Karina Fraige

**Estudo comparativo do perfil metabolômico e
proteômico de uvas (*Vitis vinifera*) durante o
processo de maturação utilizando ferramentas
bioanalíticas**

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e
Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço Deus, por me dar o Dom da vida, oportunidades, saúde e força de vontade para correr atrás do que quero.

Aos meus pais, em especial minha mãe, pelo apoio incondicional e carinho concedido durante todos os anos de minha vida. À minha irmã pelo carinho, paciência e amizade.

Ao meu namorado, Dédo, que sempre esteve ao meu lado com muito amor e paciência.

A todos de minha família, que contribuíram para o meu crescimento, em especial ao meu avô Zé, que mesmo não estando de corpo presente com certeza está sempre ao meu lado e muito feliz com mais esta conquista.

Ao Prof. Dr. Emanuel, pela oportunidade, confiança e orientação durante todos os anos do mestrado e doutorado.

A todos os colegas de laboratório (que foram e são muitos....), por tornarem o trabalho muito mais divertido, mas em especial à Ju A., Ju B., Jenifer, Fay, Rê, Sheila, Maribel e Thiago S. pelo vínculo de amizade criado e pelas horas de descontração.

Ao Dr. Antero Lisciotto, que abriu as portas da sua propriedade para as coletas de uvas quando fosse preciso, sem a ajuda do qual este

trabalho seria muito difícil. Ao Daniel Miqueletto, por fornecer as uvas cultivadas em seu sítio na cidade de Louveira e a Vinícola Miolo - Vale dos Vinhedos para enviar uvas para o início deste trabalho, por intermédio da Giselle R. de Souza. À Vinícola Miolo - Fazenda Ouro Verde, em especial ao funcionário Geziel, pela dedicação em enviar as uvas da melhor maneira possível para que chegassem ao destino em boas condições.

Ao Prof. Dr. Jesus Jorrín-Novo, que me aceitou prontamente para o estágio em seu grupo, e pelas discussões que foram de grande contribuição para o trabalho.

Aos colegas do Grupo de Proteômica Vegetal e Agrícola, da Universidade de Córdoba, Fran, Inma, Raquel, Jose, Besma, Prof. Ana Maldonado, Rosa, Harold, pela ajuda e pelos momentos de descontração, em especial à Raquel, por toda ajuda pessoal e colaboração nos experimentos e discussões de proteômica.

À Ana, por me receber em sua casa com muita alegria e pelas histórias, que me ajudaram com a cultura e com a língua de um povo diferente.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, pela colaboração no tratamento dos dados de quimiometria.

Aos funcionários do IQSC, em especial ao Paulo Cordeiro pela ajuda e troca de idéias, e a Vanessa Jarina, sempre disposta a ajudar quando necessário.

À FAPESP (processos 2007/07752-7 e 2008/04050-4) pela bolsa concedida, que possibilitou a valiosa experiência obtida no exterior.

RESUMO

A análise da composição química das uvas é de grande importância para avaliar a data da colheita e a produção de vinhos de qualidade. O estudo do metabolismo das uvas é essencial para definirem-se em quais etapas os metabólitos são produzidos, assim como as proteínas e genes que regulam esses processos. Açúcares, polifenóis e ácidos orgânicos são importantes classes de metabólitos relacionados com o desenvolvimento de uvas. Os açúcares são os compostos que primeiramente indicam a data de colheita, sendo substâncias-chave em diversos processos biológicos. Os polifenóis tem se destacado por sua atividade antioxidante, além de participarem dos mecanismos de defesa da planta. Os ácidos orgânicos são responsáveis pela qualidade organoléptica e estão envolvidos em vários processos metabólicos. As proteínas não contribuem de forma significativa para o valor nutricional, mas são importantes marcadores de variedade para verificar adulterações de vinhos. O Rio Grande do Sul é responsável por grande parte das uvas produzidas no país, e recentemente o Vale do São Francisco tem se destacado na produção destas frutas. Em regiões do Sudeste um manejo de podas diferenciado vem sendo feito para a obtenção de uvas com bons índices de maturação e resistência a doenças fúngicas. Uvas produzidas em Água Vermelha e Louveira, interior de São Paulo, foram estudadas durante a maturação com relação a análises físico-químicas, perfil proteômico, por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, e perfil metabolômico de antocianinas, polifenóis não-antociânicos, ácidos orgânicos e açúcares por técnicas cromatográficas e eletroforéticas acopladas a detectores por arranjo de diodos e/ou espectrometria de massas. Os resultados foram analisados por ferramentas de análise multivariada e comparados com uvas maduras das regiões Sul e Nordeste. Foram observadas tendências de agrupamento das uvas verdes devido à maior acidez e das uvas maduras devido à maior concentração de antocianinas e açúcares, sendo que o perfil de antocianinas pode ser utilizado como marcador de origem varietal. Em termos do perfil proteômico foi possível estabelecer diferenças entre variedades de uvas, além de uma tendência com relação à origem geográfica. Foram identificadas 74 proteínas relacionadas principalmente, às funções de defesa e resposta a *stress*, metabolismo de carboidratos e metabolismo energético.

Palavras-chave: proteômica, metabolômica, antocianinas, uvas, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Analysis of the chemical composition of grapes is very important to evaluate harvest time and production of high quality wines. The study of grape metabolism is essential to define in which stages metabolites are produced, as well as proteins and genes that regulate these processes. Sugars, polyphenols and organic acids are important classes of metabolites related with grape development. Sugars are compounds that primarily indicate harvest time, and they are key substances in various biological processes. Polyphenols have been noted for its antioxidant activity, also for taking part in mechanisms of plant defense. Organic acids are responsible for organoleptic quality, and they are evolved in diverse metabolic processes. Proteins do not contribute significantly to the nutritional value, but they are important variety markers to verify adulterations of wines. Rio Grande do Sul is responsible for most of the grapes produced in Brazil, and recently Vale do São Francisco has received attention because of the production of these fruits. In some regions of Southeast a different pruning handle has started to obtain grapes with good levels of ripeness and resistance in developing fungal diseases. Grapes cultured in Água Vermelha and Louveira, São Paulo State, were studied during ripening in relation to physical-chemical analysis, proteomic profile, by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry; the metabolomic profile of anthocyanins, non-anthocyanin polyphenols, organic acids and sugars by chromatographic and electrophoretic techniques coupled to diode array and/or mass spectrometry detectors. The results were analyzed by multivariate analysis and compared with those of mature grapes from South and Northeast regions. The data show clustering of green grapes due to higher acidity and clusters of mature grapes due to higher anthocyanin and sugars concentrations, and the profile of anthocyanins can be used as a varietal marker. Considering the proteomic profile, it was possible to group different varieties of grapes with a trend in relation to geographical origin being also observed. It was identified 74 proteins related, mainly, to defense and stress response, carbohydrate metabolism and energetic metabolism.

Keywords: proteomics, metabolomics, anthocyanins, grapes, mass spectrometry.

Lista de figuras

CAPÍTULO 1

Análises físicas e químicas clássicas

Figura 1.1 - Estruturas químicas da glicose e frutose	5
Figura 1.2 - Estruturas químicas dos principais ácidos presentes nas uvas	7
Figura 1.3 - Fases de maturação da uva	10
Figura 1.4 - (A) Vinhedo localizado em Água Vermelha, São Carlos, SP; em sistema de espaldeira (B) Cacho de uva Syrah; (C) folha de uva Cabernet Sauvignon; (D) folha de uva Shiraz	15
Figura 1.5 - Vinhedo localizado em Louveira, SP; em sistema de Y	15
Figura 1.6 - Uvas nos estádios de maturação estudados.	16
Figura 1.7 - Representação física para orientação das medidas de comprimento e largura das bagas	17
Figura 1.8 - Gráficos da evolução do peso com a maturação de uvas C. Sauvignon e Syrah cultivadas em Água Vermelha.	25
Figura 1.9 - Teor de antocianinas totais e índice de polifenóis totais para as uvas Syrah e C. Sauvignon em diferentes estágios de maturação, colhidas em Água Vermelha e Louveira	27
Figura 1.10 - Acidez total titulável e pH do mosto para as uvas Syrah e C. Sauvignon em diferentes estádios de maturação, colhidas em Água Vermelha e Louveira	29
Figura 1.11 - Concentração de açúcares redutores e sólidos solúveis totais para as uvas Syrah e C. Sauvignon em diferentes estágios de maturação, colhidas em Água Vermelha e Louveira	31
Figura 1.12 - Teor de antocianinas totais, índice de polifenóis totais, Acidez titulável, pH do mosto, Açúcares redutores totais, sólidos solúveis totais para as uvas Syrah (ShAV) e C. Sauvignon (CSAV), colhidas em Água Vermelha, Syrah (ShL) e Máximo (MaxL) coletadas em Louveira, C. Sauvignon(CSBG) e Merlot (MerBG), provenientes de Bento Gonçalves, e Syrah (ShCN), proveniente de Casa Nova. Os números seguidos das siglas indicam o ano de coleta	33
Figura 1.13 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para amostras em diferentes estágios de maturação	35

Figura 1.14 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> das amostras maduras, das diversas origens e anos de coleta	36
--	----

CAPÍTULO 2

Análise Metabolômica

Figura 2.1 - Esquema geral da organização “ômica”	42
Figura 2.2 - Esquema representativo de um sistema de HPLC.	44
Figura 2.3 - Esquema de um equipamento de eletroforese capilar	45
Figura 2.4 - Representação esquemática simplificada das rotas envolvidas no metabolismo secundário de plantas.	48
Figura 2.5 - Estruturas dos principais ácidos orgânicos de uvas e vinhos	49
Figura 2.6 - Núcleo fundamental dos flavonoides	53
Figura 2.7 - Estruturas químicas de compostos da classe dos flavonóis.	54
Figura 2.8 - Estruturas químicas dos flavanóis (+)-catequina e (-)-epicatequina	54
Figura 2.9 - Fórmula estrutural dos taninos condensados (proantocianidinas).	56
Figura 2.10 - Estrutura principal das antocianinas e principais antocianidinas presentes em uvas e vinhos	57
Figura 2.11 - Estrutura principal dos ácidos benzóico e cinâmico e seus derivados encontrados nas uvas e vinhos.	58
Figura 2.12 - Estrutura química do 3,5,4'-trihidróxiestilbeno (resveratrol)	59
Figura 2.13 - Cromatograma obtido pela separação dos ácidos orgânicos presentes em (A) uma mistura padrão e (B) uma amostra de uvas Cabernet Sauvignon. (1) ácido tartárico, (2) ácido málico, (3) ácido lático, (4) ácido acético, (5) ácido cítrico, (6) ácido succínico, (**) não identificado, (**) não identificado presente no padrão de ácido málico. Condições experimentais descritas na Seção 3.1.	71
Figura 2.14 - Evolução dos ácidos tartárico e málico com a maturação nos mostos de uvas Syrah Água Vermelha.	72
Figura 2.15 - Evolução dos ácidos tartárico e málico com a maturação nos mostos de uvas Cabernet Sauvignon Água Vermelha.	73
Figura 2.16 - Evolução dos ácidos tartárico, málico e cítrico com a maturação nos mostos de uvas Syrah Louveira.	74

Figura 2.17 – Eletroferograma de (A) uma mistura padrão de açúcares e (B) açúcares presentes em uma amostra de uvas Cabernet Sauvignon. (1) sacarose, (2) glicose, (3) frutose. Condições experimentais descritas na Seção 3.2.	78
Figura 2.18 - Razão glicose/frutose com a maturação das uvas Syrah Água Vermelha, Cabernet Sauvignon Água Vermelha e Syrah Louveira nos anos de 2008, 2009 e 2010.	79
Figura 2.19 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para amostras em diferentes estádios de maturação, considerando ácidos orgânicos e açúcares. T_1= ácido tartárico, M_1= ácido málico, C_1= ácido cítrico, G_1= glicose, F_1= frutose, G-F_1= glicose/frutose.	81
Figura 2.20 - Cromatogramas do perfil de antocianinas nos diferentes estádios de maturação das uvas (A) Syrah e (B) Cabernet Sauvignon cultivadas em Água Vermelha. Condições experimentais descritas na Seção 3.3.1.	84
Figura 2.21 - Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para PC1 x PC2 para uvas em diferentes estádios de maturação: ■ <i>veraison</i> , ▲ amadurecimento, ● maduras.	86
Figura 2.22 - Cromatogramas do perfil de antocianinas de uvas das variedades Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot e Máximo.	88
Figura 2.23 - Espectro (A) MS e (B) MS/MS da malvidina 3-(<i>p</i> -coumarilglicosídeo)glicosídeo encontrada nas uvas Máximo após separação por HPLC.	89
Figura 2.24 - Gráfico de <i>scores</i> para PC1 x PC2 para uvas maduras: ■ Syrah, ● Cabernet Sauvignon, ▲ Merlot e ▼ Máximo.	91
Figura 2.25 - Cromatogramas dos perfis de polifenóis não-antociânicos em 275 nm nos diferentes estádios de maturação das uvas Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas em Água Vermelha. (A) <i>veraison</i> , (B) amadurecimento, (C) maturação completa.	93
Figura 2.26 - Cromatogramas dos perfis de polifenóis não-antociânicos em 320 nm nos diferentes estádios de maturação das uvas Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas em Água Vermelha. (A) <i>veraison</i> , (B) amadurecimento, (C) maturação completa.	94
Figura 2.27 - Cromatogramas dos perfis de polifenóis não-antociânicos em 360 nm nos diferentes estádios de maturação das uvas Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas em Água Vermelha. (A) <i>veraison</i> , (B) amadurecimento, (C) maturação completa.	95

- Figura 2.28** - Cromatogramas dos perfis de polifenóis não-antociânicos em 275 nm, 320 nm e 360 nm para uvas (A) Cabernet Sauvignon, (B) Syrah, (C) Merlot e (D) Máximo 97
- Figura 2.29** - Gráficos de *scores* e *loadings* para PC1 x PC2 para uvas estudadas com relação ao estágio de maturação: ▼ verde, ■ *veraison*, ▲ amadurecimento e ● maduras. $\lambda = 275$ nm 99
- Figura 2.30** - Dados obtidos em 275 nm alinhados, autoescalados e centrados na média após seleção de variáveis. As variáveis desconsideradas na PCA estão marcadas em cinza, e as variáveis que contribuem para a separação das uvas maduras em amarelo. 100
- Figura 2.31** - Gráfico de *scores* e *loadings* para PC1 x PC2 para uvas estudadas com relação ao estágio de maturação: ▼ verde, ■ *veraison*, ▲ amadurecimento e ● maduras. $\lambda = 320$ nm 101
- Figura 2.32** – Dados obtidos em 320 nm alinhados, autoescalados e centrados na média após seleção de variáveis. As variáveis desconsideradas na PCA estão marcadas em cinza, e as variáveis que contribuem para a separação das uvas maduras em amarelo. 102
- Figura 2.33** - Gráfico de *scores* e *loadings* para PC1 x PC2 para uvas estudadas com relação ao estágio de maturação: ▼ verde, ■ *veraison*, ▲ amadurecimento e ● maduras. $\lambda = 360$ nm 103
- Figura 2.34** - Dados obtidos em 360 nm alinhados, autoescalados e centrados na média. As variáveis que contribuem para a separação das uvas com relação ao estágio de maturação estão em amarelo. 104
- Figura 2.35** - Gráfico de *scores* para PC1 x PC2 para uvas estudadas com relação à origem: ■ Casa Nova, ▼ Água Vermelha, ▲ Bento Gonçalves e ● Louveira. $\lambda = 360$ nm. 105
- Figura 2.36** - Dados alinhados em 360 nm e centrados na média. As variáveis que contribuem para a separação das uvas com relação à origem estão em amarelo 106

CAPÍTULO 3

Análise Proteômica

- Figura 3.1** - Esquema do procedimento realizado em eletroforese bidimensional (2-DE). 114

Figura 3.2 - Diagrama de blocos ilustrando os componentes de um espectrômetro de massas.	117
Figura 3.3 - Representação do processo de ionização por <i>electrospray</i> .	118
Figura 3.4 - Representação do processo de ionização por MALDI	119
Figura 3.5 - Perfil eletroforético do <i>pool</i> de amostras obtido por SDS-PAGE após extração por diferentes métodos. Gel com gradiente de acrilamida 4-20 %, V=150V.	135
Figura 3.6 - Conteúdo de proteínas com a maturação das uvas: ShAV (Syrah Água Vermelha); ShL (Syrah Louveira); CSAV Cabernet Sauvignon Água Vermelha).	136
Figura 3.7 - Perfil eletroforético obtido por SDS-PAGE para amostras nos diferentes estádios de maturação. Extração com fenol, 80 µg de proteína, 12 % acrilamida, V= 80 V, coloração com Coomassie Blue G-250	137
Figura 3.8 - Dendograma construído com base no perfil eletroforético obtido por SDS-PAGE para todas as amostras de uvas.	138
Figura 3.9 - Géis 2-DE para uvas Syrah Água Vermelha em diferentes estádios de maturação: (A) verde, (B) <i>veraison</i> , (C) amadurecimento, (D) maturação completa. .	139
Figura 3.10 - Géis 2-DE para uvas Syrah Louveira em diferentes estádios de maturação: (A) verde, (B) <i>veraison</i> , (C) amadurecimento, (D) maturação completa	140
Figura 3.11 - Géis 2-DE para uvas Cabernet Sauvignon Água Vermelha em diferentes estádios de maturação: (A) <i>veraison</i> , (B) amadurecimento, (C) maturação completa. .	141
Figura 3.12 - Géis 2-DE para uvas maduras das diferentes variedades e origens: (A) Syrah AV, (B) Syrah L, (C) CSAV, (D) Max.	142
Figura 3.13 - Dendograma construído com base no perfil eletroforético obtido por 2-DE para todas as amostras	144
Figura 3.14 - PCA para todas as amostras a partir dos resultados dos géis 2-DE: gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> .	145
Figura 3.15 - Distribuição por categoria das proteínas encontradas	147
Figura 3.15 - Gel virtual construído a partir de todos os géis analisados e localização de algumas proteínas	148

Lista de tabelas

CAPÍTULO 1

Análises físicas e químicas clássicas

Tabela 1.1 - Variedades de uvas mais utilizadas para produção de vinhos nacionais	3
Tabela 1.2 - Médias mensais de temperatura média e precipitação durante os anos de 2008, 2009 e 2010 na região de São Carlos.	21
Tabela 1.3 - Médias mensais de temperatura média e total precipitação durante o ano de 2010 na região de Louveira. .	22
Tabela 1.4 - Comprimento e largura das uvas analisadas (10 bagas)	23
Tabela 1.5 – Massa média de 10 uvas em diferentes estágios de maturação e procedências.	23

CAPÍTULO 2

Análise Metabolômica

Tabela 2.1 - Equações de regressão linear, coeficientes de correlação e faixa de concentração estudada para cada um dos ácidos orgânicos estudados	68
Tabela 2.2 - Precisão do método para análises intra-dia e entre-dias	69
Tabela 2.3 - Valores de recuperação dos ácidos orgânicos em amostras de uvas.	70
Tabela 2.4 - Concentração dos ácidos tartárico e málico nas diversas uvas maduras.	75
Tabela 2.5 - Equações de regressão linear, coeficientes de correlação e faixa de concentração estudada para glicose e frutose.	77
Tabela 2.6 - Precisão do método para análises intra-dia e entre-dias	77
Tabela 2.7 - Razão glicose/frutose nas diversas uvas maduras.	80
Tabela 2.8 - Identificação das antocianinas, tempo de retenção (Tr), íon molecular e dados de fragmentação.	82
Tabela 2.9 - Porcentagens relativas dos derivados das cinco antocianidinas presentes nas uvas com a maturação.	85
Tabela 2.10 - Porcentagem de antocianinas individuais nas uvas maduras estudadas	90

CAPÍTULO 3

Análise Proteômica

Tabela 3.1 - Condições de focalização isolelétrica para fitas de 17 cm pH 3-10	131
Tabela 3.2 - Quantificação das amostras pelo método de Bradford e número de bandas identificadas para cada método de extração	135
Tabela 3.3 - Número de <i>spots</i> detectados nos géis das amostras em diferentes estádios de maturação e de diferentes origens.	143

Sumário

CAPÍTULO 1	1
Análises físicas e químicas clássicas	
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Vitivinicultura brasileira	2
1.2 Composição química das uvas	4
1.2.1 Açúcares	4
1.2.2 Compostos fenólicos	5
1.2.3 Ácidos orgânicos	7
1.2.4 Substâncias aromáticas	8
1.3 Ciclos fenológicos da videira	9
1.4 Estádios de maturação das uvas	9
1.5 Estatística e Quimiometria	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Localização, coleta e preparo das amostras	14
3.2 Parâmetros físicos das bagas	17
3.3 Antocianinas totais (Ant)	17
3.4 Compostos fenólicos totais (IPT)	17
3.5 Acidez total titulável (AT)	18
3.6 Concentração hidrogênio iônica (pH)	18
3.7 Sólidos solúveis totais (SST)	18
3.8 Açúcares redutores (AR)	19
3.9 Análise Estatística e Quimiométrica	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Características das regiões estudadas	20

4.2 Parâmetros físicos e químicos das bagas	22
4.3 Antocianinas e polifenóis totais	26
4.4 Acidez total e pH	28
4.5 Açúcares redutores e sólidos solúveis totais	30
4.6 Análises para uvas maduras de diferentes variedades e origens	32
4.7 Análise quimiométrica dos dados	34
 5 CONCLUSÕES	 38
 CAPÍTULO 2	 40
Análise Metabolômica	
 1 INTRODUÇÃO	 41
1.1 Metabolômica	41
1.2 Métodos de separação analítica e tratamento dos dados em metabolômica	43
1.3 Metabolismo das plantas	47
1.3.1 Ácidos Orgânicos	48
1.3.2 Açúcares	50
1.3.3 Compostos Fenólicos	52
1.3.3.1 Flavonóides	52
1.3.3.2 Não-flavonóides	58
 2 OBJETIVOS	 62
2.1 OBJETIVO GERAL.	62
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
 3 MATERIAIS E MÉTODOS	 63
3.1 Ácidos orgânicos	63
3.2 Açúcares	63
3.3 Compostos Fenólicos	64
3.3.1 Antocianinas	64
3.3.2 Polifenóis não-antociânicos	65
3.4 Análise multivariada dos dados	66

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 Ácidos orgânicos	68
4.2 Açúcares	76
4.3 Compostos Fenólicos	82
4.3.1 Antocianinas	82
4.3.2 Polifenóis não-antociânicos	92
5 CONCLUSÕES	107
CAPÍTULO 3	110
Análise Proteômica	
1 INTRODUÇÃO	111
1.1 Proteômica	111
1.2 Técnicas utilizadas e tratamento dos dados em análise proteômica	112
1.2.1 Eletroforese em gel unidimensional (1-DE)	113
1.2.2 Eletroforese em gel bidimensional (2-DE)	113
1.2.3 Espectrometria de massas (MS)	116
1.2.4 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS)	120
1.2.5 Análise dos dados	121
1.3 Proteoma de plantas	122
1.3.1 Proteínas das uvas	123
2 OBJETIVOS	126
3 MATERIAIS E MÉTODOS	127
3.1 Coleta das amostras	127
3.2 Extração e quantificação de proteínas	127
3.3 Separação de proteínas por 1-DE e 2-DE	131
3.4 Análise Estatística	132
3.5 Identificação das proteínas por MALDI-TOF-TOF	132

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	134
4.1 Separação de proteínas por 1-DE e 2-DE	134
4.2 Identificação das proteínas por MS e busca nos bancos de dados	146
Metabolismo de carboidratos	148
Metabolismo de aminoácidos	149
Glicólise e Glicogênese	150
Metabolismo energético	151
Metabolismo secundário	152
Defesa e resposta a <i>stress</i>	152
5 CONCLUSÕES	155
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	157
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160
APÊNDICE I: Resultados obtidos para as proteínas identificadas pelo Mascot e perfil de expressão nas amostras avaliadas.	185

CAPÍTULO 1

Análises físicas e químicas clássicas

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vitivinicultura brasileira

A vitivinicultura é uma atividade econômica recente no Brasil, quando comparada aos países tradicionalmente produtores da Europa, no entanto observa-se uma alteração acentuada na qualidade dos vinhos finos devido à incorporação de melhorias relacionadas ao emprego de cultivares finas e técnicas enológicas. O Rio Grande do Sul é o principal Estado produtor de uvas para processamento, representando em torno de 95% do total de uvas processadas no país.¹ Cerca de 20% da produção de uvas provêm de variedades viníferas (*Vitis vinifera*) e 80% de americanas e híbridas (*V. labrusca* e *V. bouquerna*). Outra região que tem se destacado no cultivo de uvas viníferas é a do submédio do Vale São Francisco, que compreende o sudoeste do Estado de Pernambuco e norte da Bahia. Esta região apresenta tradição no cultivo da fruticultura devido às condições ideais propiciadas pela bacia do Rio São Francisco, como condições edafoclimáticas favoráveis, fotoperíodo intenso e sistemas de irrigação desenvolvidos com alta tecnologia.² Nesta região a videira produz duas safras por ano, em condições climáticas diferenciadas devido à variabilidade intra-anual.

Em 2010, uma redução de 3,74% foi observada na produção de uvas na maioria dos Estados brasileiros, comparado a 2009, o que pode ser devido a fatores climáticos desfavoráveis, especialmente nas áreas de produção de uvas para vinhos, como o Rio Grande do Sul. Apenas 43,07% das uvas produzidas foram destinadas ao processamento para elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva *in natura*.³

Um dos grandes desafios da produção de vinhos finos de qualidade está na melhoria das uvas. Exceto pelo nordeste, as principais regiões produtoras de vinhos geralmente possuem um ciclo de produção, onde, na maioria dos casos, o momento de colheita coincide com o período de chuvas (janeiro/fevereiro), comprometendo a qualidade do vinho produzido devido à maior incidência de doenças fúngicas, aliada à baixa radiação solar e outros fatores que impedem que a uva atinja a maturação completa.⁴ Em grande parte dos Estados do sudeste brasileiro as chuvas de verão se encerram no final de março, dando início a um período de outono/inverno seco e com temperaturas amenas, condições ambientais adequadas para a obtenção de uvas com bons índices de maturação,⁵ o que permite a síntese de açúcares aliada à diminuição da acidez e aumento de compostos polifenólicos. Um manejo de podas

diferenciado vem sendo realizado nestas regiões como alternativa para melhoria na qualidade das uvas.

Existem inúmeras variedades de uvas para a elaboração de vinhos em diferentes regiões vinícolas no Brasil, sendo duas categorias principais: *Vitis vinifera*, denominada uva fina, que gera vinhos superiores e encorpados, cujo cultivo é limitado aos Estados mais frios do país como Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e *Vitis labrusca*, que dá vinhos comuns devido a sua rusticidade e resistência e são cultivadas nos demais Estados onde a indústria vinícola se instalou, como Minas Gerais, São Paulo e Paraná.⁶ Estudos de melhoramento genético possibilitam o desenvolvimento de variedades híbridas, sendo que muitas delas apresentam qualidade similar às das uvas finas, associada à resistência a doenças fúngicas.⁷ Algumas variedades de uvas mais utilizadas para produção de vinhos nacionais são apresentadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Variedades de uvas mais utilizadas para produção de vinhos nacionais.

Variedade (espécie)	Características
Barbera (<i>V. vinifera</i>) – tinta	Uva italiana da área de Piemonte. Produz vinhos rústicos, frutados e ácidos; usada em cortes (combinação com outras).
Cabernet Franc (<i>V. vinifera</i>) – tinta	Originária de Bordeaux, França. Produz vinhos de ótima qualidade com aroma pronunciado. Utilizada em combinação com outras uvas originadas de Bordeaux. É a base de vinhos frutados que dispensam envelhecimento prolongado.
Cabernet Sauvignon (<i>V. vinifera</i>) – tinta	Originária de Bordeaux, França. Produz vinhos bem encorpados, frutados que, no entanto, podem ser muito adstringentes devido ao alto teor de taninos. Seus vinhos precisam de algum envelhecimento para adquirir toda sua qualidade.
Gamay (<i>V. vinifera</i>) – tinta	Uva francesa, de grande importância comercial em Borgonha. Produz vinhos vermelho intenso simples, leves e frutados, destinados a serem bebidos logo.
Isabel (<i>V. labrusca</i>) – tinta	Principal uva destinada ao processamento de vinho tinto e elaboração de suco de uva no RS. Originária da mistura entre duas espécies norte-americanas (<i>V. labrusca</i> e <i>V. vulpina</i>)
Merlot (<i>V. vinifera</i>) – tinta	Possui baixo teor de tanino, produzindo vinhos menos agressivos que os da Cabernet, razoavelmente encorpados, pouco ácidos e de cor intensa e paladar e olfato agradáveis; dispensa envelhecimento. É utilizada em cortes para atenuar produtos mais fortes.

Tabela 1.1 – Variedades de uvas mais utilizadas para produção de vinhos nacionais. (continuação)

Shiraz/Syrah (<i>V. vinifera</i>) – tinta	Originalmente proveniente do Cáucaso, e conhecida na antiga Pérsia, é talvez a uva vinífera mais antiga do mundo. Trazida para o ocidente criou raízes na França, e hoje é a uva nacional da Austrália. Produz bons vinhos varietais, que muitas vezes possuem excesso de acidez e presença taninos potentes; é freqüentemente combinada com Cabernet.
Malvasia (<i>V. vinifera</i>) – branca	Uva bastante aromática que entra em muitos vinhos brancos, vários vinhos doces e vinhos do tipo <i>champagne</i> . Participa de cortes para compensar uvas menos aromáticas.
Riesling (<i>V. vinifera</i>) – branca	De origem alemã, produz vinhos com alta acidez, teor alcoólico de baixo a médio, levemente encorpados. Utilizada para fazer vinhos no mundo todo, de secos a doces.

Fonte: COBRA, R. Q. **Notas de boas maneiras e etiqueta**. Brasília. 2003. Disponível em: <<http://www.cobra.pages.nom.br>>. Acesso em: 08 jul. 2007.

1.2 Composição química das uvas

1.2.1 Açúcares

Para a obtenção de vinhos de alta qualidade, algumas características relacionadas à composição das uvas são importantes no momento de sua colheita. O ponto de colheita das uvas pode ser determinado por características físicas, testes de sabor e determinação da composição química das bagas, sendo que a principal variável é o teor de sólidos solúveis totais (SST), o que normalmente é avaliado em campo por meio de refratômetros de bolso.^{8,9} Além de determinar o ponto de maturação das uvas, esse fator é importante para a elaboração do vinho, visto estar diretamente relacionado aos teores alcoólicos da bebida, já que aproximadamente 90% dos sólidos solúveis do mosto são compostos por açúcares fermentáveis.⁹

No início da maturação das uvas, o teor de SST é baixo porque o açúcar sintetizado pela videira é destinado a outras partes da planta. Com a evolução da maturação ocorre uma mudança nas vias de acúmulo de açúcar e estas se direcionam para as bagas, o que leva a um grande acúmulo de açúcar nas mesmas.¹⁰

Os principais açúcares presentes nas uvas das cultivares *V. vinifera* são a glicose e a frutose, responsáveis por 99% dos carboidratos no mosto e por 12 a 27% do peso das uvas maduras.^{11,12} Glicose e frutose são consideradas açúcares redutores por possuírem grupos

carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. A Figura 1.1 apresenta as estruturas químicas destes dois açúcares.

Figura 1.1 – Estruturas químicas da glicose e frutose.

Existem vários métodos para estimar o teor de açúcares redutores em alimentos, e estes podem ser classificados em titulométricos (EDTA e Lane-Enyon, Luff-Schoorl),¹³ gravimétricos (Musson-Walker)¹⁴ e espectrofotométricos (ADNS, fenol-sulfúrico, Somogyi-Nelson).^{15,16,17} De acordo com Silva *et al.* 2003,¹⁸ em um trabalho de comparação de metodologias para determinação de açúcares redutores em amostras de mel, as metodologias que se fundamentam na espectrofotometria se comportam melhor frente as que se fundamentam em titulometria ou gravimetria. A quantificação de SST é avaliada por refratômetros, e expressa em °Brix (g de sólidos solúveis totais em 100 g de mosto).

1.2.2 Compostos fenólicos

Apesar de o teor de sólidos solúveis ser o principal fator para determinar o momento ideal da colheita e confecção de vinhos de alta qualidade, existe a necessidade de se conhecer outros componentes importantes, como teor de polifenóis totais, antocianinas e acidez total. Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de moléculas com uma grande diversidade estrutural que se caracteriza por apresentar um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, o que confere reatividade¹⁹. Estes compostos são produtos do metabolismo secundário e estão amplamente distribuídos no reino vegetal, enquadrando-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas. Têm recebido especial atenção nos últimos anos por sua função antioxidante e seus efeitos benéficos para a saúde humana,^{20,21,22} o que deve-se principalmente às suas estruturas químicas, as quais atribuem

propriedades como agentes redutores e antioxidantes doadores de hidrogênio.^{23,24} Eles atuam como atrativos para agentes polinizadores e protegem as plantas contra os raios UV, insetos, fungos e bactérias.^{19,25}

Dentre as espécies vegetais que produzem compostos fenólicos, a videira (*Vitis* spp.) destaca-se em função dos altos teores destes metabólitos presentes nos tecidos dos frutos, folhas e sementes, bem como pela variabilidade de estruturas químicas encontradas. Nas últimas décadas, um número crescente de estudos tem focado nos aspectos quali e quantitativos dos compostos fenólicos em biomassas de diversas espécies e variedades de videiras e seus produtos, como vinhos e sucos.²⁶ As uvas de variedades tintas caracterizam-se por apresentar teores elevados de compostos fenólicos nos tecidos da película dos frutos e sementes, comparativamente às variedades brancas e rosadas.

Os polifenóis desempenham um papel importante em enologia, pois são responsáveis por diferenças entre vinhos brancos e tintos, e contribuem para atributos sensoriais como adstringência, sabor e cor.^{27,28} Estas moléculas estão presentes em várias partes dos cachos de uva, principalmente cascas e sementes, e sua estrutura varia com a maturação das uvas e o envelhecimento do vinho.^{29,30}

As antocianinas são polifenóis responsáveis pela cor das uvas e vinhos tintos. Estão presentes em grande quantidade na casca das uvas, e minoritariamente na polpa.³⁰ O suco de uva apresenta pouca diferença na composição de antocianinas em relação às uvas frescas.³¹ A cor das antocianinas está diretamente relacionada ao pH, sendo que em meio ácido elas são vermelhas, perdendo sua cor com o aumento do pH.³⁰ A quantificação de antocianinas totais é realizada por espectrofotometria na região visível ao redor de 465-550 nm, por meio de medidas simples de absorvância.³²

Taninos são compostos facilmente encontrados em plantas e alimentos provenientes destas, em particular frutas, sementes, cereais e diferentes bebidas. Considerados compostos fenólicos solúveis em água, de massa molecular entre 500 e 3000 Da, reagem às reações fenólicas usuais e apresentam propriedades especiais como, por exemplo, a habilidade de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas em solução.³³ Os taninos são responsáveis pela adstringência das uvas, provocada por uma combinação com as proteínas contidas na saliva e outros polímeros como polissacarídeos. Estão presentes nos frutos na forma não polimerizada, que possui propriedades tânicas mais acentuadas, e tendem a evoluir para formas mais condensadas, dando combinações mais estáveis com as proteínas. Este fato

explica a diminuição da adstringência dos frutos no decorrer da maturação.³⁴ Na uva madura os taninos se encontram principalmente nos engaços e nas sementes.¹¹

O tipo e o teor dos compostos fenólicos totais podem variar segundo diversos fatores, como o clima, o solo, a variedade da uva e o sistema de condução da parreira, além das técnicas de manejo do vinhedo e das práticas enológicas.³⁵ No entanto, observa-se que o conteúdo de antocianinas e taninos aumenta com a maturação, a partir do *veraison*, enquanto que o de ácidos fenólicos diminui.³⁶ As condições climáticas durante o período de amadurecimento e colheita dos frutos estão diretamente relacionadas à biossíntese de compostos fenólicos nas videiras.^{37,38} Assim, altos índices de precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e baixa insolação são condições positivas para a ocorrência de doenças fúngicas, fato que atua como estímulo à síntese destes compostos. Além disto, a incidência elevada de luz ultravioleta sobre os tecidos de frutos promove uma maior produção destes metabólitos, devido à ativação dos genes responsáveis pela sua rota de síntese.

1.2.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são um importante grupo de compostos presentes em sucos de uvas e vinhos devido à sua influência nas propriedades organolépticas como sabor, odor e aroma ou na estabilidade e controle microbiológico dessas bebidas. São oriundos diretamente das uvas e de processos aos quais são submetidas, como fermentação alcoólica e malolática.³⁹ Os principais componentes responsáveis pela acidez do mosto da uva são os ácidos tartárico e málico, apresentados na Figura 1.2. Suas concentrações no mosto estão relacionadas com aspectos fisiológicos da maturação da uva, fatores naturais de clima e solo e práticas agronômicas de produção, sendo sua evolução útil para avaliar o processo de maturação.⁴⁰

Figura 1.2 – Estruturas químicas dos principais ácidos presentes nas uvas.

No início do desenvolvimento das uvas o teor de ácidos é elevado, visto que estes são sintetizados pelas folhas e acumulados nas bagas ainda verdes.¹⁰ A concentração de ácido tartárico aumenta rapidamente devido à intensa multiplicação celular, já que ele é um produto secundário do metabolismo dos açúcares. O ácido málico é um intermediário do metabolismo da baga, sendo os açúcares importados para a baga responsáveis por sua produção.⁴¹ Durante o desenvolvimento das bagas um aumento progressivo desses dois ácidos é esperado até o *veraison* (estádio em que as bagas iniciaram a mudança de coloração), depois do qual as concentrações de ácidos diminuem com o amadurecimento.⁴² Esta diminuição é resultante de vários fatores como o aumento da respiração, transformação dos ácidos em outros compostos, efeito de diluição devido ao aumento de volume do fruto e habilidade reduzida do fruto sintetizar ácidos com a maturidade.¹²

No suco de uva os ácidos tartárico e málico são predominantes e succínico e cítrico estão presentes em menor proporção. No vinho existem ácidos provenientes da uva (tartárico, málico, cítrico) e originados nos processos de fermentação (succínico, láctico e acético).³⁹ A análise desses ácidos é útil para monitorar a acidez durante as várias etapas do processo de vinificação (fermentação alcoólica e malolática e envelhecimento do vinho), apresentando grande importância na detecção de alterações no vinho.⁴³

1.2.4 Substâncias aromáticas

Diversas substâncias químicas participam do aroma das uvas e vinhos, entre elas os monoterpenos, C13-norisoprenóides, ésteres, acetatos, álcoois, ácidos orgânicos, fenóis e tióis. Os monoterpenos e C13-norisoprenóides são característicos da uva e suas concentrações variam com o tipo de uva, fatores climáticos e de cultivo.^{44,45} Outros compostos são modificados durante a fermentação ou derivados do metabolismo de leveduras, como ésteres e acetatos.⁴⁶

Os terpenos podem aparecer na forma livre ou glicosilada, sendo esta última mais abundante. Na forma livre são compostos voláteis diretamente relacionados ao aroma, e na forma glicosilada são compostos não voláteis que podem ser transformados em voláteis por hidrólise, aumentando as características aromáticas da uva e do vinho.^{47,48} Estão localizados principalmente nas cascas, e em variedades com aroma mais intenso, também na polpa.⁴⁹

Um dos fatores que influencia o aroma característico de uma determinada variedade é o estágio de maturação da uva, já que ambas as formas de terpenos, livre ou glicosilada, são acumuladas durante a maturação.⁵⁰

1.3 Ciclos fenológicos da videira

A diferença na duração do ciclo fenológico das videiras entre as regiões pode ser atribuída às condições de temperatura, sendo que nas locais com maior temperatura média há um maior desenvolvimento vegetativo e redução no ciclo. É de se esperar que em uma mesma região os ciclos das videiras não sejam constantes devido à variação das condições climáticas de um ano para outro, podendo ser mais curtos ou longos dependendo do ano e da época em que a quebra induzida da dormência é realizada.⁵¹ A influência da temperatura no ciclo da videira pode ser traduzida em graus-dia, que é o somatório de temperaturas médias superiores a 10 °C acumulados no período de vegetação da videira, necessários para que ela complete seu ciclo.

Nas condições de clima temperado, com inverno bem definido, a videira apresenta um ciclo vegetativo completo a cada ano, no qual formam-se ramos e folhas que asseguram o desenvolvimento do sistema radicular. Em regiões de clima tropical, como é o caso do nordeste brasileiro, a videira não encontra temperaturas inferiores a 12 °C e sua fase de dormência é obtida por suspensão da irrigação. Nessa região ocorrem dois ciclos anualmente.

De acordo com Baillod e Baggioloni (1993) o ciclo fenológico se divide nos seguintes estádios, a partir da poda de frutificação: a) gema-algodão, quando as escamas se rompem e aparece a plumagem; b) brotação, quando as folhas começam a sair; c) aparecimento da inflorescência, quando 50% dos ramos apresentam inflorescência, com cachos visíveis; d) florescimento, quando 50% das flores se encontram abertas; e) *veraison*, quando 50% das bagas mudam de coloração; f) colheita, momento em que 100% das bagas apresentam coloração intensa, com teor máximo de SST.^{42,51}

1.4 Estádios de maturação das uvas

Durante o processo de maturação das uvas ocorre um conjunto de fenômenos, dentre os quais o acúmulo de açúcares, diminuição da acidez, migração de minerais, modificação das paredes celulares, evolução de compostos fenólicos e substâncias aromáticas.⁴¹

Os estádios de maturação do fruto podem ser divididos de acordo com a Figura 1.3:

Figura 1.3 – Fases de maturação da uva.

Fonte: DIAS, J. P. **Centésimo curso intensivo de vinificação**. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Disponível em: <<http://www.drapc.min-agricultura.pt>>. Acesso em: 05 jan. 2012.

a) estágio verde (formação do bago e crescimento herbáceo): compreende desde o aparecimento do fruto ao início da maturação. Durante esta fase o bago é verde e duro, e aumenta de tamanho devido à rápida divisão celular que ocorre durante as primeiras semanas, e aos solutos acumulados, principalmente ácidos tartárico e málico, sendo que o primeiro está mais concentrado no exterior da baga em desenvolvimento e o segundo na polpa. Os açúcares são resultado da fotossíntese realizada nos órgãos verdes da videira e migram para as outras partes da planta, exclusivamente na forma de sacarose. Seus teores são muito baixos, pois são consumidos na multiplicação celular e crescimento das sementes, mas a glicose predomina em relação à frutose, já que esta é consumida preferencialmente nas reações de síntese celular;^{11,41,52}

b) estágio de amadurecimento: período entre o início e o final da maturação. Nesta fase as uvas tintas se pigmentam, indicativo da produção de antocianinas, e a baga amolece. O teor de açúcar aumenta rapidamente devido ao acúmulo nos vacúolos das células da polpa, enquanto a acidez começa a diminuir;^{11,41}

c) estágio de maturação: período no qual a uva atinge teores máximos de açúcar e mínimos de acidez. A baga aumenta de tamanho devido ao aumento dos vacúolos celulares e

a película cresce proporcionalmente menos que a polpa, o que pode causar microfissuras que servem de entrada para fungos. Nesta etapa é observado um acúmulo de açúcares, sendo que a glicose e a frutose se apresentam em mesma proporção e a acidez em constante queda;^{11,41}

d) estágio de sobrematuração, o qual se dá por desidratação das uvas elevando a concentração de seus componentes. Esta fase é importante para a produção de vinhos licorosos, e dificilmente ocorre no Brasil.^{11,41}

Fatores como incidência de luz solar, temperatura e disponibilidade de água exercem grande influência no processo de maturação, apresentando efeito no crescimento e atividade metabólica da planta. A temperatura influencia a intensidade das migrações durante a maturação, o que reflete no volume das células e tamanho dos frutos, na degradação do ácido málico, que é proporcional à temperatura, e no teor de compostos fenólicos, sendo que valores extremos de temperatura diminuem a concentração de antocianinas. Temperaturas excessivamente elevadas também são prejudiciais à qualidade aromática.¹¹

1.5 Estatística e Quimiometria

A análise de variância (ANOVA) é um teste estatístico amplamente difundido que visa verificar se existe uma diferença significativa entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente. Dois componentes são calculados, a variância dentro de grupos e entre grupos, cuja razão fornece um f calculado. Quando este valor calculado for maior que o tabelado existe uma diferença significativa entre os grupos.

A quimiometria pode ser definida como uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos.⁵³ A base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados é o PCA (Análise de Componentes Principais),^{54,55} que permite extrair, de um determinado conjunto de dados, informações relevantes para o seu entendimento. Este conjunto de dados é organizado na forma de uma matriz, onde as linhas são as amostras e as colunas as variáveis, e a dimensão dos dados é reduzida para um conjunto menor de dimensões, denominadas componentes principais (PCs), obtidas por meio de combinações lineares das variáveis originais. A partir destas componentes, dois novos conjuntos de dados são gerados, denominados *scores* e *loadings*. Estes dois conjuntos trazem, respectivamente, informações sobre as amostras e as variáveis. Como as PCs são ortogonais, é possível examinar as relações

entre amostras e variáveis através dos gráficos de *scores* e *loadings*, e o estudo do conjunto dos dois permite estimar a influência de cada variável em cada amostra.⁵⁶ As aplicações da PCA são diversas e abrangem vários ramos do conhecimento, entre eles a química analítica.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Esta parte do trabalho teve por objetivo geral estudar os parâmetros físicos e físico-químicos comumente avaliados durante o processo de maturação de uvas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar as análises clássicas de medidas e massa das bagas, antocianinas totais, polifenóis totais, acidez total titulável, pH, teor de sólidos solúveis e açúcares redutores em mostos de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon (*V. vinifera*) cultivadas em Água Vermelha, Distrito de São Carlos, SP e Syrah cultivadas em Louveira, SP.
- Comparar os resultados das uvas maduras com os obtidos para uvas Cabernet Sauvignon e Merlot, provenientes de Bento Gonçalves, RS, Syrah, cultivada em Casa Nova, BA, e uma variedade híbrida, Máximo, cultivada em Louveira, SP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Localização, coleta e preparo das amostras

As uvas utilizadas para acompanhamento da maturação foram provenientes do Sítio Jequitibá, em Água Vermelha, Distrito de São Carlos, SP e do Sítio Santa Rita, em Louveira, SP. Cachos de uvas Cabernet Sauvignon e Syrah, ambas do gênero *V. vinifera*, foram colhidos em diferentes estádios de maturação (a partir de 90 dias da data da poda, durante os anos de 2008, 2009 e 2010), acondicionados em sacos plásticos, transportados em isopor com gelo ou gelo seco (no caso de amostras provenientes de Louveira) e armazenados a -18°C .

Em São Carlos, as mudas foram plantadas em meados do ano 2000, a título de experimentação, em sistema de espaldeira, com três fios para condução das vinhas, utilizando-se o porta-enxerto IAC 766. Em Louveira, as mudas foram plantadas no ano de 2006, em sistema de condução em Y e sob cobertura de plástico, utilizando-se porta-enxerto Palsen 1103.

Devido às características climáticas da região, optou-se pela alteração do ciclo de produção, de acordo com o manejo de dupla poda, para propiciar a colheita entre os meses de maio a julho (período seco), proporcionando à videira dois ciclos de vegetação/ano e apenas um de produção, concentrado na época de menor pluviosidade.⁵ Tal modo de condução das videiras consiste em realizar uma primeira poda (de formação) entre os meses de julho/agosto. Os ramos originados desta poda são conduzidos sem frutos, visando formar novos ramos de produção com gemas férteis. Após o amadurecimento ou lignificação destes ramos, faz-se uma segunda poda (de produção) durante os meses de janeiro/fevereiro. As produções oriundas desta poda darão origem à colheita, que normalmente ocorrerá entre os 160 a 180 dias após, coincidindo com o período seco.

A Figura 1.4 apresenta imagens do vinhedo de São Carlos e a Figura 1.5 do vinhedo de Louveira.

Figura 1.4 - (A) Vinhedo localizado em Água Vermelha, São Carlos, SP; em sistema de espaldeira **(B)** Cacho de uva Syrah; **(C)** folha de uva Cabernet Sauvignon; **(D)** folha de uva Shiraz.

Figura 1.5 - Vinhedo localizado em Louveira, SP; em sistema de Y.

Uvas maduras da variedade Máximo foram coletadas no Sítio Santa Rita, em Louveira, SP, no ano de 2010. Uvas Cabernet Sauvignon e Merlot foram enviadas pela

vinícola Miolo de Bento Gonçalves-RS, em 2008, e Syrah pela vinícola Miolo de Casa Nova-BA, em 2008, 2009 e 2010.

A variedade Merlot também pertence ao gênero *V. vinifera*, enquanto a Máximo (IAC 138-22) é uma uva híbrida, obtida por Santos Neto, em 1946, como resultado do cruzamento das variedades Seibel 11342 e Syrah.⁵⁷ Este cruzamento teve como objetivo reunir em uma mesma variedade as qualidades das finas castas de *V. vinifera*, com maior resistência às doenças fúngicas e maior adaptação às condições ambientais do Estado de São Paulo.⁵⁸

Os estádios de maturação avaliados foram designados por verde (de 90 a 105 dias após a poda), *veraison* (120 dias após a poda), amadurecimento 1 (135 a 138 dias após a poda), amadurecimento 2 (150 a 155 dias após a poda), amadurecimento 3 (165 a 170 dias após a poda) e madura (180 dias após a poda), como ilustrado na Figura 1.6.

Figura 1.6 - Uvas nos estádios de maturação estudados.

Para todas as análises clássicas realizadas, o mosto foi obtido a partir das uvas retiradas de diferentes partes dos cachos, e de diferentes plantas, descongeladas em banho de gelo, esmagadas em almofariz e centrifugadas a 3000 rpm (centrífuga Baby Excelsa II, 206R) por 10 min.⁵⁹

3.2 Parâmetros físicos das bagas

O comprimento e largura de 10 bagas foram medidos com paquímetro Mitutoyo com duas casas decimais de precisão, e a massa de 10 bagas foi obtido em balança semi-analítica, em triplicata. As dimensões foram estabelecidas de acordo com a Figura 1.7.

Figura 1.7 - Representação física para orientação das medidas de comprimento e largura das bagas.

3.3 Antocianinas totais (Ant)

As medidas de antocianinas totais foram realizadas pelo método de descoloração com bissulfito de sódio.^{30,60} Adicionou-se 1 mL de etanol acidificado com HCl 0,1% em 1 mL de mosto e acrescentou-se 20 mL de HCl 2%. Para uma alíquota de 10 mL dessa solução adicionou-se 4 mL de água deionizada, e em outros 10 mL adicionou-se 4 mL de Na₂S₂O₅ 15%. As soluções foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por 20 min e suas absorbâncias obtidas em um espectrofotômetro UV-Vis Jasco, a 520 nm. A concentração total de antocianinas (em mg L⁻¹) foi obtida pela Equação 1:

$$A(\text{mg L}^{-1}) = (A - B) \times 875 \quad (\text{Eq. 1})$$

em que A é a absorbância da solução com água e B com Na₂S₂O₅.

3.4 Compostos fenólicos totais (IPT)

Para a análise de compostos fenólicos totais, o extrato das uvas maceradas foi diluído 101 vezes com água deionizada, e a absorbância das soluções lidas em 280 nm.^{30,60} O índice

de polifenóis total foi obtido pela leitura direta da diluição preparada, de acordo com a Equação 2:

$$IPT = D_{280} \times 101 \quad (\text{Eq. 2})$$

em que IPT representa o índice de polifenóis total e D_{280} o valor de absorbância obtido pelas leituras em 280 nm.

3.5 Acidez total titulável (AT)

A acidez total titulável foi avaliada por titulometria com solução de NaOH 0,1 N, previamente padronizada, utilizando-se fenolftaleína como indicador, e expressa em meq L^{-1} , calculada de acordo com a Equação 3:

$$At = \frac{1000 \times n \times N}{V} \quad (\text{Eq. 3})$$

em que At é a acidez total, n é o volume da solução de NaOH gasto na solução (mL), N é a normalidade da solução de NaOH e V é o volume de amostra (mL).⁶¹

3.6 Concentração hidrogênio iônica (pH)

O pH das amostras foi medido diretamente no mosto em pHmetro digital Digimed calibrado para pH 4 e 7.

3.7 Sólidos solúveis totais (SST)

O teor de SST foi determinado por leitura direta em um refratômetro Abbe modelo 2WAJ, e expresso em °Brix.⁶¹

3.8 Açúcares redutores (AR)

Açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria, de acordo com o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS), utilizando-se uma curva padrão de glicose com concentrações entre 0,2 e 1,0 mg mL⁻¹. Para o preparo do reagente misturou-se uma solução de 1% DNS a 30% tartarato de sódio e potássio em NaOH 0,4 mol L⁻¹. A solução foi armazenada no escuro para que não degradasse. O método consistiu em adicionar 400 µL do reagente a 400 µL de mosto, aquecer a mistura em água fervente por 10 min e após resfriamento a temperatura ambiente, diluição em 10 volumes de água. As medidas foram feitas em 540 nm.^{15,18}

3.9 Análise Estatística e Quimiométrica

Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA para verificar diferenças significativas entre as amostras para as variáveis estudadas.

Todas as variáveis analisadas foram submetidas à análise quimiométrica por meio da Análise de Componentes Principais (PCA), com a finalidade de verificar se existe algum padrão de agrupamento entre as uvas de diferentes variedades e origens, além de verificar as principais variáveis que influenciam no padrão de maturação dessas uvas. Para estudo de maturação, os dados foram organizados em uma matriz com 35 linhas (correspondentes às amostras) e 6 colunas (correspondentes às variáveis), e para a comparação de todas as variedades maduras em 12 linhas e 6 colunas. Os dados foram normalizados e analisados pelo programa Minitab 16.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características das regiões estudadas

O Brasil apresenta diversos tipos de clima, e sabe-se atualmente que a vitivinicultura é possível em praticamente todo o território nacional, com exceção da Amazônia devido às elevadas temperaturas e umidade. Nas regiões de clima com estação seca e chuvosa, como é o caso da região de São Carlos, o manejo de podas tem permitido a implantação desta prática.¹¹ Para isso é necessário fazer um manejo de poda diferenciado, alterando o ciclo da videira e, conseqüentemente, o período de frutificação.

A videira necessita de calor para o amadurecimento dos frutos, especialmente no período entre floração e maturação, com temperaturas próximas a 30 °C no período final para que a acidez dos frutos não seja muito alta. Esta planta adapta-se a vários tipos de solos, exceto os turfosos, muito úmidos ou densos. Com o uso de porta-enxertos tornou-se possível a adequação do plantio em diferentes regiões, desde solos arenosos até argilosos, sendo o melhor resultado obtido em solos onde frações de argila, silte e areia sejam similares. Para um crescimento radicular adequado, a videira deve dispor de uma profundidade de solo suficiente com mais de 50 cm de profundidade, e para o cultivo de uvas tintas solos escuros são recomendados, por aquecerem com maior facilidade.¹¹

O município de Casa Nova, situado na região do Vale do São Francisco, é atualmente o segundo pólo produtor de vinhos finos nacionais. Por estar próximo à linha do Equador, mantém altas temperaturas durante todo o ano, produzindo uma variedade de vinhos com características muito peculiares. O solo, do tipo arenoso, típico da caatinga do sertão nordestino, revelou-se ideal para o cultivo de uvas. O clima é tropical semi-árido, com grande incidência de raios solares durante todo o ano e baixa precipitação de chuvas, o que possibilita o controle da produção com base na irrigação por gotejamento.^{62,63}

O município de Bento Gonçalves está localizado na Encosta Superior do Nordeste do Rio Grande do Sul, a 690 metros de altitude, no denominado Vale dos Vinhedos, região serrana do Estado do Rio Grande do Sul. O clima da região é classificado como subtropical de altitude, e suas temperaturas variam entre – 4 °C no inverno e 36 °C no verão, com uma precipitação pluviométrica média anual de 1500 mm. É conhecida como a região que produz os melhores vinhos brasileiros.^{64,65}

O município de São Carlos está localizado no interior do Estado de São Paulo, próximo de seu centro geográfico, possuindo dois distritos, Santa Eudóxia e Água Vermelha. A cidade é um importante centro regional, com a economia fundamentada em atividades industriais e na agropecuária (cana-de-açúcar, laranja e frango). O clima é tropical de altitude com inverno seco e verão chuvoso, com precipitação anual média de 1512 mm. A temperatura média mínima é de 15,3 °C e máxima é de 27,0 °C; e a estação chuvosa vai de outubro a março e a estação seca de abril a setembro.⁶⁶ Possui potencial para a atividade agrícola, ocorrendo principalmente solos arenosos e de baixa fertilidade.⁶⁷

Louveira localiza-se a sudoeste do Estado de São Paulo, e pertence a 5ª microrregião de Campinas. A temperatura média varia entre 14,0 e 27,7 °C, sendo predominante o clima temperado, com precipitação média anual de 1355 mm. A agricultura, especialmente a plantação de frutas, é uma atividade econômica de grande importância.⁶⁸

A Tabela 1.2 apresenta os dados meteorológicos obtidos em São Carlos durante os períodos de estudo das amostras colhidas.

Tabela 1.2 - Médias mensais de temperatura e precipitação durante os anos de 2008, 2009 e 2010 na região de São Carlos.

Mês \ Ano	2008		2009		2010	
	T _{média} (°C)	Precipitação (mm)	T _{média} (°C)	Precipitação (mm)	T _{média} (°C)	Precipitação (mm)
Jan	22,8	161,2	22,8	280,8	24,1	310,0
Fev	23,4	191,6	24,1	191,0	25,0	159,8
Mar	22,6	155,6	24,0	302,8	23,9	134,2
Abr	21,7	142,4	21,8	62,6	21,6	107,4
Mai	18,4	39,0	20,2	36,6	19,1	8,0
Jun	18,4	22,4	16,8	24,8	18,2	60,8
Jul	18,4	0	19,1	63,2	19,8	31,4

Fonte: EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) Pecuária Sudeste. **Dados meteorológicos.** Disponível em: <http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/dados-meteorologicos/tmp_lista_dados>. Acesso em: 20 set. 2010.⁶⁹

Devido ao manejo de poda diferenciado adotado na região as videiras iniciaram o período de frutificação em abril e as uvas obtiveram maturação completa em julho, época em que as temperaturas médias foram ao redor de 19 °C e poucas chuvas, condições que favorecem a maturação e dificultam o aparecimento de fungos patogênicos à plantação. A Tabela 1.3 apresenta os dados meteorológicos obtidos em Louveira durante o ano de 2010.

Tabela 1.3 - Médias mensais dos meses de janeiro a agosto de temperatura e precipitação total durante o ano de 2010 na região de Louveira.

Mês	T _{média} (°C)	Precipitação (mm)
Jan	23,6	223,0
Fev	23,8	181,1
Mar	23,2	148,2
Abr	20,9	70,8
Mai	18,5	68,4
Jun	17,2	49,4
Jul	17,0	38,8
Ago	18,6	34,6

Fonte: CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS A AGRICULTURA (CPA). Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>> Acesso em: 10 jan. 2011.⁷⁰

As condições meteorológicas em Louveira no ano de 2010 foram semelhantes às de São Carlos. Neste local, as uvas foram submetidas à poda em fevereiro e foram colhidas no mês agosto, também de temperaturas amenas e pouca pluviosidade.

4.2 Parâmetros físicos e químicos das bagas

Com o amadurecimento das uvas, ambas as medidas de comprimento e largura e a massa das bagas tendem a aumentar, pois nesse processo há o acúmulo de sólidos solúveis, entre eles os açúcares. Este fato foi observado para todas as uvas estudadas durante os três anos consecutivos. A dimensão da baga depende principalmente das características genéticas da variedade, do equilíbrio hormonal, da quantidade de água absorvida e da concentração de açúcares.³⁶

A Tabela 1.4 apresenta os valores médios de comprimento e largura de 10 bagas, e a Tabela 1.5 a massa para 10 uvas, nos diferentes estádios de maturação e de diferentes origens.

Tabela 1.4 - Comprimento e largura das uvas analisadas (10 bagas)

Uva	Estádio	Comprimento (cm)			Largura (cm)		
		2008	2009	2010	2008	2009	2010
Syrah AV	verde	1,34 ^c _A ±0,07	1,35 ^c _A ±0,07	1,41 ^d _A ±0,06	1,07 ^b _A ±0,10	1,20 ^c _A ±0,06	1,31 ^e _A ±0,06
	veraison	1,46 ^c _B ±0,07	1,45 ^c _B ±0,07	1,49 ^c _B ±0,04	1,26 ^c _B ±0,10	1,27 ^c _B ±0,08	1,36 ^d _B ±0,03
	amad1	1,61 ^d _C ±0,03	1,58 ^c _D ±0,07	1,56 ^c _C ±0,05	1,33 ^b _C ±0,06	1,39 ^c _C ±0,10	1,42 ^c _C ±0,06
	amad2	1,45 ^b _B ±0,07	1,53 ^c _C ±0,06	-	1,31 ^b _B ±0,07	1,27 ^b _B ±0,07	-
	amad3	1,45 ^b _B ±0,05	1,52 ^c _C ±0,08	1,50 ^b _B ±0,05	1,26 ^a _B ±0,05	1,30 ^b _B ±0,06	1,28 ^b _A ±0,10
	madura	1,46 ^d _B ±0,11	1,47 ^d _B ±0,06	1,58 ^e _C ±0,05	1,25 ^b _B ±0,09	1,26 ^b _B ±0,07	1,34 ^e _B ±0,07
C. Sauv AV	verde	1,06 ^a _A ±0,03	-	-	0,97 ^a _A ±0,51	-	-
	veraison	1,28 ^a _C ±0,07	-	1,26 ^a _A ±0,04	1,17 ^a _C ±0,50	-	1,13 ^a _A ±0,08
	amad1	1,17 ^a _B ±0,06	-	1,37 ^b _B ±0,08	1,11 ^a _B ±0,81	-	1,29 ^b _C ±0,06
	amad2	1,28 ^a _C ±0,07	-	-	1,16 ^a _C ±0,60	-	-
	amad3	-	-	1,31 ^a _A ±0,09	-	-	1,22 ^a _B ±0,08
	madura	1,31 ^b _C ±0,08	-	1,42 ^c _C ±0,09	1,21 ^b _C ±0,67	-	1,33 ^{de} _C ±0,04
Syrah Louv	verde	-	-	1,28 ^b _A ±0,05	-	-	1,14 ^d _A ±0,05
	veraison	-	-	1,36 ^b _B ±0,06	-	-	1,21 ^b _B ±0,07
	amad2	-	-	1,48 ^b _C ±0,08	-	-	1,35 ^c _C ±0,06
	madura	-	-	1,45 ^d _C ±0,08	-	-	1,32 ^d _C ±0,07
C. SauvBG	madura	1,32 ^b ±0,05	-	-	1,32 ^b ±0,07	-	-
Merlot BG	madura	1,38 ^c ±0,05	-	-	1,32 ^d ±0,06	-	-
Syrah CN	madura	1,39 ^c ±0,06	1,49 ^d ±0,08	1,43 ^d ±0,06	1,28 ^{cd} ±0,08	1,36 ^e ±0,05	1,23 ^b ±0,10
Max	madura	-	-	1,23 ^a ±0,09	-	-	1,07 ^a ±0,08

Valores seguidos de mesma letra para a mesma variável (comprimento ou largura) não diferem significativamente pelo teste de ANOVA ($P < 0,05$). Letras minúsculas sobrescritas indicam comparação entre as uvas em cada estágio de maturação (linhas), letras maiúsculas subscritas indicam comparação para maturação de cada variedade dentro de um mesmo ano (colunas).

Tabela 1.5 - Massa média de 10 uvas em diferentes estádios de maturação e procedências.

Uva	Estádio	Massa (g)		
		2008	2009	2010
Syrah AV	verde	9,41 ^b _A ± 0,44	10,15 ^c _A ± 0,73	12,65 ^d _A ± 1,17
	veraison	13,83 ^c _B ± 0,12	12,15 ^d _B ± 0,56	14,62 ^e _B ± 1,37
	amad1	17,65 ^b _D ± 0,44	18,25 ^c _C ± 0,23	19,05 ^d _C ± 0,50
	amad2	17,00 ^c _D ± 0,38	16,77 ^c _D ± 0,30	-
	amad3	15,61 ^b _C ± 0,41	13,19 ^c _D ± 0,50	17,93 ^d _C ± 0,23
	madura	14,12 ^d _B ± 0,80	17,02 ^f _D ± 0,60	15,36 ^e _B ± 0,50
C. Sauv AV	verde	6,95 ^a _A ± 0,22	-	-
	veraison	10,76 ^b _B ± 0,47	-	8,51 ^a _A ± 0,35
	amad1	10,04 ^a _C ± 0,11	-	11,48 ^a _B ± 0,16
	amad2	12,27 ^a _D ± 0,40	-	-
	amad3	-	-	11,28 ^a _C ± 0,19
	madura	12,17 ^c _D ± 0,39	-	12,09 ^c _D ± 0,44

Tabela 1.5 - Massa média de 10 uvas em diferentes estádios de maturação e procedências. (continuação)

Syrah Louv	verde	-	-	8,88 ^b _A ± 0,59
	veraison	-	-	11,19 ^b _B ± 0,33
	amad2	-	-	13,81 ^b _C ± 0,44
	madura	-	-	14,23 ^d _C ± 0,32
C. SauvBG	madura	13,89 ^d ± 0,69	-	-
Merlot BG	madura	15,53 ^{ef} ± 0,56	-	-
Syrah CN	madura	16,46 ^f ± 0,52	19,31 ^g ± 0,72	11,11 ^b ± 0,72
Max	madura	-	-	8,15 ^a ± 0,39

Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de ANOVA ($P < 0,05$). Letras minúsculas sobrescritas indicam comparação entre as uvas em cada estágio de maturação (linhas), letras maiúsculas subscritas indicam comparação para maturação de cada variedade dentro de um mesmo ano (colunas).

A massa da baga durante a maturação está relacionada com o número de sementes, o acúmulo de açúcares e o nível de umidade no solo e na atmosfera.^{36,71} Deficiências hídricas entre a floração e início do amadurecimento causam uma redução no tamanho da baga,¹⁰ mas elevada precipitação pluviométrica no final da maturação, após um período de seca, provoca um aumento do tamanho final da baga considerável.⁷² Observa-se que as uvas Syrah são maiores e mais pesadas que as Cabernet Sauvignon, independente da localidade de cultivo, e que estas, por sua vez se apresentam mais arredondadas, características estas estabelecidas geneticamente. Os aumentos do volume e da massa estão diretamente associados ao conteúdo de açúcares e água.

No entanto, em algumas variedades, como a Syrah, o acúmulo de açúcares nos últimos estádios de amadurecimento nem sempre é acompanhado pelo aumento do volume da baga, ocorrendo um encolhimento e perda de peso, fato observado nos três anos consecutivos de cultivo desta variedade em São Carlos. Esta característica pode ser uma consequência da transpiração, que é a perda de água pela parte aérea das plantas, na forma de vapor. Isto indica que, em algumas variedades, o fluxo de água na planta diminui durante os últimos estádios da maturação do fruto.^{73,74,75} No entanto, a maior massa da baga de Syrah foi observada no ano de 2009, fato atribuído à grande pluviosidade próxima à data de colheita, no mês de julho. O mesmo foi verificado para as uvas de Casa Nova neste mesmo ano, sendo que em 2008 e 2010 o índice pluviométrico foi de aproximadamente 185 mm nesta região, ao invés dos 320 mm detectados entre os meses de abril e julho de 2009, época de maturação das uvas enviadas.⁷⁶ A Figura 1.8 apresenta graficamente a evolução de massa das bagas com o estágio de maturação das uvas Cabernet Sauvignon e Syrah cultivadas em Água Vermelha.

Figura 1.8 - Gráficos da evolução do peso com a maturação de uvas C. Sauvignon e Syrah cultivadas em Água Vermelha.

A comparação do perfil de maturação em relação à massa de uvas Cabernet Sauvignon assemelha-se ao apresentado na Figura 1.3, com os estádios verde, de amadurecimento, maturação e sobrematuração. Para as uvas Syrah, com exceção do ano 2009, o perfil gráfico ilustra os resultados apresentados na tabela, no qual após o aumento do tamanho e peso das bagas ocorre um encolhimento e diminuição de tamanho, fato observado e relatado por McCarthy (1997, 1999a, 1999b).

Diferenças significativas estatisticamente foram encontradas comparando-se algumas variedades maduras cultivadas em Água Vermelha com as de Bento Gonçalves, Louveira e Casa Nova. Rizzon e Miele (2002) encontraram valores médios de comprimento de 1,23 cm e largura de 1,24 cm para bagas de C. Sauvignon cultivadas em Bento Gonçalves durante as safras de 1987 e 1992, valores um pouco menores que para as cultivadas nas datas estudadas em Água Vermelha e Bento Gonçalves, e peso de 1,40 g.⁷² Falcão *et al.* (2008) encontraram valores de peso ao redor de 1,50 g e 1,25 g para a mesma variedade colhida nos anos de 2005 e 2006 em Santa Catarina, sendo que entre o período de *veraison* e maturação completa o índice pluviométrico foi, aproximadamente, três vezes maior no primeiro ano, indicando um maior acúmulo de água.⁷³ Estes valores são considerados inferiores aos 2,0 g por baga, já estabelecidos em literatura.⁷⁴

4.3 Antocianinas e Polifenóis Totais

A evolução dos teores de antocianinas totais (mg L^{-1}) e índice de polifenóis totais (IPT) nas uvas cultivadas em Água Vermelha (AV) e Louveira (Louv) são apresentadas na Figura 1.9.

Como esperado, o teor de antocianinas nas duas variedades aumentou com o amadurecimento, a partir das uvas verdes, sendo mais acentuado para as da variedade Cabernet Sauvignon. Isto pode ser verificado visualmente pela cor das cascas devido às antocianinas serem responsáveis pela pigmentação das uvas tintas. Porém para ambas as variedades este valor chegou a um máximo, ao redor de 250 mg L^{-1} , e decaiu na maturação completa para valores entre 125 e 225 mg L^{-1} , fato condizente com os resultados de Draghici *et al.* (2011)⁷⁵ e Falcão *et al.* (2008),⁷³ o que pode, em partes, ser explicado pelo aumento da pluviosidade após o período de *veraison*, principalmente no ano de 2010 em Água Vermelha, o que causa um “efeito de diluição”. De acordo com os resultados de Bevilacqua (1995) foram encontrados valores entre 100 e 200 mg mL^{-1} de antocianinas para diferentes variedades de uvas⁵⁹, números semelhantes aos encontrados neste estudo.

Figura 1.9 - Teor de antocianinas totais e índice de polifenóis totais para as uvas Syrah e C. Sauvignon em diferentes estádios de maturação, colhidas em Água Vermelha e Louveira.

O índice de polifenóis totais (IPT) diminuiu, fato indicativo da redução da adstringência das bagas provocada pela evolução dos taninos para formas mais condensadas, gerando combinações mais estáveis com as proteínas,³⁴ e da diminuição dos ácidos fenólicos, pertencentes à classe dos polifenóis. Ao final da maturação, um pequeno aumento no IPT pode indicar a contribuição das antocianinas para o teor de polifenóis totais, visto pertencer a esta classe de compostos.

4.4 Acidez Total e pH

A Figura 1.10 apresenta a evolução da acidez total titulável (meq L^{-1}) e pH do mosto.

Figura 1.10 - Acidez total titulável e pH do mosto para as uvas Syrah e C. Sauvignon em diferentes estádios de maturação, colhidas em Água Vermelha e Louveira.

A acidez total titulável das uvas diminuiu consideravelmente durante a maturação. Valores de 120 meq L⁻¹ foram encontrados para uvas C. Sauvignon cultivadas na Serra Gaúcha no período das safras entre 1987 e 1991,⁷² e de 87,72 e 97,52 meq L⁻¹ para uvas Syrah em 2005 e 2006 em ciclos de inverno no sul de Minas Gerais.⁷⁶ Neste estudo foram observados valores de 75,99 meq L⁻¹ e 65,13 meq L⁻¹ para a mesma variedade em 2008 e 2010, indicando uvas menos ácidas. Essa diminuição de acidez está relacionada ao fato dos ácidos málico e tartárico serem sintetizados pela folha e pelas bagas ainda verdes, e serem utilizados como fonte de energia na respiração celular no processo de amadurecimento dos frutos.¹⁰ Outros fatores que contribuem para esse perfil são a diluição dos ácidos orgânicos em função do aumento do tamanho da baga, a migração de íons e consequente salificação dos ácidos orgânicos.⁷²

Concomitantemente observou-se um aumento do pH, com valores entre 3,5 e 4,0 para as uvas maduras. Este perfil está relacionado à concentração de ácidos orgânicos e ao aumento dos cátions, principalmente potássio.³⁶ Valores de 3,32 e 3,55 foram relatados no sul de Minas Gerais nos anos de 2005 e 2006 para uvas Syrah.⁷⁶

4.5 Açúcares redutores e sólidos solúveis totais

Os valores de açúcares redutores totais, representados em mg mL⁻¹ de glicose, açúcar em maior quantidade nas uvas, e de sólidos solúveis totais (°Brix), açúcares em sua maioria, com a maturação das bagas, ao apresentados na Figura 1.11.

Figura 1.11 - Concentração de açúcares redutores e sólidos solúveis totais para as uvas Syrah e C. Sauvignon em diferentes estádios de maturação, colhidas em Água Vermelha e Louveira.

A concentração de açúcares redutores aumentou com o amadurecimento das bagas, fato já esperado. Na fase do crescimento herbáceo da baga, o teor de açúcar é baixo. Nesse período, ele é utilizado para o desenvolvimento do fruto, sobretudo para o crescimento e a maturação da semente.¹⁰ Na fase de amadurecimento do fruto, uma modificação metabólica na utilização do açúcar ocasiona o acúmulo rápido deste componente na baga. Próximo à colheita, as bagas continuam acumulando açúcares, porém mais lentamente, e dependendo das condições climáticas, o teor de açúcar pode diminuir, pois este tende a se direcionar para outras partes da planta onde será armazenado.¹⁰ Analisando estes resultados em conjunto com os obtidos para acidez total pode-se estabelecer uma relação geral entre a diminuição do teor de ácidos com o aumento do teor de açúcares, pois os primeiros, em especial o ácido málico, são intermediários na formação dos açúcares. No entanto não seria correto estabelecer uma relação direta entre os teores destes compostos durante a maturação já que há outros intermediários na formação de açúcares.⁷⁷

O teor de sólidos solúveis é o principal indicativo da época ideal da colheita, visto que pode ser monitorado em campo por refratômetros de bolso. Nas uvas C. Sauvignon observou-se um aumento gradual das uvas verdes para as maduras, apresentando 20,4 °Brix em 2008 e 20,3 °Brix em 2010. Rizzon e Miele (2002) encontraram valores médios de 18,1 °Brix para esta variedade cultivada na Serra Gaúcha no período entre 1987 e 1992, sendo o teor máximo encontrado de 20,1 °Brix em 1991.⁷² O teor de sólidos solúveis para as uvas Syrah chegou a 21,7 °Brix em 2010. Favero *et al.* (2008) relataram valores de 18,84 °Brix para o ano de 2005 e 21,48 °Brix para o ano de 2006, em ciclos de inverno, no município de Três Corações, MG.⁷⁶

4.6 Análises para uvas maduras de diferentes variedades e origens

Resultados comparativos entre as uvas maduras cultivadas em São Carlos e as provenientes de Louveira, Bento Gonçalves e Casa Nova, em relação às análises já descritas, estão apresentados na Figura 1.12.

Figura 1.12 - Teor de antocianinas totais, índice de polifenóis totais, Acidez titulável, pH do mosto, Açúcares reductores totais, sólidos solúveis totais para as uvas Syrah (ShAV) e C. Sauvignon (CSAV), colhidas em Água Vermelha, Syrah (ShL) e Máximo (MaxL) coletadas em Louveira, C. Sauvignon (CSBG) e Merlot (MerBG), provenientes de Bento Gonçalves, e Syrah (ShCN), proveniente de Casa Nova. Os números seguidos das siglas indicam o ano de coleta.

Valores seguidos de mesma letra para a mesma variável não diferem significativamente pelo teste de ANOVA ($P < 0,05$).

Os valores de pH e SST não oscilaram muito entre as variedades e anos estudados. O mesmo foi observado para o IPT, excetuando-se as uvas Syrah de Água Vermelha em 2009 e de Casa Nova em 2008, que apresentaram respectivamente, valores bastante inferiores e superiores ao restante das amostras de uvas viníferas.

As chuvas que provavelmente afetaram o tamanho das bagas de Syrah provenientes de Casa Nova no ano de 2009, não tiveram grande influência sobre as outras variáveis estudadas nos três anos. É provável que os vinhos produzidos com as uvas Syrah de Casa Nova apresentem coloração mais intensa que os da mesma variedade de Água Vermelha, devido à maior concentração de antocianinas, fato explicado por esta região apresentar sol em grande parte do ano, favorecendo o metabolismo destes compostos.

As uvas da variedade C. Sauvignon cultivadas em Água Vermelha apresentaram valores semelhantes aos obtidos para as produzidas no Estado do Rio Grande do Sul. Obviamente fatores edafoclimáticos interferiram nesses resultados, não sendo eles isoladamente um indicativo de uvas de melhor ou pior qualidade para a vinificação.

O teor de polifenóis totais para as uvas da variedade Máximo encontrou-se três vezes maior que para as uvas viníferas e o de antocianinas totais aproximadamente sete vezes maior, o que pode ser observado pela cor das bagas e do mosto produzido por esta uva, valor este que também contribui para o IPT. O valor de SST, em sua maioria açúcares (glicose, frutose e sacarose), foi de 16 °Brix, teor inferior aos encontrados para as uvas viníferas. Este parâmetro é relevante para a produção de vinhos, uma vez que os açúcares são importantes na produção do álcool durante o processo de fermentação. Às uvas com baixo valor de °Brix (abaixo de 17 °Brix) são adicionados açúcares de outra fonte, para que o vinho atinja a graduação alcoólica desejada, processo denominado chaptalização.

4.7 Análise Quimiométrica dos dados

Os resultados obtidos para as análises clássicas de uvas (antocianinas totais, polifenóis totais, pH, acidez titulável, açúcares redutores e SST) foram analisados por Análise de Componentes Principais (PCA) com a finalidade de verificar se existe algum padrão de agrupamento entre as uvas das diferentes variedades e regiões.

A Figura 1.13 apresenta os resultados de PCA para uvas em diferentes estádios de maturação, e a Figura 1.14 os resultados para as diversas uvas analisadas em estágio de completa maturação.

Figura 1.13 - Gráficos de *scores* e *loadings* para amostras em diferentes estádios de maturação.

Os componentes principais (PCs) são novos eixos criados a partir dos dados originais, e cada um deles explica ou contém uma determinada porcentagem da variância dos dados originais. O gráfico de *scores* representa a distribuição das amostras de acordo com as variáveis, representadas pelo gráfico de *loadings*, e ambos devem ser analisados em conjunto.⁵⁶ Para este conjunto de dados analisados, a PC1 explica 78,1% da variância dos dados originais, e a PC2 11,4%, enquanto que as demais PCs explicam muito pouco dos dados originais, somando 10,5%. Desta forma, foi possível reduzir a dimensão dos dados originais de 6 para 2.

Sobrepondo os gráficos de *scores* e *loadings*, pode-se observar que as uvas tendem a se agrupar em regiões de menor acidez e maiores teores de açúcares e antocianinas com a maturação. As uvas verdes, independentemente da variedade e local de cultivo, se agrupam em regiões com acidez mais elevada.

Figura 1.14 - Gráficos de *scores* e *loadings* das amostras maduras, das diversas origens e anos de coleta.

Considerando apenas as uvas maduras, uma PCA realizada com todas as variáveis estudadas não indicou padrão de agrupamento, seja por variedade ou região de cultivo, o que indica que nem todas as variáveis estudadas tem influência sobre as características destes tipos de uvas. A Figura 1.14 apresenta uma PCA realizada com apenas três variáveis, açúcares

redutores totais, antocianinas e índice de polifenóis totais. A PC1 explica 68,7% da variância dos dados originais, e a PC2 29,4%. Pode-se observar claramente a diferenciação entre uvas viníferas (Syrah, Merlot e C. Sauvignon) e a não vinífera (Máximo), principalmente com relação aos teores de polifenóis e antocianinas. Uma tendência na formação de dois grupos com relação às variedades Syrah e Cabernet Sauvignon é observada, no entanto duas amostras pertencentes à variedade Syrah, uma cultivada em Água Vermelha e outra em Casa Nova, não se agruparam com as outras amostras desta variedade. O conjunto de dados avaliados não permitiu o agrupamento das uvas de acordo com as regiões em que as mesmas foram cultivadas, considerando-se as variáveis estudadas.

5 CONCLUSÕES

Foram realizadas e apresentadas as análises clássicas para avaliação de parâmetros físicos e físico-químicos (tamanho, peso, acidez titulável, teor de sólidos solúveis, pH, polifenóis totais e antocianinas totais) em mostos de uvas em diferentes estádios de maturação cultivadas em Água Vermelha, Distrito de São Carlos, SP e Louveira, SP.

Considerando-se as medidas e o peso das bagas, ambas aumentaram com o amadurecimento do fruto, sendo que para a variedade Syrah cultivada em Água Vermelha uma diminuição foi observada após este aumento, o que pode estar relacionado às características desta variedade. Este aumento se relaciona principalmente ao acúmulo de sólidos solúveis, entre eles açúcares e água. O teor de antocianinas em ambas as variedades aumentou com o amadurecimento das uvas, a partir das uvas verdes, o que pode ser verificado visualmente pela cor das cascas, e o índice de polifenóis totais diminuiu, indicando redução da adstringência das bagas devido aos taninos e redução da concentração de ácidos fenólicos.

A acidez total titulável das uvas diminuiu consideravelmente durante a maturação, o que está relacionado principalmente ao metabolismo dos ácidos málico e tartárico, principais responsáveis pela acidez das uvas, e pode-se observar um aumento no pH, que se encontrou entre 3,5 e 4,0 para as uvas maduras.

A concentração de açúcares redutores aumentou com o amadurecimento das bagas, assim como o teor de SST, já que na fase do crescimento herbáceo da baga, o teor de açúcar é baixo, pois é utilizado para o desenvolvimento do fruto, e depois se acumula rapidamente devido a modificações metabólicas. Os resultados para todas as variáveis analisadas se encontraram condizentes com a literatura para uvas produzidas no Rio Grande do Sul, Estado mais tradicional no cultivo de uvas para vinhos, e de outras regiões onde o emprego do manejo de dupla poda está sendo implantado, o que indica boa adaptação destas variedades às regiões estudadas, São Carlos e Louveira.

A ferramenta de PCA permitiu observar o perfil de maturação de acordo com as variáveis estudadas, mostrando uma tendência de agrupamento das uvas verdes em regiões com maior acidez e concentração de polifenóis, e das uvas maduras em regiões com maior concentração de antocianinas e açúcares.

Os resultados obtidos para as uvas maduras foram comparados com as mesmas variedades provenientes de Bento Gonçalves, RS e Casa Nova, BA, e diferenças significativas não foram encontradas, fato que pode ser confirmado pela análise de componentes principais

(PCA) aplicada a estas amostras, que não identificou tendências de agrupamentos entre regiões de cultivo, considerando as variáveis estudadas. No entanto, fatores edafoclimáticos interferem na qualidade das uvas para vinificação, não sendo isoladamente as variáveis analisadas indicativo de uvas de melhor ou pior qualidade.

A PCA permitiu uma clara separação entre as uvas viníferas e a não vinífera Máximo, indicando que esta ferramenta pode ser útil para avaliar uma adulteração de sucos e possivelmente vinhos.

CAPÍTULO 2

Análise Metabolômica

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolômica

A era pós-genômica, após o sequenciamento de um grande número de genes de vários organismos, tornou claro que funções teriam que ser atribuídas a estes genes.^{78,79} Grandes esforços começaram a ser feitos para descrever relações entre o genoma e o fenótipo das células e organismos. Tornou-se evidente que o conhecimento dos genes e proteínas de um sistema vivo não revelava este fenótipo, o que despertou o estudo do metaboloma.⁸⁰

A palavra metaboloma foi primeiramente sugerida por Stephen Oliver para designar o conjunto de compostos de baixa massa molecular sintetizados por um organismo.⁸¹ Algum tempo depois, Fiehn definiu metabolômica como o estudo de todos os compostos químicos de baixa massa molecular (metabólitos) presentes em um organismo, e que são os produtos finais das funções celulares, cujos níveis podem ser vistos como respostas dos sistemas biológicos a alterações ambientais ou genéticas.⁸² Estes compostos, os metabólitos, são intermediários de reações químicas e desempenham um papel importante na conexão das diferentes rotas que operam em um sistema vivo.⁸⁰

Da mesma forma que o proteoma e o transcriptoma, o metaboloma depende do contexto, e os níveis de cada metabólito dependem do estágio fisiológico, de desenvolvimento e do estado patológico de uma célula, tecido ou organismo. No entanto, uma diferença é que ao contrário das proteínas e RNA_m é difícil estabelecer uma relação direta entre genes e metabólitos, pois um metabólito pode participar de diversas rotas, o que dificulta a interpretação dos resultados.

A Figura 2.1 apresenta um esquema geral da organização “ômica”. O fluxo de informação vai do gene para o transcrito, depois para a proteína e enfim para o metabólito, definindo uma função ou fenótipo.⁸³

Figura 2.1 - Esquema geral da organização “ômica”.

Fonte: Adaptado de Goodacre, R. Metabolomics - the way forward. **Metabolomics**, v. 1, p. 1-2, 2005.⁸³

As elucidações do genoma, transcriptoma e proteoma são baseadas nas análises alvo de biopolímeros compostos por quatro nucleotídeos (genoma e transcriptoma) ou 22 aminoácidos (proteoma), enquanto o metaboloma consiste de uma diversidade de compostos químicos como espécies iônicas, carboidratos hidrofílicos, alcoóis voláteis, cetonas, ácidos orgânicos, aminoácidos, lipídeos e produtos naturais complexos.^{84,80} A diversidade química e complexidade torna extremamente desafiadora a análise simultânea de todo o metaboloma, e atualmente nenhuma técnica analítica isolada apresenta capacidade para resolver essa mistura complexa.⁸⁴

Existem basicamente duas estratégias para análise metabolômica: análise alvo e perfil metabólico (*fingerprint*). A análise alvo é restrita a análise quantitativa de uma classe pré-estabelecida de compostos, relacionada a rotas metabólicas específicas. O perfil metabólico envolve análise frequentemente não quantitativa de um grande número de diferentes metabólitos com o objetivo de caracterizar determinada amostra. Nesta abordagem um perfil

coabrindo um grande número de metabólitos é feito por uma técnica analítica selecionada ou uma combinação de técnicas, e nem todos os metabólitos necessitam ser identificados e quantificados, sendo que os perfis obtidos podem ser usados, por exemplo, para distinguir diferentes estados fisiológicos.⁸⁰

A metabolômica de plantas ainda é um campo novo, mas com grandes oportunidades, já que é capaz de caracterizar e diferenciar genótipos e fenótipos baseada nos níveis de metabólitos, pois qualquer alteração ocorrida ao redor de uma planta pode ser acompanhada pela alteração do perfil e níveis destes compostos de baixa massa molecular. Um dos maiores interesses na ciência de plantas atualmente é relacionar o genoma e o proteoma ao seu metaboloma, sendo que o primeiro desafio é identificar e quantificar todos estes compostos, e depois interpretar o grande número de resultados.⁸⁵

1.2 Métodos de separação analítica e tratamento dos dados em metabolômica

O método de extração e o modo de análise devem ser cuidadosamente escolhidos para um determinado interesse, e as técnicas mais utilizadas em metabolômica incluem ressonância magnética nuclear (NMR),^{86,87,88} espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)^{89,90} e espectrometria de massas (MS), geralmente combinadas com técnicas de separação como cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (HPLC) ou eletroforese capilar (CE).⁹¹

A cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos seletivamente entre duas fases imiscíveis, uma fase móvel e uma fase estacionária. A técnica de HPLC utiliza colunas preenchidas com uma fase estacionária de diâmetros entre 3 e 10 μm , nas quais uma fase móvel líquida é bombeada a alta pressão. É utilizada para a caracterização de moléculas que não são suficientemente voláteis para serem identificadas pela cromatografia a gás, e permite realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em vários tipos de amostras com alta resolução, eficiência e sensibilidade.^{92,93} Um sistema de HPLC é constituído basicamente de uma bomba de alta pressão para eluição da fase móvel, injetor, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição de dados, como apresentado na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Esquema representativo de um sistema de HPLC

A CE é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos sob influência de um campo elétrico. A separação é normalmente conduzida em tubos capilares de 15 a 100 μm de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito. A aplicação de campos elétricos elevados (100 a 500 V cm^{-1}) devido à dissipação eficiente do calor gerado pela corrente elétrica resulta em separações de alta eficiência, alto poder de resolução e reduzidos tempos de análise, além do pequeno consumo de amostra e reagentes.^{94,95,96} Um instrumento de eletroforese capilar básico consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina) e um detector, que se localiza em um ponto do capilar próximo ao reservatório de saída.^{96,97,98} A fonte de alta tensão aplica uma diferença de potencial nos eletrodos de platina situados nos dois reservatórios contendo uma solução de um eletrólito conveniente, gerando o fluxo eletrosmótico, que é o fluxo do tampão através do capilar devido às cargas presentes em sua parede interna.⁹⁴ Um esquema de um equipamento de eletroforese capilar é apresentado na Figura 2.3.

Figura 2.3 – Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

A técnica de HPLC acoplada a detectores de arranjo de diodos (HPLC-DAD) tem sido bastante utilizada para compostos que apresentam grupos cromóforos. Um método para separação simultânea, identificação e quantificação de isoprenóides de plantas das classes dos carotenos, xantofilas, ubiquinonas, tocoferols e plastoquinonas por HPLC-DAD foi desenvolvido por Fraser *et al.* (2000). Algumas aplicações do método foram a caracterização de variedades de tomate mutante e transgênico com conteúdo alterado de isoprenóides e uma varredura bioquímica do perfil de *Arabidopsis thaliana* relacionado a esta classe de compostos.⁹⁹

A combinação da cromatografia líquida com detectores de arranjo de diodos e espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS) permite identificação e quantificação de metabólitos polares, pouco polares e metabólitos neutros, mesmo presentes em baixas concentrações. A ionização por *electrospray* (ESI) é a mais utilizada para análise de compostos polares e iônicos, enquanto Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) pode ser usada para análise de compostos menos polares e espécies neutras. A técnica de cromatografia líquida em fase reversa com detecção por arranjo de diodos e espectrometria de massas com ionização *electrospray* (HPLC-DAD-ESI/MS) foi utilizada para isolar saponinas em legumes. Quinze saponinas foram identificadas em alfafa por correlação com dados anteriores da literatura, e duas outras estruturas foram propostas.¹⁰⁰ Queiroz *et al.* (2002) analisaram extratos de plantas por HPLC-APCI/Q-TOF/MS para obter um perfil da composição destes extratos. A presença de isoflavanonas e isoflavonas foi verificada pelo padrão de fragmentação dos compostos, o que foi confirmado pelas técnicas de LC-RMN e

MS/MS.¹⁰¹ Zhang *et al.* (2011) estudaram a resposta do metaboloma de *Arabidopsis* à deficiência ou suplementação de enxofre por GC-TOF/MS e LC-MS, sendo que doze metabólitos identificados diferiram entre os vários tratamentos.¹⁰²

A técnica de CE foi utilizada por Calvo *et al.* (2004), com vantagens em relação à HPLC na separação de treze antocianinas de vinho da variedade Tannat. Um tempo de separação de 13 min em CE *versus* 50 min em HPLC foi obtido, e a ordem de migração encontrada foi discutida com base na massa e carga das moléculas, e a possível interação com o tampão utilizado, tetraborato de sódio, na formação de complexos. A mesma técnica foi utilizada para determinar a composição de monossacarídeos de plantas por meio de uma reação entre os carboidratos neutros e o eletrólito extremamente alcalino, o que permite a detecção direta destes compostos no comprimento de onda de 270 nm.^{103,104}

Até recentemente, a maioria das análises metabolômicas eram feitas utilizando um conjunto de dados reduzido, a partir das áreas de picos selecionados (compostos alvo) nos cromatogramas. No entanto, mudanças significativas poderiam estar ocorrendo em compostos minoritários que não estariam sendo analisados. Essa desvantagem pode ser superada pela utilização de todo o conjunto de dados gerado pelos equipamentos, por meio das análises quimiométricas multivariadas, mas muito esforço tem que ser feito para tratar essas informações, já que um perfil metabólico pode possuir centenas de compostos.

Uma das ferramentas utilizadas para avaliar os resultados por análise quimiométrica multivariada é a Análise de Componentes Principais (PCA). O objetivo da PCA é descrever a variância de um conjunto de dados multivariado em termos da variância de variáveis ortogonais (componentes principais),⁸⁵ reduzindo a dimensão das variáveis de forma a facilitar o entendimento dos resultados. Um aspecto relevante nas análises quimiométricas de perfis cromatográficos é a aplicação de ferramentas de pré-tratamento dos dados originais, como por exemplo, a correção de deslocamentos ocorridos nos tempos de retenção,^{105,106,107} o que acontece devido a pequenas alterações de composição de fase móvel ou flutuações instrumentais. As análises quimiométricas multivariadas têm sido utilizadas para estabelecer critérios de similaridade de perfis cromatográficos obtidos de tecidos de plantas.^{108,109,110} Um trabalho de Yi *et al.* demonstra a utilização de métodos quimiométricos para verificar alterações no *fingerprint* de metabólitos secundários em cascas de tangerinas por HPLC-DAD. As análises indicaram que três compostos podem ser utilizados como marcadores químicos para diferenciar espécies de tangerinas.¹¹¹ A associação de análises de perfis cromatográficos e métodos quimiométricos foi demonstrada para classificar amostras de seis

espécies *Phyllanthus*, utilizadas para tratar cálculo renal, hepatite e outras doenças, presentes no mercado brasileiro. Os modelos propostos permitiram avaliar a autenticidade de 25 amostras comerciais de “quebra-pedra”.¹⁰⁷

1.2 Metabolismo das plantas

Metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem num organismo.¹⁹ No caso de plantas o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário.

Metabolismo primário refere-se ao conjunto de processos que desempenham uma função essencial no vegetal, como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas, como aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e clorofila.¹⁹

O metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas, podendo ser usados em estudos taxonômicos. Apesar de nem sempre ser necessário para que a planta complete seu ciclo de vida, ele tem um papel muito importante na sua interação com o meio ambiente, pois tem função de defesa contra patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos, como polinizadores. Também possui função protetora contra *strees* abiótico, luz, exposição a raios UV e deficiência de nutrientes minerais.¹⁹

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários nas plantas: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou do ácido mevalônico e os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos, triptofano e tirosina.^{19,112} A Figura 2.4 apresenta um esquema simplificado das rotas metabólicas envolvidas no metabolismo secundário das plantas.

Figura 2.4 - Representação esquemática simplificada das rotas envolvidas no metabolismo secundário de plantas.

Fonte: Adaptado de CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2004. 113 p.¹¹²

1.2.1 Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos de baixa massa molecular constituem um grupo amplamente distribuído em frutas e vegetais. São compostos importantes para uvas e vinhos devido à sua influência nas propriedades organolépticas e no controle microbiológico de sucos e vinhos. Nas uvas os ácidos predominantes são o tartárico e málico, e em menor proporção cítrico e succínico. No vinho são encontrados aqueles provenientes da uva (tartárico, málico e cítrico) e os originados nos processos de fermentação (succínico, láctico e acético).³⁹

O ácido tartárico da uva é o isômero L(+) encontrado em pequeno número de espécies vegetais. É um ácido forte que interfere diretamente no pH do vinho. O ácido málico natural da uva é o isômero L(-), um dos ácidos mais difundidos na natureza, predominando em um

grande número de vegetais.¹¹³ É considerado um ácido fraco e sua síntese na videira resulta de uma reação secundária da fotossíntese. O teor mais elevado de ácido málico no grão da uva é encontrado no início da maturação. Os principais componentes responsáveis pela acidez do mosto da uva são os ácidos tartárico e málico. Suas concentrações no mosto estão relacionadas com aspectos fisiológicos da maturação da uva, como fatores naturais de clima e solo e com práticas agrônômicas de produção, sendo sua evolução útil para avaliar o processo de maturação.⁴⁰

No início do desenvolvimento das bagas o teor de ácidos é elevado, visto que estes são sintetizados pelas folhas e acumulados nas bagas ainda verdes.¹⁰ Durante o desenvolvimento das bagas um aumento progressivo desses dois ácidos (ácidos tartárico e málico) é esperado até o *veraison*,⁴² depois do qual suas concentrações diminuem com o amadurecimento. A diminuição de acidez com o amadurecimento resulta de vários fatores como o aumento da respiração, transformação dos ácidos em outros compostos, efeito de diluição devido ao aumento de volume do fruto e redução da capacidade do fruto sintetizar ácidos com a maturidade.¹²

A análise dos ácidos tartárico e málico é útil para controlar a evolução da acidez durante as várias etapas do processo de vinificação (fermentação alcoólica, fermentação malolática, envelhecimento do vinho), apresentando grande importância na detecção de alterações no vinho.⁴³ A Figura 2.5 apresenta as estruturas dos principais ácidos orgânicos encontrados em uvas e vinhos.

Figura 2.5 - Estruturas dos principais ácidos orgânicos de uvas e vinhos.

Diversos métodos analíticos têm sido utilizados para detectar e quantificar ácidos orgânicos em vinhos, mostos e sucos de uvas, sendo o mais empregado a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com colunas de troca iônica^{114,115,116} ou fase reversa,^{117,118,119} e mais recentemente a eletroforese capilar.^{43,120} Para preparo da amostra existem basicamente dois procedimentos descritos na literatura: diluição seguida de filtração^{117,118,119} e extração com resinas de troca iônica¹²¹ ou cartuchos de extração em fase sólida^{114,122} para evitar interferências causadas por açúcares ou outros compostos presentes nas uvas. Um estudo de comparação entre os dois métodos sugerem que o primeiro apresentou melhores resultados de precisão e recuperação da extração. Os mesmos autores utilizaram o método de HPLC com colunas de troca iônica e dois detectores conectados em série, possibilitando a determinação de ácidos orgânicos, açúcares e álcoois simultaneamente.¹¹⁶

1.2.2 Açúcares

Os carboidratos são alguns dos compostos orgânicos mais abundantes nas plantas, e sua análise é importante no campo bioquímico, farmacêutico e de alimentos. Eles atuam como fontes de energia e carbono e são essenciais para o metabolismo de plantas e animais. Glicose, frutose e sacarose são substâncias-chave em diversos processos biológicos, sendo os dois primeiros classificados como açúcares redutores por possuírem grupos carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas.

Os principais açúcares presentes nas uvas das cultivares *Vitis vinifera* são glicose e frutose, responsáveis por 99% dos carboidratos no mosto e por 12 a 27% do peso das uvas maduras.^{11,12} A maior parte desses açúcares provem das folhas, na forma de sacarose, que é transformada em frutose e glicose nas bagas. Uma pequena parte é originária da fotossíntese da própria uva, outra das estruturas de reserva da videira e uma parte ínfima é produzida na própria baga metabolizando o ácido málico.¹¹ A relação glicose/frutose nas bagas se altera consideravelmente desde a frutificação até a maturação. Na fase de crescimento predomina a glicose; na maturação glicose e frutose estão presentes em quantidades semelhantes e na fase de sobrematuração, geralmente a frutose excede a glicose. A análise desses compostos é importante na determinação da variedade de uva utilizada para produzir o vinho e para estabelecer diferenças entre regiões.¹²³

A composição de polissacarídeos das plantas é geralmente determinada por meio da medida dos monossacarídeos liberados após hidrólise ácida ou enzimática,¹²⁴ mas não existe um método universal padronizado.

Os monossacarídeos liberados podem ser separados e quantificados por diversos métodos, no entanto, ainda existe dificuldade em encontrar um método de detecção com sensibilidade adequada e que possibilite a análise das várias estruturas isoméricas. Os métodos utilizados mais frequentemente para separação desses compostos são a cromatografia em camada delgada (TLC), que apesar de simples e conveniente é adequada apenas para análise qualitativa da composição dos carboidratos, GC e HPLC. A GC apresenta excelente sensibilidade e eficiência de separação, no entanto exige derivação da amostra, por sililação ou acetilação,¹²⁵⁻¹²⁸ pelo fato destes compostos não serem voláteis, o que pode acarretar na formação de estereoisômeros e dificuldade na identificação dos analitos originais. Apesar de bastante utilizada, a técnica de HPLC apresenta o inconveniente da falta de eficiência em separar polissacarídeos de alta massa molecular, além do custo de colunas específicas.¹²⁹

Atualmente a eletroforese capilar tem sido utilizada com as vantagens de ser simples, eficiente, seletiva e rápida, sendo ainda um desafio o método de detecção, já que estes compostos não absorvem luz UV acima de 200 nm, que é a detecção mais utilizada pelos equipamentos comerciais. Uma alternativa é a derivação, que é um processo de controle delicado devido à reatividade diferenciada do reagente para os diferentes analitos, além da formação de adutos que tornam difícil a identificação dos compostos de interesse. Outro obstáculo para análise dos carboidratos por CE é o fato de não possuírem carga em pH neutro, mas isto pode ser resolvido utilizando-se borato como um agente complexante e detecção a 195 nm; no entanto a sensibilidade do método é baixa.¹³⁰ Uma alternativa para análise destes compostos é a detecção por absorção indireta, sendo o ácido sórbico o reagente mais empregado.^{131,132} Rovio *et al.* (2007) desenvolveram um método para análise direta de carboidratos na região UV, em 270 nm, por meio de uma reação no capilar e formação de um enoldiolato em meio extremamente alcalino e sob a aplicação do campo elétrico. Neste trabalho seis monossacarídeos, xilose, galactose, manose, ramnose, glicose e arabinose, foram analisados em hidrolisados de plantas utilizando-se um eletrólito extremamente básico, e o método comparado com cromatografia de troca aniônica. Os resultados podem ser comparados em termos de quantificação, no entanto os desvios padrão relativos para áreas de picos são maiores para CE, o que pode ser devido à degradação química dos monossacarídeos na solução alcalina e efeitos de matriz devido ao ácido nas amostras.^{103,104}

1.2.3 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos de plantas se enquadram em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas. Esses compostos tem recebido uma atenção especial nos últimos anos por sua função antioxidante e seus efeitos benéficos para a saúde humana,²⁰⁻²² o que deve-se principalmente às suas estruturas químicas. São capazes de capturar radicais livres presentes nos sistemas biológicos atuando contra a oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, e prevenindo doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares e o envelhecimento.^{23,133,134} Nas plantas, eles atuam como atrativos para agentes polinizadores e protetores contra os raios UV, insetos, fungos e bactérias.^{19,25}

Do ponto de vista químico, os compostos fenólicos são substâncias que apresentam pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, o que confere reatividade.¹⁹

As uvas (*Vitis vinifera*) estão entre as frutas com maior conteúdo de compostos fenólicos, apresentando uma ampla variedade na semente, polpa e casca, sendo que alguns deles permanecem no vinho após o processo de vinificação. Sua estrutura varia com a maturação das uvas e o envelhecimento do vinho^{30,135} e sua concentração depende da variedade e é influenciada por fatores ambientais e práticas de viticultura.^{136,137} Estes compostos desempenham um papel importante em enologia, pois são responsáveis por diferenças entre vinhos brancos e tintos, e contribuem para atributos sensoriais como adstringência, amargura, sabor e cor.^{27,28}

Uma das possíveis classificações destes compostos está baseada na distinção entre compostos flavonóides e não-flavonóides. Do primeiro grupo fazem parte as antocianinas, flavanóis (ou flavan-3-ols) e flavonóis, e do segundo grupo os ácidos hidrobenzóicos e hidrocinâmicos, e os estilbenos.^{29,137,138}

1.2.3.1 Flavonóides

Os flavonóides são formados pela combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e do ácido acético (via metabólica do acetato, acetil coenzima A).¹³⁹ Eles apresentam uma estrutura caracterizada por dois anéis

benzênicos ligados por um heterociclo oxigenado, como apresentado na Figura 2.6. Possuem propriedades químicas de fenóis, sendo relativamente solúveis em água, principalmente quando conjugados a açúcares.¹⁴⁰⁻¹⁴² São compostos levemente ácidos, e como são polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e combinações desses solventes com água. Podem sofrer degradação se deixados em meio alcalino na presença de oxigênio. Devido à sua estrutura apresentam intensa absorção no UV, exibindo 2 bandas, uma em 300-380 nm (banda I) e outra em 240-280 nm (banda II).^{140,142}

Figura 2.6 - Núcleo fundamental dos flavonoides

Fonte: MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 396-404, 2006.¹⁴³

Esta classe de compostos fenólicos divide-se em subclasses que se distinguem pelo grau de oxidação do anel pirano, em flavonóis, flavanóis e antocianinas.

Os flavonóis são compostos que contribuem para a amargura de uvas e vinhos, e variam em coloração de branco a amarelo. São representados principalmente pelos compostos kaempferol, quercetina e mircetina, e geralmente se encontram nos tecidos de plantas na forma glicosilada (Figura 2.7), sendo os mais abundantes nas uvas quercetina 3-glicosídeo e 3-glucoronídeo.^{138,143} Seus papéis mais conhecidos nas plantas são como protetor contra raios UV e copigmento de flores e frutos, sendo denominada copigmentação a associação entre flavonóis e antocianinas, o que confere estabilidade às moléculas de antocianinas resultando em aumento de coloração ou alteração do tom.^{144,145}

Estudos indicam que a quantidade de flavonóis nas bagas de uvas é baixa antes do *veraison*, e que um aumento é observado durante seu desenvolvimento, sendo que a síntese destes compostos também ocorre durante o período de florescimento.¹⁴⁶

Figura 2.7 - Estruturas químicas de compostos da classe dos flavonóis.

Quercetina 3-O-ramnosilglicosídeo (rutina)

Os flavanóis caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado e é uma família responsável pela adstringência e amargura de vinhos. Podem apresentar-se na forma de catequinas monoméricas, sendo as que mais se encontram nas uvas e vinhos a (+)-catequina e (-)-epicatequina (Figura 2.8), ou na forma condensada, como dímeros, trímeros ou polímeros.

Figura 2.8 - Estruturas químicas dos flavanóis (+)-catequina e (-)-epicatequina.

Ao contrário dos outros flavonóides esta classe encontra-se nas uvas no estado livre, sendo a (+)-catequina majoritária nas películas.^{29,138} A determinação de monômeros, dímeros e trímeros de catequinas em uvas e vinhos tem sido relatada em vários estudos pela sua ação benéfica ao sistema cardiovascular.¹⁴⁷ Poucos estudos relatam a evolução destes compostos com a maturação de uvas, sendo que alguns descrevem que a concentração inicial de catequinas é baixa nas uvas em formação, alcança um máximo durante o *veraison* e depois diminuem rapidamente nas uvas maduras.¹⁴⁸

Os polímeros de flavanóis e catequinas são designados proantocianidinas, ou taninos condensados. Suas unidades básicas estruturais são (+)-catequina e (-)-epicatequina, e são encontrados naturalmente em uvas.³⁰ Os taninos são compostos presentes em plantas e alimentos provenientes destas, em particular frutas, sementes, cereais e em diversas bebidas. São compostos fenólicos solúveis em água, de massa molecular elevada (entre 500 e 3000 Da), que reagem às reações fenólicas usuais e apresentam propriedades especiais como, por exemplo, a habilidade de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas em solução.³³ Os taninos são classificados em hidrolizáveis e não hidrolizáveis ou condensados. Os primeiros resultam da ligação de um açúcar, geralmente glicose, a um composto fenólico como ácido gálico ou elágico, e não se encontram naturalmente em uvas, mas são legalmente aceitos como aditivos em vinhos.

Os taninos são responsáveis pela adstringência das uvas, provocada por uma combinação com as proteínas contidas na saliva e outros polímeros como polissacarídeos. Na uva madura os taninos se encontram principalmente nos engaços e nas sementes,¹¹ e a evolução para formas mais condensadas que ocorre com maturação explica a diminuição da adstringência dos frutos.³⁴ A Figura 2.9 apresenta a estrutura geral dos taninos condensados (proantocianidinas).

Figura 2.9 - Fórmula estrutural dos taninos condensados (proantocianidinas).

Fonte: RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Phenolic compounds. In: HANDBOOK of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments. Chichester: John Wiley, 2006. v. 2. p. 141-203.³⁰

Ainda não é claro em qual extensão a concentração dos taninos varia durante o período de maturação das uvas. Existem evidências de que os flavanóis monoméricos e os taninos de baixa massa molecular ($M_r < 900$) das sementes diminuem com o amadurecimento do fruto.^{149,150} Uma diminuição dos taninos condensados, independentemente do grau de condensação também foi observada no decorrer da maturação de duas variedades de uvas em todos os componentes da fruta (polpa, casca e sementes).¹⁵¹

As antocianinas são os pigmentos avermelhados das uvas, e estão localizadas principalmente nas cascas. São baseadas em uma estrutura catiônica de núcleo flavílio (2-fenilbenzopirílio), que consiste de dois anéis benzênicos unidos por uma unidade de três carbonos e condensada por um oxigênio.^{30,152} A molécula de antocianina é constituída por uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares, e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos, sendo os mais comuns *p*-cumárico, cafeico e acético.^{30,152} A cor das antocianinas é diretamente relacionada ao pH: em meio ácido elas são vermelhas, perdendo sua cor com o aumento do pH.³⁰

As antocianidinas, sendo instáveis e muito menos solúveis que as antocianinas, não se acumulam na planta.¹³³ Assim, os pigmentos que ocorrem nos tecidos de flores e frutos estão na forma glicosilada, com os açúcares conferindo solubilidade e estabilidade.¹⁵³ As antocianidinas diferem entre si pelo número de grupos hidroxilas presentes na molécula e no

grau de metilação desses grupos. A Figura 2.10 apresenta o núcleo fundamental e as principais antocianinas presentes em uvas e vinhos.

Figura 2.10 - Estrutura principal das antocianinas e principais antocianidinas presentes em uvas e vinhos.

Fonte: RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Phenolic compounds. In: HANDBOOK of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments. Chichester: John Wiley, 2006. v. 2. p. 141-203.³⁰

A síntese de antocianinas nas uvas inicia durante o *veraison*, e elas são gradualmente acumuladas com o amadurecimento das uvas.^{137,154,155} Vários fatores como variedade, clima, solo e práticas de cultivo tem sido relacionadas com a acumulação de antocianinas.^{137,154} No entanto a concentração pode apresentar uma pequena diminuição um pouco antes da colheita ou na sobrematuração.¹⁵⁴

As antocianinas têm sido postuladas como marcadores químicos para diferenciar uvas e vinhos tintos produzidos de diferentes variedades.^{156,157} A presença de diglicosídeos em grandes quantidades é específica de certas espécies não viníferas, sendo que foram detectados em certas variedades de *Vitis vinifera* apenas em níveis traço.^{30,37} O caráter diglicosídeo é transferido de acordo com as leis da genética, sendo uma característica dominante, o que significa que um cruzamento entre uma variedade vinífera e uma não vinífera produz uma primeira geração de híbridos que apresentam todos os diglicosídeos.³⁰

Todas as variedades de uvas apresentam as mesmas estruturas básicas das antocianinas, mas com pequenas variações na composição. Entre as cinco antocianinas mais comuns, a malvidina é a dominante em todas as variedades, variando de 50 a 90%, sendo considerada a molécula base para a cor das uvas.³⁰

A quantificação de antocianinas totais é realizada por espectrofotometria na região visível ao redor de 465-550 nm, por meio de medidas simples de absorbância.³² A análise

quantitativa de antocianinas individuais e sua identificação podem ser feitas por meio de métodos cromatográficos acoplados a diferentes tipos de detecção.

1.2.3.2 Não-flavonóides

O grupo dos não-flavonóides é composto pelos ácidos fenólicos e estilbenos. Os ácidos fenólicos são incolores em solução alcoólica diluída, mas se tornam amarelos por oxidação. Não possuem sabor ou odor, no entanto são precursores de fenóis voláteis produzidos pela ação de certos microorganismos.²⁹

Os vários ácidos são diferenciados pela substituição do anel benzênico. As estruturas principais dos ácidos benzóico e cinâmico são apresentadas na Figura 2.11.

Figura 2.11 - Estrutura principal dos ácidos benzóico e cinâmico e seus derivados encontrados nas uvas e vinhos.

Ácidos Benzóicos	R2	R3	R4	R5	Ácidos Cinâmicos
ác. <i>p</i> -hidróxibenzóico	H	H	OH	H	ác. <i>p</i> -coumárico
ác. protocatequico	H	OH	OH	H	ác. cafeico
ác. vanílico	H	OCH ₃	OH	H	ác. ferúlico
ác. gálico	H	OH	OH	OH	
ác. siringico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	ác. sinápico
ác. salicílico	OH	H	H	H	
ác. gentísico	OH	H	H	OH	

Fonte: RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Phenolic compounds. In: HANDBOOK of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments. Chichester: John Wiley, 2006. v. 2. p. 141-203.³⁰

Nas plantas, os ácidos fenólicos estão distribuídos pelas frutas, folhas, sementes e raízes, e geralmente uma pequena fração se apresenta livre, enquanto uma grande parte está associada à celulose, ligninas, proteínas, açúcares, flavonóides e terpenos.¹⁵⁸ As uvas e vinhos contêm ácidos benzóicos e cinâmicos, sendo que se apresentam em maiores concentrações

nos vinhos tintos do que nos brancos, e mesmo em baixas concentrações representam um papel importante no aroma e sabor.

Nas uvas eles estão presentes principalmente como combinações de glicosídeos, dos quais são liberados por hidrólise ácida, e ésteres, dos quais são liberados por hidrólise alcalina. Os ácidos cinâmicos presentes nas uvas e vinhos apresentam-se principalmente esterificados, em particular com ácido tartárico.²⁹

Os estilbenos são formados por dois anéis benzênicos, geralmente ligados por uma cadeia de etano ou etileno. De forma geral são considerados fitoalexinas, um grupo de compostos de plantas de baixa massa molecular que inibem microorganismos, e sua formação em uvas está relacionada com resistência a doenças.¹⁵⁹

Um dos principais compostos desta classe é o resveratrol (Figura 2.12), conhecido por sua potente atividade antifúngica e antioxidante. O resveratrol é sintetizado nas plantas sob duas formas isômeras: *trans* e *cis*-resveratrol, sendo o isômero *trans* convertido a *cis* na presença de luz visível. Nas uvas, é sintetizado na casca como resposta ao *stress* causado por ataque de patógenos, dano mecânico ou irradiação de luz ultravioleta. O isômero *trans* (*trans*-3,4', 5-trihidroxiestilbeno) é encontrado em concentrações relativamente altas em vinhos, particularmente tintos.¹⁶⁰

Figura 2.12 - Estrutura química do 3,5,4'-trihidroxiestilbeno (resveratrol).

As propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e anticoagulantes desse e de outros polifenóis têm sido associadas ao efeito benéfico do vinho com relação às doenças coronarianas.¹⁶¹ O consumo regular de vinho tinto e a diminuição de doenças cardíacas têm sido associados ao denominado “Paradoxo Francês”, que consiste na observação de que os franceses apresentam baixa incidência de doenças coronarianas, apesar de sua alimentação relativamente rica em gorduras saturadas.¹⁶²

A extração e isolamento de compostos fenólicos são os primeiros e mais importantes passos para uma boa separação, caracterização e quantificação nas matrizes de plantas. Os polifenóis são freqüentemente solúveis em solventes orgânicos menos polares que a água, e

uma extração efetiva de polifenóis de plantas depende da seleção do solvente, temperatura e agitação mecânica para maximizar a transferência dos compostos do material sólido para a fase líquida.¹⁶³ A escolha do solvente de extração é de grande importância, e o mais popular e mais utilizado para extração de polifenóis de diferentes plantas e frutos é o metanol.^{138,164-167}

Em um extrato polifenólico as antocianinas podem interferir com outros polifenóis durante as análises e devem ser removidas. Este procedimento pode ser feito por extração líquido-líquido com acetato de etila e posterior evaporação do solvente e ressuspensão dos compostos não-antociânicos em um solvente apropriado.¹³⁸ Outro método de fracionamento pode ser por extração em fase sólida (SPE) utilizando-se cartuchos C18 com combinações de pH e solventes de eluição para separação de cada classe de composto de interesse.¹⁶⁷

A análise individual e identificação de compostos fenólicos têm sido feitas por técnicas de cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa após derivatização da amostra, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar com detecção espectrofotométrica por arranjo de diodos ou massas, sendo a cromatografia líquida a técnica mais amplamente utilizada para separação e identificação destes compostos em plantas.

Iacopini *et al.* (2008) estudaram a atividade antioxidante *in vitro* de catequina, epicatequina, quercetina, rutina e resveratrol em 10 variedades de uvas tintas por meio de dois diferentes testes. Os extratos apresentaram atividade significativa e os compostos de interesse foram quantificados por HPLC/UV.¹⁶⁸

Quatro compostos fenólicos de interesse biológico (ácido gálico, *trans*-resveratrol, quercetina e rutina) foram analisados em vinhos de diferentes regiões da Espanha. As amostras foram injetadas sem pré-tratamento, após filtração em membranas de 0,45 µm. Ácido gálico foi detectado em todas as mostras avaliadas, no entanto cada um dos outros compostos foram identificados em apenas uma amostra.¹⁶⁹

A composição de flavanóis em amêndoas foi avaliada após isolamento desta classe de compostos por cromatografia em gel e diferentes tipos de hidrólise. Dois monômeros, (+)-catequina e (-)-epicatequina, além de 15 proantocianidinas foram identificados por LC-MS.¹⁷⁰

Kammerer *et al.* (2004) caracterizaram os compostos fenólicos de 14 amostras de bagaço de uvas originados na vinificação de uvas brancas e tintas por HPLC-DAD-MS. Foram identificadas e quantificadas 13 antocianinas, 11 ácidos fenólicos, 13 catequinas e flavonóis e 2 estilbenos, compreendendo uma grande variabilidade de compostos fenólicos. Os polifenóis foram extraídos com metanol e as diferentes classes foram separadas por extração em fase sólida. Com exceção das antocianinas não foram observadas diferenças

significativas comparando-se as variedades de uvas tintas e brancas, e o bagaço das uvas mostrou-se uma fonte rica de compostos fenólicos, que pode ser utilizado como suplemento alimentar ou ingrediente em alimentos funcionais, apesar de não ser muito viável economicamente e em escala industrial.¹⁶⁷

A composição de polifenóis não-antociânicos foi avaliada por HPLC-DAD em cascas e sementes de 10 variedades de uvas viníferas. Os compostos estudados foram isolados das antocianinas por extração líquido-líquido com acetato de etila. Neste trabalho também não foram encontradas diferenças significativas na composição não-antociânica de cascas e sementes de uvas brancas e tintas.¹³⁸

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este capítulo teve por objetivo avaliar a evolução de algumas classes de metabólitos primários e secundários com a maturação de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon, além da comparação destes compostos em uvas maduras de diferentes variedades e origens com a finalidade de verificar se estes compostos são capazes de diferenciar estágio de maturação, variedade e origem.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a evolução dos ácidos orgânicos pela técnica de HPLC-DAD em mostos de uvas em diferentes estádios de maturação e de diferentes variedades e origens;
- Apresentar os resultados para análise individual de açúcares por CE-DAD, assim como a relação glicose/frutose com a maturação das uvas;
- Identificar as várias antocianinas nas diferentes amostras de uvas por HPLC-DAD e HPLC-DAD-MS/MS, seguido por análise quimiométrica de PCA para verificar agrupamentos entre as amostras;
- Avaliar o *fingerprint* de extratos polifenólicos não-antociânicos por HPLC-DAD e analisar os resultados por PCA para verificar similaridades ou diferenças entre as várias amostras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ácidos orgânicos

A separação dos ácidos orgânicos foi avaliada por HPLC. O equipamento utilizado (Shimadzu) consistiu de um sistema de bombas binárias com uma alça de amostragem de 20 μL e detecção na região UV, com o comprimento de onda de análise selecionado para 205 nm. A separação foi realizada em uma coluna Shimpack CLC-ODS (M) (Shimadzu) com 25 cm x 4,6 mm, 5 μm . A fase móvel foi composta por tampão fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 20 mmol L^{-1} , pH 2,20, ajustado com ácido fosfórico, no modo de eluição isocrática, vazão de 1,0 ml min^{-1} e temperatura ambiente.

O desenvolvimento da metodologia para separação dos ácidos orgânicos foi feito com padrões de seis ácidos presentes em uvas e vinhos: tartárico, málico, láctico, acético, cítrico e succínico. Soluções estoque 5 mg mL^{-1} foram preparadas para cada ácido, e diluições foram feitas a partir de uma solução de concentração 1 mg mL^{-1} para estudos de linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade. Para seleção do comprimento de onda a ser utilizado foi feita uma varredura preliminar de cada ácido em um espectrofotômetro UV-Vis Jasco.

O mosto foi obtido a partir das uvas retiradas de diferentes partes dos cachos, descongeladas em banho de gelo, esmagadas em almofariz até um volume de 15 mL e centrifugadas a 3000 rpm (centrífuga Baby Excelsa II, 206R) por 10 min. O preparo de amostra consistiu na remoção dos compostos polifenólicos por precipitação com PVPP (polivinilpolipirrolidona).¹¹⁹ Foram adicionados 0,1 g de PVPP a 1,5 mL do mosto e centrifugados a 3000 rpm (centrífuga Baby Excelsa II) por 15 min. O sobrenadante foi retirado, centrifugado novamente a 10000 rpm (microcentrífuga 5415 R, Eppendorf) por 5 min e diluído com água desionizada antes da injeção.

3.2 Açúcares

O método desenvolvido para a quantificação de glicose e frutose, açúcares majoritários nas uvas, foi adaptado do descrito por Rovio *et al.* (2007)¹⁰³. As separações foram feitas em um equipamento de eletroforese capilar P/ACE MDQ CE (Beckman-Coulter) com detecção por arranjo diodos. Um eletrólito consistindo de NaOH 130 mmol L^{-1} e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi preparado pela mistura de uma solução estoque de hidrogenofosfato de

sódio pentahidratado 450 mmol L⁻¹ com NaOH 1 mol L⁻¹. A solução resultante apresentou pH 12,8 e foi filtrada em membrana de 0,45 µm antes das análises, sendo substituída a cada amostra (4 replicatas).

O capilar foi condicionado antes de cada amostra com NaOH 1 mol L⁻¹ por 15 min, NaOH 0,1 mol L⁻¹ por 5 min, água deionizada durante 5 min e o eletrólito de corrida por 10 min, e entre cada replicata com NaOH 0,1 mol L⁻¹ por 5 min, água deionizada durante 2 min e o eletrólito de corrida por 5 min. As lavagens foram feitas pela aplicação de 20 psi de pressão.

Capilares de sílica fundida com 75 µm de diâmetro interno, 60 cm de comprimento total e 50 cm de comprimento efetivo foram empregados nos experimentos. As amostras foram injetadas por aplicação de 0,5 psi durante 3 s, seguida por injeção do eletrólito de corrida por 3 s. O capilar foi termostatizado para 15 °C e a separação foi feita em polaridade normal utilizando 14 kV como potencial de separação. O monitoramento dos compostos foi realizado em 270 nm, comprimento de onda no qual se observa a absorção de um ânion formado pelos carboidratos em solução alcalina concomitante à aplicação de um campo elétrico.

Soluções estoque de glicose e frutose foram preparadas em água deionizada em sistema Milli-Q na concentração de 5 mg mL⁻¹, e diluições foram feitas para estudos de linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade.

As amostras para análise foram obtidas a partir das uvas descongeladas, esmagadas em almofariz até um volume de 5 mL e centrifugadas a 10000 rpm (microcentrífuga 5415 R, Eppendorf) por 10 min e diluídas em água deionizada, de acordo com o estágio de maturação.

3.3 Compostos Fenólicos

3.3.1 Antocianinas

A avaliação das condições de separação das antocianinas foi feita de acordo com os resultados apresentados por Kammerer *et al.* (2004)¹⁶⁷, em um equipamento de HPLC com sistema de bombas binárias e detector por arranjo de diodos (Shimadzu), utilizando-se como fase móvel A água / ácido fórmico / acetonitrila (87 : 10 : 3, v/v/v) e como fase B água / ácido fórmico / acetonitrila (40 : 10 : 50, v/v/v), com o seguinte gradiente de eluição: 10 a 25% B durante 10 min, 25 a 31% B até 15 min, 31 a 40% B até 20 min, 40 a 50% B até 30 min, 50 a 100% B até 40 min, retornando a condição inicial em 45 min.

A separação foi realizada em uma coluna Zorbax Eclipse XBD C18 (Agilent Technologies) com 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m, operada a temperatura ambiente e vazão de 0,8 mL min⁻¹, e um volume de injeção de 20 μ L. Uma varredura de 200 a 600 nm foi realizada e o monitoramento das antocianinas foi feito em 520 nm.

As análises de LC-MS foram feitas em um espectrômetro de massas LCQ Deca XP Max *ion trap* equipado com uma interface *electrospray* (Thermo Finnigan), acoplado a um cromatógrafo a líquido com sistema de bombas quaternárias, injetor automático com controle de temperatura e detecção por arranjo de diodos (Thermo Finnigan). As condições cromatográficas e a coluna de separação foram as mesmas utilizadas para o sistema LC-DAD. O volume de injeção foi de 10 μ L, e para este sistema utilizou-se um *split* na saída da coluna cromatográfica para reduzir a vazão de fase móvel para 0,3 mL min⁻¹ na entrada do espectrômetro de massas. A ionização foi feita em modo positivo e o espectro de massas armazenado de 150 – 1000 *m/z*. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização a uma pressão de 40 (unidades arbitrárias). A temperatura do capilar foi de 275 °C e a voltagem do *spray* 5 kV. Experimentos de MS/MS foram realizados e, como não haviam padrões disponíveis, os resultados de íon molecular e fragmentos foram comparados com a literatura para identificação das antocianinas presentes nos extratos.

Para o preparo das amostras as bagas das uvas foram finamente trituradas em almofariz com nitrogênio líquido. A 2 g das amostras pulverizadas foram adicionados 50 mL de metanol / 0,1% HCl (v/v) e a mistura mantida sob agitação durante 1 h. Os extratos foram filtrados e o material re-extraído com mais 50 mL do solvente durante 1 h sob agitação. Os sobrenadantes foram combinados, rotoevaporados a 35 °C, e os resíduos dissolvidos em 12 mL de água acidificada com HCl a pH 3,0. Antes da injeção, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm (microcentrífuga 5415 R, Eppendorf) por 1,5 min e diluídas com a fase móvel na proporção 1:1.

3.3.2 Polifenóis não-antociânicos

O perfil dos polifenóis não-antociânicos foi avaliado por LC-DAD. O gradiente de solvente foi feito utilizando-se água / ácido acético (98 : 2 v/v) como fase móvel A e acetonitrila / solvente A (80 : 20 v/v) como fase móvel B, como segue: 0 – 44 % B durante 50 min, 44 – 100 % B até 55 min, 100 % B durante 5 min, retornando às condições iniciais entre 60 e 65 min. O tempo de corrida longo foi necessário para obter uma boa resolução entre os

picos, devido à complexidade dos extratos polifenólicos obtidos. Vinte microlitros foram injetados e a separação realizada em uma coluna Zorbax Eclipse XBD C18 (Agilent Technologies) com 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m, operada a temperatura ambiente, e vazão de 1 mL min⁻¹. O monitoramento foi feito nos comprimentos de onda máximos de absorção de três classes de polifenóis: 275 nm para ácidos benzóicos e flavanóis, 320 nm para ácidos hidroxicinâmicos e 360 nm para flavonóis.

Os compostos fenólicos não-antociânicos foram obtidos por extração líquido-líquido a partir do extrato obtido para as antocianinas. Os compostos foram extraídos quatro vezes com acetato de etila na proporção 1:1 a partir de 10 mL de solução. Os extratos foram combinados, secos em rotoevaporador a 30 °C e ressuspensos em 2 mL de ácido acético 2%.

3.4 Análise multivariada dos dados

Os resultados de concentração obtidos para os ácidos orgânicos e açúcares presentes nas uvas em diferentes estádios de maturação foram analisados por PCA para verificar a influência destes compostos na maturação das uvas e nas diferentes variedades e origens. Os dados foram normalizados e analisados pelo programa Minitab[®] 16 (Minitab Inc.).

Os dados cromatográficos dos perfis de compostos fenólicos, antocianinas e não-antocianinas, foram submetidos à análise multivariada pela ferramenta de PCA. No caso das antocianinas, uma matriz foi construída usando o cromatograma obtido em 520 nm, e no caso dos polifenóis não-antociânicos, os cromatogramas obtidos nos três comprimentos de onda estudados: 275, 320 e 360 nm.

Os dados foram alinhados pelo programa Matlab[®] v. 7.5 (MathWorks Inc.), de acordo com o procedimento descrito por Skov *et al.* (2006)¹⁷¹ e utilizado por Martins *et al.* (2011)¹⁰⁷ para classificar amostras de plantas, com um algoritmo implementado (http://www.models.kvl.dk/source/DTW_COW/index.asp). Esta etapa de alinhamento é necessária, pois frequentemente os dados cromatográficos originais apresentam pequenos deslocamentos dos picos causados pelas próprias condições da cromatografia líquida.¹⁰⁵ Para proceder a análise multivariada os dados necessitam estar em uma matriz uniforme de forma que os picos de todos os cromatogramas estejam nas mesmas colunas da matriz.¹⁷¹ Várias técnicas matemáticas são descritas na literatura para alinhamento de picos cromatográficos, entre elas *Correlation Optimized Warping* (COW), utilizada neste trabalho. Este algoritmo preserva a forma e área dos picos dos cromatogramas originais, utilizando um cromatograma

alvo como referência para estender ou comprimir os segmentos.¹⁷² A seleção dos parâmetros para utilizar esta ferramenta foi atualizada e automatizada por Skov *et al.* (2006),¹⁷¹ para selecionar as melhores condições de alinhamento, assim como a melhor amostra referência.

Depois de alinhados os dados foram centrados na média e uma seleção de variáveis foi feita com ajuda do gráfico de *loadings*. Os dados selecionados foram autoescalados e as análises de PCA feitas no *software* Pirouette® v. 4.0 (Infometrix).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ácidos orgânicos

A validação do método cromatográfico para separação dos ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico, acético e láctico foi efetuada e avaliada com o objetivo de quantificar os ácidos orgânicos com a maturação das uvas. As figuras de mérito utilizadas para a validação do método foram linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e recuperação.

A linearidade das curvas analíticas foi determinada calculando-se o valor médio de três injeções consecutivas de soluções padrão de diferentes concentrações de cada ácido. A Tabela 2.1 apresenta as equações de regressão linear para as curvas analíticas nas faixas de concentração estudadas, assim como os valores de limites de detecção e quantificação.

Tabela 2.1 – Equações de regressão linear, coeficientes de correlação e faixa de concentração estudada para cada um dos ácidos orgânicos estudados.

Ácido	Equação da reta $Y = A + BX$	Coeficiente de correlação	LD (mg mL ⁻¹)	LQ (mg mL ⁻¹)	Faixa estudada (mg mL ⁻¹)
Tartárico	$Y = -11257,47 + 1,605 \cdot 10^6 X$	0,9972	0,06	0,20	0,02-1,00
Málico	$Y = -13330,12 + 8,709 \cdot 10^5 X$	0,9992	0,04	0,13	0,02-1,50
Láctico	$Y = -3061,12 + 4,629 \cdot 10^5 X$	0,9992	0,05	0,16	0,02-2,00
Acético	$Y = -19670,63 + 5,532 \cdot 10^5 X$	0,9982	0,07	0,24	0,02-2,00
Cítrico	$Y = -4046,85 + 5,366 \cdot 10^5 X$	0,9998	0,02	0,05	0,02-1,00
Succínico	$Y = 419,28 + 5,825 \cdot 10^5 X$	0,9999	0,02	0,03	0,02-1,50

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}; \quad LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

O cálculo do limite de detecção foi feito considerando-se a razão entre três vezes o desvio padrão dos interceptos (DP_a) das curvas analíticas e as inclinações (IC) das mesmas, e o limite de quantificação considerando-se dez vezes este valor.¹⁷³ Os coeficientes de correlação entre a concentração de cada ácido orgânico e sua área de pico foram maiores que 0,99 para todos os ácidos analisados nas faixas de concentração estudadas, indicando excelente linearidade.

A precisão do método para a determinação dos seis ácidos orgânicos foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%). Seis injeções de uma mistura padrão dos ácidos foram feitas sequencialmente. Durante três dias a mistura de padrões foi injetada três vezes

consecutivas, o experimento repetido após um mês e os resultados comparados. A repetibilidade intra-dia, entre os três dias consecutivos e após um mês foi calculada para os tempos de retenção e as áreas dos picos. A Tabela 2.2 apresenta os resultados.

Tabela 2.2 - Precisão do método para análises intra-dia e entre-dias.

Ácido orgânico	Repetibilidade (n = 6)		Reprodutibilidade (n = 9)*		Reprodutibilidade (n = 9)**	
	CV (%) tempo de retenção	CV (%) área de pico	CV (%) tempo de retenção	CV (%) área de pico	CV (%) tempo de retenção	CV (%) área de pico
Tartárico	0,16	0,93	1,54	4,85	0,81	6,42
Málico	0,17	0,90	1,87	3,84	1,12	3,68
Lático	0,12	0,86	1,64	4,58	0,95	6,51
Acético	0,11	1,03	1,23	4,01	0,94	7,91
Cítrico	0,29	1,31	6,31	8,14	3,08	7,66
Succínico	0,22	2,07	2,49	11,24	2,29	10,58

$$CV\% = \frac{DP}{m\acute{e}dia} \times 100$$

* três injeções consecutivas por 3 dias

** três injeções consecutivas e por 2 dias após um mês

Pode-se observar que os valores de coeficiente de variação para as medidas feitas no mesmo dia não ultrapassam 2,07% para áreas de pico. Para a precisão entre-dias, com exceção do ácido succínico, que apresentou 11,24% para área de pico, os outros valores não ultrapassaram 8,14%, sendo estes números aceitáveis para a validação do método. Bons resultados também foram obtidos pela análise dos padrões durante três dias consecutivos e por dois dias após um mês, com os valores não excedendo 3,08% para tempos de retenção e 10,58% para área dos picos, relativo ao ácido succínico, o último pico a ser eluído.

Embora alguns autores utilizem apenas a filtração e diluição como preparo de amostra, um procedimento para eliminação de interferentes é de grande importância para melhorar a separação dos compostos de interesse, evitar co-eluições e interferências, e prevenir a degradação das colunas analíticas, aumentando seu tempo de vida e mantendo a resolução e a eficiência de separação. Polivinilpolipirrolidona (PVPP) tem sido utilizado com sucesso em alguns trabalhos para isolar os compostos de interesse, como ácidos orgânicos, açúcares e proteínas, dos polifenóis. Este composto é um polímero sintético de

vinilpirrolidona, insolúvel em água e utilizado para adsorver compostos fenólicos. O mecanismo de interação se dá por meio de ligações hidrogênio entre seus grupos carbonila e os grupos hidroxila dos compostos fenólicos, além de interações hidrofóbicas entre os núcleos benzênicos presentes em sua estrutura e os anéis aromáticos dos polifenóis.¹⁷⁴

Para avaliar a recuperação do método dois níveis de concentração para cada ácido orgânico foram adicionados a uma amostra de mosto de uva e as misturas submetidas ao procedimento com PVPP. Os valores para recuperação são apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Valores de recuperação dos ácidos orgânicos em amostras de uvas.

	Tartárico	Málico	Lático	Acético	Cítrico	Succínico
Nível 1 (mg mL⁻¹)	0,60	0,80	0,05	0,08	0,95	0,05
Rec (%)	92	83	120	112	92	80
Nível 2 (mg mL⁻¹)	1,0	0,50	0,10	0,10	0,35	0,10
Rec (%)	94	98	120	130	108	90

$$\text{Rec (\%)} = \frac{[\text{amostra} + \text{padrão}] - [\text{amostra}]}{[\text{padrão}]} \times 100$$

Os valores de recuperação apresentaram-se entre 80 e 130%, sendo os menores valores obtidos para o ácido succínico. Valores de recuperação entre 82 e 110% para ácidos tartárico, málico, ascórbico e cítrico foram encontrados para amostras de sucos e polpas de diversas frutas utilizando-se um método de HPLC similar e simplesmente diluição da amostra antes da injeção.¹⁷⁵

Resultados similares com relação à resolução da separação e concentração dos ácidos orgânicos estudados foram obtidos utilizando-se o método de precipitação com PVPP e a injeção direta da amostra. No entanto o pré-tratamento com PVPP foi escolhido com a finalidade de evitar degradação da coluna utilizada, aumentando seu tempo de vida e repetibilidade nas análises. A Figura 2.13 apresenta um cromatograma com os ácidos encontrados em uma amostra de uvas Cabernet Sauvignon de Água Vermelha.

Figura 2.13 - Cromatograma obtido pela separação dos ácidos orgânicos presentes em (A) uma mistura padrão e (B) uma amostra de uvas Cabernet Sauvignon. (1) ácido tartárico, (2) ácido málico, (3) ácido lático, (4) ácido acético, (5) ácido cítrico, (6) succínico, (**) não identificado, (*) não identificado presente no padrão de ácido málico. Condições experimentais descritas na Seção 3.1.

Os perfis da evolução dos principais ácidos orgânicos com a maturação das uvas Syrah cultivadas em Água Vermelha, durante os três anos de estudo, são apresentados na Figura 2.14. As Figuras 2.15 e 2.16 apresentam os resultados para as uvas Cabernet Sauvignon cultivada em Água Vermelha e Syrah cultivada em Louveira.

Figura 2.14 - Evolução dos ácidos tartárico e málico com a maturação nos mostos de uvas Syrah Água Vermelha.

Figura 2.15 - Evolução dos ácidos tartárico e málico com a maturação nos mostos de uvas Cabernet Sauvignon Água Vermelha.

Figura 2.16 - Evolução dos ácidos tartárico, málico e cítrico com a maturação nos mostos de uvas Syrah Louveira.

Os ácidos orgânicos majoritários encontrados nas uvas foram tartárico e málico, e cítrico em menor quantidade. Para todas as variedades, no início do desenvolvimento das bagas, quando estas ainda se apresentam verdes, os teores de ácido tartárico e málico são elevados, sendo que suas concentrações diminuem com o amadurecimento. Os resultados confirmam os apresentados no Capítulo 1 para acidez total, indicando que ela se deve principalmente aos ácidos málico e tartárico. Este decréscimo deve-se basicamente a três fatores: efeito de diluição pelo aumento do volume das bagas com a maturação, respiração oxidativa e à contribuição de cátions, associados às condições climáticas.³⁹

Para as uvas verdes a concentração de ácido málico é maior que a concentração de ácido tartárico para todos os anos e variedades avaliadas, sendo que a concentração do primeiro varia desde este estágio até as uvas estarem completamente maduras. Já a concentração de ácido tartárico diminui acentuadamente até o *veraison*, e depois varia em menor proporção. A degradação de ácido málico é bastante influenciada pela temperatura elevada, sendo que as diferentes variedades de videiras não possuem a mesma capacidade de acumular e degradar este composto na maturação.^{10,40}

Valores mais elevados de ácido tartárico foram encontrados para as uvas cultivadas em Água Vermelha no ano de 2008, enquanto que em 2009 predominou o ácido málico. O teor dos ácidos foi aproximadamente igual para as duas variedades de Água Vermelha em 2010. Rizzon e Sganzerla (2007)⁴⁰ relatam que a predominância de ácido tartárico indica condições meteorológicas mais favoráveis à maturação das uvas, e que um período mais ensolarado e com temperaturas mais elevadas determinam maior degradação do ácido málico, por meio da combustão respiratória, resultando em uvas menos ácidas.

As concentrações de ácido cítrico permaneceram aproximadamente constantes durante todo o período de maturação das uvas estudadas (resultados apresentados apenas para a uva Syrah Louveira), variando entre 0,4 e 1,0 mg mL⁻¹. A Tabela 2.4 apresenta os resultados de concentração de ácido málico e tartárico nas uvas maduras provenientes das diferentes regiões avaliadas.

Tabela 2.4 - Concentração dos ácidos tartárico e málico nas diversas uvas maduras.

Variedade	Concentração (mg mL ⁻¹)	
	Tartárico	Málico
ShAV 08	5,43 ^f ± 0,15	3,05 ^c ± 0,15
CSAV 08	5,06 ^e ± 0,03	3,62 ^c ± 0,03
ShAV 09	3,62 ^b ± 0,01	4,31 ^g ± 0,14
ShAV 10	2,14 ^a ± 0,08	2,66 ^b ± 0,04
CSAV 10	2,17 ^a ± 0,32	3,02 ^c ± 0,06
CSBG 08	4,64 ^{cd} ± 0,10	2,59 ^b ± 0,05
Merlot BG 08	5,05 ^e ± 0,11	1,46 ^a ± 0,08
ShCN 08	5,20 ^e ± 0,01	2,64 ^b ± 0,06
ShCN 09	3,64 ^b ± 0,18	3,17 ^d ± 0,01
ShCN 10	4,71 ^d ± 0,37	4,00 ^f ± 0,29
ShL 10	2,15 ^a ± 0,06	2,86 ^c ± 0,04
MáxL 10	4,45 ^c ± 0,15	5,26 ^h ± 0,38

Valores seguidos de mesma letra para a mesma variável nas colunas (ácido tartárico ou málico) não diferem significativamente pelo teste de ANOVA ($P < 0,05$).

Nas duas variedades de uvas provenientes de Bento Gonçalves foi observada a presença de ácido acético, o que se deve provavelmente à degradação por mau acondicionamento durante o transporte das mesmas.

Os valores encontrados para ácido tartárico e málico nas uvas C. Sauvignon, tanto de Água Vermelha quanto de Bento Gonçalves, são menores que os relatados por Rizon e

Sganzerla (2007) para a mesma variedade coletada em Bento Gonçalves no ano de 2004, que foram 7,7 e 5,9 mg mL⁻¹.⁴⁰ O mesmo foi observado para a variedade Merlot.

Comparando as amostras de Água Vermelha, no ano de 2008 a concentração de ácido tartárico foi maior que a de ácido málico para ambas as variedades. Nos anos de 2009 e 2010 esta relação se inverteu, tanto para as uvas de Água Vermelha como de Louveira. Já para as uvas de Casa Nova a concentração de ácido tartárico foi maior que a de ácido málico para os três anos estudados. Como ressaltado anteriormente, as condições climáticas são de grande importância para o acúmulo e degradação destes ácidos, portanto flutuações nestes valores podem ser devido a condições climáticas variadas de ano para ano, mesmo considerando-se regiões próximas.

4.2 Açúcares

Métodos eletroforéticos permitem a análise de carboidratos neutros, já que contêm grupos que são ionizados em condições fortemente alcalinas, gerando estruturas que podem ser analisadas por detecção UV direta. O método utilizado para determinação de glicose e frutose, adaptado de Rovio *et al.* (2007)¹⁰³ para análise de monossacarídeos em fibras de plantas após hidrólise, é baseado na formação de um enoldiolato no capilar, através da ação concomitante do eletrólito alcalino e do campo elétrico aplicado, permitindo a absorção deste complexo na região UV, no comprimento de onda de 270 nm.

A validação do método foi avaliada para quantificar a variação de glicose e frutose com a maturação das uvas. Foram avaliadas linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade intra-dia e repetibilidade entre dias.

A linearidade das curvas analíticas foi determinada calculando-se o valor médio de três injeções consecutivas de soluções padrão de diferentes concentrações de cada açúcar. A Tabela 2.5 apresenta as equações de regressão linear para as curvas analíticas nas faixas de concentração estudadas, assim como os coeficientes de correlação e limites de detecção e quantificação.

Tabela 2.5 - Equações de regressão linear, coeficientes de correlação e faixa de concentração estudada para glicose e frutose.

Açúcar	Equação da reta $Y = A + BX$	Coefficiente de correlação	LD (mg mL ⁻¹)	LQ (mg mL ⁻¹)	Faixa estudada (mg mL ⁻¹)
Glicose	$Y = -62454,12 + 800525,65 X$	0,9978	0,03	0,09	0,05-0,55
Frutose	$Y = -12843,83 + 317982,10 X$	0,9982	0,02	0,08	0,05-0,55

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}; \quad LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

O cálculo do limite de detecção foi feito considerando-se a razão entre três vezes o desvio padrão dos interceptos das curvas analíticas e as inclinações das mesmas, e o limite de quantificação considerando-se dez vezes este valor.¹⁷³ Os coeficientes de correlação entre a concentração de cada açúcar e sua área de pico indicam excelente linearidade nas faixas de concentração estudadas.

A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%). Seis injeções de uma mistura padrão dos açúcares foram feitas sequencialmente, e durante três dias a mistura de padrões foi injetada três vezes consecutivas. A repetibilidade intra-dia e entre os dias consecutivos foi calculada para os tempos de retenção e as áreas dos picos. A Tabela 2.6 apresenta os resultados.

Tabela 2.6 - Precisão do método para análises intra-dia e entre-dias.

Açúcar	Repetibilidade (n = 6)		Reprodutibilidade (n = 9)	
	CV (%) tempo de retenção	CV (%) área de pico	CV (%) tempo de retenção	CV (%) área de pico
Glicose	1,50	4,00	4,42	16,00
Frutose	1,54	9,00	4,54	24,00

$$CV\% = \frac{DP}{m\acute{e}dia} \times 100$$

Os valores de coeficiente de variação para as medidas feitas no mesmo dia foram de 4,00 a 9,00% para áreas de pico, sendo o maior valor obtido para frutose. Considerando as análises dos três dias, valores de 16,00 e 24,00% foram encontrados, sendo o maior valor obtido para frutose novamente. Rovio *et al.* apresentaram esta metodologia em dois trabalhos,

com valores de desvio padrão relativo da ordem 4,8% para soluções padrão de glicose nas análises em um mesmo dia, mas nenhum dos dois trabalhos citam análise de frutose. Apesar de boa repetibilidade na análise dos padrões, para as amostras os autores encontraram valores de desvio padrão relativo para áreas de pico entre 1,0 e 30,0%, o que atribuem à degradação química dos monossacarídeos na solução alcalina.^{103,104}

A Figura 2.17 apresenta um eletroferograma de uma mistura padrão de sacarose, glicose e frutose e outro com os açúcares majoritários encontrados em uma amostra de uvas maduras Cabernet Sauvignon de Água Vermelha.

Figura 2.17 – Eletroferograma de (A) uma mistura padrão de açúcares e (B) açúcares presentes em uma amostra de uvas Cabernet Sauvignon. (1) sacarose; (2) glicose; (3) frutose. Condições experimentais descritas na Seção 3.2.

A variação das quantidades de glicose e frutose com a maturação geralmente são expressas com relação à razão glicose/frutose. A Figura 2.18 apresenta as razões encontradas para estes dois açúcares nas uvas Syrah e Cabernet Sauvignon provenientes de Água Vermelha (AV) nos anos 2008, 2009 e 2010, e Louveira (L) em 2010, estudadas nos diferentes estádios de maturação.

Figura 2.18 – Razão glicose/frutose com a maturação das uvas Syrah Água Vermelha, Cabernet Sauvignon Água Vermelha e Syrah Louveira nos anos de 2008, 2009 e 2010.

Na fase de crescimento das bagas, quando as uvas ainda estão verdes ou iniciando a mudança de coloração predomina a glicose; na maturação glicose e frutose estão presentes em quantidades semelhantes e na fase de sobrematuração, geralmente a frutose excede a glicose.⁹ Liang *et al.* (2011) relatam que a concentração de glicose em diversas variedades de uvas foi um pouco maior que frutose no início do *veraison*, e se aproximou de 1 após esta data até maturação completa.¹⁷⁶

Neste estudo observou-se uma concentração de glicose muito superior à de frutose para todas as variedades verdes, sendo que a razão entre elas variou entre 2,5 e 6,5 para uvas verdes. Esta relação se aproximou de 1 na época do *veraison*, mantendo-se praticamente constante até completa maturação, onde se encontraram um pouco menores que 1 para as uvas Cabernet Sauvignon e Syrah cultivadas em Água Vermelha em 2008 e Syrah Louveira em 2010, próximas a 1 para Syrah Água Vermelha em 2009 e Cabernet Sauvignon em 2010 e um pouco maiores que 1 para Syrah Água Vermelha em 2010.

Soulis e Avgerinos (1984) encontraram uma relação glicose/frutose de 1,95 no começo do crescimento de bagas da variedade vinífera Razaki e 1,55 no momento da maturação.¹⁷⁷ Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (1975) esta relação varia com a maturação de acordo com a

variedade, normalmente entre 0,72 e 1,20, e em alguns casos até 1,49.¹⁷⁸ Em climas frios, nos quais o teor de açúcares totais é mais baixo, há uma tendência de se desenvolverem cultivares com maior teor de frutose, o contrário ocorre em climas quentes.⁹

A Tabela 2.7 apresenta os resultados de relação glicose/frutose nas uvas maduras provenientes das diferentes regiões avaliadas.

Tabela 2.7 – Razão glicose/frutose nas diversas uvas maduras.

Variedade	Glicose (mg mL ⁻¹)	Frutose (mg mL ⁻¹)	Gli/Fru
ShAV 08	56,07 ^d ± 4,58	74,70 ^{ef} ± 9,64	0,76 ^{bc} ± 0,11
CSAV 08	41,68 ^{ab} ± 1,09	52,32 ^{cd} ± 2,04	0,80 ^c ± 0,03
ShAV 09	74,28 ^g ± 6,97	81,86 ^f ± 6,30	0,89 ^{de} ± 0,08
ShAV 10	57,99 ^d ± 6,25	43,29 ^a ± 10,55	1,31 ^e ± 0,18
CSAV 10	48,46 ^{bc} ± 0,58	44,97 ^{ab} ± 1,26	1,08 ^f ± 0,04
CSBG 08	52,96 ^{cd} ± 0,30	87,24 ^g ± 1,71	0,60 ^a ± 0,01
ShCN 08	65,87 ^e ± 3,90	101,31 ^h ± 9,08	0,66 ^a ± 0,09
ShCN 09	35,70 ^a ± 1,56	35,88 ^a ± 5,71	0,97 ^{ef} ± 0,11
ShCN 10	55,79 ^d ± 1,59	82,91 ^{fg} ± 8,80	0,68 ^{ab} ± 0,05
ShL 10	52,59 ^c ± 0,77	61,85 ^{de} ± 1,50	0,86 ^{cd} ± 0,01
MáxL 10	60,75 ^e ± 1,13	99,54 ^h ± 9,15	0,61 ^a ± 0,05

As concentrações variaram de 34 a 73 mg mL⁻¹ para glicose e de 35 a 109 mg mL⁻¹ para frutose, e a razão entre elas foi menor que 1 para quase todas as variedades, exceto CSAV10 e ShCN09, nas quais se aproximou da unidade e ShAV10, na qual foi um pouco maior que 1. Os menores valores da relação glicose/frutose foram encontrados para as uvas provenientes de Bento Gonçalves e Casa Nova, exceto por 2009. Estes valores podem indicar um estágio de sobrematuração, uma vez que estas uvas foram transportadas longas distâncias, mesmo que chegando ao destino em boas condições, como no caso das uvas de Casa Nova. Para as uvas de Bento Gonçalves este fato já era esperado, uma vez que estas iniciaram o processo de fermentação durante o transporte, como confirmado pela presença de ácido acético nos resultados de ácidos orgânicos.

Os dados de concentração dos ácidos orgânicos tartárico, málico e cítrico e dos açúcares glicose e frutose, assim como a razão glicose/frutose foram analisados conjuntamente por PCA para avaliar a influência destas variáveis na maturação das uvas, e a Figura 2.19 apresenta os gráficos de *scores* e *loadings* para os resultados obtidos.

Figura 2.19 - Gráficos de *scores* e *loadings* para amostras em diferentes estádios de maturação, considerando ácidos orgânicos e açúcares. T_1= ácido tartárico, M_1= ácido málico, C_1= ácido cítrico, G_1= glicose, F_1= frutose, G-F_1= glicose/frutose.

As duas primeiras componentes principais contém 79% da variância total. Os resultados de PCA indicam uma separação relacionada ao estágio de maturação na PC1, apresentando as uvas verdes e em estágio de *veraison* do lado direito, e as uvas em estágio de amadurecimento e maduras do lado esquerdo. Dentro do primeiro grupo observa-se uma tendência de agrupamento entre as uvas verdes, mais à direita das uvas em *veraison*. A observação do gráfico de *loadings* indica que as uvas verdes possuem maior concentração de ácidos e maior relação glicose/frutose, enquanto essas variáveis contribuem menos para o agrupamento de uvas mais maduras. Este grupo, por sua vez, é representado pelas mais altas concentrações de açúcares.

Nenhum agrupamento foi observado com relação à variedade ou origem das uvas, nem mesmo entre uvas viníferas e a híbrida, indicando que estas variáveis não possuem influência em diferenciar o metabolismo destes compostos.

4.3 Compostos Fenólicos

4.3.1 Antocianinas

O perfil cromatográfico das antocianinas foi inicialmente analisado por HPLC-DAD a 520 nm, e subsequentemente elas foram identificadas por LC-MS/MS, considerando os fragmentos gerados e dados da literatura.^{167, 179-182}

Vinte antocianinas foram identificadas e separação em linha de base foi obtida para até 14 antocianinas nas uvas viníferas em menos de 30 min, dependendo do estágio de maturação e variedade. A Tabela 2.8 apresenta as identidades das antocianinas, juntamente com o tempo de retenção, íon molecular e informações de fragmentação.

Tabela 2.8 - Identificação das antocianinas, tempo de retenção (Tr), íon molecular e dados de fragmentação.

Pico*	Tr	Composto	Íon molecular M^+ (m/z)	Fragmentos (m/z)
1	4,96	Delfinidina 3,5-diglicosídeo	627	465/303
2	7,57	Delfinidina 3-glicosídeo	465	303
3	8,00	Petunidina 3,5-diglucosídeo	641	479/317
4	9,60	Peonidina 3,5-diglicosídeo	625	449
5	9,75	Cianidina 3-glicosídeo	449	287
6	10,90	Malvidina 3,5-diglicosídeo	655	493/331
7	11,09	Petunidina 3-glicosídeo	479	317
8	13,47	Peonidina 3-glicosídeo	463	301
9	14,51	Malvidina 3-glicosídeo	493	331
10	15,68	Delfinidina 3-acetilglicosídeo	507	303
11	16,47	Malvidina 3-(acetilglicosídeo)glicosídeo	697	535/331
12	19,76	Petunidina 3-acetilglucosídeo	521	317
13	21,90	Delfinidina 3-(<i>p</i> -coumaril)glicosídeo	611	303

Tabela 2.8 - Identificação das antocianinas, tempo de retenção (Tr), íon molecular e dados de fragmentação. (continuação)

14	22,70	Peonidina 3-acetilglicosídeo	505	301
15	23,52	Malvidina 3-acetilglicosídeo	535	331
16	23,80	Malvidina 3-(<i>p</i> -coumaril)glicosídeo	801	639/493/331
17	24,50	Cianidina 3-(<i>p</i> -coumaril)glicosídeo	595	287
18	25,10	Petunidina 3-(<i>p</i> -coumaril)glicosídeo	625	317
19	28,07	Peonidina 3-(<i>p</i> -coumaril)glicosídeo	609	301
20	28,67	Malvidina 3-(<i>p</i> -coumaril)glicosídeo	639	331

* N^{os}. dos picos indicados nos cromatogramas da Figura 20.

Cinco monoglicosídeos das antocianidinas delfinidina (Dp), petunidina (Pt), cianidina (Cy), peonidina (Pn) e malvidina (Mv) foram identificados em todas as uvas pelo espectro de absorção e pela presença do íon molecular e do fragmento $[M - 162]^+$, correspondente à perda de uma unidade de glicose, nos espectros de massas. Da mesma forma, quatro acetilglicosídeos e cinco (*p*-coumaril)glicosídeos dessas antocianidinas foram identificados pela perda de 204 e 308 unidades de massa, respectivamente, correspondentes à perda de um grupo acetilglicosídeo e um grupo (*p*-coumaril)glicosídeo. Exceto pela delfinidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo, a ordem de eluição dos compostos derivados das antocianidinas foi glicosídeo < acetilglicosídeo < (*p*-coumaril)glicosídeo.

Um aumento acentuado da concentração de antocianinas foi observado com a maturação de ambas as variedades de uvas, o que confirma os resultados obtidos por espectrofotometria para antocianinas totais, descritos no Capítulo 1, sendo seus conteúdos individuais dependentes da variedade. A quantidade de derivados glicosilados foi mais abundante, seguida pelos acetilglicosilados e coumarilglicosilados.

Os cromatogramas obtidos para as uvas Syrah e Cabernet Sauvignon em diferentes estádios de maturação durante o ano de 2008 são apresentados na Figura 2.20.

Figura 2.20 - Cromatogramas do perfil de antocianinas nos diferentes estádios de maturação das uvas (A) Syrah e (B) Cabernet Sauvignon cultivadas em Água Vermelha. Condições experimentais descritas na Seção 3.3.1.

Para as uvas verdes observam-se picos pouco intensos na variedade Cabernet Sauvignon, indicando que nesta fase as antocianinas já começavam a ser metabolizadas. Com a maturação das uvas, algumas antocianinas aumentaram em concentração, enquanto outras diminuíram, fato verificado pela intensidade dos picos, mas resultando em uma quantidade

total maior com a maturação. Este aumento está diretamente relacionado ao aumento da concentração de açúcares, uma vez que estes são substratos para a síntese de antocianinas.¹⁷⁶

Como não haviam padrões disponíveis, uma quantificação relativa em termos de porcentagem foi feita considerando a área total e individual de cada pico para visualização de como estes compostos variam com a maturação. As antocianinas foram classificadas em cinco grupos, de acordo com sua antocianidina, os valores relativos dos derivados de cada antocianina foram somados e são apresentados na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 - Porcentagens relativas dos derivados das cinco antocianidinas presentes nas uvas com a maturação.

	Cy (%)	Dp (%)	Pn (%)	Mv (%)	Pt (%)
2008					
ShAVverais	5,1	15,1	23,1	42,8	13,9
ShAVamad	2,4	8,9	22,1	56,7	10,1
ShAVmad	3,1	9,6	22,9	53,7	10,6
CSAVverais	16,5	26,2	22,9	23,1	11,3
CSAVamad	5,6	17,4	16,9	49,9	10,2
2009					
ShAVverais	9,8	13,2	34,0	31,2	11,8
ShAVamad	3,1	8,0	22,5	55,8	10,5
ShAVmad	2,2	7,7	17,2	61,7	11,1
2010					
CSAVverais	19	24,2	23,2	22,8	10,8
CSAVamad	7,5	19,9	15,6	46,0	11,0
CSAVmad	5,1	16,3	14,5	54,2	10,0
ShAVverais	10,6	17,2	32,1	27,4	12,9
ShAVamad	1,5	12,0	14,3	60,5	11,7
ShAVmad	2,4	9,5	15,1	61,4	11,6

Os derivados de Mv foram os mais abundantes nas uvas estudadas, e aumentaram com a maturação, sendo que a malvidina 3-glicosídeo foi a principal antocianina encontrada, independentemente do estágio de maturação das uvas, variando entre 30 e 40% para as uvas maduras. A porcentagem dos derivados de Cy e Dp diminuiu com a maturação das uvas. Estes resultados são consistentes com outros trabalhos que as descrevem como pigmentos primários nas rotas biossintéticas que levam a formação de diferentes antocianinas nas uvas. As

concentrações de Pn e Pt diminuam ou permaneçam pouco alteradas com a maturação, o que pode ser explicado pelo fato de os derivados destas duas antocianidinas serem obtidos a partir de derivados de Cy e Dp. Por sua vez, Pt é transformada em Mv, um pigmento de estrutura mais estável e produto final da biossíntese destes compostos, por reações induzidas pela enzima metiltransferase.^{37,183,184} Outros autores sugerem que a Mv é obtida diretamente de Dp pela ação das metiltransferases.¹⁸⁵

O *fingerprint* de antocianinas tem sido postulado como uma ferramenta útil para diferenciar variedades de uvas e origem varietal de vinhos. Desta forma, as variações ocorridas com a maturação das uvas foram estudadas por análise multivariada pela ferramenta de PCA. A Figura 2.21 apresenta os gráficos de *scores* e *loadings* obtidos pela análise das duas uvas em diversos estádios de maturação.

Figura 2.21 - Gráfico de *scores* e *loadings* para PC1 x PC2 para uvas em diferentes estádios de maturação: ■ *veraison*, ▲ amadurecimento, ● maduras.

As duas primeiras componentes principais contêm 88% da variância total. Com relação aos estádios de maturação, representados por *veraison*, amadurecimento e maturação completa, observa-se uma separação na PC1, com a formação de dois grupos, o da direita contendo uvas em estágio de amadurecimento e maduras, e o da esquerda contendo uvas na fase de *veraison*, quando se inicia a biossíntese de antocianinas, além da variedade Syrah cultivada em 2010 em estágio de amadurecimento, o que indica que esta variedade pode ter iniciado a etapa de amadurecimento tardiamente, considerando o perfil de antocianinas, com relação à Cabernet Sauvignon coletada na mesma data e local. Pode-se observar na PC2 que, independentemente do estágio de maturação, existem agrupamentos entre variedades Cabernet Sauvignon e Syrah, representados pelas elipses na Figura 2.21.

O estudo conjunto dos gráficos de *scores* e *loadings* indica que cianidina 3-glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo, petunidina 3-acetilglucosídeo, delphinidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo, malvidina 3-acetilglicosídeo, petunidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo, malvidina 3-(*p*-coumaril)glucosídeo são as principais responsáveis pelo agrupamento por estágio de maturação, sendo o pico referente à primeira mais intenso nas variedades menos maduras, confirmando relatos anteriores de que cianidina é um pigmento primário nas rotas biossintéticas de formação das outras antocianinas.

O perfil cromatográfico das uvas Máximo apresentou-se diferente das uvas viníferas, com 18 antocianinas com intensidades de picos aproximadamente três vezes maiores, o que confirma os resultados obtidos para antocianinas totais por espectrofotometria a 520 nm (resultados apresentados no Capítulo 1). A Figura 2.22 apresenta os cromatogramas das diversas variedades estudadas no estágio maduro.

Figura 2.22 - Cromatogramas do perfil de antocianinas de uvas das variedades Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot e Máximo. Condições experimentais descritas na Seção 3.3.1.

As antocianinas 3,5-diglicosídeos e 3,5-diglicosídeos aciladas são marcadores de espécies de uvas não-viníferas ou híbridas, sendo que a presença destas formas de antocianinas é uma maneira de diferenciar variedades, já que uvas viníferas apresentam apenas 3-glicosídeos e seus derivados.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

As uvas Máximo se caracterizaram pela presença de 3,5-diglicosídeos de delphinidina, petunidina e malvidina. A fragmentação dos íons moleculares geraram íons correspondentes ao monoglicosídeos e a aglicona de cada antocianina. Malvidina 3-(*p*-coumarilglicosídeo)glicosídeo apresenta o íon molecular em m/z 801, que leva aos fragmentos m/z 639, 493 e 331, correspondendo à perda de glicose ($M^+ - 162$), *p*-coumarilglicose ($M^+ - 308$) e ambos ($M^+ - 470$), respectivamente. A malvidina 3-(acetilglicosídeo)glicosídeo apresenta o íon molecular em m/z 697, que se fragmenta nos íons m/z 535, correspondendo à perda de glicose e m/z 331, correspondendo à perda de acetilglicose, a última perda representando a aglicona da malvidina. Nesta variedade foi observada co-eluição de delphinidina 3-glicosídeo (2) e petunidina 3,5-diglicosídeo (3), assim como de cianidina 3-glicosídeo (5) e peonidina 3,5-diglicosídeo (4). Separação em linha de base não foi obtida para separar malvidina 3-acetilglicosídeo (15) e malvidina 3-(*p*-coumarilglicosídeo)glicosídeo

(16). No entanto, todos os picos puderam ser identificados e fragmentados nos experimentos de MS/MS.

Os espectros de MS e MS/MS da malvidina 3-(*p*-coumarilglicosídeo)glicosídeo, a antocianina mais complexa encontrada na uva híbrida, são apresentados na Figura 2.23.

Figura 2.23 - Espectro (A) MS e (B) MS/MS da malvidina 3-(*p*-coumarilglicosídeo)glicosídeo encontrada nas uvas Máximo após separação por HPLC.

A quantificação relativa em termos de porcentagem foi feita para as uvas maduras considerando a área total e individual de cada pico. Apesar de compostos similares serem encontrados em todas as variedades, as quantidades relativas dos compostos individuais foram diferentes. Os dados são apresentados na Tabela 2.10.

Tabela 2.10 - Porcentagem de antocianinas individuais nas uvas maduras estudadas

Amostra Pico	Porcentagem (%)										
	CSAV 08	CSAV 10	CSBG 08	ShAV 08	ShAV 09	ShAV 10	ShL 10	ShOV 08	ShOV 10	MerBG 08	MaxL 10
1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,7
2	15,2	14,4	16,8	7,2	7,7	6,1	11,2	10,8	6,1	13,2	18,0
3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,3
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,8
5	5,4	5,4	3,1	2,0	1,5	1,2	1,5	2,9	1,3	4,4	1,5
6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	15,6
7	8,4	8,5	9,8	7,9	9,1	7,4	10,9	11,8	7,3	11,0	11,1
8	13,1	11,9	8,9	12,8	12,0	7,8	8,5	14,3	7,6	12,6	2,6
9	34,2	37,7	38,2	30,9	42,7	32,3	39,3	34,2	32,3	33,2	22,0
10	2,1	2,1	2,5	0,8	nd	1,5	1,7	1,4	1,5	2,0	3,5
11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,8
12	1,7	1,6	2,1	1,2	2,3	1,9	1,8	1,6	2,0	2,1	2,2
13	nd	nd	nd	1,9	nd	1,9	1,7	1,7	2,1	1,6	2,7
14	2,4	1,9	1,7	2,2	nd	2,6	1,2	2,0	2,6	2,2	nd
15	11,2	11,6	11,9	6,1	nd	11,9	7,5	5,2	11,9	7,5	4,9
16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,4
17	nd	nd	nd	1,1	2,0	1,2	0,6	0,7	1,2	nd	nd
18	nd	nd	nd	2,0	nd	2,3	1,6	1,6	2,3	1,3	1,7
19	1,4	0,8	0,8	7,4	5,5	4,7	1,9	4,1	4,7	2,3	0,3
20	4,9	4,1	4,2	16,5	17,2	17,2	11,1	7,7	17,1	6,4	4,9

nd = não detectado

Em todas as variedades malvidina 3-glicosídeo foi a principal antocianina encontrada, representando mais de 32% nas variedades viníferas e 22% na híbrida. Delfinidina 3-glucosídeo e diglicosídeos de malvidina estão presentes em altas concentrações na variedade Máximo, sendo o último composto detectado somente nela.

As uvas Syrah cultivadas em São Carlos no ano de 2009 não apresentaram, ou apresentaram em baixa concentração, as antocianinas delfinidina 3-acetilglicosídeo, delfinidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo, peonidina 3-acetilglicosídeo, peonidina 3-acetilglicosídeo, e petunidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo. No entanto, a quantidade de

malvidina 3-glicosídeo foi maior do que para as outras uvas desta variedade, o que pode ser explicado por alterações climáticas, que estão diretamente relacionadas com a biossíntese destes compostos.

Aproximadamente a mesma quantidade de cada antocianina foi observada nas uvas viníferas. Considerando as diferenças entre variedades pode ser observada uma maior concentração de cianidina 3-glicosídeo e delphinidina 3-glicosídeo nas uvas Cabernet Sauvignon do que nas Syrah, exceto pela cultivada em Louveira, que apresentou conteúdos similares aos das uvas Cabernet Sauvignon.

Para avaliar melhor as diferenças entre o perfil de antocianinas das uvas maduras Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot e Máximo cultivadas nas diferentes regiões, uma análise por meio de PCA foi feita com o conjunto de dados obtidos. A Figura 2.24 apresenta o gráfico de *scores* obtido.

Figura 2.24 - Gráfico de *scores* para PC1 x PC2 para uvas maduras: ■ Syrah, ● Cabernet Sauvignon, ▲ Merlot e ▼ Máximo.

As duas primeiras componentes principais contêm aproximadamente 85% da variância total. Observa-se claramente que as uvas viníferas formam um grupo separado da uva híbrida, e considerando as uvas viníferas é possível notar uma tendência de agrupamento das uvas Cabernet Sauvignon do lado esquerdo e no quadrante inferior do gráfico, separadas das uvas

Syrah pela PC2. As uvas Merlot estão agrupadas com as uvas viníferas e próximas das uvas Cabernet Sauvignon, indicando similaridade entre os perfis de antocianinas destas duas variedades. As uvas Syrah produzidas em Casa Nova em 2010 e em Louveira estão um pouco distantes das outras uvas da mesma variedade, mas este fato provavelmente não é influenciado pela região de cultivo porque outra amostra produzida em Casa Nova se encontra no grupo Syrah, mas pode ser devido a algum fator climático que interferiu na biossíntese desta classe de polifenóis.

A observação conjunta dos gráficos de *scores* e *loadings* indica que as principais antocianinas responsáveis pelo agrupamento entre as uvas Syrah das diferentes regiões de cultivo de um lado, e Cabernet Sauvignon e Merlot de outro são representadas por cianidina 3-glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo, malvidina 3-glicosídeo, delphinidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo, petunidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo, peonidin 3-(*p*-coumaril)glicosídeo, malvidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo. Considerando os perfis destes picos apenas a antocianina correspondente ao pico 5, a cianidina 3-glicosídeo, apresentou-se em maior quantidade nas uvas Cabernet Sauvignon, enquanto as outras foram majoritárias na variedade Syrah. Com relação à separação entre a uva híbrida e as viníferas as principais responsáveis são as antocianinas diglicosiladas.

Os resultados obtidos indicam que diferenças entre amostras considerando a composição de antocianinas são devido à variabilidade varietal, e que esta pode ser uma maneira de diferenciar entre uvas viníferas e não-viníferas, o que é de importância para avaliar adulteração de vinhos. Em termos de origem geográfica a diferença em composição de antocianinas nas amostras não permitiu nenhum agrupamento.

4.3.2 Polifenóis não-antociânicos

As Figuras 2.25, 2.26 e 2.27 apresentam, respectivamente, os cromatogramas obtidos para os polifenóis não-antociânicos nos três diferentes comprimentos de onda estudados, 275 nm, 320 nm e 360 nm, de uvas Syrah e Cabernet Sauvignon coletadas em Água Vermelha, em três estádios de maturação: *veraison*, amadurecimento e maduras.

Figura 2.25 - Cromatogramas dos perfis de polifenóis não-antociânicos em 275 nm nos diferentes estádios de maturação das uvas Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas em Água Vermelha. (A) *veraison*, (B) amadurecimento, (C) maturação completa. Condições experimentais descritas na Seção 3.3.2.

Figura 2.26 - Cromatogramas dos perfis de polifenóis não-antociânicos em 320 nm nos diferentes estádios de maturação das uvas Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas em Água Vermelha. (A) *veraison*, (B) amadurecimento, (C) maturação completa. Condições experimentais descritas na Seção 3.3.2.

Figura 2.27 - Cromatogramas dos perfis de polifenóis não-antociânicos em 360 nm nos diferentes estádios de maturação das uvas Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas em Água Vermelha. (A) *veraison*, (B) amadurecimento, (C) maturação completa.

Os três comprimentos de onda estudados correspondem à máxima absorção dos ácidos benzóicos e flavanóis (275 nm), ácidos hidroxicinâmicos (320 nm) e flavonóis (360 nm). Os cromatogramas em 275 nm são muito ricos em informação dos polifenóis presentes nas amostras, uma vez que grande parte destes compostos absorve neste comprimento de onda, mesmo que não seja o comprimento de onda de seu máximo de absorção. Visualmente observam-se alterações em relação à proporção dos diferentes compostos com a maturação, nos três comprimentos de onda avaliados, no entanto a composição dos extratos permanece muito semelhante. Os compostos não foram identificados, o que permitiu avaliar apenas como o perfil destes podem diferenciar, se podem, variedades, estágio de maturação e origem.

Um estudo da variação da composição fenólica de três variedades de uvas italianas com a maturação indicou uma concentração máxima de catequinas e flavonóis antes do *veraison*, após o qual ocorreu uma diminuição, mas com quantidades maiores que as uvas verdes ao final da maturação.¹⁴⁸

Estes compostos são geralmente estudados nas cascas ou sementes, uma vez que se apresentam em maior quantidade nestas partes das uvas. Liang *et al.* (2011) determinaram a evolução de oito polifenóis não antociânicos em cascas de cinco genótipos de uvas. Os autores relatam que até o início do *veraison* os polifenóis não antociânicos respondem por aproximadamente 90% dos compostos fenólicos das uvas, diminuindo com a maturação. Encontraram que a concentração dos ácidos hidroxicinâmicos caftárico e coumárico foi mais alta no início do *veraison* e diminuiu com a maturação, enquanto a concentração dos flavonóis rutina, mircetina 3-glicosídeo e quercetina 3-glicosídeo aumentou acentuadamente para todas as variedades. Os teores de procianidina B1 e epicatequina, pertencentes à classe dos flavanóis, foram baixos em todas as uvas e não apresentaram um padrão, aumentando para algumas variedades, diminuindo para outras ou permanecendo inalterados.¹⁷⁶

Um total de 60 flavanóis, 11 flavonóis e 11 ácidos fenólicos foram identificados por HPLC-DAD-MS durante a caracterização do perfil de sementes e cascas durante a maturação de uvas Tannat.¹⁸⁹ A variedade e concentração de flavanóis foram maiores nas sementes do que nas cascas, sendo identificados catequina, galocatequina, epicatequina e epicatequina galato, além de procianidinas e prodelfinidinas, os mesmos flavanóis relatados em outras variedades. Os autores observaram diminuição no conteúdo dos flavanóis expresso em mg/g de semente seca, de acordo com dados obtidos para outras variedades de uvas. Quercetina e mircetina responderam por 38 e 30% do conteúdo total de flavonóis, sendo que o teor total

aumentou com a maturação. Os ácidos fenólicos apresentaram um aumento significativo nas sementes durante a maturação, mas permaneceram sem grande alteração nas cascas.¹⁸⁹

A Figura 2.28 apresenta os cromatogramas das quatro variedades estudadas, nos três comprimentos de onda referentes à máxima absorção das classes de polifenóis.

Figura 2.28 - Cromatogramas dos perfis de polifenóis não-antociânicos em 275 nm, 320 nm e 360 nm para uvas (A) Cabernet Sauvignon, (B) Syrah, (C) Merlot e (D) Máximo. (continua)

Figura 2.28 - Cromatogramas dos perfis de polifenóis não-antociânicos em 275 nm, 320 nm e 360 nm para uvas (A) Cabernet Sauvignon, (B) Syrah, (C) Merlot e (D) Máximo. (continuação)

Visualmente observam-se diferenças quanto ao perfil de compostos fenólicos das diferentes variedades nos três comprimentos de onda estudados, sendo as maiores diferenças entre as uvas viníferas e híbrida com relação à composição de ácidos hidroxicinâmicos (320 nm) e flavonóis (360 nm).

Devido ao grande número de compostos encontrados nos extratos uma análise por meio de PCA foi realizada para avaliar o *fingerprint* cromatográfico nos diferentes estádios de maturação e das diferentes variedades. A Figura 2.29 apresenta os gráficos de *scores* e *loadings* obtidos para as análises em 275 nm.

Figura 2.29 - Gráficos de *scores* e *loadings* para PC1 x PC2 para uvas estudadas com relação ao estágio de maturação: ▼ verde, ■ *veraison*, ▲ amadurecimento e ● maduras. $\lambda = 275$ nm.

Os dados originais foram autoescalados e submetidos a uma seleção de variáveis para eliminar aquelas que não contribuíam de maneira relevante para o conjunto de dados. Os resultados de PCA para o comprimento de onda de 275 nm, referente ao máximo de absorção dos ácidos benzóicos e flavonóis, permitiu um agrupamento entre as uvas maduras, separadas das uvas nos outros estádios pela PC2. Dentro do conjunto das uvas em diversos estádios de maturação foi possível observar um padrão de agrupamento entre as três amostras em estágio de amadurecimento, enquanto nenhum padrão foi obtido para as uvas em estágio de *veraison*. A amostra madura que não foi agrupada juntamente com as outras no mesmo estágio refere-se à Cabernet Sauvignon de Bento Gonçalves.

A observação conjunta dos gráficos de *loadings* e *scores* permitiu avaliar quais regiões dos cromatogramas influenciam na formação de um grupo das uvas maduras, separado das outras. Essas regiões estão destacadas no gráfico dos dados alinhados e após a seleção de variáveis, na Figura 2.30.

Figura 2.30 - Dados obtidos em 275 nm alinhados, autoescalados e centrados na média após seleção de variáveis. As variáveis desconsideradas na PCA estão marcadas em cinza, e as variáveis que contribuem para a separação das uvas maduras em amarelo.

As regiões dos cromatogramas marcadas em cinza correspondem às variáveis desconsideradas na PCA após análise do gráfico de *loadings*, sendo estas as variáveis que se apresentavam muito próximas de zero no gráfico de *loadings*. As regiões marcadas em amarelo correspondem às variáveis que contribuem de forma mais significativa para o

agrupamento das uvas maduras, estando presentes em maior quantidade nestas. Com exceção dos dois primeiros picos, que aumentam das uvas menos maduras para as mais maduras, as outras regiões assinaladas correspondem, em sua maioria, a picos inexistentes nas amostras menos maduras, ou seja, compostos que são metabolizados apenas nas uvas maduras.

A Figura 2.31 apresenta os resultados obtidos pela PCA no comprimento de onda de 320 nm.

Figura 2.31 - Gráfico de *scores* e *loadings* para PC1 x PC2 para uvas estudadas com relação ao estágio de maturação: ▼ verde, ■ *veraison*, ▲ amadurecimento e ● maduras. $\lambda = 320$ nm

Os dados originais para o comprimento de onda de 320 nm também foram autoescalados e submetidos a uma seleção de variáveis para eliminar aquelas que não contribuíam de maneira relevante para o conjunto de dados. Os resultados de PCA referentes ao comprimento de onda de máxima absorção dos ácidos hidroxicinâmicos permitiram dois agrupamentos, um entre as uvas maduras e em estágio de amadurecimento, separadas da uva verde e em estágio de *veraison* pela PC2, sendo o segundo grupo apresentado no quadrante superior esquerdo do gráfico. Esta classe de composto permitiu o agrupamento das uvas Cabernet Sauvignon de Bento Gonçalves com as outras variedades maduras, o que não ocorreu em 275 nm.

A observação conjunta dos gráficos de *loadings* e *scores* permitiu avaliar quais regiões dos cromatogramas influenciam nos resultados obtidos. Essas regiões estão destacadas no gráfico dos dados alinhados e após a seleção de variáveis, na Figura 2.32.

Figura 2.32 - Dados obtidos em 320 nm alinhados, autoescalados e centrados na média após seleção de variáveis. As variáveis desconsideradas na PCA estão marcadas em cinza, e as variáveis que contribuem para a separação das uvas maduras em amarelo.

As regiões dos cromatogramas marcadas em cinza correspondem às variáveis desconsideradas na PCA após análise do gráfico de *loadings*, sendo estas as variáveis que se apresentavam muito próximas de zero. As regiões marcadas em amarelo correspondem às variáveis que contribuem para o agrupamento das uvas maduras, estando presentes em maior quantidade nestas. Os resultados obtidos foram semelhantes aos de 275 nm, ou seja, as regiões assinaladas em amarelo correspondem, em sua maioria, a picos inexistentes nas

amostras menos maduras, ou seja, compostos que são metabolizados apenas nas uvas maduras, ou compostos que aumentam em concentração com a maturação.

Os dados para 360 nm foram avaliados com relação ao estágio de maturação e à origem das uvas, uma vez que apresentaram resultados significativos para essas duas variáveis quando não submetidos à seleção de variáveis. Após seleção de variáveis uma tendência foi observada, no entanto os resultados se apresentaram mais significativos com a utilização do conjunto de dados completo. A Figura 2.33 apresenta os resultados obtidos pela PCA de acordo o grau de maturação das uvas.

Figura 2.33 - Gráfico de *scores* e *loadings* para PC1 x PC2 para uvas estudadas com relação ao estágio de maturação: ▼ verde, ■ *veraison*, ▲ amadurecimento e ● maduras. $\lambda = 360$ nm.

Os resultados de PCA para o comprimento de onda de 360 nm, referente ao máximo de absorção dos flavanóis, permitiu o agrupamento entre as uvas em estágio de *veraison* e a uva verde no quadrante inferior esquerdo do gráfico, enquanto que as uvas em estágio de amadurecimento e maduras se distribuem pelos outros três quadrantes.

A observação conjunta dos gráficos de *loadings* e *scores* permitiu avaliar quais regiões dos cromatogramas influenciam na formação dos dois agrupamentos, sendo estas regiões destacadas no gráfico dos cromatogramas alinhados, na Figura 2.34.

Figura 2.34 - Dados obtidos em 360 nm alinhados, autoescalados e centrados na média. As variáveis que contribuem para a separação das uvas *com relação ao estágio de maturação* estão em amarelo.

As regiões marcadas em amarelo correspondem às variáveis que contribuem para o agrupamento das uvas maduras e em estágio de amadurecimento. Os picos que contribuem de forma mais significativa para este perfil apresentam os tempos de retenção de 11,4 min, 24,2 min e 27,6 min. O primeiro composto está presente em maior quantidade nas uvas verdes, e sua concentração diminui com a maturação, enquanto os outros dois compostos aumentam em concentração com a maturação, estando presentes nas amostras maduras em quantidade muito superior à das outras amostras.

Os resultados de PCA em 360 nm com relação à origem das uvas são apresentados na Figura 2.35.

Figura 2.35 - Gráfico de *scores* para PC1 x PC2 para uvas estudadas com relação à origem: ■ Casa Nova, ▼ Água Vermelha, ▲ Bento Gonçalves e ● Louveira. $\lambda = 360$ nm.

Com relação à origem geográfica das uvas estudadas pode-se observar uma tendência de agrupamento entre as uvas provenientes de Água Vermelha nos quadrantes inferiores, separadas das outras pela PC2. É difícil dizer que entre as outras uvas existe um agrupamento relativo à Casa Nova no quadrante superior direito, uma vez que a amostragem foi muito pequena, apenas 2 amostras referentes a dois anos de estudo, o mesmo que para as outras duas regiões.

A observação conjunta dos gráficos de *loadings*, apresentado na Figura 2.33, e *scores* permitiu avaliar quais regiões dos cromatogramas influenciam no perfil obtido, sendo estas regiões destacadas no gráfico dos cromatogramas alinhados, na Figura 2.36.

Figura 2.36 - Dados obtidos em 360 nm alinhados e centrados na média. As variáveis que contribuem para a separação das uvas *com relação à origem* estão em amarelo.

O pico que contribui de forma mais significativa para o agrupamento das uvas de Água Vermelha elui em 11,4 min, sendo que se encontra em quantidades detectáveis apenas nestas uvas. Este resultado torna importante a identificação deste composto, que pode ser considerado um marcador de origem.

Estes compostos não podem ser considerados marcadores de variedades, uma vez que nenhum comprimento de onda analisado, o que cobre todas as classes de polifenóis não antociânicos, permitiu agrupamento entre variedades. Um estudo mais aprofundado pela técnica de LC-MS/MS possibilitará a identificação dos compostos responsáveis pelos agrupamentos entre estádios de maturação e, principalmente, entre as diferentes origens.

5. CONCLUSÕES

Ácidos orgânicos, açúcares e polifenóis, entre eles antocianinas, são importantes classes de metabólitos relacionados com o desenvolvimento de uvas. Neste capítulo foram apresentadas análises relativas às alterações ocorridas nestas classes de metabólitos durante a maturação de uvas e comparações entre diferentes variedades, entre elas uma híbrida, pela ferramenta de análise multivariada PCA, o que permitiu avaliar se estes compostos podem ser considerados marcadores de variedade, origem ou grau de maturação.

Um método por HPLC-DAD para determinação de ácidos orgânicos foi validado com relação à linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação, apresentando excelentes resultados. Os ácidos orgânicos majoritários encontrados nas uvas foram tartárico e málico, sendo que para todas as variedades suas concentrações diminuíram com o amadurecimento devido principalmente ao efeito de diluição pelo aumento do volume das bagas, respiração oxidativa e à contribuição de cátions, que atuam neutralizando os ácidos. As condições climáticas também são de grande importância para o acúmulo e degradação destes ácidos, em especial o ácido málico, e flutuações nos valores encontrados nos três anos estudados podem ser devido a variações destas condições.

Um método de CE-DAD permitiu a quantificação dos principais açúcares encontrados nas uvas, glicose e frutose, com a maturação. O método foi avaliado com relação à linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade intra-dia e entre dias, sendo que os valores de desvio padrão relativo para as amostras apresentaram-se um pouco elevados, em especial para a frutose, o que se deve, segundo os autores que desenvolveram o método, à degradação dos açúcares no meio extremamente alcalino utilizado. As relações glicose/frutose variaram de 6,5 a 0,6, dependendo do estágio de maturação e da variedade das uvas, no entanto foi constatado um aumento da concentração de ambos os açúcares com a maturação, sendo que no início do crescimento das bagas, a glicose acumulou em quantidade bastante superior à frutose. Uma análise conjunta dos açúcares e ácidos orgânicos por PCA identificou agrupamentos relativos ao grau de maturação das uvas, sendo que uvas verdes apresentam maiores concentrações de ácidos orgânicos e relação glicose/frutose, enquanto as uvas maduras apresentam maiores concentrações de açúcares.

Vinte antocianinas foram identificadas por LC-MS/MS, sendo 14 delas presentes nas variedades viníferas e 18 na variedade híbrida. Com a maturação das uvas observou-se um

aumento na concentração de antocianinas, o que está diretamente relacionado ao aumento da concentração de açúcares, uma vez que estes são substratos para a síntese de antocianinas. Os dados sugerem que o perfil de uma variedade cultivada em determinada região muda levemente de ano para ano, provavelmente como consequência da modulação da biossíntese desses compostos devido às condições climáticas durante o amadurecimento. Os derivados de Mv foram os mais abundantes nas uvas estudadas, e aumentaram com a maturação, sendo que a malvidina 3-glicosídeo foi a principal antocianina encontrada em todos os estádios de maturação. Consistentemente com trabalhos anteriores, os derivados de Cy e Dp diminuíram, o que se deve ao fato de serem consideradas pigmentos primários nas rotas biossintéticas que levam a formação de diferentes antocianinas nas uvas, que tem como produto final Mv.

Resultados de PCA com relação à maturação das uvas mostraram a formação de dois grupos, um representado por uvas em estágio de amadurecimento e maduras, e outro por uvas na fase de *veraison*, quando se inicia a biossíntese de antocianinas, sendo que cianidina 3-glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo, petunidina 3-acetilglucosídeo, delphinidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo, malvidina 3-acetilglicosídeo, petunidina 3-(*p*-coumaril)glicosídeo, malvidina 3-(*p*-coumaril)glucosídeo foram atribuídas como as principais responsáveis por este perfil.

As uvas Máximo se caracterizaram pela presença de 3,5-diglicosídeos de delphinidina, petunidina e malvidina, compostos marcadores de espécies não viníferas ou híbridas. Análises de PCA mostraram um claro agrupamento entre as uvas viníferas separado da uva híbrida, além de uma tendência de formação de grupos entre as variedades viníferas Syrah e Cabernet Sauvignon, o que indica que diferenças entre amostras considerando a composição de antocianinas são devido à variabilidade varietal, e que esta pode ser uma maneira de diferenciar entre uvas viníferas e não-viníferas.

O *fingerprint* de compostos fenólicos não antociânicos foi estudado em três comprimentos de onda, referentes ao máximo de absorção de cada classe de compostos. Resultados de PCA indicaram que, independente da variedade, observam-se apenas tendências de agrupamentos por estágio de maturação. Em 360 nm foi possível identificar um agrupamento relativo às uvas provenientes de Água Vermelha, separadas das outras uvas, sendo que um composto foi o principal responsável por este perfil. Como as outras variáveis estudadas, a composição de polifenóis das uvas depende de fatores como clima, grau de maturação e variedade.

Considerando as classes de compostos estudados observou-se que o aumento da concentração de açúcares com a maturação é acompanhado por um aumento na quantidade de antocianinas, uma vez que os açúcares são substratos na síntese de antocianinas, e uma diminuição na concentração de ácidos orgânicos tartárico e málico, respectivamente em maior e menor proporção.

CAPÍTULO 3

Análise Proteômica

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteômica

O conceito de proteoma foi proposto por Wilkins e colaboradores, em 1995, como sendo o conjunto de PROTEÍNAS expressas por um genOMA.¹⁹⁰ Em um sentido mais amplo, proteoma pode ser definido como o conjunto de proteínas presentes em um sistema biológico, sendo ele uma célula, tecido, órgão ou indivíduo, em um determinado estágio de desenvolvimento e sob determinada condição ambiental.¹⁹¹ O proteoma é dinâmico, visto que varia de acordo com estímulos internos e externos recebidos pelo organismo, enquanto que o genoma é estático, pois todas as células de um organismo apresentam o mesmo código genético.¹⁹⁰

A análise proteômica, definida como o conjunto de metodologias analíticas empregadas para caracterizar um proteoma, trata de uma área interdisciplinar da ciência, a qual agrega principalmente química, biologia e informática, e se tornou mais do que apenas um apêndice da genômica, mas uma disciplina complexa que estuda todo o conjunto de proteínas de uma célula ou organismo.^{191,192}

A análise proteômica pode ser dividida em várias áreas, dentre as quais: i) proteômica descritiva, que inclui a identificação em grande escala de cada uma das proteínas de um proteoma; ii) proteômica de expressão diferencial ou comparativa, que faz uma análise comparativa dos perfis proteicos entre órgãos, tecidos, diferentes estágios de desenvolvimento ou condições ambientais, seguida pela identificação das proteínas com alterações quali e/ou quantitativas; iii) proteômica aplicada ao estudo de modificações pós-traducionais, iv) estudos de interação proteína-proteína, ou interactômica e v) proteinômica, quando se pretende caracterizar uma proteína ou um grupo de proteínas.^{191,192}

O desenvolvimento das tecnologias relacionadas à análise proteômica possibilitou a identificação de inúmeras proteínas até então desconhecidas e a construção de grandes bancos de dados para a pesquisa. Essa ampliação e melhora na separação e identificação de proteínas em amostras biológicas complexas tornaram a análise proteômica uma ferramenta muito promissora, no entanto elucidar proteomas inteiros ainda é uma tarefa praticamente impossível.

A etapa mais importante em análise proteômica, assim como em praticamente todas as análises, é o preparo da amostra. O método de extração, precipitação e solubilização das

proteínas deve ser estabelecido para cada tipo de amostra, sendo alguns passos comuns para qualquer amostra: as proteínas devem ser parcialmente purificadas, completamente solubilizadas para quebrar interações macromoleculares, prevenir modificações e mantê-las em solução, desagregadas, desnaturadas e reduzidas.¹⁹³ Para uma análise mais completa possível das proteínas intracelulares, a célula deve ser efetivamente rompida e a escolha do método de ruptura celular depende do tipo de amostra. Para a extração utilizam-se métodos de precipitação com reagentes orgânicos que permitem concentrar o extrato proteico, além de separar as proteínas dos compostos interferentes.

Para avaliar mudanças no proteoma entre duas ou mais amostras, denominado proteoma comparativo, é importante a aplicação de quantidades exatamente iguais de proteínas para cada amostra. Os métodos de quantificação de proteínas mais conhecidos e amplamente utilizados são os métodos colorimétricos de Lowry,¹⁹⁴ de Bradford¹⁹⁵ e com ácido bicínico (BCA).¹⁹⁶ Estes métodos apresentam estimativas precisas quando a amostra é dissolvida em água, no entanto, a presença de alguns reagentes químicos na amostra ou na solução de solubilização da amostra podem interferir na exatidão dos resultados. Por exemplo, detergentes, flavonóides ou soluções básicas são conhecidamente interferentes para quantificação pelo método de Bradford,^{197,198} pois interagem com o corante Coomassie Blue, introduzindo um *background* de leitura na medida. Nestes casos adaptações das metodologias devem ser feitas para cada amostra avaliada, de forma a encontrar um fator de correção que permita a aplicação de quantidades proporcionais nos géis.

1.2 Técnicas utilizadas e tratamento dos dados em análise proteômica

A análise de proteínas em amostras biológicas é um tópico desafiador da proteômica devido à complexidade dessas matrizes, pois além do proteoma não ser estático, as proteínas se apresentam em grande variedade e diferentes quantidades.¹⁹⁹ Diante de tal complexidade, é necessário utilizar métodos de separação analítica robustos e que propiciem alta resolução para esses tipos de amostras. A aplicação de técnicas modernas tem contribuído consideravelmente para elucidar a estrutura de proteínas, sendo as mais utilizadas cromatografia líquida (HPLC), eletroforese unidimensional (1-DE ou SDS-PAGE) e bidimensional (2-DE), associadas à espectrometria de massas (MS). Nos últimos anos uma nova fase se iniciou na análise proteômica, na qual a pesquisa se direcionou ao uso de novas plataformas, as denominadas “técnicas proteômicas quantitativas de segunda geração”, como

2-DIGE, iTRAQ, SILAC e *gel-free*. No entanto a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) permanece a mais amplamente utilizada na análise de plantas.¹⁹²

1.2.1 Eletroforese em gel unidimensional (1-DE)

A 1-DE é uma técnica simples e adequada para analisar extratos brutos de proteínas, fornecendo informações relevantes e válidas quando se avalia um método de extração. No caso de proteômica comparativa, quando há um grande número de amostras para ser comparado, se utilizada em conjunto com técnicas estatísticas adequadas ela pode revelar resultados interessantes, além de resultados preliminares ao estudo por 2-DE.¹⁹¹

A combinação desta técnica com a excisão de bandas dos géis, digestão trípica e análise dos peptídeos gerados por LC-MS é capaz de fornecer a identificação de um grande número de proteínas.^{191,200}

1.2.2 Eletroforese em gel bidimensional (2-DE)

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE) é uma técnica de separação largamente utilizada para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Teoricamente, é capaz de resolver até 10.000 proteínas simultaneamente, no entanto ainda existem limitações que devem ser consideradas no momento do desenho experimental do projeto a ser executado.

Esta técnica promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes: na primeira dimensão, focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI), ou seja, o pH no qual a carga global da proteína é nula; na segunda dimensão, eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares relativas.²⁰¹ A Figura 3.1 apresenta um esquema do procedimento realizado em 2-DE.

Figura 3.1 - Esquema do procedimento realizado em eletroforese bidimensional (2-DE).

Fonte: Adaptado de CANTÚ, M. D. **Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citros**. 2007. 229 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.²⁰²

As proteínas são macromoléculas de natureza anfótera, ou seja, apresentam características ácidas ou básicas dependendo do pH ao qual estão expostas. Portanto, em diferentes pHs elas apresentam estados de ionização distintos, adquirindo uma carga global que pode ser positiva, negativa ou neutra. A IEF das proteínas ocorre em um gradiente de pH e sob a aplicação de uma diferença de potencial, a partir da qual as proteínas migram até encontrarem o pH correspondente ao seu ponto isoeletrico, onde a carga é neutralizada. Atualmente o gradiente de pH é produzido pela técnica de gradiente de pH imobilizado (IPG) em fitas, nas quais ocorre copolimerização de derivados de acrilamida, cuja combinação em concentrações adequadas define o intervalo e a forma do gradiente de pH produzido.²⁰³ Desta forma, a IEF pode ser realizada em fitas de diversos comprimentos e com diferentes faixas de pH, o que permite otimizar a separação para cada tipo de amostra.

A segunda dimensão é realizada com as proteínas completamente desnaturadas e na forma linear, em géis de poliacrilamida. Estes géis são formados por ligações cruzadas entre a

acrilamida e a N'-N-metilenobisacrilamida, o que faz com que a estrutura do gel seja porosa, com os poros distribuídos ao longo de toda a matriz. O tamanho médio dos poros é determinado pelas porcentagens de acrilamida e bisacrilamida utilizadas, sendo que quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros formados na matriz. A escolha da concentração do gel é um parâmetro de extrema importância para que uma boa separação seja obtida, e depende da faixa de massa molecular de interesse.

Antes do início da eletroforese a proteína desnaturada tem a sua carga intrínseca anulada para que a separação dependa apenas de sua massa molecular, o que é feito pela adição de dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS é um agente tensoativo aniônico que apresenta uma cabeça polar carregada negativamente e uma cauda hidrofóbica. O SDS desnatura as proteínas através da formação de um complexo micela-proteína (na razão 1,4 g SDS/1 g de proteína), que apresenta uma carga global negativa e constante por unidade de massa, fazendo com que a separação eletroforética no gel de poliacrilamida dependa basicamente da massa molecular da proteína.²⁰¹ Após o balanço de cargas, a fita contendo as proteínas focalizadas é aplicada no topo do gel de poliacrilamida e uma diferença de potencial é aplicada entre as extremidades do gel fazendo com que as proteínas migrem em direção ao pólo positivo e sejam separadas em relação a suas massas moleculares.

Depois de realizada a separação eletroforética bidimensional, a visualização dos resultados é feita por meio da coloração do gel. Os métodos mais comumente empregados são as colorações com corantes orgânicos e prata.²⁰⁴ Os corantes orgânicos apresentam o método mais simples de coloração de proteínas, porém a sensibilidade da detecção varia de coloração para coloração, bem como de proteína para proteína. A maior parte dos corantes orgânicos são eletrostaticamente atraídos pelos grupamentos carregados das proteínas, formando fortes complexos corante-proteína. O corante orgânico mais utilizado é o Coomassie Blue, que na forma coloidal apresenta uma maior sensibilidade.²⁰⁵ O método de coloração com prata consiste na redução dos íons Ag^+ a Ag^0 em regiões específicas do gel, ocupadas pelas proteínas. A intensidade da coloração, como com corantes orgânicos, está relacionada à quantidade de aminoácidos básicos presentes na cadeia polipeptídica.^{205,206} A sensibilidade da coloração com prata é muito maior do que com Coomassie, no entanto apresenta problemas com a repetibilidade.

O maior alvo de críticas com relação a 2DE é a baixa reprodutibilidade e, em algumas ocasiões, também baixa repetibilidade, o que é de extrema importância em análise quantitativa, já que a quantificação relativa se dá pela comparação das imagens geradas

associando os *spots* dos géis de diferentes amostras com os de um gel “padrão”. Para aumentar a confiabilidade da quantificação é essencial que os géis comparados tenham boa qualidade de separação que possa ser reproduzida para todas as amostras. A polimerização da acrilamida e a formação das malhas reticulares do gel é dependente da concentração de acrilamida e de bisacrilamida, do pH, da temperatura, do oxigênio dissolvido e do tempo de polimerização. Pequenas variações nesses parâmetros influenciam a formação dos retículos fazendo com que as propriedades de separação do gel sejam suavemente deslocadas, interferindo na separação das proteínas.²⁰⁷ Além disso, o preparo da amostra é uma etapa muito importante na reprodutibilidade dos experimentos em 2-DE. Para a obtenção de géis com qualidade é necessário promover a solubilização, a desnaturação e redução das proteínas, eliminar os interferentes e, concomitante a essas etapas, evitar a degradação da amostra.

A variação entre géis pode ser minimizada na técnica de DIGE, que permite a comparação de proteínas de duas amostras em um único gel. Nesta técnica, as proteínas de duas amostras são marcadas separadamente com corantes fluorescentes, Cy3 ou Cy5, com diferentes comprimentos de onda de emissão e excitação, mas com massas relativas idênticas. Um padrão interno contendo quantidades iguais das duas amostras é marcado com Cy2 para normalização dos dados. As amostras marcadas são misturadas, sujeitas à eletroforese bidimensional no mesmo gel, e digitalizadas com diferentes *lasers* para detectar as proteínas em cada gel. As imagens são sobrepostas e normalizadas, sendo que somente as diferenças entre as amostras são observadas.²⁰⁸ Esta técnica permite a comparação diferencial da expressão de proteínas de amostras complexas em único gel, e resultados quantitativos com maior exatidão.

1.2.3 Espectrometria de massas (MS)

A MS é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa, sendo um espectrômetro de massas constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de ionização as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massas os íons formados são separados de acordo com suas relações massa/carga (m/z) e posteriormente detectados. A Figura 3.2 apresenta um diagrama de blocos dos componentes de um espectrômetro de massas.

Figura 3.2 – Diagrama de blocos ilustrando os componentes de um espectrômetro de massas.

Fonte: Adaptado de SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. São Paulo: Bookman, 2002. 836 p.⁹²

Desde seu surgimento, na década de 80, a espectrometria de massas (MS) tem sido utilizada para a análise de compostos orgânicos de baixa massa molecular, substâncias voláteis e termicamente estáveis. O desenvolvimento das técnicas de ionização a pressão atmosférica foi um grande avanço que permitiu o acoplamento com HPLC e aumentou o número de compostos analisáveis por esta técnica. Na última década tornou-se uma técnica analítica valiosa para análises biológicas, fornecendo de maneira rápida, precisa e sensível informações inerentes a massa molecular de biomoléculas como proteínas, peptídeos, açúcares, ácidos nucleicos, lipídeos entre outros.²⁰⁹

Avanços que levaram esta técnica a ser amplamente utilizada para amostras biológicas incluem o surgimento de técnicas brandas de ionização compatíveis com biomoléculas, ESI (*Electrospray ionization*)²¹⁰ e MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*),²¹¹ e o desenvolvimento de analisadores de massas em sequência (MS/MS), o que aumentou o poder de resolução e melhorou os limites de detecção da técnica, além de permitir a determinação de características estruturais detalhadas de cada peptídeo em uma amostra pela análise dos espectros de fragmentação.

Em ESI o processo de ionização ocorre à pressão e temperatura atmosférica. Uma solução levemente básica ou ácida contendo a amostra é bombeada através de um tubo capilar metálico submetido a uma diferença de potencial e forma-se um aerossol (*spray*) com gotículas carregadas que ao passar por um gás secante causa a evaporação do solvente. As gotículas carregadas tornam-se cada vez menores de modo que a densidade de carga torna-se tão alta que as moléculas carregadas são “ejetadas” para a fase gasosa, seguindo para o analisador de massas.²¹² Uma representação do processo de ionização por *electrospray* é apresentado na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Representação do processo de ionização por *electrospray*.

Na ionização tipo MALDI, a solução contendo a amostra é misturada a uma solução saturada de uma matriz orgânica, e a solução resultante dessa mistura é aplicada em uma placa metálica, que é transferida para dentro do espectrômetro de massas. Os cristais formados após a evaporação do solvente são bombardeados por um feixe de laser de alta potência com comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção da matriz. Esta energia é absorvida em grande parte pela matriz e transferida de maneira branda para a amostra, resultando em íons na fase gasosa que seguirão para o analisador de massas.²¹³ Uma representação do processo é apresentada na Figura 3.4.

Figura 3.4 - Representação do processo de ionização por MALDI.

A parte fundamental de um espectrômetro de massas é o analisador de íons, pois é onde os íons são separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). Os analisadores de massas mais empregados em análise proteômica são *ion trap* (IT), quadrupolo (Q), tempo de voo (TOF), e mais recentemente ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR) e *orbitrap* (OT).

A MS permite não somente avaliar o perfil proteômico de um organismo de forma qualitativa e quantitativa, como também identificar proteínas e caracterizar modificações pós-traducionais. As proteínas podem ser identificadas por duas abordagens: *Top-Down*, que analisa os espectros das proteínas intactas ou *Bottom-Up*, que analisa os fragmentos de peptídeos obtidos após digestão enzimática ou tratamento químico, seguida de comparação dos espectros experimentais com espectros teóricos obtidos de sequências de proteínas, genomas ou sequências ESTs (*expressed sequence tags*), e bancos de dados de MS.^{214,215} A segunda abordagem é a mais comumente empregada uma vez que espectrômetros relativamente simples de baixo custo são capazes de fornecer resultados satisfatórios para a análise de peptídeos, no entanto a estratégia *Top-Down* permite uma caracterização mais completa do proteoma, incluindo isoformas e modificações pós-traducionais.¹⁹² As duas abordagens podem ser utilizadas juntas, uma vez que os resultados obtidos por uma podem complementar os da outra. Diversas estratégias e algoritmos podem ser usados para identificar as proteínas, entre eles *peptide mass fingerprint* (PMF), espectrometria de massas sequencial (MS/MS) e sequenciamento *de novo*. PMF é válido apenas quando a sequência da proteína está presente no banco de dados de interesse, e geralmente é usado se o genoma do organismo está completamente sequenciado. Em MS/MS as sequências de peptídeos são identificadas por correlação dos espectros dos íons fragmento adquiridos e espectros teóricos previstos para

cada peptídeo presente em um banco de dados de sequência de uma proteína. No sequenciamento *de novo* os espectros de massas dos íons fragmento são interpretados manualmente para inferir a sequência de aminoácidos do peptídeo.^{191,216}

As plataformas MALDI-TOF e ESI-MS/MS são as mais amplamente utilizadas em análise proteômica. MALDI-TOF PMF mede as massas dos peptídeos derivados da digestão trípica de proteínas, gerando uma lista de massas de peptídeos que com a ajuda de algoritmos são comparados com os fragmentos trípticos previstos teoricamente para cada proteína em um banco de dados de sequência. A outra plataforma, ESI-QTOF ou ESI-IT envolve a seleção de um peptídeo precursor de uma m/z específica em determinado tempo, fragmentação do peptídeo e detecção dos íons fragmento que constituem um espectro MS/MS. Os dados podem ser interpretados por sequenciamento *de novo*, ou podem ser usados para pesquisa em bancos de dados. Quando integrado com HPLC para separação de peptídeos esta plataforma pode ser automatizada e tem sido amplamente usada em proteômica de plantas. No entanto, MALDI-TOF PMF é o método preferido por se relativamente barato, rápido e eficiente.²¹⁶

1.2.4 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS)

A união entre as técnicas de cromatografia líquida (HPLC) e espectrometria de massas (MS), possibilitada pelo uso de uma interface adequada, permite a separação, ionização e análise das amostras de interesse *on-line*. Esse arranjo é bastante útil para a análise de peptídeos e tem sido largamente empregado em estudos proteômicos. Assim, uma vez separadas/fracionadas, as proteínas de interesse são submetidas à proteólise com enzimas específicas e os peptídeos obtidos são analisados, geralmente por LC-ESI-MS/MS.²¹⁷

Um avanço recente em relação a esse acoplamento trata-se do uso de colunas capilares de sílica fundida (diâmetro interno da ordem de 50 – 100 μm) preenchidas com diferentes materiais para a separação de peptídeos, sendo empregadas vazões de fase móvel da ordem de 100–500 nL min^{-1} .²¹² Esta técnica de nano HPLC-MS tem se tornado popular para proteômica de plantas, e apresenta excelente resolução no pré-fracionamento de digeridos complexos de proteínas, denominada proteômica *shotgun*.

1.2.5 Análise dos dados

A interpretação dos dados é fundamental para o sucesso da análise dos peptídeos e proteínas da amostra. Existem vários algoritmos na internet que permitem a interpretação de dados *on-line*, entre eles Mascot, Sequest, dbEST, NCBIInr e Swiss-Prot. Estes programas correlacionam espectros de massas de fragmentação (não interpretados) de peptídeos com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados.

As análises proteômicas geram uma grande quantidade de dados, pois um único experimento revela informações de expressão de centenas ou talvez milhares de proteínas. Desta forma, a análise dos dados por meio de bioinformática é uma ferramenta essencial neste tipo de pesquisa. Os *softwares* de 2-DE permitem comparações em análises com múltiplos géis, gerando informações sobre o número e a quantidade relativa das proteínas presentes em cada *spot*, além de executar análises estatísticas.

As análises estatísticas podem ser classificadas em univariadas ou multivariadas.²¹⁸ Os métodos univariados, como teste *t*-Student ou ANOVA, são utilizados para detectar alterações no padrão de expressão de proteínas individuais, enquanto que os métodos multivariados, como Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), utilizam todos os dados de um experimento simultaneamente, permitindo avaliar mudanças de expressão em todo o conjunto de proteínas. O objetivo da PCA é reduzir o número de variáveis de forma que elas possam ser correlacionadas e interpretadas em duas dimensões, denominadas componentes principais (PCs). Na HCA o objetivo é investigar as relações existentes dentro de um conjunto multivariado. É uma técnica que examina as distâncias interpontuais entre todas as amostras do conjunto de dados e representa essa informação na forma de um gráfico bidimensional chamado dendrograma, por meio do qual se pode visualizar os agrupamentos e similaridades entre as amostras e/ou variáveis. A construção dos dendrogramas é feita com base na proximidade entre as amostras no espaço, o que é feito calculando-se a distância entre todas as amostras do conjunto, em pares, e então definindo uma matriz de similaridade cujos elementos são denominados índices de similaridade que variam entre zero e um. Um índice alto indica uma distância pequena entre dois agrupamentos e, portanto, uma alta similaridade.⁵⁵

1.3 Proteoma de plantas

Avanços na genômica de plantas, como o sequenciamento completo do genoma da uva,²¹⁹ soja²²⁰ e milho²²¹ contribuíram na pesquisa proteômica, aumentando a confiança na identificação e caracterização de proteínas. No entanto, a análise do proteoma de plantas encontra-se em um estágio inicial de desenvolvimento e está longe de ser amplamente explorada, especialmente se comparado com outros organismos como leveduras e seres humanos,^{192,222} sendo principalmente utilizada em situações nas quais se deseja correlacionar os níveis de proteínas expressas em condições de *stress* ou estudar a interação entre planta e patógeno. Estudos iniciais em proteoma de plantas visavam criar mapas de proteínas solúveis em um determinado estágio de desenvolvimento dos órgãos da planta, no entanto, nos últimos anos vários estudos relatam as mudanças de proteínas associadas com o crescimento e desenvolvimento da planta, com o objetivo de identificar proteínas chave destes eventos.²²³⁻²²⁶

O perfil de proteínas de frutas como ameixa, pêssago e nectarina foi utilizado na tentativa de desenvolver um índice para identificar o ponto de colheita, independente de fatores ambientais, por 2-DE. Quatro proteínas foram identificadas por sua alteração em expressão e correlação com o processo de maturação, sendo que três delas pertencem a uma família de proteínas alergênicas comum em plantas, cuja função é proteger a planta durante períodos de *stress*.²²⁷ Sghaier-Hammami *et al.* (2009) utilizaram uma abordagem proteômica comparativa por 2-DE e MS/MS para avaliar o desenvolvimento, maturação e germinação de embriões de palmeiras da espécie *Phoenix dactylifera* L. Alterações notáveis foram encontradas, sendo que 194 *spots* mostraram diferenças qualitativas ou quantitativas entre os estádios de desenvolvimento.²²⁸

Algumas contribuições práticas do proteoma de plantas incluem o campo da biomedicina, com a identificação de alérgenos,^{229,230} da agronomia, por meio de estudos de equivalência de cultivares transgênicos,²³¹ e o campo da ciência dos alimentos, com a finalidade de avaliar o controle de qualidade de alimentos.²³²

As plantas são consideradas materiais recalcitrantes devido à presença de parede celular resistente, o que dificulta a extração das proteínas, além da presença de um grande número de interferentes, como proteases, compostos fenólicos, açúcares, uma ampla faixa de metabólitos secundários e ácidos orgânicos. Vários métodos são propostos para a ruptura da parede celular, entre eles a sonicação,²³³ ruptura mecânica mediante a agitação do tecido com pequenas esferas de vidro²³⁴ e moagem criogênica.²³⁵

Os métodos mais utilizados para a extração de proteínas de plantas são com TCA/acetona ou fenol/acetato de amônio em metanol. Apesar de ser eficiente para alguns tecidos de plantas, o método TCA/acetona pode resultar na co-extração de contaminantes poliméricos, principalmente quando se trata de tecidos maduros e com altos níveis de polissacarídeos e polifenóis.²³⁶ O segundo método consiste na solubilização das proteínas em fenol, com ou sem SDS, e precipitação com acetato de amônio em metanol, o que gera extratos proteicos de alta qualidade, mesmo com altas concentrações de polifenóis.²³⁷ Carpentier *et al.* (2005) avaliaram os dois protocolos de extração de proteínas em amostras de bananas, concluindo que existe uma diferença significativa entre o perfil de proteínas extraídas com os diferentes métodos. Relataram que o principal problema com o extrato de TCA/acetona é a ressolubilização das proteínas, em particular as de alta massa molecular, enquanto que os géis de eletroforese feitos com os extratos de fenol apresentam maior qualidade, devido à eliminação dos interferentes.²³⁸ Wang *et al.* (2006) desenvolveram um protocolo para precipitação de proteínas de tecidos recalcitrantes de plantas combinando as características de extração de TCA/acetona e fenol. O método foi aplicado a uma variedade de folhas e frutas e demonstrou ser uma alternativa rápida e eficiente para estes tipos de amostras.²³⁹

1.3.1 Proteínas das uvas

As uvas contêm naturalmente uma ampla faixa de diferentes proteínas, mas não em grande quantidade como outras frutas. Nas uvas maduras o conteúdo de proteínas é de apenas 0,05% em peso fresco de polpa, enquanto o de açúcares é maior que 26%,²⁴⁰ além da grande quantidade de compostos fenólicos. O perfil de proteínas solúveis encontrado em sucos de uvas maduras aparece surpreendentemente simples, com predominância de algumas proteínas de baixa massa molecular.²⁴¹ As dificuldades na extração de proteínas de uvas em diferentes estádios de desenvolvimento da baga devem ser reconhecidas como uma possível contribuição para esse panorama simples, o que se dá devido à baixa concentração de proteínas e forte interação com polifenóis e outros compostos não-protéicos.²⁴²

Alguns estudos indicam que existe um aumento significativo no conteúdo total de proteínas depois do *veraison*, e análises por eletroforese indicam que um pequeno número de proteínas são sintetizadas em quantidade significante durante o amadurecimento.²⁴³ Algumas dessas proteínas têm sido recentemente identificadas, e as mais abundantes são proteínas relacionadas a patogêneses (PR), incluindo PR-5 (taumatinas), PR-2 (β -1,-3-glucanases) e

PR-4, (endoquitinases), -8, -3 e -11 (quitinases), que atacam, respectivamente, β -1,3-glucanas e quitina, componentes da parede celular da maioria dos fungos.²⁴⁴ Estas proteínas são acumuladas nas uvas durante o amadurecimento, sendo sintetizadas em frutos saudáveis como parte do processo normal de maturação. Os níveis dessas proteínas são tipicamente baixos em plantas sadias, mas são induzidos em resposta a fermentos ou ao ataque de patógenos.²⁴²

As quitinases constituem até 50% das proteínas solúveis em uvas,²⁴⁵ e danos mecânicos aos tecidos da planta, ocasionados por fungos ou insetos, provocam a liberação de uma variedade de hormônios vegetais, como etileno, que juntamente com o ácido salicílico estimulam a produção destas proteínas.^{246,247} Durante o amadurecimento as uvas produzem níveis relativamente elevados de quitinase, provavelmente como uma forma de proteção contra o aumento da suscetibilidade ao ataque de fungos devido ao aumento da concentração de açúcares e ao amolecimento da casca do fruto.²⁴⁸ As quitinases parecem ter um papel direto na defesa do vegetal ao hidrolisar os polímeros de quitina, o principal componente da parede celular da maioria dos fungos.²⁴⁹ As β -1,3-glucanases são conhecidas por possuírem efeitos cooperativos com as quitinases, sendo sua síntese nas plantas induzidas por ataque de patógenos.²⁵⁰ Estas enzimas desempenham vários papéis na divisão celular, germinação de sementes, formação de flores e maturação de frutos.²⁵¹

Outra classe de proteínas amplamente distribuída nas plantas é polifenol oxidase (PPO), no entanto muito ainda é desconhecido com relação às suas funções biológicas.²⁵² PPO é uma enzima contendo cobre que está envolvida nas reações de escurecimento enzimático, a oxidação de compostos fenólicos à suas quinonas, que polimerizam para formar pigmentos indesejáveis, diminuindo a qualidade do alimento por alterações nutricionais e organolépticas.²⁵³ A atividade destas enzimas é particularmente alta nas frutas e vegetais que contêm altos níveis de polifenóis.

Análise do perfil de proteínas durante a maturação de uvas já foram relatadas na literatura para diferentes variedades. Giribaldi *et al.* (2007) relatam o primeiro estudo de alterações a níveis de proteínas totais em uvas da variedade Nebbiolo Lampia. Um total de 730 *spots* foram detectados nos géis 2-DE, sendo 118 diferencialmente expressos e 101 proteínas identificadas.²⁵⁴ Outro estudo relata alterações de proteínas nas cascas de uvas durante a maturação. No ponto de colheita foram identificadas proteínas envolvidas na síntese de antocianinas, que apresentam aumento de expressão com a maturação, e proteínas envolvidas no mecanismo de defesa.²⁵⁵

O perfil de proteínas é um dos fatores utilizados para diferenciar variedades de uvas e consequentemente, de vinhos, pois é estabelecido geneticamente.²⁴¹ As proteínas não contribuem de forma significativa para o valor nutritivo dos vinhos, já que suas concentrações são baixas. No entanto, elas assumem uma importância tecnológica e econômica considerável porque afetam a clareza e estabilidade dos vinhos, sendo a limpidez de vital importância para a qualidade do vinho, uma vez que é a propriedade que causa a primeira impressão ao consumidor.²⁴²

2 OBJETIVOS

- Caracterizar o proteoma das uvas por eletroforese bidimensional e identificar as proteínas diferencialmente expressas nas diferentes etapas de desenvolvimento das uvas, assim como nas variedades maduras de diferentes variedades e origens, por espectrometria de massas.
- Verificar se o perfil proteômico permite agrupar uvas por variedade, local e/ou estágio de maturação pela aplicação de técnicas de análise multivariada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Para análise proteômica foram estudadas as uvas colhidas durante o ano de 2010, provenientes do Sítio Jequitibá, em Água Vermelha, e do Sítio Santa Rita, em Louveira. Uvas da variedade Syrah foram avaliadas em quatro estádios de maturação: verde, *veraison*, amadurecimento e maturação completa, enquanto da variedade Cabernet Sauvignon nos últimos três estádios.

As bagas foram retiradas de diferentes partes dos cachos e de diferentes plantas, armazenadas em frascos de polietileno e estocadas a -80 °C.

3.2 Extração e quantificação de proteínas

Para o preparo das amostras as sementes foram retiradas e a polpa com as cascas trituradas em nitrogênio líquido usando-se almofariz e pistilo, e liofilizadas por 24 h. As amostras liofilizadas foram enviadas e analisadas no *Grupo de Bioquímica y Proteómica Vegetal y Agrícola* da Universidade de Córdoba, Espanha, sob a coordenação do Prof. Dr. Jesús V. Jorrín-Novo, onde um estágio foi realizado durante quatro meses.

Imediatamente antes da extração, o pó das amostras foi homogeneizado em almofariz e para avaliar o melhor protocolo de extração de proteínas um *pool* de todas as amostras nos diferentes estádios de maturação foi feito. Três extrações independentes utilizando-se 200 mg do *pool* de amostras foram submetidas a três protocolos de extração: TCA-acetona,²⁵⁶ TCA-acetona-fenol,²⁵⁷ e fenol.²⁵⁸ Algumas modificações foram feitas a partir dos protocolos originais, incluindo uma etapa de sonicação que foi adicionada aos três protocolos na etapa inicial. Os procedimentos utilizados para cada protocolo são apresentados abaixo.

TCA / Acetona

1. Transferir 200 mg do pó liofilizado para um tubo de 2 mL e adicionar 1 mL de uma solução 10% (w/v) TCA/Acetona com 0,07% (w/v) DTT. Misturar em vórtex.
2. Sonicar 3 vezes por 10 s a 4 °C, com intervalos de 1 min em gelo. Misturar em vórtex.
3. Completar o tubo com a solução de TCA/Acetona/DTT e homogeneizar.
4. Deixar a -20 °C *overnight* para precipitação das proteínas.
5. Centrifugar a 16000 ×g por 10 min, a 4 °C e descartar o sobrenadante.
6. Lavar o precipitado três vezes com acetona 100%.
7. Centrifugar a 16000 ×g por 10 min, a 4 °C e descartar o sobrenadante.
8. Deixar o *pellet* secar a temperatura ambiente para remover resíduos de acetona.
9. Solubilizar as proteínas em solução de solubilização¹ sob agitação por 4 h a 4 °C.
10. Estocar os extratos a -20 °C até análise.

¹uréia 9 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹, CHAPS 4% (w/v), Triton-X100 0,5% (v/v), DTT 20 mmol L⁻¹.

TCA/Acetona – Fenol/Metanol

1. Transferir 200 mg do pó liofilizado para um tubo de 2 mL e adicionar 1 mL de uma solução 10% (w/v) TCA/Acetona. Misturar em vórtex.
2. Sonicar 3 vezes por 10 s a 4 °C, com intervalos de 1 min em gelo. Misturar em vórtex.
3. Completar o tubo com a solução de TCA/Acetona e homogeneizar.
4. Centrifugar a 16000 ×g por 5 min, a 4 °C e descartar o sobrenadante.
5. Preencher o tubo com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol 80% e misturar em vórtex.
6. Centrifugar a 16000 ×g por 5 min, a 4 °C e descartar o sobrenadante.
7. Preencher o tubo com acetona 80% e misturar em vórtex.
8. Centrifugar a 16000 ×g por 5 min, a 4 °C e descartar o sobrenadante.
9. Deixar o *pellet* secar a temperatura ambiente para remover resíduos de acetona.
10. Preencher o tubo com fenol (equilibrado, pH 8)/ tampão SDS¹ (1 : 1), misturar em vórtex e incubar em gelo por 5 min.
11. Centrifugar a 16000 ×g por 5 min, a 4 °C e transferir a fase fenol (superior) para um novo tubo de 2 mL.
12. Preencher o tubo com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol 100%, misturar em vórtex e deixar a -20 °C *overnight* para precipitar.
13. Centrifugar a 16000 ×g por 5 min, a 4 °C e descartar o sobrenadante.
14. Lavar o pellet com metanol 100% e depois com acetona 80%.
15. Deixar o *pellet* secar a temperatura ambiente para remover resíduos de acetona.
16. Solubilizar as proteínas em solução de solubilização² sob agitação por 4 h a 4 °C.
17. Estocar os extratos a -20 °C até análise.

¹ sacarose 30%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0.

² uréia 9 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹, CHAPS 4% (w/v), Triton-X100 0,5% (v/v), DTT 20 mmol L⁻¹.

Fenol / Metanol

1. Transferir 200 mg do pó liofilizado para um tubo de 2 mL e adicionar 600 μ L de uma solução com sacarose¹. Misturar em vórtex.
2. Sonicar 3 vezes por 10 s a 4 °C, com intervalos de 1 min em gelo. Misturar em vórtex.
3. Completar o tubo para 1 mL com a solução anterior e homogeneizar.
4. Deixar por 30 min a 4 °C.
5. Adicionar um volume igual (1 mL) de fenol equilibrado, pH 8 e homogeneizar.
6. Deixar por 30 min a -20 °C, vortexando a cada 10 min.
7. Centrifugar a 16000 $\times$ g por 5 min, a 4 °C e transferir a fase fenol (superior) para um novo tubo de 2 mL.
8. Para uma segunda extração, adicionar solução com sacarose (1 : 1), misturar e repetir as etapas de 5 a 7.
9. Preencher o tubo com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol 100 %, homogeneizar e deixar precipitar *overnight* a -20 °C.
10. Centrifugar a 16000 $\times$ g por 5 min, a 4 °C e descartar o sobrenadante.
11. Lavar o pellet com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol 100% e depois com acetona 80%.
12. Deixar o *pellet* secar a temperatura ambiente para remover resíduos de acetona.
13. Solubilizar as proteínas em solução de solubilização² sob agitação por 4 h a 4 °C.
14. Estocar os extratos a -20 °C até análise.

¹ sacarose 0,7 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹, EDTA 50 mmol L⁻¹, PMSF 2 mmol L⁻¹, 40 μ L mL⁻¹ coquetel inibidor de protease 25 $\times$, β -mercaptoetanol 2%, PVPP 1%, Tris-HCl 0,5 mol L⁻¹ pH 7,5. (PMSF, coquetel inibidor de protease, β -mercaptoetanol e PVPP devem ser adicionados imediatamente antes do uso).

² uréia 9 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹, CHAPS 4% (w/v), Triton-X100 0,5% (v/v), DTT 20 mmol L⁻¹.

Após solubilização das proteínas as soluções foram centrifugadas para eliminar o material insolúvel e o teor de proteínas totais foi quantificado pelo método de Bradford,

usando-se BSA como padrão. Após a escolha dos métodos de extração, as proteínas em cada data de amostragem foram extraídas em triplicata.

3.3 Separação de proteínas por 1-DE e 2-DE

Os métodos de extração foram avaliados por 1-DE utilizando-se géis pré-fabricados Criterion TGX Stain Free® (Bio Rad) de 13,3 x 8,7 cm, com gradiente de poliacrilamida entre 4 e 20%. A voltagem de corrida foi de 150 V até a linha do azul de bromofenol alcançar o fim do gel e as imagens dos géis obtidos foram analisadas no sistema Criterion Stain Free Imager® (Bio Rad). Após seleção do melhor método de extração todas as amostras foram avaliadas por 1-DE e 2-DE, sendo que os géis obtidos foram corados com Coomassie Blue G-250, as imagens digitalizadas no equipamento GS-800 Calibrated Densitometer (Bio Rad) e tratadas pelos *softwares* Quantity One® (Bio Rad) e PDQuest® (Bio Rad), respectivamente.

Para os experimentos de 2-DE a primeira dimensão (IEF – Focalização Isoelétrica) foi realizada em um sistema Bio Rad Protean IEF (Bio Rad), com fitas de 17 cm e intervalo de pH 3-10. Após aplicação de 400 µg de extrato de proteína nas fitas, estas foram reidratadas ativamente a 50 V por um período de 15 h, a 20 °C, em 300 µL de solução de reidratação (uréia 7 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹, CHAPS 4%, Ampholyte 3-10 0,5%, DTT 20 mmol L⁻¹ e azul de bromofenol 0,01%). O programa utilizado para focalização isoeletrica é descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Condições de focalização isoeletrica para fitas de 17 cm pH 3-10.

Etapa	Voltagem	Rampa	Duração
1	150 V	Aumento rápido	1h
2	250 V	Aumento rápido	1h
3	500 V	Aumento rápido	1h
4	1000 V	Aumento linear	1000 Vh
5	10000 V	Aumento linear	3 h 30 min
6	10000 V	Aumento rápido	25000 Vh

Após o término da etapa de focalização isoeletrica as fitas foram equilibradas em solução de equilíbrio (Tris HCl 50 mmol L⁻¹, pH 8,8, uréia 6 mol L⁻¹, glicerol 20%, SDS 2%) contendo 2% DTT e agitadas durante 15 min, seguida da mesma solução contendo 2,5% iodoacetamida, por 15 min.

A segunda dimensão foi feita em géis de poliacrilamida 12% em um sistema Protean Plus Dodeca (Bio Rad). O tampão de eletroforese consistiu de 50 mmol L⁻¹ tris-base, 192 mmol L⁻¹ glicina e 1% SDS. As condições de corrida foram 80 V até a linha do azul de bromofenol alcançar o fim do gel. Os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 por aproximadamente 18 h e descorados com Tris 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5 por 3 min, metanol 25% por 1 min e mantidos em sulfato amoniacal 20% até obtenção das imagens. As imagens foram digitalizadas no equipamento GS-800 Calibrated Densitometer (Bio Rad) e tratadas com o software PDQuest[®]. Os géis para cada amostra foram feitos em triplicata, e somente os *spots* detectados nas três replicatas foram considerados consistentes. A massa molecular foi atribuída segundo a migração de padrões de massa molecular e o pI foi atribuído pelo *software* por meio de uma escala linear entre 3 e 10, de acordo com a dimensão total das fitas.

3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa PDQuest por meio de teste *t*-Student, considerando um valor de significância menor ou igual a 0,05. Paralelamente realizou-se um estudo estatístico por meio do teste de ANOVA, com o *software* NIA Array Analysis (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>).²⁵⁹ Foram considerados significativos valores com FDR (*False Discovery Rate*) menor ou igual a 0,05, o que representa a proporção de falsos positivos entre os *spots* analisados. Os resultados foram avaliados por Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA) para visualizar quais *spots* estão envolvidos no processo de maturação e verificar se existe agrupamento entre uvas de diferentes variedades e/ou origens.

3.5 Identificação das proteínas por MALDI-TOF-TOF

Os *spots* selecionados foram automaticamente recortados por um sistema Investigator ProPic (Genomic Solutions), transferidos para uma placa de 96 pocinhos e digeridos com tripsina (grau seqüenciamento, Promega) em uma estação de digestão ProGest (Genomic Solutions), pertencentes a *Unidad de Proteómica do Servicio Central de Apoyo a la Investigación* (SCAI) da Universidade de Córdoba, Espanha.

Os *spots* foram descorados por incubação (2 vezes por 30 min) com bicarbonato de amônio 200 mmol L⁻¹ em acetonitrila 40%, a 37 °C, e submetidos a três etapas de

desidratação/reidratação com acetonitrila pura e bicarbonato de amônio 25 mmol L⁻¹ em acetonitrila 40%, respectivamente, e secos em temperatura ambiente por 10 min. Foram adicionados 20 µL de tripsina, a uma concentração final de 12,5 ng µL⁻¹ em bicarbonato de amônio 25 mmol L⁻¹, e a digestão seguiu *overnight* a 37 °C.

Os peptídeos foram extraídos pela adição de 10 µL de TFA 1% e incubação por 15 min, e purificados por ZipTips (Millipore). Os peptídeos foram depositados em uma placa de MALDI e ácido α -ciano hidroxicinâmico 5 ng µL⁻¹ em ACN 70% e TFA 0,1% foi utilizado como matriz.

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF 4700 *Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems), na faixa de m/z 800-4000, com voltagem de aceleração de 20 kV, modo *reflectron*. Os espectros foram calibrados utilizando-se os picos da autólise da tripsina (m/z 842,509 e 2211,104) como padrões internos. Os três íons mais abundantes foram submetidos a análises MS/MS. Uma busca combinada (MS e MS/MS) foi feita pelo *software* GPS Explorer TM v. 3.5 (Applied Biosystems) sobre as bases de dados não redundantes MSDB e NCBI utilizando-se como ferramenta de busca MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).²⁶⁰ A partir dos dados obtidos uma busca detalhada por função e categorias das proteínas identificadas foi realizada em bases de dados de plantas. Para proteínas hipotéticas ou *unnamed* utilizou-se a ferramenta bioinformática BLASTp, que é usada para identificar sequências similares nos bancos de dados de proteínas, encontrando regiões de similaridade. Depois de identificadas realizou-se uma busca no banco de dados NCBI nr de domínio conservados a partir de alguma sequência já conhecida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Separação de proteínas por 1-DE e 2-DE

A eletroforese bidimensional tem se mostrado uma ferramenta poderosa para separar proteínas de tecidos animais, microrganismos e plantas, com base em suas cargas e massa molecular. A análise do proteoma de plantas encontra-se em um estágio inicial de desenvolvimento, sendo considerada uma matriz complexa, na qual vários compostos interferem nos processos de extração e eletroforese, entre eles compostos fenólicos. Desta forma, protocolos diferenciados dos aplicados em amostras de tecido animal e em microrganismos são necessários. O PVPP é um reagente muito utilizado para purificar amostras de plantas de compostos fenólicos e a moagem criogênica o método mais eficiente de romper a parede celular, liberando as proteínas sem que haja atuação das proteases, o que complica a análise dos géis, devido à baixa temperatura proporcionada pelo nitrogênio líquido.

Três métodos diferentes de extração de proteínas comumente empregados em plantas foram avaliados por 1-DE. A Figura 3.5 apresenta o gel de eletroforese obtido para o *pool* de amostras a partir dos métodos de extração, em um gel comercial pré-fabricado com gradiente de acrilamida 4-20%, diferença de potencial de corrida de 150 V e visualização no sistema *Criterion Stain-Free Imager*.

Figura 3.5 – Perfil eletroforético do *pool* de amostras obtido por SDS-PAGE após extração por diferentes métodos. Gel com gradiente de acrilamida 4-20%, V = 150 V.

Observa-se na Figura 3.5 a qualidade superior dos extratos obtidos quando se utiliza fenol comparada quando se utiliza somente TCA e acetona. Apesar de ser eficiente para alguns tecidos de plantas, o método TCA/acetona pode resultar na co-extração de contaminantes poliméricos,²³⁶ além da conhecida dificuldade na ressolubilização das proteínas.²³⁸ A Tabela 3.2 apresenta os resultados de quantificação pelo método de Bradford das amostras extraídas com os três métodos e o número de bandas identificadas pelo *software* Quantity One (Bio-Rad).

Tabela 3.2 - Quantificação das amostras pelo método de Bradford e número de bandas identificadas para cada método de extração (n = 3).

Método de extração	Rendimento de extração (mg g ⁻¹ massa seca)	Número de bandas no gel
TCA/Acetona	1,28 ± 0,21	15
TCA/Acetona/Fenol	1,78 ± 0,56	37
Fenol	8,56 ± 0,30	45

Os resultados apresentados confirmam que o método de extração com fenol é o mais adequado para a extração de proteínas de uvas, uma vez que apresenta o melhor perfil no gel SDS-PAGE, maior rendimento de extração e o maior número de bandas detectadas no gel.

Após definido o melhor método de extração todas as amostras de uvas em diferentes estádios de maturação coletadas em 2010 em Água Vermelha (Cabernet Sauvignon e Syrah) e Louveira (Syrah) foram submetidas à extração com fenol. A Figura 3.6 apresenta um gráfico do conteúdo de proteínas com a maturação das uvas.

Figura 3.6 – Conteúdo de proteínas com a maturação das uvas: ShAV (Syrah Água Vermelha); ShL (Syrah Louveira); CSAV Cabernet Sauvignon Água Vermelha).

Pode-se observar uma diminuição no teor de proteínas com a maturação, ou seja, a quantidade de proteínas extraídas foi maior para as uvas verdes do que para as uvas maduras. Este comportamento também foi observado por Giribaldi *et al.* (2007) para uvas Nebbiolo.²⁵⁴

As amostras extraídas nos diferentes estádios de maturação foram analisadas por SDS-PAGE em géis 12% acrilamida, para avaliar o perfil de bandas de cada uma delas, e o gel obtido é apresentado na Figura 3.7.

Figura 3.7 - Perfil eletroforético obtido por SDS-PAGE para amostras nos diferentes estádios de maturação. Extração com fenol, 80 µg de proteína, 12% acrilamida, V = 80 V, coloração com Coomassie Blue G-250.

O perfil de bandas de proteínas se altera significativamente das uvas verdes para as maduras, principalmente para as uvas Syrah de Água Vermelha, sendo que após o *veraison* essa mudança é pequena. Observa-se que as uvas maduras apresentam um maior número de proteínas do que as verdes, fato contrário ao obtido na quantificação dos extratos, o que pode indicar que as uvas verdes possuem poucas proteínas, mas em grande quantidade, e um maior número de proteínas é expresso durante a maturação, mas em pequena quantidade.

Um perfil bastante semelhante foi obtido para uvas das mesmas variedades e pequenas diferenças foram observadas entre as uvas Syrah e Cabernet Sauvignon. No entanto, visualmente observa-se o perfil bastante diferenciado da uva Máximo com relação às duas variedades viníferas. Depois de atribuídas as bandas a cada gel com o auxílio do *software* Quantity One os resultados foram tratados estatisticamente com a ferramenta de Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA). A HCA é uma técnica que examina as distâncias interpontuais entre todas as amostras do conjunto de dados e representa essa informação na forma de um gráfico bidimensional denominado dendrograma, pelo qual se podem visualizar os agrupamentos e similaridades entre as amostras. Um índice de similaridade alto indica uma

distância pequena entre dois agrupamentos e, portanto, uma alta similaridade. Os resultados são apresentados na Figura 3.8.

Figura 3.8 - Dendograma construído com base no perfil eletroforético obtido por SDS-PAGE para todas as amostras de uvas.

Três grandes agrupamentos foram obtidos, um entre as uvas Cabernet Sauvignon, independente do estágio de maturação, outro entre as uvas Syrah de Água Vermelha e Louveira nos estádios verde e *veraison*, e um terceiro, dividido em dois outros ramos, contendo as uvas Syrah de Água Vermelha e Louveira nos estádios de amadurecimento e maturação completa em um ramo e a uva híbrida Máximo no outro ramo. As amostras do primeiro ramo contidas no terceiro agrupamento apresentam-se separadas em diversos subgrupos relacionados à origem e estágio de maturação das uvas Syrah. A uva Máximo apresentou uma similaridade relativamente grande com o ramo das uvas Syrah em estágio de amadurecimento ou maduras, o que faz sentido se for considerado que esta cultivar é um cruzamento entre as variedades Syrah e Seibel 11342,⁵⁷ já que o proteoma é estabelecido geneticamente.²⁴¹

Para avaliar o perfil de proteínas por 2-DE dois experimentos foram feitos com diferentes quantidades de extrato de proteínas (200 µg e 400 µg), com o objetivo de padronizar a concentração de amostra aplicada nos géis e permitir a visualização do maior

número de proteínas possível. A concentração mais adequada foi 400 µg, e a partir desta etapa todas as amostras foram submetidas em triplicata à focalização isoeletrica em fitas de 17 cm e pH 3-10 e subsequentemente, à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 e as imagens digitalizadas. As imagens para as uvas Syrah Água Vermelha, Syrah Louveira e Cabernet Sauvignon Água Vermelha nos estádios de maturação estudados são apresentadas nas Figuras 3.9, 3.10 e 3.11, respectivamente.

Figura 3.9 - Géis 2-DE para uvas Syrah Água Vermelha em diferentes estádios de maturação: (A) verde, (B) *veraison*, (C) amadurecimento, (D) maturação completa.

Figura 3.10 - Géis 2-DE para uvas Syrah Louveira em diferentes estádios de maturação: (A) verde, (B) *veraison*, (C) amadurecimento, (D) maturação completa.

Figura 3.11 - Géis 2-DE para uvas Cabernet Sauvignon Água Vermelha em diferentes estádios de maturação: (A) *veraison*, (B) amadurecimento, (C) maturação completa.

É possível visualizar uma grande alteração do perfil de proteínas das uvas verdes para as maduras, com um número significativamente maior de proteínas neste último estágio de maturação. Algumas proteínas são expressas desde o início da formação das bagas, nas uvas verdes, como as que estão marcadas como 4117 e 5010 nas uvas Syrah Água Vermelha e se repetem para as outras duas variedades. Outras começam a expressar com o decorrer da maturação, como 5007.

A Figura 3.12 apresenta os géis de eletroforese bidimensional para as uvas de diferentes variedades e origens, todas em estágio de maturação completo.

Figura 3.12 - Géis 2-DE para uvas maduras das diferentes variedades e origens: (A) Syrah AV, (B) Syrah L, (C) CSAV, (D) Max.

Visualmente não foram observadas grandes alterações qualitativas entre as uvas da variedade Syrah cultivadas em Água Vermelha ou Louveira, sendo as maiores diferenças relacionadas à intensidade dos *spots*. No entanto, comparando estas com a outra variedade vinífera Cabernet Sauvignon verifica-se a presença de alguns *spots* diferenciais. Com relação à variedade híbrida pode-se dizer que o perfil apresenta-se bastante diferenciado.

O número de *spots* presentes em cada gel foi atribuído automaticamente pelo *software* PDQuest (Bio Rad) e validado manualmente por uma rigorosa inspeção visual. Todos os *spots* considerados foram consistentes, ou seja, estiveram presentes ou ausentes em todas as réplicas. A Tabela 3.3 apresenta o número de *spots* detectados em cada gel analisado, assim como a visualização gráfica da alteração do número de proteínas com a maturação.

Tabela 3.3 - Número de *spots* detectados nos géis das amostras em diferentes estádios de maturação e de diferentes origens.

Amostra	Número de <i>spots</i>	Alteração do número de <i>spots</i>
ShAV _{verde}	102
ShAV _{verais}	190	
ShAV _{amad}	239	
ShAV _{mad}	214	
CSAV _{verais}	228
CSAV _{amad}	255	
CSAV _{mad}	227	
ShL _{verde}	157
ShL _{verais}	218	
ShL _{amad}	265	
ShL _{mad}	280	

Tabela 3.3 - Número de *spots* detectados nos géis das amostras em diferentes estádios de maturação e de diferentes origens. (continuação)

MaxL	303
-------------	-----

Em paralelo às análises estatísticas realizadas no programa PDQuest (Bio Rad) uma análise de variância (ANOVA) foi feita na plataforma online NIA Array Analysis (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA>),²⁵⁹ além de uma Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) e de Componentes Principais (PCA). O resultado das análises de HCA é apresentado na Figura 3.13.

Figura 3.13 - Dendograma construído com base no perfil eletroforético obtido por 2-DE para todas as amostras.

Podem-se observar a princípio dois agrupamentos, um entre as uvas Syrah verdes e outro entre as uvas em estádios de *veraison*, amadurecimento ou maduras. O segundo grupo está dividido em dois outros ramos, um contendo a variedade Máximo isolada e outro contendo as variedades viníferas. Dentro do grupo das variedades viníferas observam-se

subgrupos referentes às uvas Syrah de Água Vermelha, Syrah de Louveira e Cabernet Sauvignon. Estes resultados confirmam a análise visual dos géis, a partir da qual pode-se verificar que as uvas verdes apresentam um perfil de proteínas bastante diferenciado com relação às uvas a partir do estágio de *veraison*.

Outra forma de visualizar os resultados, por meio da ferramenta de PCA, é apresentada na Figura 3.14.

Figura 3.14 - PCA para todas as amostras a partir dos resultados dos géis 2-DE: gráficos de *scores* e *loadings*.

A Figura 3.14 apresenta os gráficos de *scores* para todas as amostras e de *loadings* para os *spots* significativos, atribuídos de acordo com o teste ANOVA como aqueles que apresentaram valores de $FDR < 0,05$. Por meio do gráfico de *scores* observam-se as uvas Cabernet Sauvignon agrupadas no quadrante direito inferior e as uvas Syrah verdes agrupadas no quadrante esquerdo inferior, juntamente com a Syrah de Água Vermelha em estágio de *veraison*, indicando uma maturação mais tardia com relação à composição de proteínas para estas uvas. As uvas Syrah Louveira, exceto verdes, se agrupam no quadrante direito superior juntamente com a híbrida Máximo, e as uvas Syrah Água Vermelha maduras e em estágio de amadurecimento no quadrante esquerdo superior. Os dados obtidos com a PCA e HCA, juntamente com a análise visual dos géis, permitiram concluir que as uvas verdes

apresentaram um perfil proteômico bastante diferenciado das uvas a partir do estágio de *veraison*, e que há diferenças de expressão de proteínas entre as variedades e locais de cultivo. Além disso, por meio da PCA pode-se agrupar a uva Máximo cultivada em Louveira às uvas Syrah cultivadas no mesmo local, indicando semelhanças no proteoma devido ao cruzamento que originou esta uva híbrida e provavelmente, semelhanças devido ao local de cultivo.

4.2 Identificação das proteínas por MS e busca nos bancos de dados

Foram encontrados 233 *spots* referentes a proteínas diferencialmente expressas quantitativamente (*spots* mais nítidos *vs.* mais fracos) ou qualitativamente (presença *vs.* ausência), considerando todos os géis analisados. Os *spots* foram selecionados a partir de análise minuciosa e submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF no Serviço de Proteômica da Universidade de Córdoba (SCAI). Os *spots* foram recortados, digeridos, analisados e as proteínas identificadas por busca no banco de dados NCBI por meio do programa de busca Mascot. Os resultados obtidos pelo SCAI foram enviados eletronicamente, permitindo acesso à página web do Mascot e utilizados para fazer uma busca nos bancos de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)²⁶¹ e Uniprot (<http://www.uniprot.org/>)²⁶² pelos processos biológicos nos quais as proteínas estão envolvidas e sua função molecular. As proteínas identificadas como hipotéticas ou sem nome foram submetidas à ferramenta BLASTp para verificar similaridade entre esta e alguma outra proteína já nomeada de uva ou algum outro organismo do gênero *Viridiplantae*. As proteínas identificadas pelo Mascot estão descritas no apêndice I, juntamente com o número do *spot* atribuído pelo programa PDQuest, código de acesso, *score*, % cobertura dos peptídeos sequenciados, e a proteína com maior identidade encontrada pelo BLASTp. A última coluna apresenta o perfil de expressão das proteínas identificadas em cada amostra. As proteínas foram agrupadas de acordo com categorias descritas na literatura.

Foram identificadas pelo Mascot 66 proteínas com valores de *score* maior que 71, a partir de 103 *spots* enviados para análise por MALDI-TOF-TOF, e para outras 8 não foram encontradas similaridades com outras proteínas já descritas nos bancos de dados. A maioria das proteínas identificadas pertence às categorias de metabolismo de carboidratos (7%), metabolismo de aminoácidos (9%), glicólise e glicogênese (8%), metabolismo energético (9%), defesa e resposta a *stress* (31%), o que confirma relatos anteriores sobre a alta

frequência destas classes de proteínas em outras variedades de uvas.^{254,263} A Figura 3.15 apresenta a distribuição das proteínas encontradas por categoria.

Figura 3.15 - Distribuição por categoria das proteínas encontradas.

Como observado, algumas proteínas apresentaram um padrão de expressão em todos os estádios analisados, ou seja, da formação das bagas até a maturação completa, enquanto outras, foram reguladas apenas nas uvas verdes ou após o *veraison*. Os resultados indicam que quase todas as proteínas apresentam alguma alteração de expressão, o que de acordo com Giribaldi *et al.* (2007), se deve às modificações traducionais e pós-traducionais, que acrescentam um alto grau de complexidade no estudo da expressão dos genes.²⁵⁴

A Figura 3.16 apresenta o gel construído virtualmente a partir de todos os géis analisados e a localização de algumas proteínas.

Figura 3.16 - Gel virtual construído a partir de todos os géis analisados e localização de algumas proteínas.

Os *spots* 4117 e 5010 representados na Figura 3.9 correspondem à isoformas da mesma proteína, relacionada à resposta a *stress* e ao processo de maturação. Ambas estão presentes em todas as variedades e estádios de maturação (exceto 5010 nas uvas Máximo) e seus perfis de expressão permaneceram aproximadamente iguais ou diminuíram um pouco com a maturação, fato verificado mais acentuadamente para as uvas Syrah Água Vermelha.

O *spot* 5007 na Figura 3.9 corresponde à proteína identificada como *Full=Ripening-related protein grip22*. Esta proteína está relacionada à maturação completa das uvas, como o nome sugere, no entanto a função exata ainda é desconhecida.

Metabolismo de carboidratos

Três proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos foram expressas nas variedades de uvas analisadas, sendo elas a GDP-manose 3,5 epimerase, vacuolar invertase 1 (GIN1) e glucana endo-1,3-betaglucosidase.

GDP-manose 3,5 epimerase é uma enzima que catalisa a reação química que converte GDP-D-manose a GDP-L-galactose. É considerada uma enzima central na rota de biossíntese do ascorbato nas plantas superiores, no entanto seu papel ainda não está totalmente definido.^{264,265} Aqui, esta proteína foi encontrada nas uvas Syrah de Água Vermelha em todos os estádios de maturação com um perfil de expressão sem muita variação, e nas duas variedades de Louveira, Syrah e Máximo, nas uvas verdes e maduras, respectivamente.

A vacuolar invertase 1 (GIN1) pertence à família glicosil hidrolase 32. Estas enzimas provavelmente convertem sacarose a glicose e frutose e estudos sugerem que a atividade desta enzima aumenta a partir do florescimento, alcançando um máximo no *veraison*, e diminui no momento da maturação, quando o teor de açúcares é máximo.^{266,267} Esta proteína foi identificada em todas as uvas, exceto Syrah Água Vermelha verde, apresentando um perfil de diminuição de expressão com a maturação, de acordo com resultados da literatura.

A enzima glucana endo-1,3-betaglucosidase ou β -1,3-endoglucanase pertence à família glicosil hidrolase 17. Esta proteína está envolvida na defesa de plantas, na formação, organização, manutenção e degradação da parede celular. Foram identificadas duas isoformas desta proteína, com perfis de expressão semelhantes, que aumentou com o amadurecimento dos frutos.

Metabolismo de aminoácidos

Nesta categoria foi observada a expressão aumentada das proteínas aminoacilase, UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase, fumarilacetoacetase, glutamina sintetase e nucleosídeo-difosfato quinases.

A enzima aminoacilase pertence à família das hidrolases, que atua nas ligações carbono-nitrogênio, especificamente em amidas lineares. Participam dos metabolismos de arginina e prolina, são constituintes estruturais dos ribossomos e participam do processo de tradução.²⁶⁸ Esta proteína foi detectada apenas nas uvas Cabernet Sauvignon após o *veraison*.

UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase é uma enzima associada à glicogênese que sintetiza UDP-glicose a partir de glicose-1-fosfato e UTP. Duas isoformas desta proteína foram identificadas, sendo que uma delas (SSP8505) apresentou um perfil de expressão que aumentou após o estágio de *veraison* nas uvas de Água Vermelha, e opostamente, diminui nas

uvas Syrah de Louveira. A segunda isoforma esteve presente apenas nas uvas Máximo e Cabernet Sauvignon, com um perfil semelhante à primeira isoforma para estas variedades.

A fumarilacetoacetase participa de reações químicas e rotas metabólicas para a biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e foi encontrada somente na variedade Máximo.

A glutamina sintetase é uma enzima que desempenha um papel essencial no metabolismo do nitrogênio catalisando a condensação de glutamato e amônia para formar glutamina.²⁶⁹ Esta proteína foi identificada em todas as variedades e estádios de maturação, apresentando-se mais expressa nas uvas maduras do que nas verdes.

As nucleosídeo-difosfato quinases são enzimas que catalisam a troca de grupos fosfato entre diferentes nucleosídeos difosfatos, e mantém o equilíbrio entre as concentrações de diferentes nucleosídeos trifosfatos, quando, por exemplo, o GTP produzido no ciclo de Krebs é convertido a ATP.²⁷⁰ Duas isoformas desta proteína foram observadas, sendo uma delas (SSP6016) identificada apenas nas uvas verdes da variedade Syrah Água Vermelha. A outra isoforma apresentou um perfil de expressão distinto, com um pico no *veraison* e uma queda acentuada após este período.

Glicólise e Glicogênese

Quatro proteínas incluídas nesta categoria foram observadas, sendo elas: fosfoglicerato quinase, frutose-bifosfato aldolase, enolase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

A fosfoglicerato quinase é uma enzima que catalisa a formação de ATP a ADP, e vice-versa, reação essencial na maioria das células para geração de ATP em organismos aeróbios, fermentação em anaeróbios e fixação de carbono em plantas. É encontrada em todos os organismos vivos e sua sequência é altamente conservada por toda a evolução.²⁶⁸ Esta proteína não foi encontrada nas uvas Syrah Água Vermelha e seu perfil de expressão se apresentou diferenciado nas outras duas variedades com a maturação, diminuindo a expressão para Cabernet Sauvignon e aumentando para Syrah Louveira desde o *veraison* até a maturação das uvas.

A frutose-bifosfato aldolase é uma enzima glicolítica que catalisa a clivagem reversível de aldol ou a condensação de frutose-1,6-difosfato em dihidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato.²⁷¹ Duas classes de frutose-bifosfato aldolases tem sido descritas,

diferindo no mecanismo de catálise, sendo a classe I frequentemente encontrada nas formas de vida superiores como animais e plantas. Esta proteína apresentou baixa expressão nas uvas maduras, exceto Cabernet Sauvignon.

A metaloenzima enolase é responsável por catalisar a conversão de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, a nona e penúltima etapa da glicólise. A isoforma identificada desta proteína foi observada apenas nas uvas Cabernet Sauvignon, sendo o perfil de expressão diminuído a partir do *veraison*, com nenhuma expressão nas uvas maduras. No entanto, esta proteína mostrou-se altamente expressa nas uvas Máximo maduras.

A enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase catalisa a sexta etapa da glicólise, e tem a função de quebrar moléculas de glicose para fornecer energia. Esta proteína foi identificada na variedade Máximo madura, enquanto que nas outras variedades ela foi mais expressa nos estádios de *veraison*, exceto pela Syrah Água Vermelha, na qual esta proteína não foi detectada em nenhum estágio.

Metabolismo energético

Foram observadas cinco proteínas hipotéticas pertencentes a esta categoria, além da proteína ribulose 1,5-difosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO).

A ribulose 1,5-difosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) é uma enzima envolvida na primeira etapa da fixação de carbono,²⁷² um processo pelo qual o dióxido de carbono atmosférico é convertido em moléculas ricas em energia, como glicose, pelas plantas. Nas plantas superiores existe como um complexo de 8 subunidades curtas e 8 longas, sendo que a função das curtas ainda é desconhecida.²⁷³ Uma isoforma de cadeia curta desta proteína apresentou uma diminuição no perfil de expressão com o decorrer do período de maturação, apresentando-se pouco expressa na maturação completa das duas variedades de Louveira, e inexistente nas duas variedades de Água Vermelha. Outra isoforma desta enzima apresentou o mesmo perfil, mas apenas para as uvas Syrah Louveira.

Cinco proteínas hipotéticas envolvidas no metabolismo energético foram encontradas super expressas nas uvas verdes da variedade Syrah Água Vermelha, sendo que duas apresentaram similaridade com a proteína de ligação clorofila A-B. Estas proteínas pertencem a um complexo que funciona como receptor de luz na fotossíntese.²⁷⁴

Metabolismo secundário

Foram identificadas duas proteínas pertencentes ao metabolismo secundário das uvas: polifenol oxidase e homocisteína S-metiltransferase.

A enzima polifenol oxidase (PPO) apresenta cobre que em sua estrutura que, na presença de oxigênio, catalisa a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois, e a oxidação de *o*-difenois às correspondentes *o*-quinonas, o que produz pigmentos escuros indesejáveis que causam o escurecimento dos frutos.^{275,276} Foram identificadas duas isoformas desta proteína, sendo uma delas (SSP8342) expressa apenas nas uvas Cabernet Sauvignon. A outra isoforma foi encontrada nas três variedades nos estádios verde ou *veraison*, não sendo expressas na maturação.

A outra proteína pertencente ao metabolismo secundário, homocisteína S-metiltransferase, foi identificada apenas nas uvas mais maduras da variedade Cabernet Sauvignon. Esta enzima pertence à classe das transferases, abundante em plantas, que catalisa a reação química entre S-adenosilmetionina e L-homocisteína para produzir S-adenosilhomocisteína e L-metionina.²⁶⁸

Defesa e resposta a *stress*

A maioria das proteínas encontradas está incluída nesta categoria, representando 31% das proteínas identificadas.

A peroxidase, assim como a polifenol oxidase, está envolvida no escurecimento enzimático, e especula-se que ela esteja associada à perda de cor, odor e valor nutricional de alimentos devido à oxidação de uma ampla faixa de compostos orgânicos.²⁷⁷ Nas plantas ela atua no mecanismo de resposta a *stress*. Duas isoformas de ascorbato peroxidase foram identificadas, uma delas (SSP5107) apenas na variedade Cabernet Sauvignon, e outra em todas as variedades e estádios de maturação, com um perfil de expressão que diminuiu com a maturação. A expressão desta isoforma na variedade Máximo apresentou-se bastante reduzida comparada às outras variedades maduras.

A vicilina antimicrobiana pertence à família 7S de proteínas de reserva de sementes, desempenhando funções de reserva de nutrientes e defesa contra bactérias e fungos. Duas isoformas desta proteína foram encontradas apenas nas uvas Syrah Água Vermelha em

estádio de amadurecimento e madura, sendo menos expressas nas maduras, e nas uvas Máximo.

VVTL1 é uma proteína codificada por um único gene que é expresso no começo da fase de acúmulo de açúcares. O papel exato desta proteína é desconhecido, mas está correlacionado com a incapacidade do fungo Oídio (*Uncinula necator*) iniciar infecções na baga.²⁴³ Esta proteína foi identificada em todas as variedades a partir do *veraison*, fase em que se inicia o acúmulo de açúcares.

São relatados na literatura 17 grupos de proteínas relacionadas a patogêneses (PR). As proteínas PR-10 estão envolvidas na defesa de plantas, e sabe-se que seus genes são geralmente induzidos pelo ataque de patógenos e por *stress* ambiental. No entanto, evidências indicam que elas também desempenham funções no processo de desenvolvimento e no metabolismo secundário, uma vez que estão presentes em frutas saudáveis como parte do processo de maturação.²⁷⁸ Duas proteínas deste subgrupo foram identificadas, uma delas (SSP6004) em todas as variedades, cujo perfil de expressão aumentou com a maturação (exceto para Cabernet Sauvignon) e outra (SSP7007) apenas nas uvas mais maduras (exceto para Cabernet Sauvignon), apresentando-se pouco expressa na variedade Máximo quando comparada com Syrah.

As proteínas PR-4 tem sido classificadas na literatura como endoquitinases, PR-5 como taumatinas, PR-2 como β -1,-3-glucanases e PR-8, -3 e -11 como quitinases.²⁷⁹ As quitinases são enzimas hidrolíticas que quebram ligações glicosídicas de quitina, um dos componentes da parede celular dos fungos e do exoesqueleto de alguns artrópodes.²⁸⁰ Três isoformas de quitinases foram identificadas, sendo que as correspondentes aos *spots* 3114 e 8117 foram encontradas apenas na variedade Cabernet Sauvignon a partir do *veraison*, caracterizadas por um aumento no perfil de expressão com a maturação. A outra isoforma, identificada por SSP3221, esteve presente somente na variedade Máximo. Duas proteínas do subgrupo PR-4 foram identificadas (SSP2112 e SSP6006) em todas as variedades a partir do *veraison*, caracterizada por um aumento no perfil de expressão com a maturação. Com relação às taumatinas, três isoformas foram identificadas, com considerável aumento de expressão com a maturação em todas as variedades estudadas.

Deidrininas são uma família de proteínas presente em plantas que são produzidas em resposta a baixa temperatura e *stress* de seca, protegendo as membranas celulares de danos. Sua produção é induzida por ácido abscísico e em resposta a sal. Esta proteína foi identificada apenas na variedade Máximo.

Proteínas relacionadas com a síntese de antocianinas não foram identificadas, provavelmente por estarem presentes em baixos níveis e serem difíceis de analisar, sendo que a maior parte das informações sobre esta rota tem sido obtida por estudos de expressão de genes que codificam essas enzimas.²⁸¹ Estudos de expressão gênica com DNAs complementares (cDNAs) indicaram que nas cascas de uvas da variedade Syrah os genes relacionados com a síntese de antocianinas foram detectados desde os primeiros estádios de desenvolvimento, sendo a maioria expressos no florescimento ou logo após este estágio, quando a síntese de antocianinas ainda não é detectada. Entretanto a expressão destes genes foi reprimida após o período de florescimento até o *veraison*, aumentando com o início da coloração das cascas.¹⁸³

5 CONCLUSÕES

Três métodos foram avaliados para extração de proteínas das uvas, sendo que o método com fenol apresentou-se superior, tanto em qualidade do gel como em rendimento de extração e número de bandas identificadas nos géis 1-DE.

O rendimento de extração das proteínas diminuiu com a maturação das uvas, fato observado por diversos autores, no entanto a diversidade e o número de proteínas foram maiores nos géis das uvas maduras. Foram encontradas diferenças qualitativas e quantitativas com relação aos *spots* separados nos géis 2-DE com relação à maturação das uvas e às variedades e origens, sendo possível agrupar pelas ferramentas de PCA as uvas viníferas, separadas da híbrida, e entre as viníferas, as diferentes variedades. Também observou-se agrupamentos entre as uvas verdes, separadas das uvas em estágio de amadurecimento e maduras pelas análises de PCA e HCA, que indicou similaridades entre variedades e origens.

Setenta e quatro proteínas diferentes foram identificadas por MALDI-TOF-TOF e suas funções atribuídas por busca no banco de dados ou busca por similaridades, por meio da ferramenta BLASTp. Destas, 65 proteínas foram identificadas e para outras nove não foram encontradas similaridades com outras proteínas já descritas nos bancos de dados. A grande parte das proteínas identificadas, 31%, possui função de defesa e resposta a *stress*, enquanto 7% ao metabolismo de carboidratos, 9% ao metabolismo de aminoácidos, 8% glicólise e glicogênese e 9% ao metabolismo energético.

A enzima vacuolar invertase, que converte sacarose em glicose e frutose, apresentou diminuição de expressão com a maturação, de acordo com resultados da literatura, uma vez que esta conversão ocorre majoritariamente antes do *veraison*. De forma geral, as proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos tiveram sua expressão aumentada nas uvas mais maduras, assim como as proteínas relacionadas a patogêneses (PR), mesmo sem a indução por patógenos, o que pode ser explicado pela maior susceptibilidade dos frutos após o *veraison*, quando iniciam o acúmulo de açúcares e o amolecimento da baga, condições propícias para o ataque destes organismos. Seis proteínas identificadas participam da glicólise e glicogênese, sendo que todas apresentaram um perfil de expressão similar, que diminuiu das uvas mais verdes para as maduras.

Considerando as proteínas analisadas não foram identificadas proteínas relacionadas com a biossíntese de antocianinas, uma vez que elas se expressam majoritariamente nas

casas e em pequena quantidade, o que torna desafiador o estudo dos compostos envolvidos nesta rota.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O proteoma e o metaboloma de um organismo são contexto-dependentes e variam de acordo com o estágio de maturação, de desenvolvimento e condições de *stress*. É difícil correlacionar diretamente o perfil de expressão de uma proteína com um metabólito, uma vez que os metabólitos estão envolvidos em diversos processos, participando de diversas rotas metabólicas e por sua vez, uma proteína poder estar envolvida em vários ciclos metabólicos ou funções. No entanto algumas suposições podem ser feitas considerando as classes de metabólitos e as proteínas encontradas neste estudo.

Ácidos orgânicos, açúcares e polifenóis, entre eles antocianinas, são importantes classes de metabólitos relacionados com o desenvolvimento de uvas. Considerando estes compostos, observou-se que o aumento da concentração de açúcares com a maturação é acompanhado por um aumento na quantidade de antocianinas, uma vez que os açúcares são substratos na síntese destas, e uma diminuição na concentração dos ácidos orgânicos tartárico e málico, principais responsáveis pela acidez das uvas. O ácido tartárico é um produto secundário do metabolismo dos açúcares, e o ácido málico um intermediário. A diminuição do ácido málico com a maturação está relacionada à inibição do consumo de açúcares pela baga após o *veraison*, sendo que ele passa a ser utilizado para produzir energia enquanto os açúcares se acumulam. Este acúmulo de açúcares e água leva ao aumento de peso e medidas dos frutos durante a maturação.

A grande parte das proteínas identificadas, 31%, possui função de defesa e resposta a *stress*. As outras proteínas pertencem ao metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo energético e glicólise e glicogênese. As proteínas envolvidas no processo de fotossíntese (metabolismo energético) se encontraram estavam muito mais expressas nas bagas verdes, quando não somente nestas, o que indica que o fruto verde realiza fotossíntese durante o período herbáceo como qualquer outra parte verde da planta.

A enzima vacuolar invertase, que converte sacarose em glicose e frutose, apresentou diminuição de expressão com a maturação, uma vez que esta conversão ocorre majoritariamente antes do *veraison* e após esta data apenas quantidades traço de sacarose são encontradas, enquanto glicose e frutose se acumulam rapidamente. A sacarose não foi avaliada individualmente, no entanto as concentrações de glicose e frutose aumentaram consideravelmente após o *veraison*, confirmando uma das funções atribuídas a esta enzima.

As proteínas relacionadas a patogêneses (PR) tiveram sua expressão aumentada nas uvas mais maduras, mesmo sem a indução por patógenos, o que pode ser explicado pela maior susceptibilidade dos frutos após o *veraison*, quando iniciam o acúmulo de açúcares e o amolecimento da baga, condições propícias para o ataque destes organismos. Visto que os compostos fenólicos possuem função de defesa na planta, esse aumento de expressão das proteínas pode estar relacionado ao aumento do teor de compostos fenólicos, apesar de nenhuma proteína envolvida diretamente nas rotas metabólicas destes compostos ter sido identificada.

As ferramentas quimiométricas permitiram uma melhor interpretação da correlação das variáveis estudadas com os estádios de maturação, variedade e origem das uvas. De acordo com os resultados foi possível considerar a composição de açúcares e ácidos, assim como o perfil de antocianinas, polifenóis não-antociânicos e de proteínas como marcadores de estágio de maturação, indicando que grandes alterações ocorrem no metabolismo da fruta durante seu desenvolvimento. Adicionalmente o *fingerprint* de antocianinas pode ser considerado um marcador de variedade, sendo que as uvas Máximo se caracterizaram pela presença de 3,5-diglicosídeos de delfinidina, petunidina e malvidina, indicando que esta ferramenta pode ser útil para avaliar uma adulteração de sucos e possivelmente vinhos. O perfil proteômico, apesar de não distinguir uvas viníferas da híbrida, permitiu o agrupamento entre uvas da mesma variedade e uma tendência a agrupamentos com relação à origem geográfica, considerando as duas regiões avaliadas. A análise dos polifenóis em 360 nm permitiu, além do agrupamento por estágio de maturação, a descoberta de um composto capaz de diferenciar as uvas da região de Água Vermelha das outras estudadas, podendo ser considerado um marcador de origem geográfica.

A partir dos resultados obtidos torna-se interessante identificar as outras proteínas responsáveis pela diferenciação das uvas, atribuindo suas funções, assim como os polifenóis não-antociânicos, em especial aquele considerado como um marcador de origem geográfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) UVA E VINHO. **Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado:** produção e mercado de uvas viníferas. Bento Gonçalves, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br>>. Acesso em: 15 jul. 2007.
- ² FERRAZ FILHO, Z. E. **A vitivinicultura na região do Vale do São Francisco: fatores determinantes do crescimento e desenvolvimento da atividade.** 2005. Dissertação (Mestrado em Administração e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.
- ³ EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) UVA E VINHO. **Viticultura brasileira:** Panorama 2010. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br>>. Acesso em: 01 dez. 2011.
- ⁴ REGINA, M. A.; AMORIM, D. A.; FAVERO, A. C.; MOTA, R. V.; RODRIGUES, D. J. Novos pólos vitícolas para produção de vinhos finos em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 234, p. 111-118, 2006.
- ⁵ AMORIM, D. A.; FAVERO, A. C.; REGINA, M. A. Produção extemporânea da videira, cultivar Syrah, nas condições do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 327-331, 2005.
- ⁶ COBRA, R. Q. **Notas de boas maneiras e etiqueta.** Brasília. 2003. Disponível em: <<http://www.cobra.pages.nom.br>> Acesso em: 08 jul. 2007.
- ⁷ HOFFMANN, A.; MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A. **Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil.** Embrapa Uva e Vinho Sistema de Produção, 9. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/UvasRusticasParaProcessamento/>>. Acesso em 12 dez. 2005.
- ⁸ ISEPON, J. **Efeito de seis porta-enxertos sobre a produção e qualidade dos frutos da videira 'itália' e 'rubi'.** Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/079.htm>. Acesso em: 16 fev. 2009.
- ⁹ AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Análisis de vinos e mostos.** Zaragoza: Ed. Acribia, 1976. 157p.
- ¹⁰ BLOUIN, J.; GUIMBERTEAU, G. **Maduración y madurez de la uva.** Madrid: Mundi-Prensa, 2004. 176 p.
- ¹¹ GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa.** Porto Alegre: Ed. Renascença, 1999. 364 p.
- ¹² WINKLER, A. J.; COOK, J. A.; KLIEWER, W. M.; LIDER, L. A. **General viticulture.** Berkeley: University of Califórnia, 1974. 710 p.

- ¹³ MATISSEK, R.; SCHENEPEL, F. M.; STEINER, O. **Análisis de los alimentos:** fundamentos, métodos, aplicaciones. España: Ed. Acribia, 1998. 416 p.
- ¹⁴ SPENCER, G. L.; MEADE, G. P. **Special reagents.** In: CANE sugar Handbook. New York: Wiley, 1945. 1154 p.
- ¹⁵ MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- ¹⁶ NELSON, N. A. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.
- ¹⁷ VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica.** São Paulo: Ed. Guanabara, 1973. p. 552.
- ¹⁸ SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.
- ¹⁹ PERES, L. P. P. **Metabolismo secundário.** Piracicaba: ESALQ, 2004. 25 p. (Apostila).
- ²⁰ KANNER, J. K.; FRANKEL, E.; GRANIT, R.; GERMAN, J. B.; KINSELLA, J. E. Natural antioxidants in grapes and wines. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 64-69, 1994.
- ²¹ MEYER, A. S.; YI, O.; PEARSON, D. A.; WATERHOUSE, A. L.; FRANKEL, E. N. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 45, p. 1638-1643, 1997.
- ²² SHIRKANDE, A. J. Wine byproducts with health benefits. **Food Research International**, v. 33, p. 469-474, 2000.
- ²³ SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- ²⁴ HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p. 43-49, 2003.
- ²⁵ ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. Cap. 23, p. 577-614.

- ²⁶ MARASCHIN, R. P.; ARSEGO, J. L.; CAPEL, L. S.; IANSSEM, C.; CARO, M. S. B.; MARASCHIN, M. Análise química de vinhos catarinenses - dosagem de fenóis totais e antocianinas. In: VITICULTURA e Enologia: atualizando conceitos. Andradadas: EPAMIG, 2002. v. 1, p. 321-323.
- ²⁷ ANDRADE, P. B.; OLIVEIRA, B. M.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. Analysis of phenolic compounds in Spanish Albrariño and Portuguese Alvarinho and Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Electrophoresis**, v. 22, p. 1568-1572, 2001.
- ²⁸ WANG, S.; HUANG, K. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 273-279, 2004.
- ²⁹ CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: I SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA, 1, 2003. Portugal. **Anais...** Portugal: INIFAP, 2003. p. 61-100.
- ³⁰ RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Phenolic compounds. In: HANDBOOK of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments. Chichester: John Wiley, 2006. v. 2, p. 141-203.
- ³¹ WANG, J.; SPORNS, P. Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2009-2015, 1999.
- ³² JACKMANN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural food colorants**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 245-309.
- ³³ HASLAM, E. **Plant polyphenols, vegetable tannins revisited**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 230 p.
- ³⁴ AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. Biotecnologia. In: ALIMENTOS e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1983. v. 5.
- ³⁵ FERNANDÉZ, F. M. T. Viticultura de calidad: factores que afectan al contenido de compuestos fenólicos. **ACE Revista de Enologia**. Disponível em: <http://www.acenologia.com/ciencia59_1.htm>. Acesso em: 02 fev. 2009.
- ³⁶ CHAMPAGNOL, F. **Éléments de physiologie de lavigne et de viticulture générale**. Montpellier: Déhan, 1984. 351p.
- ³⁷ ROGGERO, J. P.; COEN, S.; RAGONNET, B. High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, p. 77-83, 1986.
- ³⁸ VENENCIE, C.; UVEIRA, N.; GUIET, S. Maturité polyphénolique du raisin mise en place d'une méthode d'analyse de routine. **Revue Française d'Oenologie**, v. 167, p. 36-41, 1997.

- ³⁹ PEYNAUD, E. **Enología práctica**: conocimiento y elaboración del vino. Madrid: Mundi-Prensa. 1999. 406 p.
- ⁴⁰ RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves - RS. **Ciência Rural**, v. 37, p. 911-914, 2007.
- ⁴¹ DIAS, J. P. **Centésimo curso intensivo de vinificação**. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Disponível em <<http://www.drapc.min-agricultura.pt>>. Acesso em: 05 jan. 2012.
- ⁴² BAILLOD, M; BAGGIOLINI, M. Lesstadesrepères de lavigne. **Revue Suisse Viticulture Arboriculture et Horticulture**, v. 25, n. 1, p. 7-9, 1993.
- ⁴³ MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. **Food Chemistry**, v. 102, p. 104-112, 2007.
- ⁴⁴ PEYNAUD, E.; BLOUIN, J. **Le gout du vin**: Logrand livre de la degustation. Paris: Dunod, 1996. 268 p.
- ⁴⁵ BUREAU, S. M.; RAZUNGLES, A. L.; BAUMES, R. L. The aroma of Muscat of Frontignan grapes: effect of the light environment of vine or bunch on volatile and glycoconjugates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 2012-2020, 2000.
- ⁴⁶ LAMBRECHTS, M. G.; PRETOTIOUS, I. S. Yead its importance to wine aroma. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 97-129, 2000.
- ⁴⁷ GÜNATA, Z. Y.; BAYONOVE, C. L.; BAUMES, R. L.; CORDONNIER, R. Stability of free and bound fractions of some aroma compounds of grapes cv. Muscat during wine processing: preliminary results. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, p. 112-114, 1986.
- ⁴⁸ FENOLL, J.; MANSO, A; HELLIN, P.; RUIZ, L.; FLORES, P. Changes in aromatic composition of the *Vitis vinifera* grapes Muscat Hamburg during ripening. **Food Chemistry**, v. 114, p. 420-428, 2009.
- ⁴⁹ SELLI, S.; CARBAROGLU, T.; CANBAS, A.; ERTEN, H.; NURGET, C. Effect of skin contact on the aroma composition of the musts of *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Bornova and Narince grown in Turkey. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 341-347, 2003.
- ⁵⁰ BAYONOVE, C. **Les acquisitions récentes chromatographique du vin**: applications á l'analysesensorielle des vins. Paris: Lavoisier, 1993. p. 99-119.
- ⁵¹ SATO, A. J.; BRENNER, E. A.; SANTOS, C. E.; ROBERTO, S. R. Comportamento fenológico e produtivo da videira 'Jacques' (*Vitis bourquiana*) no norte do Paraná. **Acta Science Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 231-237, 2008.

- ⁵² KENNEDY, J. Understanding grape Berry development. **Practical Winery and Vineyard Journal**, Julho/agosto 2002. Disponível em: <<http://practicalwinery.com>>. Acesso em: 05 jan. 2012.
- ⁵³ KOWALSKI, B. R.; SEASHOLTZ, M. B. Recent developments in multivariate calibration. **Journal of Chemometrics**, v. 5, p. 129-145, 1991.
- ⁵⁴ MALINOWSKI, E. R. **Factor analysis in chemistry**. New York: John Wiley, 1991. 350 p.
- ⁵⁵ BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: John Wiley, 1998. 348 p.
- ⁵⁶ MATOS, G. D.; PEREIRA- FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, n. 6, p. 38-50, 2003.
- ⁵⁷ SANTOS NETO, J. R. A.; PEREIRA, F. M.; MARTINS, F. P.; LEITÃO FILHO, H. F. Características e possibilidades do cultivar de videira IAC 138-22. **O Agrônomo**, v. 20, n. 9-10, p. 1-8, 1968.
- ⁵⁸ MESSIAS, C. L. IAC e Unicamp buscam uva e vinho representativos de SP. **Jornal da Unicamp**, 2007. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/novembro2007/ju380pag12.html>. Acesso em: 02 ago. 2010.
- ⁵⁹ BEVILACQUA, G. A. P. Avaliações físico-químicas durante a maturação de videiras cultivadas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 1, n. 3, p. 151-156, 1995.
- ⁶⁰ MARTINEZ, V. R.; MELGAREJO, M. P.; HERNADEZ, G. F. **Prácticas integradas de viticultura**. Madrid: Mundi-Prensa, 2001. 278 p.
- ⁶¹ INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf> Acesso em: 18 jan. 2009.
- ⁶² CASA NOVA, BA. Disponível em: <http://www.bahiaemfoco.com/Casa_Nova>. Acesso em: 10 out. 2008.
- ⁶³ VALE DO SÃO FRANCISCO na rota internacional do enoturismo. Disponível em: <<http://enoturismobrasil.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2008.
- ⁶⁴ BENTO GONÇALVES, RS. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Bento_Gon%C3%A7alves>. Acesso em: 10 out. 2008.
- ⁶⁵ VALE DOS VINHEDOS. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Vale_dos_Vinhedos>. Acesso em: 10 out. 2008.

- ⁶⁶ SÃO CARLOS (São Paulo). Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%A3o_Carlos_\(S%C3%A3o_Paulo\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%A3o_Carlos_(S%C3%A3o_Paulo))>. Acesso em: 10 out. 2008.
- ⁶⁷ PINTO, L. F. G.; CRESTANA, S. Características edafoclimáticas e informações socioeconômicas no diagnóstico de agroecossistemas da região de São Carlos, SP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1325-1329, 2001.
- ⁶⁸ LOUVEIRA, SP. Disponível em: <<http://www.louveira-sp.com.br/Perfil.html>>. Acesso em: 15 nov. 2011.
- ⁶⁹ EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) PECUÁRIA SUDESTE. **Dados meteorológicos**. Disponível em: <http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/dados-meteorologicos/tmp_lista_dados>. Acesso em: 20 set. 2010.
- ⁷⁰ CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS A AGRICULTURA (CPA). Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>> Acesso em: 10 jan. 2011.
- ⁷¹ CASTINO, M. La qualità dell'uva. **Vini d'Italia**, v. 34, n. 5, p. 23-40, 1992.
- ⁷² RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para a elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 192,198, 2002.
- ⁷³ McCARTHY, M. G. The effect of transient water deficit on the grape berry development of Shiraz (*Vitisvinifera L.*). **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, n. 3, p. 102-108, 1997.
- ⁷⁴ aMcCARTHY, M. G.; COOMBE, B. G. Weight loss from ripening grapevines (*Vitisvinifera L.* cv. Shiraz). **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 5, n. 1, p. 10-16, 1999.
- ⁷⁵ bMcCARTHY, M. G. Is the weight loss in ripening grape berries cv. Shiraz caused by the impeded phloem transport?. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 5, n. 1, p. 17-21, 1999.
- ⁷⁶ EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) Semi-Árido. **Dados meteorológicos**. Bebedouro, Petrolina-PE. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em: 05 jan. 2011.
- ⁷³ FALCÃO, L. D.; CHAVES, E. S.; BURIN, V. M.; FALCÃO, A. P.; GRIS, E. F.; BONIN, V.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Maturity of Cabernet Sauvignon berries from grapevines grown with two different training systems in a new grape growing region in Brazil. **Ciencia y Investigación Agraria**, v. 35, n. 3, p. 271-282, 2008.
- ⁷⁴ OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV). **Codes des caractères descriptifs des varieties et espèces de Vitis**. Paris: Office International de La Vigne et Du vin, 1985. 152 p.

- ⁷⁵ DRAGHICI, L.; RAPEANU, G.; HOPULELE, T. Evolution of polyphenolic compounds during maturation of Cabernet Sauvignon grapes from Dealu Mare vineyard. **Ovidius University Annals of Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 15-20, 2011.
- ⁷⁶ FAVERO, A. C.; AMORIM, D. A.; MOTA, R. V.; SOARES, A. M.; REGINA, M. A. Viabilidade de produção da videira Syrah, em ciclo de outono inverno, na região sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 685-690, 2008.
- ⁷⁷ GUERRA, C. C.; DAUD, C. E.; RIZZON, L. A. Evolução dos teores dos ácidos tartárico e málico durante a maturação de uvas tintas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 479-491, 1992.
- ⁷⁸ THE ARABIDOPSIS Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, p. 796-815, 2000.
- ⁷⁹ YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G. K.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J.; SUN, J.; TANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, X.; LIN, W.; YE, C.; TONG, W.; CONG, L.; GENG, J.; HAN, Y.; LI, L.; LI, W.; HU, G.; HUANG, X.; LI, W.; LI, J.; LIU, Z.; LI, L.; LIU, J.; QI, Q.; LIU, J.; LI, L.; LI, T.; WANG, X.; LU, H.; WU, T.; ZHU, M.; NI, P.; HAN, H.; DONG, W.; REN, X.; FENG, X.; CUI, P.; LI, X.; WANG, H.; XU, X.; ZHAI, W.; XU, X.; ZHANG, J.; HE, S.; ZHANG, J.; XU, J.; ZHANG, K.; ZHENG, X.; DONG, J.; ZENG, W.; TAO, L.; YE, J.; TAN, J.; REN, X.; CHEN, X.; HE, J.; LIU, D.; TIAN, W.; TIAN, C.; XIA, H.; BAO, Q.; LI, G.; GAO, H.; CAO, T.; WANG, J.; ZHAO, W.; LI, P.; CHEN, W.; WANG, X.; ZHANG, Y.; HU, J.; WANG, J.; LIU, S.; YANG, J.; ZHANG, G.; XIONG, Y.; LI, Z.; MAO, L.; ZHOU, C.; ZHU, Z.; CHEN, R.; HAO, B.; ZHENG, W.; CHEN, S.; GUO, W.; LI, G.; LIU, Q.; TAO, M.; WANG, J.; ZHU, L.; YUAN, L.; YANG, H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). **Science**, v. 296, p. 79-92, 2002.
- ⁸⁰ VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613– 646, 2005.
- ⁸¹ OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 373-378, 1998.
- ⁸² FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002.
- ⁸³ GOODACRE, R. Metabolomics – the way forward. **Metabolomics**, v. 1, p. 1-2, 2005.
- ⁸⁴ SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.
- ⁸⁵ MALONEY, V. Plant metabolomics. **BioTeach Journal**, v. 2, p. 92-99, 2004. Disponível em: <<http://www.bioteach.ubc.ca>>. Acesso em: 20 fev. 2012.
- ⁸⁶ BLINGLY, R.; DOUCE, R. NMR and plant metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 191-196, 2001.

- ⁸⁷ ROBERTS, J. K. M. NMR adventures in the metabolic labyrinth within plants. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 30-34, 2000.
- ⁸⁸ WARD, J. L.; HARRIS, C.; LEWIS, J.; BEALE, M.H. Assessment of ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 949-957, 2003.
- ⁸⁹ CHEN, L.; CARPITA, N.C.; REITER, W.-D.; WILSON, R.H.; JEFFRIES, C.; McCANN, M.C. A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. **Plant Journal**, v. 16, p. 385-392, 1998.
- ⁹⁰ COIMBRA, M.A.; BARROS, A.; BARROS, M.; RUTLEDGE, D.N.; DELGADILLO, I. Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Polymer**, v. 37, p. 241-248, 1998.
- ⁹¹ TOLSTIKOV, R.N.; FIEHN, O. Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectroscopy. **Annals of Biochemistry**, v. 301, p. 298-307, 2002.
- ⁹² SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. São Paulo: Bookman, 2002. 836 p.
- ⁹³ LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. **High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice**. London, Chapman & Hall, 1996. 276 p.
- ⁹⁴ BLANC, T.; SCHAUFELBERGER, D. E.; GUZMAN, N. A. **Analytical instrumentation handbook: capillary electrophoresis**. 2. ed. Las Vegas: Marcel Dekker, 1997. 80p.
- ⁹⁵ BAKER, D. R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley, 1995. 244p.
- ⁹⁶ LANDERS, J. P. **Handbook of capillary electrophoresis**. Boca Raton: CRC, 1997. p. 348-372.
- ⁹⁷ TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.
- ⁹⁸ TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.
- ⁹⁹ FRASER, P. D.; PINTO, E. S.; HOLLOWAY, D. E.; BRAMLEY, P. M. Application of high performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. **The Plant Journal**, v. 24, p. 551-558, 2000.
- ¹⁰⁰ HUHMAN, D. H.; SUMNER, L. W. Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. **Phytochemistry**, v. 59, p. 347-360, 2002.

- ¹⁰¹ QUEIRÓZ, E. F.; WOLFENDER, J. L.; ATINDEHOU, K. K.; TRAORE, D.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatography micro-fractionation. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 123-134, 2002.
- ¹⁰² ZHANG, J.; SUN, X.; ZHANG, Z.; NI, Y.; ZHANG, Q.; LIANG, X.; XIAO, H.; CHEN, J.; TOKUHISA, J. G. Metabolite profiling of Arabidopsis seedlings in response to exogenous sinalbin and sulfur deficiency. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1767-1778, 2011
- ¹⁰³ ROVIO, S.; YLI-KAUHALUOMA, J.; SIRÉN, H. Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection. **Electrophoresis**, v. 28, p. 3129-3135, 2007.
- ¹⁰⁴ ROVIO, S.; SIMOLIN, H.; KOLJONEN, K.; SIRÉN, H. Determination of monosaccharide composition in plant fiber materials by capillary zone electrophoresis **Journal of Chromatography A**, v. 1185, p. 139-144, 2008.
- ¹⁰⁵ LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004.
- ¹⁰⁶ HENDRIKS, M. M. W. B.; CRUZ-JUAREZ, L.; BONT, D. D.; HALL, R. D. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, p. 53-64, 2005.
- ¹⁰⁷ MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. Chromatographic profiles of Phyllanthus aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 469-481, 2011.
- ¹⁰⁸ FAN, X. H.; CHENG, Y. Y.; YE, Z. L.; LIN, R. C.; QIAN, Z. Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 217-224, 2006.
- ¹⁰⁹ XU, S.; YANG, L.; TIAN, R.; WANG, Z.; LIU, Z.; XIE, P.; FENG, Q. Fingerprint analysis of *Ligusticum chuanxiong* using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2136-2141, 2009.
- ¹¹⁰ LI, B. Y.; HU, H.; LIANG, Y. Z.; XIE, P. S.; DU, Y. P. Quality evaluation of fingerprints of herbal medicine with chromatographic data. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, p. 69-77, 2004.
- ¹¹¹ YI, L.-Z.; YUAN, D.-L.; LIANG, Y.-Z.; XIE, P.-X.; ZHAO, Y. Fingerprint alterations of secondary metabolites of tangerine peels during growth by HPLC-DAD and chemometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, p. 43-51, 2009.
- ¹¹² CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2004. 113 p.

- ¹¹³ FAVAREL, J. L. L'acidité tartrique et l'acidité: du moût au vin. In: LA MICROBIOLOGIE des vins mousseux: la stabilisation des vins: mecanismes et evaluation. Toulouse, 1994. p. 87-94.
- ¹¹⁴ MONGAY, C.; PASTOR, A.; OLMOS, C. Determination of carboxylic acids and inorganic anions in wines by ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 736, p. 351-357, 1996.
- ¹¹⁵ VONACH, R.; LENDL, B.; KELLMER, R. High performance liquid chromatography with real-time Fourier transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 824, p. 159-167, 1998.
- ¹¹⁶ CASTELLARI, M.; VARSARI, A.; SPINABELLI, U.; GALASSI, S.; AMATI, A. An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates and alcohols in grape musts and wines. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.23, p.2047-2056, 2000.
- ¹¹⁷ BUGLASS, A. J.; LEE, S. H. Sequential analysis of malic and both enantiomers of lactic acid in wine using high-performance liquid chromatographic column: switching procedure. **Journal of Chromatographic Science**, v. 39, p. 453-458, 2001.
- ¹¹⁸ PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C. TOMÁS, V.; MARTÍN, J. High performance liquid chromatography separation of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, p. 57-64, 2004.
- ¹¹⁹ KEREM, Z.; BRAVDO, B.; SHOSEYOV, O.; TUGENDHAFT, Y. Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic in red wines and must. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, p. 211-215, 2004.
- ¹²⁰ PERES, R. G.; MORAES, E. P.; MICKE, G. A.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Control**, v. 20, p. 548-552, 2009.
- ¹²¹ SCHNEIDER, A.; GERBI, V.; REDOGLIA, M. A rapid HPLC method for separation and determination of a major organic acids in grape musts and wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 38, p. 151-155, 1987.
- ¹²² GARCÍA-ROMERO, E.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, G.; MARTÍN-ALVAREZ, P. J.; CABEZUDO-IBAÑEZ, M. D. Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 655, p. 111-117, 1993.
- ¹²³ BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. J.; TORIBIO, L.; DEL ALAMO, M. HPLC analysis of carbohydrates in wines and instant coffees using anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection. **Journal of Food Chemistry**, v. 44, p. 507-511, 1996.
- ¹²⁴ VUORINEN, T.; ALÉN, R. In: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical methods in wood chemistry, pulpung and papermaking**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. p. 38.

- ¹²⁵ DAHLMAN, O.; JACOBS, A.; LILJENBERG, A.; OLSSON, A. I. Analysis of carbohydrates in wood and pulps employing enzymatic hydrolysis and subsequent capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 891, p. 157-174, 2000.
- ¹²⁶ BERTAUD, F.; SUNDBERG, A.; HOLMBOM, B. Evaluation of acid methanolysis for analysis of wood hemicelluloses and pectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 319-324, 2002.
- ¹²⁷ WILLFÖR, S.; SJÖHOLM, R.; LAINE, C.; ROSLUND, M.; HEMMING, J.; HOLMBOM, B. Characterization of water-soluble galactoglucomannans from Norway spruce wood and thermomechanical pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 175-187, 2003.
- ¹²⁸ LISBOA, S.A.; EVTUGUIN, D.V.; PASCOAL NETO, C.; GOODFELLOW, B.J. Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in *Eucalyptus globulus* kraft black liquors. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 77-85, 2005.
- ¹²⁹ LEE, Y. -H.; LIN, T. -I. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. **Journal of Chromatography B**, v. 681, p. 87-97, 1996.
- ¹³⁰ HOFFSTETTER-KUHN, S.; PAULUS, A.; GASSMANN, E.; WIDMER, H. M. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 1541-1547, 1991.
- ¹³¹ ZEEMAN, A.; NGUYEN, D. T.; BONN, G. Fast separation of underivatized carbohydrates by coelectroosmotic capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 18, p. 1142-1147, 1997.
- ¹³² JAGER, A. V.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Sciences**, v. 30, p. 586-594, 2007.
- ¹³³ HARBORNE, J. B. **The flavonoids**. New York: Chapman & Hall, 1994. 676 p.
- ¹³⁴ HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.
- ¹³⁵ REVILLA, E.; RYAN, J. M. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography—photodiode array detection without sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 461-469, 2000.
- ¹³⁶ BROUSSAUD, F.; CHEYNIER, V.; ASSELIN, C.; MOUTOUNET, M. Flavonoid compositional differences of grapes among site test plantings of Cabernet Franc. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 277-284, 1999.

- ¹³⁷ OJEDA, H.; ANDARY, C.; CREABA, E.; CARBONNEAU, A.; DELOIRE, A. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* var. Shiraz. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 261-267, 2002.
- ¹³⁸ MONTEALEGRE, R. R.; PECES, R. R.; VOZMEDIANO, J. L. C.; GASCUEÑA, J. M.; ROMERO, E. G. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 687-693, 2006.
- ¹³⁹ WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, p. 485-493, 2001.
- ¹⁴⁰ YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHENG, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.
- ¹⁴¹ HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- ¹⁴² MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113p.
- ¹⁴³ MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 396-404, 2006.
- ¹⁴⁴ HOSHINO, T.; MATSUMOTO, U.; GOTO, T. The stabilizing effect of the acyl group on the co-pigmentation of acylated anthocyanins with C-glucosylflavones. **Phytochemistry**, v. 19, p. 663-667, 1980.
- ¹⁴⁵ OSAWA, Y. Copigmentation of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food colours**. New York :Academic Press. 1982. p. 41-68.
- ¹⁴⁶ DOWNEY, M. O.; HARVEY, J. S.; ROBINSON, S. P. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 9, p. 110-121, 2003.
- ¹⁴⁷ FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDRE, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 890-894, 1995.
- ¹⁴⁸ GIOVANELLI, G.; BRENNIA, O. V. Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties. **European Food Research Technology**, v. 225, p. 145-150, 2007.

- ¹⁴⁹ CZOCHANSKA, Z.; FOO, L. Y.; PORTER, L. J. Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1819-1822, 1979.
- ¹⁵⁰ ROMEYER, F. M.; MACHEIX, J. J.; SAPIS, J. C. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. **Phytochemistry**, v. 25, p. 219-221, 1986.
- ¹⁵¹ do Ó-MARQUES, J.; REGUINGA, R.; LAUREANO, O.; RICARDO-DA-SILVA, J. M. Changes in grape seed, skin and pulp condensed tannins during Berry ripening: effect of fruit pruning. **Ciência Técnica Vitivinícola**, v. 20, p. 35-52, 2005.
- ¹⁵² FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Review of Food Science Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.
- ¹⁵³ TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 27, p. 97-105, 1976.
- ¹⁵⁴ RYAN, J. M.; REVILLA, E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 3372-3378, 2003.
- ¹⁵⁵ SEGADE, S. R.; VÁZQUEZ, E. S.; LOSADA, E. D. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 599-607, 2008.
- ¹⁵⁶ SANTOS, C.; MUÑOZ, S. S.; GUTOERREZ, Y.; HEBRERO, E.; VICENTE, J. L.; GALINDO, P.; RIVAS, J. C. Characterization of young red wines by application of HJ biplot analysis to anthocyanin profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.1086, 1991.
- ¹⁵⁷ GARCIA-BENEYTEZ, E.; REVILLA, E.; CABELLO, F. Anthocyanin pattern of several grape cultivars and wines made from them. **European Food Research Technology**, v. 215, p. 32-37, 2002.
- ¹⁵⁸ STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.
- ¹⁵⁹ LANGCAKE, P. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. **Physiological Plant Pathology**, v. 18, p. 213, 1981.
- ¹⁶⁰ FRÉMONT, F. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, p. 663-673, 2000.
- ¹⁶¹ GERMAN, J. B.; WALZEM, L. R. The health benefits of wine. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, p. 561-593, 2000.
- ¹⁶² RENAUD, S.; de LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523-1526, 1992.

- ¹⁶³ KIM, D.; LEE, C. Y. Extraction and isolation of polyphenolics. In: CURRENT protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley, 2002. p. I1.2.1-I1.2.12.
- ¹⁶⁴ HERTOOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1591-1598, 1992.
- ¹⁶⁵ ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, p.79-86, 2008.
- ¹⁶⁶ LEE, C. Y.; JAWORSKI, A. W. Identification of some phenolics in white grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, p. 87-89, 1990.
- ¹⁶⁷ KAMMERER, D.; CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4360-4367, 2004.
- ¹⁶⁸ IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 589-598, 2008.
- ¹⁶⁹ LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE, C.; MIRÓ, M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 922, p. 359-363, 2001.
- ¹⁷⁰ de PASCUAL-TERESA, S.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDES, Y.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from unripe almond fruits. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 21-27, 1998.
- ¹⁷¹ SKOV, T.; VAN DEN BERG, F.; TOMASI, G.; BRO, R. Automated alignment of chromatographic data. **Journal of Chemometrics**, v. 20, p. 484-497, 2006.
- ¹⁷² van NEDERKASSEL, A. M.; XU, C. J.; LANCELIN, P.; SARRAF, M.; MACKENZIE, D. A.; WALTON, N. J.; BENSAD, F.; MEES, M.; MARTIN, G. J.; DESMURS, J. R.; MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDER HEYDEN, Y. Chemometric treatment of vanillin fingerprint chromatograms: Effect of different signal alignments on principal component analysis plots. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, p. 291-298, 2006.
- ¹⁷³ BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003.
- ¹⁷⁴ LABORDE, B.; MOINE-LECOUX, V.; RICHARD, T.; SAUCIER, C.; BUCOURDIEU, D.; MONTI, J.-P. PVPP-polyphenol complexes: a molecular approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4383-4389, 2006.
- ¹⁷⁵ SCHERER, R.; RYBKA, A. C. P.; GODOY, H. T. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju. **Química Nova**, v. 31, p.1137-1140, 2008

- ¹⁷⁶ LIANG, Z.; SANG, M.; FAN, P.; WU, B.; WANG, L.; DUAN, W.; LI, S. Changes of polyphenols, sugars and organic acids in 5 *Vitis* Genotypes during berry ripening. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C1231-C1238, 2011.
- ¹⁷⁷ SOULIS, T.P.; AVGERINOS A. Changes in the glucose:fructose ratio during the growth period of the Razaki grape. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 35, p. 527–530, 1984.
- ¹⁷⁸ RIBÉREAU–GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBÉREAU-GAYON, P. **Traité d'oenologie, science et techniques du vin**. Paris: Dunod, 1975. 556p.
- ¹⁷⁹ WU, X.; PRIOR, R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3101-3113, 2005.
- ¹⁸⁰ DE VILLIERS, A.; VANHOENACKER, G.; MAJEK, P.; SANDRA, P. Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 195-204, 2004.
- ¹⁸¹ BURNS, J.; MULLEN, W.; LANDRAULT, N.; TEISSEDRE, P.-L.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from cabernet sauvignon and hybrid grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4096-4102, 2002.
- ¹⁸² WANG, H.; RACE, E. J.; SHRIKHANDE, A. J. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1839-1844, 2003.
- ¹⁸³ BOSS, P. K.; DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulations. **Plant Physiology**, v. 111, p. 1059-1066, 1996.
- ¹⁸⁴ TESNIERE, C.; VERRIES, C. Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. **Plant Science**, v. 157, p. 77-88, 2000.
- ¹⁸⁵ DELUC, L. G.; GRIMPLET, J.; WHEATLEY, M. D.; TILLER, R. L.; QUILICI, D. R.; OSBORNE, C.; SCHOOLEY, D. A.; SCBLAUCH, K. S.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G. R. Transcriptomic and metabolite analysis of Cabernet Sauvignon grape berry development. **BMC Genomics**, v. 8, p. 429, 2007.
- ¹⁸⁶ MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341, 1995.
- ¹⁸⁷ STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 54, p. 237, 2000.

- ¹⁸⁸ MAZZUCA, P.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, G.; CHIANESE, L.; ADDEO, F. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 83-90, 2005.
- ¹⁸⁹ BOIDO, E.; GARCÍA-MARINO, M.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F.; RIVAS-GONZALO, J.C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M.T. Characterisation and evolution of grape polyphenol profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat during ripening and vinification. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 17, p. 383-393, 2011.
- ¹⁹⁰ WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, 1995.
- ¹⁹¹ GONZÁLEZ-FERNANDES, R.; PRATS, E.; JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jbb/2010/932527/>>. Acesso em: 10 set. 2011.
- ¹⁹² JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M. A.; CURTO, M.; VALERO, J.; SGHAIER, B.; DONOSO, G.; REDONDO, I. Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 285-314, 2009.
- ¹⁹³ ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa, 2005. p. 1-12. (Comunicado Técnico 136).
- ¹⁹⁴ LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- ¹⁹⁵ BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- ¹⁹⁶ SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bichinchonic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- ¹⁹⁷ COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, p. 369-374, 1985.
- ¹⁹⁸ FANGER, B. O. Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 11-17, 1987.

- ¹⁹⁹ CORTHALS, G. L.; WASINGER, V. C.; HOCHSTRASSER, D. F.; SANCHEZ, J. C. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1104-1115, 2000.
- ²⁰⁰ TRIBL, F.; LOHAUS, C.; DOMBERT, T.; LANGENFELD, E.; PIECHURA, H.; WARSCHIED, B.; MEYER, H. E.; MARKUS, K. Towards multidimensional liquid chromatography separation of proteins using fluorescence and isotope-coded protein labelling for quantitative proteomics. **Proteomics**, v. 8, p. 1204-1211, 2008.
- ²⁰¹ 2-D ELECTROPHORESIS, principles and methods – GE Healthcare. Disponível em: <[http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/\\$file/80642960.pdf](http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/$file/80642960.pdf)> Acesso em: 12 mar. 2007.
- ²⁰² CANTÚ, M. D. **Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citros**. 2007. 229 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- ²⁰³ HAMES, B. D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press. 2002. 345 p.
- ²⁰⁴ CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.
- ²⁰⁵ TAL, M.; SILBERSTEIN, A.; NUSSER, E. Why does Coomassie Brilliant Blue-R Interact differently with different proteins – a partial answer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 9976-9980, 1985.
- ²⁰⁶ MORRISEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrilamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307-310, 1981.
- ²⁰⁷ GUTERRES, S. B. **Busca de biomarcadores para esquizofrenia em plaquetas utilizando eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE) e espectrometria de massas**. 2011. 186 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- ²⁰⁸ ÜNLÜ, M.; MORGAN, M. E.; MINDEN, J. S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2071-2077, 1997.
- ²⁰⁹ HAGER, J. W. Recent trends in mass spectrometer development. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 845-850, 2004.
- ²¹⁰ FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M.; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64-71, 1989.
- ²¹¹ KARAS, M.; HILLENKAMP, F.; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 2299-2301, 1988.

- ²¹² ARDREY, B. **Liquid chromatography-mass spectrometry**: an introduction. New York: John Wiley, 2003. 276 p.
- ²¹³ ZENOBI, R.; KNOCHENMUSS, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 17, p. 337-366, 1998.
- ²¹⁴ DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, p. 212-217, 2006.
- ²¹⁵ NESVIZHSKII, A. I.; VITEK, O.; AEBERSOLD, R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. **Nature Methods**, v. 4, p. 787-797, 2007.
- ²¹⁶ CHEN, S.; HARMON, A. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.
- ²¹⁷ RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 663-670, 2003.
- ²¹⁸ KARP, N. A.; LILLEY, K. S. Design and analysis issues in quantitative proteomics studies. **Proteomics**, v. 2, p. 42-50, 2007.
- ²¹⁹ JAILLON, O.; AURY, J. M.; NOEL, B.; POLICRITI, A.; CLEPET, C.; CASAGRANDE, A.; CHOISNE, N.; AUBOURG, S.; VITULO, N.; JUBIN, C.; VEZZI, A.; LEGEAI, F.; HUGUENEY, P.; DASILVA, C.; HORNER, D.; MICA, E.; JUBLOT, D.; POULAIN, J.; BRUYÈRE, C.; BILLAULT, A.; SEGURENS, B.; GOUYVENOUX, M.; UGARTE, E.; CATTONARO, F.; ANTHOUARD, V.; VICO, V.; DEL FABBRO, C.; ALAUX, M.; DI GASPERO, G.; DUMAS, V.; FELICE, N.; PAILLARD, S.; JUMAN, I.; MOROLDO, M.; SCALABRIN, S.; CANAGUIER, A.; LE CLAINCHE, I.; MALACRIDA, G.; DURAND E.; PESOLE, G.; LAUCOU, V.; CHATELET, P.; MERDINOGLU, D.; DELLEDONNE, M.; PEZZOTTI, M.; LECHARNY, A.; SCARPELLI, C.; ARTIGUENAVE, F.; VALLE, G.; MORGANTE, M.; CABOCHE, M.; ADAM-BLONDON, A. F.; WEISSENBAACH, J.; QUÉTIER, F.; WINCKER, P. French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. **Nature**, v. 449, p. 463-467, 2007.
- ²²⁰ SCHMUTZ, J.; SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X. C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, p. 178-183, 2010.

- ²²¹ SCHNABLE, P. S.; WARE, D.; FULTON, R. S.; STEIN, J. C.; WEI, F.; PASTERNAK, S.; LIANG, C.; ZHANG, J.; FULTON, L.; GRAVES, T. A.; MINX, P.; REILY, A. D.; COURTNEY, L.; KRUCHOWSKI, S. S.; TOMLINSON, C.; STRONG, C.; DELEHAUNTY, K.; FRONICK, C.; COURTNEY, B.; ROCK, S. M.; BELTER, E.; DU, F.; KIM, K.; ABBOTT, R. M.; COTTON, M.; LEVY, A.; MARCHETTO, P.; OCHOA, K.; JACKSON, S. M.; GILLAM, B.; CHEN, W.; YAN, L.; HIGGINBOTHAM, J.; CARDENAS, M.; WALIGORSKI, J.; APPLEBAUM, E.; PHELPS, L.; FALCONE, J.; KANCHI, K.; THANE, T.; SCIMONE, A.; THANE, N.; HENKE, J.; WANG, T.; RUPPERT, J.; SHAH, N.; ROTTER, K.; HODGES, J.; INGENTHRON, E.; CORDES, M.; KOHLBERG, S.; SGRO, J.; DELGADO, B.; MEAD, K.; CHINWALLA, A.; LEONARD, S.; CROUSE, K.; COLLURA, K.; KUDRNA, D.; CURRIE, J.; HE, R.; ANGELOVA, A.; RAJASEKAR, S.; MUELLER, T.; LOMELI, R.; SCARA, G.; KO, A.; DELANEY, K.; WISSOTSKI, M.; LOPEZ, G.; CAMPOS, D.; BRAIDOTTI, M.; ASHLEY, E.; GOLSER, W.; KIM, H.; LEE, S.; LIN, J.; DUJMIC, Z.; KIM, W.; TALAG, J.; ZUCCOLO, A.; FAN, C.; SEBASTIAN, A.; KRAMER, M.; SPIEGEL, L.; NASCIMENTO, L.; ZUTAVERN, T.; MILLER, B.; AMBROISE, C.; MULLER, S.; SPOONER, W.; NARECHANIA, A.; REN, L.; WEI, S.; KUMARI, S.; FAGA, B.; LEVY, M. J.; MCMAHAN, L.; VAN BUREN, P.; VAUGHN, M. W.; YING, K.; YEH, C. T.; EMRICH, S. J.; JIA, Y.; KALYANARAMAN, A.; HSIA, A. P.; BARBAZUK, W. B.; BAUCOM, R. S.; BRUTNELL, T. P.; CARPITA, N. C.; CHAPARRO, C.; CHIA, J. M.; DERAGON, J. M.; ESTILL, J. C.; FU, Y.; JEDDELOH, J. A.; HAN, Y.; LEE, H.; LI, P.; LISCH, D. R.; LIU, S.; LIU, Z.; NAGEL, D. H.; MCCANN, M. C.; SANMIGUEL, P.; MYERS, A. M.; NETTLETON, D.; NGUYEN, J.; PENNING, B. W.; PONNALA, L.; SCHNEIDER, K. L.; SCHWARTZ, D. C.; SHARMA, A.; SODERLUND, C.; SPRINGER, N. M.; SUN, Q.; WANG, H.; WATERMAN, M.; WESTERMAN, R.; WOLFGRUBER, T. K.; YANG, L.; YU, Y.; ZHANG, L.; ZHOU, S.; ZHU, Q.; BENNETZEN, J. L.; DAWES, R. K.; JIANG, J.; JIANG, N.; PRESTING, G. G.; WESSLER, S. R.; ALURU, S.; MARTIENSSSEN, R. A.; CLIFTON, S. W.; MCCOMBIE, W. R.; WING, R. A.; WILSON, R. K. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. **Science**, v. 326, p. 1112-1115, 2009.
- ²²² JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; CASTILLEJO, M. A. Plant proteome analysis: a 2006 update. **Proteomics**, v. 7, p. 2947-2962, 2007.
- ²²³ CÁNOVAS, F. M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBERT, G.; JORRÍN, J.; MOCK, H. P.; ROSSIGNOL, M. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, p. 285-298, 2004.
- ²²⁴ ROSSIGNOL, M.; PELTIER, J. B.; MOCK, H. P.; MATROS, A.; MALDONADO, A. M.; JORRÍN, J. V. Plant proteome analysis: A 2004–2006 update. **Proteomics**, v. 6, p. 5529-5548, 2006.
- ²²⁵ MACHEREL, D.; BENAMAR, A.; AVELANGE-MACHEREL, M. H.; TOLLETER, D. Function and stress tolerance of seed mitochondria. **Physiology Plantarum**, v. 129, p. 233-241, 2007.
- ²²⁶ HOCHHOLDINGER, F.; SAUER, M.; DEMBINSKY, D.; HOECKER, N.; MUTHREICH, N.; SALEEM, M.; LIU, Y. Proteomic dissection of plant development. **Proteomics**, v. 6, p. 4076-4083, 2006.

- ²²⁷ ABDI, N.; HOLFORD, P.; McGLASSON, B. Application of two-dimensional gel electrophoresis to detect proteins associated with harvest maturity in stonefruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, p. 1-13, 2002.
- ²²⁸ SGHAIER-HAMMAMI, B.; VALLEDOR, L.; DRIRA, NOUREDDINE; JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomic analysis of the development and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos. **Proteomics**, v. 9, p. 2543-2554, 2009.
- ²²⁹ GONZALEZ-BUITRAGO, J. M.; FERREIRA, L.; ISIDORO-GARCIA, M.; SANZ, C.; LORENTE, F.; DAVILA, I. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 385, p. 21-27, 2007.
- ²³⁰ SOTKOVSKY, P.; HUBALEK, M.; HERNYCHOVA, L.; NOVAK, P.; HAVRANOVA, M.; SETINOVA, I. et al. Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. **Proteomics**, v. 8, p. 1677-1691, 2008.
- ²³¹ SALEKDEH, G. H.; KOMATSU, S. Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. **Proteomics**, v. 7, p. 2976-2996, 2007.
- ²³² SAZ, J. M.; MARINA, M. L. High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of soybean proteins and peptides in foodstuffs. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 431-451, 2007.
- ²³³ GRINYER, J.; HUNT, S.; MCKAY, M.; HERBERT, B. R.; NEVALAINEN, H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, v. 47, p. 381-388, 2005.
- ²³⁴ GRINYER, J.; MCKAY, M.; HERBERT, B.; NEVALAINEN, H. Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. **Current Genetics**, v. 45, p. 170-175, 2004.
- ²³⁵ WANG, W.; TAI, F.; CHEN, S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomic analysis. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 2032-2039, 2008.
- ²³⁶ SARAVANAN, R. S.; ROSE, J. K. C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v. 4, p. 2522-2532, 2004.
- ²³⁷ HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, v. 81, p. 802-806, 1986.
- ²³⁸ CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497-507, 2005.
- ²³⁹ WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomics analysis. **Electrophoresis**, v. 27, p. 2782-2786, 2006.

- ²⁴⁰ MATHAR, H.; BASHA, S. M.; LU, J. Variation in berry protein composition of muscadine cultivars. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 87-91, 2002.
- ²⁴¹ PUEYO, E.; DIZY, M.; POLO, C. Varietal differentiation of must and wines by means of protein fraction. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 27, p. 255-261, 1993.
- ²⁴² FERREIRA, R. B.; PIÇARRA-PEREIRA, M. A.; MONTEIRO, S.; LOUREIRO, V. B.; TEIXEIRA, A. R. The wine proteins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, p. 230-239, 2002.
- ²⁴³ TATTERSALL, D. B.; HEESWIJCK, R.; HOJ, P. B. Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. **Plant Physiology**, v. 114, p. 759-769, 1997.
- ²⁴⁴ FERREIRA, R.; MONTEIRO, S.; PIÇARRA-PEREIRA, M.; TEIXEIRA, A. Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 168-173, 2004.
- ²⁴⁵ WATERS, E. J.; HAYASAKA, Y.; TATTERSALL, D. B.; ADAMS, K. S.; WILLIAMS, P. J. Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4950-4957, 1998.
- ²⁴⁶ DERCKEL, J. P.; LEGENDRE, L.; AUDRAN, J.-C.; HAYE, B.; LAMBERT, B. Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. **Plant Science**, v. 119, p. 31-37, 1996.
- ²⁴⁷ GIANNIKIS, C.; BUCHELI, C. S.; SKENE, K. G. M.; ROBINSON, S. P.; STEELE-SCOTT, N. Chitinase and β -1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 4, p. 14-22, 1998.
- ²⁴⁸ ROBINSON, S. P.; JACOBS, A. K.; DRY, I. B. Gene regulation and molecular genetics. **Plant Physiology**, v. 114, p. 771-778, 1997.
- ²⁴⁹ COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **Plant Journal**, v. 3, p. 31, 1993.
- ²⁵⁰ ZEMANEK, A.B.; KO, T.-S.; THIMMAPURAM, J.; HAMMERSCHLAG, F.A.; KORBAN, S.S. Changes in β -1, 3-glucanase mRNA levels in peach in response to treatment with pathogen culture filtrates, wounding, and other elicitors. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 877-889, 2002.
- ²⁵¹ BUCHNER, P.; ROCHAT, C.; WUILLEME, S.; BOUTIN, J. P. Characterisation of a tissue-specific and developmentally regulated β -1,3-glucanase gene in pea. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 171-186, 2002.
- ²⁵² MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2318-2331, 2006.

- ²⁵³ NÚÑEZ-DELICADO, E.; SERRANO-MEGÍAS, M.; PÉREZ-LÓPEZ, A. J.; LÓPEZ-NICOLÁS, J. M. Polyphenol oxidase from Dominga table grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 6087-93, 2005.
- ²⁵⁴ GIRIBALDI, M.; PERUGINI, I.; SAUVAGE, F. -X.; SCHUBERT, A. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Proteomics*, v. 7, p. 3154-3170, 2007.
- ²⁵⁵ DEYTIEUX, C.; GENY, L.; LAPALLERIE, D.; CLAVEROL, S.; BONNEU, N.; DONÈCHE, B. Proteome analysis of grape skins during ripening. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 1851-1862, 2007.
- ²⁵⁶ DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, v. 7, p. 52-54, 1986.
- ²⁵⁷ WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, v. 24, p. 2369-2375, 2003.
- ²⁵⁸ GRIMPLET, J.; WHEATLEY, M. D.; HOUIRA, H. B.; DELUC, L. G.; CRAMER, G. R.; CUSHMAN, J. C. Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well-watered and water-deficit stress conditions. *Proteomics*, v. 9, p. 2503-2528, 2009.
- ²⁵⁹ NIA ARRAY ANALYSIS. Disponível em: <<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>>. Acesso em: 10 out 2011.
- ²⁶⁰ MASCOT MATRIX SCIENCE. Disponível em: <<http://www.matrixscience.com>>. Acesso em: 10 nov. 2011.
- ²⁶¹ NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>>. Acesso em: 25 nov. 2011.
- ²⁶² UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE (UniProt). Disponível em: <<http://www.uniprot.org/>>. Acesso em: 20 dez. 2011.
- ²⁶³ NEGRI, A. S.; PRINSI, B.; ROSSINI, M.; FAILLA, O.; SCIENZA, A.; COCUCCHI, M.; ESPEN, L. Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. *BMC Genomics*, v. 9, p. 378-396, 2008.
- ²⁶⁴ GILBERT, L.; ALHAGDOWI, M.; NUNES-NESE, A.; QUEMENER, B.; GUILLON, F.; BOUCHET, B.; FAUROBERT, M.; GOUBLE, B.; PAGE, D.; GARCIA, V.; PETIT, J.; STEVENS, R.; CAUSSE, M.; FERNIE, A. R.; LAHAYE, M.; ROTHAN, R.; BALDET, P. GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *The Plant Journal*, v. 60, p. 499-508, 2009.
- ²⁶⁵ WOLUCKA, B.A.; van MONTAGU, M. The VTC2 cycle and the de novo biosynthesis pathways for vitamin C in plants: an opinion. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2602-2613, 2007.

- ²⁶⁶ HAWKER, J. S. Changes in the activity of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. **Phytochemistry**, v. 8, p. 9-17, 1969.
- ²⁶⁷ DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues. **Plant Physiology**, v. 111, p. 275-283, 1996.
- ²⁶⁸ EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE (EMBL-EBI). Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk>>. Acesso em: 01 mar. 2012.
- ²⁶⁹ EISENBERG, D.; ALMASSY, R. J.; JANSON, C. A.; CHAPMAN, M. S.; SUH, S. W.; CASCIO, D.; SMITH, W. W. Some evolutionary relationships of the primary biological catalysts glutamine synthetase and RuBisCO. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 52, p. 483-90, 1987.
- ²⁷⁰ BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York: WH Freeman, 2002. p. 476.
- ²⁷¹ MARSH, J. J.; LEBHERZ, H. G. Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, p. 110-113, 1992.
- ²⁷² BROGLIE, R.; CORUZZI, G. LAMPPA, G.; KEITH, B.; CHUA, N. H. Structural analysis of nuclear genes coding for the precursor to the small subunit of wheat ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. **Biotechnology**, v. 1, p. 55-61, 1983.
- ²⁷³ PICHERSKY, E.; BERNATZKY, R. TANKSLEY, S. D.; CASHMORE, A. R. Evidence for selection as a mechanism in the concerted evolution of *Lycopersicon esculentum* (tomato) genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 3880-3884, 1986.
- ²⁷⁴ LIU, X.D.; SHEN, Y. G. NaCl-induced phosphorylation of light harvesting chlorophyll a/b proteins in thylakoid membranes from the halotolerant green alga, *Dunaliella salina*. **FEBS Letters**, v. 569, p. 337-340, 2004.
- ²⁷⁵ ORENES-PIÑERO, E.; GARCÍA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A. Latent of polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): Purification, activation and some properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2172-2178, 2006.
- ²⁷⁶ GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 609-615, 2004.
- ²⁷⁷ SERRANO-MARTÍNEZ, A.; FORTEA, M. I.; del AMOR, F. M.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. **Food Chemistry**, v. 107, p. 193-199, 2008.
- ²⁷⁸ LIU, J. -J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, p. 3-13, 2006.

²⁷⁹ NEUHAUS, J. M.; FRITIG, B.; LINHORST, H. J.M.; MEINS JR, F.; MIKKELSEN, J. D.; RYALS, J. A revised nomenclature for chitinase genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 14, p. 102–104, 1996.

²⁸⁰ JOLLÈS, P.; MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin and chitinases**. Basel: Birkhäuser, 1999. 340 p.

²⁸¹ ROBINSON, S. P.; DAVIES, C. Molecular biology of grape berry ripening. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 6, p. 175-188, 2000.

APÊNDICE I

Resultados obtidos para as proteínas identificadas pelo Mascot e perfil de expressão nas amostras avaliadas.

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
Metabolismo de carboidratos									
6408	6,05	6,70	42,8	45,1	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a GDPmanose epimerase 1 isoforma 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 147794688	366	31%
2601	4,60	4,64	71,8	59,9	vacuolar invertase 1, GIN1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 1839578	311	19%
6204	8,45	6,58	36,7	34,8	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar à glucana endo-1,3-betaglucosidase [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225441373	593	37%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
7102	8,45	6,99	36,7	34,2	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar à glucana endo-1,3-betaglucosidase [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225441373	591	35%
8213	6,49	7,47	29,6	32,1	proteína hipotética SORBIDRAFT_06g021260 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242076346	105	14%
Metabolismo de aminoácidos									
6414	5,41	6,55	46,0	46,9	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>] similar a aminoacilase 1	gi 270255339	415	41%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
8518	6,64	7,49	51,4	52,6	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a UTP-glicose 1-fosfato uridiltransferase isoforma 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225431563	684	40%
8505	6,64	7,50	51,4	51,5	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar UTP-glicose 1-fosfato uridiltransferase isoforma 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225431563	918	69%
5312	5,74	6,36	45,9	42,4	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a fumarilacetoacetase	gi 147771009	278	41%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
5304	5,69	6,30	39,5	41,9	Full: Glutamina sintetase citosólica isozime 2; AltName: Full=Glutamato- amonia ligase	gi 1707959	208	17%
6016	7,98	6,75	15,6	18,1	<i>unnamed protein product</i> [Vitis vinifera] similar a nucleosídeo difosfato quinase [Vitis vinifera]	gi 270227967	424	42%
8002	6,85	7,39	16,3	18,1	proteína hipotética isoforma 1 [Vitis vinifera] similar a nucleosídeo difosfato quinase B isoforma 2 [Vitis vinifera]	gi 225453348	452	45%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
Glicólise e Glicogênese									
7105	6,34	7,24	27,5	29,6	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a triosefosfato isomerase, citosólica [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 147784332	182	37%
5306	6,29	6,36	42,5	40,3	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a fosfoglicerato quinase, citosólica [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225464999	225	44%
9303	8,03	9,57	39,0	39,6	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a frutose-bifosfato aldolase [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225440976	324	53%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
5601	5,57	6,17	61,3	63,0	putativa 2,3-bifosfoglicerato independente fosfoglicerato mutase [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 239056191	256	35%
4508	5,67	6,01	48,1	55,3	enolase 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225441000	680	56%
8331	5,28	8,91	54,1	40,9	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase, citosólica	gi 225457450	250	31%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
Metabolismo Energético									
8012	8,97	8,84	18,4	17,2	unnamed protein product [Vitis vinifera] similar a ribulose bifosfato carboxilase (RuBisCO) cadeia curta, cloroplástica isoforma 1 [Vitis vinifera]	gi 225455934	807	79%
8033	9,11	7,55	20,7	17,2	proteína hipotética isoforma 1 [Vitis vinifera]] similar a ribulose bifosfato carboxilase (RuBisCO) cadeia curta, cloroplástica isoforma 1 [Vitis vinifera]	gi 225455934	145	57%
3218	5,87	5,57	33,4	34,3	proteína hipotética [Vitis vinifera]	gi 147791852	466	48%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
2225	5,87	5,39	33,4	34,23	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 147791852	246	33%
3223	5,87	5,46	33,4	34,3	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 147791852	329	39%
1113	4,99	4,92	28,1	29,7	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a clorofila a-b binding proteína 40, cloroplástica [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225463432	139	42%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					

2118	5,10	5,03	28,0	29,6	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a clorofila a-b binding proteína 40, cloroplástica [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225463428	98	19%
------	------	------	------	------	--	--------------	----	-----

Metabolismo Secundário

8342	6,39	7,45	67,7	40,0	polifenol oxidase [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 1785613	497	28%
------	------	------	------	------	---	------------	-----	-----

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
4317	5,42	6,13	36,4	38,26	proteína hipotética isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>] similar a homocisteína S-metiltransferase 3 isoforma 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225432744	142	23%
2022	6,39	5,26	67,7	23,34	polifenol oxidase [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 1785613	497	28%
Reserva									
4306	5,39	5,94	38,5	40,7	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a glutelina tipo-A1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225435090	139	21%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
2309	9,09	5,44	52,4	41,81	unnamed protein product [Vitis vinifera] similar a 11S globulina subunidade beta isoforma 1 [Vitis vinifera]	gi 270254731	485	35%
3313	9,09	5,52	52,4	40,3	unnamed protein product [Vitis vinifera] similar a 11S globulina subunidade beta isoforma 1 [Vitis vinifera]	gi 270254731	464	34%
Defesa e Resposta a Stress									
2108	4,94	5,04	24,9	32,9	proteina tipo taumatina [Vitis vinifera]	gi 7406716	730	55%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
8102	9,17	7,31	45,3	31,3	unnamed protein product [Vitis vinifera] similar a vicilina antimicrobiano peptídeo 2-1 [Vitis vinifera]	gi 270241500	108	21%
8105	7,18	7,57	64,5	30,3	proteína hipotética isoform 1 [Vitis vinifera] similar a vicilina antimicrobiana peptídeos 2-1 [Vitis vinifera]	gi 225437076	375	25%
2121	5,09	4,82	24,9	29,7	VVTL1 [Vitis vinifera]	gi 2213852	97	26%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
6004	5,95	6,68	17,3	22,8	similar a proteína relacionada à patogênese 10 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225431844	128	36%
3004	5,12	5,56	17,3	21,0	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar à proteína relacionada à maturação [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225424264	681	86%
7007	6,30	7,12	17,5	21,0	similar a proteína relacionada à patogênese 10,3 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225431848	481	60%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
5105	5,71	6,44	27,7	31,1	ascorbato peroxidase [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225435177	420	67%
6006	8,12	6,72	15,6	16,8	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar à proteína relacionada à patogênese PR-4B [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225453022	614	56%
5107	5,71	6,48	27,7	30,3	ascorbato peroxidase [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225435177	476	68%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
4117	6,16	6,21	12,0	29,3	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>] similar a protein relacionada a streess de ácido abscísico [<i>Glycine Max</i>]	gi 270229292	257	60%
2006	5,09	5,06	24,9	27,4	proteina tipo taumatina [cultivar hibrida <i>Vitis</i>]	gi 163914227	496	54%
5010	6,16	6,26	12,0	27,8	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>] similar a protein relacionada a streess de ácido abscísico [<i>Glycine Max</i>]	gi 270229292	127	59%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
2002	4,67	4,77	24,8	27,3	proteína tipo taumatina [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 33329390	382	40%
4005	8,12	6,06	15,6	17,4	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225453022	310	36%
5007	4,83	6,34	23,7	26,6	RecName: Full=Ripening- related protein grip22; Flags: Precursor	gi 75184387	191	26%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
8104	7,18	7,40	64,5	30,3	proteína hipotética isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>] similar a vicilina antimicrobiana peptídeos 2-1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225437076	275	24%
7011	6,63	6,90	21,6	25,7	similar a temperatura-induzida lipocalina [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225467878	98	39%
3114	5,01	5,72	28,1	33,1	Quitinase classe IV [<i>Vitis pseudoreticulata</i>]	gi 164699029	310	16%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
3221	5,01	5,64	28,1	32,3	quitinase classe IV [<i>Vitis pseudoreticulata</i>]	gi 164699029	384	16%
2112	5,38	5,31	28,1	32,6	endoquitinase classe IV [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 2306811	240	16%
8117	8,44	7,49	29,8	31,0	quitinase [<i>Zea diploperennis</i>]	gi 48093346	104	28%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					

2404 5,55 5,22 22,0 45,0 desidrina [*Brassica juncea*] gi|90654235 97 19%

Fosforilação Oxidativa

4111 5,62 6,11 24,5 30,3 *unnamed protein product* [*Vitis vinifera*] similar à pirofosfatase inorgânica solúvel [*Vitis vinifera*] gi|270228554 480 60%

6103 5,84 6,57 24,8 30,7 proteína hipotética [*Vitis vinifera*] similar a pirofosfatase inorgânica solúvel [*Vitis vinifera*] gi|225439878 308 62%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
Modificação de proteínas									
3206	5,02	5,61	30,9	36,7	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a proteasomo subunidade α tipo-1B [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225458231	596	37%
8040	7,68	8,58	18,5	21,5	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a peptidil-prolil cis-trans isomerase [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225427936	492	75%
4006	5,94	6,13	17,4	20,8	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar à Hsp20	gi 225429592	100	35%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
8106	6,93	7,59	27,3	31,3	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a proteasomo subunidade alfa tipo 7 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225428005	215	42%
Transporte									
8110	7,01	8,23	29,5	32,62	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a proteína de membrana externa mitocondrial porina de 36kDa isoforma 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225424908	489	44%
Processos Redox									
3006	5,22	5,65	13,0	17,6	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a tioredoxina tipo-H isoforma 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225458147	166	31%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
3012	5,15	5,47	17,3	24,1	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a peroxiredoxina-2B [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225445188	265	35%
3222	8,78	5,72	24,9	34,3	CYP74C4 protein [<i>Solanum lycopersicum</i>]	gi 115304532	73	52%
Transdução									
2221	4,74	5,19	29,6	32,6	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a 14-3-3 proteína 4	gi 225451995	235	33%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
2113	5,73	5,36	98,1	29,72	XLG2 (extra-large GTP-binding protein 2) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	gi 42567387	73	16%
Função desconhecida									
2504	4,71	4,95	43,0	56,6	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225452887	324	45%
4412	5,77	6,02	40,6	44,5	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225430200	421	44%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
1312	4,66	4,96	34,7	39,5	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225434253	152	34%
2210	6,73	5,40	53,4	38,3	proteína hipotética isoforma 2 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225438133	643	41%
5106	5,76	6,46	33,0	32,6	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>] similar a homóloga SEC13 [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225452646	104	32%

SSP	pI		Mw		Proteína	Código de acesso	Mascot Score	% cob	Perfil de expressão nas amostras
	T	Exp	T	Exp					
6013	5,89	6,64	21,3	23,6	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225465286	223	58%
3211	5,16	5,78	19,3	37,1	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 270258240	95	9%
2505	4,98	5,28	65,7	52,5	proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 225425551	329	32%

T = valor teórico; Exp = valor experimental.

(1) — Syrah AV verde; (2) — Syrah AV *veraison*; (3) — Syrah AV amad; (4) — Syrah AV madura (5) — CSAV *veraison*; (6) — CSAV amad; (7) — CSAV madura (8) — Syrah Louv verde; (9) — Syrah L *veraison*; (10) — Syrah Louv amad; (11) — Syrah Louv madura (12) — Máximo