003	nd	0,340	0,035	nd	**4,054**
1979	0,007	0,247	0,006	0,003	nd	0,254	0,038	nd	**3,009**
1980	0,011	0,381	0,018	0,015	nd	0,388	0,056	nd	**4,191**
1981	nd	0,244	0,021	0,015	nd	0,305	0,064	nd	**3,442**
1982	nd	0,617	0,027	0,006	nd	0,349	0,035	0,005	**6,214**
1983	nd	0,532	0,027	0,006	nd	0,485	0,044	nd	**4,114**
1984	nd	0,674	0,053	0,008	nd	0,376	0,026	0,005	**4,558**
1985	nd	0,711	0,035	0,009	nd	0,339	0,116	0,012	**4,701**
1986	nd	0,429	0,025	0,003	nd	0,448	0,049	nd	**3,836**
1987	nd	1,438	0,053	0,007	nd	0,316	0,049	0,011	**6,272**
1988	nd	1,049	0,068	0,014	nd	0,278	0,018	0,005	**5,060**
1989	nd	1,070	0,053	0,010	nd	0,182	0,378	0,012	**4,268**
1990	nd	1,705	0,076	0,023	nd	0,220	0,309	0,019	**7,165**
1991	0,004	2,817	0,100	0,012	nd	0,434	0,034	0,018	**8,570**
1992	0,007	2,420	0,116	0,010	nd	0,287	0,451	0,026	**7,161**
1993	nd	1,545	0,193	0,023	nd	2,338	0,032	0,078	**11,767**
1994	0,005	2,217	0,113	0,016	nd	0,385	0,032	0,032	**5,710**

* Teores em mg/L
nd – não detectado

TABELA 8.3

AMINAS BIOGÉNICAS

RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE VINHO DO PORTO DO TIPO VINTAGE

	MA	DMA	EA	DEA	IPA	IBA	2-MBA	IAA	PIR
1970	0,065	0,090	2,653	nd	nd	0,002	0,010	0,079	0,181
1975	0,158	0,086	1,305	nd	nd	0,009	0,049	0,907	0,113
1977	0,106	0,081	2,122	nd	nd	0,003	0,010	0,099	0,126
1978	0,190	0,087	2,878	nd	nd	0,006	0,025	0,200	0,143
1979	0,153	0,097	1,349	nd	nd	0,004	0,025	0,353	0,113
1980	0,165	0,087	1,738	nd	nd	0,003	0,012	0,181	0,103
1982	0,151	0,088	2,001	nd	nd	0,005	0,011	0,143	0,097
1983	0,266	0,079	2,967	nd	nd	0,008	0,038	0,667	0,137
1985	0,144	0,085	1,208	nd	nd	nd	0,006	0,017	0,053
1987	0,307	0,122	4,854	nd	nd	0,002	0,007	0,063	0,064
1989	0,251	0,081	1,829	nd	nd	nd	0,009	0,046	0,079
1991	0,285	0,105	4,712	nd	nd	0,004	0,016	0,266	0,085
1994	0,336	0,093	2,928	nd	nd	0,008	0,049	0,870	0,092
1995	0,457	0,101	6,006	nd	nd	0,011	0,043	0,833	0,085
1997	0,294	0,078	3,164	nd	nd	0,005	0,019	0,209	0,040

* Teores em mg/L
nd – não detectado

TABELA 8.3 (cont.)

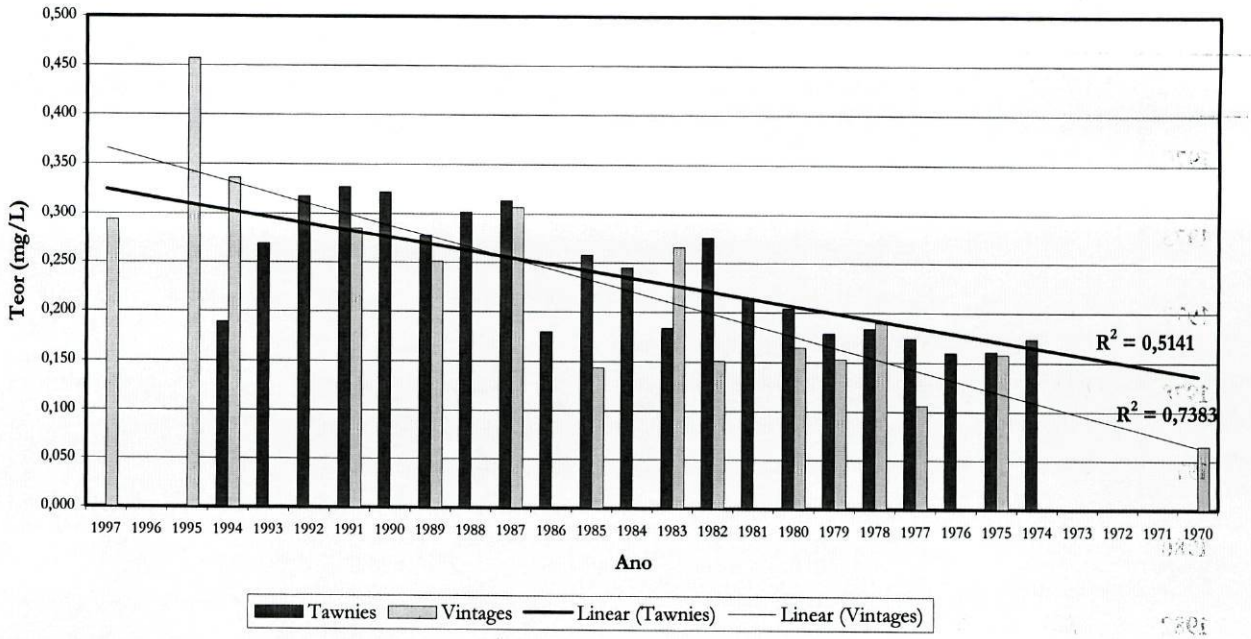
AMINAS BIOGÉNICAS

RESULTADOS* OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE VINHO DO PORTO DO TIPO VINTAGE

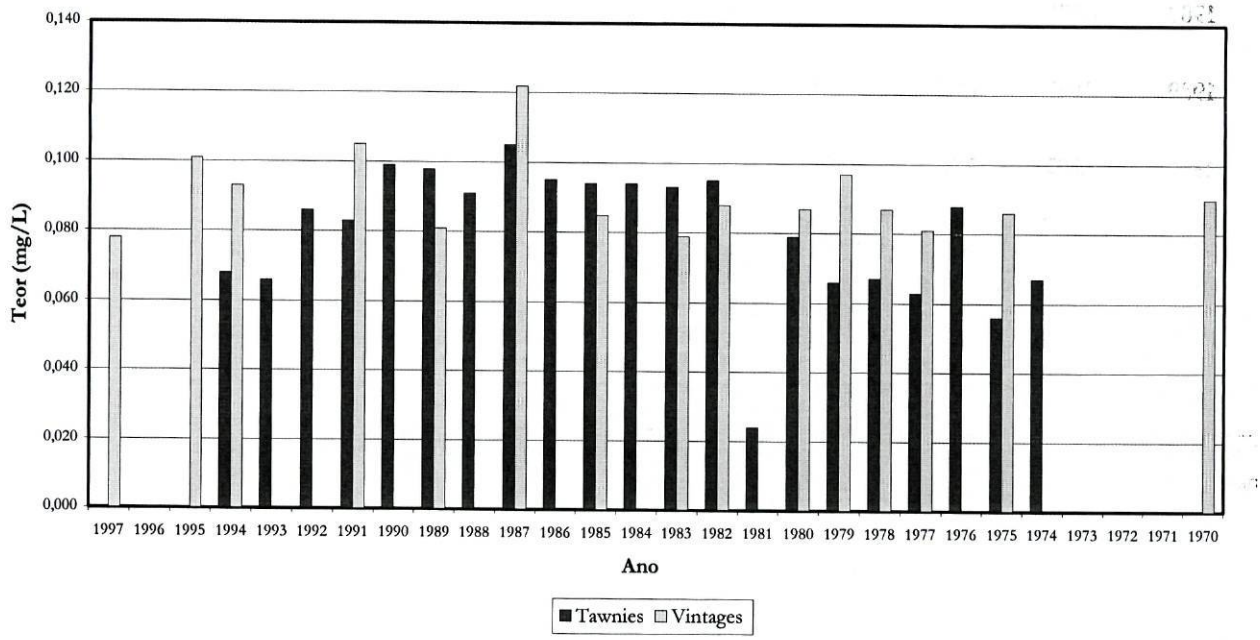
	1,3-DAP	PUT	CAD	EPMD	EPM	2-FEA	TIR	HIST	TOTAL
1970	0,008	0,560	0,080	na	na	0,118	0,011	na	**3,857**
1975	0,070	1,349	0,106	na	na	0,697	0,042	na	**4,891**
1977	0,011	1,315	0,094	na	na	0,159	0,028	na	**4,154**
1978	0,014	2,122	0,114	na	na	0,262	0,025	na	**6,066**
1979	0,034	1,742	0,115	na	na	0,295	0,046	na	**4,326**
1980	0,020	1,739	0,129	na	na	0,114	0,012	na	**4,303**
1982	0,021	2,049	0,111	na	na	0,086	0,010	na	**4,773**
1983	0,017	1,709	0,131	na	na	0,935	0,100	na	**7,054**
1985	0,022	2,025	0,148	na	na	0,039	0,013	na	**3,760**
1987	0,021	2,055	0,110	na	na	0,121	0,047	na	**7,762**
1989	0,041	1,857	0,133	na	na	0,096	0,013	na	**4,435**
1991	0,082	3,915	0,159	na	na	0,183	0,168	na	**9,980**
1994	0,246	3,710	0,226	na	na	0,650	0,075	na	**9,283**
1995	0,293	6,011	0,215	na	na	0,529	0,121	na	**14,705**
1997	0,043	2,305	0,174	na	na	0,319	0,021	na	**6,671**

* Teores em mg/L
na – não analisado

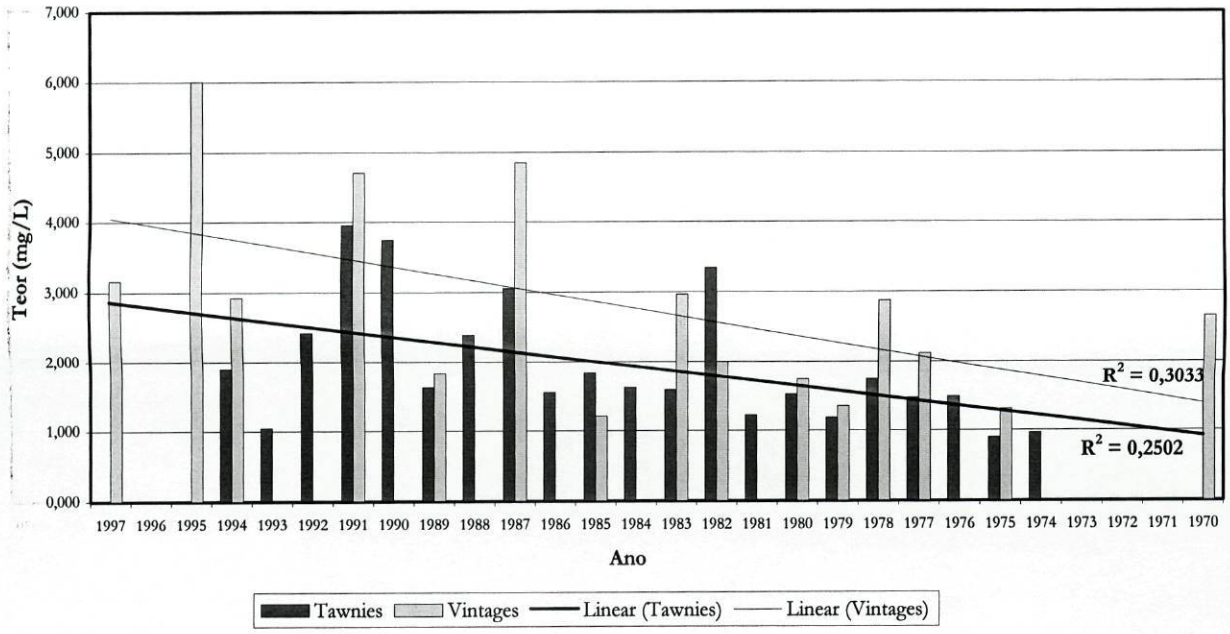
Metilamina



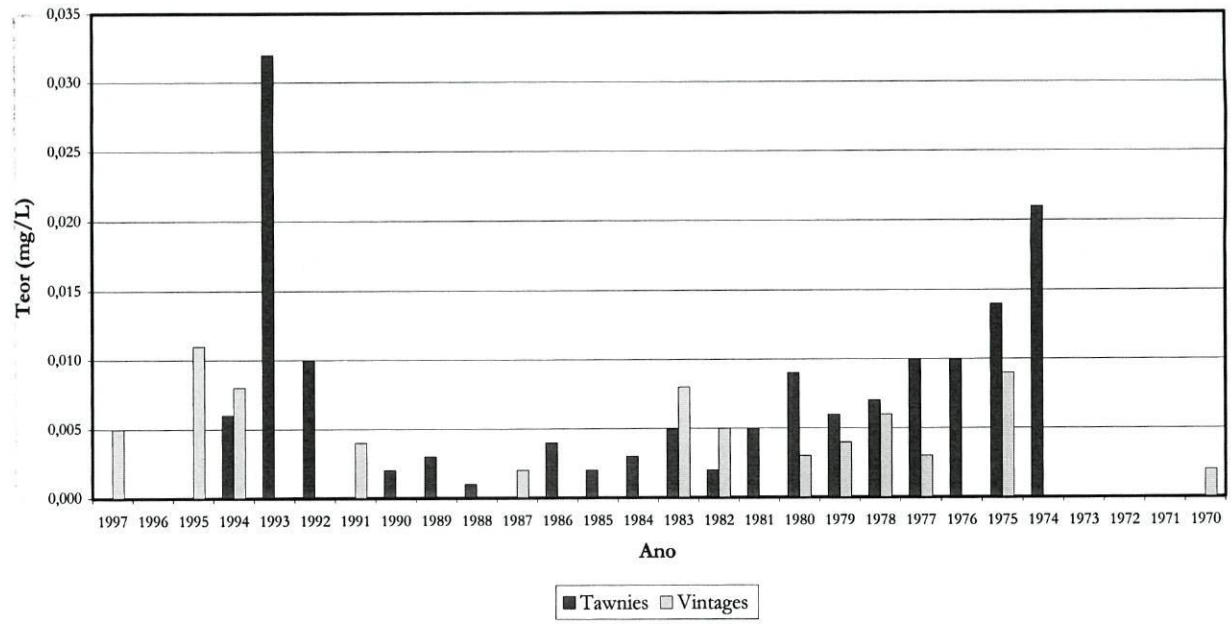
Dimetilamina



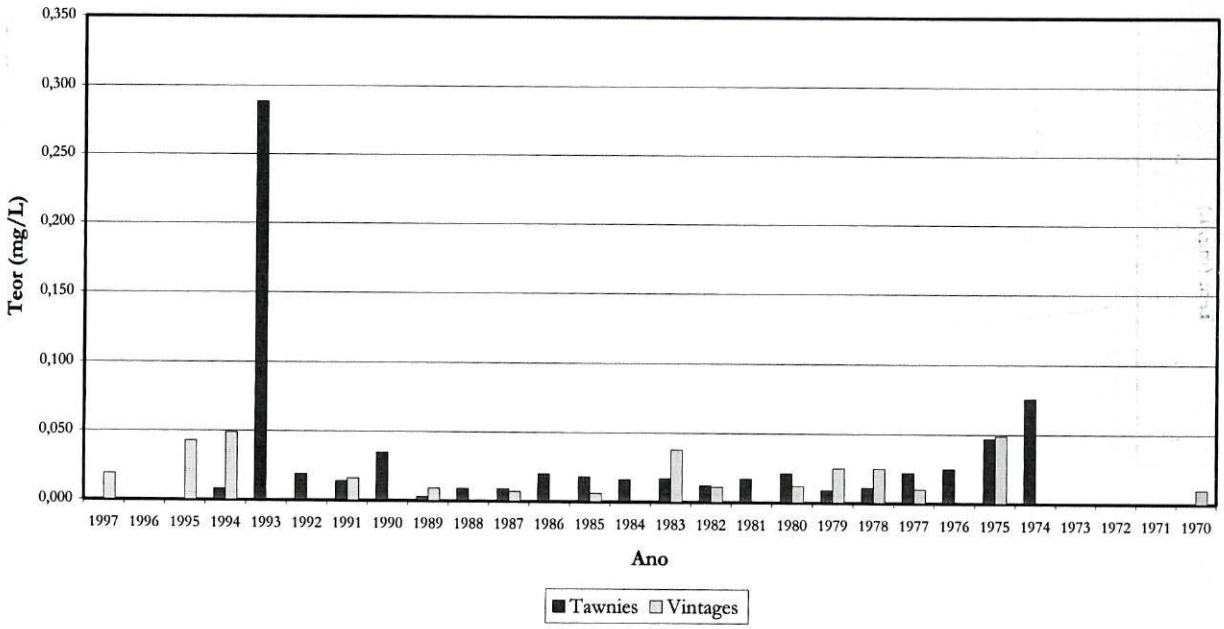
Etilamina



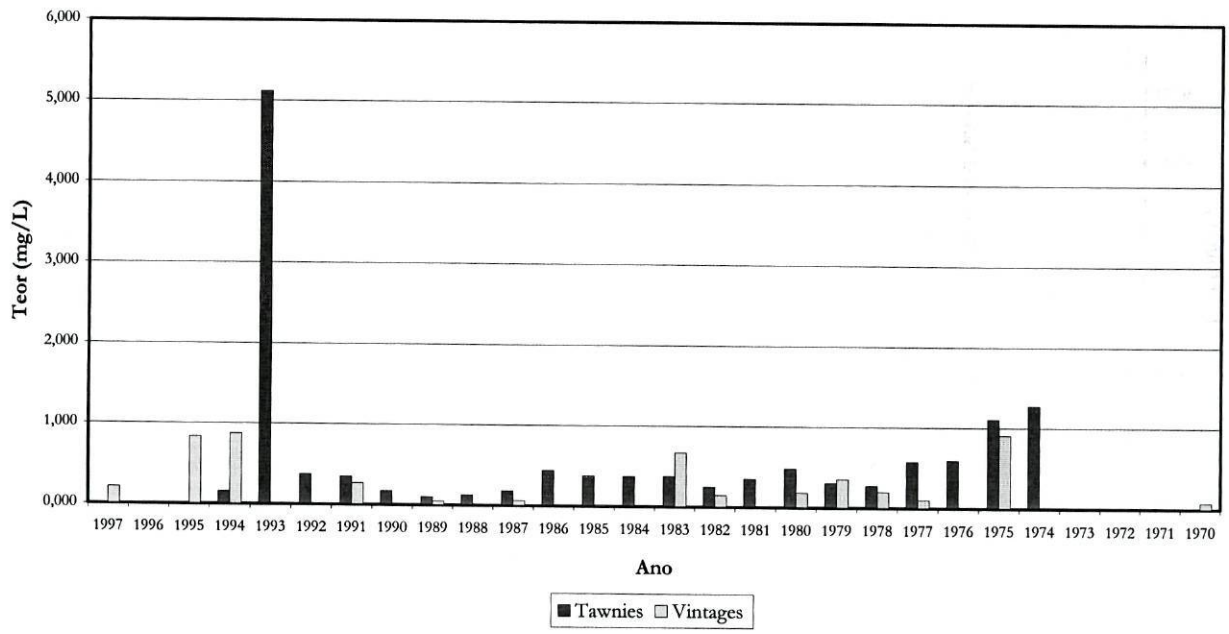
Isobutilamina



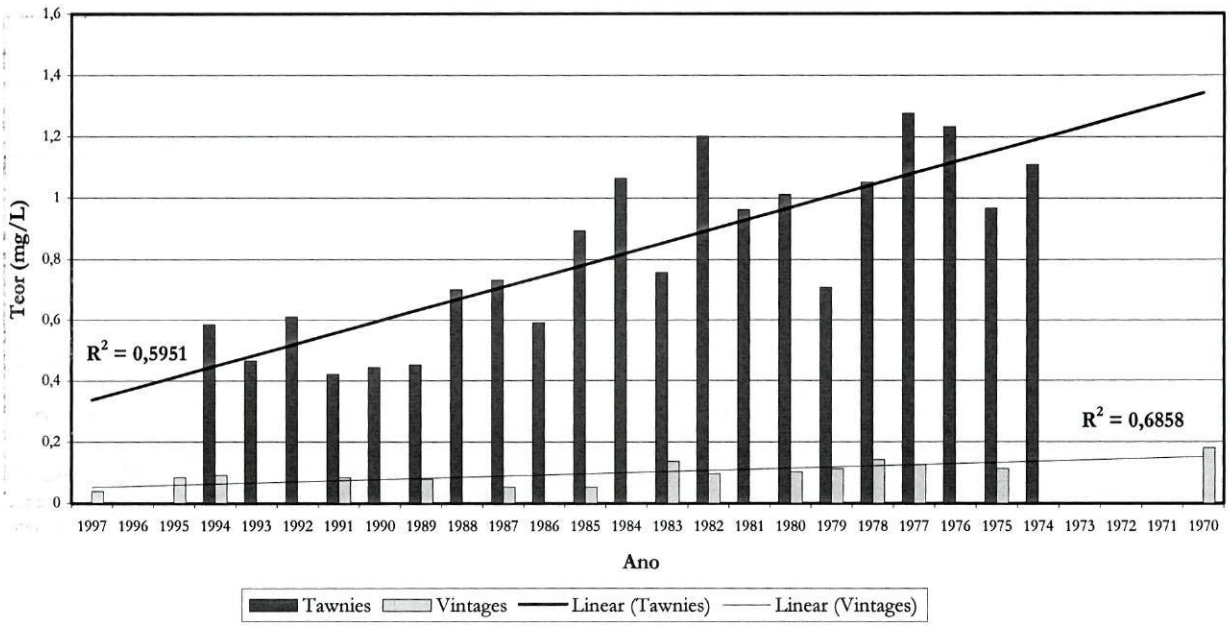
2-Metilbutilamina



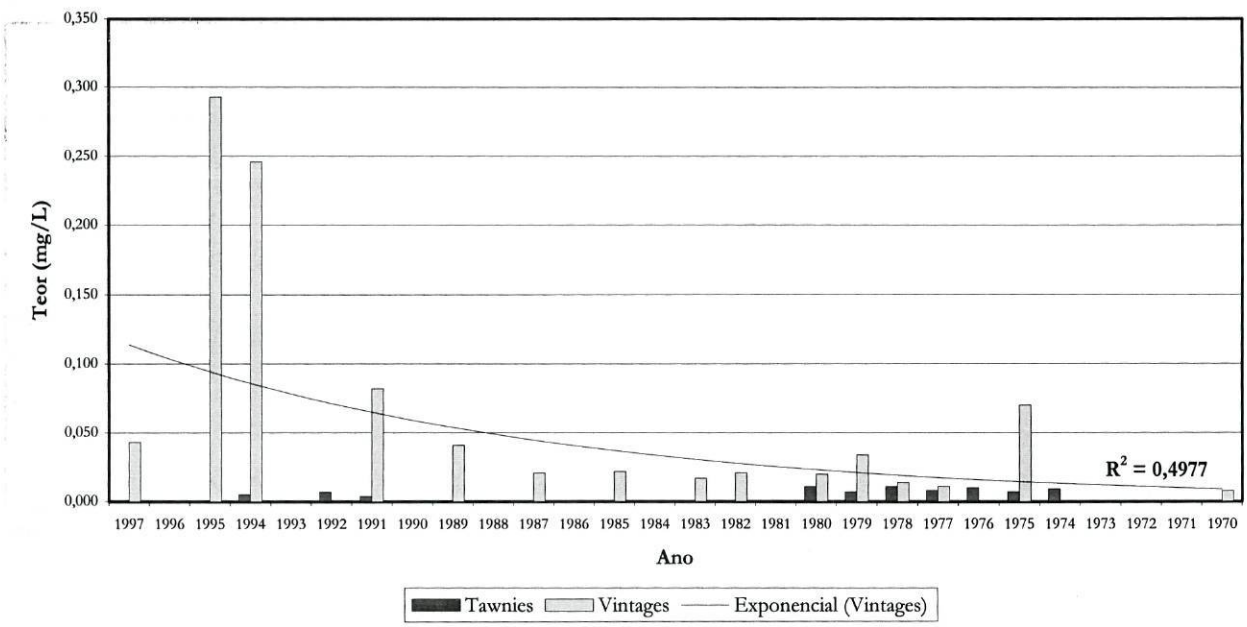
Isoamilamina



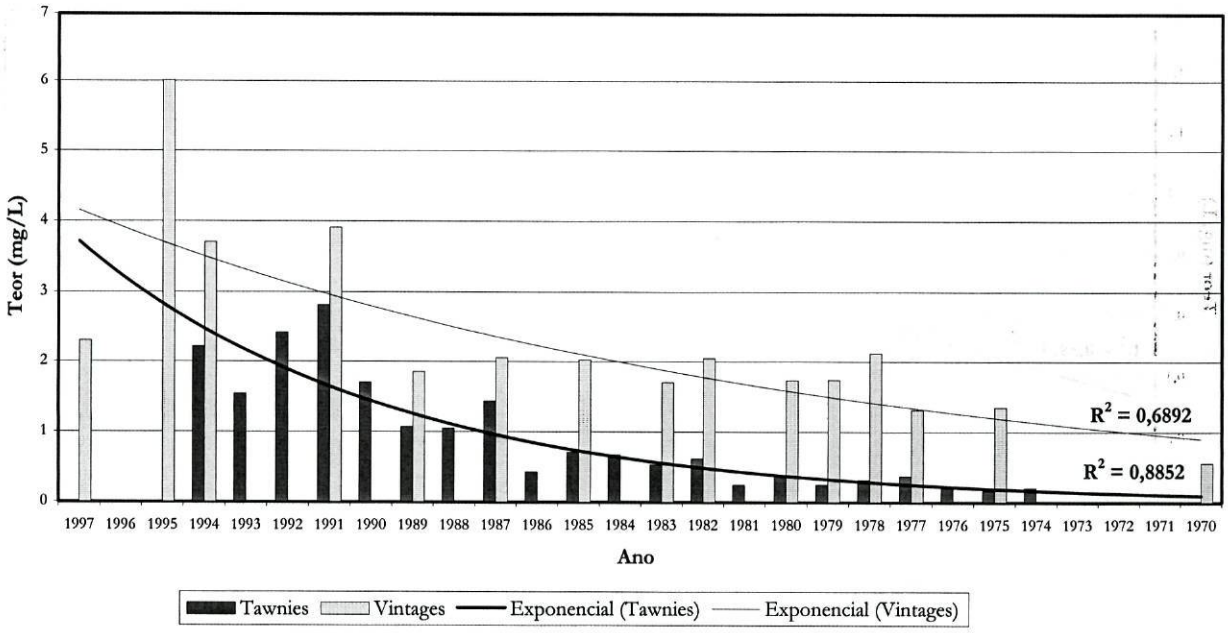
Pirrolidina



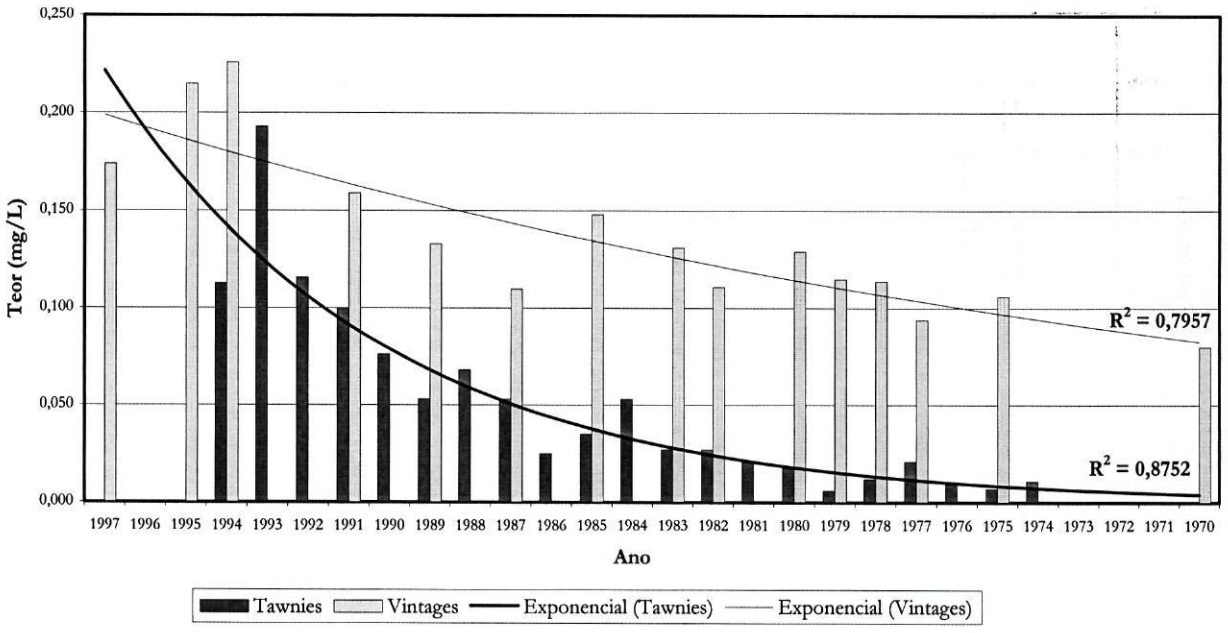
1,3-Diaminopropano



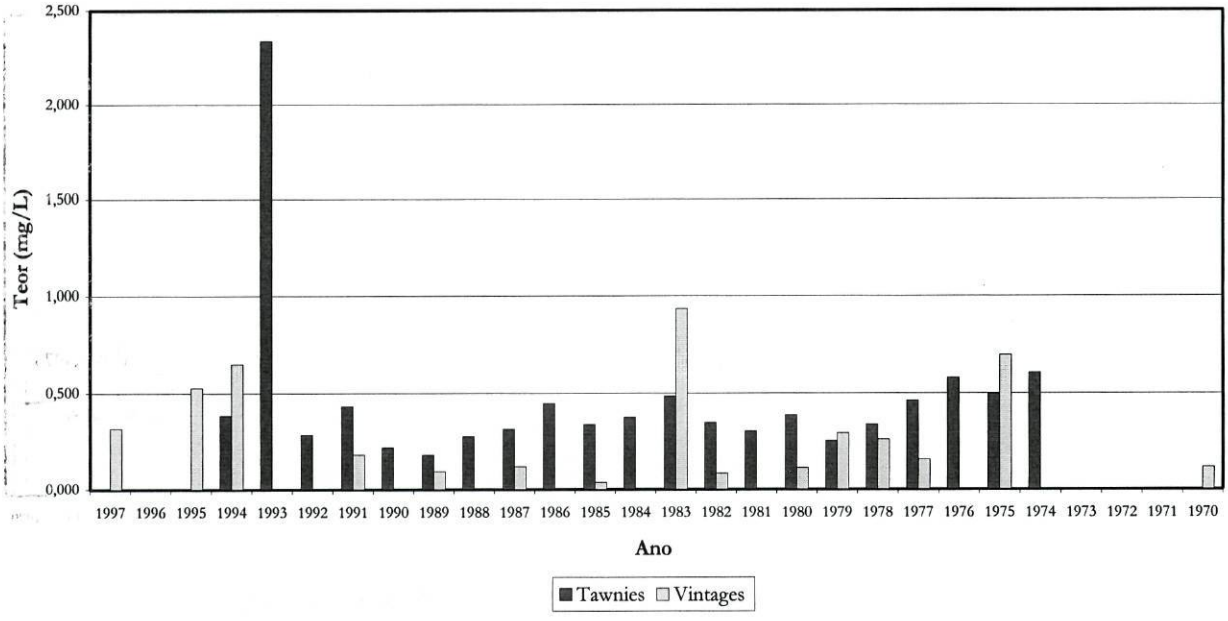
Putrescina



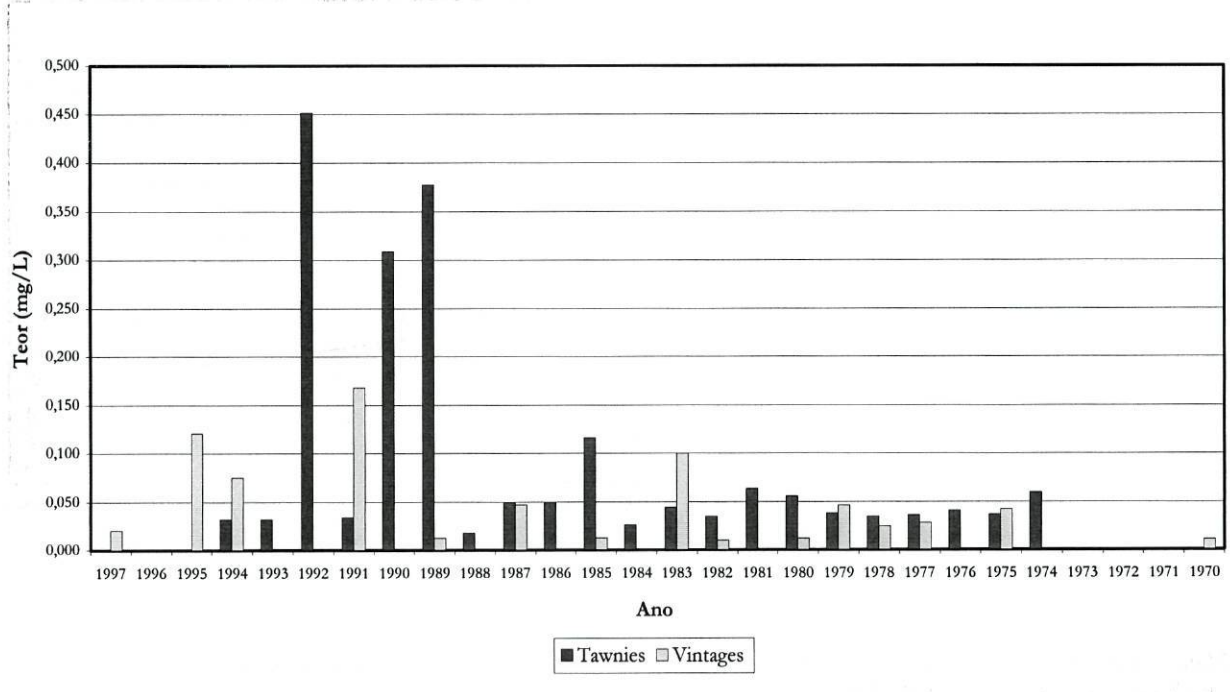
Cadaverina



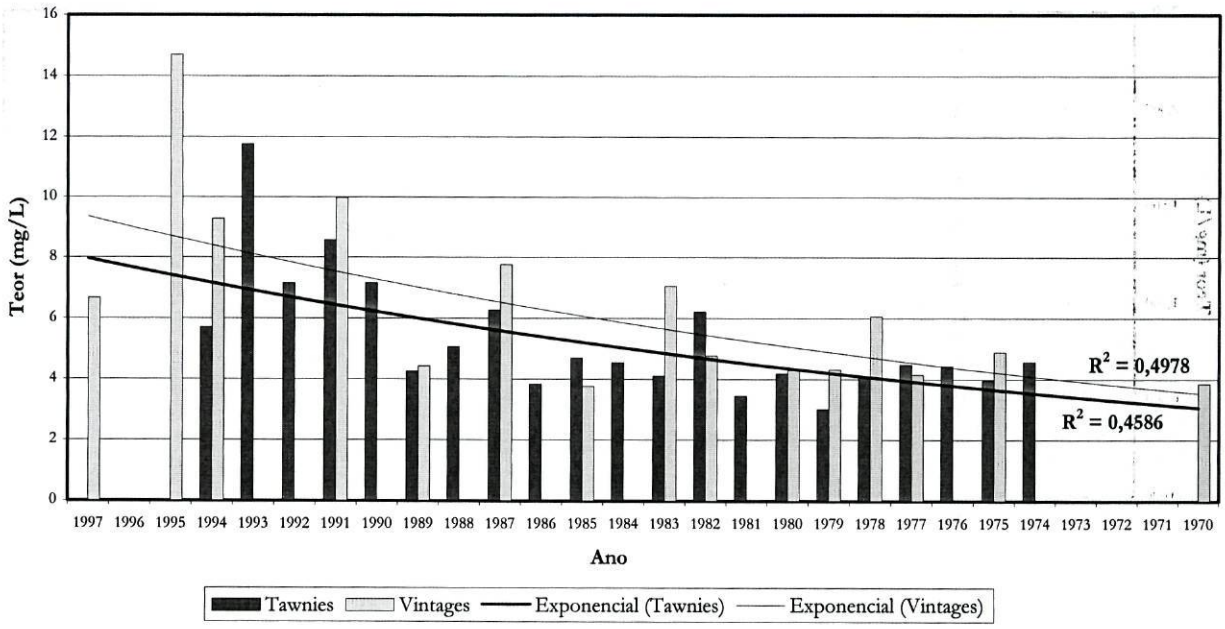
2-Feniletilamina



Tiramina



Aminas Totais



Aminas Totais*

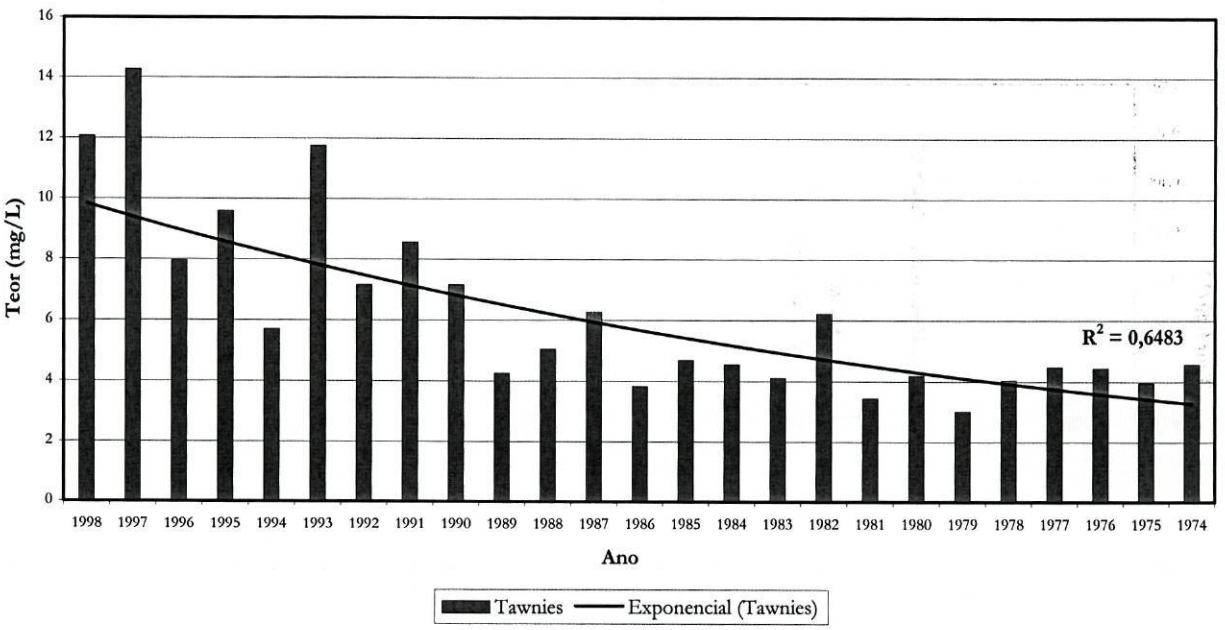


*Gráfico em que se consideraram as médias globais obtidas para os vinhos monovarietais dos anos de 1995 a 1998 (ver explicação na discussão dos resultados).

8.4. Discussão dos resultados e conclusões

A leitura dos resultados obtidos na análise das amostras de vinho do Porto envelhecidos permitiu retirar algumas ilações que nos parecem de grande importância para uma melhor caracterização do fenómeno da presença de aminas biogénicas em vinhos. Acima de tudo, e como é facilmente visível nos gráficos de barras apresentados, foi possível constatar pela primeira vez a existência de indícios claros sobre a formação e a degradação de algumas das aminas biogénicas estudadas durante o envelhecimento deste tipo de vinhos.

As principais conclusões tiradas podem resumir-se nos seguintes pontos:

a) Os teores totais de aminas biogénicas nas amostras de vinhos do tipo "Tawny" e do tipo "Vintage" estudadas são genericamente baixos. Nos vinhos "Tawny" o teor máximo observado foi de 11,767 mg/L enquanto que nas amostras de vinhos "Vintage" o teor máximo observado foi de 14,705 mg/L.

b) É visível uma tendência para a redução desses teores com o aumento da idade do vinho. Como se pode ver no gráfico apresentado, a melhor representação matemática para essa tendência consiste em curvas exponenciais, que apresentam um grande paralelismo quando aplicadas aos dois tipos de vinho em estudo. A correlação obtida para os vinhos "Tawny" aumenta significativamente se considerarmos os teores médios globais obtidos para os vinhos monovarietais estudados no capítulo anterior como representativos dos anos de 1995 a 1998 (ver gráfico inferior da página 481).

c) A justificação para o referido padrão de evolução do teor de aminas totais encontra-se prioritariamente no comportamento da putrescina. Esta amina, juntamente com a cadaverina e a metilamina, revela uma nítida tendência para uma redução de teores ao longo do envelhecimento de ambos os tipos de vinhos.

No caso da putrescina e da cadaverina verifica-se um padrão de evolução semelhante, não obstante os diferentes níveis em que ambas as diaminas se encontram presentes nas amostras — os teores de putrescina são, em regra, 15 a 25 vezes superiores aos teores de cadaverina. Esse paralelismo terá a ver, provavelmente, com o facto de se tratar de

compostos estruturalmente semelhantes e de as causas que levam à redução dos respectivos teores serem também idênticas.

Para ambas as diaminas em questão, é visível uma diminuição com a idade cuja melhor aproximação matemática se traduz nas curvas exponenciais que se podem observar nos respectivos gráficos. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos para essas curvas podem considerar-se como elevados atendendo ao tipo de estudo em questão. Em ambos os casos é notório que essa redução dos teores é mais acentuada nos vinhos do tipo "Tawny" do que nos vinhos do tipo "Vintage"; este últimos apresentam sempre teores mais elevados de ambos os compostos, sendo esta constatação tanto mais evidente quanto maior a idade dos vinhos em consideração.

No caso da metilamina, a redução dos teores ao longo do envelhecimento dos vinhos é também facilmente visível embora não tenha a mesma intensidade da observada para as duas diaminas atrás consideradas. Neste caso não são visíveis diferenças significativas entre os vinhos do tipo "Tawny" e os vinhos do tipo "Vintage", que apresentam idênticos teores. A melhor aproximação matemática ao fenómeno traduziu-se nas curvas rectilíneas apresentadas no respectivo gráfico, embora sejamos de opinião que com uma maior amostragem, seria possível, também aqui, representar o fenómeno por uma curva do tipo exponencial tal como verificado para a putrescina e para a cadaverina.

d) Inversamente às aminas atrás consideradas, existe uma nítida tendência para o aumento dos teores de pirrolidina ao longo do envelhecimento dos vinhos, tanto no caso dos vinhos do tipo "Tawny" como no caso dos vinhos do tipo "Vintage".

Como se pode observar claramente no gráfico de barras correspondente ao composto, essa tendência é comum aos vinhos do tipo "Tawny" e aos vinhos do tipo "Vintage", podendo ser representada matematicamente, em ambos os casos, por curvas rectílineas. Os níveis apresentados pelos vinhos do tipo "Tawny" são, porém, superiores em aproximadamente uma ordem de grandeza em relação aos vinhos do tipo "Vintage". Este facto indica-nos que as condições de envelhecimento dos vinhos do tipo "Tawny" exercem um papel importante na formação do composto.

Está referida na literatura, a possibilidade de formação de pirrolidina a partir de putrescina em determinadas condições de meio incluindo aquecimento. É nossa opinião, contudo, que, nas condições de envelhecimento dos vinhos estudados, a formação do composto poderá ter lugar por descarboxilação enzimática da prolina, que é habitualmente um dos aminoácidos mais abundantes, muitas vezes mesmo o mais abundante, dos vinhos.

De notar que estudos conducentes à confirmação desta nossa convicção não se poderão reduzir a uma mera monitorização simultânea dos teores de prolina e de pirrolidina dada a grande diferença das respectivas concentrações; a formação de algumas dezenas ou centenas de μg/L de pirrolidina pouca influência deverão exercer na quantidade presente de prolina, cuja concentração é da ordem das centenas de mg/L.

Bibliografia

Dagnelie, P., Estatística - Teoria e Métodos, 1ª edição da tradução portuguesa (editado por Publicações Europa-América, Lisboa) Cap. 22 - As transformações de variáveis, p. 425 (1973).

CONCLUSÕES FINAIS

A dissertação apresentada pretendeu contribuir para um melhor esclarecimento da comunidade científica e dos consumidores em geral sobre a problemática da presença de aminas biogénicas em vinhos. Para o efeito, e como amplamente sublinhado nos capítulos introdutórios, actuou-se a dois níveis distintos mas complementares entre si. Assim, num primeiro plano, desenvolveram-se métodos analíticos baseados na técnica de cromatografia gasosa - espectrometria de massa, para a quantificação de uma larga gama de aminas biogénicas habitualmente encontradas nos alimentos. Numa segunda esfera de actuação, procedeu-se à aplicação dos métodos desenvolvidos ao estudo da origem e da evolução deste tipo de compostos em vinhos do Porto.

Atendendo a esta estrutura, são também de dois tipos as conclusões que se podem retirar do trabalho efectuado.

Assim, no que respeita aos métodos analíticos desenvolvidos, pensamos ser de salientar os seguintes aspectos:

1. O uso de metodologias multi-paramétricas baseadas na técnica de cromatografia gasosa - - espectrometria de massa mostrou-se totalmente adequado para a correcta quantificação das aminas biogénicas nas amostras em estudo.

2. Para os bons resultados obtidos foi essencial a opção feita pelo uso de reacções de derivatização química, responsáveis pela transformação quantitativa das aminas em derivados com boas propriedades cromatográficas, e a criteriosa escolha feita dos compostos usados como padrões internos.

3. Dos três métodos desenvolvidos, pensamos ser de salientar o método baseado no uso de cloroformato de isobutilo como reagente derivatizante. As principais vantagens apresentadas pelo mesmo dizem respeito à possibilidade de efectuar a análise directamente sobre a amostra, com dispensa de um processo prévio de extracção das aminas em estudo, e à possibilidade de analisar simultaneamente a grande maioria das aminas biogénicas de interesse (as excepções são a histamina e as poliaminas).

4. As outras duas propostas desenvolvidas apresentam o seu principal interesse na determinação da histamina — método baseado na derivatização com brometo de pentafluorobenzilo — e na determinação das poliaminas — método baseado na derivatização com anidrido heptafluorobutírico.

5. Atendendo aos bons resultados obtidos nos ensaios de validação efectuados para os três métodos em questão, designadamente no que respeita aos limites de detecção e de quantificação, e aos níveis de precisão e de recuperação, pensámos tratar-se, no seu conjunto, de instrumentos valiosos para o aprofundamento da investigação enológica sobre aminas biogénicas, tanto a nível das indústrias vitivinícolas como das organizações oficiais.

6. É nossa opinião que as propostas apresentadas contêm os requisitos necessários para poderem ser consideradas como métodos de referência para a análise de aminas biogénicas no tipo de amostras em estudo — mostos e vinhos.

No que respeita aos resultados obtidos nos estudos efectuados sobre a origem e a evolução das aminas biogénicas nos vinhos do Porto, pensamos ser de destacar, para além de outros aspectos já sublinhados nas conclusões apresentadas no final dos capítulos 7 e 8, os seguintes pontos:

1. Os vinhos do Porto apresentam uma boa qualidade global no que respeita à presença de aminas biogénicas, parâmetro que vem preocupando as entidades com responsabilidade na saúde pública, em consequência do seu envolvimento em fenómenos de intoxicação e de intolerância alimentar. Para o efeito, contribui, muito provavelmente, a tecnologia enológica envolvida na elaboração deste tipo de vinhos.

2. Merecem especial relevo os reduzidos teores (sistematicamente inferiores a 0,5 mg/L e, na maioria das amostras, inferiores a 0,1 mg/L) observados nos vinhos do Porto analisados para as aminas biogénicas com maior interesse do ponto de vista toxicológico — histamina e tiramina. Esses teores são substancialmente inferiores aos descritos na literatura para outro tipo de vinhos e muito aquém dos níveis considerados como preocupantes pelas entidades oficiais. Desta forma, torna-se possível enviar uma mensagem de tranquilidade para os consumidores e para todos os responsáveis pela elaboração do produto.

3. Uma fracção importante das aminas biogénicas encontradas nos vinhos do Porto é proveniente dos mostos. Merece destaque, em particular, o caso da putrescina, cuja formação ao longo do processo fermentativo se verificou ser muito reduzida.

4. As aminas biogénicas cuja formação, em termos relativos, é mais importante durante o processo fermentativo são a pirrolidina, a 2-feniletilamina, a isoamilamina e a etilamina. Os teores encontrados são, contudo, genericamente reduzidos, sistematicamente inferiores a 1 mg/L. No caso da pirrolidina, pensamos ser a primeira vez que é referida a sua presença em vinhos do Porto.

5. Durante o envelhecimento dos vinhos existe uma diminuição tendencial do teor de aminas biogénicas nos vinhos, particularmente notória nos casos da metilamina, da etilamina, da putrescina e da cadaverina.

6. De todas as aminas biogénicas estudadas, a única que apresentou uma nítida tendência para aumentar ao longo do processo de envelhecimento foi a pirrolidina. A sua formação resulta, muito provavelmente, da descarboxilação da prolina, aminoácido geralmente abundante nos vinhos, sendo muito mais evidente nos vinhos do tipo "Tawny" do que nos vinhos do tipo "Vintage". O conhecimento dos teores de pirrolidina poderá constituir um contributo importante para, em conjunto com outros parâmetros, se instituir um sistema de datação dos vinhos baseado na sua caracterização analítica.