Giselle Ribeiro de Souza

Caracterização proteômica do vinho espumante brasileiro e sua relação com a qualidade da formação de espuma

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

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos
2016

A Vanderlei e Bruna, meus amores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo Dom da Vida, pela saúde, pelas oportunidades, bênçãos recebidas e principalmente pela Salvação em Cristo Jesus.

Agradeço a meus pais pelos ensinamentos, pela moral e ética com que sempre me guiaram e pelo amor e apoio incondicional.

Agradeço ao meu marido Vanderlei e minha filha Bruna pelo amor, apoio, compreensão da minha ausência em muitos momentos importantes em suas vidas nestes 4 anos. Essa conquista é nossa!

Agradeço ao meu irmão por sempre estar ao meu lado, física e/ou emocionalmente, com carinho e dedicação.

Agradeço a toda minha família, em especial a minha prima Dra. Cristiane Ribeiro Salmon pelo apoio, pelas discussões proteômicas, pelas ideias e pela filmagem do serviço do espumante utilizada nesta tese.

Agradeço ao Professor Dr. Emanuel pela oportunidade, pela orientação e amizade ao longo destes anos.

Agradeço a Comissão Julgadora da Tese, Profa. Dra. Maria Cristina Baracat Pereira, Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso e Dra. Karina Fraige pelas sugestões e correções desta tese. Agradeço igualmente a Profa. Dra. Fernanda Canduri pelas sugestões dadas na qualificação da tese, bem como por sua amizade.

Agradeço pelas amostras cedidas as empresas LVMH do Brasil, na pessoa do enólogo chefe Sr. Philippe Mével; Cave Geisse, na pessoa do enólogo Sr. Carlos Abarzúa; Vinícola Salton, na pessoa do Sr. Gregório Bircke Salton.

Agradeço aos colegas do grupo BioMicS pela ajuda, pelas risadas, em especial a Júlia Postigo por me ensinar várias técnicas de análise, ao Jonatan Catai por me ensinar a utilizar o MS, a Juliana Alberice pelas intervenções e por me ensinar a utilizar o η LC/MS e também por fazer várias análises nele por mim, a Regiane Travensolo e Thiago Mazzu, que embora não tenham participado diretamente deste trabalho, me ensinaram métodos de análises do projeto anterior, ao Adriano, Juliane B., Segato, Luciana, Patrícia, Carol, Fayene, Paulo, Aline, Welinton por participarem e ajudarem.

Agradeço ao Dr. Fernando Gonçalves de Almeida pela disponibilidade e análises shotgun realizadas no nLC-MS/MS do CEFAP/ICB/USP.

Agradeço de coração aos meus amigos de São Carlos, sem os quais eu não teria suportado a distância da família: Suzy, Amanda, Aline, Aldinéia, Fernanda, Lilian, Aline (família São Carlos), Orlando, Anderson, Regis, Joice, Virgínia, obrigada.

Agradeço aos meus mais que amigos, irmãos, Erasto, D. Lauracy, Andréia, Iudi, Lauceli, Amauri.

Agradeço ao IFRS Câmpus Bento Gonçalves pela licença que permitiu a realização deste doutorado.

“Por mais raro que seja, ou mais antigo,
Só um vinho é deveras excelente
Aquele que tu bebes, docemente,
Com teu mais velho e silencioso amigo.”

(Mário Quintana)

RESUMO

Uma das características de qualidade dos vinhos espumantes, e que também impõe a sua identidade, é a aparência das borbulhas. Tradicionalmente, acredita-se que a capacidade de formação e estabilização dessas borbulhas depende de macromoléculas do vinho, em especial das proteínas, devido a sua ação tensoativa. Este trabalho de doutorado visou o estudo proteômico do vinho espumante brasileiro a fim de identificar quais proteínas estão presentes nesses vinhos para entender melhor a influência dessas na estabilização da espuma (*perlage* e colarinho), e com o intuito de potencializar essa característica em nossos produtos. Foram utilizados os métodos de extração de proteínas clássico, ácido tricloroacético/acetona e de última geração, biblioteca combinatória de ligantes peptídicos, sendo estas separadas por SDS-PAGE, 2DE e OFFGEL. As proteínas extraídas foram digeridas com tripsina e a mistura de peptídeos analisada por nLC-MS/MS com metodologia *shotgun*. Os resultados iniciais obtidos por eletroforese 2DE e OFFGEL, mostraram a presença de três grupos de proteínas de massa molecular distintas, sendo duas próximas a 25 kDa e uma próxima a 70 kDa. Estas proteínas parecem estar presentes nos vinhos em mais de uma isoforma evidenciado pelo espalhamento de todas as bandas de mesma massa molecular em diferentes pH. Foram identificadas 40 proteínas, sendo 17 proteínas de organismos do sub-reino *Viridiplantae* e 23 proteínas pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, onde 10 e 6 proteínas, respectivamente, estão presentes em pelo menos duas amostras de espumantes nacionais. Dessas, seis proteínas foram identificadas pela primeira vez em vinhos. Três proteínas originárias da levedura *Saccharomyces cerevisiae* estão presentes em todos os produtos analisados, podendo essas proteínas serem as responsáveis pela melhor formação de espuma observada em nossos produtos em relação ao *Champagne* (vinho espumante tradicional da França).

ABSTRACT

The type of fizzy bubbles is one of the aspects that characterizes the quality of sparkling wines and also helps defining their identity. Traditionally, it is believed that the ability of these bubbles to form and stabilize depends on the macromolecules found in the wine, particularly proteins, due to their surfactant action. The aim of this work is the proteomic study of the brazilian sparkling wines in order to identify which proteins are present to better understand the influence of these molecules in the foam formation (*perlage* and collar), in order to improve our products. The protein extraction methods used were the classical TCA/acetone precipitation and the modern combinatorial peptide ligand library. Then, proteins were separated by SDS-PAGE, 2DE and OFFGEL. The protein extracted were digested with trypsin and the peptide mixture were analyzed with nLC-MS/MS using the shotgun method. The first results obtained by electrophoresis 2DE and OFFGEL showed the presence of three groups of proteins with different molecular mass, two of them close to 25 kDa and the other one close to 70 kDa. These proteins appear to be present in wine in more than one isoform evidenced by spreading in all bands of similar molecular weight at different pH. In total, 40 proteins were identified, 17 protein from *Viridiplantae* sub-kingdom organisms and 23 proteins belonging to *Saccharomyces* genus, where 10 and 6 proteins, respectively, are present in at least two samples of domestic sparkling wines. Six of those proteins were identified in wine for the first time. Three proteins originating from *Saccharomyces cerevisiae* are present in all analyzed products, and those may be responsible for a better foam formation observed in our products in comparison to *Champagne* (traditional French sparkling wine).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de elaboração do vinho base espumante.....	15
Figura 2	Esquema do método <i>Champenoise</i> ou Tradicional de elaboração de espumantes.....	21
Figura 3	Esquema do método <i>Charmat</i> de elaboração de espumantes.....	24
Figura 4	Esquema da síntese <i>Split and Mix</i> de BLPC composto por 3 aminoácidos.....	29
Figura 5	Ilustração da forma de separação de proteínas por biblioteca de ligantes peptídicos combinatoriais, concentrando as proteínas de baixa abundância da matriz.....	31
Figura 6	Gel de SDS-PAGE dos testes de ultrafiltração corado com nitrato de prata.....	52
Figura 7	Cartuchos de ultrafiltração Vivaspin 20 - GE (teste 4) e AMICON ULTRA 15 – <i>Millipore</i> (teste 6) com o mesmo tempo de ultrafiltração (90 min) à 20 °C.....	53
Figura 8	Gel de poliacrilamida das amostras testadas pelos métodos de precipitação de proteínas.....	54
Figura 9	Visualização da tela do programa de focalização isoeletrica do equipamento Ettan IPGphor 3 (programa 7.300 V h ⁻¹).....	56
Figura 10	Gel de eletroforese 10% da segunda dimensão da análise 2DE.....	57
Figura 11	Visualização da tela do programa de focalização isoeletrica do equipamento Ettan IPGphor 3 (programa 18.400 V h ⁻¹).....	58
Figura 12	Gel de eletroforese 12,5% da segunda dimensão da análise 2DE.....	59
Figura 13	Gel de eletroforese 12,5% da segunda dimensão da análise 2D da fita IPG 7 cm de pH 3 a 5,6 não linear.....	60
Figura 14	Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% com amostras de proteínas precipitadas dos espumantes.....	62
Figura 15	Gel SDS-PAGE 12,5% a) gel digitalizado b) foto do gel após excisões...	63
Figura 16	Alinhamento da proteína F6HAU0 (<i>query</i>) com a proteína invertase (<i>beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I-like</i> [<i>Vitis vinifera</i>] gi: 225466093) a partir do resíduo 113 (<i>sbjct</i>) em 100%.....	64
Figura 17	Gel 1.1 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 1 da proteína precipitada com Acetona 100% (frações de 1 a 6).....	65
Figura 18	Gel 1.2 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 1 da proteína precipitada com Acetona 100% (frações de 7 a 11).....	66
Figura 19	Gel 2.1 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 1 da proteína precipitada com TCA em acetona (frações de 1 a 5).....	67
Figura 20	Gel 2.2 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 1 da proteína precipitada com TCA em acetona (frações de 6 a 10).....	67

Figura 21	Gel 3.1 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 2 da proteína precipitada com TCA em acetona (frações de 1 a 7).....	68
Figura 22	Gel 3.2 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 2 da proteína precipitada com TCA em acetona (frações de 8 a 12).....	69
Figura 23	Fotografia eletrônica dos <i>beads</i> reidratados segundo indicação do fabricante com 20% (v/v) etanol <i>overnight</i> à 4 °C com aumento de 400X em microscópio invertido óptico-digital Olympus CKX41.....	71
Figura 24	Fotografia eletrônica dos <i>beads</i> reidratados segundo Boschetti e Righetti (2013, p. 278) com metanol P.A. na proporção de 20 µL de metanol para cada 1 mg de <i>bead</i> por 30 min, adicionando em seguida 20 µL de tampão fosfato 25 mmol L ⁻¹ (pH7), <i>overnight</i> a temperatura ambiente com aumento de 400X em microscópio invertido óptico-digital Olympus CKX41.....	71
Figura 25	Domínio conservado da proteína tipo YMR006C [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AWRI1631] (gi: 207342449) pertencente à família de proteína tipo patatin fosfolipase.....	78
Figura 26	Imagens extraídas da filmagem desde o tempo zero, momento em que o líquido toca o fundo da taça, até: 5s após início do serviço a) Cave Geisse <i>Brut</i> e b) <i>Moët&Chandon</i> ; 10s após início do serviço c) Cave Geisse <i>Brut</i> e d) <i>Moët&Chandon</i> ; 11,5s após início do serviço e) Cave Geisse <i>Brut</i> e f) <i>Moët&Chandon</i> ; 20s após início do serviço g) Cave Geisse <i>Brut</i> e g) <i>Moët&Chandon</i>	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comercialização de vinhos espumantes provenientes do Rio Grande do Sul ao longo dos anos, em litros.....	14
Tabela 2	Número de ligantes peptídicos possíveis obtidos a partir de um número preestabelecido dos diversos aminoácidos em acordo com o tamanho da cadeia peptídica.....	29
Tabela 3	Exemplo de pH médio por fração de OFFGEL para fita pH 3–10 de 13 cm linear.....	33
Tabela 4	Resumo dos testes de concentração da amostra 1 (Excellence) por ultrafiltração com membrana de <i>cut off</i> de 3 kDa.....	51
Tabela 5	Concentração de proteína total dos teste 3, 4 e 6 de concentração (gel da figura 6).....	53
Tabela 6	Concentração de proteína total das amostras testadas pelos métodos de precipitação e quantificadas pelo método de Bradford.....	54
Tabela 7	Programa de focalização isoeletrica de 7.300 V h ⁻¹	55
Tabela 8	Programa de focalização isoeletrica de 18.400 V h ⁻¹	57
Tabela 9	Identificação das proteínas da amostra 1 através dos dados obtidos do MS/MS consultando o banco de dados Uniprot_ <i>Vitis vinifera</i> com o algoritmo SEQUEST.....	64
Tabela 10	Alinhamento dos formatos de acesso dos bancos UniProt e NCBI das proteínas identificadas nos espumantes brasileiro consultando o banco de dados UniProt_ <i>Viridiplantae</i>	73
Tabela 11	Alinhamento dos formatos de acesso dos bancos UniProt e NCBI das proteínas identificadas nos espumantes brasileiro consultando o banco de dados UniProt_ <i>Saccharomyces</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila
AF - Ácido fórmico
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
BLPC - Biblioteca de ligantes peptídicos combinatoriais
CE - *Capillary Electrophoresis*
CHAPS - 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CPLL - *Combinatorial peptide ligand libraries*
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*
ESI - *Electrospray ionization*
DTT - Ditioneitol
GI (ou gi) - *GenInfo identifier*
IAA - Iodoacetamida
IEF - *Isoelectric focusing*
IPG - *Immobilized pH gradient*
KDS - *Potassium dodecyl sulfate*
LC - *Liquid chromatography*
FPLC - *Fast protein liquid chromatography*
MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*
MS - *Mass Spectrometry*
MudPIT - *Multidimensional Protein Identification Technology*
NCBI - *National center for biotechnology information*
PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
SDS - *Sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
TCA - Ácido tricloroacético
TFA - Ácido trifluoroacético (*Trifluoroacetic acid*)
TOF - *Time-of-Flight*
Tris - *Trisaminometano*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Processo de elaboração de vinhos espumantes	13
1.1.1 <i>A preparação do vinho base (Cuvée).....</i>	16
1.1.2 <i>Prensagem das uvas</i>	17
1.1.3 <i>Sulfitagem e desborre do mosto</i>	18
1.1.4 <i>Primeira fermentação alcoólica e fermentação malolática</i>	19
1.1.5 <i>Corte e tomada de espuma</i>	20
1.2 Composição química dos vinhos espumantes	24
1.3 Origem das proteínas nos vinhos	25
1.4 Propriedades e composição da espuma	27
1.5 Análise proteômica dos vinhos espumantes	27
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Amostragem	38
3.2 Concentração das amostras	39
3.3 Métodos de precipitação das proteínas.....	40
3.3.1 <i>Precipitação de proteínas com acetona</i>	40
3.3.2 <i>Precipitação com ácido tricloroacético (TCA) em acetona.....</i>	41
3.3.3 <i>Precipitação com TCA/acetona, solubilização em fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol.....</i>	41
3.4 Método de separação das proteínas por CPLL.....	43
3.5 Quantificação das proteínas totais	43
3.6 Separação das proteínas em uma dimensão	44
3.7 Separação das proteínas em duas dimensões	45

3.8	Separação das proteínas em Agilent 3100 OFFGEL.....	46
3.9	Digestão trípica das proteínas separadas em géis corados com prata.....	46
3.10	Digestão trípica das proteínas de mistura complexa (Shotgun).....	48
3.11	Identificação das proteínas por nLC-MS/MS	49
3.12	Medida da propriedade espumante.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1	Avaliação do método de concentração das amostras de espumante.....	51
4.2	Avaliação dos métodos de extração das proteínas dos espumantes	53
4.3	Análise dos resultados a partir da separação por eletroforese 2DE	55
4.4	Análise proteômica do espumante a partir da precipitação das proteínas por TCA/acetona	63
4.5	Focalização isoeletrica OFFGEL.....	65
4.6	Avaliação da extração com CPLL das amostras de espumante	70
4.7	Análise proteômica do espumante por shotgun a partir do extrato de CPLL	72
4.8	Avaliação da propriedade espumante.....	79
5	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A.....	91
	APÊNDICE B.....	94
	ANEXO A.....	96

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do vinho pode ser definida como uma relação entre as características visuais, de sabor e aroma próprios do produto. Esta qualidade superior advém da percepção do consumidor em relação ao produto em questão quando comparado a outros vinhos de mesmo tipo. Pode ter ainda uma relação com o preço, porém esse parâmetro também é influenciado pela moda, tradição, disponibilidade do produto e preferência pessoal (JACKSON; LOMBARD, 1993). No que concerne o vinho espumante, a presença de gás carbônico proveniente da segunda fermentação dos vinhos base é um fator crítico de sua qualidade. A quantidade, tamanho e comportamento da espuma (*perlage*¹ e colarinho) formada na taça, assim como sua persistência ao longo do tempo são indicadores de uma qualidade superior destes vinhos (LEA; PIGGOTT, 2003).

1.1 Processo de elaboração de vinhos espumantes

A produção de uvas no Brasil tem uma história recente quando comparada aos países europeus. A principal região produtora de vinhos é o Rio Grande do Sul com cerca de 90% da produção nacional (EMBRAPA, 2013).

Segundo Protas e Camargo (2011) no Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul (2005/ 2007), estão registrados no Estado 38.505,23 ha de parreirais, distribuídos em 15.384 propriedades. Essas propriedades possuem cerca de 2,6 ha ocupados por parreirais, caracterizadas como minifúndios, com predomínio de mão de obra familiar (cerca de 4 pessoas por propriedade).

¹ Pequenas borbulhas de gás carbônico que se formam no fundo da taça, a partir de um ponto de nucleação, quando os espumantes são servidos. Elas devem ser formadas na taça durante toda a degustação do produto.

Com o processo de abertura da economia brasileira, o segmento de vinhos finos (vinhos tranquilos² e espumantes) tem enfrentado uma forte concorrência externa, registrando-se taxas significativas de crescimento das importações. De 2007 a 2012, a importação de vinhos passou de 57,6 milhões de litros para 74,2 milhões, representando 80% do vinho comercializado no país em 2012 (UVIBRA, 2013).

O vinho espumante brasileiro, em especial aquele elaborado na Serra Gaúcha, tem se destacado por sua qualidade superior. Sua produção tem crescido ao longo dos anos (Tabela 1), sendo totalmente absorvido pelo mercado nacional (EMBRAPA, 2013).

Tabela 1. Comercialização de vinhos espumantes provenientes do Rio Grande do Sul ao longo dos anos, em litros

Ano	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Volume	7.011.203	7.634.215	8.742.660	9.701.727	10.308.834	11.278.858

Fonte: EMBRAPA, 2013.

Pela Lei Federal 7678 (1988), alterada pela Lei Federal 10.970 (2004), o vinho espumante é definido como:

"Art. 11. Champanha (*Champagne*), Espumante ou Espumante Natural é o vinho cujo anidrido carbônico provém exclusivamente de uma segunda fermentação alcoólica do vinho em garrafas (método *Champenoise*/tradicional) ou em grandes recipientes (método *Chaussepied/Charmat*), com uma pressão mínima de 4 (quatro) atmosferas a 20°C (vinte graus Celsius) e com teor alcoólico de 10% (dez por cento) a 13% (treze por cento) em volume." (NR)

Os espumantes são elaborados normalmente em duas etapas. Primeiro se faz o vinho base (Figura 1), podendo esse ser oriundo de uvas de variedades brancas ou tintas. Se o vinho espumante que se pretende elaborar for *rosé* ou tinto, faz-se uma pequena maceração das películas das uvas de variedades tintas para a extração dos compostos que darão cor ao espumante. Porém, o produto de maior consumo e produção é o espumante branco. Nesse caso, o contato das películas e as sementes com o mosto (suco da uva) deve ser o mais breve possível para que não haja extração dos compostos dessas partes sólidas (película e semente) para o meio líquido.

² Vinhos tranquilos são os vinhos sem borbulhas de gás carbônico. Esse termo é utilizado para diferenciar esses vinhos dos vinhos espumantes.

A fermentação alcoólica dos mostos de diferentes variedades de uvas é feita em tanques separados, isto é, em cada tanque de fermentação é colocado mosto apenas uma variedade de uva e esse irá fermentar nas condições adequadas aquela variedade a fim de se obter um vinho característico daquela variedade de uva.

Uma vez obtido o vinho base, de diferentes variedades de uva mantidos em tanques separados, esses serão “cortados” (misturados) em proporções diferentes dos diferentes vinhos base, conforme a decisão do enólogo, de acordo com a característica final do produto que se deseja elaborar. Esse processo se chama corte ou *assemblage*. O vinho é então estabilizado: são feitos processos de “colagem” e estabilização (adição de proteínas como a caseína para a precipitação de metais como cobre e ferro, adição de bentonita para a precipitação das proteínas instáveis e resfriamento do produto para precipitação do ácido tartárico instável).

Figura 1. Esquema de elaboração do vinho base espumante

Fonte: Autoria própria, com imagens obtidas de diversas fontes públicas

Na sequência é feita a segunda fermentação que pode ser em garrafa (método *Champenoise*) ou em tanques fechados (método *Charmat*). Para tanto é adicionado ao vinho base uma quantidade de açúcar (sacarose) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que irá fermentar produzindo uma quantidade a mais de álcool etílico e gás

carbônico, sendo esse último retido no recipiente de fermentação que proporcionará a característica principal do espumante: borbulhas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

1.1.1 A preparação do vinho base (*Cuvée*)

A qualidade dos vinhos espumantes começa na colheita das uvas. O grau de maturação das uvas necessário é menor que no caso da elaboração de vinhos tranquilos. Na região da Serra Gaúcha (RS) dificilmente se consegue um grau de maturação adequado das variedades de uvas viníferas todos os anos, em especial as brancas, de forma a se obter vinhos tranquilos com características aromáticas e de corpo das variedades, por motivos climáticos. Desta forma, essa região se torna interessante para a produção de vinhos espumantes (TONIETTO, 2007).

Para os vinhos espumantes, essa característica varietal não é, em geral, um símbolo de qualidade. Além do mais, para seu equilíbrio na boca e refrescância típica, é necessária uma acidez maior no vinho base, o que se consegue naturalmente, com uvas de grau de maturação menor (isto não quer dizer uvas verdes). O vinho base deverá ter em torno de 10,5% (v/v) de álcool potencial e, portanto, convém que a uva tenha uma maturação adequada para elaboração desse vinho sem chaptalização³ (massa volumétrica = 1,077 kg L⁻¹ ou Brix = 19,0° ou açúcar = 180 g L⁻¹ ou Babo = 16°) (FLANZY, 2000).

No processo da colheita e transporte deve-se tomar o cuidado para que sejam encaminhadas para a cantina de elaboração de espumantes uvas sãs e de forma íntegra (sem romper as bagas antes do início controlado do processo).

³ Chaptalização: processo de adição de sacarose ou mosto concentrado ao mosto de uva, durante a fermentação alcoólica.

1.1.2 Prensagem das uvas

A forma ideal de prensagem, para se obter mosto com menos compostos fenólicos provenientes das películas das bagas de uva, é a prensagem direta, ou seja, sem retirar o engaço (parte lenhosa do cacho) e sem o processo de moagem das bagas (rompimento das bagas). No caso de utilização de uvas tintas para a elaboração de espumantes brancos, a prensagem deve ser bem delicada e rápida, a fim de não extrair antocianinas (cor) das películas.⁴

O fracionamento dos mostos obtido nas diferentes prensagens é um fator primordial para a elaboração do vinho base de espumantes. Durante a prensagem, ao passo que se exerce uma maior força sobre as uvas, são extraídos diferentes tipos de mosto das diferentes células da baga das uvas, que possuem composição química variada. Além dos diferentes sucos de células diferentes, em prensagens mais intensas, após o primeiro movimento de descompactação da torta da prensagem (bagaço), existe uma dilaceração das partes sólidas aumentando, por causa das partículas em suspensão, a extração dos compostos das películas (polifenóis) que tornarão o vinho final obtido mais adstringente e herbáceo (FLANZY, 2000).

O primeiro mosto que escorre da prensagem direta da uva inteira (*cuvée*) é mais propício a oxidação e mais rico em açúcar e ácido tartárico, o segundo (1ª. prensa) já possui mais elementos minerais, polifenóis e substâncias odorantes, e no terceiro (2ª. prensa), essas substâncias estão em maior concentração. Os vinhos prensa são menos finos aromaticamente e possuem um pH mais elevado.

O primeiro mosto da prensagem (os primeiros 100 litros de mosto de 4.000 kg de uva) não tem poder de formar espuma e as prensas finais têm bem pouco poder de formar espuma (baixa concentração de proteínas e aminoácidos hidrófobos: fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina, valina) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

No caso de haver necessidade de desengajar (retirar as bagas dos engaços) e moer (comprimir levemente as bagas das uvas a fim de romper as películas e liberar

⁴ Caso se extraia um mínimo de cor das uvas tintas na prensagem, esta tende a diminuir durante a primeira fermentação, e no corte dos vinhos, esta cor será ainda menos intensa (por diluição).

o suco das mesmas) a uva, deve-se fazer com equipamentos que o façam de forma suave. Deve-se evitar transporte da uva moída com transportadores de rosca sem fim.

O programa da prensagem deve ser suave (mais suave que aquele utilizado para a prensagem de vinhos tranquilos). As prensas hidráulicas verticais utilizadas tradicionalmente em *Champagne* (França) possuem uma base larga para melhor distribuir a pressão exercida e, conseqüentemente, suavizar a prensagem. Já as prensas pneumáticas com membranas laterais, desenvolvidas na região de *Champagne*, na sua maioria, já vêm com um programa pronto para a obtenção de mosto para espumantes. Esses programas são sugestivos e podem ser alterados de forma a se obter mostos com qualidade igual e de forma mais rápida ou ainda mosto de qualidade superior. A adaptação as condições da uva é sempre necessária e envolve a aplicação dos conhecimentos enológicos (FLANZY, 2000).

1.1.3 Sulfitagem e desborre do mosto

Deve ser feita a adição de dióxido de enxofre (SO₂) diretamente na saída da prensa para se evitar ao máximo as oxidações do mosto. As doses de SO₂ variam, normalmente, de 40 a 50 mg L⁻¹ para as *cuvées* e de 50 a 80 mg L⁻¹ para as prensas. No caso do enólogo não pretender fazer a fermentação malolática posterior do vinho, essas doses podem ser maiores (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

O desborre (retirada das partículas em suspensão) é também um elemento indispensável para a elaboração de espumantes de qualidade. Após a prensagem e sulfitagem, os diferentes mostos são encaminhados por bombas ou por gravidade aos tanques destinados para seu desborre⁵. Uma vez que se trabalha de forma suave nas prensagens, é comum mostos com pouca matéria sólida em suspensão (1 a 2 % m/v) (FLANZY, 2000).

O desborre estático (decantação) leva de 10 a 24 h à temperaturas de 10 a 15 °C dependendo da variedade. Desta forma se obtém um vinho de maior delicadeza

⁵ Desborre: retirada dos sólidos em suspensão do mosto ou vinho por decantação, centrifugação ou filtração.

aromática. A centrifugação é a forma mais indicada de desborre dinâmico. Deve-se tomar o cuidado de não se retirar muito dos compostos do mosto, a fim de não ter problemas na fermentação. A filtração também pode ser utilizada, mas de preferência com terras diatomáceas (coadjuvante de filtração) com poros de maior diâmetro (terras abertas).

Pode-se ainda utilizar coadjuvantes como a bentonita, a sílica gel, caseína e até gelatina, como auxiliares de decantação. A utilização de enzimas pectolíticas comerciais também tem sido uma prática comum. As doses serão em geral inferiores as doses utilizadas nos vinhos tranquilos. Nenhum desses tratamentos corrige uma prensagem intensa (defeituosa). As doses de bentonita e sílica gel devem ser ainda mais judiciosas para evitar a retirada em excesso das proteínas que dão poder surfactante aos espumantes (estabilizam o CO₂ solúvel).

Quando necessário, as operações de acidificação ou desacidificação do mosto são feitas preferencialmente após o desborre. Uma maior acidez total e um pH mais baixo do produto tem uma relação direta com o maior poder de envelhecimento dos vinhos espumantes (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

1.1.4 Primeira fermentação alcoólica e fermentação malolática

As operações e controles da primeira fermentação alcoólica são do mesmo tipo daquelas para vinhos brancos tranquilos, ou seja, controle da temperatura (inferior a 18 °C), fermentação regular e completa (teor de açúcar redutor inferior a 2,0 g L⁻¹). No que diz respeito à chaptalização (adição de sacarose ao mosto), essa deve ser feita levando-se em consideração o teor de álcool final desejado no produto (espumante) e o teor de álcool que será produzido na segunda fermentação. O aumento de álcool da segunda fermentação é em média de 1,5% (v/v) de álcool. Assim, se queremos um vinho espumante que tenha 12,5% (v/v) de álcool, a chaptalização do mosto deve ser feita para se obter um vinho base de 11% (v/v) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

É possível adicionar bentonita durante a fermentação por sua função de suporte para as leveduras e de colagem (limpeza e estabilização proteica dos vinhos novos).

Ao final da fermentação a concentração de SO₂ no vinho novo é ajustada, e o produto recebe “cola” (coadjuvante de clarificação como a caseína, albumina e/ou sílica gel) e é clarificado (filtrado ou centrifugado).

É prática comum a fermentação malolática por bactérias lácticas (culturas comerciais de *Oenococcus oeni*) em vinhos base brancos, ocorrendo a diminuição da acidez total do vinho e aumento do pH. O objetivo dessa fermentação é a transformação do ácido málico dos vinhos em ácido láctico. Sua origem se deu devido à dificuldade de evitar essa fermentação na garrafa, ocorrendo desvios de uma fermentação não controlada (principalmente a formação de acidez volátil). Ela surgiu como uma solução para estabilizar o vinho base antes da segunda fermentação (tomada de espuma).

Quando se deseja fazer a fermentação malolática, deve-se levar esse fato em consideração ao final da primeira fermentação, tendo o cuidado de não adicionar muito SO₂ ao vinho novo e de atestar o tanque (completar o volume do tanque inteiramente) onde ocorrerá a fermentação malolática. Uma vez terminada a fermentação malolática a concentração de SO₂ do vinho deve ser corrigida e esse deve, então ser estabilizado (colado). A clarificação de vinhos que fizeram a fermentação malolática normalmente é mais difícil, sendo aconselhável a filtração do vinho novo (FLANZY, 2000; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

1.1.5 Corte e tomada de espuma

A etapa do corte dos vinhos (*assemblage*) é extremamente importante para o equilíbrio e leveza dos vinhos espumantes, e deve ser feita com muito conhecimento e prática dos enólogos na elaboração desse produto. A proporção correta entre os vinhos de variedades diferentes e anos diferentes de forma harmônica é que irá dar o toque do enólogo (ou da Casa, empresa) ao produto final.

Normalmente, os espumantes não safrados (que não possuem o ano da safra de colheita da uva em seus rótulos) têm uma característica organoléptica constante indiferentemente dos anos de produção. O espumante de uma empresa (Casa) em uma determinada região tem sempre a mesma característica organoléptica. Os espumantes safrados são típicos de suas safras (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

Uma vez definido o corte, esse é feito no volume total (ou em pequenos lotes iguais) a fim de se ter uma homogeneidade do vinho base. Esse vinho cortado deve ser estabilizado em relação ao ácido tartárico, no caso do processo tradicional, antes da tomada de espuma.

A operação de tomada de espuma consiste em: a) provocar uma nova fermentação alcoólica do vinho base e b) eliminar o depósito das leveduras (Figura 2).

Figura 2. Esquema do método *Champenoise* ou Tradicional de elaboração de espumantes

Fonte: Autoria própria, com imagens obtidas de diversas fontes públicas

Segundo Flanzy (2000), no método tradicional ou *Champenoise*, são efetuados os seguintes processos:

- a) Tiragem: é a adição de uma quantidade determinada de licor de tiragem (açúcar + leveduras). A quantidade de açúcar adicionada é em média 24 g L^{-1} , para se obter, com o desprendimento de CO_2 , de 5 a 6 atmosferas de pressão na garrafa;

Existe comercialmente leveduras imobilizadas em *pellets* de alginato (material inerte) que facilitam a fermentação e, principalmente, o *dégorgement*.

As leveduras utilizadas para esse processo devem ser resistentes ao álcool e, de preferência produzir pouco ácido acético. Existe, também, no mercado diversas marcas de leveduras destinadas a esse fim.

Normalmente, adiciona-se alginato para auxiliar a formação de um depósito coeso e escorregadio. Pode-se, também, adicionar bentonita com a mesma função.

A tiragem deve ser feita em tanque para se ter uma melhor homogeneidade dos produtos adicionados e, portanto, da tomada de espuma e posterior clarificação do produto.

- b) Tomada de espuma: é a segunda fermentação alcoólica que ocorre na garrafa. As garrafas são colocadas na posição horizontal (*sur latte*) à temperatura de 12 a 18° C, para que a fermentação se produza de forma lenta;

Antes de se iniciar a fermentação, logo após a adição de licor de tiragem, deve-se agitar vigorosamente as garrafas a fim de homogeneizar o licor. Essa prática se chama *poignelage*. Ao final da fermentação se faz mais um *poignelage* para descolar os depósitos de leveduras das garrafas para a perfeita clarificação do espumante.

Ao final da fermentação, os espumantes ficam sobre a levedura para excreção e posterior autólise dos conteúdos celulares, por tempos variados que vão de 9 meses até vários anos.

Durante esse período, o espumante estará protegido de alterações redutoras devido à fotodegradação dos aminoácidos sulfurados do meio. Quando se retira as borras de levedura, que funcionam como um tampão do potencial redox do espumante, o produto fica sensível a essa redução e formação de tiois como metanotiol e dimetildisulfeto, responsáveis pelo “gosto a luz” (defeito aromático do vinho).

- c) Colocação no *pupitre* (cavelete) e *remouage*: essas operações têm por objetivo aglomerar e retirar os depósitos de levedura, fazendo-o descer até o gargalo da garrafa se depositando sobre a rolha (ou cápsula). No *remouage* são feitos, normalmente, dois movimentos de 1/8 de circunferência ao dia durante 7 dias. Durante esses movimentos as garrafas também são inclinadas de forma que, nesse período, elas passem da inclinação de 30° a 60° ao final do *remouage*. As garrafas são, então, colocadas na posição vertical sobre o gargalo (*sur pointe*) para que o depósito vá por completo para o gargalo.

Esse processo pode ser automatizado em equipamentos denominados giropaletes.

- d) *Dégorgement* (degola): consiste em eliminar os depósitos, utilizando a pressão do gás carbônico existente na garrafa. Antigamente se fazia de forma manual (*à volée*) e hoje é feito com auxílio de solução gelada. Nesse último caso, o gargalo é submerso na solução salobra à -10 °C e se forma um tampão de gelo aprisionando os depósitos. Esse tampão é eliminado pela pressão do CO₂, tão logo a garrafa seja aberta;

- e) Recolocação do nível de líquido: para reencher as garrafas no nível adequado, se coloca o licor de expedição ou dosagem. A composição desse licor varia de empresa para empresa e contém SO_2 e açúcar suficiente para obter um espumante *Nature* (máximo de 3 g L^{-1} de glicose), *Extra-Brut* (de 3 a 8 g L^{-1} de glicose), *Brut* (de 8 a 15 g L^{-1} de glicose), *Sec* (de 15 a 20 g L^{-1} de glicose) ou *Demi-sec* ($20,1$ a 60 g L^{-1} de glicose) ou *Doce* (superior a 60 g L^{-1} de glicose) (Decreto Federal 8197, 2014). O licor de expedição pode conter vinho envelhecido e/ou *brandy*. Para minimizar a formação de gosto a luz no espumante durante o tempo de prateleira, pode-se adicionar ácido ascórbico (50 mg L^{-1}) juntamente com SO_2 ;
- f) Amadurecimento: o espumante, como os demais vinhos, precisa de alguns meses para que as reações de oxido-redução se estabilizem e, principalmente, os aromas voltem ao seu máximo de qualidade (forma oxidativa).

O método tradicional exige condições de trabalho particulares, mão de obra especializada, tempo e espaço, por outro lado, o investimento financeiro é menor. Para elaborar um bom espumante pelo método tradicional, em regiões quentes (como o Brasil, ou Califórnia) é necessário investimento em câmaras frias para garantir uma segunda fermentação lenta.

Já no método *Charmat* de elaboração de espumantes (Figura 3), ou método de cuba hermética, o investimento é maior, pois são necessários tanques de inox capazes de suportar pressões de até 10 atm e sistemas de refrigeração (compressores, evaporadores, bombas, tanques de solução hidro-alcoólica). A tomada de espuma é feita nesses tanques de inox munidos com camisas ou cintas de frio e sistema de agitação para garantir a homogeneidade da fermentação.

A temperatura de fermentação é mantida inferior à $14\text{--}15^\circ\text{C}$. Após o fim da tomada de espuma, o espumante pode permanecer nos tanques de fermentação para uma excreção de compostos da levedura por alguns meses ou não; serem estabilizados a baixa temperatura no mesmo tanque ou serem transferidos, isobaricamente, para outros para a estabilização.

Após a estabilização à frio, o espumante é centrifugado (isobaricamente) para um outro tanque, onde receberá o licor de expedição, disponibilizando o produto para o engarrafamento. Normalmente se efetua filtrações (placa e membrana) no momento do engarrafamento, porém, é necessário que o engarrafamento seja feito à frio (próximo de 0°C) para aumentar a solubilidade do CO_2 no espumante e, portanto,

diminuir a sua perda (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Figura 3. Esquema do método *Charmat* de elaboração de espumantes

Fonte: Autoria própria, com imagens obtidas de diversas fontes públicas

1.2 Composição química dos vinhos espumantes

A composição química dos vinhos em geral e, especialmente dos vinhos espumantes, é complexa e varia muito de acordo com as variedades de uva do vinho base (tipo de uva, proporção das diferentes variedades, local de plantio dessas uvas, tipo de porta-enxerto utilizado, clone da variedade, ano de produção, forma de condução da parreira, tratamentos culturais, entre outros), com a forma de elaboração do vinho base (forma de clarificação do mosto, produtos enológicos utilizados, cepa da variedade de levedura, parâmetros de fermentação, fermentação malolática ou não do vinho base, entre outros) e com a forma de elaboração do vinho espumante (produtos enológicos utilizados, cepa da variedade de levedura da segunda fermentação, parâmetros de fermentação, tipo de processo utilizado, entre outros) (FLANZY, 2000; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Genericamente, os vinhos são compostos de água, etanol, ácidos orgânicos, outros alcoóis, poliois, ácidos graxos, ésteres, aldeídos, cetonas, acetais, lactonas, carboidratos, polissacarídeos, compostos nitrogenados (aminoácidos, peptídeos e proteínas), compostos fenólicos, cátions e ânions inorgânicos, metais pesados (principalmente ferro e cobre) e outros compostos voláteis denominados compostos varietais (metoxipirazina, norisoprenóides, compostos sulfurados, terpenos, entre outros) (USSEGLIO-TOMASSET, 1995; FLANZY, 2000; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

1.3 Origem das proteínas nos vinhos

As proteínas presentes nos vinhos, pesquisadas desde os anos 50, têm resultados contraditórios quanto sua origem. Tradicionalmente, diz-se que essas proteínas são provenientes das uvas (*Vitis vinifera*) e das leveduras que transformam o mosto (suco da uva) em vinho tranquilo (vinho base). Nos dos vinhos espumantes, as proteínas são principalmente oriundas das leveduras responsáveis pela segunda fermentação, que transformam o vinho base em espumante (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Porém, as proteínas provenientes das uvas são em parte retiradas durante o processo de clarificação do mosto e em parte hidrolisadas pelas proteases das leveduras (DAMBROUCK et al., 2003; PALMISANO; ANTONACCI; LARSEN, 2010).

Já após a segunda fermentação, os espumantes são tradicionalmente deixados em contato com a borra de leveduras (*sur lies*) para que essas sofram autólise e liberem no meio mais macromoléculas, especialmente manoproteínas⁶ (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2001; POZO-BAYÓN et al., 2009). Mas, também durante esse processo de autólise das leveduras, as proteases dessas leveduras agem sobre as

⁶ Manoproteínas são glicoproteínas contendo em sua composição até 90% de açúcar, basicamente manose. Elas compõem de 35 a 40% da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e possuem várias funções enológicas como adsorção da ocratoxina A, combinação com os compostos fenólicos, aumento da taxa de crescimento das bactérias maloláticas, inibição da formação dos cristais de ácido tartárico, dentre outras (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

proteínas ainda existentes no meio, o que explica a menor concentração de proteínas em vinhos espumantes, quando comparados com vinhos brancos tranquilos (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Lee (1995) sugeriu que as proteínas encontradas nos vinhos são exclusivamente provenientes das variedades de uvas, sendo a variação destas, nos vinhos, influenciada pelo clima, grau de maturação das uvas e local de plantio. Outros autores corroboraram com esse resultado utilizando técnicas de análise mais recentes (FERREIRA et al., 2000; DAMBROUCK et al., 2003).

De toda forma, as proteínas do vinho, presentes em concentração de 4 a 20 mg L⁻¹ são altamente resistentes à proteólise e baixo pH. São heterogêneas em tamanho, variando de 10 a 100 kDa (BLASCO; VIÑAS; VILLA, 2011). Marchal, Bouquelet e Maujean (1996) demonstraram que as proteínas derivadas de uva têm tamanhos de 14 - 60 kDa, e têm um pI perto de 3,9.

Já as proteínas derivadas das leveduras presentes no vinho são principalmente glicoproteínas envolvidas na montagem e desmontagem da parede da célula e, especificamente, no catabolismo lipídico (PALMISANO; ANTONACCI; LARSEN, 2010).

Alguns estudos foram realizados sobre o isolamento e caracterização das manoproteínas derivadas das leveduras nos vinhos. Waters, Pellerin e Brillouet (1994) isolaram manoproteínas de 420 kDa com um teor de proteína de 30%, enquanto os restantes 70% correspondiam a resíduos de açúcar, sendo 98% manose e 2% glicose. No vinho branco, Gonçalves et al. (2002) relataram três grupos de manoproteínas, com massa molecular de 53,4, 252 e 560 kDa. Cromatografia de exclusão dessas manoproteínas produziram duas frações, uma contendo manoproteínas de massa molecular mais alta (contendo 10% de proteína e 90% de manose) e outra contendo manoproteínas de massa molecular mais baixa (87,5% manose e 22,5% de proteína). Dambrouck et al. (2003) utilizando anticorpos de levedura por imunodeteção foram capazes de detectar uma fração protéica em vinho que correspondeu a manoproteínas com tamanhos entre 20 e 100 kDa.

As proteínas nos vinhos podem ainda ser oriundas de microorganismos de contaminação tanto da uva (patógenos) como do produto. Cilindre et al. (2007) caracterizaram duas enzimas pectolíticas secretadas pelo fungo patógeno *Botrytis cinerea* em vinho base espumante da variedade *Chardonnay*.

1.4 Propriedades e composição da espuma

Embora existam diversos fatores que levem a essas características desejadas da espuma (CILINDRE et al., 2010), a concentração de proteínas nos vinhos espumantes tem uma correlação positiva com essa qualidade (LÓPEZ-BARAJAS et al., 2001; DAMBROUCK et al., 2005; CILINDRE et al., 2007; SALAZAR et al., 2010). Andre's-Lacueva et al. (1996) mostraram que a variedade influencia na formação de espuma, sendo que a variedade *Chardonnay* tem a melhor capacidade de formação de espuma, tanto em sucos e vinhos base. No caso dos vinhos espumantes que são envelhecidos com a levedura da segunda fermentação, a liberação de manoproteínas e outras macromoléculas a partir de células de levedura antes da autólise contribuem para a estabilidade de espuma.

As proteínas e glicoproteínas, portanto, desempenham um papel importante na estabilização da espuma, que serve como surfactantes macromoleculares (PUFF et al., 2001; AGUIÉ-BÉGHIN et al., 2009).

1.5 Análise proteômica dos vinhos espumantes

O fluxo de metodologias empregadas em proteômica de plantas e alimentos tipicamente passa pelos seguintes passos: i) extração das proteínas de sua matriz; ii) separação das proteínas e peptídeos e sua quantificação; iii) identificação das proteínas e iv) análise dos dados e sua interpretação (CARPENTIER et al., 2008).

As proteínas dos vinhos espumantes devem ser, então, separadas (extraídas) e analisadas, eliminando potenciais contaminantes como compostos polifenólicos, carboidratos, sais, terpenos, etc. Esses interferentes são comuns em maior ou menor intensidade nas diferentes plantas e alimentos.

Nos vinhos, técnicas preparativas de separação das proteínas de seus interferentes como diálise, ultrafiltração, precipitação tipo salting-out ou com solventes orgânicos têm sido utilizadas (MORENO-ARRIBAS et al., 2002).

Desta forma, diversos protocolos de extração das proteínas foram desenvolvidos tentando eliminar ou minimizar essas interferências.

1.5.1 Métodos de extração das proteínas

Existem diferentes métodos que permitem obter extratos de proteínas concentrados de suco de uva bruto ou amostras de vinho e a remoção de outras macromoléculas. As formas mais comuns de isolar as proteínas geralmente envolvem precipitação ou diálise e ultrafiltração (LE BOURSE et al., 2010). A precipitação é uma maneira simples e eficiente para a obtenção de frações de proteínas, sem necessidade de aparelhos específicos, mas deve-se considerar com cautela, pois pode desnaturar as proteínas.

Considerando-se que as proteínas são menos solúveis em concentrações elevadas de sal, a adição de grandes quantidades de sulfato de amônio pode induzir a precipitação de proteínas. Vincenzi et al. (2005) desenvolveram um método com dodecil sulfato de potássio (KDS) especificamente para proteínas em vinho.

Métodos de cromatografia preparativa, tal como cromatografia de exclusão ou cromatografia de troca iônica também podem ser utilizadas como uma etapa de pré-fractionamento de suco de uva ou vinho bruto (LE BOURSE et al., 2010).

Métodos de extração de proteínas dos vinhos com auxílio de solventes orgânicos (álcool, acetona, etc) são menos utilizados (NUNES-MIRANDA et al., 2013).

Uma nova tecnologia de extração de proteínas de sua matriz utiliza-se de Biblioteca de ligantes peptídicos combinatoriais (BLPC) ou *Combinatorial Peptide Ligand Libraries* (CPLL). Essas são compostas por um suporte sólido poroso (normalmente resina) denominado *bead* (pérolas), onde são ligados covalentemente os peptídeos ligantes (MARASCO et al., 2008; BOSCHETTI et al., 2009).

O princípio utilizado nessa tecnologia de extração de proteínas de sua matriz é o mesmo da cromatografia por afinidade, onde ocorre a adsorção por afinidade das proteínas em uma fase sólida. A separação de uma dada proteína é seletiva para um específico ligante e, portanto, além de separar, pode-se igualmente concentrar essa proteína (BOSCHETTI & RIGHETTI, 2008).

A BLPC é composta pela ligação de peptídeos sobre uma fase sólida. Supondo peptídeos formados por 3 aminoácidos sobre a resina, teríamos em um primeiro ciclo de formação a possibilidade de ligação sobre o suporte dos três aminoácidos possíveis, já no segundo ciclo as combinações possíveis poderiam formar $3 \times 3 = 9$ dipeptídeos. No terceiro ciclo teríamos $3 \times 3 \times 3 = 27$ tripeptídeos (Figura 4).

Figura 4. Esquema da síntese *Split and Mix* de BLPC composto por três aminoácidos (onde, ● = suporte sólido; ○ ○ ○ = aminoácidos): formação uma biblioteca combinatorial de ligantes tripeptídicos, composta por 27 ligantes diferentes.

Fonte: Fenniri H., 2003. Adaptado.

Considerando os 20 aminoácidos e o tamanho dos peptídeos (dipeptídeos, tripeptídeos, tetrapeptídeos, etc), o número de peptídeos possíveis formados aumenta exponencialmente (Tabela 2).

Tabela 2. Número de ligantes peptídicos possíveis obtidos a partir de um número preestabelecido dos diversos aminoácidos em acordo com o tamanho da cadeia peptídica

	Tamanho da cadeia peptídica					
	Dipeptídeo	tripeptídeo	tetrapeptídeo	pentapeptídeo	hexapeptídeo	Heptapeptídeo
1	1	1	1	1	1	1
2	4	8	16	32	64	129
3	9	27	81	243	729	2.187
4	16	64	256	1.024	4.096	16.384
5	25	125	625	3.125	15.625	78.125
6	36	216	1.296	7.776	46.656	279.936
7	49	343	2.401	16.807	117.649	823.543
8	64	512	4.096	32.768	262.144	2.097.152
9	81	729	6.561	59.049	521.441	4.782.969
10	100	1.000	10.000	100.000	1.000.000	10.000.000
11	121	1.331	14.641	161.051	1.771.561	19.487.171
12	144	1.728	20.736	248.832	2.985.984	35.831.808
13	169	2.197	28.561	371.293	4.826.809	62.748.517
14	196	2.744	38.416	537.824	7.529.536	105.413.504
15	225	3.375	50.625	759.375	11.390.625	170.859.375
16	256	4.096	65.536	1.048.576	16.777.216	268.435.456
17	289	4.913	83.521	1.419.857	24.137.569	410.338.673
18	324	5.832	104.976	1.889.568	34.012.224	612.220.032
19	361	6.859	130.321	2.476.099	47.045.881	893.871.739
20	400	8.000	160.000	3.200.000	64.000.000	1.280.000.000

Fonte: Boschetti & Righetti, 2008.

No processo de síntese da biblioteca de ligantes peptídicos, cada suporte sólido é ligado a várias cópias do mesmo peptídeo. Todas os possíveis arranjos de formação de peptídeos de um dado tamanho de cadeia são igualmente sintetizados. Os peptídeos são enxertados por toda a estrutura do suporte de forma a se ter uma concentração entorno de 10 a 15 pmol por partícula.

Cada proteína da matriz tem a capacidade de se ligar com um dado peptídeo ligante. Como cada suporte é composto por um único tipo de ligante, esse suporte irá se ligar por afinidade a uma dada proteína. Esta proteína, presente em uma determinada concentração na matriz, irá progressivamente se ligar a seu respectivo ligante (peptídeo) até seu ponto de saturação. Os diferentes ligantes, irão se ligar as diferentes proteínas da matriz, saturando cada um dos suportes da biblioteca. As proteínas em excesso na matriz irão se ligar mais rapidamente aos seus respectivos suportes, enquanto que as proteínas em baixa concentração no meio, levarão mais tempo para alcançar a saturação de seus respectivos ligantes. Porém, a um dado momento, todos os ligantes estarão saturados. Como a proporção de ligantes composto pelos diversos peptídeos combinatoriais possíveis é a mesma e como as proteínas em maior concentração no meio não se ligarão por completo aos ligantes, ao separar os suportes saturados, a quantidade de proteína total extraída será menor do que aquela encontrada na matriz, porém a diversidade de proteínas da matriz será mantida (GUERRIER et al., 2006; BOSCHETTI & RIGHETTI, 2008; RIGHETTI et al., 2014).

Com essa tecnologia, além de separar as proteínas em alta concentração, é possível concentrar as proteínas que se encontram em baixa concentração nas matrizes, separá-las e identificá-las, o que não era possível por supressão de sinal com outras técnicas de extração de proteínas (Figura 5).

As ligações entre os peptídeos das BLPC e as proteínas da matriz é composta por várias interações complexas, sendo algumas sinérgicas e outras antagônicas, como ligações eletrostáticas, interações de *van der Waals*, ligações de hidrogênio, e/ou interações hidrofóbicas (RIGHETTI et al., 2006). Porém, a contribuição das interações eletrostáticas entre as proteínas da matriz e os ligantes peptídicos tem papel dominante sobre as outras interações.

Os vários grupos ionizáveis tanto da proteína como dos ligantes são os responsáveis por essa maior influência, e esses são, por sua vez, afetados pelo pH do meio. Assim, a interação e posterior separação das diferentes proteínas da matriz,

dadas pelas diferentes interações proteína-ligante, podem ser mais ou menos importantes nos diferentes pH. Fasoli et al. (2010) estudaram a influência do pH na redução das perdas das espécies capturadas pelo BLPC de hexapeptídeos em soro humano, em veneno de cobra e em extrato de proteínas de folha de espinafre. Os diferentes pH associados as diferentes concentrações das proteínas da matriz modificam as condições de interações destas com os ligantes, alterando igualmente os próprios ligantes. Desta forma, obteve-se diferentes proporções das diferentes proteínas, bem como para determinadas proteínas só houve detecção em um dado pH, nas diferentes matrizes estudadas.

Figura 5. Ilustração da forma de separação de proteínas por biblioteca de ligantes peptídicos combinatoriais, concentrando as proteínas de baixa abundância da matriz: a) diferentes proteínas dispersas em uma matriz de volume V; b) adição das BLPC (●) a matriz e início da ligação entre as proteínas do meio e os ligantes peptídicos; c) aumento das ligações entre as proteínas do meio e os ligantes peptídicos até a sua saturação; d) separação dos ligantes peptídicos saturados por filtração, com a perda das proteínas em alta concentração na matriz não ligadas; e) BLPC saturados por diferentes proteínas separados e f) dessorção das proteínas dos ligantes, diminuindo a proporção das proteínas mais abundantes e concentrando as proteínas pouco abundantes na matriz.

Fonte: autoria própria

1.5.2 Método de quantificação de proteínas

A técnica mais comum empregada na quantificação de proteínas e polipeptídeos, de massa molecular superior a 3 kDa é o método de *Bradford* (MORENO-ARRIBAS; PUEYO; POLO, 2002). Esse método colorimétrico baseia-se

na reação das proteínas e polipeptídeos com o reagente *Coomassie Blue* G-250, e a formação de um complexo corado que apresenta absorção eletrônica em 595 nm. É um método simples, rápido e largamente utilizado, porém pode fornecer um resultado impreciso, considerando a variação de resposta do reagente para diferentes proteínas. A ausência de proteínas padrão da uva ou do vinho não permite efetuar uma calibração exata com esse reagente (LE BOURSE et al., 2010).

1.5.3 Métodos de separação de proteínas

Métodos eletroforéticos são os mais antigos usados para a separação e caracterização de proteínas. Nos últimos anos, as técnicas de eletroforese e, em especial a eletroforese capilar (CE), têm progredido enormemente, principalmente graças à utilização do gel de acrilamida como suporte, o que levou a uma grande melhoria na resolução. Usando eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), é possível estimar a massa molecular das proteínas, separadas principalmente de acordo com seu tamanho molecular. Isto porque o SDS liga-se fortemente a proteína fazendo-a adotar uma forma alongada e em uma proporção relativamente constante de 1,4 g de SDS para 1 g de proteína. Desta forma, todas as proteínas tendem a ter uma relação carga-massa e forma constante, sendo separadas conforme suas massas moleculares devido ao efeito filtrador do gel (VOET; VOET, 2006).

Técnicas de focalização isoeétrica (*isoelectric focusing* – IEF) são reconhecidas como tendo alta resolução de separação para proteínas que diferem em sua carga. Quando uma proteína é colocada numa matriz com pH variando e sujeita a um campo elétrico, ela se moverá para o eletrodo com carga oposta. A proteína migra para um ponto do gradiente de pH em que a sua carga total é zero, o que é conhecido como o valor de pH isoeletrico, denominados pontos isoeletricos (BJELLQVIST et al., 1982; DOLNÍK; HUTTERER, 2001; ZHU; LU; LIU, 2012).

As técnicas de IEF baseiam-se na utilização de reagentes bifuncionais (*Immobiline*), composto por uma série de dez derivados de acrilamida quimicamente bem definidos, com a estrutura geral $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$, onde R é um grupo carboxila ou um grupo amino. Esses reagentes formam uma série de tampões com

diferentes valores de pKa que variam entre 1 e 12. Uma vez que o terminal reativo da molécula é copolimerizado com a matriz de acrilamida, gradientes de pH extremamente estáveis são gerados, permitindo verdadeiro estado estacionário da IEF, de alta reprodutibilidade, como já foi demonstrado em várias comparações entre laboratórios (BJELLQVIST et al., 1982; CORBETT et al., 1994; BLOMBERG et al., 1995).

As proteínas separadas por eletroforese em gel podem ser eletroforicamente transferidas para uma membrana de nitrocelulose para efetuar ensaios de imunodeteção, por exemplo, *Western blotting* e *immunoblotting*.

Existe ainda uma nova tecnologia de separação de proteínas 2-DE com a focalização isoeletrica em meio líquido (*OFFGEL Fractionator – Agilent*). Nesse caso as proteínas são separadas de acordo com os seus pontos isoeletricos difundindo sobre o gel das fitas comerciais de poliacrilamida para o líquido da fase acima dos géis em 12 frações, sendo recolhidas em poços separados sobre as fitas (FRANCHIN et al., 2014). Dependendo do tamanho e faixa de pH de cada fita, cada um dos 12 poços possuem pH médio específico calculado (Tabela 3).

Tabela 3. Exemplo de pH médio por fração de OFFGEL para fita pH 3–10 de 13 cm linear.

Fração	pH médio	Fração	pH médio
1	3,3	7	6,8
2	3,9	8	7,4
3	4,4	9	8,0
4	5,0	10	8,5
5	5,6	11	9,1
6	6,2	12	9,7

Fonte: Autoria própria

A cromatografia líquida (LC) tem sido igualmente utilizada na separação de proteínas de mostos e/ou vinhos (MORENO-ARRIBAS et al., 2002). Os diferentes modos de LC (fase reversa, exclusão molecular, afinidade e troca iônica) são utilizados para essa separação, bem como a cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) dentre outras (MORENO-ARRIBAS et al., 2002; LE BOURSE et al., 2010).

A utilização de colunas de diâmetro interno inferiores a 0,1 mm em cromatografia líquida, classificada como nano-LC (SAITO et al., 2004), na separação de peptídeos provenientes da digestão trípica de proteínas, tem sido largamente empregada quando acoplada com o método de identificação por espectrometria de

massas (MS), em especial MS/MS na identificação das estruturas de biomoléculas (CARPENTIER et al., 2008; TIAN et al., 2015).

1.5.4 Digestão das proteínas

A digestão tríptica das proteínas nos estudos proteômico é a mais utilizada, embora existam outras endo proteases possíveis de serem utilizadas. A tripsina age preferencialmente quebrando a ligação peptídica na posição c-terminal do aminoácido arginina e lisina (resíduos com cadeia lateral carregados positivamente) gerando peptídeos de tamanho médio entre 800 e 2000 Da, ideal para o sequenciamento por MS (STEEN; MANN, 2004).

1.5.5 Métodos de identificação de proteínas

Uma forma de identificação das proteínas é por espectrometria de massas (MS). A análise proteômica, em geral, é complexa e ainda um desafio a ser pesquisado, mesmo após a evolução da genômica. Sabe-se que o número de proteínas existentes é maior que o número de genes do organismo correspondente, isto porque para cada gene é possível haver inúmeras proteínas, resultado de *splicing* alternativo do transcrito primário e/ou modificações pós-traducionais (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

Embora a espectrometria de massas tenha sido geralmente aplicada para o estudo de peptídeos endógenos biológicos e é frequentemente utilizado no mapeamento de peptídeos para a determinação da sequência primária. Nos últimos anos, a aplicação dessa técnica em proteína e a análise de peptídeos têm sido continuamente crescentes. No entanto, até agora, a aplicação de MS a peptídeos e proteínas do vinho é muito limitado em comparação com outros alimentos (LE BOURSE et al., 2010).

A cromatografia líquida seguida da ionização por *eletrospray* acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI/MS), e a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) acoplada com o analisador de massas por tempo - de voo (TOF), foram aplicadas com sucesso para o estudo de proteínas de uva e de vinho e na diferenciação das variedades de uva (FLAMINI; TRALDI, 2010). Moreno-Arribas; Pueyo; Polo (2002) destacam que é possível obter ótimas informações estruturais das proteínas utilizando tanto ionizadores tipo ESI como MALDI acoplados com analisadores tipo quadrupolo, TOF ou setor magnético, em sistema MS/MS.

1.5.6 Estratégias de análise proteômica

Como estratégia de análise proteômica, pode-se analisar a proteína intacta, *top-down*, ou os peptídeos obtidos da digestão proteolítica das proteínas, *bottom-up*. Na proteômica *top-down*, devido à dificuldade de ionizar as proteínas maiores que 50kDa tem-se a detecção limitada, além disso, são necessários espectrômetros de massa de alta resolução capazes de identificar as proteínas. Porém, com essa estratégia, é possível isolar as diferentes isoformas das proteínas antes de identificá-las por MS (SALVATO; CARVALHO, 2010). Assim, a estratégia *top-down* é particularmente interessante em análises proteômica de organismos eucariotos quando se deseja verificar diferenças funcionais das diferentes isoformas das proteínas, ou ainda verificar o complexo padrão das variações pelo processo de *splicing* do transcrito primário da proteína (GUERRERA; KLEINER, 2005).

Já na proteômica *bottom-up*, a digestão proteolítica pode causar perdas por degradação das proteínas, ou ainda erros na identificação pela cobertura incompleta das proteínas e perdas nas informações das modificações pós-traducionais (RESING; AHN, 2005; SALVATO; CARVALHO, 2010). Apesar disto, essa estratégia é a mais utilizada em trabalhos de proteômica. Novas estratégias para minimizar essa desvantagem da identificação de modificações pós-traducionais têm sido desenvolvidas nesses últimos anos, como análise de peptídeos fosforilados, glicosilados ou nitrosilados (SALVATO; CARVALHO, 2010; ZACHERY; GREGORICH; CHANG; GE, 2014).

Existe ainda a estratégia proteômica *shotgun*, diversas vezes referida como *bottom-up* ou LC multidimensional-MS/MS ou tecnologia de identificação de proteínas multidimensional (*MudPIT*), que envolve a digestão de uma mistura complexa de proteínas, seguida pela separação cromatográfica dos peptídeos antes da identificação por MS/MS. Pode-se ainda separar e/ou enriquecer as proteínas, antes da digestão, por exemplo por cromatografia ou purificação dessas proteínas. Uma variação dessa abordagem separa as proteínas por SDS-PAGE, seguida pela digestão em gel de fatias de massas moleculares próximas de proteínas que co-migram no gel, e subsequente análise multidimensional LC-MS/MS (RESING; AHN, 2005).

Assim, o fluxo experimental normalmente utilizado na proteômica, e que foi utilizado neste trabalho, consiste na extração de proteínas e/ou separação, quantificação total no extrato e, por último, na sua identificação.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo principal o estudo proteômico do vinho espumante brasileiro produzido na Serra Gaúcha elaborado, predominantemente, com as variedades de uva *Chardonnay* e/ou *Pinot noir* (*Vitis vinifera*), a fim de melhor entender a influência destes compostos na estabilização da espuma (*perlage* e colarinho), comparando com espumantes de outros países.

Para a análise das proteínas presentes no vinho espumante serão empregadas técnicas de eletroforese para a separação das mesmas e a identificação dessas será feita por MS/MS em infusão e/ou LC-ESI-MS/MS, com estratégia *bottom-up*.

Para alcançar esse objetivo, faz-se necessário os seguintes objetivos secundários:

- a) Definição do preparo da amostra, devendo-se concentrar as proteínas do vinho;
- b) Escolha do melhor método de extração de proteína, levando em consideração a matriz complexa e o custo/tempo;
- c) Determinação do melhor método de separação eletroforético e otimização das condições de separação;
- d) Análise por espectrometria de massas das proteínas e/ou peptídeos obtidos por digestão enzimática;
- e) Identificação das proteínas com auxílio de ferramentas de busca de bancos de dados.

Uma vez identificadas as proteínas presentes nos espumantes brasileiros, estas serão comparadas com as proteínas de um *Champagne* (padrão positivo) correlacionando a capacidade de formação de espuma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

As amostras de espumante foram gentilmente cedidas pelas empresas vitivinícolas do Rio Grande do Sul, levando em consideração sua tradição de elaboração de produtos de alta qualidade, variedade de uvas utilizadas em seus produtos amostrados e processo de elaboração desses espumantes.

Os produtos analisados, por empresa, foram:

- a) *Moët & Chandon* – França (cedido pela LVMH do Brasil Ltda.):

Champagne Moët Imperial Brut (padrão positivo): Elaborado pelo método tradicional, utilizando uvas das variedades *Chardonnay*, *Pinot noir* e *Pinot meunier*. Depois de terminada a segunda fermentação com cepas de leveduras selecionadas da empresa, o *champagne* é deixado em contato com as borras de leveduras por um mínimo de 18 meses.

- b) LVMH do Brasil Ltda:

Espumante *Excellence Brut* (amostra 1): Elaborado pelo método *Charmat*, utilizando uvas das variedades *Chardonnay* (52%) e *Pinot noir* (48%) produzidos pela empresa. A levedura utilizada na segunda fermentação é a EC1118 e o espumante depois de pronto é deixado sobre leveduras por pelo menos 12 meses.

- c) Vinícola Geisse:

Espumante *Cave Amadeu Brut* (amostra 2): Elaborado pelo método tradicional, utilizando uvas das variedades *Chardonnay* (80%) e *Pinot noir* (20%). Após a segunda fermentação, o espumante é deixado por pelo menos 18 meses em contato com as leveduras.

Espumante *Cave Geisse Brut* (amostra 3): Elaborado pelo método tradicional, utilizando uvas das variedades *Chardonnay* (70%) e *Pinot noir* (30%). Após a segunda

fermentação, o espumante é deixado por pelo menos 24 meses em contato com as leveduras.

Espumante Cave Geisse *Blanc de Blanc Brut* (amostra 4): Elaborado pelo método tradicional, utilizando unicamente uvas da variedade *Chardonnay*. Após a segunda fermentação, o espumante é deixado por pelo menos 28 meses para amadurecimento do produto.

Espumante Cave Geisse *Blanc de Noir Brut* (amostra 5): Elaborado pelo método tradicional, utilizando unicamente uvas da variedade *Pinot noir*. Após a segunda fermentação, o espumante é deixado por pelo menos 28 meses para amadurecimento do produto.

d) Salton

Espumante Salton Gerações José Bepi Salton (amostra 6): Elaborado pelo método tradicional, utilizando uvas das variedades *Chardonnay* (50%) e *Pinot noir* (50%). Após a segunda fermentação, o espumante é deixado por pelo menos 4 anos em contato com as leveduras.

Espumante Salton *Évidence* (amostra 7): Elaborado pelo método tradicional, utilizando uvas das variedades *Chardonnay* (70%) e *Pinot noir* (30%). Após a segunda fermentação, o espumante é deixado por pelo menos 12 meses em contato com as leveduras.

3.2 Concentração das amostras

Uma vez que a concentração de proteínas em vinhos espumantes é baixa, após a retirada do gás carbônico do espumante com auxílio de agitador magnético, a concentração da amostra foi realizada por rota-evaporação partindo de volumes que variavam de 300 a 250 mL até volumes entre 100 e 30 mL a uma temperatura de 35°C. O rota-evaporador IKA utilizado foi gentilmente cedido pelo grupo de Fotoquímica (IQSC/USP) na pessoa da professora Dra. Carla Cristina S. Cavalheiro. Foram testados dois cartuchos de ultrafiltração de duas marcas diferentes: a)

AMICON ULTRA 15 de 15 mL e membrana de celulose regenerada com *cut off* de 3 kDa (Millipore)⁷; e b) Vivaspin 20 de 20 mL e membrana de polietersulfona (PES) com *cut off* de 3 kDa (GE Healthcare), para verificar suas eficiências e sua velocidade de fluxo. Os cartuchos foram centrifugados (centrífuga de mesa Microtubo 5804 R, gentilmente cedida pelo laboratório do Grupo de Química Medicinal IQSC/USP coordenada pelo prof. Dr. Carlos Alberto Montanari) a uma velocidade de 4.000×g, à temperatura de 4 °C até o volume de retenção desejado.

3.3 Métodos de precipitação das proteínas

Levando em consideração a complexidade da amostra e a necessidade de se ter uma proteína o mais livre de outras substâncias possível e mais concentrada, foram testados diversos métodos de precipitação das proteínas dos espumantes.

3.3.1 Precipitação de proteínas com acetona

A não solvatação das proteínas em solvente orgânico (baixa constante dielétrica) leva a sua maior interação e precipitação, principalmente quando gelado. Assim, para a precipitação das proteínas dos espumantes, utilizou-se 9 volumes de acetona gelada (−20 °C) para 1 volume de amostra concentrada. A mistura foi agitada em vortex e incubada a −20 °C *overnight*. Centrifugou-se a 12.000×g, durante 5 min, à 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se o precipitado secar a temperatura ambiente. Em seguida, solubilizou-se a proteína precipitada em solução de reidratação (solução 7 mol L^{−1} ureia; 2 mol L^{−1} tiourea; 2% (m/v) CHAPS em água).

⁷ Concentrador de ultrafiltração Amicon Ultra 15 marca Millipore gentilmente cedido pelo grupo de Biologia Molecular e Bioquímica (IQSC/USP), na pessoa da Professora Dra. Fernanda Canduri.

3.3.2 Precipitação com ácido tricloroacético (TCA) em acetona

O TCA adicionado à solução de acetona tem por objetivo a diminuição das degradações das proteínas e também a remoção de interferentes como sais e polifenóis (GÖRG et al., 2004).

Foram adicionados 10 volumes de uma solução 10% (p/v) de TCA em acetona (P.A. gelada) a 1 volume de amostra concentrada e incubou-se à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ *overnight*. Centrifugou-se ($15.000\times g$, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi lavado com 10 volumes de acetona P.A. gelada, agitado no vortex e deixado à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Centrifugou-se a $15.000\times g$, por 15 min, à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e removeu-se o sobrenadante. Essa lavagem com acetona foi repetida até que o precipitado tornasse esbranquiçado. Em seguida, o precipitado foi deixado secar à temperatura ambiente e ressuspendeu-se em solução de reidratação (solução 7 mol L^{-1} ureia; 2 mol L^{-1} tiourea; 2% (m/v) CHAPS em água).

3.3.3 Precipitação com TCA/acetona, solubilização em fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol

Esse método de precipitação de proteínas, embora seja longo e com várias etapas, tem por objetivo a purificação das proteínas extraídas. Ele combina a precipitação com TCA/acetona, que tem alto poder de retirada de compostos não proteicos, com a solubilização seletiva da proteína em fenol e nova precipitação com metanol (WU et al., 2014). O método proposto por Wu et al. (2014) foi adaptado como segue.

Adicionou-se 10 volumes de uma solução 10% de TCA em acetona P.A. gelada a 1 volume de solução de amostra (4 mL). Centrifugou-se a $15.000\times g$, por 5 min à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e removeu-se o sobrenadante imediatamente. Ressuspendeu-se o precipitado em 2 mL solução 10% TCA/Acetona. Centrifugou-se a $15.000\times g$, por 5 min à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e removeu-se o sobrenadante imediatamente. Repetiu-se a lavagem com TCA/Acetona até que o precipitado ficasse claro (branco) ou levemente amarelado.

Lavou-se, então, o precipitado com 1 mL de acetona P.A. gelada e centrifugou-se a 15.000×g por 5 min à 4 °C e removeu-se o sobrenadante. Deixou-se o precipitado secar completamente em temperatura ambiente em capela.

Adicionou-se ao *pellet* seco em 1,5 mL de solução de SDS 1% (1% (m/v); 0,15 mol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,8); 1 mmol L⁻¹ EDTA; 2 mmol L⁻¹ PMSF; 0,1 mol L⁻¹ DTT) e incubou-se a temperatura ambiente por 1 a 2 h. Centrifugou-se a 15.000×g por 10 min à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para 2 microtubos novos de 2 mL (cerca de 0,75 mL em cada). Lavou-se os precipitados resultantes da centrifugação da etapa anterior com 0,5 mL de solução SDS 1%, centrifugou-se novamente e juntou-se ao sobrenadante anterior (0,25 mL em cada microtubo).

Verificou-se o pH do sobrenadante, devendo esse estar entre 7 e 9. Se fosse menor que 7, adicionar-se-ia gotas de solução 0,5 mol L⁻¹ Tris base, se o pH fosse muito básico, adicionar-se-ia gotas de solução 0,5 mol L⁻¹ de glicina.

Adicionou-se igual volume de solução de fenol equilibrado com Tris aos tubos contendo o sobrenadante (cerca de 1 mL). Misturou-se bem as duas fases com auxílio de vortex por 3-5 min e centrifugou-se a 15.000×g por 5 min à temperatura ambiente. Coletou-se a fase do fenol contendo a proteína para um novo microtubo (cerca de 1 mL).

Em seguida, adicionou-se a fase fenol a 1 mL de tampão de lavagem (10 mmol L⁻¹ de Tris-HCl pH 8,0; 1 mmol L⁻¹ de EDTA; 0,7 mol L⁻¹ de sacarose) e centrifugou-se a 15.000×g por 5 min à temperatura ambiente. Coletou-se novamente a fase fenol fracionando-a em quatro microtubos de 2,0 mL e adicionou-se 1,5 mL de solução de 0,1 mol L⁻¹ acetato de amônio em metanol. Incubou-se à -20 °C *overnight*. Centrifugou-se a 15.000×g por 30 min à 4 °C, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 1,5 mL de acetona 80% (v/v). Centrifugou-se a 15.000×g por 10 min à 4 °C e deixou-se o precipitado secar à temperatura ambiente em capela. Ressuspendeu-se o precipitado em solução de reidratação (solução 7 mol L⁻¹ ureia; 2 mol L⁻¹ tiourea; 2% (m/v) CHAPS em água).

3.4 Método de separação das proteínas por CPLL

Os *beads* ProteoMiner™ (CPLL) utilizados nesse trabalho possuem peptídeos hidrofílicos, hidrofóbicos e iônicos que devem ser reidratados antes de sua utilização.

Desta forma, adicionou-se a 40 mg de *beads* 800 µL de metanol P.A. agitando suavemente por 30 min. Em seguida, adicionou-se 800 µL de tampão fosfato 25 mmol L⁻¹ (pH7) e deixou-se *overnight* à temperatura ambiente, com agitação suave.

No dia seguinte, lavou-se os *beads* reidratados adicionando 1 mL de solução 50 mmol L⁻¹ acetato de sódio e centrifugando a 1.000×g, por 1 min à temperatura ambiente. Repetiu-se essa lavagem 3 vezes, descartando o sobrenadante. Adicionou-se 100 µL dos *beads* lavados às amostras de espumante desgaseificadas à vácuo (750 mL). Deixou-se *overnight* sob agitação suave à temperatura ambiente.

Separou-se por decantação os *beads* e lavou-se com 600 µL de solução 50 mmol L⁻¹ acetato de sódio, agitando por 5 min à temperatura ambiente e centrifugando a 1.000×g, por 10 min à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se, então, 600 µL de água tipo 1 (MilliQ) agitando por 1 min à temperatura ambiente e centrifugando a 1.000×g, por 1 min à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante. Aos *beads* lavados, adicionou-se 200 µL de solução 4% (m/v) SDS e 2% (m/v) DTT, agitando por 15 min em ebulição e centrifugando a 1.000×g, por 2 min à temperatura ambiente. Coletou-se o sobrenadante (extrato de proteína) e armazenou-se à -20 °C até o momento das demais análises.

3.5 Quantificação das proteínas totais

A determinação de proteína total foi feita por espectrofotometria (em comprimento de onda de 595 nm) em espectrofotômetro GeneQuant Pro (Amersham Biosciences) utilizando o reagente de *Bradford* (*Coomassie brilliant blue* BG-250) da BioRad, em triplicata. A quantidade de proteína total foi calculada a partir da relação entre a absorbância lida e a quantidade de proteína em mg L⁻¹ (soro albumina bovina, BSA) inferida em curva padrão.

3.6 Separação das proteínas em uma dimensão

Para a visualização dos testes de concentração das amostras e das proteínas extraídas, foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE com gel de resolução na concentração de 12,5% e com gel de empilhamento de 4,5%. A análise eletroforética foi realizada conforme Laemmli (1970). A 5 μL da amostra foram adicionados 10 μL de tampão de amostra SDS (0,5 mol L^{-1} Tris-HCl pH 6,8 contendo 1,5% (m/v) de SDS, 15% (v/v) de glicerol, 5% (v/v) β -mercaptoetanol e 0,001% (v/v) de azul de bromofenol).

A eletroforese foi realizada em sistema *Mini Protean System* da BioRad em gel de poliacrilamida de 10% ou 12,5%. O padrão de baixo peso molecular utilizado nos géis era composto de fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

A corrida de eletroforese foi feita em cuba (BioRad) contendo solução de corrida (solução aquosa 25 mmol L^{-1} Tris Base, 192 mmol L^{-1} glicina, 0,1% (m/v) SDS) e utilizando uma corrente de 10 mA/gel durante 15 min e 15 mA até que as amostras percorressem todo o gel.

Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata conforme Shevchenko et al.(1996), modificado. Para tanto, utilizou-se solução 50% (v/v) de metanol e 5% (v/v) ácido acético, para gel pequeno, por 20 min para a fixação da proteína no gel. Fez-se uma lavagem com metano 50% (v/v) por 10 min. O gel foi então lavado com água tipo 1 (MilliQ) por 5 min e mais uma vez lavado com água tipo 1 por mais 20 min.

Procedeu-se, então, a sensibilização pela adição de solução 0,025% (m/v) de tiosulfato de sódio em água durante 1 min. Lavou-se o gel duas vezes com água tipo 1 (MilliQ) e foi adicionada solução de 0,15% (m/v) de nitrato de prata pelo período de 20 min.

Lavou-se novamente com água tipo 1 (MilliQ) por duas vezes e foi adicionada solução 3% (m/v) de carbonato de sódio e 0,05% (v/v) de formaldeído em água até a revelação das proteínas.

Interrompeu-se a revelação com solução 5% (v/v) de ácido acético em água. O gel foi armazenado em solução 1% (v/v) de ácido acético à 4 °C até o momento das demais análises (Anexo A).

3.7 Separação das proteínas em duas dimensões

Na focalização isoeletrica, foram utilizadas fitas comerciais de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (*IPG*) da GE Healthcare (*Immobiline™ DryStrip*) com fitas de 7 cm de pH entre 3 – 10 não linear.

As fitas foram reidratadas adicionando-se o volume da amostra correspondente de 30 a 15 µg de proteínas, dependente do resultado da análise de proteína total, adicionado de 60 mg de DTT, 1,25 µL de anfólito específico para cada fita (pela faixa de pH e se linear ou não linear), e a quantidade suficiente de solução de reidratação para completar 125 µL de volume total, conforme indicação do fabricante, por um período mínimo de 12 h e máximo de 15 h à temperatura ambiente.

Após a reidratação, as fitas foram colocadas no equipamento de focalização (*IPGphor II – GE Healthcare*), com programação variada de voltagem e tempo e acúmulo total Vh, porém limitando a corrente máxima de 50 µA por tira, a fim de melhor separar as proteínas extraídas do espumante.

Ao término da programação, as fitas foram retiradas do equipamento e foram feitas as etapas de redução e alquilação para equilíbrio das proteínas. Para tanto, as fitas foram colocadas em tubo contendo 2,5 mL de solução de equilíbrio (solução 75 mmol L⁻¹ Tris base, 6 mol L⁻¹ ureia, 30% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS, 0,002% (v/v) azul de bromofenol) adicionado de 25 mg de DTT. A fita com o gel virado para cima foi deixada em agitação com essa solução por 15 min. Em seguida foi colocada em um novo tubo contendo 2,5 mL de solução de equilíbrio adicionada de 62,5 mg de iodoacetamida (IAA) e deixada agitar por mais 15 min.

Para a segunda dimensão, a fita equilibrada foi, então, colocada sobre o gel de poliacrilamida 12,5% na cuba MiniVE (GE Healthcare) com padrão de baixo peso molecular, contendo tampão de corrida (solução aquosa 25 mmol L⁻¹ Tris base, 192 mmol L⁻¹ glicina, 0,1% (m/v) SDS). A eletroforese ocorreu a uma voltagem máxima de 300 V e uma corrente máxima inicial de 10 mA durante 15 min e, em seguida, uma corrente de 15 mA até que a amostra percorresse todo o gel, visualizado pelo azul de bromofenol.

O gel foi corado com solução de prata (SHEVCHENKO et al., 1996, modificado. Anexo A) e digitalizado com auxílio do Image Scanner II (GE Healthcare) e do programa LabScan, sendo a imagem tratada pelo o ImageMaster 2D Platinum 7.

3.8 Separação das proteínas em Agilent 3100 OFFGEL

A eletroforese OFFGEL é um método que separa as proteínas com base em seu ponto isoelétrico, como na primeira dimensão da IEF, porém mantém as proteínas em frações líquidas.

Para tanto, foram utilizadas fitas comerciais de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (IPG) da GE Healthcare (*Immobiline™ DryStrip*) com fitas de 13 cm de pH entre 3–10 linear. Foram preparados 2 mL de solução de reidratação OFFGEL (62 mmol L⁻¹ DTT; 1,9 mol L⁻¹ tioureia; 6,7 mol L⁻¹ ureia; 8,4% glicerol) e adicionado 19,2 µL de anfólito específico para cada faixa de pH (no caso, pH 3–10 linear). Foi preparada a solução de amostra OFFGEL contendo 1,44 mL da solução de reidratação OFFGEL adicionada de 0,36 mL de amostra contendo a proteína. Foi montado o suporte com a fita e a régua de poços conforme indicação do fabricante e foram adicionados 40 µL de solução de reidratação OFFGEL em cada poço. Em seguida, foram colocados os contatos dos eletrodos (papel de filtro embebido em solução de reidratação OFFGEL) nos locais adequados e foram aguardados 15 min.

Foi, então, adicionado 150 µL de solução de amostra OFFGEL em cada um dos 12 poços e os poços foram selados com a fita de silicone. Foram adicionados mais 10 µL de água deionizada nos contatos dos eletrodos. A base foi colocada na plataforma do equipamento e adicionado óleo mineral (*cover fluid*) nos espaços laterais da canaleta contendo a régua de poços. Foram colocados os eletrodos e iniciado o fracionamento com a programação do equipamento em 20 kVh, por 48 h, 6000 V, 200 mWh e 50 µA.

Após o fim de 48 h, o processo de separação foi interrompido e o conteúdo de cada poço foi transferido para microtubos de 2,0 mL identificados com a numeração do poço e armazenado à -80 °C até a eletroforese em gel SDS-PAGE.

3.9 Digestão trípica das proteínas separadas em géis corados com prata

Os *spots* (ou bandas) dos géis de SDS-PAGE foram transferidos para microtubos de 1,5 mL identificados. Para tanto usou-se o bisturi (no caso das bandas),

ou a ponta de ponteiros de 1 mL cortados em diferentes alturas para diferentes diâmetros desejados.

Cada porção de gel recortado foi lavado com 500 μL de água ultrapura por três vezes durante 15 min à temperatura ambiente sob agitação suave;

Em seguida, o nitrato de prata é reduzido com solução contendo 50 mmol L^{-1} de tiosulfato de sódio e 15 mmol L^{-1} de ferrocianato de potássio durante 15 min à temperatura ambiente sob agitação (até cobrir $\pm 50 \mu\text{L}$)

Os agentes redutores da prata foram lavados com 500 μL água ultrapura por três vezes durante 15 min à temperatura ambiente sob agitação suave. Os pedaços de géis foram equilibrados com 500 μL de tampão de bicarbonato de amônio aquoso 100 mmol L^{-1} por 20 min à temperatura ambiente, sendo, em seguida, lavados com 50 mmol L^{-1} de bicarbonato de amônio contendo 50% (v/v) acetonitrila (ACN) por 5 min à temperatura ambiente.

Os géis excisados foram então desidratados com ACN 100% por 10 min (até ficarem esbranquiçados). Removeu-se a ACN 100% e repetiu-se esse passo. Ao final, deixou-se a acetonitrila evaporar em capela à temperatura ambiente.

A exceção dos géis de 2DE de IEF, foi necessário reduzir as proteínas com auxílio de DTT e em seguida adicionar iodoacetamida (IAA) que alquila os grupos tiol das proteínas e o DTT residual. Assim, adicionou-se 30 μL da solução de DTT 10 mmol L^{-1} em água, incubando por 30 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se rapidamente para remover a solução de DTT. Adicionou-se 30 μL da solução de IAA 50 mmol L^{-1} , incubando por 30 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente e removeu-se a solução de IAA.

As porções de gel foram lavadas com 100 μL de bicarbonato de amônio 100 mmol L^{-1} por 10 min e, em seguida, removeu-se essa solução. Desidratou-se o gel com 200 μL de ACN (100%), incubando por 5 min à temperatura ambiente e removeu-se a ACN. Esse passo de desidratação foi repetido uma vez. Deixou-se secar à temperatura ambiente e finalmente reidratou-se com 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (até cobrir, cerca de 50 μL) de tripsina (*Sequence Grade Modified Trypsin* – Promega) dissolvida em bicarbonato de amônio 50 mmol L^{-1} . Após a 1 hora em gelo, os tubos com os géis e a tripsina foram incubados à 37 °C *overnight*.

Após a incubação, os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos de 0,5 mL identificados e o restante dos peptídeos foram extraídos dos géis primeiramente com uma solução de 5% (v/v) ácido fórmico em água (10 μL) por 10

min e, a seguir, 5% (v/v) ácido fórmico em ACN 50% (v/v) ($\pm 12 \mu\text{L}$) por 10 min, por duas vezes. As soluções de peptídeos foram secas em *Speed Vac* por cerca de 2 h à temperatura ambiente e os microtubos foram armazenados à -20°C para posterior análise em nLC-MS/MS.

3.10 Digestão trípica das proteínas de mistura complexa (Shotgun)

As proteínas da mistura complexa (proteínas extraídas com CPLL das amostras de espumante) foram inicialmente separadas da matriz por precipitação com ácido tricloroacético (TCA) em acetona. Essa precipitação tinha por objetivo separar as proteínas da matriz composta de SDS e DTT, além de compostos fenólicos extraídos simultaneamente das amostras de espumantes.

Desta forma, a partir de $100 \mu\text{L}$ da mistura complexa foi feita a precipitação de TCA/acetona. O precipitado foi ressuspendido em $25 \mu\text{L}$ solução 6 mol L^{-1} ureia. Foi adicionado $25 \mu\text{L}$ de solução DTT (50 mmol L^{-1} DTT; 100 mmol L^{-1} bicarbonato de amônio em água) e incubou-se à 45°C por 1 h. Adicionou-se, então, $50 \mu\text{L}$ de solução IAA (200 mmol L^{-1} IAA; 100 mmol L^{-1} bicarbonato de amônio em água) e incubou-se à temperatura ambiente por 1 h no escuro.

Foi adicionado $1 \mu\text{L}$ de solução 1 mol L^{-1} DTT em água, $50 \mu\text{L}$ de solução 100 mmol L^{-1} bicarbonato de amônio em água e $100 \mu\text{L}$ de tripsina dissolvida em bicarbonato de amônio 100 mmol L^{-1} ; 5% (v/v) ACN em água. Após, foram incubados à 37°C *overnight* (16 h).

As ponteiras *ZipTips* (Millipore) foram previamente equilibradas com solução 0,1% (v/v) ácido fórmico (AF) em água, para condicionamento e limpeza. Retirou-se a solução anterior e adicionou-se 100% ACN. Retirou-se essa solução e adicionou-se 50% (v/v) ACN/0,1% (v/v) AF em água, para condicionamento.

Em seguida, os peptídeos de $200 \mu\text{L}$ da solução da digestão trípica foram adsorvidos nas ponteiras *ZipTips* e eluidos com $200 \mu\text{L}$ de 60% (v/v) ACN; 0,1% (v/v) AF em água.

A solução de peptídeo foi seca em *Speed Vac* por cerca de 2 h à temperatura ambiente e os microtubos foram armazenados à -20°C para posterior análise em nLC-MS/MS.

3.11 Identificação das proteínas por nLC-MS/MS

Os peptídeos digeridos foram analisados em sistema nano-LC (EASY-nLC II Thermo Scientific) acoplado *on line* ao MS híbrido *ion trap* linear Orbitrap (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Scientific) com interface nano *electrospray* (Nano-Flex II nanospray, Thermo Scientific). A coluna (C18 – 10cm x 75 µm DI, 3 µm, 120 Å, Thermo Scientific) foi equilibrada com 95% (v/v) de solvente A (0,1% de AF em água) e 5% (v/v) de solvente B (0,1% de AF em ACN).

Após equilíbrio, as amostras foram injetadas (3 µL min⁻¹, 10 µL) em pré-coluna (C18, 2 cm x 100 µm DI, Thermo Scientific) e eluidas sob vazão de 300 nL min⁻¹ com gradiente de eluição a 5% B, 0-5 min; 5% a 35% B, 5-65 min; 35 a 90% B, 65-80 min e 5% B, 80-90 min.

Os dados foram adquiridos utilizando o *software* XCalibur, versão 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific). As análises foram feitas no modo *scan* no intervalo de 400-2000 *m/z*, modo positivo, tensão do capilar de 4500 V, nebulizador a 8,0 psi, gás secante a uma vazão de 5,0 L min⁻¹ e temperatura de 220 °C.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa *Proteoma Discoverer* (v.1.2.0 *Thermo*) utilizando o algoritmo SEQUEST e consultando os bancos de dados Uniprot_*Viridiplantae* e Uniprot_*Saccharomyces*, permitindo as seguintes modificações dos resíduos de aminoácidos: carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina.

3.12 Medida da propriedade espumante

Os espumantes foram mantidos à 4 °C (temperatura de serviço dos espumantes) e de todos foram retiradas suas rolhas originais colocando rolhas de armazenagem. A taça foi lavada com água tipo I (MilliQ) e igualmente resfriada, mantendo-a em geladeira por 15 min antes de cada serviço, a fim de igualar a temperatura da taça com a do líquido.

Foi montado um suporte para apoio das garrafas bem como definida a posição de colocação da taça, da câmera de filmagem, ajustes de foco e tempo/volume de serviço previamente.

Os vídeos e imagens foram capturadas usando uma lente AF-S Nikkor 28-300mm f/3.5-5.6G ED VR (Nikon) montado em um adaptador N/F-E-*mount* (Metabones) acoplado a uma câmera $\alpha 7$ II E-*mount* (Sony).

O filme foi tratado com o editor *Windows Movie Maker*, sendo feito corte inicial do filme no momento zero (momento em que o liquido toca o fundo da taça). Foram feitos instantâneos dos quadros nos tempos 5; 10; 11,5 e 20 segundos para a análise das imagens.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação do método de concentração das amostras de espumante

A partir de amostra 1 (vinho espumante Chandon *Excellence*) foi retirado o gás carbônico por dois processos diferentes (testes 1 e 2: por agitação e aquecimento; e testes 3 e 4: por agitação sem aquecimento) e utilizando os cartuchos de ultrafiltração com membranas de 3 kDa de *cut off* a serem testadas, foram colocados 15 mL de amostra em cada cartucho. O resumo dos testes dos métodos de concentração da amostra 1 de vinho espumante são apresentados na Tabela 4.

O resultado da eletroforese em gel SDS-PAGE dos testes de ultrafiltração da amostra empregado para a concentração das proteínas ainda na matriz complexa do vinho é mostrado na Figura 6. Utilizando a mesma amostra (amostra 1) nas mesmas condições experimentais os diferentes métodos foram analisados visualmente.

Nos testes 1 e 2 da amostra 1 foi retirado o gás carbônico da amostra em agitador magnético com placa de aquecimento e como mostra a Figura 6, a amostra foi desnaturada, tendo provavelmente precipitado, perdendo-se a proteína.

Tabela 4. Resumo dos testes de concentração da amostra 1 de vinho espumante (*Excellence*) por ultrafiltração com membrana de *cut off* de 3 kDa

Teste	Marca da membrana	Processo de degaseificação	Volume inicial de vinho (mL)	Volume final de vinho (mL)
1	Vivaspin 20 GE	Agitação com aquecimento	15	1,5
2	Amicon Ultra 15 Millipore	Agitação com aquecimento	15	1,5
3	Amicon Ultra 15 Millipore	Agitação	15	6
4	Vivaspin 20 GE	Agitação	15	1,5
5	Descarte do teste 4 – Membrana Vivaspin 20 - GE			
6	Amicon Ultra 15 Millipore	Agitação	15	0,1

Fonte: autoria própria

Nos testes 3 e 4, a retirada do gás carbônico foi apenas com agitação (agitador magnético). No teste 3, o concentrador de ultrafiltração era da marca *Millipore* e o

volume inicial era de 15 mL, sendo concentrado até o volume final de 6 mL por um período de 80 min. Já no teste 4, o concentrador de ultrafiltração era da marca GE e o volume inicial era de 15 mL, sendo concentrado até o volume final de 1,5 mL por um período de 8,5 h. Visualmente, se percebe no gel de SDS-PAGE corado com nitrato de prata uma concentração um pouco maior das proteínas (mais escuro) no teste 4, porém, o tempo de filtração é muito maior, portanto a velocidade de fluxo é menor, quando comparado com o concentrador da GE. Já no teste 5, foi testado se havia alguma proteína que pudesse estar sendo eluída pela membrana (marca GE), o que não foi verificado.

Figura 6. Gel de SDS-PAGE dos testes de ultrafiltração corado com nitrato de prata. Onde: 1_Amostra aquecida para retirada do CO₂, Membrana GE (Vi = 15 mL; Vf = 1,5 mL); 2_Amostra aquecida para retirada do CO₂, Membrana *Millipore* (Vi = 15 mL; Vf = 1,5 mL); 3_Amostra agitada para retirada do CO₂, Membrana *Millipore* (Vi = 15 mL; Vf = 6 mL); 4_Amostra agitada para retirada do CO₂, Membrana GE (Vi = 15 mL; Vf = 1,5 mL); 5_Amostra/descarte membrana GE (teste 4); e 6_Amostra agitada para retirada do CO₂, Membrana *Millipore* (Vi = 15 mL; Vf = 0,1 mL)

Fonte: Autoria própria

No teste 6 (Figura 7), a amostra 1 foi concentrada de 15 mL até 0,1 mL utilizando o concentrador de ultrafiltração da *Millipore*, o que levou 90 min na temperatura de 20 °C.

Foi feita então, a quantificação pelo método de Bradford das proteínas extraídas dos testes 3, 4 e 6 como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Concentração de proteína total dos teste 3, 4 e 6 de concentração (gel da figura 6)

Teste	Concentração de proteína total em $\mu\text{g mL}^{-1}$	Concentração calculada de proteína total no vinho em mg L^{-1}
3	1,6	2,6
4	2,4	4,7
6	6,0	1,6

Fonte: Autoria própria

Desta forma, a membrana que apresenta a melhor velocidade de fluxo é a membrana da marca Millipore (AMICON ULTRA 15), mas a eficiência de concentração da membrana da GE (Vivaspin 20) é melhor, por apresentar uma recuperação maior das proteínas (teste 4 recuperou uma concentração maior medida em $4,7 \text{ mg L}^{-1}$ de proteína total no vinho espumante medida pelo método de Bradford).

Figura 7. Cartuchos de ultrafiltração Vivaspin 20 - GE (teste 4) e AMICON ULTRA 15 – Millipore (teste 6) com o mesmo tempo de ultrafiltração (90 min) à 20°C

Fonte: Autoria própria

4.2 Avaliação dos métodos de extração das proteínas dos espumantes

Uma vez definido o método de concentração da amostra por rota-evaporação a 35°C e ultrafiltração com cartucho Vivaspin 20 de 3 kDa (GE) a $4.000\times g$, à 20°C , para determinar o melhor método de extração das proteínas das amostras, inicialmente foram testados diferentes métodos de precipitação dessas proteínas.

Foram testados os métodos de precipitação com 1) ácido tricloroacético (TCA) em acetona; 2) acetona; e 3) TCA/acetona, solubilização em fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol. Foi feita a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (Tabela 6) e a análise visual em gel SDS-PAGE 12,5% (Figura 8).

Tabela 6. Concentração de proteína total das amostras testadas pelos métodos de precipitação e quantificadas pelo método de Bradford.

Teste	Concentração de proteína total em $\mu\text{g mL}^{-1}$	Concentração calculada de proteína total no vinho em mg L^{-1}
1	11,6	5,5
2	6,1	3,0
3	5,4	2,6

Fonte: Autoria própria

Figura 8. Gel de poliacrilamida das amostras testadas pelos métodos de precipitação de proteínas: 1- TCA em acetona; 2- acetona; e 3- TCA em acetona/fenol/acetato de amônio em metanol.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 6 e Figura 8 mostram que pela quantificação de proteínas totais, pelo método de Bradford, a concentração de proteínas medidas pelo teste de precipitação com ácido tricloroacético em acetona é maior, sendo o melhor método dentre os três testados a ser utilizado no caso dos espumantes. Visualmente, na Figura 8 (1), observa-se a maior concentração de proteínas, na precipitação com TCA em acetona, pelas bandas mais escuras no gel mais escuras, portanto uma concentração maior das proteínas separadas pela eletroforese. O teste de precipitação TCA/acetona, solubilização em fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol, por ter

várias etapas, aumenta a probabilidade de perda de proteínas ao longo destas etapas, além do tempo maior de obtenção das proteínas. Porém, é importante ressaltar que as proteínas extraídas podem apresentar purezas e variedades diferentes o que poderá acarretar em um comportamento melhor ou pior pela utilização dos diferentes métodos nas demais análises que seguem este trabalho.

4.3 Análise dos resultados a partir da separação por eletroforese 2DE

O primeiro teste de focalização isoeletrica foi feito com amostra 1 (Chandon Excellence). Utilizou-se a fita comercial de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (IPG) da GE Healthcare (*Immobiline™ DryStrip*) com fitas de 7 cm de pH entre 3–10 não linear. A fita foi reidratada usando-se 70 µg de proteína medido por *Bradford* em 125 µL de solução de reidratação (com 1,25 µl de anfólito – *IPG Buffer* 3–10NL, 0,006 g de DTT) por 13 h.

Foi testado o programa apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Programa de focalização isoeletrica de 7.300 V h⁻¹

Passo	Tipo	ddp (V)	Valor	Unidade
1	<i>Step</i>	50	02:00	h:min
2	<i>Step</i>	300	200	V h ⁻¹
3	<i>Grad</i>	1.000	300	V h ⁻¹
4	<i>Grad</i>	5.000	4.500	V h ⁻¹
5	<i>Grad</i>	5.000	2.000	V h ⁻¹
6	<i>Step</i>	100	02:00	h:min

Fonte: Autoria própria

Não houve aumento da tensão medida ao longo do programa, e a corrente permaneceu alta (em torno de 36 µA). Isto ocorreu por um excesso de proteína utilizada na reidratação da fita ou, mais provavelmente, por presença de sais.

A determinação de proteínas pelo método de *Bradford* é uma análise aproximada da quantidade de proteína. Esse método quantifica a proteína pela formação de um complexo colorido do reagente *Coomassie Blue* G-250 com as cadeias aromáticas e cadeias básicas dos aminoácidos das proteínas, mas também dos peptídeos acima de 3 kDa (MORENO-ARRIBAS et al., 2002). Outros interferentes como álcool e compostos fenólicos também podem alterar o resultado dessa análise

espectrométrica (MARCHAL et al., 1997). Waters et al. (1991) observou que o método *Bradford* subestima a quantidade de proteínas em vinho na ordem de 50 a 80%. Desta forma, diferentes proteínas, com diferentes composições de aminoácidos, nas diferentes composições da matriz vinho têm respostas diferentes ao reagente, e por não se dispor de um padrão de proteínas do vinho para a construção da curva padrão, a incerteza da quantidade real de proteínas na amostra aumenta ainda mais.

Um novo teste foi feito diminuindo a quantidade para 30 µg de proteína, medido por *Bradford*, em 125 µL de solução de reidratação (com 1,25 µl de anfólito, 0,006 g de DTT), reidratado por 14 h. Foi utilizado o mesmo programa de 7.300 V h⁻¹.

Como mostra a Figura 9, nesta concentração de proteína, a focalização isoeletrica parecia ter ocorrido, evidenciado pela diminuição de corrente (próxima a 0 µA).

Figura 9. Visualização da tela do programa de focalização isoeletrica do equipamento Ettan IPGphor 3 (programa de 7.300 V h⁻¹)

Fonte: Autoria própria

A fita foi retirada do equipamento antes do último passo se iniciar (100 V, utilizado apenas como proteção da focalização) e armazenada à -80 °C.

Em seguida, foi feita a redução e alquilação das proteínas da fita com DTT e IAA.

Preparou-se o gel de poliacrilamida a 10%, e a corrida se deu primeiro a uma voltagem de 300 V/10 mA/15 min e em seguida, 300 V/15 mA até o final da corrida do gel. O padrão de baixo peso molecular foi colocado no lado esquerdo da fita (lado positivo do gel), corado com prata (Figura 10).

Figura 10. Gel de eletroforese 10% da segunda dimensão da análise 2DE da fita IPG 7 cm de pH 3 a 10 não linear

Fonte: Autoria própria

Aparentemente as proteínas não focalizaram (Figura 10) e foi testado um novo programa para que a focalização pudesse ocorrer (Tabela 8).

Tabela 8. Programa de focalização isoeétrica de 18.400 V h^{-1}

Passo	Tipo	ddp (V)	Valor	Unidade
1	Step	50	02:00	h:min
2	Step	150	100	V h^{-1}
3	Step	300	200	V h^{-1}
4	Grad	1.000	300	V h^{-1}
5	Grad	5.000	02:30	h:min
6	Grad	5.000	02:00	h:min
7	Step	100	02:00	h:min

Fonte: Autoria própria

Diminuiu-se também a concentração da amostra medida pelo método Bradford, sendo a nova amostra contendo 15 µg de proteínas totais, em fita de 7 cm 3–10NL reidratado por 13 h com solução de reidratação com DTT e anfólito.

Nesse teste de programa de 18.400 V h⁻¹, novamente, a focalização parecia ter ocorrido, pois a corrente chegou à zero (Figura 11).

Figura 11. Visualização da tela do programa de focalização isoeletrica do equipamento Ettan IPGphor 3 (programa de 18.400 V h⁻¹)

Fonte: Autoria própria

Foi feito, então, a segunda dimensão em gel de poliacrilamida de 12,5% (Figura 12). Mais uma vez, a focalização das proteínas não aconteceu da forma esperada. Mas pode-se perceber, visualmente, uma tendência a concentração das proteínas nos pH mais ácidos da fita, em três bandas de massas moleculares diferentes.

Foram testados diversos programas mais longos de focalização, aumentando o tempo e o número das rampas iniciais na tentativa de que outras substâncias que porventura estivessem impedindo a focalização (como sais, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, entre outros) pudessem migrar na fita antes do início da focalização da proteína e consequentemente melhorar o método.

Foram testados programas com mais um *step* de 200 V e quase 49.000 V h⁻¹, até de quase 90.000 V h⁻¹, sem obter resultados diferentes de focalização dos já apresentados.

Figura 12. Gel de eletroforese 12,5% da segunda dimensão da análise 2DE da fita IPG 7 cm de pH 3 a 10 não linear

Fonte: Autoria própria

Cilindre et al. (2007) observaram que a maioria das proteínas dos vinhos espumantes de *Champagne* situavam-se na faixa de pH entre 3 e 5, e tomando como base esse resultado, foi testado o uso da fita de 7 cm de faixa de pH ácido variando entre 3 e 5,6 (não linear). Utilizou-se 15 µg de proteínas totais da amostra 1 (Chandon *Excellence*) precipitada pelo método TCA/acetona, reidratando a fita por 13 h com solução de reidratação com DTT e anfólito.

O programa utilizado foi de 46.750 V h⁻¹ e a segunda dimensão foi feita em gel de poliacrilamida de 12,5% (Figura 13).

Observou-se, então, uma melhoria na focalização das proteínas, porém o padrão das bandas em três diferentes massas moleculares já observado nas análises anteriores, nesse teste mostrou-se um pouco diferente, por apresentar três *spots* paralelos bem semelhantes na faixa de 25 kDa, três na faixa de 40 kDa e três na faixa de 70 kDa.

Figura 13. Gel de eletroforese 12,5% da segunda dimensão da análise 2D da fita IPG 7 cm de pH 3 a 5,6 não linear

Fonte: Autoria própria

Cilindre et al. (2008) identificaram por nLC/MS/MS as proteínas de 32 spots extraídos de gel SDS-PAGE e digeridos com tripsina de vinho base espumante da variedade *Chardonnay*, separadas previamente por eletroforese 2DE em fita IGP de 18 cm com pH variando de três a seis. Dos 32 spots, 16 foram identificados como tendo invertase vacuolar GIN1 (gi:1839578), 14 foram identificados como VVTL1 (gi: 2213852) ou proteína putativa similar a taumatina (gi:7406714 e gi: 7406716). Além disso, 9 spots foram identificados como proteína tipo osmotina (gi:1839046), porém a maioria dos peptídeos encontrados eram similar aos identificadores de outras proteínas similar a taumatina (proteínas com alta homologia). Foram ainda identificadas quitinase (gi: 33329392) e endoquitinase (gi:2306811 e gi:2306813) em 7 spots e β -1,3-glucanase (gi:1549400) em apenas um spot. Foi sugerido que os vários spots identificando uma mesma proteína deve-se a diferentes glicoformas das proteínas ou ainda a degradação proteolítica ocorrida ao longo do processo de elaboração do vinho base.

Há que se supor que semelhante resultado foi observado na análise de 2DE das amostras de espumante brasileiro, onde a menor quantidade de *spots* de proteínas deve-se ao fato dessa análise ter sido feita em vinho espumante diferentemente da análise feita por Cilindre et al. (2008) em vinho base espumante, que portanto, não sofreu a ação da segunda fermentação.

Como a amostra 1 (vinho espumante Chandon *Excellence*) usada nos testes até esse momento era limitada, decidiu-se mudar a amostra usada para o teste de focalização isoelétrica. A amostra utilizada primeiramente foi a amostra 6 (vinho espumante Salton Gerações José Beppi). Essa foi rota-evaporada à 35 °C e, em seguida, ultrafiltrada com cartucho Vivaspin 20 de 3 kDa (GE) a 4.000×g, à 20 °C e precipitada inicialmente com o método TCA/acetona. Como não houve recuperação do precipitado final de proteína, testou-se a precipitação com acetona, não tendo sucesso novamente. Testou-se, então o método com TCA/acetona, solubilização em fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol. Da mesma forma, não se conseguiu precipitado final de proteína no método utilizando o fenol, e precipitados com aparência diferente dos outros dois métodos. Fez-se, então a aquisição de novos reagentes para testar os métodos de precipitação, e ainda assim não se conseguiu sucesso na precipitação e na focalização com estas amostras.

Mudou-se, então, para amostra 7 (vinho espumante Salton *Évidence*). Novamente, a amostra foi rota-evaporada e ultrafiltrada com os mesmos parâmetros anteriores e foram testados todos os métodos de precipitação já citados. Com essa amostra também não houve sucesso na focalização das proteínas precipitadas.

Testou-se a precipitação da amostra 2 (vinho espumante Cave Amadeu *Brut* da Vinícola Geisse) pelos métodos de TCA/Acetona, Acetona e TCA/acetona, solubilização em fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol, após rotaevaporação e ultrafiltração, como nas amostras anteriores. Desta vez, com sucesso. Paralelamente, se fez uma nova precipitação da amostra 7 (vinho espumante Salton *Évidence*) pelo método TCA/acetona, para verificar se estava ocorrendo erro de método/analista. Fez-se uma eletroforese de gel SDS-PAGE com as proteínas precipitadas da amostra 1 (vinho espumante Chandon *Excellence*), pelo método TCA/acetona e acetona, armazenadas à -80 °C; da amostra 6 (vinho espumante Salton Gerações José Beppi) precipitado pelo método TCA/acetona, armazenada à -80 °C; da amostra 7 (vinho espumante Salton *Évidence*), precipitado paralelamente com a amostra 2 (vinho espumante Cave de Amadeu); e os três

métodos de precipitação da amostra 2 (Cave de Amadeu). A Figura 14 mostra o resultado visual do gel SDS-PAGE com esses 7 testes de proteínas precipitadas dos espumantes brasileiros.

Visualmente, no gel SDS-PAGE corado com prata (Figura 14) e deixado a coloração chegar a um estado avançado a fim de revelar ao máximo pequenas concentrações de proteína, foi verificado que os testes 1 e 2 da amostra 1 (Chandon *Excellence*) apresentam alta concentração de proteínas, os testes 5, 6 e 7 da amostra 2 (Cave de Amadeu) também apresentam as bandas características. Porém os testes 3 e 4 das amostras 6 e 7, referente as amostras da Vinícola Salton, apresentam leve coloração que podem ser provenientes de possíveis vazamentos dos poços vizinhos.

Talvez, o fato do não sucesso nas extrações de proteínas e focalização destas nas amostras dos espumantes da Salton, devesse a algum interferente das amostras com os reagentes, ou a perda da proteína no processo de elaboração dos produtos.

Figura 14. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% com amostras de proteínas precipitadas dos espumantes. 1) amostra 1 (*Excellence*), pelo método TCA/acetona 2) amostra 1 (*Excellence*), pelo método acetona; 3) amostra 6 (Salton Gerações José Beppi), pelo método TCA/acetona; 4) amostra 7 (Salton *Évidence*), pelo método TCA/acetona; 5) amostra 2 (Cave de Amadeu), pelo método TCA/acetona; 6) amostra 2 (Cave de Amadeu), pelo método acetona; 7) amostra 2 (Cave de Amadeu), pelo método TCA/acetona, fenol, acetato de amônio em metanol.

Fonte: Autoria própria

4.4 Análise proteômica do espumante a partir da precipitação das proteínas por TCA/acetona

A Figura 15 mostra os locais de excisão do gel de SDS-PAGE utilizados para a pesquisa das proteínas da amostra 1 (Chandon *Excellence*) precipitadas pelo método de TCA/acetona.

Figura 15. Gel SDS-PAGE 12,5% a) Gel digitalizado Ex2 = amostra 1 (Excellence) com locais de excisão (1 a 5) para digestão trípica e análise nLC-MS/MS. b) Foto do gel após as excisões

Fonte: Autoria própria

Após a excisão foi feita a digestão trípica e a injeção no sistema de nLC acoplado ao espectrômetro de massas equipado com a fonte de ions nano ESI e os dados obtidos foram analisados pelo algoritmo SEQUEST consultando os bancos de dados Uniprot_ *Viridiplantae* e Uniprot_ *Saccharomyces* (Tabela 9).

Das proteínas identificadas (por um peptídeo único), todas são originárias da uva e apenas a F6HF49 tem sua função definida como sendo uma enzima proteolítica dependente de ATP e íons magnésio. As demais 4 proteínas são descritas como proteínas putativas não caracterizadas (*Putative uncharacterized protein*).

Consultando o banco de dados UniProt, das 29.907 proteínas descritas no banco do proteoma UP000009183 (*Vitis vinífera* cv *Pinot noir*) 27.528 proteínas são caracterizadas como *Putative uncharacterized protein*. Outros organismos como

Arabidopsis thaliana proteoma UP000006548, das 31.485 proteínas anotadas, apenas 4.580 proteínas são caracterizadas como *Putative uncharacterized protein*.

Tabela 9. Identificação das proteínas da amostra 1 através dos dados obtidos por nLC-MS/MS consultando o banco de dados Uniprot *Vitis vinifera* com o algoritmo SEQUEST

BANDA	BANCO	Acesso	Descrição	MM [kDa]	pI teor.	Sequencia do peptídeo	Xcorr
2	VITVI	F6HF49	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit OS=Vitis vinifera GN=VIT_01s0011g02100	26,24	7,9	SYALIPmVIEHSSRGER	1,51
3	VITVI	D7TX6	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_10s0071g01010	38,36	5,3	LVNKNAmLCK	1,78
4	VITVI	F6GZM6	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_18s0001g09200	146,23	7,1	FQVERFGPIEHFFFPPIK	2,95
4	VITVI	F6HB76	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_13s0064g01790	69,45	6,7	VTKSFLEEIGSKTDSNLIK	2,49
5	VITVI	F6HAU0	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_16s0022g00670	60,00	4,6	TGTYLLWPPIEEVESLR	3,81

Fonte: Autoria própria

A proteína com código de acesso F6HAU0, descrita como *Putative uncharacterized protein*, tem 100% de similaridade (Figura 16) com a proteína invertase (*beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I-like* [*Vitis vinifera*] gi: 225466093) e 99% com invertase vacuolar 1, GIN1 (Accession: AAB47171), como descrito por Davis e Robinson (1996).

Figura 16. Alinhamento da proteína F6HAU0 (*query*) com a proteína invertase (*beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I-like* [*Vitis vinifera*] gi: 225466093) a partir do resíduo 113 (*sbjct*) em 100%

Query	1	MFAWQRTAFHFQPEKNWMDPDGPLFHMGWYHLFYQYNPD SAVWGNITWGHAVSRDMIHW	60
Sbjct	113	MFAWQRTAFHFQPEKNWMDPDGPLFHMGWYHLFYQYNPD SAVWGNITWGHAVSRDMIHW	172
Query	61	LYLPLAMVPDRWFDLNGVWTGSATILPNGQIIMLYTGD TNSVQVQNLAYPANLSDPLLL	120
Sbjct	173	LYLPLAMVPDRWFDLNGVWTGSATILPNGQIIMLYTGD TNSVQVQNLAYPANLSDPLLL	232
Query	121	HWIKYENNPVMVPPAGIGSDDFRDPTTMMVGADGNWRVAVGSLVNTTGIVLVFQTTFNFTD	180
Sbjct	233	HWIKYENNPVMVPPAGIGSDDFRDPTTMMVGADGNWRVAVGSLVNTTGIVLVFQTTFNFTD	292
Query	181	FELLDGELHGVPGTGMWECVDFYPVSINGVYGLD TSAHGPGIKHVLKASMDNRRHDYYAL	240
Sbjct	293	FELLDGELHGVPGTGMWECVDFYPVSINGVYGLD TSAHGPGIKHVLKASMDNRRHDYYAL	352
Query	241	GEYDPMTDWTTPDDPELDVGIGRLDYKGYASKTFYDQVKKRRILYGWISEGDIESDDL	300
Sbjct	353	GEYDPMTDWTTPDDPELDVGIGRLDYKGYASKTFYDQVKKRRILYGWISEGDIESDDL	412
Query	301	KKGWASLQSIPTVLHDNKTGTYLLWPPIEEVESLRTNSTEFEDVLLPEGSVVPLDIGSA	360
Sbjct	413	KKGWASLQSIPTVLHDNKTGTYLLWPPIEEVESLRTNSTEFEDVLLPEGSVVPLDIGSA	472
Query	361	SQLDIVAEFEVDNETLEAMVEADVIYNCST SAGAAGRGALGPFILVLADDTLSELTPIY	420
Sbjct	473	SQLDIVAEFEVDNETLEAMVEADVIYNCST SAGAAGRGALGPFILVLADDTLSELTPIY	532
Query	421	FYIAKDTDGSYKTFCTDLSSSLAVDDVDQRIYGSIVPVLDD EKPTMRVLVDHSIVEGF	480
Sbjct	533	FYIAKDTDGSYKTFCTDLSSSLAVDDVDQRIYGSIVPVLDD EKPTMRVLVDHSIVEGF	592
Query	481	SQGRSCITTRVYPTAIYGAARLFLFNATGVNVTASIKIWEMASADIHPYPLDQP	537
Sbjct	593	SQGRSCITTRVYPTAIYGAARLFLFNATGVNVTASIKIWEMASADIHPYPLDQP	649

Fonte: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_225466093

As proteínas invertase vacuolar GIN1 e GIN2 são responsáveis pela quebra da sacarose armazenada nas células das bagas das uvas em glicose e frutose, sendo a invertase GIN1 a proteína mais abundante nos vinhos (DAMBROUCK ET AL., 2005; GIRIBALDI; GIUFFRIDA, 2010). Dambrouck et al. (2005) relacionaram a diminuição de concentração dessa proteína em vinhos base elaborados com a variedade de uva *Chardonnay* com diminuição da propriedade espumante do produto final.

4.5 Focalização isoeétrica OFFGEL

Com o intuito de verificar como as proteínas do espumante se comportariam nesse método de focalização isoeétrica, foi utilizada a mesma amostra 1 (Chandon *Excellence*) em fita comercial de gel de poliacrilamida de 13 cm de pH 3–10 linear.

No primeiro teste de OFFGEL, após a focalização, os conteúdos de cada um dos poços transferidos para microtubo de 2,0 mL identificados foram armazenados à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Foram, então, feitos dois géis de poliacrilamida 12,5% (Figuras 17 e 18) para que houvesse a visualização da separação das proteínas nos diferentes pHs médio das frações do OFFGEL.

Figura 17. Gel 1.1 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 1 da proteína precipitada com Acetona 100% (frações de 1 a 6)

Fonte: Autoria própria

No gel 1.1 (Figura 17) foram colocadas as frações dos poços de 1 a 6 e em seguida o padrão de baixo peso molecular e no gel 1.2 (Figura 18) foram colocadas as frações dos poços 7 a 11 e em seguida o padrão de baixo peso molecular. No poço número 12, não foi verificado nenhum líquido presente. Os géis foram corados com prata.

Nos dois géis (Figuras 17 e 18) percebe-se o mesmo padrão de separação encontrado nos géis de poliacrilamida da segunda dimensão da eletroforese 2DE, uma concentração maior de proteínas em determinadas faixas de pH, mas principalmente a presença de duas bandas de proteínas de peso molecular próximo a 25 kDa e uma terceira próximo a 70 kDa.

No caso do teste 1 OFFGEL, as proteínas estão mais concentradas nos pHs médios de 5,6 (poço 5 – Figura 17) a 8,5 (poço 10 – Figura 18).

Figura 18. Gel 1.2 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 1 da proteína precipitada com Acetona 100% (frações de 7 a 11)

Fonte: Autoria própria

Esse teste foi repetido (teste 2) com a amostra 1 (Chandon *Excellence*) porém utilizando a amostra de proteína precipitada pelo método de TCA em acetona. Nesse caso, após a focalização, os conteúdos dos poços de diferentes pHs médio foram novamente separados em géis de poliacrilamida 12,5% (Figuras 19 e 20).

Figura 19. Gel 2.1 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 1 da proteína precipitada com TCA em acetona (frações de 1 a 5)

Fonte: Autoria própria

No gel 2.1 (Figura 19) foram colocados o padrão de baixo peso molecular e as frações dos poços de 1 a 5 e no gel 2.2 (Figura 20) foram colocados o padrão de baixo peso molecular e as frações dos poços 6 a 10. Nessa amostra, nos poços números 11 e 12 não haviam líquido presente. Os géis foram corados com prata.

Figura 20. Gel 2.2 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 1 da proteína precipitada com TCA em acetona (frações de 6 a 10)

Fonte: Autoria própria

Novamente percebe-se o mesmo padrão de separação (duas bandas de proteínas próximo do 25 kDa e uma do 70 kDa), sendo uma concentração maior das proteínas na faixa de pH médio de 5,0 (poço 4), no gel 2.1 (Figura 19). Nesse gel, ainda pode-se ver uma banda próximo do 14 kDa.

No gel 2.2 (Figura 20), percebe-se bandas fracas próximas a 25 kDa nas faixas de pH médio de 6,2 a 8,0 (poços 6 a 9). Porém, as bandas próximas a 70 kDa são intensas nas faixas de pH médio de 6,2 a 7,4 (poços 6 a 8).

Já no teste 3 da separação das proteínas utilizando a técnica de focalização isoeétrica OFFGEL, utilizou-se a amostra 2 (Cave de Amadeu) precipitado com acetona 100%.

Os géis de poliacrilamida dos conteúdos dos 12 poços (Figuras 21 e 22) mostram que houve uma maior concentração de proteínas próximo de 70 kDa na faixa de pH médio de 5,0 (poço 4) visualizado pela banda mais escura (Figura 21). Para as bandas próximas de 25 kDa são observadas uma dispersão das proteínas entre as faixas pH médio de 5,0 (poço 4) até pH médio de 8,0 (poço 9).

Figura 21. Gel 3.1 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 2 da proteína precipitada com TCA em acetona (frações de 1 a 7)

Fonte: Autoria própria

Dufrechou et al. (2013) encontraram em vinhos tranquilos branco de *Sauvignon* identificadas por espectrometria de massas 3 proteínas: invertase vacuolar I de massa teórica 71.746 Da (*accession number* Q9S944_VITVI); *class IV – Chitinase* de massa teórica 27.528 Da (*accession number* Q7XAU6_VITVI); e *Vitis vinifera thaumatin-like*

protein (VVTL1) de massa teórica 24.866 Da (*accession number* O04708_VITIVI). Essas mesmas proteínas foram também encontradas em vinhos brancos e espumantes por outros pesquisadores (DAMBROUCK et al., 2005; CILINDRE et al., 2008; BRUIJN et al., 2013).

Figura 22. Gel 3.2 de poliacrilamida 12,5% do OFFGEL da amostra 2 da proteína precipitada com TCA em acetona (frações de 8 a 12)

Fonte: Autoria própria

Os resultados observados nos géis de OFFGEL dessa tese estão em acordo com a literatura, no que concerne os pesos moleculares das proteínas mais abundantes dos vinhos. Porém, o espalhamento nos diferentes pHs para uma dada banda pode estar relacionada a pequenas variações das moléculas de proteínas devido aos diversos compostos da matriz vinho, ou ainda glicosilação das proteínas.

Palmisano et al. (2010) encontraram 28 glicoproteínas em vinhos brancos de *Chardonnay*, sendo 13 de origem da uva e 15 da levedura, em 44 sítios de glicosilação (N-ligação). Na glicosilação (N-ligação) a glicana se liga a cadeia peptídica por ligação amida no resíduo de asparagina localizado na sequência Asn-X-Thr/Ser/Cys (onde X pode ser qualquer aminoácido exceto a prolina). Das glicoproteínas da uva identificadas estão a quitinase classe IV, a endoquitinase classe IV, proteína putativa similar a taumatina e a invertase vacuolar GIN1. A presença de glicana nas proteínas aumenta a solubilidade, estabilidade e a resistência a proteases, sendo considerado um fator importante contra a precipitação das proteínas ao longo do processo de elaboração do vinho.

Utilizando as técnicas clássicas de extração de proteínas nesta tese, apenas algumas bandas de basicamente três a quatro pesos moleculares diferentes foram observadas. Na literatura, como já citado acima, foram identificadas basicamente as mesmas proteínas nos diversos trabalhos, sendo essas as mais abundantes nos vinhos. Diante desse cenário, buscou-se um novo método de extração de proteínas que pudesse não somente identificar as proteínas mais abundantes, como aquelas outras que pudessem caracterizar melhor as similaridades e diferenças dos vinhos espumantes nacionais em relação ao descrito na literatura sobre os vinhos espumantes estrangeiros. Após busca de possíveis métodos, e os promissores resultados de identificação de proteínas pela primeira vez apresentados por alguns grupos (D'AMATO et al., 2010; D'AMATO et al., 2011; CILINDRE et al., 2014) utilizando este novo método de extração de proteínas por CPLL em vinhos, este método foi selecionado e testado nesta tese.

4.6 Avaliação da extração com CPLL das amostras de espumante

Por ser uma metodologia nova de extração de proteínas de amostras complexas, foram necessárias adaptações aos protocolos disponíveis na literatura para que houvesse melhores resultados.

O primeiro teste realizado utilizando os *beads* de ProteoMiner™ foi com relação a forma de hidratação dos mesmos (Figuras 23 e 24). Em um primeiro momento reidratou-se os *beads* conforme a indicação do fabricante, porém não todo o conteúdo do frasco (525 mg) conforme indicado. Assim, adicionou-se a 10 mg dos *beads* a 200 µL de solução 20% (v/v) de etanol P.A., guardando a proporção indicada. Deixou-se reidratando *overnight* à 4 °C com agitação suave.

Segundo o fabricante, após a reidratação, a proporção do decantado de *beads* em relação ao volume total deve ser de 20%. Porém, como os *beads* reidratados não apresentaram esta proporção, foi feita uma observação dos mesmos com microscópio eletrônico com lente objetiva de aumento de 40x. No microscópio com aumento de 400x, os *beads* reidratados tinha em média 30 µm de diâmetro (Figura 23). Righetti

citou que os *beads* reidratados deveriam ter cerca de 60 a 65 μm de diâmetro (informação pessoal)⁸.

Figura 23. Fotografia eletrônica dos *beads* reidratados segundo indicação do fabricante com 20% (v/v) etanol *overnight* à 4 °C com aumento de 400x em microscópio invertido óptico-digital Olympus CKX41 (escala 20 μm)

Fonte: Autoria própria

Foi feito, então, o teste de reidratação segundo Boschetti e Righetti (2013, p. 278) com metanol P.A. na proporção de 20 μL de metanol para cada 1 mg de *bead*, agitando suavemente por 30 min. Em seguida, adicionou-se 20 μL de tampão fosfato 25 mmol L^{-1} (pH7) e deixou-se *overnight* à temperatura ambiente, com agitação suave. Com esse método de reidratação, obteve-se um aumento do diâmetro dos *beads* reidratados para cerca de 40 μm (Figura 24), mas não alcançando o valor citado por Righetti.

Figura 24. Fotografia eletrônica dos *beads* reidratados segundo Boschetti e Righetti (2013, p. 278) com metanol P.A. (20 μL de metanol para cada 1 mg de *bead*) por 30 min, e 20 μL de tampão fosfato 25 mmol L^{-1} (pH7), *overnight* à temperatura ambiente com aumento de 400x em microscópio invertido óptico-digital Olympus CKX41 (escala de 20 μm)

Fonte: Autoria própria

⁸ Righetti, G. **It's time to pop a cork_article_doubt**. Mensagem eletrônica recebida de righetti.pg@tiscali.it em 20 de ago. 2015.

Como esse método de reidratação mostrou-se melhor do que o originalmente informado pelo fabricante, ele foi utilizado neste trabalho.

Na literatura (CEREDA et al., 2010; D'AMATO et al., 2010; CILINDRE et al., 2014) o método de recuperação dos *beads* reidratados após a extração das proteínas da matriz é por filtração, porém o procedimento utilizado aqui foi a decantação e centrifugação, pois foi observado que os *beads* precipitavam rapidamente. Além disto, este procedimento adotado diminui o risco de eventuais perdas na filtração dos *beads* e, portanto, das proteínas extraídas.

4.7 Análise proteômica do espumante por shotgun a partir do extrato de CPLL

Foram extraídas as proteínas das amostras de cinco espumantes brasileiros (amostras 1 a 5) e um *champagne* francês (padrão positivo - Moët) com os *beads* de CPLL sob as mesmas condições, e cada extrato digerido com tripsina foi analisado com a estratégia *shotgun* em nLC-MS/MS (apêndices A e B).

Nos espumantes brasileiros foram encontradas 40 proteínas, sendo 17 proteínas de organismos do sub-reino *Viridiplantae* e dessas 12 são da espécie *Vitis vinifera*. As demais 23 proteínas são caracterizadas como sendo pertencentes ao gênero *Saccharomyces*.

Segundo a classificação proposta por D'Amato et al. (2011) na qual as proteínas identificadas extraídas com CPLL que possuem apenas uma sequência de peptídeo de identificação são consideradas proteínas de baixa abundância na matriz. Já aquelas que possuem três ou mais sequências de peptídeos são consideradas média ou alta abundância na amostra. Das proteínas identificadas nos vinhos pertencentes aos organismos *Viridiplantae*, 10 proteínas estão presentes pelo menos em duplicata nas amostras de espumantes nacionais (Tabela 10). E destas, 30% podem ser consideradas proteínas de baixa abundância na matriz, sendo apenas possível de serem detectadas com a extração por CPLL. Esta mesma proporção foi observada por D'Amato et al. (2011) em amostras de vinho branco licoroso italiano (*Recioto*) e uma proporção ainda maior (47% ou 20 em 43 proteínas identificadas)

foram consideradas de baixa abundância em vinhos espumantes franceses (*Champagne*) por Cilindre et al. (2014).

Tabela 10. Alinhamento dos formatos de acesso dos bancos UniProt e NCBI das proteínas identificadas nos espumantes brasileiro consultando o banco de dados UniProt *Viridiplantae*

Amostra	Acesso UniProt	Descrição UniProt	MM [kDa]	pI teor.	NCBI GI	Descrição NCBI
1, 2, 4	A5C9F1_VITVI	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04300	23,9	4,75	1839046	osmotin-like protein [Vitis vinifera]
3, 4, 5	A9CSP0_9ROSI	Putative thaumatin-like protein OS=Vitis hybrid cultivar GN=Tam-TLP	23,9	5,31	163914227	putative thaumatin-like protein [Vitis hybrid cultivar]
2, 4	B0FZ26_9ROSI	Class IV chitinase OS=Vitis pseudoreticulata GN=Chi4D	27,3	5,25	164699029	class IV chitinase [Vitis pseudoreticulata]
1, 4	F6HAU0_VITVI	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_16s0022g00670	60,0	4,61	225466093	beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I-like [Vitis vinifera]
1, 2, 4, 5	F6HMA2_VITVI	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_10s0003g01360	60,7	5,05	359483753	low-temperature-induced cysteine proteinase-like [Vitis vinifera]
1, 2, 3, 4	F6HUG9_VITVI	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04310	23,8	4,88	33329390	thaumatin-like protein [Vitis vinifera]
1, 2	F6HUH1_VITVI	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04330	24,0	5,31	2213852	VVTL1 [Vitis vinifera]
1, 2	O81228_VITVI	PR-4 type protein OS=Vitis vinifera GN=PR-4 ^a	15,2	5,85	3511147	PR-4 type protein [Vitis vinifera]
1, 2, 5	Q9M4G7_VITVI	Putative thaumatin-like protein (Fragment) OS=Vitis vinifera GN=TI2	20,1	4,75	7406714	putative thaumatin-like protein [Vitis vinifera]
1, 4	W9RMN4_9ROSA	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase OS=Morus notabilis GN=L484_007244	18,0	4,88	703112925	5'-methyladenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase [Morus notabilis]

Fonte: Autoria própria

As proteínas presentes nos espumantes brasileiros que foram observadas em 2 ou mais amostras estão relacionadas na Tabela 10. Para cada proteína, foi feita a correlação entre o número de acesso (do banco de dados de sequências de proteínas UniProt) informado pelo programa *Proteoma Discoverer* (v.1.2.0 *Thermo*) analisado pelo algoritmo SEQUEST e o número de acesso do banco de dados de sequência de proteínas NCBI. Para tanto, os resultados obtidos com número de acesso UniProt de cada proteína foi primeiramente buscado no sítio do banco UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Os dados de sequência de aminoácidos de cada proteína no formato FASTA obtidos no sítio do banco UniProt foram utilizados na procura BLASTp no sítio do banco NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As proteínas que tiveram no alinhamento com sequência de interesse valor de 100% de cobertura e identidade de pelo menos 99% foram consideradas como sendo a mesma proteína.

As proteínas relacionadas à patogênese (*pathogenesis-related proteins* – PR) são produzidas nas plantas por estímulos bióticos (infecção de um patógeno) ou abióticos (estresse) e foram classificadas em 17 famílias. As proteínas PR são resistentes a ação proteolítica, estáveis a baixos pH e a altas temperaturas e podem estar localizadas tanto nas membranas celulares como nos vacúolos das células. Nos vinhos já foram identificadas 5 famílias das proteínas PR: PR-2 (proteínas com propriedades β -1,3-glucanase), PR-3 (quitinase I, II, IV e VII), PR-4 (quitinase I e II), PR-5 (proteínas tipo osmotina e taumatina) e PR-14 (proteínas relacionadas com o transporte de lipídios) (MONTEIRO et al., 2003; LOON et al., 2006; WIGAND et al., 2009).

Nos vinhos espumantes brasileiros deste trabalho foram encontradas as seguintes proteínas relacionadas à patogênese (Tabela 10): da família PR-3 a quitinase classe IV (*class IV chitinase [Vitis pseudoreticulata]* gi: 164699029); da família PR-4 a proteína tipo PR-4 (*PR-4 type protein [Vitis vinifera]* gi: 3511147); da família PR-5 a proteína tipo osmotina (*osmotin-like protein [Vitis vinifera]* gi: 1839046), a proteína putativa similar a taumatina (*putative thaumatin-like protein [Vitis hybrid cultivar]* gi: 163914227), a proteína similar taumatina (*thaumatin-like protein [Vitis vinifera]* gi: 33329390), a proteína putativa similar a taumatina (*putative thaumatin-like protein [Vitis vinifera]* gi: 7406714) e a proteína VVTL1 (*VVTL1 [Vitis vinifera]* gi: 2213852).

Além destas proteínas PR, em apenas uma amostra de espumante brasileiro (Apêndice A) foi encontrada a proteína de transferência de lipídeos (*lipid transfer protein precursor [Vitis vinifera]* gi: 526117812) pertencente à família PR-14, identificada a partir de apenas um peptídeo. Pode-se inferir que esta proteína está presente no produto em concentrações muito baixas.

Apesar de esperado, neste trabalho não foi encontrada proteína da família PR-2 com atividade β -1,3-glucanase, embora esta proteína seja abundante nas uvas. Similarmente, esta família também não foi verificada por Cillindre et al. (2014) em amostras de espumante francês. Possivelmente porquê, assim como o *Champagne*, os espumantes brasileiros são submetidos à colagem com bentonita sódica tanto na elaboração dos vinhos base, quanto durante a segunda fermentação e estes tratamentos podem ter retirado a proteína em questão por arraste (alta absorção das proteínas a bentonita) ou ainda essa proteína pode ter precipitado naturalmente

durante o processo de estabilização proteica, como evidenciado por Sauvage et al. (2010) em vinhos brancos submetidos a diferentes tratamentos de estabilização.

A proteína quitinase classe IV (PR-3), observada em duas amostras, foi identificada nessas com apenas um e dois peptídeos o que caracteriza uma baixa concentração desta nas amostras. Isto está em acordo com Cillindre et al. (2014) que não encontrou esta proteína nas amostras de *Champagne*. Sauvage et al. (2010) demonstraram que essa proteína tem um comportamento intermediário em relação a adsorção pela bentonita, o que explica sua baixa concentração e até ausência em alguns produtos, embora a quitinase junto com as proteínas similar a taumatina sejam as proteínas mais abundantes das uvas (MONTEIRO et al., 2003).

A proteína tipo PR-4 encontrada em duas amostras de espumantes brasileiros foi identificada, nos dois casos com três peptídeos, o que revela uma maior abundância desta nos vinhos. Duas classes de quitinase (I e II) pertencem a família PR-4 e essas proteínas possuem um domínio de ligação a quitina com ação antifúngica nas uvas (MARANGON et al., 2009).

A proteína tipo osmotina pertencente à família PR-5 é induzida nas uvas por estresse osmótico e por patógenos (LOON et al., 2006). A proteína foi encontrada em três amostras, sendo que o número de peptídeos que a identificou foram de dois, três e quatro para cada amostra. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* podem apresentar maior ou menor resistência a osmotina. Os resultados de pesquisa mostram que as interações específicas da osmotina com a membrana plasmática da levedura são responsáveis pela morte celular. Porém, a modulação da toxicidade da osmotina deve-se a diferenças na composição da parede celular, já que é a parede da célula que regula o acesso de osmotina à membrana plasmática (YUN et al, 1997).

Outras enzimas pertencentes a família PR-5 encontradas nas amostras foram duas proteínas putativa similar a taumatina, uma proteína similar a taumatina e a VVTL1. Elas formam o grupo de proteínas mais abundante tanto em número de amostras que foram encontradas como em concentração, uma vez que a maioria foi identificada com pelo menos três peptídeos. Resultado semelhante foi encontrado por Cillindre et al. (2014). Estas proteínas possuem atividade antifúngica e sua concentração nas uvas aumenta com a maturação da baga, variando conforme a variedade de uva e as condições climáticas (MONTEIRO et al., 2003).

A proteína invertase (*beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I-like [Vitis vinifera]* gi: 225466093) que transforma a sacarose em glicose e frutose é considerada

a proteína mais abundante em vinhos e foi igualmente observada por Cillindre et al. (2014) nos dois espumantes franceses. Tal abundância não foi observada nesta tese, pois apenas duas amostras possuíam invertase e ambas foram identificadas por dois peptídeos. Mas, para a amostra 1 (Chandon *Excellence*) além de sua identificação por CPLL, esta proteína (F6HAU0) também foi identificada na extração das proteínas por precipitação pelo método TCA/Acetona a partir do gel SDS-PAGE (tabela 9).

Dambrouck et al. (2005) em seu estudo de avaliação do efeito da colagem sobre a quantidade de proteínas total e da invertase em vinhos base espumante concluíram que a quantidade total de proteínas diminuía com o aumento da concentração principalmente de bentonita e a proteína invertase igualmente apresentava um decréscimo que ocasionava uma diminuição da capacidade de formação de espuma nos produtos finais. Assim, a baixa concentração ou inexistência desta enzima em alguns dos espumantes brasileiros em relação ao observado por Cillindre pode ser explicado pelo uso de bentonita durante o processo de elaboração do espumante.

A enzima cisteína proteinase induzida a baixa temperatura (*low-temperature-induced cysteine proteinase-like* [*Vitis vinifera*] gi: 359483753) encontrada em quatro das cinco amostras de espumantes brasileiros e também no padrão positivo (*Champagne Moët&Chandon* – apêndice A), apesar de estar em baixa concentração na maioria dos produtos é uma proteína comum. As cisteínas proteinases são um grupo de mais de 130 proteínas encontradas em plantas, animais e microorganismos, sendo a família da papaína a mais abundante (DAMODARAN et al., 2008). Porém, não há registros anteriores na literatura desta proteína em vinhos.

A proteína 5'-metiltioadenosina/S-adenosilhomocisteína nucleosidase (5'-*methyladenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase* [*Morus notabilis*] gi: 703112925) encontrada em duas amostras em baixa abundância, catalisa a clivagem da ligação glicosídica dos substratos S-adenosilhomocisteína a 5'-metiltioadenosina. Esta proteína foi identificada pela primeira vez em vinhos.

Os vinhos espumantes também possuem proteínas provenientes da autólise das leveduras utilizadas na elaboração do vinho base e no processo de tomada de espuma. Estas leveduras são, em geral, adquiridas pelas empresas de forma liofilizada (seca e ativa) e pertencentes a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Neste trabalho foram identificadas 23 proteínas de leveduras (Apêndice B), e dessas, 6 proteínas foram observadas em mais de duas amostras (Tabela 11)

Tabela 11. Alinhamento dos formatos de acesso dos bancos UniProt e NCBI das proteínas identificadas nos espumantes brasileiro consultando o banco de dados UniProt_ *Saccharomyces*

Amostra	NCBI GI	Descrição NCBI	MW [kDa]	calc. pI	Acesso UniProt	Descrição UniProt
1, 2, 3, 4, 5	190409145	protein YGP1 precursor [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a]	37,3	5,44	B3LP15	B3LP15_YEAS1 -Protein YGP1 - Saccharomyces cerevisiae (strain RM11-1a) (Baker's yeast)
1, 2, 3, 4, 5	207342449	YMR006Cp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	59,8	4,63	B5VPD0	B5VPD0_YEAS6 - Lysophospholipase Saccharomyces cerevisiae (strain AWRI1631) (Baker's yeast)
1, 2, 3, 4, 5	349576260	K7_Pau7p [Saccharomyces cerevisiae Kyokai no. 7]	5,7	5,01	G2W8N9	G2W8N9_YEASK - K7_Pau7p Saccharomyces cerevisiae (strain Kyokai no. 7 / NBRC 101557) (Baker's yeast)
1, 2, 4	323306112	Ecm33p [Saccharomyces cerevisiae FostersB]	23,9	4,68	E7Q0N6	E7Q0N6_YEASB - Ecm33p Saccharomyces cerevisiae (strain FostersB) (Baker's yeast)
2, 4	323353829	Cts1p [Saccharomyces cerevisiae VL3]	56,8	4,55	E7QI89	E7QI89_YEASZ - Cts1p Saccharomyces cerevisiae (strain Zymaflore VL3) (Baker's yeast)
2, 4	337294721	endo-beta-1,3-glucanase [Saccharomyces cerevisiae]	34,1	4,51	F8KAD8	F8KAD8_YEASX - Endo-beta-1,3-glucanase Saccharomyces cerevisiae (Baker's yeast)

Fonte: Autoria própria

A proteína precursora YGP1 [*Saccharomyces cerevisiae* RM11-1a] (gi:190409145) encontrada nos espumantes brasileiros é semelhante em 99% com a proteína YGP1 UniProt P38616 (YGP1_YEAST) da *Saccharomyces cerevisiae* (cepa ATCC 204508 / S288c/ gi:285814495). Essa proteína parece atuar na adaptação da levedura ao meio antes do crescimento microbiológico (MERCEDES et al., 1999). Cilindre et al. (2014) também identificaram essa proteína tanto no *Champagne* elaborado exclusivamente com a variedade de uva *Chardonnay* como no elaborado com o corte de *Pinot meunier*, *Pinot noir* e *Chardonnay*.

A proteína tipo YMR006C [*Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631] (gi: 207342449; UniProt B5VPD0) verificada em todos os espumantes brasileiros (Tabela 11), é uma fosfolipase que libera ácidos graxos dos fosfolípidos e embora seu gene tenha sido identificado em alguns estudos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ERASMUS, 2003; ACEITUNO et al., 2012), foi determinada em vinhos pela primeira vez.

A proteína tipo YMR006C tem um domínio conservado no intervalo do 32º aminoácido até o de número 550 pertencente à família das proteínas tipo *patatin* fosfolipase, como mostra a Figura 25. Essa proteína tem 77% de cobertura e, dessa

99% de semelhança (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#6323648>) com a fosfolipase Plb2p [*Saccharomyces cerevisiae* S288c] (gi: 6323648; UniProt Q03674) encontrada em vinhos tipo *Champagne* por Cilindre et al. (2104). Yin et al. (2005) encontraram essa mesma enzima na parede celular da levedura, embora normalmente as fosfolipases estejam localizadas e ativas na membrana plasmática.

Figura 25. Domínio conservado da proteína tipo YMR006C [*Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631] (gi: 207342449) pertencente à família de proteína tipo patatin fosfolipase

Fonte: ncbi disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=EDZ70212.1 >. Acesso em: 06 de dezembro de 2015.

A proteína K7_Pau7p [*Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7] (gi: 349576260; UniProt G2W8N9) é uma proteína pequena de apenas 55 resíduos de aminoácidos. Essa proteína foi encontrada em todos os espumantes brasileiros e identificada pela primeira vez em vinhos. Ela está presente durante a fermentação alcoólica. A região do resíduo 23 ao 55 pertence à família TIP1 e *seripauperin*. A proteína TIP1 parece não possuir atividade enzimática (YIN et al., 2005).

A proteína Ecm33p [*Saccharomyces cerevisiae* FostersB] (gi: 323306112; UniProt E7Q0N6) encontrada em três vinhos espumantes brasileiros foi caracterizado pela primeira vez em vinhos. Esta proteína já havia sido identificada em fermentação de mosto sintético pela *S. cerevisiae* (NDLOVU, 2012) e uma proteína Ecm33p (gi: 323356050) foi identificada em secretomas de mosto sintético fermentado com *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Metschnikowia pulcherrima* + *Saccharomyces cerevisiae* (MOSTERT, 2013), tendo a proteína gi: 323306112 apenas 66% de cobertura contra a proteína gi: 323356050. Essa proteína de

superfície ligada a glicosilfosfatidilinositol da parede celular da levedura é importante para sua integridade (PARDO et al., 2004).

A proteína Cts1p [*Saccharomyces cerevisiae* VL3] (gi: 323353829; UniProt E7QI89) foi verificada em duas amostras de espumante brasileiro a nível de traço já que em ambos apenas um peptídeo foi sequenciado. Esta proteína é uma quitinase da parede celular da levedura já bem identificada na literatura (CAPPELLARO; MRSA; TANNER, 1998; STRAHL-BOLSINGER; SCHEINOST, 1999; KIN et al., 2011). Porém, em vinhos foi identificada pela primeira vez neste trabalho.

A proteína endo-beta-1,3-glucanase [*Saccharomyces cerevisiae*] (gi: 337294721; UniProt F8KAD8) foi encontrada em duas amostras dos espumantes brasileiros em grande abundância já que foram identificadas por 5 e 6 peptídeos (Apêndice B). São enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas β -1,3 de porções internas das glicanas (polímeros de glicose onde a ligação entre unidades glicosídicas se dá entre os carbonos 1 e 3). Esta enzima é muito ativa durante a fermentação alcoólica e sua ação permanece ativa durante muitos meses após a morte das leveduras (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Esta proteína também foi identificada em vinhos *Recioto* por D'Amato et al. (2011), porém em baixa concentração já que apenas um peptídeo foi identificado na proteína.

Cilindre et al. (2014) evidenciam que embora os *Champagnes* elaborados com uva *Chardonnay* possuam uma menor quantidade de proteínas, eles possuem um poder espumante maior, indicando que o poder espumante possa estar relacionado com a qualidade e não com a quantidade de proteínas.

4.8 Avaliação da propriedade espumante

Foram feitas as filmagens do serviço dos espumantes brasileiros e do padrão positivo (*Champagne Moët&Chandon*) e, nas condições de análise, apenas a amostra 3 (Cave Geisse *Brut*) foi possível comparar com o *Champagne*. Isso se deu porque as demais amostras de espumantes brasileiros possuíam garrafas de formato distinto do *Champagne*, o que alterava a altura e posição do gargalo da garrafa em relação a taça assim como a vazão do serviço.

Na comparação visual das imagens dos momentos 5 s, 10 s, 11,5 s, 20 s da amostra 3 (Cave Geisse *Brut*) e do padrão positivo (*Champagne Moët&Chandon*) (Figura 26) percebe-se que em todos os momentos do serviço, a amostra do espumante brasileiro sempre apresenta uma propriedade espumante superior ao francês tanto em quantidade de espuma formada durante o serviço no momento 5 s (Figura 26 a e b) quanto no momento 10 s (Figura 26 c e d). O mesmo se repete nos momentos pós-serviço de 11,5 s (Figura 26 e e f) e 20 s (Figura 26 g e h) onde a quantidade, o tamanho e o comportamento da espuma (*perlage* e colarinho) formada na taça, assim como sua persistência ao longo do tempo possui uma qualidade melhor no espumante brasileiro.

Figura 26. Imagens extraídas da filmagem desde o tempo zero, momento em que o líquido toca o fundo da taça, até: 5 s após início do serviço a) Cave Geisse *Brut* e b) *Moët&Chandon*; 10 s após início do serviço c) Cave Geisse *Brut* e d) *Moët&Chandon*; 11,5 s após início do serviço e) Cave Geisse *Brut* e f) *Moët&Chandon*; 20 s após início do serviço g) Cave Geisse *Brut* e h) *Moët&Chandon*.

Fonte: Autoria própria

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposto o estudo proteômico dos espumantes brasileiros por ser um tema inédito na literatura até o presente, que dá subsídio para a compreensão da relação entre a quantidade e qualidade das proteínas identificadas e a qualidade do produto, em especial a formação de espuma.

O primeiro passo avaliado necessário ao estudo foi definir a melhor forma de extração das proteínas. Das formas de extração tradicionais testadas, a extração com melhor rendimento medido pela quantificação de proteínas total pelo método de *Bradford* foi a de precipitação com TCA em acetona, apresentando mais bandas no gel SDS-PAGE, bem como mais escuras, portanto com uma concentração maior das proteínas separadas pela eletroforese.

A separação 2DE com fitas de pH variando de 3 a 10 (não linear) das proteínas com uma amostra de espumante brasileiro, após vários testes de programas de focalização, foi observada uma tendência de concentração das proteínas em uma faixa de pH mais ácidos até próximo a pH 8 em três níveis de massa molecular (duas bandas próximas de 25 kDa e uma de 70 kDa), sugerindo a presença de pelo menos três diferentes proteínas.

O mesmo comportamento visto na análise de 2DE, foi observado na análise de focalização por OFFGEL onde houve um espalhamento das proteínas nos diferentes poços, tendo uma concentração maior nas frações dos poços 6 a 10. Isto sugeriu uma possível formação de isoformas das proteínas ao longo do processo de elaboração dos espumantes além das formações de isoformas da própria uva.

Foi sugerida a presença de VVTL1 e quitinase classe IV (25 e 27 kDa, respectivamente) e ainda de invertase vacuolar (72 kDa), de acordo com a literatura. Essas proteínas são encontradas também em espumantes estrangeiros, portanto não diferenciando o espumante brasileiro dos demais produtos.

Na análise de espectrometria de massas primeiramente de uma amostra de espumante brasileiro na qual houve a extração das proteínas pelo método de TCA/Acetona (amostra1) observou-se a identificação de cinco proteínas, sendo uma delas uma invertase vacuolar. Existe uma correlação positiva entre a concentração da invertase e a capacidade espumante dos vinhos.

Já na extração por CPLL, para esta mesma amostra 1 foram caracterizadas 16 proteínas, sendo 10 proteínas da uva (das quais oito foram também encontradas em outras amostras de espumantes brasileiros) e 6 da levedura. Esta nova forma de extração das proteínas mostrou-se muito mais eficiente ao estudo proteômico.

Ao todo, no conjunto das amostras de espumantes no qual o método de extração de proteínas foi por CPLL, foram identificadas 40 proteínas, sendo 17 proteínas de organismos do sub-reino *Viridiplantae* e 23 proteínas pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, onde 10 e 6 proteínas, respectivamente, estão presentes em pelo menos duas amostras de espumantes nacionais.

Foram ainda identificadas pela primeira vez em vinhos seis proteínas, sendo duas originárias da uva e quatro da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

As proteínas da levedura encontradas podem ser aquelas responsáveis pela melhor formação de espuma observada em nossos produtos em relação ao *Champagne*, já que três delas estão presentes em todos os produtos analisados. Estudos mais aprofundados destas três proteínas são necessários para verificar se elas realmente participam da qualidade da espuma e em qual proporção, já que outras proteínas encontradas e já relatadas na literatura como promotoras de espuma poderiam também influenciar nesta característica de forma positiva.

Seria interessante estudar por exemplo se essas proteínas são glicosiladas no vinho e o nível desta glicosilação, uma vez que esta característica dá estabilidade a proteína no produto e poderia participar como macromolécula na estabilização da espuma. E se comprovada suas relações positivas com a qualidade da espuma, estudos complementares do porquê da presença destas nos nossos produtos em relação aos estrangeiros se farão imprescindíveis a fim de entender e favorecer ainda mais suas presenças, melhorando o processo de elaboração de vinhos espumantes no Brasil.

Este estudo de caráter exploratório dá base para mais pesquisas proteômicas dos vinhos espumantes, uma vez que a expressão das proteínas não é estática, variando de ano a ano para uma dada variedade de uva. Além disto, outros fatores como os tratos culturais das parreiras, os processos de elaboração do produto, os produtos enológicos utilizados, em especial a bentonita, e ainda o corte de uvas (variedade de uva usada e proporção delas) influenciam completamente a quantidade e qualidade de proteínas no produto final.

REFERÊNCIAS

ACEITUNO, F.F.; ORELLANA, M.; TORRES J.; MENDOZA, S.; SLATER, A.W.; MELO, F.; AGOSIN, F. Oxygen response of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 23, p. 8340-8352, 2012.

AGUIÉ-BÉGHIN, V.; ADRIAENSEN, Y.; PÉRON, N.; VALADE, M.; ROUXHET, P.; DOUILLARD, R. Structure and chemical composition of layers adsorbed at interfaces with Champagne. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p. 10399–10407, 2009.

ANDRE'S-LACUEVA, C.; GALLART, M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Influence of variety and aging on foaming properties of sparkling wine (Cava). **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 3826–3829, 1996.

BJELLQVIST, B.; EK K.; RIGHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; GÖRG A.; WESTERMEIER, R.; POSTEL, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 6, n. 4, p. 317-339, 1982.

BLASCO, L.; VIÑAS, M.; VILLA, T.G. Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast. **Int. Microbiol.**, v. 14, p. 61-71, 2011.

BLOMBERG, A.; BLOMBERG, L.; NORBECK, J.; FEY, S. J.; LARSEN, P. M.; LARSEN, M.; ROEPSTORFF, P.; DEGAND, H.; BOUTRY, M.; POSCH, A. Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1935–1945, 1995.

BOSCHETTI, E.; BINDSCHEDLER, L.V.; TANG, C.; FASOLI, E.; RIGHETTI, P.G. Combinatorial peptide ligand libraries and plant proteomics: a winning strategy at a price. **J. Chromat. A**, v. 1216, p. 1215–1222, 2009.

BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.G. Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues. **Bio.Techniques**, v. 44, n. 5, p. 663-665, 2008.

BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.G. **Low-abundance proteome discovery**: state of the art and protocols. Oxford:Elsevier, 2013. 341 p.

BRASIL. Decreto N° 8197, de 20 de fevereiro de 2014. Regulamenta a Lei no 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Disponível em < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-014/2014/Decreto/D8198.htm#anexo>. Acesso em: 16 dez. 2014.

BRASIL. Lei Federal N° 7.678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 09 nov. 1988. Disponível em

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L7678.htm>. Acesso em: 27 nov. 2014.

BRASIL. Lei Federal Nº 10.970, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 16 nov. 2004. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2004/Lei/L10.970.htm#art1>. Acesso em: 27 nov. 2014.

BRUIJN, J.; MARTÍNEZ-OYANEDEL, J.; LOBOS, F.; ANZIANI, C.; LOYOLA, C. Enrichment of Sauvignon Blanc wine by heat stable wine macromolecules. In: GARTNER, V.(Ed.). **Macromol. Chem.: New Res.**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2013. p. 47 – 67.

CAPPELLARO, C.; MRSA, V.; TANNER, W. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 19, 1998.

CARPENTIER, S.C.; PANIS, B.; VERTOMMEN, A.; SWENNEN, R.; SERGEANT, K.; RENAUT, J.; LAUKENS, K.; WITTERS, E.; SAMYN, B.; DEVRESEE, B. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 27, p. 354–377, 2008.

CEREDA, A.; KRAVCHUK, A.V.; D'AMATO, A.; BACHI, A.; RIGHETTI, P.G. Proteomics of wine additives: Mining for the invisible via combinatorial peptide ligand libraries. **J. Proteomics**, v. 73, p. 1732–1739, 2010.

CILINDRE, C.; CASTRO, A. J.; CLÉMENT, C.; JEANDET, P.; MARCHAL, R. Influence of *Botrytis cinerea* infection on champagne wine proteins (characterized by two dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. **Food Chem.**, v. 103, p. 139–149, 2007.

CILINDRE, C.; JÉGOU, S.; HOVASSE, S.; SCHAEFFER, A.; CASTRO, A.J.; CLÉMENT, C.; VAN DORSSELAER, C.; JEANDET, P.; MARCHAL, R. Proteomic approach to identify champagne wine proteins as modified by *Botrytis cinerea* infection. **J. Proteome Res.**, v.7, p. 1199 – 1208, 2008.

CILINDRE, C.; LIGER-BELAIR, G.; VILLAUME, S.; JEANDET, P.; MARCHAL, R. Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: grape variety, aging, protein and CO₂ content. **Anal. Chim. Acta**, v. 660, n. 2, p. 164–170, 2010.

CILINDRE, C.; FASOLI, E.; D'AMATO, A.; LIGER-BELAIR, G.; RIGHETTI, P.G. It's time to pop a cork on champagne's proteome! **J. Proteomics**, v. 105, p. 351-362, 2014.

CORBETT, J.M.; DUNN, M.J.; POSCH, A.; GÖRG, A. Positional reproducibility of protein *spots* in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised

pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis*, v. 15, p. 1205–1211, 1994.

D'AMATO, A.; KRAVCHUK, A.V.; BACHI, A.; RIGHETTI, P.G. Noah's nectar: the proteome content of a glass of red wine. **J. Proteomics**, v. 73, p. 2370-2377, 2010.

D'AMATO, A.; FASOLI, E.; KRAVCHUK, A.V.; RIGHETTI, P.G. Mehercules, adhuc bacchus! The debate on wine proteomics continues. **J. Proteome Res.**, v. 10, p. 3789-3801, 2011.

DAMBROUCK, T.; MARCHAL, R.; MARCHAL-DELAHAUT, L.; PARMENTIER, M.; MAUJEAN, A.; JEANDET, P. Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 9, p. 2727-2732, 2003.

DAMBROUCK, T.; MARCHAL, R.; CILINDRE, C.; PARMENTIER, M.; JEANDET, P. Determination of the grape invertase content (using PTA-ELISA) following various fining treatments versus changes in the total protein content of wine. Relationships with wine foamability. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 8782-8789, 2005.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O.R. **Química de alimento de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 900 p.

DAVIES, C.; ROBINSON, S.P. Sugar accumulation in grape berries: cloning of two putative vacuolar invertase cdnas and their expression in grapevine tissues. **Plant Physiol.**, v. 111, p. 275-283, 1996.

DOLNÍK, V.; HUTTERER, K.M. Capillary electrophoresis of proteins 1999–2001. **Electrophoresis**, v.22, n.19, p. 4163–4178, 2001.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, 2006.

DUFRECHOU, M.; VERHET, A.; ROBLIN, P.; SAUVAGE, F.X.; PONCET-LEGRANG, C. White wine proteins: how does the pH affect their conformation at room temperature? **Langmuir**, v. 29, p. 10475 – 10482, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA Uva e Vinho). Comunicado técnico 137: Vitivinicultura brasileira panorama 2012. Bento Gonçalves, 2013.

ERASMUS, D.J.; VAN DER MERWE, G.K; VAN VUUREN, H.J.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Res.**, v. 3, p. 375-399, 2003.

FASOLI, E.; FARINAZZO, A.; SUN, C.J.; KRAVCHUK, A.V.; GUERRIER, L.; FORTIS, F.; BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.G. Interaction among proteins and peptide libraries in proteome analysis: pH involvement for a larger capture of species. **J. Proteomics**, v. 73, p. 733 – 742, 2010.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; PICÜARRA-PEREIRA, M.A.; TANGANHO, M.C. LOUREIRO, V.B.; TEIXEIRA, A.R. Characterisation of the proteins from grapes and wines by immunological methods. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 51, n. 1, p. 22-28, 2000.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; PICARRA-PEREIRA, M.A.; TEIXEIRA, A. R. Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. **Trends Biotech.**, v. 22, p. 168–173, 2004.

FINLEY, D.; ULRICH, H.D.; SOMMER, T.; KAISER, P. The ubiquitin-proteasome system of *saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 192, p. 319-360, 2012.

FLAMINI, R.; TRALDI, P. **Mass spectrometry in grape and wine chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010. 349 p.

FLANZY, C. **Oenologie**: fondements scientifiques et technologiques. Londres; Paris; New York: Tec & doc-Lavoisier, 2000. 1311 p.

FRANCHIN, C.; PIVATO, M.; RATTAZZI, M.; ARRIGONI, G.; MILLIONI, R. OFFGEL fractionation of peptides: where really is your sample? **J. Chromatogr. A**, v.1355, p. 278-283, 2014.

GIRIBALDI, M.; GIUFFRIDA M.G. Heard it through the grapevine: proteomic perspective on grape and wine. **J. Proteomics**, v. 73, p. 1647–1655, 2010.

GONÇALVES, F.; HEYRAUD, A.; PINHO, M.N.; RINAUDO M. Characterization of white wine mannoproteins. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, n. 21, p. 6097–6101, 2002.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v.4, p. 3665-3685, 2004.

GUERRERA, I.C.; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics. **Biosc. Reports**, v. 25, n.1-2, p. 71-93, 2005.

GUERRIER, L.; THULASIRAMAN, V.; CASTAGNA, A.; FORTIS, F.; LIN, S.; LOMAS, L.; RIGHETTI, P.G.; BOSCHETTI E. Reducing protein concentration range of biological samples using solid-phase ligand libraries. **J. Chromatogr. B**, v. 833, p. 33–40, 2006.

JACKSON, D. I.; LOMBARD, P. B. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - a review. **Am. J. Enol. Vitic**, v. 44, n. 4, p. 409-430, 1993.

KIM, K.; KIM, E.; KIM, S.; PARK, Y.; PARK, H. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* ret1–1 mutation on glycosylation and localization of the secretome. **Mol. Cells**, v. 31, p. 151–158, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LE BOURSE, D.; JÉGOU, S.; CONREUX, A.; VILLAUME, S.; JEANDET, P. Review of preparative and analytical procedures for the study of proteins in grape juice and wine. **Anal. Chim. Acta**, v.667, p. 33–42, 2010.

LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. Fermented beverage production. 2.ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. 423 p.

LEE, T.H. Protein instability: nature, characterization and removal by bentonita. In: Physical stability of wine. T. H. Lee (Ed.). **Austral. Soc. Vitic. Enol.**, p. 23-40, 1985.

LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135–62, 2006.

LÓPEZ-BARAJAS, M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C. Effect of vinification and variety on foam capacity of wine. **Amer. J. Enol. Vitic.**, v.49, p.397-402, 1998.

MARANGON, M.; VAN SLUYTER, S.C.; HAYNES, P.A.; WATERS, E.J. Grape and wine proteins: their fractionation by hydrophobic interaction chromatography and identification by chromatographic and proteomic analysis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 4415–4425, 2009.

MARASCO, D.; PERRETTA, G.; SABATELLA, M.; RUVO, M. Past and future perspectives of synthetic peptide libraries. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 9, p. 447-467, 2008.

MARCHAL, R.; BOUQUELET, S.; MAUJEAN, A. Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in a champenois chardonnay wine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, n. 7, p. 1716–1722, 1996.

MARCHAL, R.; SEGUIN, V.; MAUJEAN, A. Quantification of interferences in the direct measurement of proteins in wines from the Champagne region using the Bradford method. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 48, p. 303-309, 1997.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.; CARRASCOSA, A.V.; BARCENILLA, J. M.; POZO-BAYÓN, M. A.; POLO, M. C. Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production, **Food Microb.**, v. 18, n. 2, p. 183–191, 2001.

MERCEDES PARDO, M.; MONTEOLIVA, L.; PLA, j.; SANCHEZ, M.; GIL, C.; NOMBELA, C. Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. **Yeast**, v. 15, p. 459–472, 1999.

MONTEIRO, S.; PICARRA-PEREIRA, M.A.; TEIXEIRA, A. R.; LOUREIRO, V. B.; FERREIRA, R.B. Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes. **J Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 4046–53, 2003.

MORENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M.C. **Wine chem. biochem.** New York: Springer, 2009. 735 p.

MORENO-ARRIBAS, M.V.; PUEYO, E.; NIETO, F.J.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; POLO, M.C. Influence of the polysaccharides and nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. **Food Chem.**, v.70, p. 309-317, 2000.

MORENO-ARRIBAS, M.V.; PUEYO, E.; POLO, M.C. Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. **Anal. Chim. Acta**, v.458, p. 63–75, 2002.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal. Biochem.**, v.117, n. 2, p. 307-310, 1981.

MOSTERT, Talitha Tanya. **Investigating the secretome of non- Saccharomyces yeast in model wine.** 2013. 98 f. Thesis (Master of Sciences) - Institute for Wine Biotechnology, Faculty of AgriSciences, Stellenbosch University, Stellenbosch, 2013.

NDLOVU, Thulile. **Mannoprotein production and wine haze reduction by wine yeast strains.** 2012. 150 f. Dissertation (Doctor of Philosophy in Science) - Institute for Wine Biotechnology, Faculty of AgriSciences, Stellenbosch University, Stellenbosch, 2012.

NUNES-MIRANDA, J. D.; IGREJAS, G.; ARAUJO, E.; REBOIRO-JATO, M.; CAPELO, J. L. Mass spectrometry-based fingerprinting of proteins and peptides in wine quality control: a critical overview. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 53, p. 751–759, 2013.

PALMISANO, G.; ANTONACCI, D.; LARSEN, M. R. Glycoproteomic profile in wine: a 'sweet' molecular renaissance. **J. Proteome Res.**, v. 9, n. 12, p. 6148–6159, 2010.

PARDO, M.; MONTEOLIVA, L.; L.; VÁZQUEZ, P.; MARTÍNEZ, R.; MOLERO, G.; NOMBELA C.; GI, C. Pst1 and Ecm33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. **Microbiology**, v. 150, p. 4157–4170, 2004.

POZO-BAYÓN, M.A.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.; PUEYO, E.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 20, n. 6–7, p. 289-299, 2009.

PUFF, N.; MARCHAL, R.; AGUIÉ-BÉGHIN, V.; DOUILLARD, R. Is grape invertase a major component of the adsorption layer formed at the air/champagne wine interface? **Langmuir**, v.17, p. 2206-2212, 2001.

RESING, K.A.; AHN, N.G. Proteomics strategies for protein identification. **FEBS Letters**, v.579, p. 885–889, 2005.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBORURDIEU, D.; DONECHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications.** 2nd Ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006. v.1. 497 p.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBORURDIEU, D. **Handbook of enology**: the chemistry of wine, stabilization and treatments. 2nd Ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006. v. 2. 441 p.

RIGHETTI, P.G.; BOSCHETTI, E.; LOMAS, L.; CITTERIO, A. Protein equalizer ® technology: the quest for a “democratic proteome”. **Proteomics**, v. 6, p. 3980–3992, 2006.

RIGHETTI, P.G.; FASOLI, E.; D'AMATO, A.; BOSCHETTI, I. E. The “dark side” of food stuff proteomics: the CPLL-marshals investigate. **Foods**, v.3, p.217-237, 2014.

SAITO, Y.; JINNO, K.; GREIBROCK, T. Capillary columns in liquid chromatography: between conventional columns and microchips. **J. Sep. Sci.**, v. 27, p. 1379–1390, 2004.

SALAZAR, F.N.; ZAMORA, F.; CANAL, J.M.; LOPEZ, F. Protein stabilization in sparkling base wine using zirconia and bentonita: influence on the foam parameters and protein fractions. **J. Int. Sci. Vigne Vin**, número especial Macrowine, p. 51-58, 2010.

SALVATO, F.; CARVALHO, M.C.C.G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p. 727-734, 2010.

SAUVAGE, F.X.; BACH, B.; MOUTOUNET M.; VERNHET A. Proteins in white wines: thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonita. **Food Chem.**, v. 118, p. 26–34, 2010.

SHEVCHENKO A.; WILM M.; VORM O.; MANN M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*,v. 68, p. 850-858, 1996.

STEEN, H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.5, n.9, p. 699-711, 2004.

STRAHL-BOLSINGER, S.; SCHEINOST, A. Transmembrane topology of Pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 13, p. 9068–9075, 1999.

TIAN, B.; HARRISON, R.; MORTON, J.; DEB-CHOUDHURY, S. Proteomic analysis of sauvignon blanc grape skin, pulp and seed and relative quantification of pathogenesis-related proteins. **PLoS ONE**, v. 10(6): e0130132, 2015.

TONIETTO, J. Existe "o espumante brasileiro"? **Bon Vivant**, v. 8, n. 97, p. 04, 2007.
USSEGLIO-TOMASSET L. Chimie oenologique. 2e Ed. Paris: Tec et doc , 1995. 387 p.

UVIBRA: União Brasileira de Vitivinicultura. Importação de vinhos: procedência (em litros). Disponível em: http://www.uvibra.com.br/pdf/import_vinhos_espumantes_2007_ago2013.pdf. Acesso em: 25 jan. 2015.

VINCENZI, S.; MOSCONI, S.; ZOCCATELLI, G.; DALLA PELLEGRINA, C.; VENERI, G.; CHIGNOLA, R.; PERUFFO, A.; CURIONI, A.; RIZZI, C. Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine. **Am. J. of Enol. and Vitic.**, v.56, n.3, p. 182–187, 2005.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. Ed. ArtMed, 3ª Ed. Porto Alegre, 2006.

WATERS, E.J.; WALLACE, W.; WILLIAMS, P.J. Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 42, p. 123–127, 1991.

WATERS, E.P.; PELLERIN, P.; BRILLOUET, J.M. A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. **Carboh. Polymers**, v. 23, n. 3, p. 185–191, 1994.

WIGAND, P.; TENZER, S.; SCHILD, H.; DECKER, H. Analysis of protein composition of red wine in comparison with rosé and white wines by electrophoresis and high-pressure liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC–MS). **J Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 4328–33, 2009.

WU, X.; XIONG, E.; WANG, W.; SCALI, M.; CRESTI, M. Universal sample preparation method integrating TCA/Acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. **Nature**, v.9 n. 2, p. 362-374, 2014.

YIN, Q.Y.; GROOT, P.W.J.; DEKKER, H.L.; JONG, L.; KLIS, F.M.; KOSTER, C.G. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 21, p. 20894–20901, 2005.

YUN, D. J.; ZHAO, Y.; PARDO, J. M.; NARASIMHAN, M. L.; DAMSZ, B.; LEE, H.; ABAD, L.R.; D'URZO, M.P.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, p. 7082–7087, 1997.

ZACHERY, R.; GREGORICH, Z.R.; CHANG, Y.H.; GE Y. Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up? **Pflugers Arch.**, v. 466, n.6, p.1199–1209, 2014.

ZHU, Z.; LU, J.J.; LIU, S. Protein separation by capillary gel electrophoresis: a review. **Anal. Chim. Acta**, v. 709, p. 21–31, 2012.

APÊNDICE A - Identificação das proteínas através dos dados obtidos do MS/MS consultando o banco de dados Uniprot_Viridiplantae com o algoritmo SEQUEST

AMOSTRA	BANCO	Acesso UniProt	Descrição	PM [kDa]	calc. pl	Sequencia	Xcorr
MOËT	VIRIDIP	A5B125	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VITISV_034734 PE=4 SV=1 - [A5B125_VITVI]	7,7	6,51	VLVDHSIVEGFSQGGR	4,86
	VIRIDIP	A9CSP0	Putative thaumatin-like protein OS=Vitis hybrid cultivar GN=Tam-TLP PE=2 SV=1 - [A9CSP0_9ROSI]	23,9	5,31	TNEYccTDGPGScGPTTYSK	5,36
						RLDSGQSWTITVNP GTTNAR	4,43
						LDSGQSWTITVNP GTTNAR	4,04
	VIRIDIP	F6HUG9	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04310 PE=1 SV=1 - [F6HUG9_VITVI]	23,8	4,88	TDEYccNSGScSATDYSR	5,46
						GIScTADIVGecPAALK	5,25
						TTGGcNNPcTVFK	3,84
	VIRIDIP	F6HMA2	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_10s0003g01360 PE=3 SV=1 - [F6HMA2_VITVI]	60,7	5,05	NTDLPYGEcAINAmASYPTK	4,56
						NTDLPYGEcAINAMASYPTK	4,43
	VIRIDIP	Q9M4G7	Putative thaumatin-like protein (Fragment) OS=Vitis vinifera GN=TI2 PE=2 SV=1 - [Q9M4G7_VITVI]	20,1	4,75	GIScTADIVGecPAALK	5,25
						TDEYccNSGScNATDYSR	4,44
						TTGGcNNPcTVFK	3,84
EXCELLENCE (Amostra 1)	VIRIDIP	A5C9F1	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04300 PE=4 SV=1 - [A5C9F1_VITVI]	23,9	4,75	GIScTADIVGecPAALK	5,44
						TDEYccNSGScNATTYSEFFK	4,83
						TTGGcNNPcTVFK	3,73
	VIRIDIP	Q9M4G7	Putative thaumatin-like protein (Fragment) OS=Vitis vinifera GN=TI2 PE=2 SV=1 - [Q9M4G7_VITVI]	20,1	4,75	TDEYccNSGScNATDYSR	5,86
						GIScTADIVGecPAALK	5,44
						TTGGcNNPcTVFK	3,73
	VIRIDIP	F6HUG9	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04310 PE=1 SV=1 - [F6HUG9_VITVI]	23,8	4,88	TDEYccNSGScSATDYSR	5,72
						GIScTADIVGecPAALK	5,44
						TTGGcNNPcTVFK	3,73
	VIRIDIP	F6HUH1	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04330 PE=4 SV=1 - [F6HUH1_VITVI]	24,0	5,31	TNEYccTDGPGScGPTTYSK	5,49
						GIQcSVDINGQcPSELK	4,50
						RLDSGQSWTITVNP GTTNAR	4,35
						LDSGQSWTITVNP GTTNAR	4,22
						APGGcNNPcTVFK	3,81
	VIRIDIP	F6HMA2	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_10s0003g01360 PE=3 SV=1 - [F6HMA2_VITVI]	60,7	5,05	NTDLPYGEcAINAmASYPTK	5,38
						NTDLPYGEcAINAMASYPTK	5,32
						NSWGTSGWmEGYFYIK	4,05
	VIRIDIP	F6HAU0	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_16s0022g00670 PE=3 SV=1 - [F6HAU0_VITVI]	60,0	4,61	VLVDHSIVEGFSQGGR	3,95
						GWASLQSIPIR	3,90
	VIRIDIP	O81228	PR-4 type protein OS=Vitis vinifera GN=PR-4a PE=4 SV=1 - [O81228_VITVI]	15,2	5,85	YGWTAfcGPSPTGQAACGK	5,52
						IVDQcSNGGLDLDSGVFNK	5,38
						cLSVTNTATGTQATVR	4,07

continua

continuação

AMOSTRA	BANCO	Acesso	Descrição	PM [kDa]	calc. pI	Sequencia	Xcorr
	VIRIDIP	F6GXX3	Non-specific lipid-transfer protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_08s0058g01230 PE=3 SV=1 - [F6GXX3_VITVI]	10,5	8,57	TFSGSIPGINFGLASGLPGK	4,04
	VIRIDIP	W9RMN4	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase OS=Morus notabilis GN=L484_007244 PE=4 SV=1 - [W9RMN4_9ROSA]	18,0	4,88	GTSASIYLDNAAYR	3,82
	VIRIDIP	D8TSJ3	Putative uncharacterized protein OS=Volvox carteri GN=VOLCADRAFT_89747 PE=4 SV=1 - [D8TSJ3_VOLCA]	235,1	4,68	TAAEAALADIEAR	3,69
CAVE AMADEU (Amostra 2)	VIRIDIP	F6HUG9	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04310 PE=1 SV=1 - [F6HUG9_VITVI]	23,8	4,88	TDEYccNSGScSATDYSR	6,01
	VIRIDIP	F6HUH1	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04330 PE=4 SV=1 - [F6HUH1_VITVI]	24,0	5,31	GIScTADIVGecPAALK	5,38
						TNEYccTDGPGScGPTTYSK	5,35
						GIQcSVDINGQcPSELK	4,90
						cTYTVWAAASPGGGR	4,79
						RLDSGQSWTITVNP GTTNAR	4,51
						LDSGQSWTITVNP GTTNAR	4,39
	VIRIDIP	A5C9F1	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04300 PE=4 SV=1 - [A5C9F1_VITVI]	23,9	4,75	GIScTADIVGecPAALK	5,38
	VIRIDIP	Q9M4G7	Putative thaumatin-like protein (Fragment) OS=Vitis vinifera GN=TI2 PE=2 SV=1 - [Q9M4G7_VITVI]	20,1	4,75	TDEYccNSGScNATTYSEFFK	5,07
						GIScTADIVGecPAALK	5,38
	VIRIDIP	A3QRB5	Thaumatococcus-like protein OS=Vitis vinifera PE=2 SV=1 - [A3QRB5_VITVI]	23,9	4,70	TDEYccNSGScNATDYSR	5,10
						GIScTADIVGecPAALK	5,38
						TDEYccNSGScDATDYSR	4,06
	VIRIDIP	O81228	PR-4 type protein OS=Vitis vinifera GN=PR-4a PE=4 SV=1 - [O81228_VITVI]	15,2	5,85	IVDQcSNGGLDLDSGVFNK	5,22
						cLSVTNTATGTQATVR	4,81
						YGWTAFCGPSGPTGQAACGK	4,71
	VIRIDIP	B0FZ26	Class IV chitinase OS=Vitis pseudoreticulata GN=Chi4D PE=2 SV=1 - [B0FZ26_9ROSI]	27,3	5,25	AINGAVEcNGGNTAAVNAR	4,71
	VIRIDIP	F6HMA2	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_10s0003g01360 PE=3 SV=1 - [F6HMA2_VITVI]	60,7	5,05	AAFSLALNSYSGFGNDGSTANKR	4,31
						NTDLPYGEcAINAmASYPTK	4,98
CAVE GEISSE BRUT (Amostra 3)	VIRIDIP	A9CSP0	Putative thaumatin-like protein OS=Vitis hybrid cultivar GN=Tam-TLP PE=2 SV=1 - [A9CSP0_9ROSI]	23,9	5,31	TNEYccTDGPGScGPTTYSK	5,25
						LDSGQSWTITVNP GTTNAR	4,45
						cTYTVWAAASPGGGR	3,98
	VIRIDIP	F6HUG9	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04310 PE=1 SV=1 - [F6HUG9_VITVI]	23,8	4,88	GIScTADIVGecPAALK	4,80
CAVE GEISSE Blanc de blanc (Amostra 4)	VIRIDIP	A5C9F1	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04300 PE=4 SV=1 - [A5C9F1_VITVI]	23,9	4,75	TTGGcNNPcTVFK	4,08
						TDEYccNSGScSATDYSR	3,89
						TDEYccNSGScNATTYSEFFK	5,00
						GIScTADIVGecPAALK	4,89
	VIRIDIP	F6HUG9	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_02s0025g04310 PE=1 SV=1 - [F6HUG9_VITVI]	23,8	4,88	TNcNFDASGNGK	3,85
						TTGGcNNPcTVFK	3,84
						TDEYccNSGScSATDYSR	5,44
						GIScTADIVGecPAALK	4,89
						TNcNFDASGNGK	3,85
						TTGGcNNPcTVFK	3,84
						TDEYccNSGScSATDYSR	5,44

conclusão

AMOSTRA	BANCO	Acesso	Descrição	PM [kDa]	calc. pI	Sequencia	Xcorr
	VIRIDIP	A9CSP0	Putative thaumatin-like protein OS=Vitis hybrid cultivar GN=Tam-TLP PE=2 SV=1 - [A9CSP0_9ROSI]	23,9	5,31	TNEYccTDGPGScGPTTYSK	5,10
						cTYTVWAAASPGGGR	4,33
	VIRIDIP	B0FZ26	Class IV chitinase OS=Vitis pseudoreticulata GN=Chi4D PE=2 SV=1 - [B0FZ26_9ROSI]	27,3	5,25	AINGAVEcNGGNTAAVNAR	5,08
	VIRIDIP	F6HAU0	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_16s0022g00670 PE=3 SV=1 - [F6HAU0_VITVI]	60,0	4,61	SSLAVDDVDQR	3,83
						VLVDHSIVEGFSQGGR	3,79
	VIRIDIP	F6HMA2	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_10s0003g01360 PE=3 SV=1 - [F6HMA2_VITVI]	60,7	5,05	NTDLPYGecAINAmASYPTK	5,33
	VIRIDIP	A0A068UHY7	Uncharacterized protein OS=Coffea canephora GN=GSCOC_T00025409001 PE=4 SV=1 - [A0A068UHY7_COFCA]	17,7	9,70	AAGESVSQPDSPGcPPTPVHSSMTPLGRNSVVSTRVGTESPPSEEEER	4,63
CAVE GEISSE Blanc de noir (Amostra 5)	VIRIDIP	W9RMN4	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase OS=Morus notabilis GN=L484_007244 PE=4 SV=1 - [W9RMN4_9ROSA]	18,0	4,88	GTSASIYLDNAAYR	4,01
	VIRIDIP	A0A0C5DFC3	Myo-inositol 1-phosphate synthase OS=Camellia sinensis PE=2 SV=1 - [A0A0C5DFC3_CAMSI]	56,2	5,66	VGSFNGEEIYAPFKSLLPMVNPDDVVFGGWDISDmDLADAmARAK	4,01
	VIRIDIP	Q9M4G7	Putative thaumatin-like protein (Fragment) OS=Vitis vinifera GN=TI2 PE=2 SV=1 - [Q9M4G7_VITVI]	20,1	4,75	GIScTADIVGecPAALK	4,81
	VIRIDIP	A9CSP0	Putative thaumatin-like protein OS=Vitis hybrid cultivar GN=Tam-TLP PE=2 SV=1 - [A9CSP0_9ROSI]	23,9	5,31	LDSGQSWTITVNP GTTNAR	4,41
	VIRIDIP	F6HMA2	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VIT_10s0003g01360 PE=3 SV=1 - [F6HMA2_VITVI]	60,7	5,05	NTDLPYGecAINAmASYPTK	4,01
	VIRIDIP	A9TYN6	FACT complex subunit OS=Physcomitrella patens subsp. patens GN=GTC1501 PE=4 SV=1 - [A9TYN6_PHYPA]	119,9	5,48	ERKQDGSVQmNSVLDAVK	3,98

APÊNDICE B - Identificação das proteínas através dos dados obtidos do MS/MS consultando o banco de dados Uniprot_Saccharomyces com o algoritmo SEQUEST

AMOSTRA	BANCO	Acesso GI	Descrição	PM [kDa]	calc. pl	Sequencia	Xcorr
MOËT	SACCH	349576260	K7_Pau7p [Saccharomyces cerevisiae Kyokai no. 7]	5,7	5,01	VNLVELGVYVSDIR	4,88
	SACCH	401625719	pmc1p [Saccharomyces arboricola H-6]	130,3	6,33	cQQAGVVVRmVTGDNILTAK	3,26
	SACCH	401625615	scw4p [Saccharomyces arboricola H-6]	40,1	4,59	VWTAcDGKKDVIITESGWPSK	3,16
EXCELLENCE (Amostra 1)	SACCH	349576260	K7_Pau7p [Saccharomyces cerevisiae Kyokai no. 7]	5,7	5,01	VNLVELGVYVSDIR	4,86
	SACCH	323306112	Ecm33p [Saccharomyces cerevisiae FostersB]	23,9	4,68	VGQSLSIVSNDELSK	4,11
						VNVFNINNNR	3,58
						KVNVFNINNNR	3,58
	SACCH	207342449	YMR006Cp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	59,8	4,63	WESIVQEVQAK	3,75
	SACCH	190409145	protein YGP1 precursor [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a]	37,3	5,44	SSAGAVVVTNAK	3,49
	SACCH	401837383	MNT4-like protein [Saccharomyces kudriavzevii IFO 1802]	66,8	8,73	GADWSNEFYEPAAVWKSFSYmNGGRK	3,44
CAVE AMADEU (Amostra 2)	SACCH	207344868	YGR282Cp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	28,2	4,68	SVVADISDSDGK	3,29
	SACCH	337294721	endo-beta-1,3-glucanase [Saccharomyces cerevisiae]	34,1	4,51	NDLTASQLSDKINDVR	4,87
						SVVADISDSDGK	4,12
						IKESTVAGFLVGSEALYR	4,05
						SVVADISDSDGKSYSGK	3,79
						STSDYETELQALK	3,68
						HWGVFTSSDNLK	3,51
	SACCH	349576260	K7_Pau7p [Saccharomyces cerevisiae Kyokai no. 7]	5,7	5,01	VNLVELGVYVSDIR	4,92
	SACCH	323306112	Ecm33p [Saccharomyces cerevisiae FostersB]	23,9	4,68	VGQSLSIVSNDELSK	3,92
						VNVFNINNNR	3,46
	SACCH	207342449	YMR006Cp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	59,8	4,63	WESIVQEVQAK	3,80
						ALSYNFFPSLPDAGSALTWSSLR	3,71
						IGIAcSGGGYR	3,42
						SSAGAVVVTNAK	3,62
	SACCH	190409145	protein YGP1 precursor [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a]	37,3	5,44	SSAGAVVVTNAK	3,62
	SACCH	323353829	Cts1p [Saccharomyces cerevisiae VL3]	56,8	4,55	STcTEGEIACsADGK	4,53
	SACCH	323338696	Tos1p [Saccharomyces cerevisiae Vin13]	42,7	4,87	TLQYGDAScScWK	3,60
CAVE GEISSE BRUT (Amostra 3)	SACCH	157833610	Chain A, 3-Phosphoglycerate Kinase, Mutation R65q	44,6	7,25	SSAAGNTVIIGGGDTATVAK	4,08
						DVTFLNDcVGPEVEAAVK	3,43
						ASAPGSVILLENLR	3,07
	SACCH	365762362	Fba1p [Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces kudriavzevii VIN7]	37,5	5,66	FAIPAINVTSSSTAVALALEAR	5,30
						VNLDTDCQYAYLTGIR	3,65
	SACCH	323304344	Tdh2p [Saccharomyces cerevisiae FostersB]	21,8	6,34	TASGNIIPSSTGAAK	3,53
						VPTVDVSVVDLTVK	3,22

continua

conclusão

AMOSTRA	BANCO	Acesso GI	Descrição	PM [kDa]	calc. pI	Sequencia	Xcorr
	SACCH	207344913	YGR254Wp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	41,7	6,71	SGETEDTFIADLVVGLR	4,80
						AVDDFLISLDGTANK	3,69
						NVNDVIAPAFVK	3,23
						TAGIQIVADDLTVTNPK	3,06
	SACCH	223142	dehydrogenase isozyme I, alcohol	31,5	6,86	SISIVGSYVGNR	3,43
						ANELLINVK	2,99
	SACCH	190409145	protein YGP1 precursor [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a]	37,3	5,44	SSAGAVVVTNAK	3,74
	SACCH	207342449	YMR006Cp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	59,8	4,63	WESIVQEVQAK	3,23
CAVE GEISSE Bb (Amostra 4)	SACCH	349576260	K7_Pau7p [Saccharomyces cerevisiae Kyokai no. 7]	5,7	5,01	VNLVELGVYVSDIR	4,46
	SACCH	190405458	hypothetical protein SCRG_04360 [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a]	17,9	4,53	MSMSSTVIKFRAGVcEYNEDSR	3,21
	SACCH	365759461	YLR072W-like protein [Saccharomyces cerevisiae x Saccharomyces kudriavzevii VIN7]	78,4	6,65	GQDSSNVSHVGTFEKVNK	2,99
	SACCH	337294721	endo-beta-1,3-glucanase [Saccharomyces cerevisiae]	34,1	4,51	NDLTASQLSDKINDVR	4,89
						SVVADISDSDGK	3,93
						STSDYETELQALK	3,66
						HWGVFTSSDNLK	3,61
						ESTVAGFLVGSEALYR	3,43
	SACCH	349576260	K7_Pau7p [Saccharomyces cerevisiae Kyokai no. 7]	5,7	5,01	VNLVELGVYVSDIR	4,31
	SACCH	207347698	YBR093Cp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	39,4	4,84	SVGSNLFNASVK	3,66
						GYSDVcDIFTK	3,39
						DELVHYSYYQLHTYYHEGPGYDIK	3,14
	SACCH	190409145	protein YGP1 precursor [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a]	37,3	5,44	SSAGAVVVTNAK	3,55
	SACCH	296170950	actin [Saccharomyces cerevisiae]	28,2	5,16	WFFDASKPTLISSDSIIR	3,26
						SYELPDGQVITIGNER	3,26
CAVE GEISSE Bn (Amostra 5)	SACCH	323306112	Ecm33p [Saccharomyces cerevisiae FostersB]	23,9	4,68	VNVFNINNNR	3,60
	SACCH	207342449	YMR006Cp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	59,8	4,63	VGQSLSIVSNDELSK	3,02
						WESIVQEVQAK	3,24
	SACCH	323353829	Cts1p [Saccharomyces cerevisiae VL3]	56,8	4,55	IGIAcSGGGYR	3,15
	SACCH	323353829	Cts1p [Saccharomyces cerevisiae VL3]	56,8	4,55	STcTEGEIACsADGK	3,71
	SACCH	207347697	YBR092Cp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	38,0	4,59	GYSDVcDIFTEDELVR	3,86
	SACCH	323349005	Utr2p [Saccharomyces cerevisiae Lalvin QA23]	36,9	4,69	NSGGTVLSSTR	3,32
	SACCH	323354858	Crh1p [Saccharomyces cerevisiae VL3]	45,6	4,73	TTWYLDGESVR	2,98
	SACCH	349576260	K7_Pau7p [Saccharomyces cerevisiae Kyokai no. 7]	5,7	5,01	VNLVELGVYVSDIR	4,93
	SACCH	190409145	protein YGP1 precursor [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a]	37,3	5,44	SSAGAVVVTNAK	3,67
	SACCH	207342449	YMR006Cp-like protein [Saccharomyces cerevisiae AWRI1631]	59,8	4,63	WESIVQEVQAK	3,16

ANEXO A - Coloração com solução de prata (SHEVCHENKO et al.,1996) modificado

Etapa	Solução	Tempo (min) Gel grande	Tempo (min) Gel pequeno
Fixação	50% (v/v) Metanol (etanol) e 5% (v/v) Ácido Acético em água	60	20
Lavagem	50% (v/v) Metanol (etanol) em água	20	10
Lavagem	Água bidestilada	10	5
Lavagem	Água bidestilada	120	20
Sensibilização	0,025% (v/v) Na ₂ S ₂ O em água	3	1
(2x) Lavagem	Água bidestilada	1	Rápida
Coloração	0,15% (m/v) AgNO ₃ em água gelada	45	20
(2x) Lavagem	Água bidestilada	1	Rápida
Revelação	3% (m/v) Na ₂ CO ₃ e 0,05% (v/v) Formaldeído em água	-	-
(3x) Interrupção	5% (v/v) Ácido Acético em água	5	5
Estoque	1% (v/v) Ácido Acético em água à 4°C	-	-