



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**Desenvolvimento de métodos voltamétricos para a determinação
simultânea de aminas biogênicas em vinhos e cafés solúveis**

Rossana Oliveira da Nóbrega



João Pessoa – PB – Brasil

Dezembro/2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de métodos voltamétricos para a determinação
simultânea de aminas biogênicas em vinhos e cafés solúveis**

Rossana Oliveira da Nóbrega*

Tese de Doutorado apresentada como requisito para
obtenção do título de Doutora em Química, área de
concentração Química Analítica, pela Universidade
Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Amanda Cecília da Silva

***Bolsista CAPES**



**João Pessoa – PB – Brasil
Dezembro/2025**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N754d Nobrega, Rossana Oliveira da.

Desenvolvimento de métodos voltamétricos para a determinação simultânea de amins biogênicas em vinhos e cafés solúveis / Rossana Oliveira da Nobrega. - João Pessoa, 2025.

121 f. : il.

Orientação: Mário César Ugulino de Araújo.

Coorientação: Amanda Cecília da Silva.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

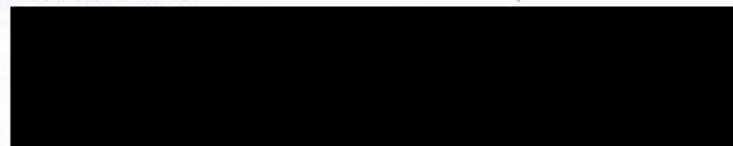
1. Amins biogênicas - Vinho. 2. Amins biogênicas - Café solúvel. 3. Segurança alimentar. 4. Química analítica verde. I. Araújo, Mário César Ugulino de. II. Silva, Amanda Cecília da. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547(043)

Desenvolvimento de métodos voltamétricos para a determinação simultânea de aminas biogênicas em vinhos e cafés solúveis

Trabalho de Tese de Doutorado apresentada pela discente **Rossana Oliveira da Nóbrega** e aprovada pela Banca Examinadora composta abaixo, realizada no dia 10 de dezembro de 2025.



Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
DQ/UFPB
Orientador

Documento assinado digitalmente



AMANDA CECILIA DA SILVA
Data: 11/12/2025 11:37:11-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Pror. Dr. Amanda Cecilia da Silva
DQCI/UFS

Coorientadora

Documento assinado digitalmente



SHERLAN GUIMARAES LEMOS
Data: 11/12/2025 20:00:31-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
DQ/UFPB

Membro Titular Interno



Prof. Dr. Luciano Faras de Almeida
DQ/UFPB

Membro Titular Interno

Documento assinado digitalmente



GIANCARLO RICHARD SALAZAR BANDA
Data: 11/12/2025 11:55:51-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Giancarlo Richard Salazar Banda
UNIT/Aracaju-SE

Membro Titular Externo

Documento assinado digitalmente



SEVERINO CARLOS BEZERRA DE OLIVEIRA
Data: 11/12/2025 16:28:31-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira
DQ/UFRPE

Membro Titular Externo

Dedico essa conquista à minha mãe, que me inspira diariamente e, com todo seu amor e apoio, tem me guiado em cada etapa desta jornada acadêmica. Ao meu sobrinho, símbolo de esperança e renovação, este trabalho é dedicado com a promessa de um futuro repleto de conquistas e aprendizados.

“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do Senhor fez isso”.

(Isaías 41:20)

Agradecimentos

A Deus e à Nossa Senhora, pela força e proteção que me acompanharam até a realização desta etapa tão sonhada.

À minha mãe, Joana Darc, exemplo de coragem e dedicação. Como professora e mãe solo, nunca mediu esforços para garantir a mim e à minha irmã uma educação de qualidade. Sua determinação moldou quem sou e tornou possível essa conquista. Obrigada por acreditar em mim e por ser meu alicerce.

À minha irmã, Rafaela, minha melhor amiga. Obrigada por estar sempre presente, por dividir comigo sonhos, viagens, inseguranças e risadas. A você e ao meu cunhado, também agradeço por confiarem a mim, o meu afilhado Bernardo, que, mesmo tão pequeno, trouxe leveza aos meus dias e felicidade.

Aos meus amigos, Thaisy, Amélia, Ivia, Jéssica, Irla, Jardelly, Karen, Letícia, Jefferson e Rennan, obrigada pelos encontros repletos de risadas, desabafos, cervejas e pela amizade sincera que ajudou a tornar esta caminhada mais leve.

Aos amigos do LAQA, Fernanda, João, Edithe, Tássio, Diana, Renato, João Lucas, Lucas Isidio, Clara e Mayane, agradeço por cada momento de descontração, pelas conversas, risadas e confraternizações. Em especial, agradeço à Girlene pelos cafezinhos acompanhados de boas conversas.

À minha coorientadora, Amanda Cecília, pela acolhida, pela disponibilidade e por compartilhar seus conhecimentos e conselhos.

Ao meu orientador, Mário Ugulino, agradeço pelos ensinamentos, pela orientação e por dividir suas experiências ao longo desses anos.

Aos professores Dr. Sherlan e Dr. Luciano, pelas contribuições na qualificação e na tese. Aos professores Dr. Giancarlo e Dr. Severino, agradeço pelo aceite em compor minha banca e pelas contribuições que certamente enriquecerão este trabalho.

Ao Prof. Dr. Fatibello-Filho, pela gentileza em disponibilizar o eletrodo de diamante dopado com boro.

À CAPES, pelo apoio financeiro indispensável para a realização desta pesquisa.

RESUMO

O monitoramento de aminas biogênicas em produtos alimentícios e bebidas é fundamental para garantir a conformidade dos padrões de qualidade e segurança alimentar dos consumidores. Neste trabalho, foram desenvolvidos dois métodos analíticos baseados em voltametria de onda quadrada (SWV), empregando diferentes eletrodos e estratégias para a obtenção de dados multivariados de primeira e segunda ordem. No primeiro estudo, utilizou-se um eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de zinco (CPE-ZnPC) para a geração de dados de primeira ordem. A modificação do eletrodo foi otimizada e confirmada por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de dispersão de energia de raios X. Sob condições otimizadas (tampão borato, pH 9,2; $f = 50$ Hz, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 6$ mV), o método proposto permitiu a determinação simultânea de tiramina e espermidina em amostras de vinho e café solúvel, com baixos limites de detecção de $48,6 \text{ nmol L}^{-1}$ para tiramina e $76,9 \text{ nmol L}^{-1}$ para espermidina. A acurácia foi satisfatória, com recuperações entre 86,1% e 107,5%, além de boa reprodutibilidade (RSD de 2,6%). Além disso, o método apresentou alta seletividade, uma vez que não houve interferência na quantificação eletroquímica destes analitos tanto nas amostras de vinho quanto nas de café solúvel e, conseqüentemente, não houve a necessidade de pré-tratamento de amostras, contribuindo para a química analítica verde. No segundo trabalho, foi utilizado um eletrodo de BDD para obtenção dos dados voltamétricos de segunda ordem, através da variação da amplitude de pulso. Sob condições otimizadas da SWV (tampão BR, pH = 9,0; $f = 70$ Hz, $a = 20$ a 70 mV e $\Delta E_s = 8$ mV), foi desenvolvido um método para quantificação simultânea de putrescina, cadaverina e histamina, para resolver os sinais voltamétricos altamente sobrepostos. Para isso, foram construídos modelos de calibração baseados em mínimos quadrados parciais desdobrados com bilinearização residual (U-PLS/RBL) e resolução de curvas multivariadas com mínimos quadrados alternados (MCR-ALS), utilizando soluções padrão individuais na faixa linear de $0,92$ a $7,46 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com LD 50 a 100 nmol L^{-1} . Dessa forma, a combinação de um eletrodo convencional com métodos de calibração *multiway* mostrou-se uma estratégia promissora para a análise de misturas de ABs. Embora a aplicação em amostras reais permaneça como perspectiva para estudos futuros, os resultados alcançados indicam forte potencial para o desenvolvimento de metodologias voltadas à análise simultânea de ABs em matrizes alimentícias, sem etapas prévias de preparo das amostras.

Palavras-chave: aminas biogênicas, segurança alimentar, vinho, café solúvel, química analítica verde.

ABSTRACT

Monitoring biogenic amines in food and beverage products is essential to ensure compliance with quality standards and consumer food safety. In this work, two analytical methods based on square-wave voltammetry (SWV) were developed, employing different electrodes and strategies to obtain first- and second-order multivariate data. In the first study, a zinc phthalocyanine–modified carbon paste electrode (CPE–ZnPc) was employed to generate first-order data. The successful modification of the optimized electrode was confirmed by scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy. Under optimized conditions (borate buffer, pH 9.2; $f = 50$ Hz, $a = 30$ mV, and $\Delta E_s = 6$ mV), the proposed method enabled the simultaneous determination of tyramine and spermidine in wine and instant coffee samples, achieving low limits of detection of 48.6 nmol L^{-1} for tyramine and 76.9 nmol L^{-1} for spermidine. The method exhibited satisfactory accuracy, with recoveries ranging from 86.1% to 107.5%, and good reproducibility (RSD of 2.6%). Moreover, high selectivity was observed, as no significant interference affected the electrochemical quantification of the target analytes in either matrix. Consequently, no sample pretreatment was required, which contributes to the principles of green analytical chemistry. In the second study, a boron-doped diamond (BDD) electrode was used to acquire second-order voltammetric data through pulse amplitude variation. Under optimized SWV conditions (Britton–Robinson buffer, pH 9.0; $f = 70$ Hz, $a = 20\text{--}70$ mV, and $\Delta E_s = 8$ mV), a method was developed for the simultaneous quantification of putrescine, cadaverine, and histamine, allowing the resolution of highly overlapping voltammetric signals. For this purpose, calibration models based on Partial Least Squares Unfolded with Residual Bilinearization (U-PLS/RBL) and Resolution of Multivariate Curves with Alternating Least Squares (MCR-ALS) were constructed using individual standard solutions in the linear concentration range of 0.92 to $7.46 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, with limits of detection between 50 and 100 nmol L^{-1} . Overall, the combination of conventional electrodes with multiway calibration methods proved to be a promising strategy for the analysis of biogenic amine mixtures. Although application to real samples remains a subject for future investigation, the results demonstrate strong potential for the development of methodologies aimed at the simultaneous determination of biogenic amines in food matrices without prior sample preparation.

Keywords: biogenic amines, food safety, wine, instant coffee, green analytical chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estruturas moleculares das ABs e seus precursores. Criado com BioRender.com.	22
Figura 2 Fórmula estrutural da Espermidina.....	26
Figura 3 Funcionamento de um sensor eletroquímico. Fonte: Adaptada de Müller <i>et al.</i> (2022) (Criada BioRender.com).....	39
Figura 4 Esquema da técnica SWV Criado com BioRender.com.....	43
Figura 5. Representação do modelo MCR-ALS.Criado com BioRender.com.	50
Figura 6. Representação do modelo U-PLS.Criado com BioRender.com.....	51
Figura 7 Representação ilustrativa do sensor eletroquímico proposto (CPE e CPE-ZnPC). Elaborado no BioRender.com	56
Figura 8 Medidas SWV em tampão fosfato (pH=6,2) com (a) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e (b) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina usando o sensor CPE com ftalocianinas metálicas (Co, Cu, Ni e Zn). Os parâmetros SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$	63
Figura 9 Estudo do comportamento eletroquímico. Voltamogramas SW em tampão boráx (pH=9,2) com 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e 3,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina usando o sensor CPE e CPE-ZnPC com 1 a 9% m/m de ZnPC. Os parâmetros SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_w = +0,3 \text{ a } +1,1 \text{ V}$	64
Figura 10 Micrografias eletrônicas de varredura de superfícies de CPE (a) e CPE-ZnPC com 3% de ZnPC (b) com ampliação de 5000x, e o espectro EDX do CPE-ZnPC com 3% de ZnPC (c)	65
Figura 11 Varreduras no eletrólito de suporte (tampão borato, pH 9,2) obtido durante o tratamento eletroquímico do sensor CPE-ZnPC antes de a(i) e b(i) e após a(ii) e b(ii) correção de linha de base.	66
Figura 12 Voltamogramas cíclicos do processo redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ para os cálculos das áreas da superfície eletroativa dos eletrodos CPE (a); CPE-ZnPC com 1% m/m (b); 3% m/m (c); 5% m/m (d) de ZnPC em velocidades de varredura de 10 a 200 mV s^{-1} em $\Delta E_w = -0,4 \text{ a } 0,8 \text{ V}$	68
Figura 13 Voltamogramas de SW de 6,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina (a) e 66,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina (c) usando ZnPC-CPE em eletrólitos de suporte com pH variando de 3,4 a 10,5. Gráficos E_p (potencial de pico) versus pH de tiramina (b) e espermidina	

(d). Os parâmetros de SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_w = +0,3 \text{ a } +1,2 \text{ V}$.	69
Figura 14 Relação de potencial de pico versus o logarítmico da frequência obtidos usando SWV em solução de $3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina (a) e $6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina (b) em tampão borato (pH 9,2) sobre o CPE-ZnPC.	70
Figura 15 Voltamogramas cíclicos obtidos em CPE-ZnPC usando $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina (a) em tampão borato (pH 9,2) em diferentes velocidades de varredura ($10 \text{ a } 150 \text{ mV s}^{-1}$) e $\Delta E_w = 0 \text{ a } +1,3 \text{ V}$. Relação de I_p vs. v (mV s^{-1}) (b) e Relação de $\log I_p$ vs. $\log v$ (mV s^{-1}) (c).	72
Figura 16 Voltamogramas cíclicos obtidos em CPE-ZnPC usando $33 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Espermidina (a) em tampão borato (pH 9,2) em diferentes velocidades de varredura ($10 \text{ a } 150 \text{ mV s}^{-1}$) e $\Delta E_w = 0 \text{ a } +1,3 \text{ V}$. Relação de I_p vs. v (mV s^{-1}) (b) e Relação de $\log I_p$ vs. $\log v$ (mV s^{-1}) (c).	73
Figura 17 Medidas de SWV em solução de $3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e $6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina em tampão borato (pH 9,2) obtidos em uma faixa de frequência de $10 \text{ a } 100 \text{ s}^{-1}$ (a e b), um incremento de potencial de $1 \text{ a } 10 \text{ mV}$ (c e d) e uma amplitude de pulso de $10 \text{ a } 70 \text{ mV}$ (e e f), fixando os demais parâmetros de SWV.	74
Figura 18 Estudo de Efeito de memória. Medidas de SWV da corrente (I) versus potencial (E) em concentrações triplicata de $0,48 \text{ e } 2,77 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e $0,77 \text{ e } 4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina em tampão borato (pH 9,2) no CPE-ZnPC (a). Gráfico de corrente de pico (I_p) versus número de varreduras (b). Os parâmetros de SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_w = +0,3 \text{ a } +1,1 \text{ V}$.	75
Figura 19 Voltamogramas de SW usando o sensor CPE-ZnPC em tampão borato (pH = 9,2) para Tiramina ($0,4 \text{ a } 4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) com concentração fixa de Espermidina ($0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) (a) e para Espermidina ($0,5 \text{ a } 4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) com concentração fixa de Tiramina ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) (b) Os parâmetros de SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_w = +0,3 \text{ a } +1,1 \text{ V}$.	76
Figura 20 Voltamogramas em onda quadrada em triplicata usando o sensor CPE-ZnPC (a) e curvas analíticas resultantes de tiramina (b) e espermidina (c) com concentrações variando de $0,30 \text{ a } 5,08 \mu\text{mol L}^{-1}$ tiramina e $0,48 \text{ a } 8,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ espermidina em tampão borato (pH 9,2).	77
Figura 21 Gráficos de resíduos para as curvas analíticas de tiramina (a) e espermidina (b).	78

Figura 22 Voltamogramas de SW de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e $3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina (—) em tampão borato (pH 9.2) com adição dos seguintes interferentes: 10 % v/v of etanol (—), e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ of Histamina (—), Putrescina (—), Cadaverina (—), 2-feniletilamina (—), ácido tártarico (—), ácido cítrico (—) e sacarose (—). Os parâmetros SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_w = +0,3$ to $+1,1 \text{ V}$.	80
Figura 23 Concentração predita e nominal em vinhos de tiramina (a) e espermidina (c) e EJCR para o método proposto para tiramina (b) e espermidina (d)	84
Figura 24 Concentração predita e nominal em cafés solúveis de tiramina (a) e espermidina (c) e EJCR para o método proposto para tiramina (b) e espermidina (d)	85
Figura 25. SWV utilizando eletrodo BDD em tampão BR (pH 9,0) para soluções contendo $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada ABs (putrescina, cadaverina e histamina), analisadas individualmente.	94
Figura 26. Medidas CV em eletrodo BDD usando $46 \mu\text{mol L}^{-1}$ de putrescina (a), $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de histamina (c) e cadaverina (e) em tampão BR (pH 9) em diferentes velocidades de varredura (10 a 200 mV s^{-1}). Relação de I_p vs. v (mV s^{-1}) para putrescina (b) e cadaverina (f) e Relação de I_p vs. $v^{1/2}$ (mV s^{-1}) ^{1/2} para histamina (d)	95
Figura 27. Voltamogramas de SW de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de putrescina (a), histamina (c) e de cadaverina (e) em tampão BR com pH variando de 6 a 10. Gráficos E_p (potencial de pico) versus pH de putrescina (b), histamina (d) e cadaverina (f). pH 6 (—), pH 7 (—), pH 8 (—), pH 9 (—), pH 10 (—).	96
Figura 28 Estudo de otimização dos parâmetros experimentais usando medições de SWV em solução individual de $7,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ de putrescina (a, b, c), histamina (d, e, f) e cadaverina (g, h, i) em tampão BR (pH 9) obtidos em uma faixa de amplitude de pulso de 20 a 70 mV (a, d, g), um incremento de potencial de 1 a 10 mV (b, e, h) e frequência de 10 a 100 s^{-1} (c, f, i), e, fixando os demais parâmetros de SWV.	97
Figura 29 Voltamogramas de SW em triplicata usando o sensor BDD, curvas analíticas resultantes e gráficos de resíduos de putrescina (a, b,c), histamina (d, e, f) e cadaverina (g, h, i) com concentrações variando de $0,92$ a $7,46 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR (pH 9). Parâmetros SWV: $f = 70 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 8 \text{ mv}$, $a = 70 \text{ mV}$.	98
Figura 30. Voltamogramas de SW obtidos em eletrodo BDD em tampão BR (pH 9) para os conjuntos de calibração de putrescina (a-c), histamina (d-f) e cadaverina (g-	

i). SWV antes **(a, d, g)** e após correção de linha de base por algoritmo AsLSSR **(b, e, h)** e do deslocamento usando COW **(c, e, f)**. Parâmetros SWV: $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$, $f = 70 \text{ mV}$, $\Delta E_w = 0,8 \text{ a } 1,3 \text{ V}$ e $a = 20 \text{ a } 70 \text{ mV}$ 101

Figura 31 Concentração predita versus nominal e EJCRC para o modelo MCR-ALS 103

Figura 32. Concentração predita versus nominal e EJCRC para o modelo UPLS.... 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Toxicidade das ABs	23
Tabela 2 Sintomas associados aos efeitos adversos da tiramina	25
Tabela 3. Informações sobre métodos analíticos aplicados à quantificação de aminas biogênicas em vinhos e cafés solúveis.	34
Tabela 4 Relação do potencial de pico e $\log f$ para sistemas redox reversível e irreversível	43
Tabela 5 Faixa dos parâmetros SWV do estudo de otimização SWV	58
Tabela 6 Identificação das amostras de vinhos e cafés solúveis	59
Tabela 7 Expressões matemáticas da ANOVA para o modelo de regressão linear .	60
Tabela 8 Resultados da ANOVA obtidos com significância de 5% nas curvas analítica	79
Tabela 9. Resultados de tiramina e espermidina em vinhos usando o método proposto e o método de referência HPLC.	81
Tabela 10 Concentrações de tiramina e espermidina determinados em amostras de vinhos utilizando o método proposto, juntamente com os respectivos resultados obtidos nos testes de recuperação.....	82
Tabela 11 Concentrações de tiramina e espermidina em amostras de café solúvel obtidos nos testes de recuperação.....	83
Tabela 12 Características analíticas dos métodos voltamétricos proposto e de outros que foram encontrados na literatura.....	87
Tabela 13 Resultados da ANOVA obtidos com significância de 5% nas curvas analítica	99
Tabela 14 Resultados da variância explicada e do ajuste residual obtidos conforme os números de componentes incluídas no modelo MCR-ALS nos conjuntos de calibração	102
Tabela 15. Resultados da validação cruzada nos conjuntos de calibração U-PLS	104

SUMÁRIO

Capítulo 1	17
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivo Geral	20
Capítulo 2	21
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Aminas Biogênicas: Formação, Importância e Toxicidade	22
2.2 Aminas biogênicas em vinhos	28
2.3 Aminas biogênicas em cafés solúveis	30
2.4 Métodos analíticos para detecção de ABs em bebidas	31
2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	35
2.4.2 Cromatografia Gasosa (GC)	36
2.4.3 Eletroforese Capilar (CE)	37
2.4.4 Voltametria	38
2.5 Técnicas Eletroanalíticas	40
2.5.1 Voltametria	41
2.5.2 Voltametria Cíclica	41
2.5.3 Voltametria de onda quadrada	42
2.6. Eletrodos de trabalho para determinação de ABs	44
2.6.1 Eletrodos Quimicamente Modificados	44
2.6.2 Ftalocianinas Metálicas	45
2.6.3 Eletrodo de diamante dopado com boro	47
2.7. Técnicas Quimiométricas	48
2.8. Método de calibração <i>multiway</i>	48
2.9. Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS)	49
2.10. Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados com Bilinearização Residual (U-PLS/RBL)	51
Determinação simultânea de espermidina e tiramina em bebidas utilizando o eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de zinco	53
Capítulo 3	53
3. Objetivos Específicos	54
4. Experimental	55

4.1.1 Reagentes.....	55
4.1.2 Instrumentação e software	55
4.1.4 Tratamento eletroquímico dos eletrodos de trabalho.....	56
4.1.9 Efeito de memória	58
4.2 Análise das amostras de vinho pelo método de referência (HPLC).....	59
4.3 Validação Analítica do método proposto	59
4.3.1 Linearidade	60
4.3.2 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	61
4.3.3 Exatidão	61
4.3.4 Especificidade	62
5. Resultados e discussão	63
5.1 Comportamento eletroquímico de eletrodos.....	63
5.2 Análises morfológicas de CPE e CPE-ZnPC.....	65
5.3 Avaliação do tratamento eletroquímico dos eletrodos CPE e CPE-ZnPC.....	65
5.4 Área eletroativa dos eletrodos CPE e CPE-ZnPC	66
5.5 Estudo de pH	68
5.6 Mecanismos propostos para reação de oxidação espermidina e tiramina em CPE-ZnPC	70
5.7 Estudo de velocidade.....	71
5.8 Otimização dos parâmetros experimentais de SWV	73
5.9 Efeito de Memória	74
5.10 Curva Analítica.....	75
5.11 Estudo de Interferentes	79
5.12 Análise de vinhos e cafés solúveis e teste de recuperação	80
5.13 Análise comparativa do desempenho do método proposto frente a outras abordagens voltamétricas	85
6. Considerações Finais	88
Determinação simultânea de ABs por voltametria de onda quadrada em eletrodo de diamante dopado com boro empregando calibração <i>multiway</i>	89
Capítulo 4	89
7. Objetivos Específicos	90
8. Experimental	91
8.1. Reagentes.....	91
8.2 Tratamento eletroquímico do eletrodo de trabalho	91

8.3 Comportamento eletroquímico da putrescina, cadaverina, histamina e espermidina sob o eletrodo de BDD	91
8.4 Estudo de pH	92
8.5 Estudo de velocidade	92
8.6 Estudo dos parâmetros	92
8.7 Conjuntos de calibração	92
8.8 Tratamento dos dados experimentais	93
9. Resultados e Discussão	93
9.1. Resposta eletrocatalítica das ABs	93
9.2. Estudo de velocidade	94
9.3. Estudo de pH	95
9.4. Estudo dos parâmetros	97
10. Considerações Finais	105
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	107
6.1 Conclusões	107
6.1 Perspectivas	107
REFERÊNCIAS	110

INTRODUÇÃO

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

As aminas biogênicas (ABs) são bases orgânicas formadas pela atividade enzimática de microrganismos que atuam sobre aminoácidos presentes em diferentes tipos de alimentos, desempenhando diversas funções fisiológicas (Kumar *et al.*, 2020). Embora as ABs exerçam um papel biológico benéfico no organismo, níveis elevados destes compostos são considerados tóxicos, causando efeitos nocivos à saúde humana, como enxaqueca, náuseas, problemas estomacais, e taquicardia (Jastrzębska *et al.*, 2023).

O aumento dessas ABs é indicativo de deterioração do alimento por atividade microbiana, representando um risco de intoxicação alimentar e podendo atuar como precursores de compostos potencialmente cancerígenos. (Kannan *et al.*, 2020). Por isso, é importante estabelecer limites seguros para as ABs em bebidas e alimentos. Sendo assim, a ANVISA e *European Food Safety Authority* (EFSA) reconhecem a tiramina e histamina como as ABs de maior relevância toxicológica, estabelecendo um limite tolerável de 100 mg/kg de histamina em pescados. No caso da tiramina, a EFSA define um limite seguro de até 600 mg/kg em alimentos destinados à população em geral. Entretanto, indivíduos em tratamento com inibidores da monoaminaoxidase (IMAO) de primeira e terceira geração, devem restringir sua ingestão a 6mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente (EFSA, 2011).

Atualmente, não existe um marco regulatório que estabeleça limites máximos permitido para espermidina, putrescina e cadaverina (Tiris *et al.*, 2023; Turna, Chung & McIntyre, 2023). Estudos realizados por Del Rio *et al.* (2024) e (2019) indicaram que as concentrações superiores a 1452 mg/kg de espermidina, 880 mg/kg de putrescina e 510 mg/kg de cadaverina podem representar risco significativo à saúde humana. A toxicidade dessas ABs não se manifesta de maneira uniforme entre os indivíduos, podendo variar em função das características alérgicas, intolerâncias alimentares, fatores genéticos e do consumo de álcool e de medicamentos IMAO (Tiris *et al.*, 2023). Portanto, é importante, em termos de qualidade e segurança alimentar, o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas robustas para a determinação e monitoramento das ABs em alimentos e bebidas (Müller *et al.*, 2022).

Diversas metodologias analíticas são aplicadas para monitorar e quantificar ABs em alimentos e bebidas, incluindo métodos de cromatografia gasosa (do inglês, *gas chromatography* - GC) (Stój *et al.*, 2022), eletroforese capilar (Daniel *et al.*, 2015), cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High-performance Liquid*

Chromatography – HPLC) acoplada à espectroscopia de absorção ultravioleta (do inglês, *Ultraviolet (UV) absorption spectroscopy*) (Pineda *et al.*, 2012), espectrometria de massa (do inglês, *Mass Spectrometry – MS*) (Huang *et al.*, 2016) e detecção por fluorescência (do inglês, *fluorescence detector* – FLD) (Liu *et al.*, 2020).

Grande parte dessas técnicas requer pré-tratamento da amostra como extração, devido à instrumentação, à complexidade da matriz e à diversidade estrutural das ABs. Nas técnicas cromatográficas, é necessária a realização da derivatização pré ou pós coluna, uma vez que as ABs não possuem cromóforos ou fluoróforos para serem detectadas por UV ou FLD, respectivamente. Essa reação envolve o grupamento amino e é realizada com reagentes específicos, entre os quais se destacam o cloreto de dansila (Dns-Cl), o orto-ftaldeído (OPA), o cloreto de benzoíla (Ben-Cl) e ocloroformiato de isobutíla (IBCF) (Tiris *et al.*, 2013), tornando o método mais demorado, caro e trabalhoso.

Diante desse cenário, uma alternativa promissora é a utilização de técnicas voltamétricas para desenvolver métodos seletivos, sensíveis, rápidos e de baixo custo, com etapas mínimas ou nenhuma etapa de preparação da amostra e derivatização (Lourenço *et al.*, 2022, Silva *et al.*, 2021). Na literatura, diversos estudos empregaram métodos voltamétricos para determinar ABs de forma individual em vinhos, porém não há registros de sua aplicação em cafés solúveis. Contudo, a quantificação simultânea desses compostos apresenta desafios devido à baixa sensibilidade, e alta sobreposição dos picos voltamétricos, o que compromete a seletividade em eletrodos convencionais (Kumar *et al.*, 2021; Lourenço *et al.*, 2022).

Para enfrentar esses desafios, têm sido exploradas diferentes abordagens, como a utilização de sistemas enzimáticos mais específicos para a construção de biossensores eletroquímicos (Kaçar *et al.*, 2020), a aplicação de eletrodos quimicamente modificados (do inglês, *Chemically Modified Electrodes* - CMEs) (Lourenço *et al.*, 2022) e a incorporação de métodos quimiométricos para melhorar a seletividade e a resolução dos sinais (Henao-Escobar *et al.*, 2015). A preparação dos sensores CMEs emprega o uso de materiais de suporte estáveis e condutores, como eletrodos de carbono vítreo (do inglês, *Glassy carbon electrode* – GCE), eletrodo de pasta de carbono (do inglês, *Carbon paste electrode* – CPE), e nanotubos de carbono (do inglês, *Multi-Walled Carbon Nanotubes* – MWCNTPE). Dentre os modificadores empregados, as metaloftalocianinas (MPCs), especialmente a ftalocianina de zinco (ZnPC), se destacam por sua alta eficiência catalítica para diversas reações

envolvendo compostos orgânicos (Guaus & Torrent-Burgués, 2022). Essas propriedades são influenciadas pela estrutura molecular da ZnPC, que é determinada pelo caráter dos ligantes e suas posições (periféricas ou não periféricas) no anel da Pc (Guaus & Torrent-Burgués, 2022; Bayrak *et al.*, 2021). A utilização desses complexos na preparação de eletrodos quimicamente modificados oferece diversas vantagens, incluindo elevada sensibilidade, seletividade e limites de detecção mais baixos (Al-Ogaidi *et al.*, 2018).

Outra estratégia analítica promissora consiste na combinação de técnicas voltamétricas com métodos quimiométricos multivariados. Henao-Escobar *et al.* (2015) aplicaram a técnica SWV utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (do inglês, *boron doped diamond* – BDD), associada à regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), demonstrando a capacidade do método em resolver sinais colineares em misturas quaternárias de ABs. Contudo, o modelo desenvolvido apresentou limitações, como a necessidade de um conjunto de calibração extenso (81 amostras). Além disso, por se tratar de uma calibração de primeira ordem, o modelo permanece sensível a compostos não modelados na etapa da calibração (interferentes) em presuntos.

Nesse contexto, a calibração multivariada de segunda ordem, empregando algoritmos como *Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares* (MCR-ALS) e o *Unfolded Partial Least Squares/Residual Bilinearization* (U-PLS/RBL), surge como alternativa mais robusta, permitindo a determinação seletiva de analitos mesmo na presença de interferências e reduzindo o número de amostras de calibração necessárias. Estudos recentes, como os de Silva *et al.* (2018) e Dantas *et al.* (2021), confirmam a eficácia desses métodos em matrizes alimentícias complexas.

Assim, este trabalho descreve o desenvolvimento de novos métodos eletroanalíticos multivariados, de primeira e de segunda ordem, para a determinação simultânea de aminas biogênicas em vinhos e cafés solúveis. No primeiro estudo, foi proposto um método voltamétrico de onda quadrada para quantificação simultânea de tiramina e espermidina empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado ZnPC, eliminando etapas de derivatização e pré-tratamento. No segundo estudo, a voltametria de onda quadrada empregando o eletrodo BDD, foi associada aos algoritmos de segunda ordem MCR-ALS e U-PLS/RBL para a determinação simultânea de putrescina, cadaverina e histamina, possibilitando a resolução de picos sobrepostos.

1.1 Objetivo Geral

- ❖ Desenvolver abordagens voltamétricas baseadas em SWV, empregando calibração multivariada de primeira e segunda ordem, para a determinação simultânea de ABs em bebidas, utilizando eletrodos modificado e não modificado.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Capítulo 2

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, é apresentada a fundamentação teórica que embasa o desenvolvimento dos estudos nos **Capítulos 3 e 4**.

2.1 Aminas Biogênicas: Formação, Importância e Toxicidade

As ABs são moléculas nitrogenadas produzidas predominantemente pela descarboxilação de aminoácidos precursores na forma livre. Essa reação é catalisada por enzimas chamadas descarboxilases, presentes em bactérias, leveduras e fungos, que eliminam o grupo carboxila (-COOH) dos aminoácidos para gerar as respectivas aminas ([Jastrzębska et al., 2023](#)). As ABs mais recorrentes em alimentos e bebidas são a histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, feniletilamina e espermidina, derivadas de aminoácidos precursores ([Papageorgiou et al., 2018a](#)). As ABs são classificadas em diferentes grupos com base na sua estrutura química (**Figura 1**).

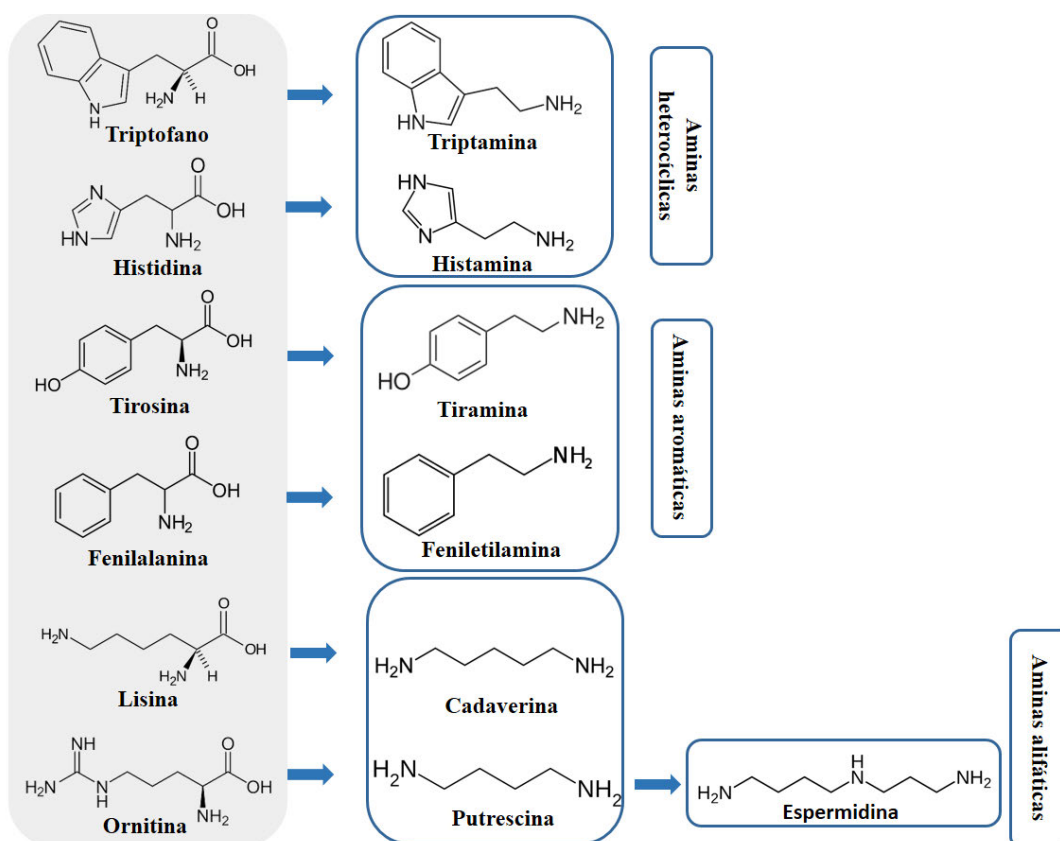


Figura 1 Estruturas moleculares das ABs e seus precursores. Criado com BioRender.com.

Esses compostos são sintetizados naturalmente por organismos vivos e têm diversas atividades biológicas importantes. Do ponto de vista fisiológico, a triptamina e a tiramina exercem ação sobre o sistema circulatório, enquanto histamina, putrescina e cadaverina atuam predominantemente no sistema nervoso central. (Del Rio *et al.*, 2024). A espermidina exerce funções fundamentais em diversos sistemas biológicos, como a proliferação celular, a regulação do crescimento celular, a estabilização de membranas celulares e a modulação da expressão gênica (Önal, 2007).

Entretanto, as ABs podem ser tóxicas quando estão presentes no organismo em elevadas concentrações, desencadeando diversos sintomas análogos aos de uma intoxicação alimentar, tais como vômitos, dificuldade respiratória, náuseas, tonturas, coceiras, pressão arterial elevada, enxaqueca, desconforto abdominal, vasodilatação ou vasoconstrição como mostra a **Tabela 1** (Vinci & Madalloni, 2020). A espermidina pode potencializar os efeitos das ABs e formar nitrosaminas cancerígenas ao reagir com nitrito (Tiris *et al.*, 2023).

Geralmente, as ABs são estáveis e difíceis de degradar, pois não são destruídas durante o cozimento ou tratamento com alta temperatura (Papageorgiou *et al.*, 2018a). Mas sua formação pode ser reduzida por métodos como alta pressão hidrostática, ozonização e radiação (Wójcik *et al.*, 2022).

Tabela 1 Toxicidade das ABs

Aminas Biogênicas	Efeitos fisiológicos
Histamina	Liberação de adrenalina e noradrenalina, processos alérgicos, vias respiratórias, contração da parede uterina, modulação de estímulos sensoriais e motores, controle da secreção de ácido gástrico.
Tiramina	Vascularização periférica, elevação da frequência cardíaca, intensificação da lacrimejamento e salivação, aumento da frequência respiratória, elevação da glicemia e enxaqueca
Triptamina	Pressão arterial elevada e enxaqueca.
Putrescina, Cadaverina, Espermidina e Espermina	Hipotensão, bradicardia, aumento da toxicidade de outras aminas

Fonte: Adaptada de Vinci & Maddaloni (2020)

Os sintomas provocados pela ingestão excessiva de ABs podem surgir tanto em indivíduos com maior sensibilidade à histamina e a outras ABs, quanto naqueles

com atividade catabólica normal, causando consequências severas. Esses sintomas geralmente persistem por um período de 8 a 12 horas (Vinci & Madalloni, 2020).

Estudos relatam métodos para a detecção em diferentes matrizes alimentares proteicas (de origem vegetal ou animal), como carne (Wójcik *et al.*, 2022), peixe (Pinto *et al.*, 2016), vinho (Silva, Franco & Santos, 2020), café (Restuccia; Loizzo; Spizzirri, 2019), cerveja (Daniel *et al.*, 2015), entre outros. A existência destes compostos nesses alimentos pode ser utilizada como marcadores da qualidade e frescor. Sendo assim, qualquer alimento que seja fermentado ou exposto à contaminação microbiana durante o processamento ou armazenamento pode conter ABs.

Os teores de ABs podem variar desde o cultivo até o consumo do alimento, incluindo parâmetros físico-químicos (pH, temperatura e teor de NaCl), processos de fabricação, condições e tempo de armazenamento (umidade), microrganismos com atividade descarboxilase, integridade do insumo e presença de aminoácidos livres (Vinci & Madalloni, 2020). Alguns alimentos são mais propensos a ter altos níveis de ABs, devido às etapas de fabricação, processamento e armazenamento que estimulam a proliferação das bactérias produtoras de aminas (Papageorgiou *et al.*, 2018a).

No entanto, estabelecer uma quantidade segura de uma determinada AB para consumo diário é um grande desafio. Isso acontece porque os limites tóxicos podem variar significativamente entre os indivíduos e ainda podem ser potencializadas pela presença e combinação de diferentes ABs. No Brasil, somente a histamina possui limite definido de 100mg/kg para pescados (Brasil, 2019). A EFSA recomenda 600 mg/kg de tiramina como limite seguro para indivíduos saudáveis, mas abaixo desse limite (50 mg/kg) para indivíduos em uso de antidepressivos inibidores de monoaminoxidase (EFSA, 2011). Entretanto, não há normas específicas que regulamenta a quantidade de ABs em bebidas, como vinhos e cafés solúveis.

2.1.2 Tiramina

A tiramina, ou *p*-(2-aminoetil) fenol, é uma monoamina sintetizada pela remoção do grupo carboxila da tirosina, conforme mostrado na **Figura 1**, por meio da ação enzimática da tirosina descarboxilase. Esta amina desempenha diversas funções relevantes, atuando como um agente simpaticomimético (indireto) que promove a liberação de diferentes neurotransmissores como dopamina, noradrenalina e adrenalina na fenda sináptica (Dala-Paula, Custódio & Glória, 2023).

Normalmente, a tiramina é metabolizada no organismo pela monoamina oxidase (MAO). No entanto, o consumo de bebidas alcoólicas ou o uso de medicamentos como antidepressivos, ou para o tratamento de doenças de Alzheimer e Parkinson, tuberculose e malária inibem a monoamina oxidase, e podem tornar as pessoas sensíveis a baixos níveis de tiramina (Dala-Paula, Custódio & Glória, 2023; Silva, Franco & Santos, 2020). Essa sensibilidade também pode desencadear crises hipertensivas devido aos efeitos simpaticomiméticos da tiramina, que deslocam a dopamina, norepinefrina e epinefrina das vesículas pré-sinápticas, causando um aumento súbito da pressão arterial (Patel *et al.*, 2019). Além disso, a intoxicação por tiramina pode causar outros efeitos adversos como crises de enxaqueca, bem como sintomas gastrointestinais e respiratórios (Silva, Franco & Santos, 2020). Esses sintomas aparecem aproximadamente 30 minutos após o consumo de alimentos que apresentam tiramina, comumente encontrado em queijos, peixes, salsichas e bebidas alcoólicas (Dala-Paula, Custódio & Glória, 2023). Na **Tabela 2** estão descritos os principais efeitos da tiramina e envolvidas com outras amins.

Tabela 2 Sintomas associados aos efeitos adversos da tiramina

	Manifestações toxicológicas
	Gastrointestinal (náuseas)
Toxicidade aguda por Tiramina	Neurológica (dor de cabeça, palpitações e enxaqueca)
	Circulatória (sudorese, dor no peito)
	Respiratória (aperto no peito)
	Outros (febre)
Crise hipertensiva (interação da tiramina com medicamentos IMAO)	Episódios hipertensivos, $\geq 180/120$ mmHg, e em casos mais graves choque e morte por hemorragia cerebral ou insuficiência cardíaca

Fonte: Adaptada de Dala-Paula, Custódio & Glória (2023)

2.1.3 Espermidina

A Espermidina é uma poliamina sintetizada a partir da putrescina pela adição sequencial de grupos aminopropil. Sua estrutura molecular (**Figura 2**) contém três grupos amina carregados positivamente, sendo responsável por desempenhar diversas funções, que incluem estabilizar o DNA, promover o crescimento celular e induzir autofagia (Zou *et al.*, 2022). Apesar da sua importância nas atividades celulares, níveis excessivos de espermidina podem desencadear sinais de toxicidade como a diminuição da pressão arterial, inibição da coagulação sanguínea, e a

ocorrência de sintomas respiratórios, neurológicos e possíveis complicações renais (Turna, Chung & McIntyre, 2023).

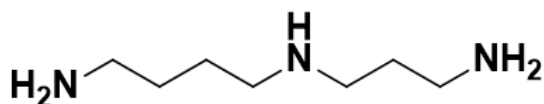


Figura 2 Fórmula estrutural da Espermidina.

Estudos têm observado alterações nos níveis de espermidina em fluidos corporais de indivíduos diagnosticados com Alzheimer (Sternberg *et al.*, 2022) e com câncer (Sari *et al.*, 2021). A presença de espermidina em células tumorais tende a inibir a apoptose celular, prolongando o desenvolvimento do tumor maligno. Assim, a espermidina é considerada um biomarcador na prevenção e tratamento do câncer (Amin *et al.*, 2021).

2.1.5 Histamina

A histamina (2-[1H-imidazol-5-etanamina) é uma amina heterocíclica, constituída por um anel imidazol e um grupo etilamina, sintetizada pela atividade microbiana mediante conversão enzimática da histidina por meio de uma reação de descarboxilação (Debeer *et al.*, 2021). Embora exerça funções fisiológicas e imunológicas relevantes, o acúmulo de histamina em alimentos pode provocar intoxicações severas, historicamente associadas ao consumo de peixes da família Scombridae, responsáveis por aproximadamente 98% dos casos registrados entre 1959 e 2013 (Del Rio *et al.*, 2024).

A histamina é a única AB com regulamentação específica definida por órgãos oficiais e políticas de conformidade em segurança alimentar (Debeer *et al.*, 2021). A EFSA estabelece limites entre 100 e 200 mg/kg apenas para peixes e 400 mg/kg para produtos de peixe (EFSA, 2011). A *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) recomenda concentrações acima de 500 mg/kg em peixes como potencialmente perigosas à saúde (FDA, 2022). No Brasil, a ANVISA determina um limite máximo de 100 mg/kg para pescados, visando assegurar a qualidade e a inocuidade desses alimentos (Brasil, 2019).

Os sintomas decorrentes da intoxicação por histamina podem aparecer em diferentes sistemas do organismo, incluindo o cutâneo, com eritema e urticário, o gastrointestinal, com náuseas e vômitos, e o cardiovascular, com hipotensão e

taquicardia. Essa intoxicação é reportada mundialmente e apresenta quadro clínico semelhante ao de reações alérgicas, podendo evoluir para casos graves e potencialmente fatais (Lourenço *et al.*, 2022; Del Rio *et al.*, 2024).

2.1.6 Putrescina

A putrescina (1,4-diaminobutano) foi identificada no século XIX pelo médico e cientista Ludwig Brieger, a partir da análise de um cadáver em decomposição (Del Rio *et al.* 2024). Dentre as aminas biogênicas, a putrescina se destaca pela complexidade de suas vias metabólicas, que variam conforme o grupo bacteriano. Em bactérias Gram-positivas, pode ocorrer por duas rotas principais: a via da ornitina descarboxilase (ODC), de caráter biodegradativo e a via da agmatina deiminase. Já em bactérias Gram-negativas, a síntese pode ocorrer de forma direta a partir da ornitina pela ODC, ou indiretamente a partir da arginina por meio da via da arginina descarboxilase, que utiliza a agmatina como intermediário. A coexistência de múltiplas vias metabólicas e sua atuação simultânea em diferentes bactérias dificultam as condições ideais para a produção e armazenamento de alimentos, elevando o potencial de acúmulo de putrescina (Wunderlichová *et al.*, 2014).

A putrescina apresenta atividade citotóxica e potencial carcinogênico, além de atuar como potenciadora da toxicidade de outras ABs (Del Rio *et al.* 2024). Apesar dessas evidências, não existem diretrizes legislativas estabelecidas para os seus teores em alimentos. Com base em dados toxicológicos, estudos experimentais com ratos estabeleceram 180 mg/kg de peso corporal como a dose máxima sem efeitos adversos observáveis (do inglês, *non-observed adverse effect level* - NOAEL) para a putrescina. No entanto, pesquisas mais recentes sugerem que concentrações acima de 880 mg/kg de alimento podem representar risco significativo à saúde, especialmente quando associadas à presença de outras aminas bioativas (Del Rio *et al.*, 2019).

2.1.4 Cadaverina

A cadaverina (pentano-1,5-diamina), assim como a putrescina, foi descoberta pelo médico e cientista Ludwig Brieger. Ambas apresentam estruturas semelhantes, diferenciando apenas em relação ao comprimento da cadeia alifática, a putrescina possui quatro átomos de carbono, enquanto a cadaverina apresenta cinco, conforme ilustrado na **Figura 1** (Del Rio *et al.*, 2024).

A cadaverina é originada do catabolismo da lisina, por meio de uma reação de descarboxilação catalisada pela enzima lisina descarboxilase (Xu & Zhou, 2025). Embora apresente toxicidade relativamente menor que a histamina e tiramina, sua ingestão pode provocar sintomas semelhantes aos observados para putrescina, como bradicardia, hipotensão e paralisia de membros.

Os estudos toxicológicos realizados em testes experimentais com ratos indicam que os limites de segurança para a cadaverina são comparáveis aos estabelecidos para a putrescina (Del Rio *et al.*, 2019). Pesquisas recentes de toxicidade *in vitro* em células intestinais revelaram que concentrações comumente encontradas em queijos, embutidos, peixes e seus derivados podem induzir necrose celular. Esses achados indicam que níveis superiores a 510 mg kg⁻¹ em alimentos podem gerar preocupações significativas para a saúde devido à toxicidade (Del Rio *et al.*, 2024).

Esse acúmulo excessivo de cadaverina pode causar sintomas como intoxicação, cefaleia, alterações na pressão arterial, distúrbios respiratórios, palpitações e vômitos (Tiris *et al.*, 2023; Xu & Zhou, 2025). Além disso, a cadaverina pode reagir com nitritos presentes em alimentos, para formar nitrosaminas, composto de ação carcinogênica e pode potencializar a ação de outras ABs (ÖNAL *et al.*, 2007).

2.2 Aminas biogênicas em vinhos

A produção de vinho no Brasil é caracterizada como o resultado da fermentação alcoólica de uvas maduras e frescas, sendo a bebida categorizada conforme seu tipo como mesa, espumante, licoroso ou composto, e sua coloração branco, tinto ou rosado (BRASIL, 1988).

O Brasil ocupa a décima sexta (16º) posição no consumo de vinho e décima quinta (15º) como produtor mundial (OIV, 2023). As vinícolas localizadas na Serra Gaúcha/RS são responsáveis por mais de 85% da produção nacional de vinhos (UVIBRA, 2023). O interesse do consumidor por esse produto está frequentemente vinculado à sua qualidade, parâmetro este que é diretamente impactado por elementos como a variedade da uva, condições ambientais e as metodologias aplicadas durante a fabricação, fermentação e estocagem. Contudo, um fator importante que pode comprometer essas características sensoriais e a segurança do produto é a presença de compostos indesejáveis, como as aminas biogênicas, as quais afetam significativamente as propriedades do vinho (Silva, Franco & Santos, 2020).

Dados da literatura relatam que a presença de ABs é comum em vinhos e mais de sete ABs foram identificadas em vinhos comerciais de diferentes países do mundo: vinhos chilenos ([Pineda et al., 2012](#)), brasileiros ([Silva, Franco, & Santos et al., 2021](#)) e entre outros. As ABs no vinho podem ser originadas de fontes endógenas, sendo sintetizadas naturalmente (putrescina, espermidina e espermina) de acordo com o estágio de maturação do fruto, características do solo e fatores climáticos e higiênicos. Também são formadas por fontes exógenas, decorrente de reações enzimáticas mediadas por microrganismos ao longo das etapas de produção e envelhecimento do vinho ([Torre, Rotondo & Salvo, 2023](#)).

A formação das ABs de fontes exógenas está associada à atividade descarboxilase de leveduras ao longo da fermentação alcoólica e de bactérias lácticas na fermentação malolática ([Stój et al., 2022](#)). Na fermentação malolática, as bactérias lácticas convertem o ácido málico em láctico por meio da reação de descarboxilação. Essa conversão resulta na suavização do vinho e na redução significativa de sua acidez ([Torre, Rotondo & Salvo, 2023](#)). Como consequência, estabelecem-se condições metabólicas favoráveis para que outros substratos, como aminoácidos precursores, sejam metabolizados, potencializando assim a formação de ABs. No caso dos vinhos brancos, a fermentação malolática não é muito comum e, conseqüentemente, os teores de ABs tendem a ser menores do que nos vinhos tintos. ([Wunderlichová et al., 2014](#)).

Mitar et al., (2018), identificaram mais de 11 ABs nos vinhos tintos e notaram que as concentrações dependem da variedade e origem geográfica da uva. Restuccia et al., (2017) encontraram seis ABs em amostras de uvas, sendo a espermidina, a espermina e a putrescina detectadas em maiores concentrações, seguida por tiramina, histamina e feniletilamina em menores níveis. Nesse mesmo estudo, os autores observaram que as variedades das uvas afetaram os teores e os tipos de ABs formadas. De modo geral, as principais ABs encontradas em vinhos, em teores elevados, são: histamina, tiramina, putrescina e cadaverina, seguidas da triptamina e espermidina ([Aliaño-González & Cantos-Vila, 2024](#)).

A detecção de ABs no vinho é relevante devido a presença do etanol que provoca inibição da enzima MAO, responsável pela metabolização de ABs no organismo humano ([Vasconcelos et al., 2021](#)). Isso causa preocupação para indústria enológica, em decorrência da associação das condições sanitárias inadequadas das uvas e da ausência de protocolos para higienização nas etapas de processamento do

vinho. Isso compromete a qualidade e segurança do produto, resultando um sabor desagradável aos consumidores, além de induzir sintomas tóxicos em humanos (Aliaño-González & Cantos-Vila, 2024). Assim, torna-se necessário identificar e determinar, com métodos rápidos e confiáveis, a quantidade de ABs no vinho, para monitorar a qualidade e segurança alimentar do consumidor.

2.3 Aminas biogênicas em cafés solúveis

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário global, sendo reconhecido como principal produtor e exportador de café solúvel e o segundo maior consumidor dessa bebida (ABICS, 2023). O elevado consumo de café solúvel é atribuído à sua praticidade e propriedades organolépticas e psicoativas, sendo proveniente da desidratação do extrato de café torrado das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (Nóbrega *et al.*, 2023). Nos últimos anos, foram registrados um crescimento expressivo nos estudos sobre a composição do café, em relação aos compostos fenólicos e nitrogenados (Arai *et al.*, 2015; Santanatoglia *et al.*, 2024). Porém, na literatura, estudos acerca de ABs em cafés solúveis ainda é limitada, apresentando poucas metodologias disponíveis para sua quantificação.

As ABs estão naturalmente presentes nos frutos do café tanto na forma livre como conjugada com outras moléculas, como ácido fenólico e proteínas, sendo seus níveis influenciados pela variedade, fase de maturação e o ambiente de armazenamento (Silveira *et al.*, 2007). De modo geral, quanto mais longo for o ciclo de produção para obtenção dos cafés torrados e moídos e cafés solúveis (manuseio, armazenamento e comércio) maior o acúmulo de ABs, seja em cada etapa do processo de fabricação ou fenômenos de deterioração (Restuccia, Loizzo & Spizzirri, 2019).

Sridevi *et al.* (2009) investigaram a presença de putrescina, espermidina e espermina durante a formação do fruto do café e verificaram que os níveis dessas poliaminas aumentaram durante a ontogenia dos frutos, tanto no café arábica quanto no café robusta. Cirilo *et al.* (2003) analisaram os tipos e os níveis de concentração de ABs nos cafés verdes e torrados, nas amostras de café verde, a serotonina e a putrescina foram as aminas predominantes, seguidas pela espermidina e espermina. Após o processo de torrefação a 300 °C por 6 min, as únicas ABs encontradas no café torrado foram a espermidina e serotonina, pois a putrescina e espermina foram sensíveis à temperatura/tempo utilizada durante a torrefação. No estudo de Casal *et*

al. (2004), outras ABs também foram detectadas no café verde, como a cadaverina, histamina e tiramina, mas após a torrefação a 160-220 °C por 14 min, relataram que todas as ABs estavam presentes, mas em menores quantidades.

A detecção de ABs em cafés solúveis também foi investigada por Restuccia *et al.* (2015), os quais constataram que o café solúvel regular e o descafeinado apresentam quantidades menores de ABs em comparação com o café torrado e moído. Essa diferença provavelmente está relacionada aos processos industriais de descafeinação e a produção do café solúvel, que podem levar à perda de componentes do sabor e das ABs após o processo de extração da cafeína e/ou secagem (Restuccia; Loizzo; Spizzirri, 2019).

O estudo realizado por Silveira *et al.* (2007), detectaram diferentes ABs em café solúvel, variando de 2,8 a 27,6 mg L⁻¹. A serotonina mostrou-se presente em níveis mais elevados, seguida por cadaverina, tiramina e espermidina. No trabalho de Restuccia *et al.* (2015) os resultados comprovaram que o método de preparação do café pode ser considerado o principal fator contribuinte no teor de ABs totais. As bebidas à base de mocha continham níveis mais elevados de ABs, do que as bebidas obtidas a partir de cafés solúveis, descafeinados e de máquinas de café expresso.

2.4 Métodos analíticos para detecção de ABs em bebidas

A determinação dos teores de ABs em bebidas é importante por duas razões principais: (i) risco de intoxicação por ABs quando consumidas em quantidades excessivas, podendo causar sintomas de intoxicação alimentar (Ordóñez *et al.*, 2016), (ii) possibilidade das ABs serem utilizadas como marcadores de qualidade do produto, pois sua presença pode ser um indicativo de contaminação microbiológica, deterioração ou de condições precárias de armazenamento e higiene durante a produção e processamento de alimentos. Por isso, o desenvolvimento de metodologias analíticas para determinar ABs representa uma condição importante para verificar a conformidade com os padrões de qualidade e segurança alimentar dos alimentos consumidos (Papageorgiou *et al.*, 2018a).

A detecção de ABs em alimentos e bebidas apresenta desafios analíticos importantes devido a três fatores principais: o forte caráter polar dessas moléculas, que aumenta sua solubilidade em água e dificulta a extração e pode comprometer a exatidão e a recuperação analítica (Papageorgiou *et al.*, 2018a); a elevada complexidade das matrizes alimentícias e as semelhanças estruturais entre as

diferentes ABs, que dificultam sua separação e identificação (Ordóñez *et al.*, 2016); e a ausência de grupos cromóforos e fluoróforos, o que torna necessário a derivatização desses compostos antes de sua detecção por métodos espectrofotométricos ou fluorométricos (Tiris *et al.*, 2023).

Para contornar essas limitações, os métodos convencionais adotam as etapas de extração e derivatização de ABs, para reduzir a polaridade e fornecer um cromóforo para que seja detectado e, em seguida, quantificado (Restuccia, Loizzo & Spizzirri, 2019). Os métodos de extração representam etapas críticas do processo, que são realizadas tanto para remover compostos que possam interferir na análise, como também para concentrar os analitos. (Vieira *et al.*, 2020). As técnicas mais utilizadas são extração líquido-líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction* – LLE), extração em fase sólida (do inglês, *solid-phase extraction* – SPE), microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction* – DLLME) e microextração em fase sólida por imersão direta (do inglês, *Direct Immersion-solid-phase microextraction* – DI-SPME) (Vasconcelos *et al.*, 2021).

Os processos de extração e derivatização são frequentemente realizados simultaneamente. A reação de derivatização pode ser realizada antes (métodos pré-coluna) ou depois (métodos pós-coluna) da análise cromatográfica, utilizando Ben-Cl, OPA ou DNS-Cl para análises por HPLC, e o IBCF para análise por GC. Dentre esses reagentes, o DNS-Cl tem sido aplicado na maioria dos estudos, uma vez que seus derivados são estáveis e podem ser analisados por detectores UV e FLD. Por outro lado, esse procedimento requer aplicação de temperatura externa (10 - 60°C) e tempo de reação prolongada (10 – 60 min).

A derivatização realizada com ortoftalaldeído (OPA) ocorre em temperatura ambiente e em um espaço curto de tempo. No entanto, reage apenas com aminas primárias e gera derivados instáveis (Özdestan & Üren, 2009). Por outro lado, o Ben-Cl reage com aminas primárias e secundárias formando derivados estáveis, porém pode reagir com outros grupos, como fenóis, álcoois alifáticos e alguns açúcares, e a reação é mais demorada (Ordóñez *et al.*, 2016). Quanto ao clorofórmio de isobutila (IBFC), reage com água, por isso apresenta resultado com maior instabilidade, necessitando do uso de solventes orgânicos apróticos (hexano, tolueno ou clorofórmio). Esses solventes reduzem a presença de água na reação, ajudando a manter a estabilidade do composto e, conseqüentemente, a eficácia da reação desejada (Resque, 2022).

Embora tenha muitos artigos na literatura sobre a determinação de ABs, novos avanços têm impulsionado melhorias na precisão, simplicidade, seletividade e sensibilidade dos métodos analíticos. Nas últimas décadas, várias metodologias analíticas têm sido empregadas para determinar ABs em vinhos, enquanto, em cafés solúveis, essa aplicação tem sido menos estudada, conforme detalhado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Informações sobre métodos analíticos aplicados à quantificação de aminas biogênicas em vinhos e cafés solúveis.

Matriz	Aminas Biogênicas	Pré-tratamento	Reagente Derivatizante	LD/LQ	Recuperação	Técnica de Separação	Referência
Vinhos	TIR, PUT, TRIP, CAD, HIST, ESPD, 2-FENIL, ESPM.	LLE modificada	Dns-Cl	LD: 0,001-0,050 mg/L LQ: 0,005–0,167 mg/L	73,0 a 111,6%	HPLC-FD	Liu <i>et al.</i> , 2020
	CAD, ETIL, TIR, PUT, MET, ESPM, ESPD, 2-FENIL, HIST, TRIP.	SPE	-	LD: 9,3-60,5 µg/L LQ: 31,1-202,3 µg/L	86,4 a 109,9%	HPLC-Potenciométrico	Gil <i>et al.</i> , 2020
	ESPM, ESPD, CAD, HIST, 2-FENIL, TRIP, TIR.	Degaseificado, filtração e adição de PVPP	-	LD: 1-2 µg/L LQ: 3–8 µg/L	87 a 113%	CE-MS/MS	Daniel <i>et al.</i> , 2015
	ESPM, ESPD, 2-FENIL, DIET, ETL, HIST, CAD, PUT, TRIET, TEA, TRIP, TIR	Adição de 1,7 diaminoheptano	-	LD: 3,1 a 34,8 ng/mL LQ: 16,5 a 114,8 ng/mL	65 a 117%	CE-MS	Woźniakiewicz <i>et al.</i> , 2018
	MET, DIMT, DIET, PROP, ISOB, BUT, ISOP, HEX, 2-FENIL, PUT, TRIP, TIR, CAD, HIS	DI-SPME	IBCF	LD: 0,009 a 0,859 µg/L LQ: 0,028–1,634 µg/L	65 a 107%	GC-MS	Papageorgiou <i>et al.</i> , 2018b
	2-FENIL, HIS, PUT, CAD, TIR e TRIP	DLLME	IBCF	LD: 1,4 a 4,2 µg/L LQ: 4,6 to 12,6 µg/L	76 a 105%.	GC-MS	Stoj <i>et al.</i> , 2022
	TIR	-	-	LD: 3,6 µmol/L LQ: 10,52 µmol L	110,8%	DPV	Soares <i>et al.</i> , 2019
	HIST	-	-	LD: 0,19 µg/mL LQ: 0,62 µg/mL	-	DPV	Herrera-Chacón, Dinc-Zor e Valle, 2020
	TIR	Diluição	-	LD: 0,6 µmol/L LQ: 1,98 µmol/L	94,4 a 106,0%	SWV	Silva, Franco e Santos, 2021
Café Solúvel	PUT, CAD, HIST, TIR, SER, AGM, ESPD, ESPM, 2-FENIL, TRIP	TCA a 5% (m/v)	OPA (derivatização pós coluna)	Não informado	Não informado	HPLC-FLD	Silveira, Tavares e Glória 2007
	ESPM, ESPD, PUT, HIST, TIR, 2-FENIL, CAD, SER	TCA a 5% (m/v) e SPE	DNS-Cl	LD: 0,02 a 0,05 µg/mL LQ: 0,06 a 0,13 µg/mL	92,3 a 97,5%	HPLC-UV	Restuccia <i>et al.</i> , 2015
				LD: 0,168 ng/ml e LQ: 0,509 ng/mL LD: 0,038 µg/mL e LQ: 0,115 µg/mL	82,6 a 102,9%	SWV	Lourenço <i>et al.</i> , 2022

ETL: etilamina, PROP: propilamina, BUT: butilamina, PUT: putrescina, CAD: cadaverina, 2-FENIL: Feniletilamina, AMIL: amilamina, ESPD: espermidina, ESPM: espermina, HEX: hexilamina, HIST: Histamina, MET: Metilamina. TRIET: trietanolamina, TEA: Trietialmina, DIET: dietilamina, AGM: agmatina, DIMT: dimetilamina, ISOB: isobutilamina, ISOP: isopentilamina

2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

HPLC é o método analítico de referência reconhecido e recomendado para a detecção de ABs em alimentos. Este método baseia-se na diferença do tamanho das ABs e na interação (adsorção, exclusão de tamanho, distribuição e afinidade) entre as ABs e a fase estacionária (Gao *et al.*, 2023). Apresenta vantagens notáveis, como alta sensibilidade e precisão. No entanto, também possui desvantagens, como o elevado custo do equipamento e da operação (que envolve o uso de solventes orgânicos de alto grau de pureza como fase móvel e colunas cromatográficas), além da exigência de etapas prévias de preparo das amostras. (Tiris *et al.*, 2023).

Liu e colaboradores (2020) quantificaram oito ABs em vinhos tintos e brancos, utilizando HPLC-FLD. Usaram Dns-Cl (60°C por 30 min) como reagente derivatizante e método de LLE modificada, simplificando o método LLE convencional. Os valores de LD e LQ variaram de 0,001 a 0,050 mg L⁻¹ e 0,005 – 0,167 mg L⁻¹, respectivamente, e as recuperações ficaram entre 73 e 112%. Os resultados mostraram maiores concentrações de ABs em vinhos tintos, atribuídas à fermentação malolática.

Em 2022, Gil *et al.* desenvolveram um método para quantificar 10 ABs em vinhos por HPLC acoplada a um detector potenciométrico. O preparo das amostras foi realizado por SPE. A separação das ABs ocorreu em coluna C18, com eluição em gradiente. A duração da corrida cromatográfica foi de aproximadamente 25 minutos, com LDs variando de 9,3 a 60,5 µg L⁻¹, LQ entre 31,1 a 202,3 µg L⁻¹ e recuperações entre 86 e 110 %. Vinhos tintos apresentaram maiores teores de ABs, especialmente histamina, tiramina e triptamina. O método HPLC com detecção potenciométrica sem derivatização mostrou-se promissor para a análise de ABs, sendo mais rápido, econômico e eficiente.

Existe apenas dois artigos na literatura sobre a quantificação de ABs em cafés solúveis. Silveira, Tavares e Glória (2007) quantificaram dez ABs em diferentes marcas. As ABs foram extraídas com ácido tricloroacético e analisadas por HPLC com detecção fluorimétrica e derivatização pós-coluna utilizando OPA. O café regular apresentou níveis maiores de serotonina, enquanto os descafeinados e orgânicos apresentaram maiores teores de cadaverina. As concentrações de ABs apresentaram valores entre 2,8 – 27,6 mg L⁻¹ em diferentes lotes e marcas, sugerindo que sua presença pode estar associada à formação durante as etapas de processamento ou à ocorrência nos grãos torrados sob forma conjugada, com liberação subsequente por hidrólise.

Em 2015, Restuccia *et al.* desenvolveram um método para detectar 8 ABs em café moído e bebidas de café (cápsulas de expresso, mocha e solúvel) por HPLC-UV. As amostras de café em pó e infusão foram extraídas com ácido tricloroacético, seguido de extração SPE e derivatização com DNS-Cl. Os cafés solúveis regular e descafeinado apresentaram menores quantidades de ABs quando comparados com os cafés torrados, devido as diferenças nos processos de produção, como extração da cafeína e secagem para café solúvel. Foram obtidos valores de recuperação de 92 a 97 %, com LD de 0,02 a 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e LQ de 0,06 a 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de ABs detectados nas amostras de café variaram de 13,30 a 88,85 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 3,43 a 9,88 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em café em pó e infusão, respectivamente, com a putrescina sendo a mais abundante. Embora as quantidades de ABs no café sejam relativamente baixas, o consumo excessivo ao longo do dia pode causar sintomas severos de intoxicação, dependendo da tolerância individual dos consumidores.

2.4.2 Cromatografia Gasosa (GC)

Embora não seja tão comum quanto ao método HPLC, a GC também tem sido utilizada para a investigação de ABs em produtos alimentícios, especificamente em bebidas fermentadas. Alguns estudos têm aplicado a espectrometria de massas como técnica de detecção. De modo geral, antes das análises por GC, também é necessária a etapa de derivatização das ABs para modificar suas propriedades, aumentando a volatilidade e reduzindo a polaridade (Kannan *et al.*, 2020).

No estudo de Papageorgiou *et al.*, (2018b), foi proposto um método para determinação de 16 ABs em vinhos da Polônia e outros países utilizando GC-MS associado a DI-SPME. Antes da extração, foi realizada a derivatização utilizando IBCF com NaCl (pH 12) para aumentar a volatilidade dos compostos oriundos da derivatização das ABs. Na extração, os autores utilizaram a fibra polidimetilsiloxano/divinilbenzeno e otimizaram as condições do procedimento de DI-SPME para obter melhores resultados. Os valores de LD e LQ estiveram na faixa de 0,009 a 0,859 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,028 a 1,634 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, com taxas de recuperação de 65 a 107%. As análises revelaram concentrações de ABs no intervalo de 7 a 2544 $\mu\text{g L}^{-1}$, sugerindo que as práticas de vinificação são de boa qualidade. Essa abordagem apresentou vantagens quando comparada com os métodos convencionais, com tempo de análise curto (25 min), mínima geração de resíduo e sem uso de solventes orgânicos. No entanto, é importante destacar que a fibra SPME

utilizada no estudo é dispendiosa e requer cuidados quando imersa na amostra de vinho, para evitar danos.

Stoj *et al.* (2022) avaliaram os teores de ABs em vinhos produzidos com uvas das variedades de Zweigelt e Rondo, utilizando diferentes cepas de leveduras e fermentação malolática (induzida ou espontânea). O método empregado envolveu a microextração DLLME, combinada com um processo de derivatização *in situ*, seguida da análise por GC-MS. Os achados evidenciaram que a variedade da uva e o tipo de fermentação impactaram nos teores de ABs. A fermentação malolática espontânea em vinhos Rondo resultou em quantidades mais altas de putrescina, cadaverina e triptamina, enquanto os vinhos Zweigelt apresentaram níveis mais altos de putrescina e cadaverina, com baixos níveis de tiramina. Os LD variaram entre 1,4 e 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, com uma taxa de recuperação variando de 76% a 105%. Os teores de ABs em relação ao tipo de fermentação foi atribuída à presença de diferentes cepas de bactérias lácticas e à composição específica do vinho.

Outros trabalhos utilizando o mesmo reagente derivatizante (cloroformato de isobutil) associado à DLLME (Almeida, Fernandes & Cunha; 2012; Plotka-wasyłka, Simeonov & Namieśnik, 2016) e à SPME (Huang *et al.*, 2016) também apresentaram resultados precisos, reprodutíveis, e com menor tempo de análise do que alguns métodos de HPLC mencionados anteriormente, alcançando LDs equivalentes. No entanto, o cloroformato de isobutil é uma substância altamente volátil, carcinogênica e tóxica, com possibilidade de formação de subprodutos indesejáveis durante a reação, que podem interferir na análise e afetar a precisão e a exatidão dos resultados obtidos.

2.4.3 Eletroforese Capilar (CE)

A eletroforese capilar é considerada uma alternativa viável na determinação de ABs em alimentos. Embora apresentem menor sensibilidade em comparação com as técnicas HPLC e GC, destacam-se na rapidez das análises, menor tempo e consumo dos solventes orgânicos e reagentes (Stojanović & Kos, 2020).

Em 2015, Daniel *et al.* desenvolveram um procedimento analítico utilizando eletroforese capilar com espectrometria de massa tandem (do inglês, *Capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry* – CE-MS/MS) para quantificação simultânea de nove ABs em vinhos e cervejas. A separação das ABs ocorreu por meio do método CE ao revestir a coluna com álcool polivinílico (PVA), utilizando ácido

acético (pH 2,5) como eletrólito. Esse método permitiu a determinação direta das ABs nas amostras após a etapa de limpeza com polivinilpolipirrolidona (PVPP), sem a necessidade de derivatização. A separação das ABs foi alcançada em menos de 10 minutos, com LD entre 1 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e recuperação entre 87% e 113%. Apesar de eficiente, a técnica CE-MS é considerada dispendiosa em termos de custos de aquisição e operação.

Em 2018, Woźniakiewicz e colaboradores desenvolveram e aplicaram dois métodos para determinação de ABs em vinhos. Um deles utiliza a técnica de eletroforese capilar acoplada à MS sem extração, enquanto o outro emprega GC acoplada à MS combinado com a DI-SPME. Para esse último método, foi necessário incluir a etapa de derivatização com IBCF antes da extração. A DI-SPME foi executada utilizando uma fibra SPME de poliacrilato, resultando no tempo de análise de 52 min. Os LDs obtidos foram de 25 ng mL^{-1} e 3,1 ng mL^{-1} para CE-MS e DI-SPME-GC-MS, respectivamente. Os valores de recuperação de ambos os métodos foram semelhantes, variando de 65 a 117% e 64 a 106% para CE-MS e DI-SPME-GCMS, respectivamente. Apesar da vantagem do método GC-MS na detecção de baixas concentrações de ABs, ambos os métodos foram eficazes, sendo o método CE-MS mais aplicável para análises de rotina devido à sua rapidez, economia de tempo e custos.

2.4.4 Voltametria

Os métodos voltamétricos aplicados à quantificação de ABs em alimentos e bebidas são uma alternativa vantajosa aos métodos cromatográficos, pois dispensam o uso de equipamentos sofisticados e, na maioria das vezes, não requerem procedimentos de preparação e derivatização de amostras, o que reduz os custos, geração de resíduos e o tempo de análise (Kumar *et al.*, 2020). Embora apresente alta sensibilidade, precisão e baixo custo, o desempenho dos métodos voltamétricos pode ser melhorado através de modificações na superfície do eletrodo de trabalho (Soares *et al.*, 2019)

Nesse contexto, o sensor eletroquímico surge como um dispositivo promissor, sendo composto por: (i) um receptor, que reconhece os analitos em uma matriz; (ii) um transdutor, transforma a resposta originada da interação analito-receptor em uma resposta elétrica proporcional; e (iii) um componente eletrônico, que filtra, amplifica e opera o sinal elétrico para otimizar a resposta do analito, como mostrado na **Figura 3**.

A principal distinção entre sensor e biossensor é a incorporação de um elemento de reconhecimento biológico na superfície do receptor (Soares *et al.*, 2019). No entanto, uma limitação referente a utilização dos biossensores é a seletividade enzimática limitada para diferentes ABs e a necessidade de altos potenciais operacionais, o que ocasiona o aumento de interferências.

Dentre os exemplos de aplicação de enzimas em biossensores, destacam-se a detecção de histamina e cadaverina em queijos, utilizando as enzimas diamina oxidase e monoamina oxidase, respectivamente (Kaçar *et al.*, 2020); a detecção de espermidina e espermina em sangue, utilizando a enzima poliamina oxidase (Boffi *et al.*, 2015).

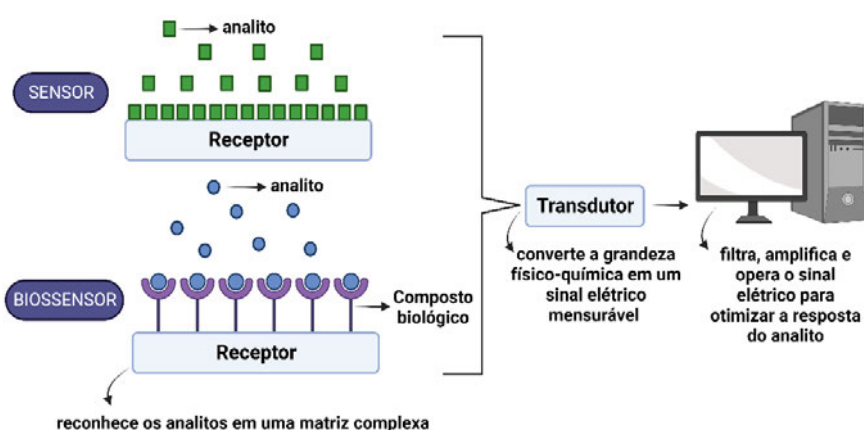


Figura 3 Funcionamento de um sensor eletroquímico. Fonte: Adaptada de Müller *et al.* (2022) (Criada BioRender.com).

Soares *et al.* (2019) elaboraram um biossensor enzimático para detectar a presença de tiramina em amostras de vinho utilizando DPV. O biossensor foi obtido através da eletropolimerização do ácido 4- mercaptofenilacético (MPAA) na superfície do eletrodo de carbono (do inglês, *carbon graphite lead* – GCL) para criar ligações covalentes entre os grupos carboxila e a tirosinase. A ativação dos grupos carboxila foi realizada através da imersão do eletrodo em uma solução contendo n-hidroxissuccinimida, cloridrato de 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) e carbodiimida, por 30 min. Posteriormente, os eletrodos foram imersos em uma solução enzimática e deixados a 4°C por 18 h. O método obteve LD de 3,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com uma taxa de recuperação de 110,8%, dispensando etapas de tratamento da amostra. Entretanto, a preparação do sensor poly(MPAA)/CGL foi demorada, levando mais de 18 horas.

Silva, Franco e Santos (2021) propuseram um método usando DPV e SWV para quantificação de tiramina em vinhos brasileiros usando eletrodo de grafite (do inglês, *pencil carbon graphite electrodes* – PCGE). A partir de estudos por CV, os autores observaram que a tiramina apresentou um sinal de oxidação irreversível com um comportamento adsorptivo e propuseram que o mecanismo da oxidação envolve a transferência de 3 elétrons e 3 prótons. O método apresentou faixa linear de 0,6 - 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com LDs de 0,5 para SWV e 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para DPV. As duas técnicas apresentaram um baixo potencial anódico (+0,64 V) e altas taxas de recuperação de 94,4 a 106,0%.

Neste estudo, foram discutidos os métodos voltamétricos disponíveis na literatura para a quantificação apenas da tiramina em vinhos. Até o presente, não foi encontrado na literatura relatos de método voltamétrico para determinação de espermidina em vinhos, bem como para tiramina e espermidina em cafés solúveis.

2.5 Técnicas Eletroanalíticas

O desenvolvimento e o avanço das técnicas eletroanalíticas permitiram sua aplicação para quantificação e identificação dos analitos em diversas áreas de estudo, baseado na correlação existente entre a quantidade da espécie eletroativa e a propriedade elétrica como corrente, potencial e carga (Mirceski, Skrzypek & Stojanov, 2018). Essas técnicas se destacam por permitir a análise diretamente na amostra com a utilização de pouco/nenhum pré-tratamento da amostra. Comparado com as técnicas cromatográficas, as técnicas eletroanalíticas apresentam vantagens, como rápida execução, tempo de análise e baixo custo, alcançando limites de detecção comparáveis aos das técnicas convencionais.

Entre essas técnicas, destaca-se a voltametria, na qual ocorrem reações envolvendo a transferência de elétrons na interface eletrodo/solução promovida pela aplicação de um potencial controlado entre os eletrodos, gerando respostas mensuráveis do analito, como corrente e potencial. A resposta dessa interação é dependente da concentração da espécie eletroativa. Dessa forma, é possível obter informações tanto quantitativas quanto qualitativas de um analito em estudo a partir das medidas voltamétricas (Kurzweil, 2009).

2.5.1 Voltametria

Em voltametria, a corrente gerada está em função da diferença de potencial elétrico aplicado, gerando os voltamogramas, que são sinais analíticos provenientes do processo de eletrólise das espécies químicas em um sistema padrão de três eletrodos (Megale & Souza, 2023). Nesse sistema, o eletrodo de trabalho induz reações de oxidação e redução das espécies eletroativas, e a corrente flui entre os eletrodos de trabalho e auxiliar, enquanto o eletrodo de referência assegura a estabilidade de potencial durante todo o experimento (Liu *et al.*, 2022).

Nessas condições, as espécies eletroativas possuem propriedades cinéticas e termodinâmicas favoráveis para que ocorra os processos de redução e/ou oxidação, obedecendo à lei de Nernst. Do ponto de vista cinético, os processos de oxirredução que acontecem na interface eletrodo/solução são controlados pelos mecanismos de transporte de massa, migração, convecção e difusão, sendo este último o predominante. Isso ocorre porque a corrente migratória é minimizada pela presença do eletrólito de suporte, responsável por manter a força iônica da solução, enquanto os processos convectivos são eliminados pela ausência de agitação mecânica durante a aplicação do potencial. Assim, a corrente total observada é resultado da soma da corrente faradaica, associada às reações redox do analito na superfície do eletrodo de trabalho, e da corrente capacitiva, relacionada ao carregamento e descarregamento da dupla camada elétrica, que atua como um capacitor acumulando ou liberando cargas durante o processo eletroquímico (Stojek, 2009).

As técnicas voltamétricas predominantes em eletroanálise serão brevemente discutidas, com foco na voltametria cíclica (do inglês, *Cyclic voltammetry* – CV) e SWV, que foram utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

2.5.2 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é fundamental para a caracterização de processos redox, permitindo avaliar de forma qualitativa o comportamento redox dos sistemas eletroquímicos, bem como investigar a termodinâmica e a cinética das reações envolvidas (reversibilidade do composto analisado) e processos adsorptivos (Liu *et al.*, 2022).

Nesta técnica, o sinal de excitação varia como uma onda triangular a uma velocidade conhecida. No sentido direto, o potencial do eletrodo de trabalho segue uma rampa linear até atingir o potencial máximo determinado. Em seguida, no sentido

inverso, a varredura é invertida ao potencial inicial, mantendo a velocidade (Brett & Brett 1996). Esta aplicação do sinal de excitação (forma como o potencial é aplicado) nos fornece como resposta informações sobre as espécies eletroativas que sofrem reações redox na superfície do eletrodo, resultando em potenciais de picos catódicos (redução da espécie) e anódicos (oxidação da espécie).

Assim, se a reação apresenta sinais de redução e oxidação bem definidos, indica um sistema reversível ou quase-reversível, caracterizado por uma separação maior entre os picos e uma cinética de transferência de elétrons moderada. Por outro lado, a presença de apenas um pico catódico ou anódico representa um sistema irreversível (Skoog, Holler & Nieman, 2002; Brett & Brett 1996).

2.5.3 Voltametria de onda quadrada

A SWV surgiu em 1953 por meio dos estudos e experimentos liderados por Barker, com a finalidade de reduzir a corrente capacitiva residual presente nas técnicas polarográficas. Na SWV, o potencial varia na forma de uma rampa em degraus, no qual os pulsos de potencial de amplitude fixa (a) são sobrepostos a cada incremento de potencial constante (ΔE_s), com duração total de $2t_p$ (período) (Figura 4a e 4b). As correntes elétricas são medidas duas vezes a cada ciclo, tanto no sentido direto da varredura quanto no reverso, coincidindo com o início do degrau e metade da etapa da rampa de degraus, respectivamente. Assim, o sinal analítico da SWV é obtido pela diferença da corrente direta e reversa (Figura 4c), originando a corrente resultante, cujo pico aumenta proporcionalmente à concentração do analito. Essa corrente resultante é maior que a corrente direta e reversa (Megale & Souza, 2023).

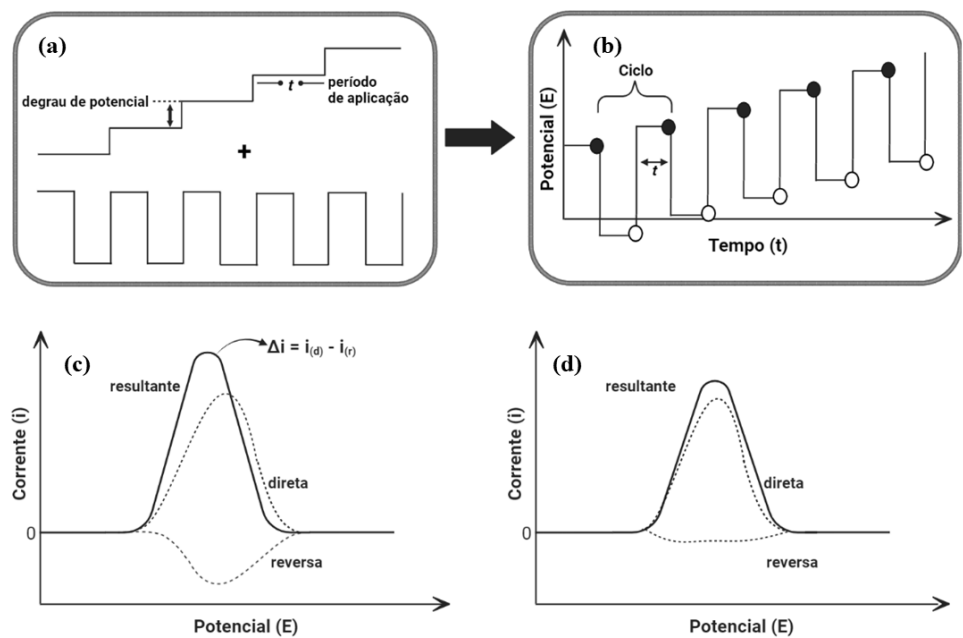


Figura 4 Esquema da técnica SWV Criado com [BioRender.com](#).

Na SWV, o perfil dos picos redox é determinado pela natureza reversível ou irreversível do mecanismo de transferência de elétrons, possibilitando um estudo relacionado ao mecanismo redox. Para processos reversíveis (**Figura 4c**) e irreversíveis (**Figura 4d**), o potencial de pico varia linearmente com o $\log(f)$. A partir das equações matemáticas descrita na **Tabela 4**, desenvolvida por Osteryoung e Lovric, que permite calcular a quantidade de elétrons transferidos durante o processo redox (Lovrić & Komorsky-lovrić, 1988).

Tabela 4 Relação do potencial de pico e $\log f$ para sistemas redox reversível e irreversível

Sistema	Inclinação
Irreversível	$\frac{\partial E_p}{\partial \log (f)} = \frac{-2,3RT}{\alpha nF}$
Reversível	$\frac{\partial E_p}{\partial \log (f)} = \frac{-2,3RT}{2nF}$

Adaptado de [Lovrić & Komorsky-lovrić, 1988](#).

As vantagens da SWV se baseiam na alta sensibilidade, em virtude do ganho da corrente faradaica em relação corrente capacitiva e o uso de altas velocidades para aquisição das medidas, resultando em um aumento expressivo no limite de detecção.

2.6. Eletrodos de trabalho para determinação de ABs

A sensibilidade analítica em técnicas voltamétricas é fortemente influenciada pelas propriedades químicas e físicas do material empregado na construção do eletrodo de trabalho, que influenciam a transferência de elétrons e, por consequência, asseguram a seletividade, estabilidade e desempenho do método (Ribeiro, 2012). Dentre os eletrodos disponíveis no laboratório de pesquisa, foram empregados nesse estudo eletrodos de pasta do carbono quimicamente modificado com ftalocianinas metálicas e o BDD, os quais apresentam propriedades eletrocatalíticas distintas para a determinação de ABs, possibilitando o estudo e a otimização de métodos mais sensíveis e seletivos para diferentes aplicações analíticas.

2.6.1 Eletrodos Quimicamente Modificados

Antes da década de 1970, a eletroanalítica era dominada pelo uso de eletrodos convencionais de Hg, Pt, Au e C, cujas limitações em sensibilidade e versatilidade levaram o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados. O termo *Chemically Modified Electrodes* – CMEs foi criado por Murray para sensores cuja superfície contém substâncias eletroativas que promovem seletividade e aprimoraram o desempenho eletroquímico. A modificação da superfície desses eletrodos serve para promover ou melhorar algumas propriedades eletroquímicas, o que normalmente não é possível ou é dificultado pela falta de eletroatividade nos sensores convencionais. Com isso, por meio da modificação é possível aumentar a área superficial do eletrodo e analisar componentes que não tinham atividade eletroativa nos eletrodos convencionais (Murray, 1980).

Para a elaboração do eletrodo modificado, o agente modificador é escolhido de acordo com as necessidades da aplicação analítica, devendo apresentar propriedades que aprimoram a sensibilidade, estabilidade e seletividade do sensor convencional. Além disso, apresentam as vantagens de fabricação simples e barata, diminuição do sobrepotencial e ampla faixa de potencial e de superfície renovável (Yin, Zhou & Al, 2009). Os mais utilizados são as enzimas, espécies orgânicas e compostos organometálicos (Zen *et al.* 2003). Essas modificações podem ser realizadas por diferentes métodos como:

- Adsorção (imersão do eletrodo em solução do modificador, resultando na adsorção do material sobre sua superfície, formando uma camada ativa estável).
- Filmes poliméricos (revestimento da superfície do eletrodo através de uma solução polimérica ou por eletropolimerização de um monômero);
- Ligação covalente em eletrodos à base de carbono (o agente modificador é imobilizado a partir de ligação covalente com o substrato do eletrodo);
- Imobilização por oclusão (eletrodo preparado a partir da mistura do grafite em pó com o aglutinante);
- Materiais compósitos (mudança da superfície eletródica mediante a associação de componentes heterogêneos em sua estrutura).

A utilização dos CMEs é uma área em expansão, na busca de novos materiais e métodos de modificação para aperfeiçoar os sensores convencionais. Alguns tipos de complexos, como porfirinas, bases de Schiff, hexacianometalatos, aquacobalamina e ftalocianinas são utilizados como mediadores de elétrons na oxidação eletrocatalítica de alguns analitos, como ácidos orgânicos, pesticidas, aminas biogênicas, entre outras (Lourenço *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2018).

2.6.2 Ftalocianinas Metálicas

No início do século 19, as PCs foram sintetizadas, acidentalmente, por Diesbach e Van Der Weid, ao aquecer o orto-dibromobenzeno com cianeto de cobre, formando um subproduto insolúvel e de coloração azul (Demir, Silah & Uslu, 2020). Por isso, o nome ftalocianina (PC) deriva do grego “nafta” e “cianina”, significando óleo de rocha e azul escuro, respectivamente.

As PCs são compostos macrocíclicos planares de coloração azul ou verde, constituídas por quatro anéis de isoindol ligados entre si por átomos de nitrogênio. Essa estrutura confere um sistema π conjugado com 18 elétrons, o que resulta em uma alta densidade eletrônica e propriedades redox características desses compostos. Na forma livre (H_2PC), contém dois átomos de hidrogênio ligados aos dois grupos isoindólicos que podem ser substituídos por átomos metálicos para formar as metaloftalocianinas (MPCs). O átomo metálico fornece um elétron a cada nitrogênio dos grupos isoindólicos, os quais, por sua vez, fornecem um elétron ao metal, formando ligações covalentes (Almeida *et al.*, 2021).

As PCs têm se mostrado materiais atraentes para uso como modificadores químicos em sensores eletroquímicos devido as características eletrocatalíticas, eletroquímicas e ópticas. Além disso, são relativamente baratas e fáceis de modificar (Almeida *et al.*, 2021; Demir, Silah & Uslu, 2020). Entre suas propriedades mais relevantes está a elevada eficiência como materiais eletrocatalisadores, que possibilita a análise de espécies químicas tanto em regiões anódicas quanto catódicas, devido as variações dos estados de oxidação do centro metálico e/ou das reações de oxirredução que acontecem no anel das PCs (Chen *et al.*, 2018).

Os mecanismos de oxidação que acontecem no anel ou no centro metálico das MPCs dependem dos orbitais π (orbitais HOMO e LUMO) e dos níveis de energia de fronteira (orbitais “d” dos metais de transição), respectivamente. Nessas circunstâncias, a oxidação pode ocorrer por remoção dos elétrons do orbital HOMO, enquanto a redução se dá pela adição de elétrons do orbital LUMO, ocasionando transferência de carga do metal central para ligante ou o contrário (Brown & Kucernak, 2001).

Deste modo, muitos estudos eletroquímicos têm sido desenvolvidos utilizando vários tipos de MPCs, pela acomodação do metal de transição (como Mn(II), Co(II), Fe(II), Zn(II), Cu(II) e Ni(II)) na cavidade central da PC que aumentam significativamente a intensidade de pico e permite que os analitos sejam detectados em potenciais mais baixos devido as propriedades cinéticas. Os principais materiais para elaboração desses eletrodos são à base de carbono, como: o eletrodo GCE, CPE, MWCNTPE e de grafite que são usados efetivamente na determinação de inúmeros analitos (Demir, Silah & Uslu, 2020).

A utilização de MPCs para modificação de eletrodos de pasta de carbono tem se mostrado eficiente na determinação de ácidos orgânico (Silva, Lourenço & Araújo, 2018), pesticidas (Severo *et al.*, 2024), aminas biogênicas (Lourenço *et al.*, 2022) e outros. Nos referidos estudos, foi utilizado o grafite em pó para fabricação do CPE, por possuir excelente condutividade, baixo custo, alto grau de pureza e com uma ampla faixa de potencial. Neste contexto, Lourenço *et al.* (2022) propuseram um CPE modificado com ftalocianina de níquel para determinação de triptamina e histamina em vinhos. Entretanto, não há registros na literatura sobre o emprego de CPE modificado com ftalocianina de zinco (ZnPC) para determinação voltamétrica simultânea de tiramina e espermidina em vinhos e cafés solúveis.

A ZnPC possui propriedades ópticas, eletroquímicas e elétricas que depende do caráter dos ligantes (doadores ou receptores) e suas posições (periféricas ou não periféricas) na estrutura molecular do anel da Pc. Uma característica importante da ZnPC, é que o Zn(II) não apresenta processos redox pela sua inatividade, pois seu estado de oxidação é +2 e da PC -2 formando um composto neutro ZnPC. Uma vez que seu subnível 3d é totalmente preenchido e profundo o suficiente para formar orbitais moleculares bastantes puros, a ZnPC e MgPC possuem estruturas eletrônicas bastantes semelhantes, com uma grande lacuna entre os orbitais HOMO e LUMO. Contudo, os processos redox estão relacionados com o anel macrocíclico ([Guaus & Torrent-burgués, 2022](#)).

2.6.3 Eletrodo de diamante dopado com boro

O diamante é um semicondutor de banda larga, o que limita sua aplicação direta em eletroquímica e, por isso, para tornar possível o seu uso como eletrodo de trabalho, é necessário a modificação de suas propriedades elétricas por meio da dopagem com boro. Esse elemento substitui o carbono na rede cristalina, apresentando baixa energia de ativação, o que possibilita altos níveis de dopagem (até 10000 ppm) e torna o diamante um condutor adequado para diversas aplicações ([Macpherson, 2015](#)).

Na literatura, o eletrodo BDD é amplamente utilizado em diversas aplicações eletroquímicas e eletroanalíticas para análises de moléculas orgânicas e inorgânicas ([Cornejo *et al.*, 2020](#)). O crescente interesse por esse material está relacionado as suas excelentes propriedades, como a baixa corrente capacitiva, ampla faixa de potencial (-3 a +3 V), além de sua resistência à incrustação e corrosão ([Macpherson, 2015](#)). Além das características mencionadas, o uso do DBB em eletroanalítica está relacionado à concentração da dopagem do boro (variando de 10 – 10000 ppm), às orientações cristalinas e, principalmente, às terminações superficiais em hidrogênio, que conferem ao eletrodo um caráter hidrofóbico e alta condutividade, e oxigênio que apresentam caráter hidrofílico, baixa condutividade e alta capacidade de aceitar elétrons ([Einaga, 2022](#); [Ribeiro, 2012](#)).

Na abordagem experimental, é possível modificar essas terminações de hidrogênio e oxigênio através de polarizações catódicas e anódicas em ácido forte, respectivamente. Para determinados analitos, o tratamento catódico tem mostrado melhoria significativa na atividade eletroquímica do BDD, pois favorece maior

velocidade de transferência de carga (Mijajlović *et al.*, 2024; Salazar-Banda *et al.*, 2010)

2.7. Técnicas Quimiométricas

As técnicas quimiométricas usam abordagens matemáticas e estatísticas para extrair informações relevantes a partir de dados instrumentais, permitindo a análise de conjuntos de dados complexos (Liu *et al.*, 2022). Originada da necessidade de lidar com a crescente complexidade dos dados gerados por instrumentos analíticos modernos, a quimiometria tem se consolidado como uma ferramenta importante na análise de diversas áreas, como alimentícia, farmacêutica e ambiental, para fins qualitativos e quantitativos (Ferreira, 2016; Nóbrega, 2021).

Dentro das técnicas quimiométricas, a calibração multivariada de primeira ordem tem sido utilizada para determinação simultânea de espécies químicas em sistemas complexos, considerando que os interferentes estejam adequadamente modelados no conjunto de calibração (Sena, Trevisan & Poppi, 2005). Portanto, para garantir um modelo de calibração robusto, é fundamental utilizar um conjunto amplo e representativo de amostras, ou seja, um número significativo de amostras que abranja a maior variabilidade possível das espécies presentes na amostra a ser analisada (Silva, 2019).

Por outro lado, a calibração de segunda ordem emprega dados multidimensionais, formando um arranjo tridimensional (três vias). Essa abordagem permite a determinação de múltiplos analitos mesmo na presença de constituintes desconhecidos nas amostras, superando as limitações inerentes aos modelos de primeira ordem. Como principal vantagem, destaca-se a redução da necessidade de conjuntos de calibração extensos e altamente diversificados, permitindo apenas o uso de soluções padrão do(s) analito(s), diminuindo significativamente o esforço experimental na fase de construção do modelo analítico (Escandar & Olivieri, 2019).

2.8. Método de calibração *multiway*

De acordo com a literatura, nos últimos anos, os métodos de calibração *multiway* têm alcançado destaque como uma alternativa promissora na área de alimentos (Brasca, Goicoechea & Culzoni, 2018). Esses métodos têm desempenhado um grande impacto no âmbito do controle de qualidade e na determinação de contaminantes emergentes e adulterantes em alimentos, permitindo a quantificação

dos analitos de interesse em amostras de composição complexa, mesmo na presença de componentes não modelados (interferentes) (Chiappini *et al.*, 2024).

Na voltametria, a aquisição dos dados eletroanalíticos baseia-se na obtenção de um vetor de informação, que é a intensidade de corrente em função de uma faixa de potencial aplicado (Jalavand, Goicoechea & Rutlede, 2017). Esses dados bidimensionais, são classificados como de primeira ordem, embora confiáveis, apresentam limitações significativas quando aplicados à determinação simultânea de espécies eletroativas com potenciais sobrepostos ou em matrizes de composição complexa. Por outro lado, na calibração de segunda ordem (*multiway*), cada amostra analisada gera um tensor tridimensional por amostra, obtido por meio da variação de um parâmetro experimental adicional, como pH, incremento de potencial, amplitude, frequência etc., ampliando assim a quantidade de informações que possam ser extraídas da análise eletroanalítica (Silva, 2019).

A modelagem desses dados multidimensionais permite explorar a vantagem de segunda ordem, proporcionando maior sensibilidade, seletividade e precisão independentemente da presença de espécies químicas não modeladas (Brasca, Goicoechea & Culzoni, 2018). A calibração *multiway* apresenta vantagem para a determinação simultânea de ABs, como putrescina, cadaverina e histamina, cujos potenciais de oxidação são muito próximos, ocasionando sobreposição significativa de picos voltamétricos, conforme observado por Koppang *et al.* (1999) e Henao-Escobar *et al.* (2015).

Nesse estudo, os métodos U-PLS/RBL e MCR-ALS foram empregados no tratamento dos dados voltamétricos porque esses sinais apresentam características de quebra de trilinearidade. Em dados voltamétricos, a não-trilinearidade é frequentemente provocada por deslocamentos de potencial, que geram mudanças significativas na posição, largura ou simetria dos picos. Nesses casos, as diferenças entre os sinais das amostras deixam de ser restritas à intensidade da corrente, passando também a envolver alterações do pico voltamétrico do analito (Jalavand, Goicoechea & Rutlede, 2017).

2.9. Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS)

O MCR-ALS é um procedimento de decomposição de matrizes empregado para recuperar os perfis e as contribuições de espécies quimicamente puras a partir

de dados multivariados. Nesse caso, constrói-se uma matriz aumentada a partir do tensor de três vias, organizando as matrizes individuais ao longo do modo associado à não trilinearidade (Brasca, Goicoechea & Culzoni, 2018). Por exemplo, em um conjunto de dados estruturado nas dimensões amplitude × potencial, gera-se uma matriz aumentada por colunas quando a quebra da trilinearidade ocorre no modo amplitude, como mostrado na **Figura 5**, caracterizada por variações na intensidade de corrente e desvios nos potenciais de pico entre as diferentes amostras.

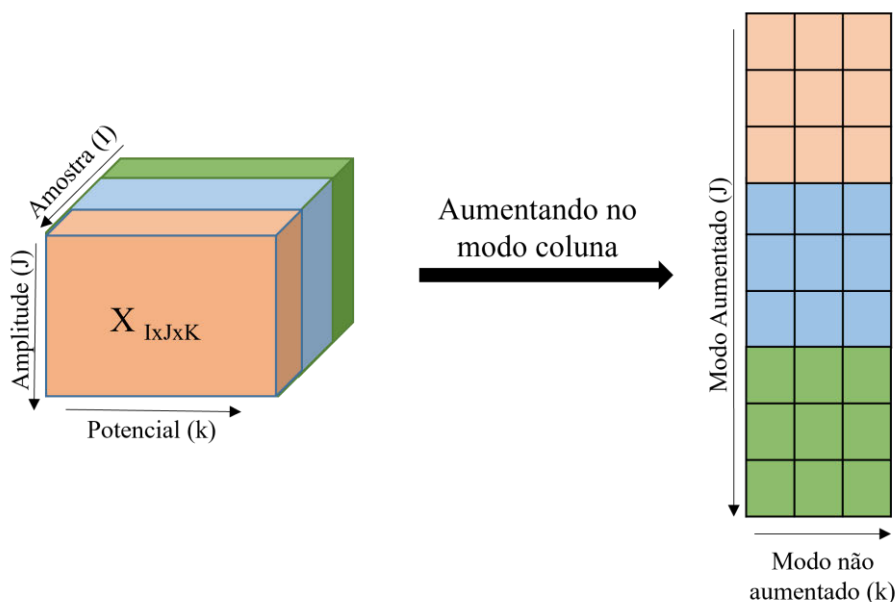


Figura 5. Representação do modelo MCR-ALS. Criado com [BioRender.com](https://www.biorender.com/).

A decomposição bilinear da matriz aumentada **D** é realizada de acordo com a **Equação 1**, no qual o algoritmo MCR-ALS gera duas matrizes distintas que representam os perfis de concentração (**C**) e os perfis voltamétricos dos analitos presentes (**S**), além de uma matriz de resíduos **E**, que contém variações de dados não explicadas pelos modos.

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 1}$$

A decomposição da matriz **D** é obtida utilizando o algoritmo ALS, que realiza a minimização iterativa da norma residual **E**. Nesse processo, as matrizes **C** e **S** são estimadas iterativamente de maneira alternada, enquanto uma é mantida fixa, a outra é recalculada, até que o critério de convergência seja satisfeito. Durante as interações, aplicam-se restrições que asseguram a interpretabilidade física da solução (recuperação de perfis). As restrições mais comuns no MCR-ALS incluem a não

negatividade dos perfis de concentração, a unimodalidade e correspondência entre espécies (Palomino-Vasco, 2021).

2.10. Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados com Bilinearização Residual (U-PLS/RBL)

O método U-PLS representa uma extensão do algoritmo PLS convencional, adaptado para a análise de dados multiway após seu desdobramento em uma matriz bidimensional. A **Figura 6** esquematiza o procedimento de desdobramento de dados voltamétricos, em que o conjunto de amostras é organizado em um tensor tridimensional. O desdobramento (*unfolding*) transforma esse tensor em uma matriz bidimensional $\mathbf{X}$ ($I \times JK$), em que cada linha contém uma amostra e as colunas correspondem à sequência concatenada de voltamogramas obtidos em diferentes amplitudes, algoritmo a aplicação do algoritmo U-PLS.

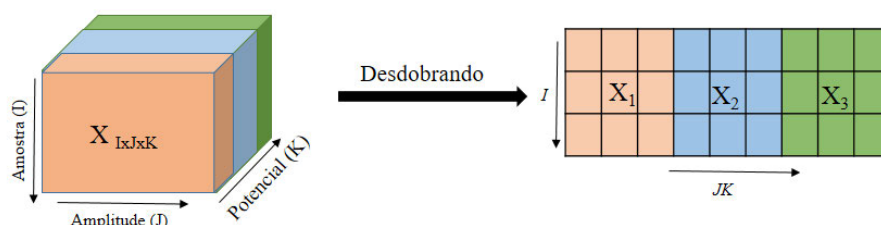


Figura 6. Representação do modelo U-PLS. Criado com [BioRender.com](https://www.biorender.com/).

Matematicamente, o U-PLS decompõe a matriz de dados $\mathbf{X}$ (**Equação 2**) que representa um modelo PLS, em que $\mathbf{T}$ constitui a matriz de escores, $\mathbf{P}$ representa a matriz de pesos e $\mathbf{E}$ corresponde à matriz de resíduos.

$$\mathbf{X}_u = \mathbf{P}\mathbf{T}^t + \mathbf{E}_u \quad \text{Eq. 2}$$

Após o desdobramento do tensor, o número ideal de variáveis latentes (VLs) é determinado por *leave-one-out* (validação cruzada), seguido pelo cálculo dos parâmetros do modelo U-PLS. A partir do modelo calibrado, a concentração ($\mathbf{y}_u$) de uma amostra ($\mathbf{X}_u$) é determinada utilizando a **Equação 3**.

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad \text{Eq. 3}$$

Os escores $\mathbf{t}_u$, obtidos a partir da matriz $\mathbf{X}_u$, permitem a análise da amostra. No entanto, a presença de constituintes não modelados compromete a predição da concentração y_u . Para contornar essa limitação, aplica-se a etapa de Bilinearização Residual (RBL), que modela as interferências através da decomposição de valores singulares (SVD) da matriz de resíduos (Brasca, Goicoechea & Culzoni, 2018). Durante o procedimento, a matriz $\mathbf{P}$ (pesos) mantêm-se constante, enquanto os escores $\mathbf{t}_u$ são ajustados iterativamente pelo método de Gauss-Newton (Equação 4) até que o resíduo $\mathbf{s}_u$ sejam minimizados, garantindo a precisão quantitativa mesmo na presença de interferentes inesperados (Zhu et al., 2020).

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P}\mathbf{t}_u + \text{vec}[\mathbf{B}_{\text{int}}\mathbf{G}_{\text{int}}(\mathbf{C}_{\text{int}})\mathbf{T}] + \mathbf{S}_u \quad \text{Eq. 4}$$

**Determinação simultânea de espermidina e
tiramina em bebidas utilizando o eletrodo de
pasta de carbono modificado com
ftalocianina de zinco**

Capítulo 3

3. Objetivos Específicos

- ❖ Estudar a resposta eletroquímica da tiramina e espermidina em CPE e CPE modificado com diferentes ftalocianinas metálicas;
- ❖ Otimizar os parâmetros experimentais da SWV para a determinação de tiramina e espermidina no sistema CPE modificado com ftalocianinas;
- ❖ Propor um mecanismo de oxidação para a espermidina e tiramina no sensor CPE-ZnPC;
- ❖ Avaliar o desempenho eletroanalítico do CPE-ZnPC na determinação simultânea de tiramina e espermidina em amostras de cafés solúveis e vinhos;
- ❖ Avaliar a concordância entre os métodos SWV/CPE-ZnPC e HPLC, empregando o teste t pareado.

4. Experimental

4.1.1 Reagentes

Todos os padrões utilizados nesse trabalho foram adquiridos na Sigma Aldrich. As soluções estoque de tiramina e espermidina, bem como as soluções eletrolíticas, foram preparadas com água deionizada, obtida em sistema Milli-Q (Millipore) e armazenadas sob refrigeração à 4°C. O CPE-ZnPC foi preparado utilizando pó de grafite (pureza $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, EUA), ZnPC (pureza $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich, EUA) e óleo mineral (pureza $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, EUA).

4.1.2 Instrumentação e software

Um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab (modelo PGSTAT 302 N) foi utilizado para as medidas em CV e SWV através do software NOVA 2.3.1. Este instrumento foi conectado a uma cela eletroquímica com um eletrodo de referência (Ag/AgCl em 3,0 mol L⁻¹ KCl), um contra eletrodo (fio de platina) e um eletrodo de trabalho (CPE ou CPE-ZnPC).

Os voltamogramas obtidos na SWV foram suavizados com o método *Savitsky-Golay* (*Smooth Level 2*) para reduzir/eliminar o ruído instrumental. Em seguida, foi empregado a correção de linha de base (*moving average*) usando o software NOVA.

A caracterização morfológica dos sensores foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (do inglês, *Scanning ElectronMicroscope* - MEV) utilizando um equipamento ZEISS LEO-1430. A análise elementar foi conduzida por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (do inglês, Energy dispersive X-ray spectrometer - EDX) empregando um equipamento TESCAN Essence EDX (Dortmund, Alemanha).

4.1.3 Preparação de eletrodos de trabalho - Pasta de carbono não modificado e modificado

O eletrodo não modificado (CPE) e modificado com ftalocianinas metálicas (ZnPC, CoPC, CuPC e NiPC) foram preparados conforme relatado por Severo *et al.* (2023). Para a preparação de CPE, foi pesada a massa correspondente a 60% m/m de pó de grafite e 40% m/m de óleo mineral, e misturados até ficarem completamente homogeneizados. Para essa mistura, foi utilizado um pó de grafite de elevado grau de pureza e baixa capacidade de adsorção de oxigênio juntamente com o óleo mineral,

que é um aglutinante inerte, eletroinativo e imiscível, usado pra preencher os espaços do grafite.

Para a obtenção do sensor CPE modificado, diferentes ftalocianinas metálicas foram empregadas como modificadores. As misturas foram preparadas de modo que a soma das massas de pó de grafite e ftalocianina metálica correspondesse a 60% (m/m), contendo X% (m/m) de ftalocianina metálica ($X = 1, 3, 5$ ou 9% m/m) e a fração complementar de pó de grafite, sendo posteriormente agitadas em acetona até completa dispersão. Após a evaporação total do solvente, o óleo mineral foi incorporado à mistura e homogeneizado até formar uma pasta uniforme. Por fim, as pastas CPE e CPE-ZnPC foram inseridas em um tubo de vidro (3 mm de diâmetro interno) com fio de cobre para contato elétrico, como mostrado na **Figura 7**. A preparação dos eletrodos de trabalho (CPE e CPE-ZnPC) foi realizada em menos de 30 min.

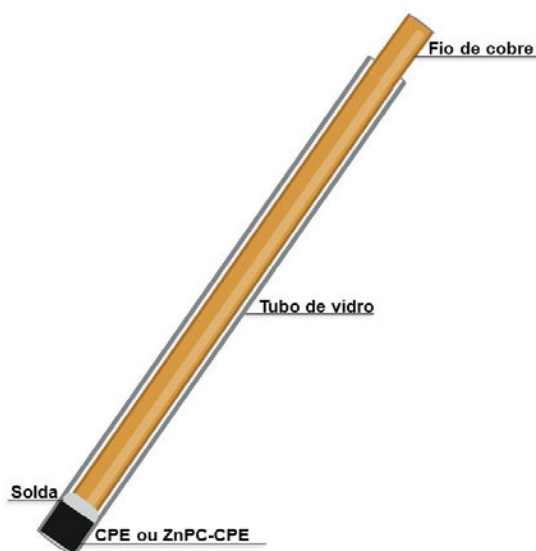


Figura 7 Representação ilustrativa do sensor eletroquímico proposto (CPE e CPE-ZnPC). Elaborado no [BioRender.com](https://www.biorender.com)

4.1.4 Tratamento eletroquímico dos eletrodos de trabalho

Antes de cada medida voltamétrica, as superfícies dos eletrodos CPE e CPE-ZnPC foram polidas em papel manteiga com movimentos circulares e lavadas com água deionizada para remover quaisquer impurezas. Posteriormente, esses eletrodos foram submetidos ao tratamento eletroquímico, conforme o procedimento descrito por Lourenço *et al.* (2018), realizando 10 varreduras sucessivas na SWV no eletrólito de

suporte, a fim de obter uma linha de base plana com uma resposta eletroquímica estável e reprodutível.

4.1.5 Determinação da área eletroativa do eletrodo do CPE e ZnPC

As áreas da superfície eletroativa dos eletrodos CPE e CPE-ZnPC foram determinadas por medidas de CV empregando o sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ como sonda eletroquímica. Os experimentos foram conduzidos em solução contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em solução KCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, variando a velocidade de varredura entre 10 a 200 mV s^{-1} . Para o cálculo da área eletroativa, empregou-se a equação de Randles–Sevcik, a partir do coeficiente angular obtido da relação entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura.

4.1.6 Estudo da influência do pH no CPE-ZnPC

A influência do pH na resposta eletroquímica da tiramina e da espermidina no sensor CPE-ZnPC foi investigada por meio de análises voltamétricas realizadas em diferentes soluções tampão na faixa de pH de 3,4 a 10,5. Para isso, foram analisadas soluções contendo $6,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e $66,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina, utilizando a técnica SWV. Os eletrólitos de suporte empregados foram: tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,4 e 4,3), tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0; 7,1 e 8,2) e tampão borato $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,2 e 10,5).

4.1.7 Estudo da velocidade de varredura

Para investigar a reversibilidade do processo eletroquímico e o de transporte de massa da tiramina e espermidina no eletrodo CPE-ZnPC, realizou-se um estudo na CV. Foram registrados voltamogramas de uma solução de $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e $33 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina em tampão borato (pH 9,2), aplicando-se velocidades de varredura entre 10 e 150 mV s^{-1} e com incremento de potencial de 1 mV, no intervalo de 0,0 a +1,3 V.

4.1.8 Otimização dos parâmetros SWV

A otimização dos parâmetros SWV, descritos na **Tabela 5**, foi realizada na presença de tiramina ($3,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e espermidina ($6,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão borato

(pH 9,2), a fim de obter maior sensibilidade e a seletividade do método proposto. As condições otimizadas foram, posteriormente, empregadas na construção de curvas analíticas para a quantificação simultânea de tiramina e espermidina em vinhos e cafés solúveis.

Tabela 5 Faixa dos parâmetros SWV do estudo de otimização SWV

Parâmetros	SWV
Incremento de potencial (ΔE s)	1 a 10 mV
Amplitude de pulso (a)	10 a 70 mV
Frequência (f)	10 a 100 Hz

4.1.9 Efeito de memória

Para investigar a existência do efeito de memória (do inglês, *carry-over*) dos analitos na superfície do CPE-ZnPC, as medidas voltamétricas foram registradas em triplicata na SWV, sob condições otimizadas, usando as concentrações de tiramina (0,48 e 2,77 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e espermidina (0,77 e 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão borato (pH 9,2). Entre cada varredura, a superfície do CPE-ZnPC foi lavada apenas com água deionizada.

4.1.10 Curva Analítica

As curvas de calibração foram obtidas a partir da adição de alíquotas crescentes de soluções de tiramina (30,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e espermidina (48,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em 5 mL de tampão borato (pH 9,2), no qual as concentrações variaram de 0,30 a 5,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para tiramina e 0,48 a 8,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para espermidina. As análises foram realizadas por SWV em triplicata, utilizando os parâmetros experimentais otimizados.

4.1.11 Aquisição e análise das amostras de vinhos e cafés solúveis por SWV

Sete amostras de vinho e seis amostras de café solúveis (**Tabela 6**) foram adquiridas em lojas de varejo de João Pessoa, Paraíba, Brasil, e analisadas sem pré-tratamento pelo método proposto. Isto é, alíquotas de 15 ou 60 μL de vinho (dependendo do tipo de vinho) e 100 μL de café solúvel foram inseridas diretamente em uma cela eletroquímica com 5 mL de tampão borato (pH = 9,2). As medidas de SWV foram sempre realizadas em triplicata.

Tabela 6 Identificação das amostras de vinhos e cafés solúveis

Vinhos	Tipo de uva	Safra	Origem
Tintos	Isabel, Concord e Seibel	-	Brasil
	Isabel e Bordeaux	2020	Brasil
	Cabernet sauvignon	2021	Chile
Branços	Trebbiano, Flora, Riesling e Semillon	2021	Brasil
	Mesa	2019	Brasil
	Isabel e Bordeaux	2020	Brasil
	Chardonnay	2021	Argentina
Classe		Preparo	Origem
Cafés solúveis	Tradicional	Aglomeração	Brasil
	Descafeinado	Aglomeração	Brasil
	Tradicional	Aglomeração	Brasil
	Descafeinado	Aglomeração	Brasil
	Extra Forte	Aglomeração	Brasil
	Tradicional	Liofilização	Brasil

4.2 Análise das amostras de vinho pelo método de referência (HPLC)

A tiramina e espermidina foram determinadas em amostras de vinho conforme o método de Pineda *et al.* (2012). As amostras foram clarificadas com 0,5 g de PVPP em 10 mL de vinho, sob agitação a 500 rpm por 15 minutos, seguidas de filtração em papel nº 4. Em seguida, 100 µL do filtrado foram derivatizados com Dns-Cl na presença de tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 10,0) e acetona, sendo a mistura incubada a 60 °C por 60 minutos. O produto derivatizado foi filtrado em filtro PVDF (0,45 µm) antes da análise.

As análises cromatográficas foram realizadas em sistema Ultimate 3000 (Dionex, Thermo Fisher Scientific), equipado com coluna C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), mantida a 40 °C, e detector por arranjo de diodos (DAD). A separação ocorreu com fase móvel água/acetonitrila, em sistema binário, a 0,6 mL min⁻¹

4.3 Validação Analítica do método proposto

4.3.1 Linearidade

Após os parâmetros SWV otimizados, a curva de calibração foi construída, em triplicata, registrando os sinais analíticos (correntes) de seis concentrações diferentes de tiramina e espermidina. A partir da relação direta entre a corrente elétrica e a concentração do analito. A capacidade de predição dos modelos de calibração foi examinada por meio da Análise de Variância (do inglês, *Analysis of variance* – ANOVA), com o objetivo de verificar a confiabilidade estatística do modelo de regressão e assegurar que as variações observadas fossem adequadamente explicadas pelo modelo. Os parâmetros de variação foram obtidos a partir das equações apresentadas na **Tabela 7**, que possibilitam comparar a variância explicada pelo modelo com a variância residual (Neto, Scarmínio & Bruns, 2007; Dantas *et al.*, 2021).

Tabela 7 Expressões matemáticas da ANOVA para o modelo de regressão linear

Fonte	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_{ei}) - y_m]^2$	$p-1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg} / (p-1)$
Resíduo	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n-p$	$MQ_r = SQ_r / (n-p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_{ei}) - y_{im}]^2$	$m-p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m-p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$n-m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n-m)$

onde: i = nível da variável x ; j = repetição de cada nível x ; p = número de parâmetros do polinômio do modelo de calibração; n = número de medidas; m = número de níveis da variável x .

A robustez do modelo de calibração pode ser avaliada por meio das médias quadráticas, que indicam os graus de liberdade associados a cada termo incluído na equação. A análise de resíduos permite verificar se os erros de predição se distribuem aleatoriamente em torno de zero, indicando a ausência de variabilidade sistemática e confirmando que os erros observados são totalmente aleatórios. Por outro lado, a presença de padrões ou estruturas nos resíduos indica erros sistemáticos,

evidenciando a importância de avaliar a robustez para assegurar a confiabilidade e a aplicabilidade do modelo em novas análises (Pimentel & Neto, 1996).

No teste de significância da regressão, avalia-se se a relação entre as variáveis do modelo é estatisticamente significativa, sendo calculado a partir da relação entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo. O modelo é considerado significativo quando o valor de F_{cal} excede o ponto crítico da distribuição F_{tab} ao nível de 95% de confiança, de acordo com os graus de liberdade correspondentes. Já no teste de falta de ajuste, a razão entre a média quadrática de falta de ajuste (MQ_{faj}) e a média quadrática do erro puro (MQ_{ep}) deve ser inferior ao valor crítico da distribuição F_{tab} para o mesmo nível de confiança. Esses testes asseguram que o modelo apresenta bom ajuste e capacidade preditiva adequada, confirmando sua validade estatística e aplicabilidade em análises químicas (Dantas *et al.*, 2021).

4.3.2 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD corresponde à concentração mínima do analito capaz de produzir um sinal três vezes superior ao ruído instrumental, permitindo sua identificação, ainda que sem precisão quantitativa. Por outro lado, o LQ equivale à menor concentração de um analito que pode ser determinada com confiabilidade, apresentando níveis aceitáveis de precisão, exatidão e reprodutibilidade, atendendo aos critérios de desempenho estabelecidos para o método analítico (IUPAC, 1978). Portanto, a sensibilidade do método desenvolvido foi estimada utilizando as equações do LD (Eq. 5) e LQ (Eq. 6).

$$LD = \frac{3S_B}{\beta} \quad \text{Eq. 5}$$

$$LQ = \frac{10S_B}{\beta} \quad \text{Eq. 6}$$

β é a inclinação da curva analítica e S_B é o desvio padrão das dez medidas do branco (eletrólito de suporte = tampão borato, pH 9,2).

4.3.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da realização de testes de recuperação utilizando um procedimento de adição de padrão com concentrações conhecidas de

tiramina e espermidina. Esse procedimento envolveu a adição direta de alíquotas de 15 ou 60 µL de vinho (dependendo do tipo de vinho) e 100 µL de café solúvel em uma cela eletroquímica contendo 5 mL de tampão borato (pH = 9,2), com quatro níveis de concentração de tiramina (0,94; 1,39; 1,83 e 2,25 µmol L⁻¹) para vinhos (1,39; 1,83; 2,25 e 2,66 µmol L⁻¹) para cafés solúveis e espermidina (1,51; 2,23; 2,93 e 3,60 µmol L⁻¹) para vinhos e (2,23; 2,93; 3,60 e 4,26 µmol L⁻¹) para cafés solúveis. A exatidão representa o grau de concordância entre a concentração real do analito presente na amostra e a quantidade do analito estimada pelo método proposto (Eq. 7) (Anvisa, 2017).

$$REC (\%) = \frac{(C_{amostra} - C_{adicionada})}{C_{teóricaadicionada}} \quad \text{Eq. 7}$$

A exatidão também foi verificada por meio da comparação entre as concentrações de tiramina e espermidina determinadas em amostras de vinho pelo método proposto e aquelas obtidas pelo método cromatográfico de referência descrito na Seção 4.2, empregando o teste *t* para avaliar a concordância entre os resultados.

4.3.4 Especificidade

A especificidade do método proposto consistiu em analisar interferentes que podem estar presentes no vinho, como: ácido tartárico e cítrico, sacarose e etanol, assim como no café solúvel: trigonelina e cafeína, e algumas ABs encontradas nessas amostras ou formadas durante o processo de produção do vinho e fabricação do café solúvel, como: cadaverina, 2-feniletilamina, putrescina, histamina. Desse modo, o objetivo desse estudo foi investigar se essas espécies apresentam resposta eletroquímica no CPE-ZnPC, utilizando os parâmetros otimizados da SWV, para a determinação simultânea de tiramina e espermidina.

5. Resultados e discussão

5.1 Comportamento eletroquímico de eletrodos

Neste trabalho, a voltametria SW foi empregada em razão do maior ganho de sensibilidade quando comparada à DPV, conforme evidenciado nos voltamogramas apresentados no [Anexo I](#). O estudo eletroquímico inicial de tiramina e espermidina ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato (pH 6,2) permitiu comparar o desempenho do sensor CPE modificado com ftalocianinas metálicas (Co, Cu, Ni e Zn). Conforme ilustrado na [Figura 8](#), o eletrodo contendo ZnPC apresentou efeito eletrocatalítico significativo para ambos os analitos, favorecendo a detecção com elevada sensibilidade. Assim, o sensor CPE–ZnPC foi selecionado para os estudos subsequentes.

Esse resultado corrobora com o estudo de Turan & Koca (2025), que demonstrou que as ftalocianinas metálicas, especialmente ZnPC, favorecem a adsorção e a oxidação de analitos contendo grupos fenólicos ou amínicos por meio de interações π – π e ligações de hidrogênio.

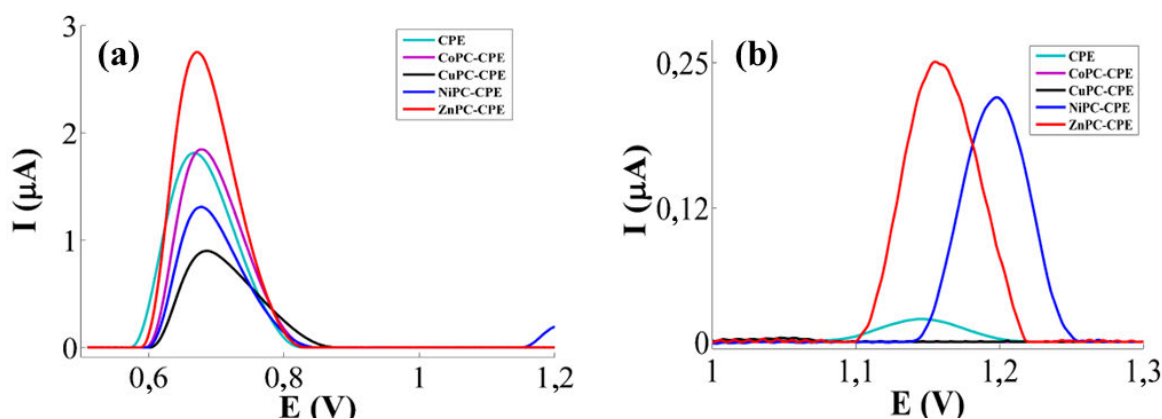


Figura 8 Medidas SWV em tampão fosfato (pH=6,2) com **(a)** $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e **(b)** $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina usando o sensor CPE com ftalocianinas metálicas (Co, Cu, Ni e Zn). Os parâmetros SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$.

Considerando a influência direta da quantidade de modificador (ZnPC) sobre a resposta eletroanalítica do sensor, diferentes porcentagens (1%, 3%, 5% e 9%) do modificador (ZnPC) no CPE foram investigadas para obter a maior sensibilidade possível no método a ser desenvolvido. A [Figura 9](#) mostra os sinais SWV de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ tiramina (0,5 V) e $3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ espermidina (0,86 V) em tampão borato, pH 9,2.

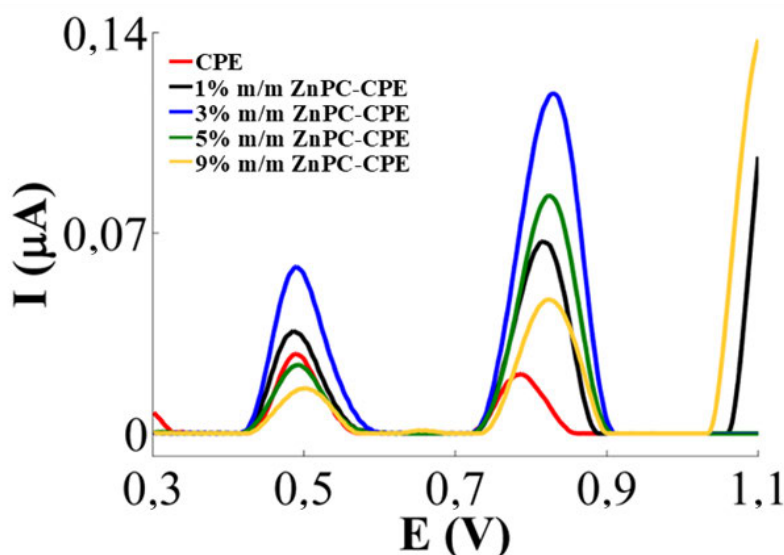


Figura 9 Estudo do comportamento eletroquímico. Voltamogramas SW em tampão boráx (pH=9,2) com $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e $3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina usando o sensor CPE e CPE-ZnPC com 1 a 9% m/m de ZnPC. Os parâmetros SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_w = +0,3 \text{ a } +1,1 \text{ V}$.

A **Figura 9** mostra que a adição de ZnPC nas proporções de 1% e 3% (m/m) ao CPE resultou em um aumento da corrente faradaica dos analitos. Esse efeito é atribuído à ação catalítica do mediador redox ZnPC, que favoreceu a eletro-oxidação da tiramina e da espermidina, intensificando a resposta eletroquímica. No entanto, porcentagens maiores, de 5% e 9% de ZnPC, promoveram a diminuição dessa corrente, possivelmente devido ao aumento da resistência interna do eletrodo, comprometendo seu desempenho eletroanalítico. Contudo, essa associação é apresentada apenas como uma hipótese, uma vez que não foram realizadas análises por espectroscopia de impedância eletroquímica para sua confirmação, embora tal comportamento esteja de acordo com resultados reportados na literatura ([Severo et al., 2023](#); [Lourenço et al., 2022](#)). Portanto, o CPE-ZnPC com 3% m/m de ZnPC foi escolhido como sensor para o método proposto devido à sua maior sensibilidade analítica para a determinação simultânea desses analitos.

Vale ressaltar ainda que os potenciais de pico da tiramina e espermidina estão bem separados (a uma distância de 0,3V), sendo uma excelente condição para determinação simultânea desses compostos.

5.2 Análises morfológicas de CPE e CPE-ZnPC

As micrografias das superfícies dos eletrodos CPE e CPE-ZnPC foram analisadas por MEV (**Figura 10**) revelando texturas distintas, o que confirma que a deposição de ZnPC no CPE foi bem-sucedida. A presença de aglomerados brancos e turvos na micrografia do CPE-ZnPC (**Fig. 10b**) corresponde à formação de partículas de ZnPC na superfície do CPE, conforme sugerido por [Siswana *et al.*, 2006](#). Além disso, a análise por EDX foi empregada para comprovar a composição elementar da superfície do eletrodo modificado. O espectro EDX do CPE-ZnPC com 3% de ZnPC confirmaram a presença dos elementos Zn, N e C, conforme ilustrado na (**Fig. 10c**).

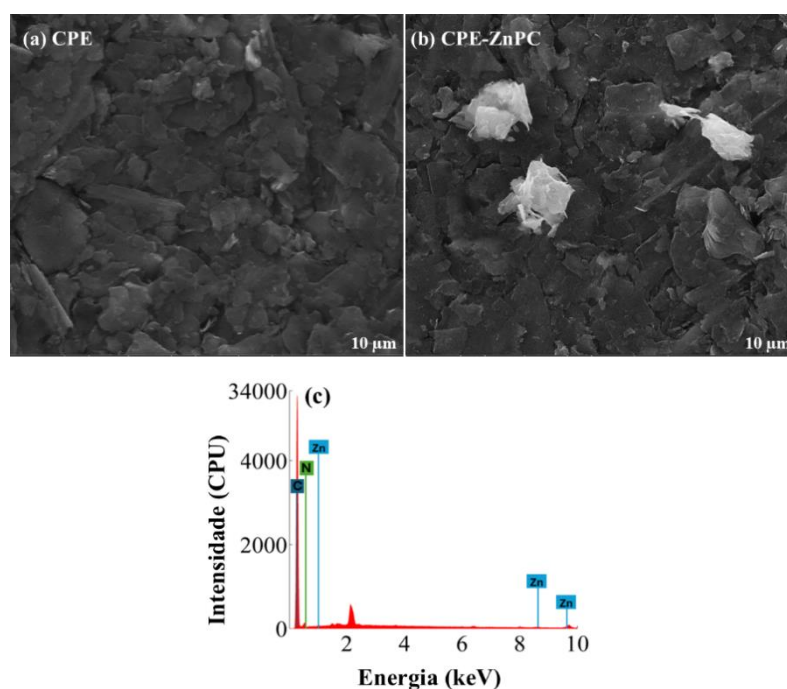


Figura 10 Micrografias eletrônicas de varredura de superfícies de CPE **(a)** e CPE-ZnPC com 3% de ZnPC **(b)** com ampliação de 5000x, e o espectro EDX do CPE-ZnPC com 3% de ZnPC **(c)**.

5.3 Avaliação do tratamento eletroquímico dos eletrodos CPE e CPE-ZnPC

O tratamento eletroquímico realizado antes das medidas consistiu em 10 varreduras consecutivas usando a técnica SWV em tampão borato (pH 9,2), com varredura de potencial entre 0,3 V e 1,1 V, de acordo com [Lourenço *et al.* \(2018\)](#). A **Figura 11a** mostra que no CPE não há nenhum processo redox na faixa de potencial estudado. Já no CPE-ZnPC, na primeira série das varreduras SWV (**Figura 11b (i)**) o sinal de oxidação pode ser atribuído à oxidação de PC⁻² em PC⁻¹ no anel de ftalocianina devido à natureza eletroinativa do Zn coordenada ao macrociclo,

conforme relatado por Bayrak *et al.* (2021). Essa onda de oxidação desapareceu após a décima varredura (**Fig. 11b (ii)**). Portanto, os sensores CPE e CPE-ZnPC foram considerados apropriados devido à ausência do sinal após este tratamento.

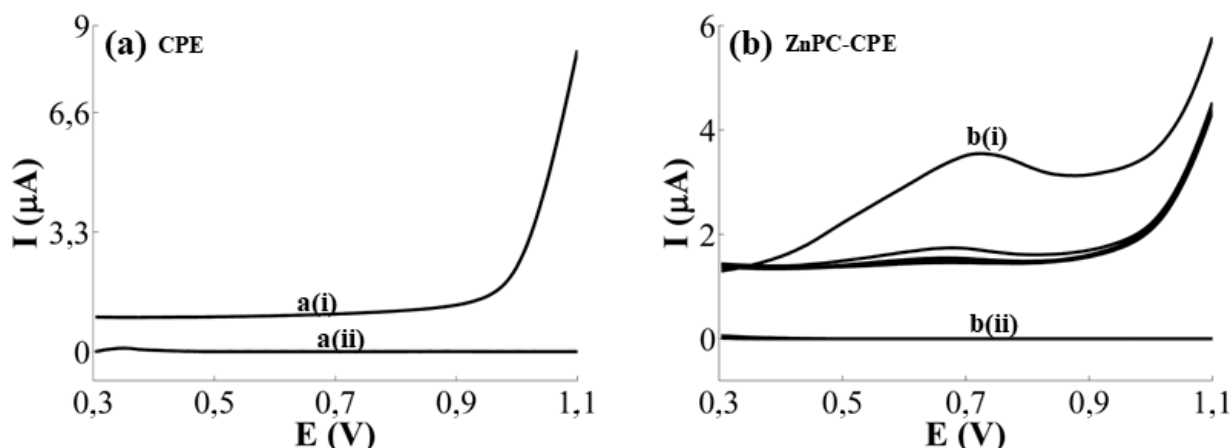


Figura 11 Varreduras no eletrólito de suporte (tampão borato, pH 9,2) obtido durante o tratamento eletroquímico do sensor CPE-ZnPC antes de **a(i)** e **b(i)** e após **a(ii)** e **b(ii)** correção de linha de base.

5.4 Área eletroativa dos eletrodos CPE e CPE-ZnPC

Para um sistema considerado reversível ($I_{(p,a)}/I_{(p,c)} = 1,0$), conforme mostrado na **Figura 12**, observou-se um aumento nas correntes de pico anódico ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) e catódico ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) nos processos de oxidação e redução, respectivamente. A partir desta relação, a equação de Randles Sevcik (**Eq. 8**) foi empregada para calcular a área eletroativa dos eletrodos estudados:

$$I = 2,69 \times 10^5 A n^{\frac{3}{2}} D^{\frac{1}{2}} C v^{\frac{1}{2}} \quad \text{Eq. 8}$$

Onde, n é o número de elétrons envolvidos na reação redox; A é a área da superfície eletroativa (cm^2); D é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); C é a concentração do analito (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}). As seguintes áreas foram obtidas: $0,015 \text{ cm}^2 \pm 0,0053$ (CPE), $0,019 \text{ cm}^2 \pm 0,0042$ (1% m/m ZnPC), $0,021 \text{ cm}^2 \pm 0,0061$ (3% m/m ZnPC) e $0,023 \text{ cm}^2 \pm 0,0090$ (5% m/m ZnPC). Verifica-se que a área eletroativa do eletrodo aumenta com a inclusão de ZnPc, exibindo incremento gradual progressivo à medida que o teor de ZnPc é elevado de 1 para 3 e 5%. Nesse contexto, a área eletroativa real (A_{real}) do sensor CPE

contendo 3% (m/m) de ZnPC foi determinada como sendo 0,021 cm², enquanto a área geométrica (A_{geo}) correspondeu a 0,032 cm². A partir desses valores, calculou-se a porcentagem de área eletroativa real em relação à área geométrica, de acordo com a equação proposta por Ferrari *et al.* (2018) ($\%Real = (A_{real}/A_{geo}) \times 100$), resultando em aproximadamente 65,6%, indicando que esse eletrodo participa efetivamente dos processos eletroquímicos.

Esse resultado também indica que a melhoria da resposta eletroquímica do CPE–ZnPC para tiramina e espermidina não está associada apenas ao aumento da área eletroativa, mas, provavelmente, à interação específica desses analitos com o anel macrocíclico da ZnPC, envolvendo processos de adsorção que favorecem a transferência de carga (Turan & Koca, 2025).

De acordo com Demir *et al.* (2020) os complexos de MPC (onde M = Co, Fe, Cu, Ni e Zn) favorecem a transferência de elétrons, resultando em maior resposta de corrente e em uma variação do potencial de pico para regiões menos energéticas, e consequentemente, promovendo um processo redox rápido com baixa energia. No caso do CPE–ZnPC, o processo redox ocorre no anel PC devido à natureza eletroativa do Zn coordenado ao macrociclo com ligações pi (π) conjugadas, conforme relatado por Bayrak *et al.* (2021). Assim, o processo redox depende exclusivamente dos orbitais do anel π , em particular dos orbitais HOMO e LUMO, de acordo com Brown e Schoen (2018).

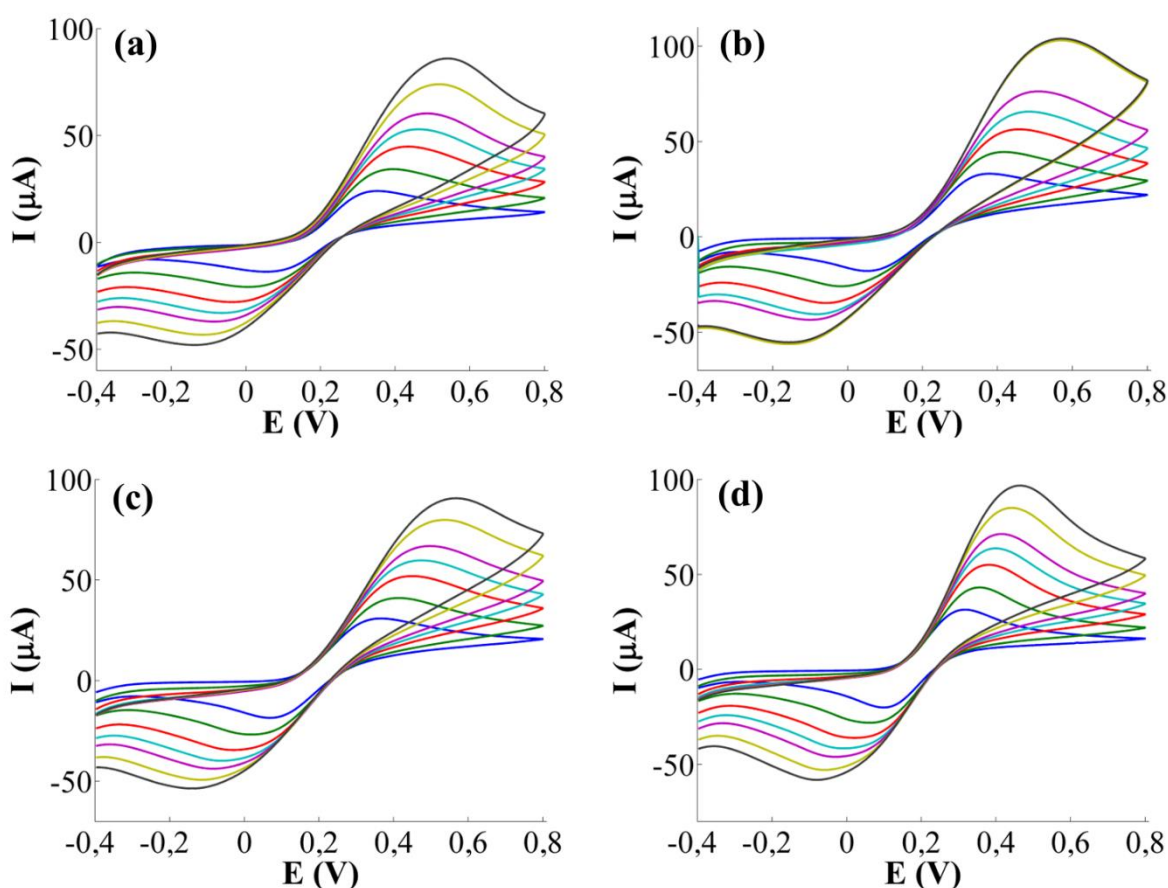


Figura 12 Voltamogramas cíclicos do processo redox $\text{Fe(CN)}_6^{3-}/\text{Fe(CN)}_6^{4-}$ para os cálculos das áreas da superfície eletroativa dos eletrodos CPE (a); CPE-ZnPC com 1% m/m (b); 3% m/m (c); 5% m/m (d) de ZnPC em velocidades de varredura de 10 a 200 mV s^{-1} em $\Delta E_w = -0,4$ a 0,8 V.

5.5 Estudo de pH

A influência do pH foi analisada utilizando a SWV em eletrólitos de suporte com pH variando de 3,4 a 10,5, como descrito na [Seção 4.1.6](#). Os potenciais de pico (E_p) de 6,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ tiramina ([Figura 13a](#)) e 66,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ espermidina ([Figura 13c](#)) foram deslocados para regiões menos positivas com o aumento do pH, indicando que a oxidação destas ABs foi significativamente afetada pela variação do pH. Considerando os valores de pKa dos grupos funcionais da tiramina ($\text{pKa}_1 = 9,74$; $\text{pKa}_2 = 10,52$) e da espermidina ($\text{pKa}_1 = 8,4$; $\text{pKa}_2 = 9,9$; $\text{pKa}_3 = 10,9$), observa-se que esse deslocamento pode estar associado aos diferentes estados de protonação/desprotonação dessas ABs. Conforme os valores de pKa, a tiramina e espermidina encontram-se protonadas em meio ácido, apresentando excesso de carga positiva, deslocando os picos de oxidação para valores mais positivos. Quando o pH se aproxima ou ultrapassa os pKa

dos grupos amino, ocorre a desprotonação. Esse efeito favorece a transferência de carga, promovendo a oxidação em potenciais menos positivos (Lourengo *et al.*, 2022).

Vale ressaltar que a espermidina não apresentou sinal eletroquímico nos pH 3,4 e 4,3 (Figura 13c). Corduneanu *et al.* (2010) também não detectaram reação de transferência de carga em eletrólitos de suporte com $\text{pH} \leq 5,1$, devido à baixa capacidade de eletrooxidação de espermidina. Conforme mostrado na Figura 13, a intensidade máxima da corrente de pico para tiramina foi obtida em pH 7,1 (Figura 13a) e para espermidina em pH 9,2 (Figura 13c). Embora a tiramina tenha apresentado maior intensidade de corrente em pH 7,1, optou-se pelo uso do tampão borato (pH 9,2) como eletrólito de suporte, pois essa condição favorece a sensibilidade na detecção da espermidina, cuja oxidação eletroquímica exige um meio mais sensível. Ademais, em pH 9,2 observa-se o deslocamento do potencial de oxidação da tiramina para valores mais negativos, aumentando a separação em relação ao pico da espermidina e favorecendo a análise simultânea de ambos os analitos com elevada sensibilidade.

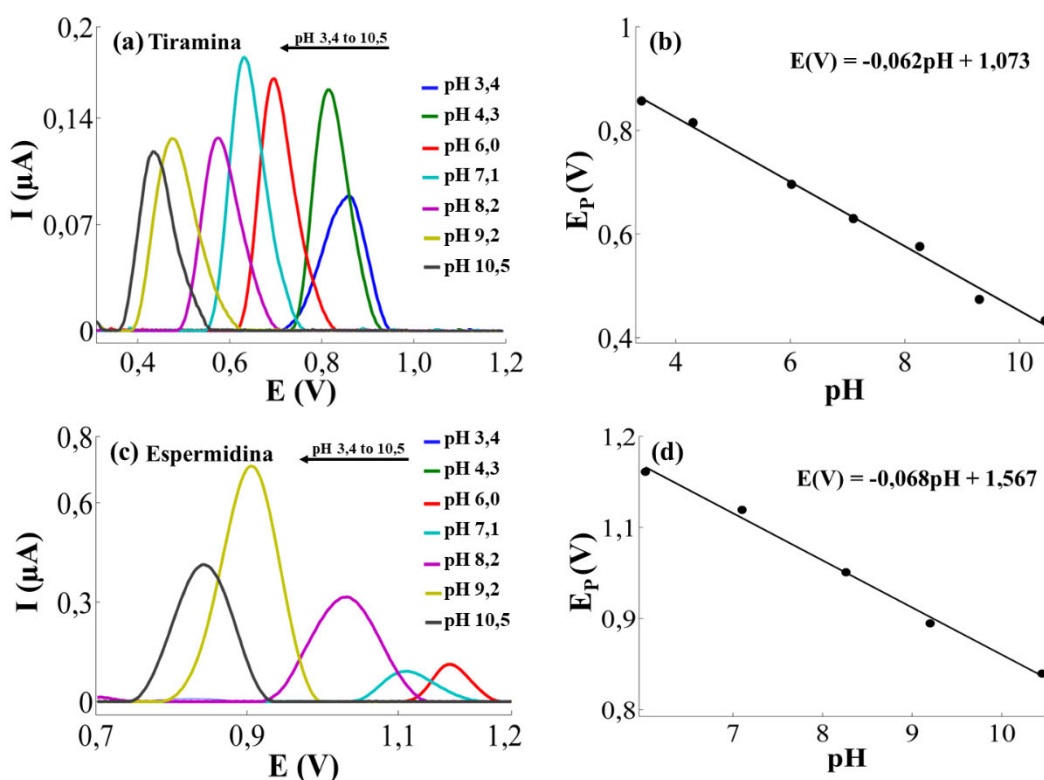


Figura 13 Voltamogramas de SW de $6,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina (a) e $66,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina (c) usando ZnPC-CPE em eletrólitos de suporte com pH variando de 3,4 a 10,5. Gráficos E_p (potencial de pico) versus pH de tiramina (b) e espermidina (d). Os parâmetros de SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_w = +0,3$ a $+1,2 \text{ V}$.

5.6 Mecanismos propostos para reação de oxidação espermidina e tiramina em CPE-ZnPC

A quantidade de prótons e elétrons envolvidos nos processos oxidativos da tiramina e espermidina foi determinada mediante estudo do efeito do pH e da frequência, utilizando SWV. As curvas de E_p em função do pH apresentaram coeficientes angulares de 62 mV/pH para tiramina (**Figura 13b**) e 68 mV/pH para espermidina (**Figura 13d**), sugerindo participação equivalente de prótons e elétrons para ambos analitos, conforme discutido por Brett & Brett (1993).

Com base nos princípios descritos por Lovric (**Seção 2.5.3**) para sistemas irreversíveis, foi estimado a quantidade de elétrons envolvidos através da correlação entre E_p versus $\log f$ para a oxidação eletroquímica de tiramina (**Figura 14a**) e espermidina (**Figura 14b**), com inclinação de 42,8 mV e 113,7 mV, respectivamente. A partir desses dados, determinou-se o produto αn (coeficiente de transferência multiplicado pelo número de elétrons transferidos na reação) como 1,38 para tiramina e 0,52 para espermidina. Considerando $\alpha = 0,5$, obtém-se um valor para o número de elétrons de 2,76 (≈ 3) para tiramina e 1,04 (≈ 1) para espermidina.

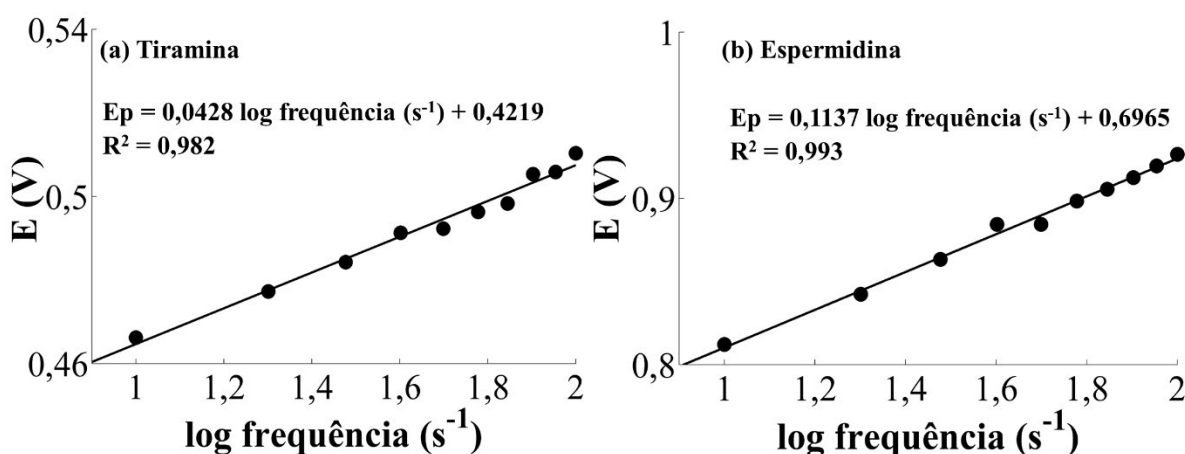
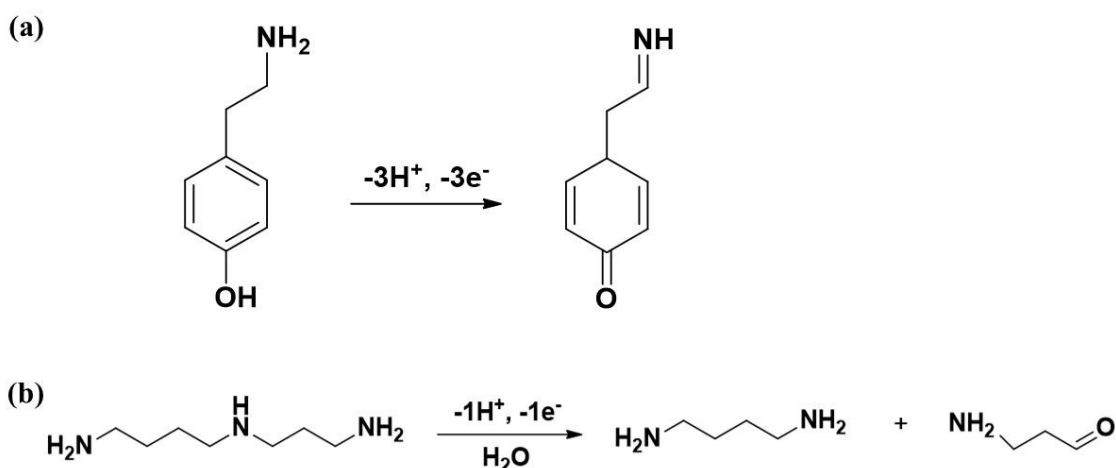


Figura 14 Relação de potencial de pico versus o logarítmico da frequência obtidos usando SWV em solução de $3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina **(a)** e $6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina **(b)** em tampão borato (pH 9,2) sobre o CPE-ZnPC.

A participação do número de prótons (H^+) durante o processo de oxidação de tiramina e espermidina pode ser calculado pela **Equação 9** (Zhou *et al.*, 2009). E foi estimado em 3,14 (≈ 3) para tiramina e 1,15 (≈ 1) para espermidina.

$$\frac{dE_{pa}}{dpH} = \frac{-2,303 H^+ RT}{nF} \quad \text{Eq. 9}$$

Desse modo, um possível mecanismo foi proposto para a reação de oxidação em CPE-ZnPC envolvendo três prótons e três elétrons ($3H^+/3e^-$) para tiramina (**Esquema 1a**) e um próton e um elétron ($1H^+/1e^-$) para espermidina (**Esquema 1b**). Esses resultados corroboram com os obtidos em estudos anteriores para as reações eletroquímicas de tiramina (Silva *et al.*, 2021; Raoof *et al.*, 2012) e espermidina (Koppang *et al.*, 1999). No entanto, nesse trabalho, não foram realizados estudos adicionais para caracterização dos produtos, uma vez que seus mecanismos já estão estabelecidos na literatura.



Esquema 1. Possível mecanismo de reação para oxidação de Tiramina (a) e Espermidina (b).

5.7 Estudo de velocidade

O grau de reversibilidade da tiramina e espermidina foi analisada na superfície CPE-ZnPC, utilizando a CV, mediante a variação da velocidade de varredura de 10 a 150 $mV s^{-1}$, em uma célula eletroquímica contendo 10 $\mu mol L^{-1}$ de tiramina e 33 $\mu mol L^{-1}$ de espermidina em tampão borato (pH 9,2). Em todas as velocidades de varredura analisadas, foi registrado apenas um pico anódico, conforme mostrado nas **Figuras 15a** e **16a**, sugerindo que os analitos estudados sofrem somente oxidação na superfície do CPE-ZnPC, conforme descrito por Brett & Brett (1993). Por esta razão,

pode-se concluir que a oxidação dessas ABs se trata de um processo irreversível, sendo assim, todos os experimentos foram realizados na faixa de potencial na região anódica.

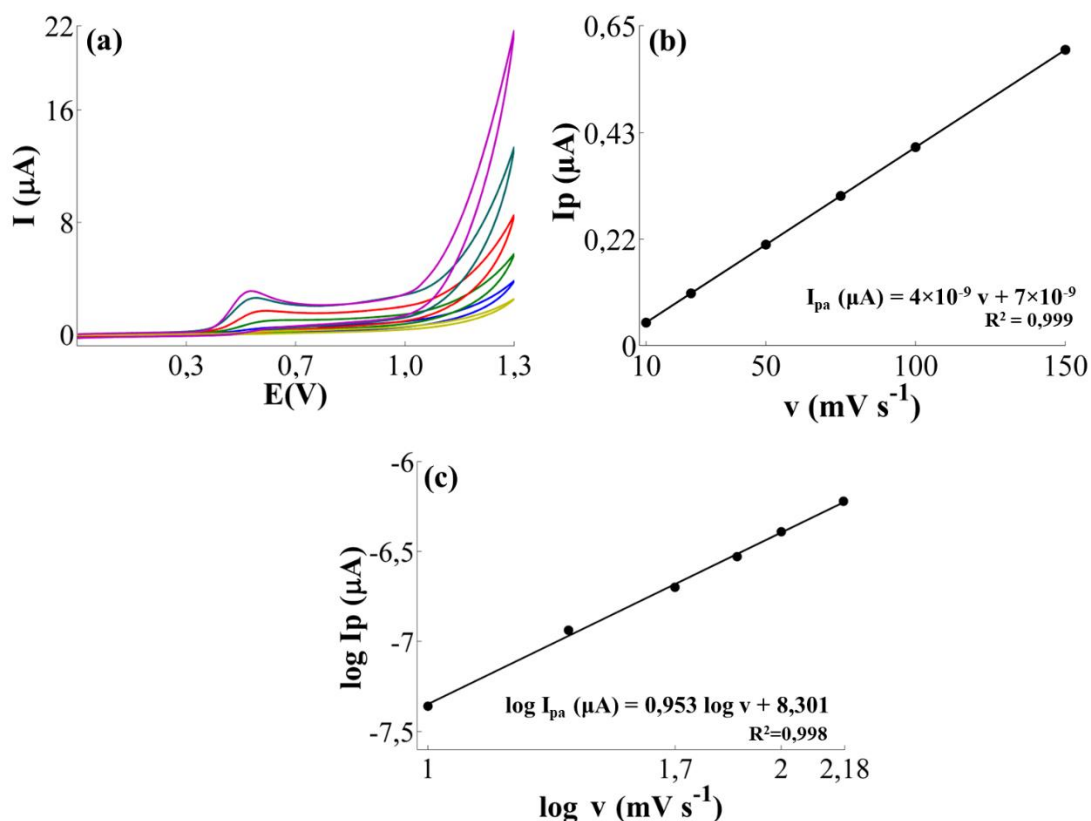


Figura 15 Voltamogramas cíclicos obtidos em CPE-ZnPC usando $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina (a) em tampão borato (pH 9,2) em diferentes velocidades de varredura (10 a 150 mV s^{-1}) e $\Delta E_w = 0$ a $+1,3 \text{ V}$. Relação de I_p vs. v (mV s^{-1}) (b) e Relação de $\log I_p$ vs. $\log v$ (mV s^{-1}) (c)

Nas Figuras 15b e 16b, o comportamento linear obtido para I_{pa} versus v , sugere que a oxidação da tiramina e espermidina é controlada por adsorção. Para o gráfico do logaritmo da I_{pa} versus o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$) para tiramina (Figuras 15c) e espermidina (Figuras 16c) apresentaram inclinação de 0,95 e 0,57, respectivamente, indicando que para tiramina a reação de oxidação foi controlado inteiramente por adsorção, enquanto para espermidina foi governada por adsorção e difusão.

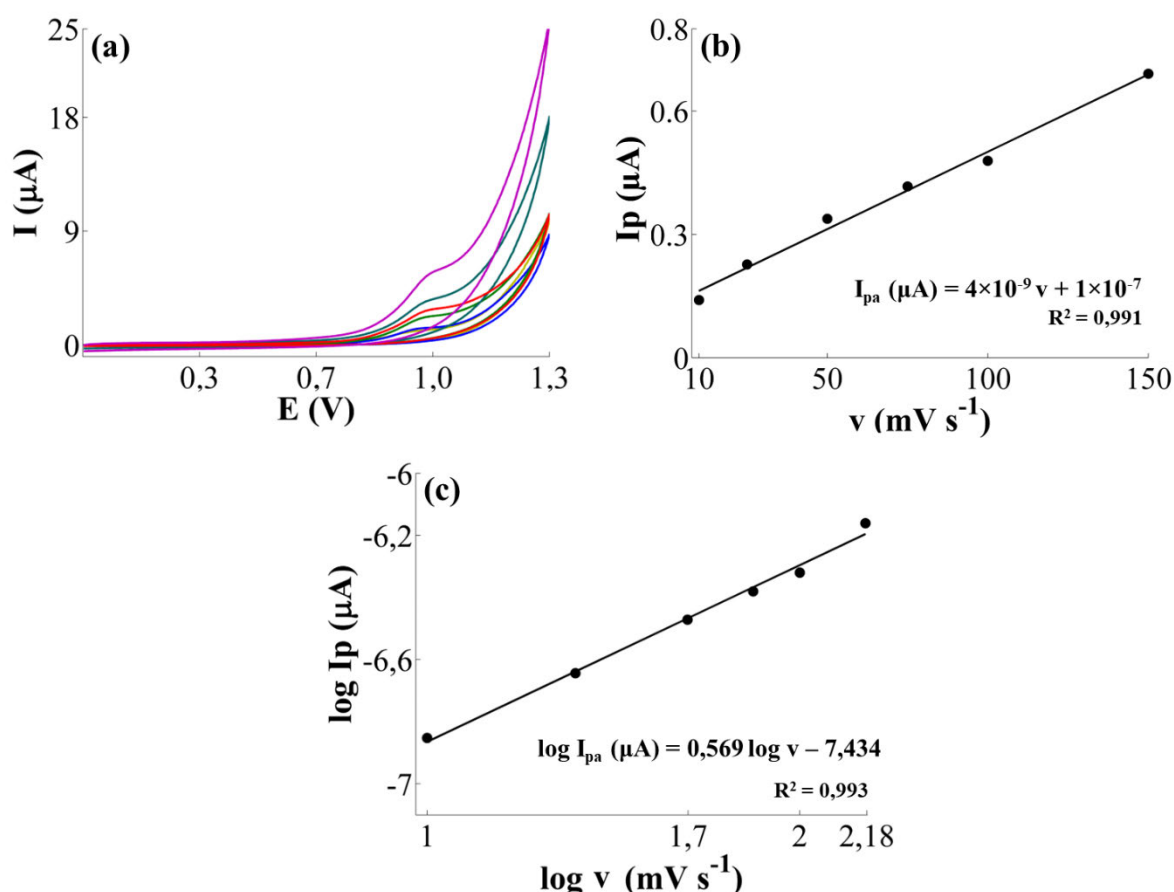


Figura 16 Voltamogramas cíclicos obtidos em CPE-ZnPC usando $33 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Espermidina **(a)** em tampão borato (pH 9,2) em diferentes velocidades de varredura (10 a 150 mV s^{-1}) e $\Delta E_w = 0$ a $+1,3 \text{ V}$. Relação de I_p vs. v (mV s^{-1}) **(b)** e Relação de $\log I_p$ vs. $\log v$ (mV s^{-1}) **(c)**.

5.8 Otimização dos parâmetros experimentais de SWV

Os parâmetros SWV foram avaliados de forma univariada adicionando $3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina ou $6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina em tampão borato (pH 9,2). A frequência de pulso (**Figuras 17a e 17b**), o incremento de potencial (**Figuras 17c e 17d**) e a amplitude do pulso (**Figuras 17e e 17f**) foram investigados, mantendo fixos os demais parâmetros SWV. Os valores ótimos de SWV: $f = 50 \text{ Hz}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$, proporcionaram maior sensibilidade (intensidade da corrente de pico) e seletividade (largura do pico à meia altura, $W_{1/2}$) para a determinação simultânea de tiramina e espermidina.

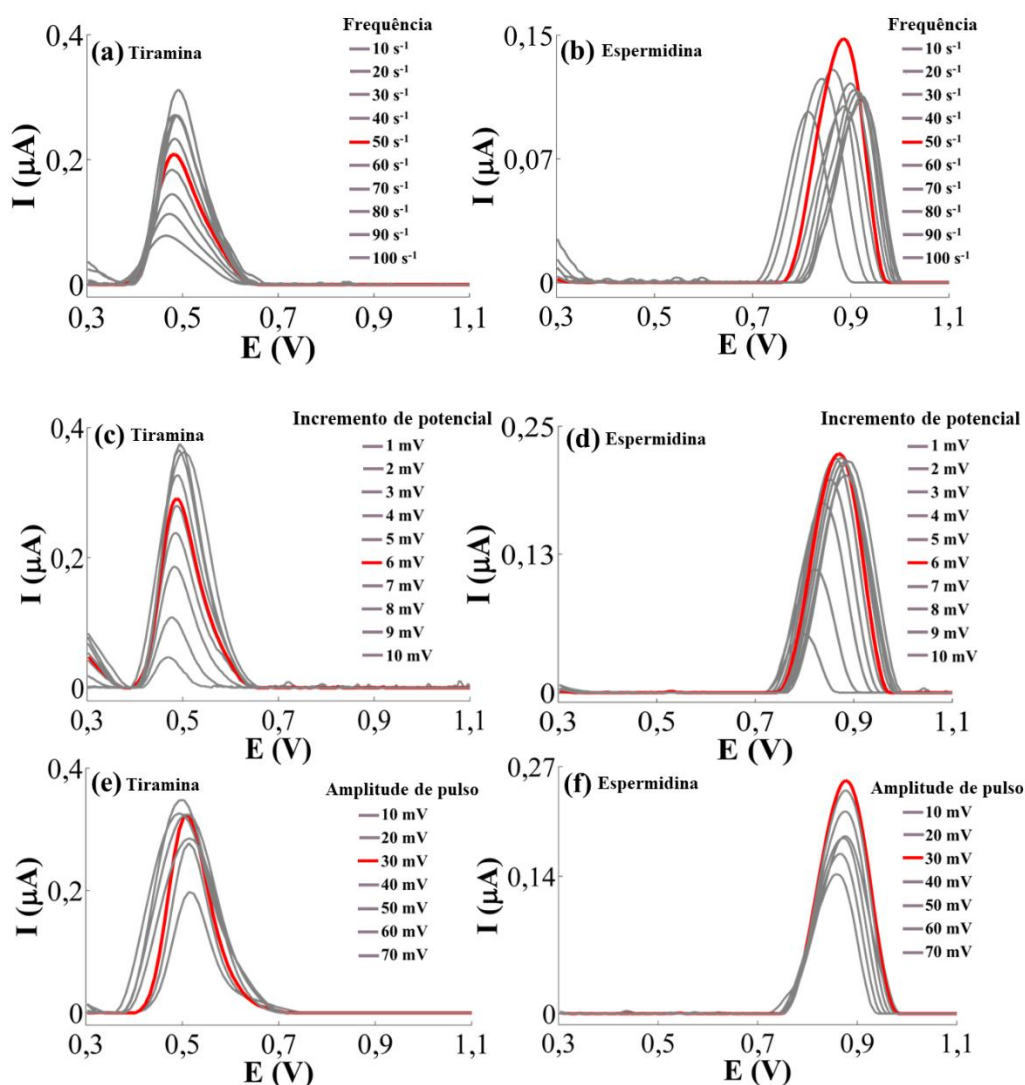


Figura 17 Medidas de SWV em solução de $3,3 \mu mol L^{-1}$ de tiramina e $6,7 \mu mol L^{-1}$ de espermidina em tampão borato (pH 9,2) obtidos em uma faixa de frequência de 10 a $100 s^{-1}$ (**a** e **b**), um incremento de potencial de 1 a 10 mV (**c** e **d**) e uma amplitude de pulso de 10 a 70 mV (**e** e **f**), fixando os demais parâmetros de SWV.

5.9 Efeito de Memória

Como pode ser visto nas **Figuras 18a** e **18b**, nenhum efeito de memória foi observado, de acordo com o procedimento experimental previamente descrito na **Seção 4.1.9**. Com base nesses resultados, a superfície do CPE-ZnPC apresentou uma rápida regeneração e uma alta estabilidade, indicando que o processo eletroquímico controlado por adsorção apresentado na **Seção 5.7** não comprometeu o sinal analítico. Dessa forma, etapas de renovação da superfície do CPE-ZnPC entre as análises tornaram-se desnecessárias.

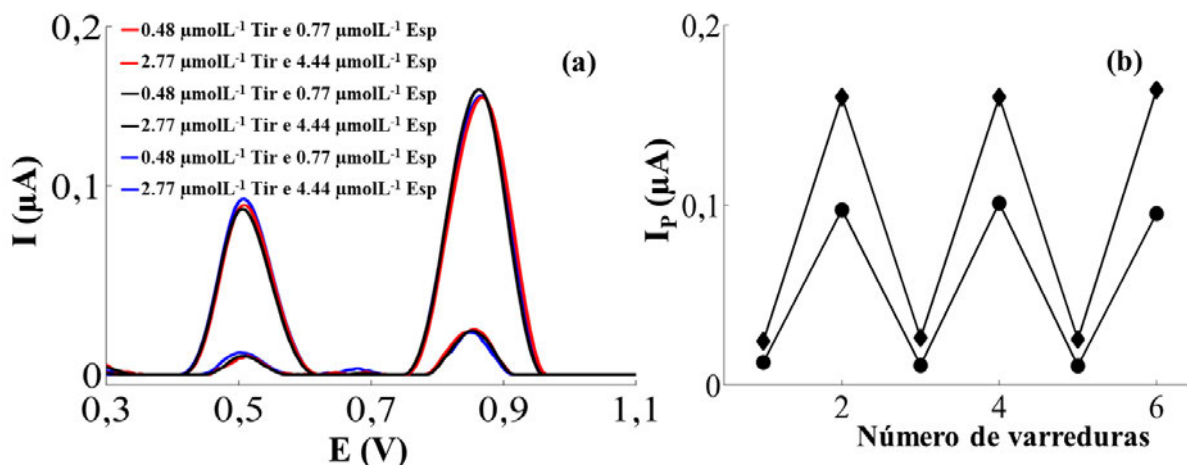


Figura 18 Estudo de Efeito de memória. Medidas de SWV da corrente (I) versus potencial (E) em concentrações triplicata de 0,48 e 2,77 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e 0,77 e 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina em tampão borato (pH 9,2) no CPE-ZnPC (a). Gráfico de corrente de pico (I_p) versus número de varreduras (b). Os parâmetros de SWV foram: $t_r = 5$ s, $f = 50$ s^{-1} , $\Delta E_s = 6$ mV, $a = 30$ mV, $\Delta E_w = +0,3$ a $+1,1$ V.

5.10 Curva Analítica

Inicialmente, foi construída uma curva analítica variando a concentração de um dos analitos, enquanto a do outro analito foi mantida fixa, com o objetivo de avaliar a sensibilidade e verificar possíveis interferências na resposta eletroquímica entre esses analitos. Para isso, foi calculado o desvio padrão relativo (do inglês, *relative standard deviation* – RSD) das correntes de pico da concentração que se manteve constante durante as medidas eletroquímicas.

Para construir a curva de calibração da tiramina, foi mantida a concentração da espermidina fixa em 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto se adicionavam quantidades crescentes de tiramina, em concentrações variando de 0,4 a 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, como mostrado na **Figura 19a**. Na análise de regressão linear foi obtido um alto coeficiente de regressão ($R^2 = 0,995$), indicando uma relação direta entre a concentração e a resposta voltamétrica da tiramina. Em contrapartida, a corrente de pico associada à espermidina manteve-se praticamente constante, com um RSD = 3,1%. Isso demonstra que a quantificação da tiramina não foi afetada pela presença da espermidina.

Posteriormente, foi realizada a mesma metodologia, variando a concentração da espermidina de 0,5 a 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e mantendo a tiramina fixa em 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Na **Figura 19b**, a corrente de pico anódica da espermidina apresentou uma ótima relação linear com a sua concentração ($R^2 = 0,999$), e a corrente de pico anódica para tiramina

apresentou um RSD de 1,5 %. Com estes resultados, verifica-se estabilidade da tiramina e espermidina, sendo possível a determinação simultânea desses analitos, por não causarem interferência entre si.

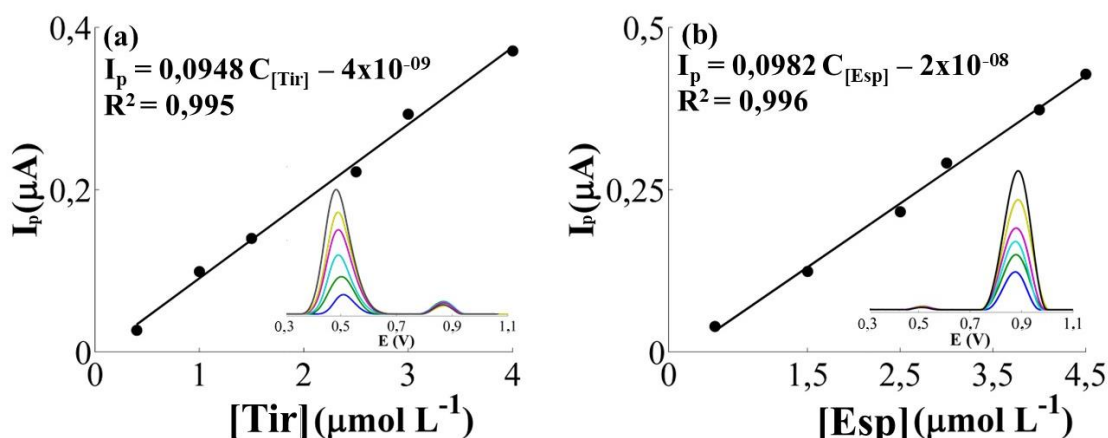


Figura 19 Voltamogramas de SW usando o sensor CPE-ZnPC em tampão borato (pH = 9,2) para Tiramina (0,4 a 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com concentração fixa de Espermidina (0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) **(a)** e para Espermidina (0,5 a 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com concentração fixa de Tiramina (0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$) **(b)** Os parâmetros de SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_w = +0,3 \text{ a } +1,1 \text{ V}$.

Em seguida, foi realizada a determinação simultânea para ambos analitos, adicionando alíquotas crescentes de soluções padrão de tiramina (30,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e espermidina (48,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) usando CPE-ZnPC em tampão borato (pH 9,2), de modo que as concentrações variassem de 0,30 a 5,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para tiramina e 0,48 a 8,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para espermidina.

A **Figura 20a** apresenta os perfis voltamétricos SWV em triplicata, registrados mediante as condições experimentais otimizadas, bem como as curvas de calibração correspondentes (**Figura 20b e 20c**). Ambos os casos apresentaram relações lineares satisfatórias entre a corrente de pico e a concentração de tiramina ($R^2 = 0,995$, $n = 6$) e espermidina ($R^2 = 0,997$, $n = 6$) com as seguintes equações das curvas analíticas $I_p (\mu\text{A}) = 0,078 (\pm 0,0023) C_{\text{TIR}} + 5,2 (\pm 0,0059)$ e $I_p (\mu\text{A}) = 0,064 C_{\text{Esp}} (\pm 0,0015) + 8,1 \times 10^{-9} (0,0061)$.

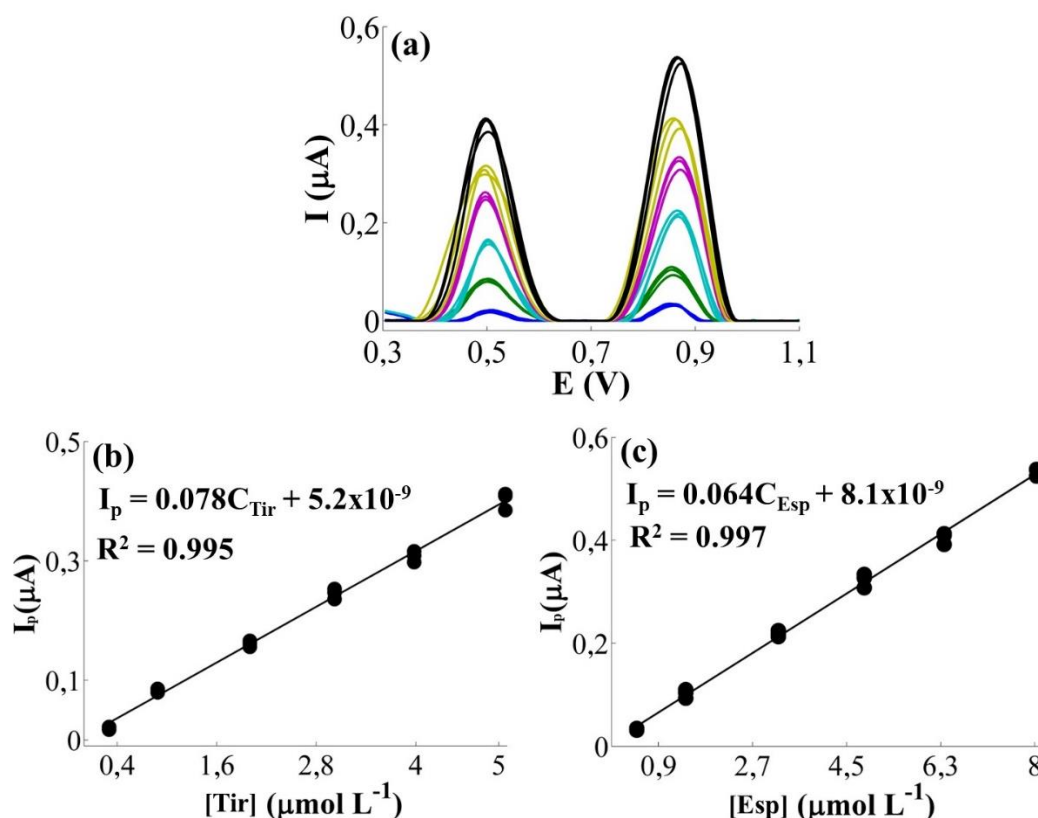


Figura 20 Voltamogramas em onda quadrada em triplicata usando o sensor CPE-ZnPC (a) e curvas analíticas resultantes de tiramina (b) e espermidina (c) com concentrações variando de 0,30 a 5,08 μ mol L $^{-1}$ tiramina e 0,48 a 8,13 μ mol L $^{-1}$ espermidina em tampão borato (pH 9,2).

A inclinação (β) dessas curvas analíticas e o desvio padrão (SD) para as dez medidas da SWV da solução do branco (eletrólito de suporte = tampão borato, pH 9,2) foram usados para estimar os LD e LQ, conforme recomendações da IUPAC (IUPAC, 1978) descritos na Seção 4.3.2. Os valores de LD e LQ obtidos foram: LD = 48,61 nmol L $^{-1}$ e LQ = 60,83 nmol L $^{-1}$ para tiramina e LD = 76,90 nmol L $^{-1}$ e LQ = 97,45 nmol L $^{-1}$ para espermidina. Além desses parâmetros relacionados a regressão linear e coeficientes, os resultados também foram respaldados mediante a análise do gráfico de resíduos obtidos pelos modelos e, de maneira mais significativa, pela ANOVA, descrita na Seção 4.3.1.

Ao analisar o gráfico de resíduos, observa-se uma distribuição aleatória dos resíduos (Figuras. 21a e 21b) indicando que os dados das curvas analíticas de tiramina e espermidina são homocedásticos, ou seja, ausência de comportamento sistemático que comprometa o ajuste do modelo (Bruns *et al.*, 2006). Porém, essa análise é de caráter subjetivo e, por isso, utilizou-se à ANOVA e aplicou um teste F com nível de confiança de 95%.

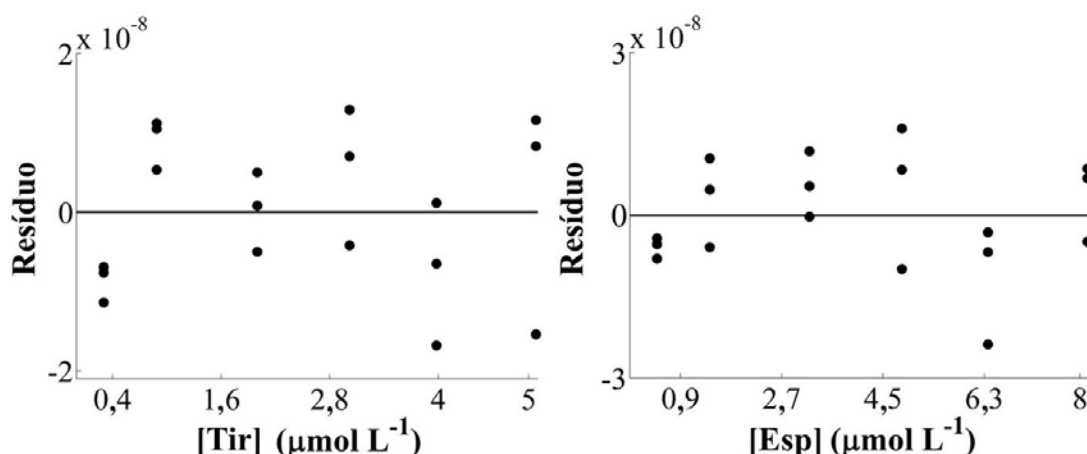


Figura 21 Gráficos de resíduos para as curvas analíticas de tiramina (a) e espermidina (b)

Na **Tabela 8**, são apresentados os resultados obtidos pela ANOVA, para validação dos modelos de calibração no intervalo de concentração avaliado para tiramina e espermidina. Para a falta de ajuste, os valores das razões MQ_{faj}/MQ_{ep} foram inferiores aos valores críticos da distribuição F . Para a tiramina e a espermidina, os valores de F_{cal} (2,61 e 2,32, respectivamente) foram menores que F_{crit} (3,26), confirmando a ausência de falta de ajuste do modelo. Em relação à significância da regressão, as razões (MQ_{reg}/MQ_{re}) foram superiores aos valores críticos ($F_{cal} = 3,15 \times 10^3 > F_{crit} = 4,49$ para tiramina e $F_{cal} = 5,12 \times 10^3 > F_{crit} = 4,49$ para espermidina), indicando que as regressões lineares possuem alta significância.

Tabela 8 Resultados da ANOVA obtidos com significância de 5% nas curvas analítica

Fonte de Variação	Analitos	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	tiramina	$3,05 \times 10^{-13}$	1	$3,05 \times 10^{-13}$
	espermidina	$5,31 \times 10^{-13}$		$5,31 \times 10^{-13}$
Resíduos	tiramina	$1,55 \times 10^{-15}$	16	$9,17 \times 10^{-17}$
	espermidina	$1,64 \times 10^{-15}$		$1,03 \times 10^{-16}$
Falta de ajusre	tiramina	$7,22 \times 10^{-16}$	4	$1,80 \times 10^{-16}$
	espermidina	$7,16 \times 10^{-16}$		$1,79 \times 10^{-16}$
Erro Puro	tiramina	$8,31 \times 10^{-16}$	12	$6,93 \times 10^{-17}$
	espermidina	$9,24 \times 10^{-16}$		$7,70 \times 10^{-17}$
Total	tiramina	$3,03 \times 10^{-13}$	17	$1,81 \times 10^{-14}$
	espermidina	$5,32 \times 10^{-13}$		$3,13 \times 10^{-13}$
MQ _{reg} /MQ _{re}	tiramina	$3,15 \times 10^3$	F _{Crítico} (1,16)	4,49
	espermidina	$5,12 \times 10^3$		
MQ _{faj} /MQ _{ep}	tiramina	2,61	F _{Crítico} (4,12)	3,26
	espermidina	2,32		

5.11 Estudo de Interferentes

O estudo foi conduzido para verificar a seletividade do sensor CPE-ZnPC, utilizando possíveis compostos encontrados nos vinhos e cafés solúveis que podem interferir nas respostas voltamétricas da tiramina e espermidina. Foram testados os seguintes interferentes: ácidos tartárico e cítrico, putrescina, sacarose, cadaverina, 2-feniletilamina, putrescina, histamina, etanol, cafeína e trigonelina. As medidas de SWV foram realizadas nas mesmas condições experimentais usadas para construir as curvas analíticas.

Conforme mostrado na **Figura 22**, nenhum dos interferentes estudados apresentaram respostas voltamétricas nos potenciais 0,5 V e 0,86 V (potenciais onde responde a tiramina e espermidina, respectivamente). A histamina apresentou um pico de oxidação bem definido (1,01 V), mas não interfere no sinal de nenhum dos analitos. Isto confirma a seletividade do CPE-ZnPC e indica o seu elevado potencial para utilização na determinação simultânea de tiramina e espermidina em vinhos e cafés solúveis.

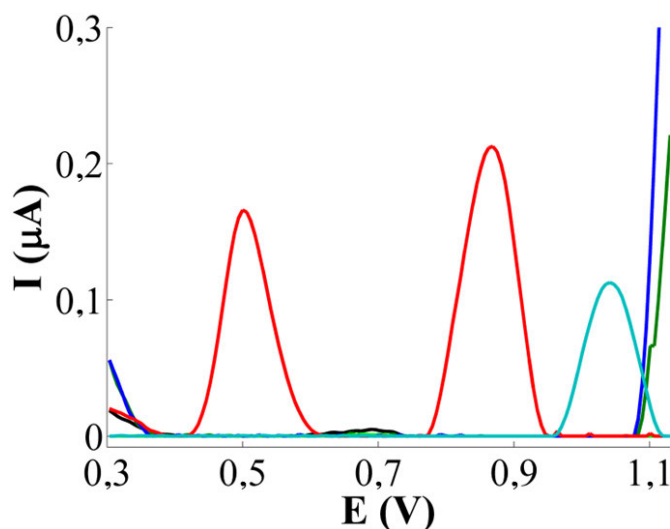


Figura 22 Voltamogramas de SW de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de tiramina e $3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espermidina (—) em tampão borato (pH 9.2) com adição dos seguintes interferentes: 10 % v/v of etanol (—), e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ of Histamina (—), Putrescina (—), Cadaverina (—), 2-feniletilamina (—), ácido tártarico (—), ácido cítrico (—) e sacarose (—). Os parâmetros SWV foram: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_w = +0,3 \text{ to } +1,1 \text{ V}$.

5.12 Análise de vinhos e cafés solúveis e teste de recuperação

O método de adição padrão (do inglês, *Method of Standard Additions* - MSA) é empregado quando há interferência significativa da matriz, possibilitando quantificações mais precisa que aquelas obtidas por métodos de calibração convencional. Assim, o MSA foi empregado no método proposto para solucionar o efeito de matriz na determinação de tiramina e espermidina em vinhos e cafés solúveis, sem pré-tratamento da amostra. O seguinte MSA foi analisado em quatro níveis de concentração de tiramina: $0,94$; $1,39$; $1,83$ e $2,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ para vinhos, e $1,39$; $1,83$; $2,25$ e $2,66 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cafés solúveis. Para a espermidina os níveis avaliados foram $1,51$; $2,23$; $2,93$ e $3,60 \mu\text{mol L}^{-1}$ para vinhos, e $2,23$; $2,93$; $3,60$ e $4,26 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cafés solúveis. Alíquotas de 15 ou $60 \mu\text{L}$ de vinho (dependendo do tipo de vinho) e $100 \mu\text{L}$ de café solúvel foram adicionados a célula eletroquímica contendo 5 mL de tampão borato (pH 9,2). As concentrações de tiramina e espermidina nas amostras de vinhos e cafés solúveis foram determinadas utilizando a equação do MSA, com todas as análises realizadas em triplicata.

Todas as amostras de vinho também foram analisadas utilizando o método cromatográfico descrito por [Pineda et al. \(2012\)](#). Conforme demonstrado na **Tabela 9**, a concordância estatística entre os resultados obtidos para tiramina e espermidina

pelo método proposto e de referência (HPLC), sem diferenças significativas entre eles, conforme o teste t pareado com nível de confiança de 95% ($t_{\text{cal}}=0,94 < t_{\text{crít}}=2,57$).

Tabela 9. Resultados de tiramina e espermidina em vinhos usando o método proposto e o método de referência HPLC.

Amostras	tiramina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		espermidina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	Proposto $\pm$ RSD (%)	HPLC $\pm$ RSD (%)	Proposto $\pm$ RSD (%)	HPLC $\pm$ RSD (%)
Vinho tinto 1	0,53 $\pm$ 1,97	0,67 $\pm$ 2,81	nd	nd
Vinho branco 2	nd	nd	0,83 $\pm$ 2,57	0,91 $\pm$ 1,79
Vinho branco 3	0,92 $\pm$ 1,04	0,95 $\pm$ 1,03	nd	nd
Vinho tinto 4	1,12 $\pm$ 1,14	1,36 $\pm$ 3,25	nd	nd
Vinho branco 5	0,74 $\pm$ 3,63	0,72 $\pm$ 1,43	nd	nd
Vinho tinto 6	0,89 $\pm$ 3,20	0,76 $\pm$ 2,09	nd	nd
Vinho branco 7	0,94 $\pm$ 2,65	0,84 $\pm$ 4,75	nd	nd

nd: não detectado

A exatidão do método voltamétrico proposto neste estudo foi avaliada por meio do ensaio de recuperação, o qual permite estimar a capacidade do método em quantificar o analito adicionado à matriz. As **Tabelas 10 e 11** apresentam as concentrações de tiramina e espermidina, bem como as taxas de recuperação e RSD. Ao avaliar os resultados obtidos, pode-se afirmar que o método proposto foi empregado com desempenho satisfatório na determinação simultânea de tiramina e espermidina em vinhos e cafés solúveis, alcançando excelentes taxas de recuperação (91,5% a 104,1% para tiramina e 86,1% a 107,5% para espermidina).

Tabela 10 Concentrações de tiramina e espermidina determinados em amostras de vinhos utilizando o método proposto, juntamente com os respectivos resultados obtidos nos testes de recuperação.

Vinhos	tiramina			espermidina		
	Concentração (μmol L ⁻¹)		Recuperação média ± RSD (%)	Concentração (μmol L ⁻¹)		Recuperação média ± RSD (%)
	Add	Encont. ± RSD (%)		Add	Encont ± RSD	
Vinho tinto	-	0,53 ± 0,04	-	-	-	-
	0,94	1,52 ± 0,55	103,1 ± 3,4	1,51	1,20 ± 0,12	91,0 ± 4,8
	1,39	1,96 ± 0,01		2,23	2,04 ± 0,09	
	1,83	2,41 ± 0,07		2,93	2,82 ± 0,12	
	2,25	2,84 ± 0,08		3,60	3,48 ± 0,09	
Vinho branco	-	-	-	-	0,83 ± 0,05	-
	0,94	0,78 ± 0,51	91,5 ± 2,4	1,51	2,38 ± 0,07	98,5 ± 2,4
	1,39	1,20 ± 0,04		2,23	3,14 ± 0,08	
	1,83	1,78 ± 0,02		2,93	3,53 ± 0,07	
	2,25	2,25 ± 0,00		3,60	4,20 ± 0,07	
Vinho branco	-	0,92 ± 0,21	-	-	-	-
	0,94	1,71 ± 0,03	94,7 ± 1,1	1,51	1,87 ± 0,36	107,5 ± 2,4
	1,39	2,28 ± 0,02		2,23	2,44 ± 0,06	
	1,83	2,70 ± 0,03		2,93	2,93 ± 0,06	
	2,25	3,13 ± 0,00		3,60	3,33 ± 0,08	
Vinho tinto	-	1,12 ± 0,22	-	-	-	-
	0,94	2,21 ± 0,00	104,1 ± 0,8	1,51	1,09 ± 0,06	86,1 ± 2,2
	1,39	2,53 ± 0,01		2,23	1,74 ± 0,06	
	1,83	2,92 ± 0,02		2,93	2,84 ± 0,04	
	2,25	3,37 ± 0,01		3,60	3,49 ± 0,02	
Vinho branco	-	0,74 ± 0,05	-	-	-	-
	0,94	1,66 ± 0,16	95,8 ± 1,0	1,51	1,63 ± 0,03	101,9 ± 1,8
	1,39	2,04 ± 0,01		2,23	2,30 ± 0,08	
	1,83	2,50 ± 0,00		2,93	2,90 ± 0,01	
	2,25	2,94 ± 0,03		3,60	3,50 ± 0,05	
Vinho tinto	-	0,89 ± 0,20	-	-	-	-
	0,94	1,69 ± 0,30	96,5 ± 3,6	1,51	1,54 ± 0,07	101,3 ± 3,9
	1,39	2,16 ± 0,07		2,23	2,31 ± 0,17	
	1,83	2,77 ± 0,20		2,93	2,96 ± 0,08	
	2,25	3,33 ± 0,04		3,60	3,55 ± 0,03	
Vinho branco	-	0,94 ± 0,14	-	-	-	-
	0,94	1,80 ± 1,01	96,4 ± 6,0	1,51	1,56 ± 0,04	101,9 ± 1,7
	1,39	2,33 ± 0,04		2,23	2,22 ± 0,04	
	1,83	2,74 ± 1,44		2,93	2,96 ± 0,03	
	2,25	3,10 ± 0,05		3,60	3,62 ± 0,03	
RSD médio (%)			2,6	2,6		

Tabela 11 Concentrações de tiramina e espermidina em amostras de café solúvel obtidos nos testes de recuperação.

Cafés Solúveis	tiramina			espermidina		
	Concentração (μmol L ⁻¹)		Recuperação média ± RSD (%)	Concentração (μmol L ⁻¹)		Recuperação média ± RSD (%)
	Add	Encont. ± RSD (%)		Add	Encont ± RSD (%)	
Café solúvel tradicional	1,39	1,33±0,02	94,1 ± 1,1	2,23	2,06±0,07	95,7 ± 1,7
	1,83	1,65±0,02		2,93	2,83±0,07	
	2,25	2,11±0,04		3,60	3,52±0,02	
	2,66	2,59±0,00		4,26	4,09±0,04	
Café solúvel descafeinado	1,39	1,49±0,05	103,9 ± 1,4	2,23	2,39±0,13	102,0 ± 2,9
	1,83	1,87±0,00		2,93	2,90±0,09	
	2,25	2,33±0,03		3,60	3,53±0,08	
	2,66	2,75±0,01		4,26	4,44±0,03	
Café solúvel tradicional	1,39	1,40 ± 0,02	97,7 ± 0,9	2,23	2,12 ± 0,09	98,8 ± 2,2
	1,83	1,70 ± 0,03		2,93	3,01 ± 0,05	
	2,25	2,14 ± 0,00		3,60	3,59 ± 0,06	
	2,66	2,68 ± 0,02		4,26	4,18 ± 0,08	
Café solúvel descafeinado	1,39	1,35 ± 0,03	95,7 ± 1,3	2,23	2,17 ± 0,04	100,1 ± 1,2
	1,83	1,74 ± 0,02		2,93	3,05 ± 0,02	
	2,25	2,06 ± 0,02		3,60	3,54 ± 0,05	
	2,66	2,65 ± 0,04		4,26	4,27 ± 0,04	
Café solúvel extraforte	1,39	1,37 ± 0,02	97,3 ± 0,7	2,23	2,19 ± 0,02	98,2 ± 1,0
	1,83	1,74 ± 0,00		2,93	2,77 ± 0,03	
	2,25	2,19 ± 0,03		3,60	3,71 ± 0,05	
	2,66	2,63 ± 0,01		4,26	4,14 ± 0,03	
Café solúvel liofilizado	1,39	1,37 ± 0,01	100,1 ± 0,8	2,23	2,18 ± 0,02	96,6 ± 0,7
	1,83	1,85 ± 0,03		2,93	2,69 ± 0,04	
	2,25	2,28 ± 0,01		3,60	3,58 ± 0,02	
	2,66	2,64 ± 0,02		4,26	4,15 ± 0,02	
RSD médio (%)			1,0	1,6		

Também foi realizado um teste para avaliar a ausência ou presença de bias nos resultados obtidos com o método proposto. Para isso, foram construídas regiões elípticas de confiança conjunta (do inglês, *Elliptical Joint Confidence Region* – EJCR) (Soares *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2018) utilizando as concentrações de tiramina e espermidina adicionadas e encontradas nos vinhos (Tabela 13) e cafés solúveis (Tabela 14). As EJCRs para tiramina e espermidina nas amostras de vinhos foram obtidas por regressão linear de mínimos quadrados. Como mostrado nas Figuras 23b e 23d para vinhos e Figuras 24b e 24d para cafés solúveis, o ponto teórico (intercepto = 0, inclinação = 1) estar contido dentro dos limites de confiança das elipses confirma, estatisticamente, a ausência de erros sistemáticos no método proposto, ao nível de 95% de confiança.

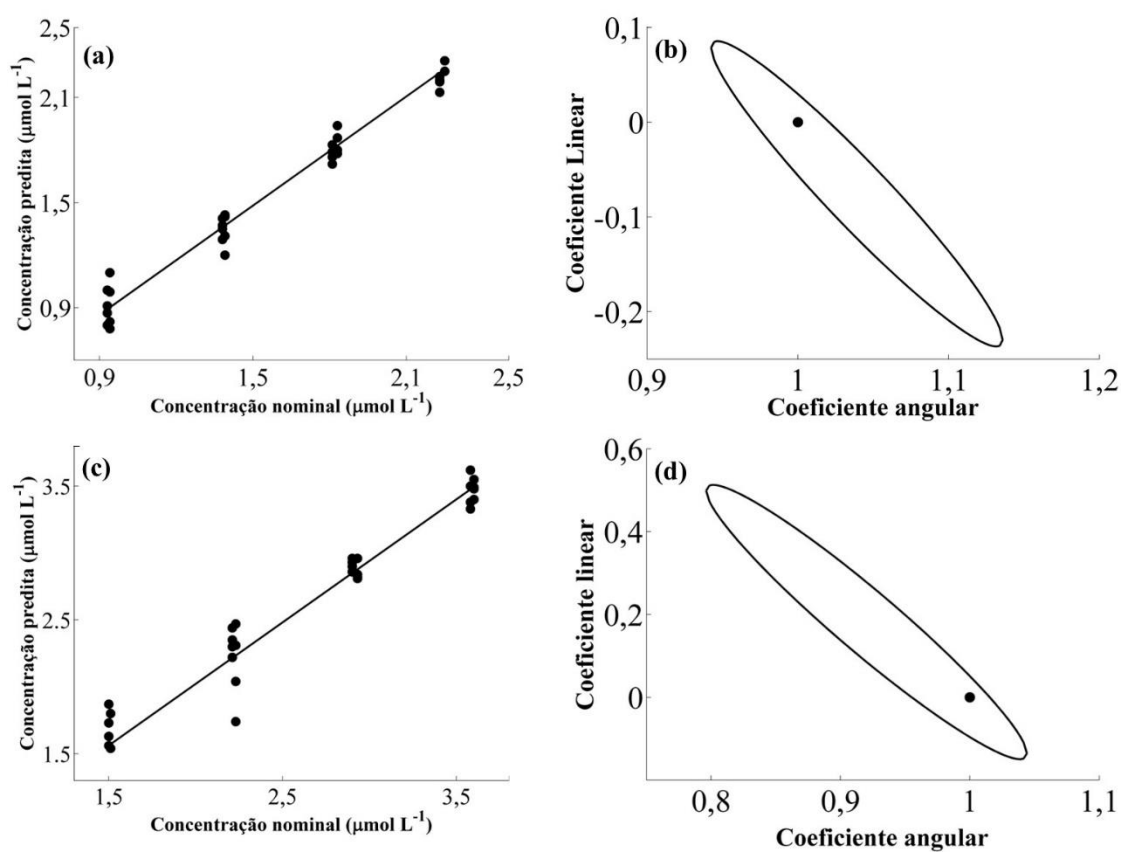


Figura 23 Concentração predita e nominal em vinhos de tiramina **(a)** e espermidina **(c)** e EJCRC para o método proposto para tiramina **(b)** e espermidina **(d)**

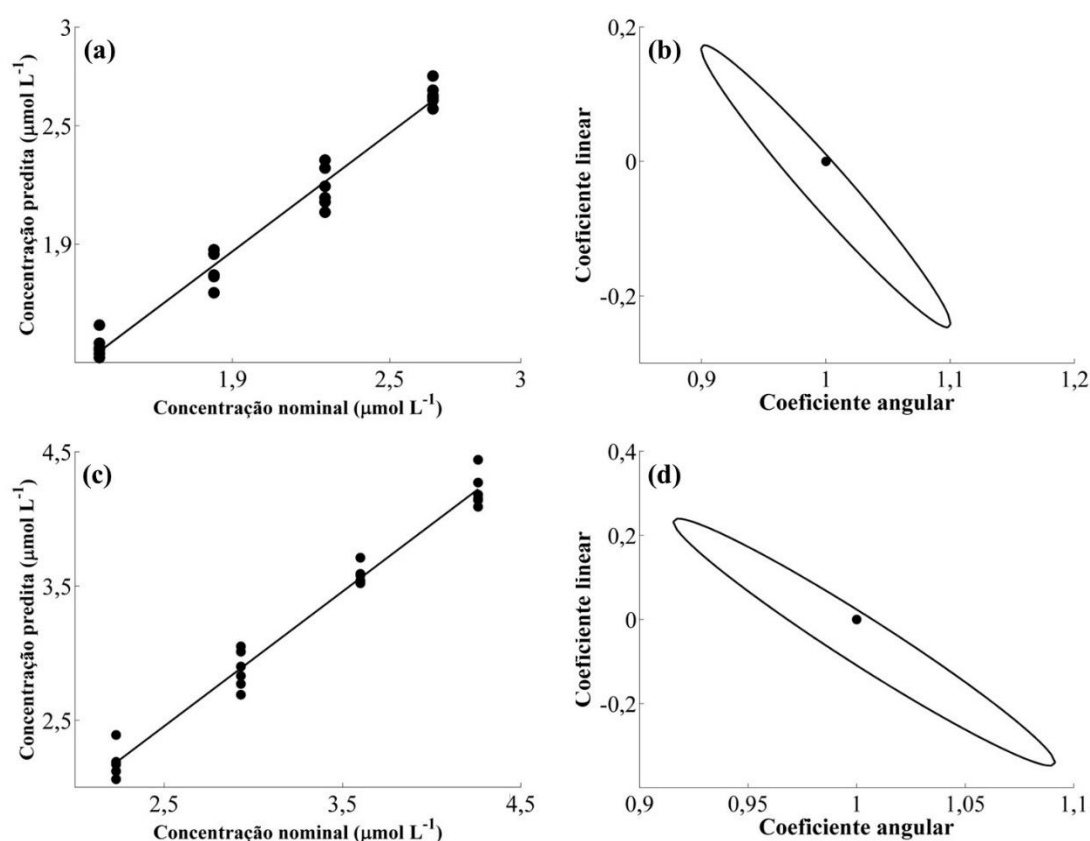


Figura 24 Concentração predita e nominal em cafés solúveis de tiramina (a) e espermidina (c) e EJCRC para o método proposto para tiramina (b) e espermidina (d)

5.13 Análise comparativa do desempenho do método proposto frente a outras abordagens voltamétricas

Até onde sabemos, nenhum estudo reportado na literatura descreveu um método voltamétrico para a determinação simultânea de tiramina e espermidina em vinhos e cafés solúveis. Vale ressaltar, que há poucos estudos na literatura abordando a determinação voltamétrica de espermidina em matrizes alimentares complexas, pois a maioria dos estudos se concentra na análise de soluções padrões, sem considerar a presença de interferentes encontrados nos alimentos (Huang, Chang & Zhu, 2020).

Soares *et al.* (2019) utilizaram um biossensor baseado em uma matriz polimérica derivada de ácido 4-mercaptobenzoico para medir os níveis de tiramina, enquanto Silva, Franco & Santos (2021) empregaram um eletrodo lápis de grafite de carbono. Contudo, até a data deste estudo, nenhum método voltamétrico para determinação individual de espermidina em vinhos e cafés solúveis foi encontrado na literatura. Por outro lado, em amostras de peixes, a determinação foi realizada

utilizando um biossensor baseado em poliamina oxidase/quitosana/zeólitas-AuNPs imobilizado na superfície de eletrodo de ouro ([Chauhan et al., 2017](#)).

Na **Tabela 12** são mostradas comparações entre o método proposto e alguns métodos voltamétricos que determinaram individualmente a tiramina e a espermidina em alimentos e bebidas. Alguns dos sensores mencionados, incorporam elementos biológicos (enzimas). Uma desvantagem relacionada a essas enzimas é a sua sensibilidade à temperatura, exigindo condições de congelamento para manter sua atividade enzimática, o que restringe sua utilização prática na elaboração de biossensores eletroquímicos enzimáticos. Outra limitação é a inibição dessas enzimas em bebidas alcoólicas devido à presença de etanol ([Kashyap et al., 2022](#)). Além disso, esses sensores requerem tempo de síntese prolongado e uso de solventes no processo de modificação.

Portanto, o sensor CPE-ZnPC proposto pode ser preparado e tratado de forma simples e rápida quanto o sensor de lápis de grafite de carbono (PCGE) proposto por [Silva et al. \(2021\)](#). Além disso, o método CPE-ZnPC apresentou LD menor que o sensor PCGE e os demais métodos apresentados na **Tabela 12** e inclui a determinação simultânea desses analitos, com alta estabilidade e excelente desempenho analítico.

Tabela 12 Características analíticas dos métodos voltamétricos proposto e de outros que foram encontrados na literatura.

Analitos	Técnica	Sensor	Amostras	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD (mol L^{-1})	Ref.
Tiramina	CV	GE/TiO ₂ /CMK-3/Náilon/PDDA	Chucrute, banana e queijo camembert	6 - 130	$1,5 \times 10^{-6}$	Kochana <i>et al.</i> (2016)
	DPV	poly(MPAA)/CGL	Vinho	10 - 60	$3,16 \times 10^{-6}$	Soares <i>et al.</i> (2019)
	SWV	PCGE	Vinho	0,6 - 100	6×10^{-7}	Silva <i>et al.</i> (2021)
	SWV	f-MWCNTs-GR/CILPE	Queijo e iogurte	1–1000	5×10^{-7}	Eteya <i>et al.</i> (2023)
Espermidina	CV	PAO/CHIT/zeolites-AuNPs/Au	Peixe	0,2 - 200	1×10^{-7}	Chauhan <i>et al.</i> (2017)
Tiramina + Espermidina	SWV	CPE-ZnPC	Vinho	0,30 – 5,08 Tir. 0,48 – 8,13 Esp.	$4,86 \times 10^{-8}$ Tir. $7,69 \times 10^{-8}$ Esp.	Este trabalho

GE/TiO₂/CMK-3/Nafion/PDDA: eletrodo de grafite imobilizado em TiO₂/CMK-3/Nafion/PDDA; poly(MPAA)/CGL: eletrodo de grafite (carbon graphite lead) modificado com poli(ácido 4-mercaptophenilacético); PCGE: eletrodo de carbono de grafite de lapiseira; f-MWCNTs-GR/CILPE: eletrodo de pasta de líquido iônico de carbono modificado com filme nanocompósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados e grafeno; PAO/CHIT/ zeolites-AuNPs/Au: eletrodo de ouro modificado com poliamina oxidase como elemento de bioreconhecimento, imobilizado sobre uma matriz de quitosana/zeólitas e nanopartículas de ouro;

6. Considerações Finais

Este trabalho descreveu o desenvolvimento de um método para determinar simultaneamente tiramina e espermidina em vinhos e cafés solúveis utilizando o CPE-ZnPC e a técnica SWV. No método proposto a tiramina e a espermidina apresentaram potenciais de oxidação em torno de 0,5 V e 0,86 V, respectivamente, permitindo a determinação simultânea desses analitos com alta sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, estabilidade e rapidez. O efeito de matriz das amostras de vinho e café solúvel foi superado com sucesso utilizando o método de adição padrão.

Excelentes curvas analíticas lineares sem falta de ajuste e bias foram obtidas no intervalo de concentração de 0,30 a 5,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para tiramina e 0,48 a 8,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para espermidina, produzindo baixos LD (48,6 nmol L^{-1} para tiramina e 76,9 nmol L^{-1} para espermidina), com exatidão satisfatória (taxas de recuperação de 86,1 a 107,5%), reprodutibilidade (RSD de 2,6%).

Portanto, o método proposto oferece uma alternativa valiosa, simples e rápida para análises de rotina de tiramina e espermidina em amostras de vinho e café solúvel utilizando instrumentação barata, e nenhuma diferença estatística foi observada em comparação com a quantificação por HPLC. Além disso, não requer nenhum pré-tratamento da amostra, como a derivatização e/ou extração com solventes orgânicos (eluentes), de acordo com os princípios da química verde. Dessa forma, reforça-se a viabilidade de métodos analíticos mais sustentáveis, capazes de substituir com eficiência e confiabilidade os procedimentos convencionais. Os resultados obtidos e discutidos nesta seção foram publicados no periódico *Electroanalysis* ([Anexo II](#)).

Determinação simultânea de ABs por voltametria de onda quadrada em eletrodo de diamante dopado com boro empregando calibração *multiway*

Capítulo 4

7. Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar o perfil voltamétrico da putrescina, cadaverina e histamina utilizando eletrodo de BDD;
- ❖ Otimizar os parâmetros voltamétricos de onda quadrada para assegurar alta sensibilidade na determinação simultânea das ABs;
- ❖ Construir modelos de calibração multivariada baseados em U-PLS e MCR-ALS para cada ABs (putrescina, cadaverina e histamina).
- ❖ Validar os modelos de calibração construídos através de um conjunto de validação composto pela mistura simultânea das ABs (constituente calibrado);
- ❖ Utilizar os modelos de calibração validados para prever as concentrações das ABs em bebidas;
- ❖ Avaliar a confiabilidade do método desenvolvido por comparação com o método de referência, empregando o teste t pareado.

8. Experimental

8.1. Reagentes

As soluções tampão Britton-Robison ($6,0 \leq \text{pH} \leq 10$) foram preparados utilizando ácido bórico (Sigma- Aldrich, USA), ácido acético (Neon, Brasil), ácido fosfórico (Chemis, Brasil), com o pH ajustado ao valor desejado por adição de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich, USA).

8.2 Tratamento eletroquímico do eletrodo de trabalho

O BDD, contendo 8000 ppm de boro, fabricado pelo *Centre Suisse de Electronique et de Microtechnique* (Suíça), com área $14,48 \text{ cm}^2$, foi empregado na quantificação de histamina, putrescina e cadaverina. Antes de cada medição, o BDD foi submetido a um tratamento eletroquímico, baseado nos estudos de Mijajlović *et al.* (2024) e Salazar-banda *et al.*, (2010), aplicando um potencial de $+3,0 \text{ V}$ por 60 segundos (polarização anódica) para limpeza da superfície do BDD, seguida de $-3,0 \text{ V}$ por 120 segundos (polarização catódica) para ativação da superfície, em solução de ácido sulfúrico ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Após essa etapa, foi realizada a estabilização do eletrodo BDD em tampão BR (pH 9,0) utilizando a técnica da CV, com 20 varreduras consecutivas a 100 mVs^{-1} .

8.3 Comportamento eletroquímico da putrescina, cadaverina, histamina e espermidina sob o eletrodo de BDD

O comportamento eletroquímico da putrescina, cadaverina, histamina (todas a $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e espermidina ($20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) foi investigada em soluções individuais no eletrodo BDD empregando-se 10 mL de tampão BR (pH 9,0). As medidas foram realizadas por SWV sob as seguintes condições experimentais: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 25 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 7 \text{ mV}$, $a = 70 \text{ mV}$ e janela de varredura $\Delta E_w = +0,8 \text{ a } +1,4 \text{ V}$.

Os experimentos realizados permitiram analisar os perfis voltamétricos individuais de cada analito, identificando seus potenciais de oxidação e verificando a capacidade do BDD em promover respostas bem definidas mesmo para aminas de baixo eletroatividade, como putrescina e cadaverina.

8.4 Estudo de pH

Para o estudo do efeito do pH, foram analisadas soluções individuais contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de putrescina, cadaverina e histamina. O eletrólito de suporte utilizado foi o tampão BR, cujo pH foi ajustado na faixa de 6 a 10, por meio da adição de hidróxido de sódio. As medidas foram realizadas por SWV sob as seguintes condições experimentais: $t_r = 5 \text{ s}$, $f = 25 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 7 \text{ mV}$, $a = 70 \text{ mV}$.

8.5 Estudo de velocidade

A influência da velocidade de varredura na cinética das reações de oxidação de ABs foi investigada no eletrodo BDD mediante aquisição de voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (10 a 200 mV s^{-1}). Foram analisadas soluções individuais contendo $46 \mu\text{mol L}^{-1}$ de putrescina, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de histamina e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cadaverina em tampão BR (pH 9,0). As medidas foram obtidas com incremento de potencial de 1 mV .

8.6 Estudo dos parâmetros

Para o desenvolvimento do método analítico, foi realizado a otimização dos parâmetros SWV para melhorar significativamente o sinal voltamétrico (intensidade da corrente). O estudo foi conduzido separadamente para cada ABs (putrescina, histamina e cadaverina), utilizando soluções de $7,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada analito em tampão BR (pH 9,0). Os parâmetros experimentais avaliados foram: frequência (10 a 100 s^{-1}), amplitude de pulso (10 a 70 mV) e incremento de potencial (1 a 10 mV).

8.7 Conjuntos de calibração

Os dados voltamétricos de segunda ordem foram obtidos a partir de varreduras de SWV executadas em seis amplitudes diferentes, no intervalo de 20 a 70 mV , com incrementos de 10 mV . Todas as medições voltamétricas, realizadas em triplicata, tiveram seus dados organizados em matrizes bidimensionais (amplitude $\times$ potencial) para cada nível de concentração da solução padrão de putrescina, histamina e cadaverina. A partir dessas matrizes, foi construído um tensor de dados (amplitude $\times$ potencial $\times$ corrente) que foi utilizado na modelagem MCR-ALS e U-PLS.

No conjunto de calibração, cada solução padrão de histamina, putrescina e cadaverina foi preparada individualmente. As soluções foram preparadas em triplicata

e em sete níveis de concentração, variando de 0,92 a 7,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando tampão BR (pH 9,0), sendo as diluições efetuadas diretamente na cela eletroquímica.

8.8 Tratamento dos dados experimentais

Após as medidas voltamétricas, foi realizado a correção da linha de base do conjunto de dados por meio da rotina de Regressão Spline dos Mínimos Quadrados Assimétricos (do inglês, *Asymmetric Least Squares Spline Regression* - AsLSSR) empregando os seguintes parâmetros: fator de assimetria (p) de 0,001 e fator de suavização (λ) de 1×10^7 . Quando necessário, o deslocamento dos sinais voltamétricos foi corrigido através do alinhamento por correção otimizada (do inglês, *Correlation Optimized Warping* - COW). Em seguida, os modelos de calibração U-PLS/RBL e MCR-ALS foram construídos utilizando a interface MVC2 desenvolvida por Olivieri *et al.* (2009). Todos os dados foram tratados no Matlab R2010a.

9. Resultados e Discussão

9.1. Resposta eletrocatalítica das ABs

De acordo com o estudo de interferentes apresentado no **Capítulo 3** (Seção 5.11), as ABs avaliadas neste capítulo (putrescina e cadaverina) não apresentaram resposta eletroquímica no CPE modificado com ZnPC, ao contrário do observado para histamina e espermidina que se mostraram eletroativas. A eletroatividade da espermidina, verificada tanto no eletrodo ZnPC-CPE quanto no eletrodo BDD, é atribuída à presença do grupo amina secundária em sua estrutura, que apresenta o menor valor de pK_a ($\approx 8,2$), favorecendo sua desprotonação e subsequente oxidação eletroquímica no ZnPC-CPE.

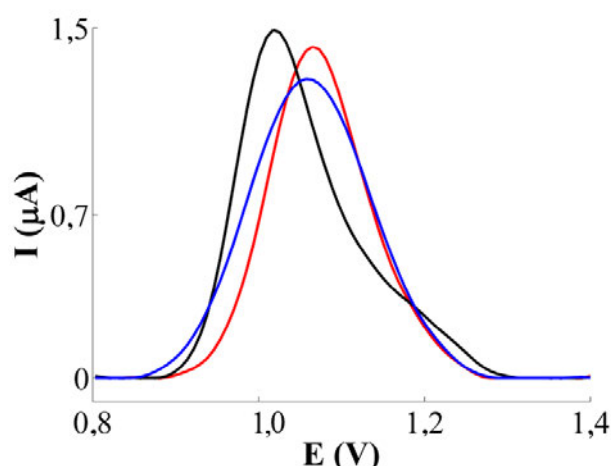


Figura 25. SWV utilizando eletrodo BDD em tampão BR (pH 9,0) para soluções contendo $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada ABs (putrescina, cadaverina e histamina), analisadas individualmente.

Conforme mostrado na **Figura 25**, a histamina, putrescina e cadaverina apresentaram picos anódicos em potenciais muito próximos quando analisadas com o eletrodo BDD em tampão BR (pH 9,0), apresentando sinais fortemente sobrepostos nos voltamogramas obtidos por SWV (**Figura 25**). Essa sobreposição dificulta a determinação simultânea dos três analitos, uma vez que seus potenciais de oxidação são convergentes. Diante desse desafio, torna-se necessário o emprego de técnicas de calibração *multiway*, as quais têm se mostrado eficazes para resolver sinais eletroquímicos sobrepostos, permitindo a quantificação seletiva e precisa desses analitos em matrizes complexas.

9.2. Estudo de velocidade

Foram analisadas soluções individuais contendo $46 \mu\text{mol L}^{-1}$ de putrescina (**Figura 26a**), $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de histamina (**Figura 26c**) e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cadaverina (**Figura 26d**) em diferentes velocidades de varreduras empregando CV. Os resultados demonstraram uma boa linearidade dos gráficos de corrente de pico versus velocidade de varredura (i_p vs. v) para putrescina (**Figura 26b**) e cadaverina (**Figura 26d**), indicando que, para ambas as ABs, o processo de oxidação foi controlado por adsorção, enquanto para a histamina, exibiu uma relação linear entre a i_p e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), o que caracteriza um processo controlado por difusão. Ademais, os voltamogramas cíclicos (**Figura 26**) não exibiram picos

catódicos no sentido inverso da varredura, caracterizando a irreversibilidade dos processos de oxidação das ABs sob as condições experimentais empregadas.

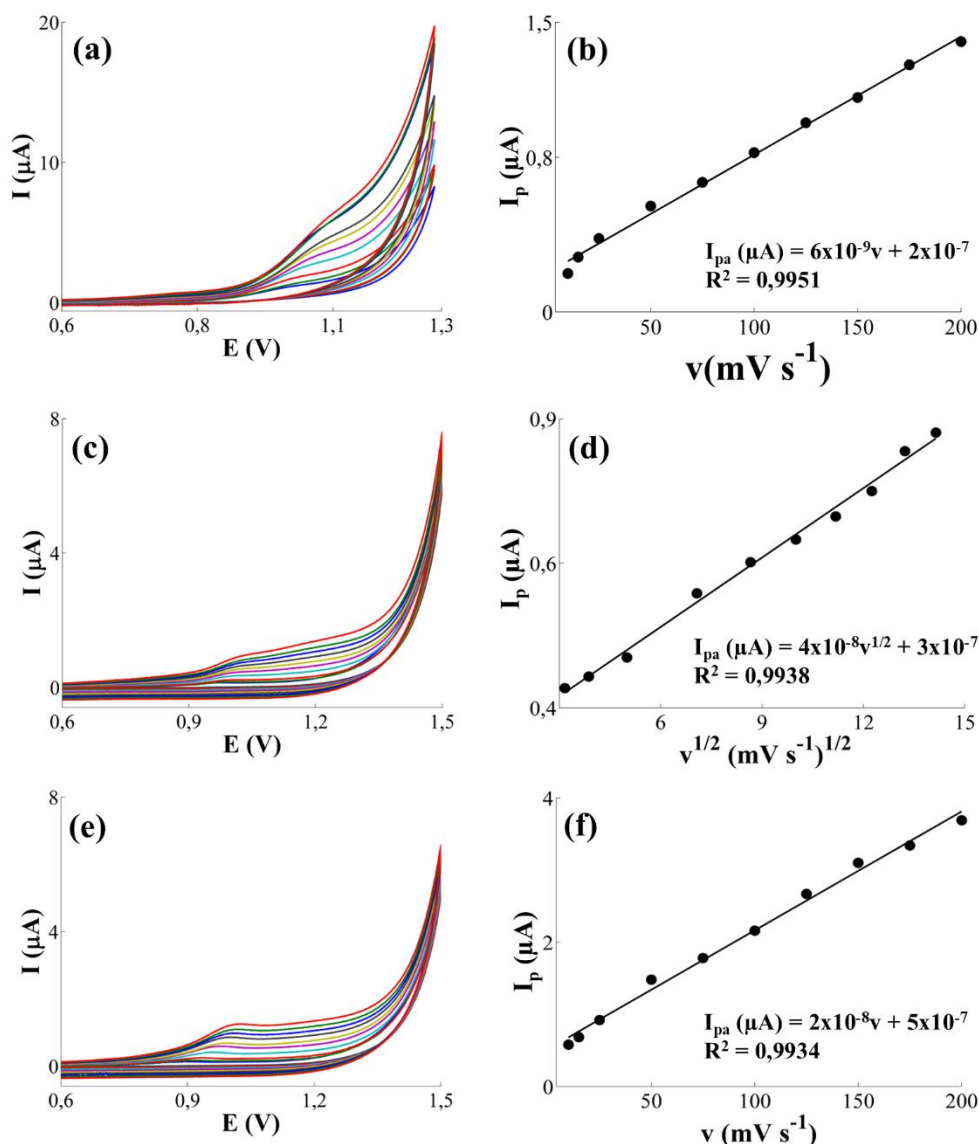


Figura 26. Medidas CV em eletrodo BDD usando $46 \mu\text{mol L}^{-1}$ de putrescina (a), $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de histamina (c) e cadaverina (e) em tampão BR (pH 9) em diferentes velocidades de varredura (10 a 200 mV s^{-1}). Relação de I_p vs. v (mV s^{-1}) para putrescina (b) e cadaverina (f) e Relação de I_p vs. $v^{1/2}$ ($\text{mV s}^{-1})^{1/2}$ para histamina (d)

9.3. Estudo de pH

O comportamento eletroquímico das ABs foi estudado em resposta às variações de pH do tampão BR, demonstrando que tanto o potencial quanto a corrente de pico são fortemente dependentes do meio (Figura 27). Verificou-se que o aumento do pH promove o deslocamento dos potenciais de pico para valores menos positivos,

indicando a participação de prótons no mecanismo de oxidação dessas ABs no eletrodo BDD. A relação entre o potencial de pico e o pH do tampão BR apresentou comportamento linear, conforme mostrado na **Figura 27** para putrescina (**b**), histamina (**d**) e cadaverina (**f**). As inclinações obtidas das regressões lineares mostraram-se próximas do valor teórico previsto pela equação de Nernst, corroborando que a reação eletroquímica envolve um número igual de prótons e elétrons.

Conforme apresentado na **Figura 27a**, o pH ótimo para a análise da putrescina no BDD foi 10. Em contrapartida, para histamina e cadaverina nesse mesmo eletrodo requer condições de pH 9. Diante da necessidade de uma determinação simultânea dessas ABs, foi selecionado o pH 9 por proporcionar respostas voltamétricas com a sensibilidade analítica necessária.

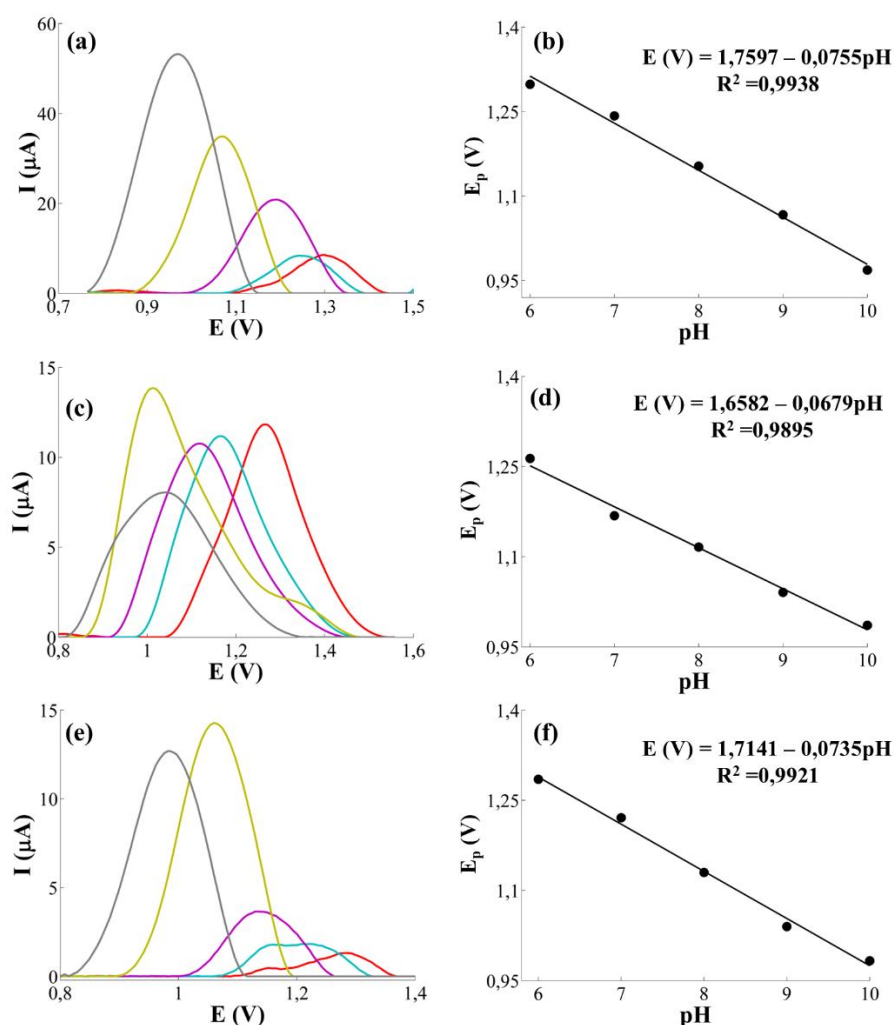


Figura 27. Voltamogramas de SW de 10 $\mu mol L^{-1}$ de putrescina (**a**), histamina (**c**) e de cadaverina (**e**) em tampão BR com pH variando de 6 a 10. Gráficos E_p (potencial de pico) versus pH de putrescina (**b**), histamina (**d**) e cadaverina (**f**). pH 6 (—), pH 7 (—), pH 8 (—), pH 9 (—), pH 10 (—).

9.4. Estudo dos parâmetros

A **Figura 28** apresenta os voltamogramas SWV obtidos para as ABs em resposta às variações de amplitude, incremento e frequência. Pode ser observado que o aumento da frequência e incremento resultaram no ganho de corrente de pico. Diante desse comportamento, a frequência de 70 Hz, incremento de 8 mV e amplitude de 70 mV foram selecionados como condição ótima, assegurando uma resposta voltamétrica mais sensível.

A alteração no intervalo da amplitude de pulso exerceu influência direta sobre os potenciais de pico. Em conformidade com o comportamento eletroquímico irreversível observado, o aumento da amplitude promoveu não apenas o crescimento da corrente de pico, mas também deslocamentos dos potenciais e alterações na largura de meia-altura dos picos. Considerando o impacto significativo da amplitude na forma e intensidade do sinal (**Figura 28a, 28d, 28g**), a aquisição dos dados de segunda ordem foi utilizando a amplitude como parâmetro de variação por SWV no intervalo de 20 a 70 mV.

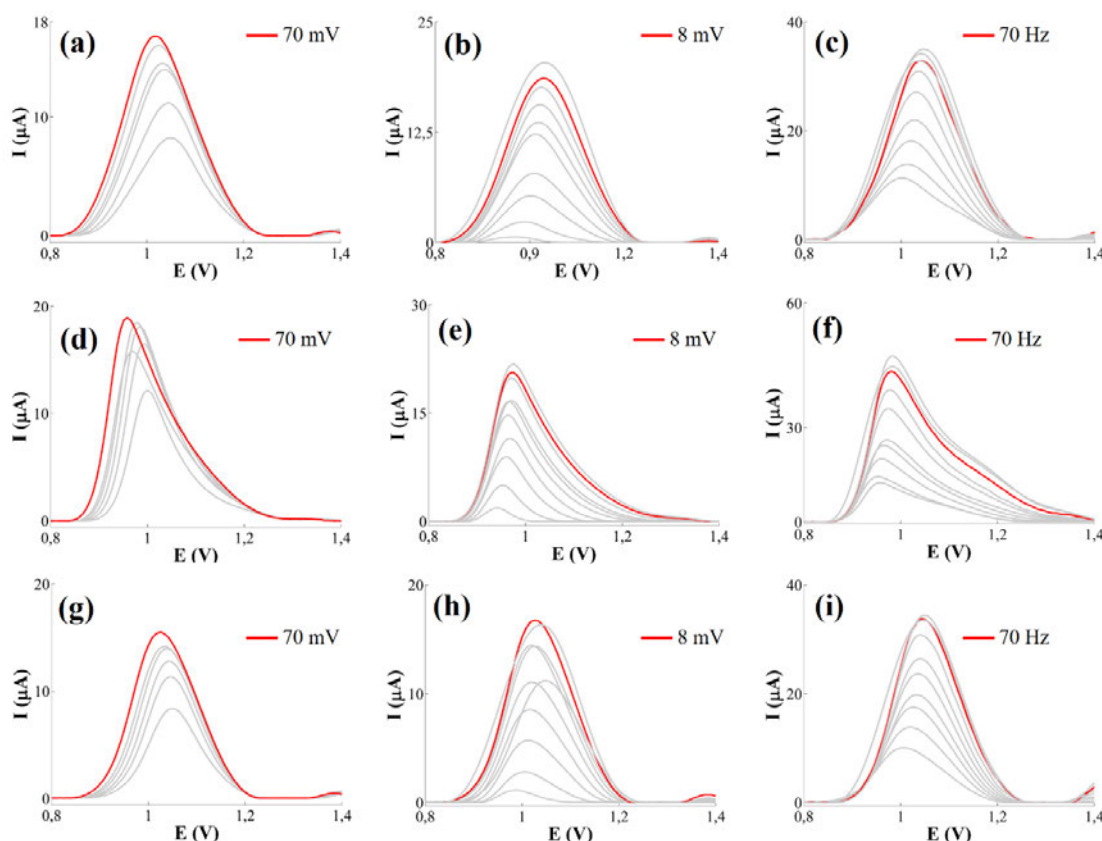


Figura 28 Estudo de otimização dos parâmetros experimentais usando medições de SWV em solução individual de $7,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ de putrescina (**a, b, c**), histamina (**d, e, f**) e cadaverina (**g, h, i**) em tampão BR (pH 9) obtidos em uma faixa de amplitude de

pulso de 20 a 70 mV **(a, d, g)**, um incremento de potencial de 1 a 10 mV **(b, e, h)** e frequência de 10 a 100 s⁻¹ **(c, f, i)**, e, fixando os demais parâmetros de SWV.

9.5 Curvas Analíticas (calibração multivariada de 1ª ordem)

Sob as condições otimizadas do método voltamétrico, a resposta do eletrodo BDD foi avaliada em função da concentração das ABs (putrescina, histamina e cadaverina). Observou-se uma relação linear no intervalo de 0,92 a 7,46 µmol L⁻¹ em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 9), apresentado na **Figura 29**.

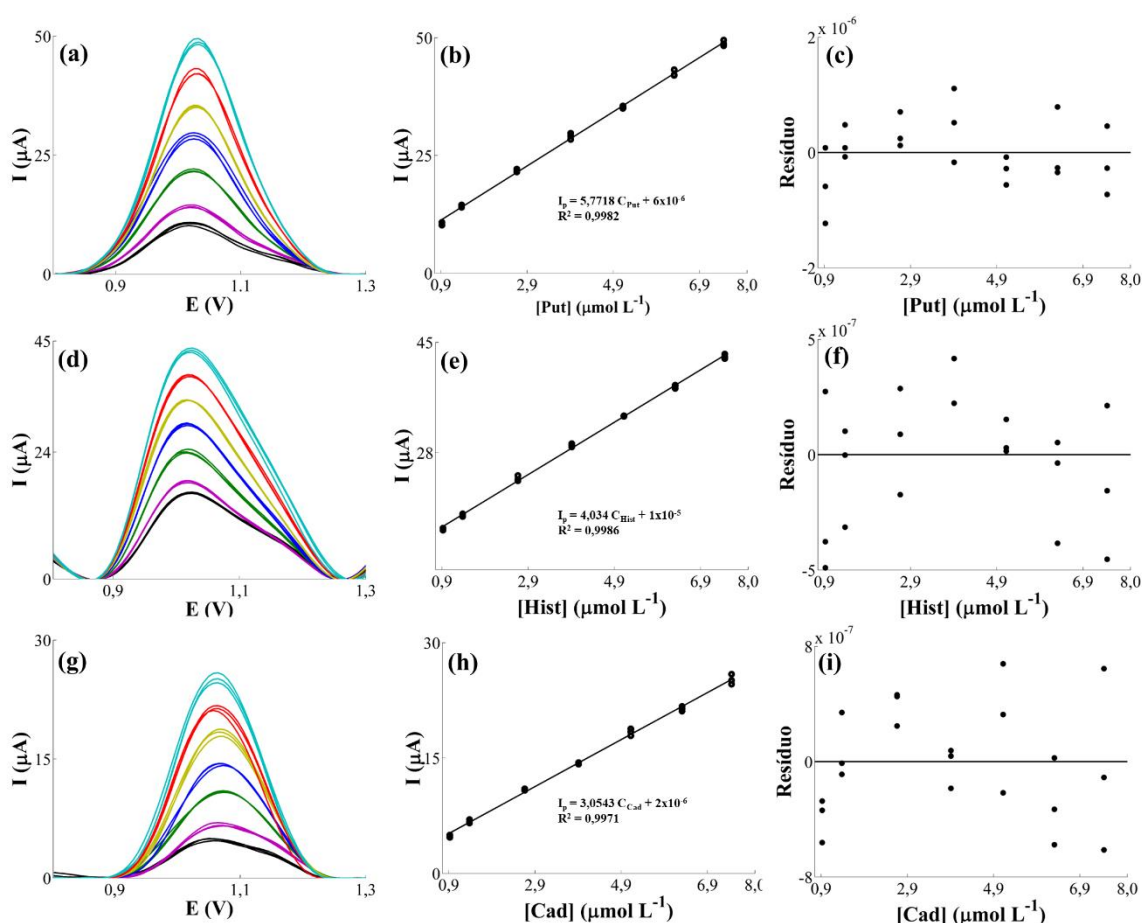


Figura 29 Voltamogramas de SW em triplicata usando o sensor BDD, curvas analíticas resultantes e gráficos de resíduos de putrescina **(a, b,c)**, histamina **(d, e, f)** e cadaverina **(g, h, i)** com concentrações variando de 0,92 a 7,46 µmol L⁻¹ em tampão BR (pH 9). Parâmetros SWV: $f = 70$ Hz, $\Delta E_s = 8$ mV, $a = 70$ mV.

A distribuição aleatória dos resíduos em torno de zero, observada nas Figuras **29c**, **29f** e **29i**, demonstra que os dados das curvas analíticas de putrescina, histamina e cadaverina apresentam comportamento homocedástico, isto é, não apresentam estrutura sistemática que indique falta de ajuste do modelo (Neto, Scarmínio & Bruns,

2006). A aplicação da ANOVA e um teste F a um nível de confiança de 95% (Tabela 13), corroborou com esse resultado, confirmando a ausência de falta de ajuste ($F_{\text{cal}} < F_{\text{crit}}$) e a significância da regressão linear na faixa de concentração avaliada ($F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$).

Tabela 13 Resultados da ANOVA obtidos com significância de 5% nas curvas analítica

Fonte de variação	Analitos	Média Quadrática	F_{crit}
Regressão ($MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{re}}$)	histamina	20740,40	4,38
	putrescina	11091,58	
	cadaverina	6489,47	
Falta de ajuste ($MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$)	histamina	2,14	2,96
	putrescina	1,96	
	cadaverina	2,43	

Os LDs obtidos foram de 50 nmol L⁻¹ para histamina, 58 nmol L⁻¹ para putrescina e 100 nmol L⁻¹ para cadaverina, enquanto os LQs corresponderam a 330 nmol L⁻¹ para histamina, 347 nmol L⁻¹ para putrescina e 440 nmol L⁻¹ para cadaverina. O método proposto, baseado em SWV utilizando eletrodo BDD, demonstrou bom desempenho analítico comparável ou superior ao de outros métodos voltamétricos reportados na literatura, que dependem de modificações nos sensores ou etapas de pré-tratamento de amostras. Por exemplo, Henao-Escovar *et al.*, (2016) propuseram um método amperométrico para quantificação simultânea de histamina e putrescina, devido a ação específica das enzimas imobilizadas no eletrodo de carbono serigrafado que atingiu LD de 8,1 µmol L⁻¹ para histamina e 10 µmol L⁻¹ para putrescina. Em contrapartida, um sensor não-enzimático baseado em eletrodo GCE com poli(vermelho neutro) alcançou LD de 0,25 µmol L⁻¹ para putrescina e 0,22 µmol L⁻¹ para cadaverina (Kumar *et al.*, 2021). Em comparação com esses estudos, o método proposto não só apresenta maior sensibilidade para ABs estudadas, mas também prescinde de etapas laboriosas como modificação camada por camada e do uso de biomoléculas, oferecendo uma alternativa mais simples, robusta e rápida para a detecção simultânea de ABs.

Os voltamogramas das curvas analíticas individuais apresentaram picos de oxidação bem definidos em 1,03 V, 1,02 V e 1,06 V para putrescina, histamina e putrescina, respectivamente (Figura 29). Apesar da resposta linear satisfatória observada para cada AB, a presença simultânea desses analitos resulta em

acentuada sobreposição dos sinais voltamétricos, impedindo a determinação simultânea por calibração univariada. Para superar esta limitação, foi aplicado um tratamento quimiométrico baseado em calibração *multiway*, empregando os algoritmos UPLS/RBL e MCR-ALS, conforme descrito nas seções subsequentes.

9.6 Pré-tratamento de dados

Devido à ausência de respostas eletroativas nos intervalos de 0,4 a 0,8 V e 1,3 a 1,4 V (**Figura 30a, 30d, 30g**), essas regiões foram excluídas e os procedimentos quimiométricos foram realizados na região de 0,8 a 1,3 V, correspondente à região eletroativa das ABs estudadas. Nos dados voltamétricos, é comum a ocorrência de deslocamentos nos potenciais de pico e de flutuações na linha de base, decorrentes dos fenômenos na superfície eletrodo. Esses comportamentos intrínsecos podem comprometer a linearidade dos sinais e aumentam a complexidade da modelagem quimiométrica (**Jalalvand, 2022**). Para resolver essas interferências, os dados foram submetidos à correção de linha de base (**Figura 30b, 30e, 30h**) e correção de deslocamento de potencial de pico (**Figura 30c, 30f, 30h**), por meio da aplicação dos algoritmos AsLSSR e COW, respectivamente. Após os dados pré-processados, os algoritmos MCR-ALS e U-PLS/RBL foram empregados para construção dos modelos de calibração de três vias.

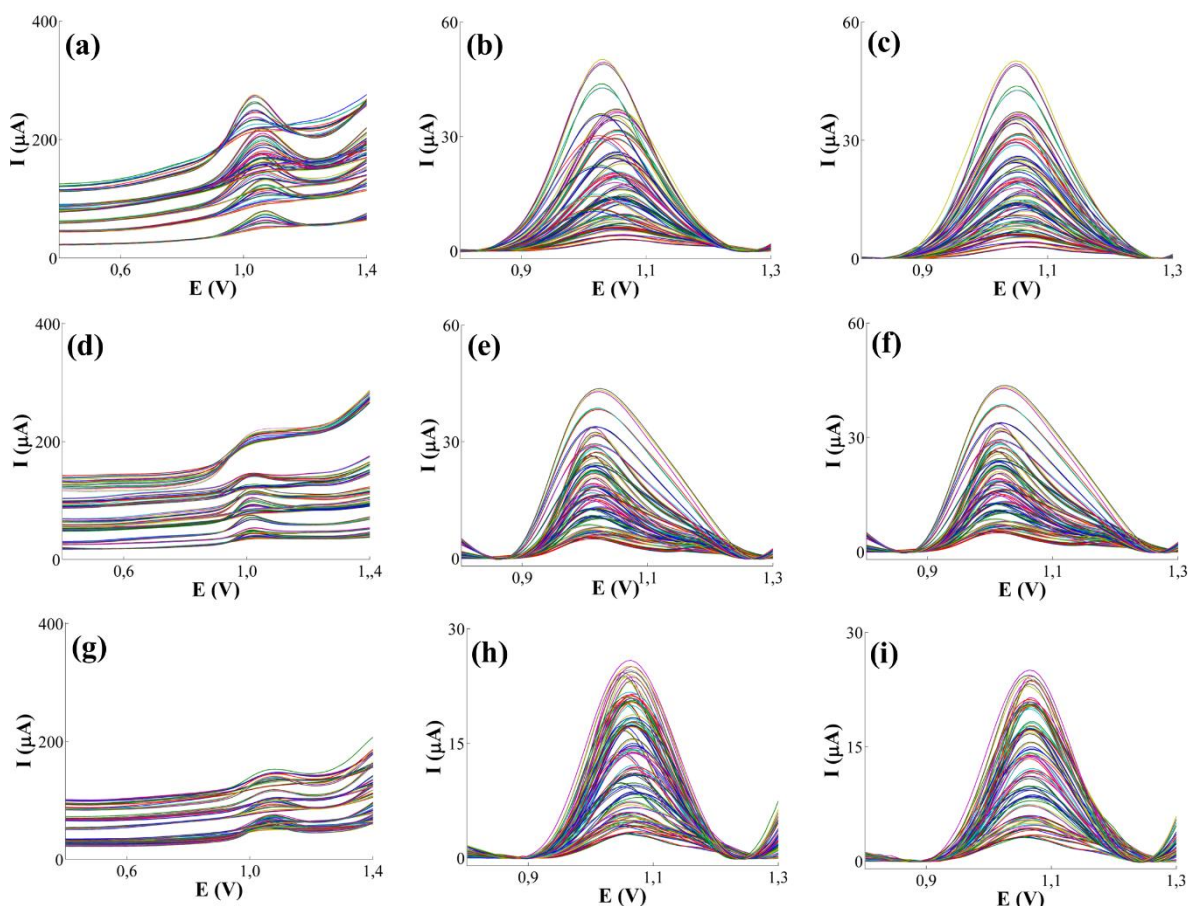


Figura 30. Voltamogramas de SW obtidos em eletrodo BDD em tampão BR (pH 9) para os conjuntos de calibração de putrescina (a-c), histamina (d-f) e cadaverina (g-i). SWV antes (a, d, g) e após correção de linha de base por algoritmo AsLSSR (b, e, h) e do deslocamento usando COW (c, e, f). Parâmetros SWV: $\Delta E_s = 8$ mV, $f = 70$ mV, $\Delta E_w = 0,8$ a $1,3$ V e $a = 20$ a 70 mV.

9.7 Análise por MCR-ALS

Para construção do modelo MCR-ALS, foi realizado a transformação do tensor de dados tridimensional (amplitude x potencial x corrente) em uma matriz aumentada na dimensão correspondente à quebra de trilinearidade. Nessa etapa, à amplitude foi utilizada para integrar os blocos de dados, no modo coluna, organizando-os de forma sequencial para gerar a matriz aumentada. A partir dessas matrizes aumentadas, o número de componentes principais (PCs) foi determinado por meio da decomposição em valores singulares (SVD), a fim de avaliar a variância explicada e o ajuste residual.

Os modelos de calibração MCR-ALS desenvolvidos para cada analito foram inicialmente avaliados por validação interna, isto é, empregando o próprio conjunto de calibração (cal *versus* cal). Esse procedimento teve como objetivo verificar, de forma preliminar, a capacidade preditiva de cada modelo. Conforme apresentado na **Tabela 14**, para todos os modelos apenas uma componente principal foi suficiente para

descrever quase toda informação química, isto é, a primeira componente contém a maior variância explicada.

Tabela 14 Resultados da variância explicada e do ajuste residual obtidos conforme os números de componentes incluídas no modelo MCR-ALS nos conjuntos de calibração

PC	Putrescina		Histamina		Cadaverina	
	Variância. Exp. (%)	Ajuste Res.*	Variância. Exp. (%)	Ajuste Res.*	Variância. Exp. (%)	Ajuste Res.*
1	97,9720	0,5100	96,91	0,72	96,0520	0,3640
2	1,82070	0,4870	2,13	0,67	3,3080	0,5540
3	0,0875	0,3730	0,75	0,47	0,2610	0,4310
4	0,0290	0,3280	0,07	0,4	0,1780	0,3170
5	0,0228	0,2860	0,05	0,33	0,0730	0,2550
6	0,0186	0,2460	0,04	0,27	0,0300	0,2260
7	0,0129	0,2130	0,03	0,2	0,0210	0,2020
8	0,0070	0,1940	0,01	0,17	0,0190	0,1780
9	0,0053	0,1770	0,004	0,16	0,0110	0,1630
10	0,0040	0,1630	0,004	0,15	0,0080	0,1510

*Ajuste Res: Ajuste Residual (10^{-6} mol L⁻¹)

Na **Figura 31** demonstra um bom ajuste entre as concentrações previstas e nominais da putrescina, histamina e cadaverina determinadas para o modelo MCR-ALS. A partir dessas concentrações, foi construída a EJCR por meio da regressão dos mínimos quadrados ordinários. A elipse (com 95 % de confiança) contém o ponto ideal (inclinação = 1 e intercepto = 0), demonstrando que nenhum erro sistemático foi observado com o método proposto.

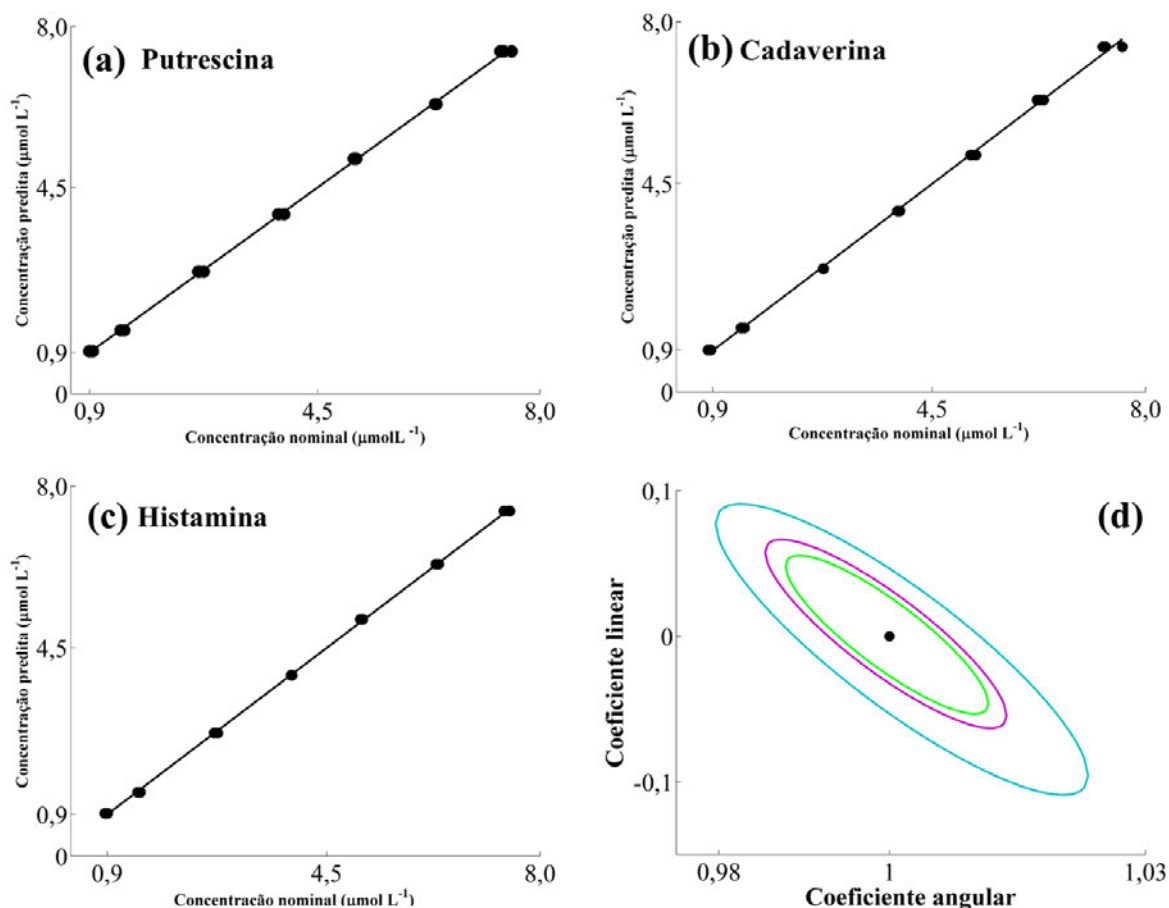


Figura 31 Concentração predita versus nominal e EJCR para o modelo MCR-ALS

9.8 Análise por U-PLS/RBL

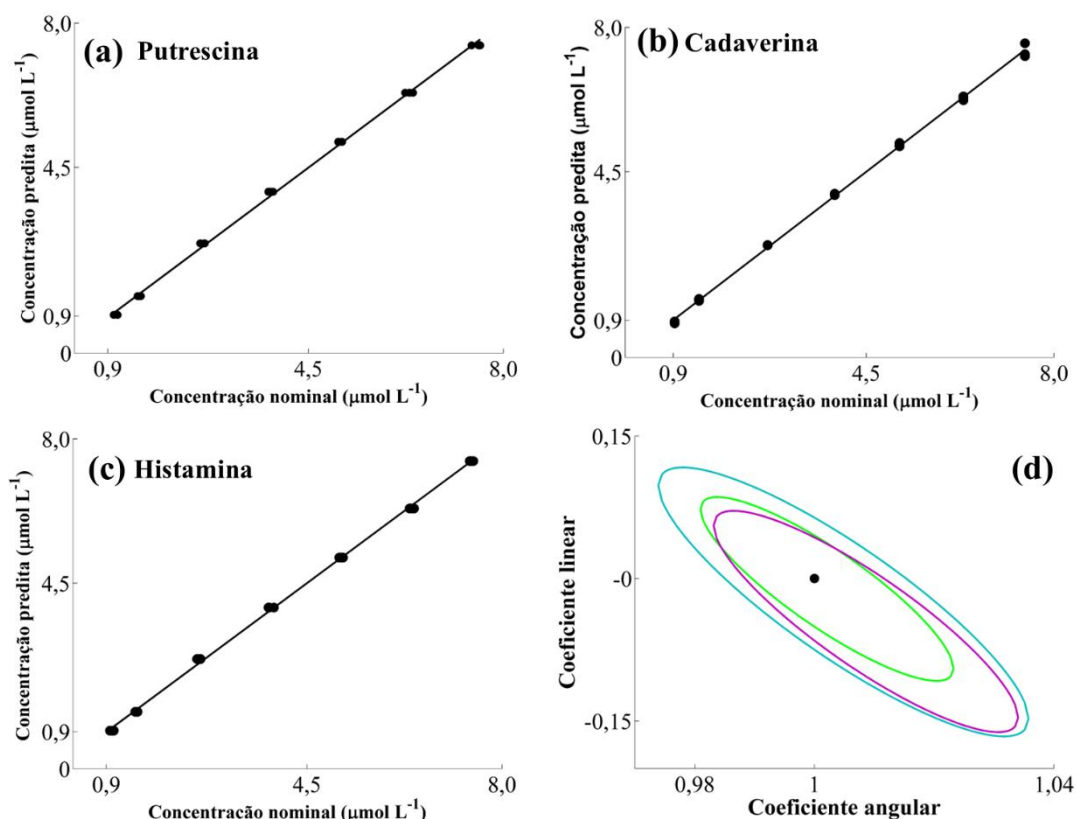
O conjunto de calibração composto apenas pelas soluções padrão para o modelo U-PLS foi obtido mediante o desdobramento do tensor original ($21 \times 6 \times 69$) em uma matriz bidimensional (21×414). Em seguida, para o conjunto de calibração, foi determinado o número ótimo de variáveis latentes (VLs), a partir da soma quadrática dos erros de predição (PRESS) *versus* o número de VLs incluídas no modelo U-PLS obtido por validação cruzada (**Tabela 15**).

Nos conjuntos de calibração, o modelo U-PLS desenvolvido para cada analito apresentou apenas uma variável latente e nenhuma etapa de bilinearização, indicando que uma VL foi suficiente para descrever a variabilidade dos dados, com probabilidade inferior a 75% ($p < 0,75$) e a distribuição F de *Snedecor* (F) foi ≥ 1 . Esse resultado era esperado, considerando que o conjunto de calibração foi constituído apenas por soluções padrão individuais de putrescina, cadaverina e histamina.

Tabela 15. Resultados da validação cruzada nos conjuntos de calibração U-PLS

		Número de VLs				
		1	2	3	4	5
Putrescina	PRESS	0,0241	1,8702	1,7891	2,1185	2,0902
	F	0,61	0,54	0,5	-	-
	P	1,1409	1,0453	1,0	-	-
Histamina	PRESS	0,03059	0,03102	0,3282	0,0488	0,0458
	F	1,01	1,00	-	-	-
	P	0,51	0,5	-	-	-
Cadaverina	PRESS	0,09232	0,9407	0,14572	0,1278	0,1780
	F	1,5784	1,0190	1,000	-	-
	P	0,64	0,51	0,5	-	-

Assim, empregando uma única variável latente para cada amina, avaliou-se a relação entre as concentrações previstas e nominais, juntamente com a EJCR. A excelente correlação linear observada entre os valores de concentração predita versus nominal (**Figura 32**) confirma a validade estatística dos modelos U-PLS/RBL, uma vez que não foi identificado viés em relação à condição ideal (inclinação = 1; intercepto = 0).

**Figura 32.** Concentração predita versus nominal e EJCR para o modelo UPLS.

10. Considerações Finais

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, a viabilidade de determinar simultaneamente putrescina, cadaverina e histamina por meio da SWV associada a modelos quimiométricos de segunda ordem, utilizando os algoritmos MCR-ALS e U-PLS. Os modelos construídos para soluções padrão individuais mostraram-se lineares na faixa de 0,92 a 7,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No MCR-ALS, uma única componente foi suficiente para descrever os dados, enquanto o U-PLS requereu apenas uma variável latente para representar a variabilidade das amostras. Ademais, as etapas de calibração e validação são importantes para aprimorar a seletividade do método diante da presença de picos sobrepostos das ABs observados neste estudo. Apesar dos desafios ainda existentes, os resultados obtidos apontam caminhos promissores para o aperfeiçoamento da metodologia proposta e reforçam seu potencial como base para futuras pesquisas voltadas à análise simultânea de aminas biogênicas em matrizes complexas.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

CAPÍTULO 5

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

Neste estudo, as duas abordagens propostas apresentaram resultados promissores. No primeiro, foi desenvolvido um sensor de CPE modificado com ZnPC, capaz de determinar simultaneamente espermidina e tiramina em vinhos e cafés solúveis. O sensor apresentou picos bem distantes em meio alcalino (pH 9,2) e excelente potencial eletrocatalítico para oxidação dessas ABs, com baixos limites de detecção e aplicabilidade em amostras reais por meio do procedimento MSA, sem diferença estatisticamente significativa em relação aos resultados obtidos por HPLC. Diferentemente de sensores enzimáticos ou baseados em compósitos complexos, o sensor proposto apresenta procedimento de preparação simples e rápida (~30 min), excelente reprodutibilidade e elevada estabilidade.

No segundo estudo, os dados voltamétricos (SWV), obtidos com eletrodo BDD, foram modelados via algoritmos de segunda ordem (U-PLS e MCR-ALS) para explorar a vantagem de segunda ordem. Foram construídos modelos individuais de calibração para putrescina, cadaverina e histamina na faixa de 0,92–7,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$, os quais mostraram bom desempenho analítico. No entanto, a validação em amostras reais não foi avaliada, devendo ser abordada em trabalhos futuros.

Em conclusão, essa tese permitiu o desenvolvimento de metodologias inovadoras voltadas à obtenção de dados multivariados de primeira e segunda ordem. Os resultados demonstram que (i) o sensor modificado (CPE-ZnPC) tem preparo simples e de baixo custo e podem fornecer respostas seletivas e reprodutíveis para certas ABs em vinhos e cafés solúveis e (ii) o uso de sensor convencional (BDD) aliado a algoritmos de calibração de segunda ordem podem resolver sinais fortemente sobrepostos, oferecendo uma estratégia promissora para futuras validações e aplicações no monitoramento de qualidade de bebidas.

6.1 Perspectivas

- Quantificar os teores de tiramina e espermidina em amostras de cafés solúveis por HPLC e compará-los ao método CPE-ZnPC-SWV, empregando o teste t pareado.
- Validar os modelos de calibração de segunda ordem;

- Aplicar os modelos de calibração de segunda ordem na análise de ABs em amostras de bebidas;
- Avaliar a confiabilidade dos resultados obtidos pelo método proposto com os resultados obtidos no(s) método(s) de referência.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABICS. Associação Brasileira da Indústria de Café Solúvel, 2023. Disponível em: <https://www.abics.com.br/wp-content/uploads/2023/03/Relatorio-do-Cafe-Soluvel-do-Brasil-2022-1.pdf> . Acesso em: 15 Dez. 2023.
- ADAMS, R.N. "Carbon paste electrodes". **ACS Publications**, v. 30: 1, 1958
- ALIAÑO-GONZÁLEZ, M. J., & CANTOS-VILLAR, E. Exploring the Impact of Viticultural and Winemaking Factors on Amino Acids and Biogenic Amines in Wine: A Comprehensive Review. **Food Reviews International**, v. 41(1), p. 291–322, 2024. <https://doi.org/10.1080/87559129.2024.2398645>
- ALMEIDA, R. H.D., MONROY-GUZMÁN, F., ARGANIS JUÁREZ, C. R., MANRÍQUEZ ROCHA, J., BUSTOS, E.B. Electrochemical detector based on a modified graphite electrode with phthalocyanine for the elemental analysis of actinides. **Chemosphere**, v. 276, p. 130114, 2021.
- AL-OGAIDI, A. J. M., STEFAN-VAN STADEN, R.-I., GUGOASA, L. A., ROSU, M.-C., SOCACI, C. Electrochemical Determination of the KRAS Genetic Marker for Colon Cancer with Modified Graphete and Graphene Paste Electrodes. **Analytical Letters**, v. 51, p. 2820–2832, 2018.
- AMIN, M., TANG, S., SHALAMANOVA, L., TAYLOR, R. L., WYLIE, S., ABDULLAH, B. M., & WHITEHEAD, K. A. Polyamine biomarkers as indicators of human disease. **Biomarkers**, v. 26, p. 77–94, 2021.
- ARAI, K., TERASHIMA, H., AIZAWA, S., TAGA, A., YAMAMOTO, A., TSUTSUMIUCHI, K., KODAMA, S. Simultaneous Determination of Trigonelline, Caffeine, Chlorogenic Acid and Their Related Compounds in Instant Coffee Samples by HPLC Using an Acidic Mobile Phase Containing Octanesulfonate. **Analytical Sciences**, v. 31, p. 831–835, 2015.
- BALMER, R. S., BRANDON, J. R., CLEWES, S. L., DHILLON, H. K., DODSON, J. M., FRIEL, I., WOOLLARD, S. M. Chemical vapour deposition synthetic diamond: materials, technology and applications. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 21(36), p. 364221, 2009.
- BAYRAK, R., ATAŞEN, S. K., YILMAZ, I., YALÇIN, İ., ERMAN, M., ÜNVER, Y., & DEĞİRMENCIOĞLU, İ. Synthesis and Spectro-Electrochemical Properties of New Metallophthalocyanines Having High Electron Transfer Capability. **Journal of Molecular Structure**, v. 1231, p. 129677, 2020.
- BOFFI, A., FAVERO, G., FEDERICO, R., MACONE, A., ANTIOCHIA, R., TORTOLINI, C., SANZÓ, G., MAZZEI, F. Amine oxidase-based biosensors for spermine and spermidine determination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 1131–1137, 2015.

BRASCA, R., GOICOECHEA, H. C., & CULZONI, M. J. Multiway Calibration Approaches for Quality Control of Food Samples. **Food Safety and Preservation**, p. 143-165, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2019. Disponível em https://cvs.saude.sp.gov.br/zip/U_IN-MS-ANVISA-60_231219.pdf. Acesso: 24 de jan. de 2024

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. Aprovar as Normas referentes a “Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1988. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> . Acesso: 24 de jan. de 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada, Nº 166 de 24 de Julho de 2017 que Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 141, p. 87, 25 julho 2017.

BRETT, A.M.O, BRETT, C.M.A. Eletroquímica Princípios, Métodos e Aplicações. Coimbra: **Livraria Almedina**, 1996.

BROWN, R. J., KUCERNAK, A. R. The electrochemistry of platinum phthalocyanine microcrystals: III. Electrochemical behaviour in aqueous electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 46, p. 2573-2582, 2001.

BROWN, M. D., SCHOENFISCH, M. H. Catalytic selectivity of metallophthalocyanines for electrochemical nitric oxide sensing. **Electrochimica Acta**, v. 273, p. 98-104, 2018.

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

CHAUHAN, N., JAIN, U., GANDOTRA, R., HOODA, V. Zeolites-AuNPs assembled interface towards amperometric biosensing of spermidine. **Electrochimica Acta**, v. 230, p. 106-115, 2017.

CHEN, J., ZHU, C. XU, Y., ZHANG, P., LIANG, T. Advances in Phthalocyanine Compounds and their Photochemical and Electrochemical Properties. **Current Organic Chemistry**, v.5, p. 485-504.

CHIAPPINI, F. A., PINTO, L., ALCARAZ, M. R., OMIDIKIA, N., GOICOECHEA, H. C., OLIVIERI, A. C. Multivariate curve resolution-alternating least-squares and second-order advantage in first-order calibration. A systematic characterisation for three-component analytical systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 1328, p. 343159, 2024.

CORDUNEANU, O., CHIORCEA-PAQUIM, S., FIÚZA, S., MARQUES, M., & OLIVEIRA-BRETT, A. Polynuclear palladium complexes with biogenic polyamines: AFM and voltammetric characterization. **Bioelectrochemistry**, v. 78, p. 97-105, 2010.

- CORNEJO, O. M., MURRIETA, M. F., CASTAÑEDA, L. F., & NAVA, J. L. Characterization of the reaction environment in flow reactors fitted with BDD electrodes for use in electrochemical advanced oxidation processes: A critical review. **Electrochimica Acta**, v. 331, p. 135373, 2020.
- DALA-PAULA, B. M., CUSTÓDIO, F. B., & GLORIA, M. B. Health concerns associated with biogenic amines in food and interaction with amine oxidase drugs. **Current Opinion in Food Science**, v. 54, p. 101090, 2023.
- DANTAS, M. S., LOURENÇO, A. S., SILVA, A. C., BICHINHO, K. M., ARAUJO, M. C. Simultaneous determination of methyl, ethyl, propyl, and butyl parabens in sweetener samples without any previous pretreatment using square wave voltammetry and multiway calibration. **Food Chemistry**, v. 365, p. 130472, 2021.
- DEBEER, J., BELL, J. W., NOLTE, F., ARCIERI, J., CORREA, G. Histamine Limits by Country: A Survey and Review. **Journal of Food Protection**, v. 84(9), p. 1610-1628.
- DEL RIO, B.; FERNANDEZ, M.; REDRUELLO, B.; LADERO, V.; ALVAREZ, M. A. New insights into the toxicological effects of dietary biogenic amines. **Food Chemistry**, v. 435, 2024.
- DEL RIO, B., REDRUELLO, B., LINARES, D. M., LADERO, V., RUAS-MADIEDO, P., FERNANDEZ, M., ALVAREZ, M. A. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, v. 9, p. 120, 2019.
- DEMIR, E., SILAH, H., USLU, B. Phthalocyanine Modified Electrodes in Electrochemical Analysis, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 425-46, 2020.
- EFSA. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, p. 2393-2486, 2011.
- EINAGA, Y. Boron-Doped Diamond Electrodes: Fundamentals for Electrochemical Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 55, n. 24, p. 476-486, 7 dez. 2022.
- ESCANDAR, G. M., OLIVIERI, A. C. Multi-way chromatographic calibration—A review. **Journal of Chromatography A**, v. 1587, p. 2-13, 2019.
- FERRARI, A. G., FOSTER, C.W., KELLY, P.J., BROWNSON, D.A.C.; BANKS, C.E. Determination of the Electrochemical Area of Screen-Printed Electrochemical Sensing Platforms. **Biosensors**, v. 8, p. 53, 2018.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. 4. ed. Washington, DC: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, p. 113-152, 2022.
- GAO, X., LI, P., ELE, R., ZHANG, Y., WANG, B., ZHANG, Z. H., & HO, C. Research advances on biogenic amines in traditional fermented foods: Emphasis on formation

mechanism, detection and control methods. **Food Chemistry**, v. 405, p. 134911, 2023.

GIL, R.L., AMORIM, C.G., MONTENEGRO, M.C.B.S.M., ARAÚJO, A. N. HPLC-potentiometric method for determination of biogenic amines in alcoholic beverages: A reliable approach for food quality control. **Food Chemistry**, v. 72, p. 131288, 2022.

GUAUS, E., TORRENT-BURGUÉS, J. Characterization of modified solid electrodes with organized thin films of a tetra-substituted zinc phthalocyanine. **Thin Solid Films**, v. 747, p. 139145, 2022.

HENAO-ESCOBAR, W.; DEL TORNO-DE ROMÁN, L.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. Dual enzymatic biosensor for simultaneous amperometric determination of histamine and putrescine. **Food Chemistry**, v. 190, p. 818-823, 2016.

HENAO-ESCOBAR, W., DOMÍNGUEZ-RENEDO, O., ALONSO-LOMILLO, M., ARCOS-MARTÍNEZ, M. Resolution of quaternary mixtures of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by the square wave voltammetry and partial least squares method. **Talanta**, v. 143, p. 97-100, 2015.

HUANG, Y., CHANG, R., ZHU, Q. Self-assembled Imprinted Polymer Film-Based Sensor System for Spermidine on Screen Printed Electrodes. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, v.6, 2020.

HUANG, J., GAN, N., LV, F., CAO, Y., OU, C., TANG, H. Environmentally friendly solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of biogenic amines in fish samples, **Journal Separation Science**, v. 39, p. 4384–4390, 2016.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 33, p. 241–246, 1978.

JALALVAND, A. R. Fabrication of a novel molecularly imprinted biosensor assisted by multi-way calibration for simultaneous determination of cholesterol and cholestanol in serum samples. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 226, p. 104587, 2022.

JASTRZĘBSKA, A.; KMIECIAK, A.; BRZUZY, K.; GRALAK, Z.; KRZEMIŃSKI, M. P.; SZŁYK, E. Determination of selected biogenic amines in fermented vegetables juices. **Food Control**, v. 154, p. 109980, 2023.

KAÇAR, C., ERDEN, P.E, DALKIRAN, B., INAL, K.E., KILIÇ, E. Amperometric biogenic amine biosensors based on Prussian blue, indium tin oxide nanoparticles and diamine oxidase– or monoamine oxidase–modified electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, p.1933–1946, 2020.

KANNAN, S.K., AMBROSE, B., SUDALAIMANI, S., PANDIARAJ, M., GIRIBABU, K., KATHIRESAN, M. A review on chemical and electrochemical methodologies for the sensing of biogenic amines. **Analytical Methods**, 2020.

KASHYAP, S., TEHRI, N., VERMA, N., GAHLAUT, A., HOODA, V. Recent advances in development of electrochemical biosensors for the detection of biogenic amines. **3 Biotech**, v. 13, p. 2, 2023.

KUMAR, S.; AROCKIARAJ, M.; ESOKKIYA, A.; SUDALAIMANI, S.; HANSDA, S.; SIVAKUMAR, C.; SULAIMAN, Y.; KHAN, M. M.; GIRIBABU, K. Ion-Pair Facilitated Non-Enzymatic Electrochemical Sensing of Cadaverine and Putrescine. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 168, n. 4, p. 047505, 2021.

KUMAR, K., AMBROSE, B., SUDALAIMANI, S., PANDIARAJ, M., KATHIRESAN, M., GIRIBABU, K. Review on Chemical and Electrochemical Methodologies for the Sensing of Biogenic Amines. **Analytical Methods**, v. 27, 2020.

LIU, Y., HAN, F., LIU, Y., WANG, W. Determination of Biogenic Amines in Wine Using Modified Liquid-Liquid Extraction with High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 911–922, 2020.

LIU, J., XU, Y., LIU, S., YU, S., YU, Z., & LOW, S. S. Application and Progress of Chemometrics in Voltammetric Biosensing. **Biosensors**, v. 12(7), p. 494, 2022.

LOURENÇO, A.S., NUNES, T. A., SILVA, A. C., RIBEIRO, W. F., ARAUJO, M.C.U. Simultaneous Voltammetric Determination of Tryptamine and Histamine in Wines Using a Carbon Paste Electrode Modified with Nickel Phthalocyanine. **Food Analytical Methods**, v. 15, p. 3257–3269, 2022.

LOVRIĆ, MILIVOJ; KOMORSKY-LOVRIĆ, SEBOJRA. Square-wave voltammetry of an adsorbed reactant. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 248, p. 239–253, 1988.

KURZWEIL, P. HISTORY | Electrochemistry. **Encyclopedia of Electrochemical Power Sources**, p. 533–554, 2009.

MEGALE, J. D., SOUZA, D. New approaches in antibiotics detection: The use of square wave voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 234, p. 115526, 2023.

MIJAJLOVIĆ, A., STANKOVIĆ, V., VLAHOVIĆ, F., ĐURĐIĆ, S., MANOJLOVIĆ, D., & STANKOVIĆ, D. The cathodically pretreated boron-doped diamond electrode as an environmentally friendly electrochemical tool for the detection and monitoring of mesotrione in food samples. **Food Chemistry**, v. 447, p. 138993. 2024.

MITAR, I., LJUBENKOV, I., ROHTEK, N., PRKIĆ, A., ANĐELIĆ, I., & VULETIĆ, N. The Content of Biogenic Amines in Croatian Wines of Different Geographical Origins. **Molecules**, v. 23, p. 2570, 2018.

MÜLLER, D. G., ORESTE, E. Q., HEINEMANN, M. G., DIAS, D., KESSLER, F. Biogenic amine sensors and its building materials: a review. **European Polymer Journal**, v. 175, p. 111221, 2022.

MURRAY, R. W. Chemically modified electrodes. **Accounts of Chemical Research**, 13, 135–141, 1980.

NASCIMENTO, R. F., SELVA, T. M. G., BELIAN, M. F., ANGNES, L., DO, V. B. Flow-NEMZER, B., KALITA, D., YASHIN, A. Y., YASHIN, Y. I. Chemical Composition and Polyphenolic Compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities and Effects on Human Health — A Review. **Beverages**, v. 8, 2022.

NETO, B.B., SCARMINIO, I.S. e BRUNS, R.E. Como fazer experimentos. 3ª Ed. Campinas: **Editora Unicamp**, 2006.

NÓBREGA, R.O., SILVA, S.F., FERNANDES, D.D.S., LYRA, W.S., ARAÚJO, T.K.L., DINIZ, P.H.G.D D, ARAÚJO, M.C.U. Classification of instant coffees based on caffeine content and roasting degree using NIR spectrometry and multivariate analysis, **Microchemical Journal**, p. 108624, 2023.

OIV. Organização Internacional da Uva e do Vinho. The World Vine and Wine sector in 2022. Disponível em: https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_State_of_the_world_Vine_and_Wine_sector_in_2022_2.pdf. Acesso em 30 de jan. de 2024.

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

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

ÖZDESTAN, Ö., ÜREN, A. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 78, p. 1321–1326, 2009.

PALOMINO-VASCO, M., MORA-DIEZ, N. M., RODRÍGUEZ-CÁCERES, M. I., ACEDO-VALENZUELA, M. I., ALCARAZ, M. R., & GOICOECHEA, H. C. Exploring the potential of combining chemometric approaches to model non-linear multi-way data with quantitative purposes – A case study. *Analytica Chimica Acta*, v. 1141, p. 63-70, 2021.

PAPAGEORGIOU, M., LAMBROPOULOU, D., MORRISON, C., KŁODZIŃSKA, E., NAMIEŚNIK, J., PŁOTKA-WASYLKA, J. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p 128–142, 2018a.

PAPAGEORGIOU, M., LAMBROPOULOU, D., MORRISON, C., NAMIEŚNIK, J.,

PŁOTKA-WASYLKA, J. Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography – Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine. **Talanta**, v. 183, p. 276–282, 2018b.

PATEL, A., THOMPSON, A., ABDELMALEK, L., ADAMS-HUET, B., JIALAL, I. The relationship between tyramine levels and inflammation in metabolic syndrome. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 40, 2019.

PIMENTEL, M.F., BARROS NETO, B.B., Calibração: uma revisão para químicos analíticos, **Química Nova**, 19: 268, 1996

PINEDA, A., CARRASCO, J., PEÑA-FARFAL, C., HENRÍQUEZ-AEDO, K., & ARANDA, M. Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC. **Food Control**, v. 23(1), p. 251-257, 2012.

PINTO, L., DÍAZ NIETO, C. H., ZÓN, M. A., FERNÁNDEZ, H., & ARAUJO, M. C. U. Handling time misalignment and rank deficiency in liquid chromatography by multivariate curve resolution: Quantitation of five biogenic amines in fish. **Analytica Chimica Acta**, v. 902, p. 59-69, 2016.

MACPHERSON, J. V. A practical guide to using boron doped diamond in electrochemical research. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17(5), p. 2935–2949, 2015.

MIRCESKI, V.; SKRZYPEK, S.; STOJANOV, L. Square-wave voltammetry. **ChemTexts**, v. 4

RAOOF, J. B.; OJANI, R.; BAGHAYERI, M.; AMIRI-AREF, M. Application of a glassy carbon electrode modified with functionalized multi-walled carbon nanotubes as a sensor device for simultaneous determination of acetaminophen and tyramine. **Analytical Method**, v. 6, 2012.

RIBEIRO, W. F. Determinação voltamétrica de ricina em mamona usando carbono vítreo e diamante dopado com boro. 2012. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

RESQUE, I.S. Cromatografia líquida de alta eficiência, Extração líquido-líquido e derivatização com DANSYL para quantificação de amins biogênicas em queijos, 2022. 71f. **Dissertação (Mestrado em Química)**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022

RESTUCCIA, D., LOIZZO, M. R., SPIZZIRRI, U. G. Quality and Safety Issues Related With the Presence of Biogenic Amines in Coffee, Tea, and Cocoa-Based Beverages. **Caffeinated and Cocoa Based Beverages**, p. 47–88, 2019.

RESTUCCIA, D., SICARI, V., PELLICANÒ, T. M., SPIZZIRRI, U. G., Loizzo, M. R. The impact of cultivar on polyphenol and biogenic amine profiles in Calabrian red grapes during winemaking. **Food Research International**, v. 102, p. 303–312, 2017.

RESTUCCIA, D., SPIZZIRRI, U. G., PARISI, O. I., CIRILLO, G., PICCI, N. Brewing effect on levels of biogenic amines in different coffee samples as determined by LC-UV. **Food Chemistry**, v. 175, p. 143–150, 2015.

SALAZAR-BANDA, G.R., DE CARVALHO, A.E., ANDRADE, L.S, ROCHA-FILHO R., AVACA, L.A. On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. **J Appl Electrochem**, v. 40, p. 1817–1827, 2010.

Santos, L. P., Santana, E. R., Winiarski, J. P., Dreyer, J. P., Haddad, V. F., Vitali, L., & Vieira, I. C. Natural deep eutectic solvent-supported exfoliated graphite nanoplatelet-based electrochemical sensor for the determination of tyramine in fermented beverages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 132, p. 106331, 2024.

Santanatoglia, A., Angeloni, S., Fiorito, M., Fioretti, L., Ricciutelli, M., Sagratini, G., Vittori, S., & Caprioli, G. Development of new analytical methods for the quantification of organic acids, chlorogenic acids and caffeine in espresso coffee by using solid-phase extraction (SPE) and high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 125, p. 105732, 2024.

SARI, I.N., SETIAWAN, T., KIM, K.S., WIJAYA, Y.T, CHO, K.W., KWON, H.Y. Metabolism and function of polyamines in cancer progression. **Cancer Letters**, v. 519, p. 91-104, 2021.

SENA, M. M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 910-920, 2005.

SILVA, A. C., LOURENÇO, A. S., ARAUJO, M. C. U. Simultaneous voltammetric determination of four organic acids in fruit juices using multiway calibration. **Food Chemistry**, v. 266, p. 232-239, 2018.

SILVA, A. G., FRANCO, D.L., SANTOS, L.D. A simple, fast, and direct electrochemical determination of tyramine in Brazilian wines using low-cost electrodes. **Food Control**, v. 130, p. 108369, 2021.

SILVEIRA, T.M.L., TAVARES, E., GLÓRIA, M.B.A. Profile and levels of bioactive amines in instant coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 451–457, 2007.

SILVEIRA, T.M.L., TAVARES, E., GLÓRIA, M.B.A. Profile and levels of bioactive amines in instant coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 451–457, 2007.

SKOGG, D.A., HOLLER, F.J. Nieman, T.A. Princípios de análise instrumental. 5ª Edição, Porto Alegre: **Bookman**, 2002.

- SOARES, I.P., DA SILVA, A.G., ALVES, R.F., CÔRREA, R.A.M.S., FERREIRA, L.F., FRANCO, D.L. Electrochemical enzymatic biosensor for tyramine based on polymeric matrix derived from 4-mercaptophenylacetic acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 23, p. 985–995, 2019.
- SRIDEVI, V., GIRIDHAR, P., RAVISHANKAR, G.A. Endogenous polyamine profiles in different tissues of *Coffea* sp., and their levels during the ontogeny of fruits. **Acta Physiol Plant**, v. 31, p. 757–764, 2009.
- STERNBERG, Z., PODOLSKY, R., NIR, A., YU, J., NIR, R., HALVORSEN, S. W., QUINN, J. F., KAYE, J., KOLB, C. Elevated spermidine serum levels in mild cognitive impairment, a potential biomarker of progression to Alzheimer dementia, a pilot study. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 100, p. 169-174, 2022.
- STÓJ A., PŁOTKA-WASYLKA, J., SIMEONOV, V., KAPŁAN, M. The content of biogenic amines in Rondo and Zweigelt wines and correlations between selected wine parameters. **Food Chemistry**, v. 371, p. 131172, 2022.
- STOJANOVIĆ, Z., KOS, J. Detection of Metabolites of Microbial Origin in Beverages With Harmful Effect on Human Health—Biogenic Amines and Mycotoxins. **Safety Issues in Beverage Production**, p. 39–77, 2020.
- STOJEK, Z. The Electrical Double Layer and Its Structure. **Electroanalytical Methods**, p. 3–9, 2009.
- TIRIS, G., YANIKOĞLU, R.S., CEYLAN, B., EGELI, D., TEKKELE, E.K., ÖNAL, A. A review of the currently developed analytical methods for the determination of biogenic amines in food products. **Food Chemistry**, v. 398, p. 133919, 2023.
- TORRE, G. L., ROTONDO, A., SALVO, A. Do vine cropping and breeding practices affect the biogenic amines' content of produced wines?. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 115, p. 104901, 2023.
- TURAN, R., KOCA, A Phthalocyanine compounds in electrochemical sensors. **Microchemical Journal**, v. 215, p. 114176, 2025.
- TURNA, N. S., CHUNG, R., MCINTYRE, L. A Review of Biogenic Amines in Fermented Foods: **Occurrence and Health Effects**, 2023.
- UVIBRA. União Brasileira de Vitinicultura. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br>. Acesso em 30 de jan. de 2024.
- VASCONCELOS, H., ALMEIDA, J. M. M. M., MATIAS, A., SARAIVA, C., JORGE, P. A. S., COELHO, L. C. C. Detection of biogenic amines in several foods with different sample treatments: An overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 86–96, 2021.
- VIEIRA, C. P., COSTA, M.P., SILVA, V. L. M., FRASÃO, B.S., AQUINO, L. F. M.C., NUNES, Y. E. C.O., CONTE-JUNIOR, C.A. Development and validation of RP-HPLC-

DAD method for biogenic amines determination in probiotic yogurts. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 1582-1597, 2020.

VINCI, G., MADDALONI, L. Biogenic Amines in Alcohol-Free Beverages. **Beverages**, v. 6, p. 17, 2020.

WOJNOWSKI, W., NAMIEŚNIK, J., PŁOTKA-WASYLKA, J. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for in situ determination of biogenic amines in meat: Estimation of meat's freshness. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 130-138, 2019.

WÓJCIK, W., DAMAZIAK, K., & BIEŃ, D. Biogenic Amines in Poultry Meat and Poultry Products: Formation, Appearance, and Methods of Reduction. **Animals**, v. 12(12), p. 1577, 2022.

WOŹNIAKIEWICZ, M., WOŹNIAKIEWICZ, A., NOWAK, P.M., KŁODZIŃSKA, E., YIN, H., ZHOU, Y., AI, S. Preparation and characteristic of cobalt phthalocyanine modified carbon paste electrode for bisphenol A detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 626, 80–88, 2009.

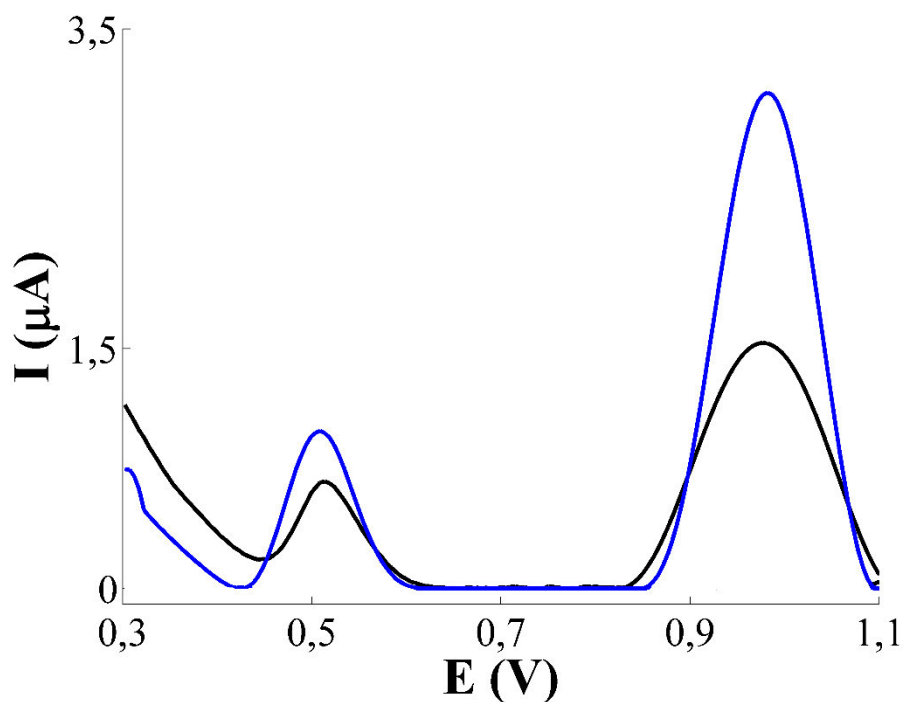
WUNDERLICHOVÁ, L.; BUŇKOVÁ, L.; KOUTNÝ, M.; JANČOVÁ, P.; BUŇKA, F. Formation, Degradation, and Detoxification of Putrescine by Foodborne Bacteria: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, p. 1012-1030, 2014.

ZOU, D., ZHAO, Z., LI, L.; MIN, Y., ZHANG, D., JI, A., JIANG, C., WEI, X., WU, X. A comprehensive review of spermidine: Safety, health effects, absorption and metabolism, food materials evaluation, physical and chemical processing, and bioprocessing. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 21, p. 2820-2842, 2022.

ZHU, W., ZHAO, N. J., YANG, R. F., CHEN, Y. N., CHEN, X. W., YIN, G. F., LIU, J. G., & LIU, W. Q. Simultaneous measurement of phenols by three-way fluorescence spectroscopy: A comparison of N-PLS/RBL, U-PLS/RBL and PARAFAC. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 239, p. 118511, 2020.

ANEXO

Anexo I



Anexo I. Voltamogramas de pulso diferencial (DPV) e de onda quadrada (SWV) obtidos para tiramina ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e espermidina ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Anexo II

Received: 21 February 2024 | Revised: 30 May 2024 | Accepted: 21 June 2024
DOI: 10.1002/elan.202400073

RESEARCH ARTICLE

ELECTROANALYSIS

Electrochemical study and simultaneous square-wave voltammetric determination of tyramine and spermidine in wines

Rossana O. Nóbrega | Luciano B. Ramo | Amanda C. Silva | Mario C. U. Araujo