

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EVOLUÇÃO AROMÁTICA E AUTOFAGIA/AUTÓLISE  
DURANTE A SEGUNDA FERMENTAÇÃO DE  
ESPUMANTES

**ANDRELISE VERZELETTI**

Caxias do Sul

2014

**ANDRELISE VERZELETTI**

**EVOLUÇÃO AROMÁTICA E AUTOFAGIA/AUTÓLISE  
DURANTE A SEGUNDA FERMENTAÇÃO DE  
ESPUMANTES**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul,  
visando à obtenção de grau de Mestre  
em Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

**Co-orientador:** Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Caxias do Sul

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

V574e Verzeletti, Andrelise, 1982-  
Evolução aromática e autofagia/autólise durante a segunda fermentação  
de espumantes / Andrelise Verzeletti. - 2014.  
169 f.: il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.  
Apresenta bibliografia.  
“Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare, coorientação  
Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray ”.

1. Vinhos espumantes. 2. Fermentação. 3. Compostos aromáticos. I.  
Título.

CDU 2.ed.: 663.223

Índice para o catálogo sistemático:


1. Vinhos espumantes	663.223
2. Fermentação	663.252.4
3. Compostos aromáticos	547.52

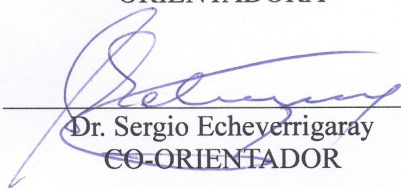
Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Carolina Meirelles Meroni – CRB 10/ 2187

ANDRELISE VERZELETTI

EVOLUÇÃO AROMÁTICA E AUTOFAGIA/AUTÓLISE  
DURANTE A SEGUNDA FERMENTAÇÃO DE ESPUMANTES


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia da Universidade  
de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau  
de Mestre em Biotecnologia.

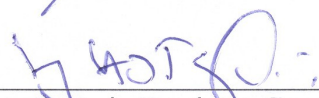
  
Dra. Ana Paula Longaray Delamare  
ORIENTADORA

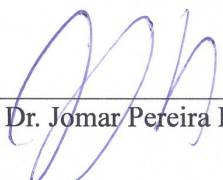
  
Dr. Sergio Echeverrigaray  
CO-ORIENTADOR

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24 DE JANEIRO DE 2014.

Comissão Examinadora:

  
Dr. Adriano Brandelli

  
Dr. Luiz Humberto Gomes

  
Dr. Jomar Pereira Laurino

*União não é o fim  
de uma família, mas o início  
de uma vida. A pessoa que  
acreditamos em nós e em Deus!*

*ANDRELISE VERZELETTI*

EVOLUÇÃO AROMÁTICA E AUTOFAGIA/AUTÓLISE  
DURANTE A SEGUNDA FERMENTAÇÃO DE  
ESPUMANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia da Universidade  
de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau  
de Mestre em Biotecnologia.

---

Dra. Ana Paula Longaray Delamare  
ORIENTADOR

---

Dr. Sergio Echeverrigaray  
CO-ORIENTADOR

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24 DE JANEIRO DE 2014.

Comissão Examinadora:

---

Dr. Adriano Brandelli

---

Dr. Luiz Humberto Gomes

---

Dr. Jomar Laurino

*Dedico este trabalho  
à minha família maravilhosa,  
ao meu esposo, às pessoas que  
acreditaram em mim e ao futuro!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho nos momentos em que pensei em desistir e atender todos os pedidos.

A toda a minha família, que torceu, chorou, se preocupou e rezou pelo meu sucesso!

Ao meu esposo por acreditar que eu conseguiria e pelo suporte financeiro durante esses anos.

À minha orientadora professora Dr. Ana Paula Delamare e meu co-orientador professor Dr. Sérgio Echeverrigaray que confiaram, compreenderam minha ausência (trabalho), apostaram e sempre exigiram o melhor de mim, inclusive quando eu mesma não acreditava!

Ao meu colega de laboratório Jucimar Zacaria que me ensinou muito, mas muito mesmo...aguentou eu chamar a cada 5 minutos e me fez entender o que é uma extração de RNA e um PCR. E também pelo entendimento de vários provérbios e um deles é: "O medo mantém as pessoas vivas".

À Dra. Luciana Andrade Touguinha pela paciência, o "ombro" amigo, aos ensinamentos e pelo Folin.

A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia, pela amizade e colaboração, em especial as minhas amigas e colegas Franciele Zanol, Angelica Onzi, Ronize dos Santos, Queli Montanari, Valquiria Reis, Fabiola Toniazzi e Evanize Oliveski.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

Ao Laboratório de Referência em Enologia – LAREN, pelas análises realizadas.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

## RESUMO

A Serra Gaúcha apresenta uma excelente aptidão enológica para produzir vinhos espumantes de qualidade. Na produção de espumantes, o vinho base passa por uma segunda fermentação para tomada de espuma, durante a qual ocorre a produção de gás carbônico e etanol, assim como diversas transformações biológicas e químicas que influenciam as características organolépticas do produto final. Após a segunda fermentação, os espumantes maturam em contato com as borras (*sur lie*) por períodos variados durante o qual ocorre autofagia/autólise das leveduras. Neste trabalho foram avaliadas as características físico-químicas e compostos voláteis ao longo da segunda fermentação e maturação de espumantes, assim como a dinâmica da população de leveduras e expressão de genes relacionados ao processo autofágico/autolítico. Para tanto foram conduzidas segundas fermentações pelo método tradicional com vinho base elaborado com as variedades Pinot Noir, Chardonnay e Riesling Itálico e levedura *S. cerevisiae* EC1118. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 7, 15, 30, 60, 90, 135, 180, 270 e 360 dias de fermentação, e avaliadas quanto as características físico-químicas básicas, compostos voláteis (27 compostos), população de leveduras, concentração de compostos fenólicos e proteínas/peptídeos. A expressão de genes relacionados com autofagia foi determinada por qRT-PCR durante a segunda fermentação e início de maturação. Os resultados mostraram que a segunda fermentação de espumantes apresenta uma fase inicial de adaptação de 7 dias seguida por importante incremento do teor alcoólico até os 30 dias. Durante a fermentação e maturação ocorre redução da acidez total e leve aumento da acidez volátil que refletem no aumento do pH no produto final. Da mesma forma, foi observada variação significativa na concentração de distintos compostos aromáticos ao longo da segunda fermentação e maturação de espumantes, com redução de ésteres especialmente a partir dos 90 dias. Análise multivariada mostrou que o espumante apresenta mudanças importantes durante a segunda fermentação. Após 270 dias de maturação observou-se redução no conteúdo de propanol 1, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, octanoato de etila, ácido decanóico e ácido dodecanóico, e aumento de dietil succinato, dodecanoato de etila e feniletanol. Aumento da concentração de compostos fenólicos durante a maturação foi constatado, podendo interferir na cor do produto final. A população de leveduras (UFC/ml) exibiu importante aumento durante o período fermentativo com redução abrupta (~80%) nos 30 dias seguintes. Por outro lado, o número de células se mantém constante dos 30 aos 90 dias, com redução posterior indicativa de autólise. A redução no número de células integras foi acompanhada por aumento na concentração de proteínas/peptídeos no vinho, com estabilização a partir dos 270 dias. A avaliação da expressão de um conjunto de genes relacionados com a autofagia indica que tanto a micro quanto a macroautofagia são induzidas ainda na fase fermentativa com aumento da macroautofagia sobre o final da segunda fermentação, acompanhando a redução de viabilidade.

**Palavras chave:** espumantes, segunda fermentação, compostos aromáticos, autofagia/autólise.



## ABSTRACT

The Serra Gaucha region shows an excellent oenological aptitude for the production of high quality wines and sparkling wines. Sparkling wines process involves a second fermentation with gas and ethanol production, and several biological and chemical transformations that influence the organoleptic properties of the final product. After the second fermentation sparkling wines mature in contact with the lees (*sur lie*) for long periods during which yeasts autophagy/autolysis occurs. In this work we evaluate the physic-chemical characteristics and volatile compounds during the second fermentation and maturation of sparkling wines, as well as the dynamics of yeast population and the expression of autophagic/autolytic related genes. For this purpose second fermentations were conducted by the traditional method using a base wine elaborated with Pinot Noir, Chardonnay and Riesling Italic and the *S. cerevisiae* EC1118 commercial strain. Samples were collected at 0, 7, 15, 30, 60, 90, 135, 180, 270 and 360 days of fermentation, and evaluated with respect to the basic physic-chemical characteristics, volatile compounds (27 compounds), yeast population, and the concentration of phenolic compounds and protein/peptides. The expression of autophagy/autolysis related genes during the second fermentation and the beginning of maturation was determined by qRT-PCR. The results showed that the second fermentation involved an initial adaptation period of 7 days followed by an important increment in the alcoholic concentration during 30 days. During the fermentation and maturation it was observed a reduction in total acidity and a small increase of volatile acidity that led to a pH increase in the final product. A significant variation in several volatile compounds was detected during second fermentation and maturation of sparkling wines, with a reduction in esters after 90 days. Multivariate analysis showed that sparkling wines suffer important modifications during second fermentation. After 270 days of maturation sparkling wines exhibited a reduction in the concentration of 1-propanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, ethyl octanoate, decanoic acid, and dodecanoic acid, and an increase in the concentration of diethyl succinate, ethyl dodecanoate and phenylethanol. Increase in the concentration of phenolic compounds during maturation, can affect wine color. Yeast population (UFC/mL) exhibited an important increase during the fermentation period followed by a drastic reduction (~80%) in the next 30 days. However, the total number of cells remained constant between 30 and 90 days, a rapidly decrease after this period indicating yeast autolysis. The reduction of yeast cells was accompanied by an increase in the concentration of proteins/peptides in wine, which stabilized at 270 days. The evaluation of expression of a group of genes related with the autophagic process indicated that both micro and macroautophagy are induced during the second fermentation with an increase of macroautophagy at the end of the fermentation period, accompanying the decrease in yeast viability.

**Key-words:** sparkling wine, second fermentation, volatile compounds, autophagy/autolysis.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. O vinho espumante .....	3
2.2. Elaboração de vinhos espumantes .....	4
2.3. Leveduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
2.4. Fermentação alcoólica do vinho e as biotransformações associadas .....	11
2.5. Processo de autofagia e autólise de leveduras .....	16
2.6. Autólise de leveduras em vinhos e espumantes .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
3.1. Linhagem de levedura .....	26
3.2. Produção experimental espumantes (Método tradicional) .....	26
3.3. Análises do vinho espumante .....	27
3.3.1. <i>Análises de acompanhamento da segunda fermentação: análises clássicas ou bromatológicas</i> .....	27
3.3.2. <i>Determinação de compostos fenólicos totais</i> .....	27
3.3.2.1. <i>Índice de compostos fenólicos totais (Método OIV)</i> .....	27
3.3.2.2. <i>Índice de compostos fenólicos totais (Método Folin-Ciocalteu)</i> .....	28
3.3.3. <i>Determinação dos compostos voláteis</i> .....	28
3.3.3.1. <i>Determinação de álcoois superiores</i> .....	28
3.3.3.2. <i>Determinação de acetatos, ésteres e ácidos graxos</i> .....	30
3.3.4. <i>Avaliação de população de leveduras (UFC) e número de células</i> .....	30
3.3.5. <i>Avaliação de proteínas</i> .....	31
3.3.6. <i>Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR</i> .....	31
3.3.7. <i>Análises estatísticas</i> .....	35

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
4.1. Características básicas, componentes aromáticos e compostos fenólicos durante a segunda fermentação e maturação de espumantes .....	36
4.1.1. Características básicas .....	36
4.1.2. Evolução de compostos aromáticos .....	39
4.1.3. Concentração de compostos fenólicos .....	46
4.2. População de leveduras, liberação de proteínas/peptídeos e expressão de genes relacionados com a autofagia durante a segunda fermentação e maturação de espumantes .	48
4.2.1. Dinâmica da população de leveduras e liberação de proteínas/peptídeos .....	48
4.2.2. Expressão de genes envolvidos no processo autofágico .....	53
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	60
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação dos espumantes quanto aos teores de açúcares .....	9
<b>Tabela 2</b> – Principais álcoois superiores/derivados e seus aminoácidos precursores .....	14
<b>Tabela 3</b> – Compostos voláteis (mg/L) do vinho espumante durante 360 dias de acompanhamento .....	40

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Degradação de conteúdo celular e seu impacto no espumante .....	25
<b>Quadro 2</b> – Primer utilizados para avaliação da expressão gênica .....	32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Produção de álcoois superiores a partir de aminoácidos (reação de Ehrlich) ....	14
<b>Figura 2</b> – Autofagia em leveduras .....	18
<b>Figura 3</b> – Análises básicas em vinhos espumantes ao longo de 360 dias .....	37
<b>Figura 4</b> – Análise dos componentes principais com base nos compostos voláteis ao longo dos 360 dias de acompanhamento de vinhos espumantes .....	45
<b>Figura 5</b> – Concentração de fenóis totais durante 360 dias de acompanhamento em vinhos espumantes .....	47
<b>Figura 6</b> – Dinâmica da população de leveduras durante a segunda fermentação e maturação/envelhecimento de espumantes .....	50
<b>Figura 7</b> – Teor de proteínas/peptídeos durante os 360 dias de acompanhamento em vinhos espumantes .....	52
<b>Figura 8</b> – Passos básicos dos processos de micro (Cvt) e macroautofagia em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	55
<b>Figura 9</b> – Expressão de genes associados ao processo autofágico de <i>S. cerevisiae</i> durante a segunda fermentação de espumantes .....	57

## **1. INTRODUÇÃO**

O espumante é o produto obtido pela segunda fermentação de vinhos finos, o qual é considerado perfeito para todas as ocasiões de comemoração, assim como um excelente presente. O Brasil é considerado um país ainda jovem no setor de elaboração de espumantes, mas está alcançando o reconhecimento internacional pela sua qualidade. Atualmente, são produzidos mais de 11 milhões de litros de vinho espumante natural (UVIBRA, 2012). Embora a produção de vinhos espumantes seja menor que de vinhos tranquilos, o impacto econômico deste produto é muito importante devido ao alto valor agregado (Torresi et al, 2011).

A qualidade do espumante está ligada principalmente pela composição de substâncias voláteis e não-voláteis que resulta no seu aroma e sabor. Esses compostos são originários da uva, da fermentação pelas leveduras, reações químicas espontâneas e pela autofagia e autólise das leveduras que ocorrem durante o processamento e maturação ou envelhecimento.

No caso particular de espumantes, as leveduras contribuem para as características organolépticas e estabilidade química do produto final, através da sua autólise iniciando o processo na tomada de espuma ou segunda fermentação e particularmente maturação. Entretanto, a autólise em condições enológicas é um processo lento que requer longos períodos de envelhecimento, incrementando de forma importante o custo final dos espumantes. Em termos tecnológicos, algumas alternativas têm sido criadas visando solucionar o problema e encurtar os períodos de

envelhecimento: adição de autolizados de leveduras no vinho e envelhecimento a temperaturas superiores. Entretanto, ambas alternativas causam modificações indesejáveis nas características organolépticas. A compreensão, controle e aceleração do processo de autólise pode beneficiar de forma significativa a qualidade de espumantes, com concomitante redução de custos e riscos advindos de longos períodos (12 a 24 meses) de envelhecimento.

O complexo sistema que controla e executa a cascata de eventos envolvidos na autofagia e autólise vem sendo estudado e diversos genes têm sido implicados, seja nos processos de transferência citoplasma-vacúolo, degradação em nível vacuolar, degradação em nível de proteossomos, entre outros. Apesar de todos os conhecimentos genômicos, fisiológicos e metabólicos acumulados nas últimas décadas, pouco se conhece sobre o comportamento metabólico de *Saccharomyces cerevisiae* sob as condições particulares impostas pela segunda fermentação ou tomadas de espuma na produção de espumantes. Isso é particularmente verdadeiro no que diz respeito à expressão gênica durante a fermentação e as alterações que ocorrem no período subsequente de inanição, morte celular e autólise.

Neste contexto, o presente trabalho visou estudar a evolução de características básicas, compostos aromáticos e compostos fenólicos, assim como a viabilidade de leveduras, liberação de proteínas e expressão de genes relacionados à autofagia durante a segunda fermentação e maturação de espumantes pelo método tradicional (Champenoise).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O Vinho Espumante**

De todos os grandes vinhos atuais do mundo, apenas um é popularmente atribuído a um inventor, trata-se do “champanhe”, considerando-se seu responsável dom Pierre Pérignon (1638-1715), monge beneditino e tesoureiro da abadia de Hautviller (Johnson, 1999). Segundo consta, foi ideia do monge a utilização de rolhas de cortiça no lugar de tampas de madeira, bem como os cortes dos vinhos bases na elaboração de espumantes (Rizzon et al., 2000).

Segundo Tonietto (2007) foi no segundo decênio do século passado que o Brasil iniciou a produção de espumante, na região Sul do país no Estado do Rio Grande do Sul, região hoje conhecida como Serra Gaúcha no município de Garibaldi.

A região da Serra Gaúcha possui um clima vitícola que, seguidamente questionado quanto à sua aptidão, é um fator chave da adaptação e da qualidade obtida nas uvas utilizadas para a elaboração do vinho-base que se destina à segunda fermentação para o espumante fino (Tonietto, 2007). As cultivares mais utilizadas para a elaboração de vinhos espumantes são Riesling Itálico e Chardonnay, entre as uvas brancas, e Pinot Noir, entre as tintas. Além dessas, são utilizadas também as cultivares brancas Sémillon e Trebbiano, e em casos mais específicos, a Cabernet Franc, vinificada em branco (Rizzon et al., 2000).

## 2.2 Elaboração de Vinho Espumantes

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 e com teor alcoólico de 10% a 13% em volume (Brasil, 2004).

A elaboração de um vinho espumante produzido pelo método tradicional envolve o enchimento da garrafa com vinho base, derivado da fermentação de um mosto de uvas produzidas pela tradicional tecnologia de vinhos brancos.

O vinho base deve apresentar características típicas como cor pálida, aroma frutado, baixo nível de açúcar residual, moderado teor de álcool, baixa acidez volátil e ter realizado a estabilização tartárica (Torresi et al., 2011). Antes do engarrafamento, o vinho também pode ser filtrado (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Na composição do vinho base, no processo de *assemblage* (definido como sendo a mescla dos diferentes vinhos utilizados na produção do vinho base), cada uma das uvas contribui com características bem definidas, dando a cada espumante personalidade própria. Assim por exemplo, a Riesling Itálica aporta aromas de frutas cítricas frescas e alguma acidez. A Chardonnay aporta na mescla com seus aromas de maçã verde, abacaxi e cítricos maduros, reforçando a complexidade aromática e a acidez, além de preencher o meio de boca, aumentando a persistência final e a Pinot Noir, uva vinificada em branco, colhida precocemente, apresenta excelente acidez e aromas frutais delicados, com toques de especiarias, além de conferir mais corpo e estrutura ao espumante. A degustação é a principal ferramenta neste processo (Azevedo et al., 2006).

No engarrafamento, o licor de *tirage* é adicionado para a segunda fermentação, podendo ser adicionado no tanque de vinho base ou em cada garrafa individualmente



durante o processo de engarrafamento (Ribéreau-Gayon et al. 2006). Este licor consiste na adição de uma biomassa de levedura selecionada, sacarose e um coadjuvante de *tirage* (Flanzy, 2000). Estima-se que 4,00 a 4,30 g/L de sacarose é necessária para produzir uma atmosfera de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O teor de CO<sub>2</sub> final desejado em um vinho espumante é cerca 6 atmosferas a 20°C. Além disso, pequenas quantidades de bentonite e dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) são adicionados como coadjuvantes de *tirage* para simplificar o procedimento de *remuage*, remoção das borras e também para prevenir os danos de oxidação e degradação biológica (Torresi et al., 2011).

As leveduras selecionadas utilizadas no licor de *tirage* são da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Estas leveduras devem ser particularmente ativas para desenvolver-se em meio hostil que representa o vinho base (aprox.10% volume de etanol, pH de 3,4 a 3,7, temperatura de 12 a 16<sup>0</sup>C, SO<sub>2</sub> livre na ordem de 10 mg/L) (Torresi et al., 2011). No entanto, em um meio contendo etanol, por exemplo, quando é necessário iniciar uma fermentação as leveduras deverão ser reativadas antes de sua utilização preparando o que é chamado de pé de cuba (Flanzy, 2000).

O pé de cuba é a mistura de ingredientes como levedura, vinho, sacarose e água (a água serve de auxiliar tecnológico com a finalidade de evitar que o grau alcoólico se eleve durante a propagação). Ele pode ser preparado em um processo descontínuo para sua utilização durante vários dias ou em propagar a levedura em processo contínuo preparando cada dia a proporção que será utilizada. Para obter-se um pé de cuba de boa qualidade é necessário fornecer regularmente oxigênio e uma fonte de nitrogênio na forma de fosfato de amônio na razão de 400 a 800 mg/L. Para serem eficazes e ativas na tomada de espuma, as leveduras devem encontrar-se em atividade de fermentação mais do que de respiração (Flanzy, 2000). É aconselhável que a população inicial seja de 1,5

x 10<sup>6</sup> células/mL, abaixo dessa quantidade a fermentação é mais lenta e poderá permanecer açúcar residual não fermentado, enquanto que acima dessa população a fermentação é mais rápida, porém algumas cepas de leveduras podem produzir aromas desagradáveis (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Segundo Lepe & Leal (2004), as cepas selecionadas para a “tomada de espuma” ou “segunda fermentação” em garrafa devem ter uma série de características adicionais às exigidas para a primeira fermentação: (i) produção de etanol em meio alcoólico; (ii) mínima produção de acidez volátil; (iii) regularidade na velocidade de fermentação; (iv) tolerância a baixas temperaturas; (v) boa formação de espuma; (vi) boa capacidade de aglomeração e floculação; (vii) correto metabolismo de compostos nitrogenados e sulfurados; (viii) boa capacidade de autofagia e autólise após o término da fermentação e (ix) baixa aderência ao vidro.

Depois do engarrafamento do vinho base, levedura e do licor de *tirage*, é inserido o *bidule* que é um copo de polietileno vazio geralmente Ø 17mm e 14 mm de altura. O *bidule* previne o escape de gás carbônico, além de facilitar o *dégorgement*, pois as borras são depositadas no seu espaço vazio. Após a inserção do *bidule*, é colocada sobre a garrafa uma tampa coroa. Essas tampas são projetadas para os vinhos espumantes e geralmente são de aço inoxidável, aço ou alumínio revestido (Torresi et al., 2011).

As garrafas são armazenadas na horizontal em caixas ou pilhas, intercaladas com ripas de madeira para firmar as camadas. É importante que as garrafas permaneçam na horizontal para que forme um ambiente hermético durante a segunda fermentação ou tomada de espuma e para fornecer maior contato do vinho com as borras. A tomada de espuma tem a duração de aproximadamente um mês em temperatura constante e após este período as garrafas são armazenadas à baixa temperatura (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

O principal risco durante o armazenamento, especialmente se as garrafas estão expostas à luz, é o desenvolvimento de odores indesejáveis. Esses odores são devidos às reduções da formação de grupos tiol por via fotoquímica a partir de aminoácidos sulfurados naturalmente presentes no vinho espumante (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Segundo Alexandre & Guilloux (2006) após a segunda fermentação o espumante é envelhecido de nove meses até três anos sobre as borras de leveduras, e Barcenilla et al. (2003) acrescenta que este período de envelhecimento é necessário para desenvolver nestes vinhos os aromas e paladar característicos que são o resultado da autólise das leveduras e a liberação concomitante de componentes de células e quebra de seus produtos

Sabe-se que a autólise de leveduras durante a produção de espumantes é um processo irreversível que envolve diversos mecanismos, entre os quais microautofagia, macroautofagia e autólise propriamente dita (Alexandre & Guilloux 2006).

Cebollero et al. (2005), utilizando mutantes deficientes no sistema de autofagia mostraram que este processo pode ter papel importante na liberação de componentes durante o envelhecimento de espumantes. Considerando os estudos morfológicos e a liberação de componentes ao longo do processo de envelhecimento, pode-se supor um primeiro momento no qual ocorre autofagia (logo após a segunda fermentação), seguido por um processo de autólise que envolve a liberação do conteúdo dos autofagossomos no citoplasma e a síntese e liberação de novas enzimas hidrolíticas (proteases e glucanases).

Após o período de envelhecimento, ocorre a etapa de *remuage* que consiste na transição gradativa do sedimento da levedura no gargalo da garrafa (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Este processo originalmente foi realizado com garrafas colocadas em pupiteres sendo girados manualmente em 1/8 de volta por 15 dias e aumentando

gradativamente a inclinação até permanecerem perpendiculares ao chão (gargalo para baixo). Atualmente, este método tem sido substituído por sistemas automatizados que podem mover todas as garrafas simultaneamente (Torresi et al., 2011). Segundo Ribéreau-Gayon et al. (2006) esta operação pode durar de 3 (três) semanas a um mês, dependendo do tipo de vinho, de sua estrutura coloidal, do tipo de levedura e de sua capacidade de formar grumo.

Segundo Torresi et al. (2011) quando as borras estão completamente no gargalo da garrafa e o vinho espumante está totalmente claro as garrafas já estão prontas para a remoção dos sedimentos. A etapa final na elaboração de espumante consiste na eliminação das borras conhecido como *dégorgement*. O vinho espumante é refrigerado de 4-10 °C, a fim de evitar a fuga de CO<sub>2</sub> e o gargalo da garrafa é mergulhado em uma solução contendo etanol, cloreto de cálcio ou glicol, de modo que as borras fiquem presas no *bidule*. Segundo Ribéreau-Gayon et al. (2006) o congelamento ocorre cerca de 2 cm de vinho acima da tampa. Após o congelamento dos sedimentos as garrafas são colocadas na posição vertical (gargalo para cima) e a tampa é removida fazendo com que a parte congelada seja expulsa devido à pressão interna. Em seguida, é adicionado a garrafa um licor de dosagem ou expedição. O licor de expedição pode ser um vinho base, um mosto, uma solução contendo açúcar, ou o próprio espumante. O tipo e a quantidade de licor de expedição adicionado irão determinar a sua classificação final. Segundo Brasil (1990) o teor máximo de açúcares totais em g/L de glicose para cada tipo de espumante segue na Tabela 1:

**Tabela 1-** Classificação dos espumantes quanto aos teores de açúcares (g/L)

<b>Tipo de Espumante</b>	<b>Limite Mínimo</b>	<b>Limite Máximo</b>
<b>Extra-brut</b>	-	6
Brut	6	15
Seco	16	20
Meio doce ou demi-sec	21	60
Doce	61	-

O dióxido de enxofre também pode ser adicionado ao licor de expedição na quantidade necessária para eliminar qualquer oxigênio dissolvido e, pode ser complementado com um antioxidante como ácido ascórbico (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Em seguida, as garrafas são arrolhadas com rolha de cortiça e gaiola metálica utilizada para a segurança.

O principal fator de distinção entre o vinho e o vinho espumante é a efervescência, isto é devido ao CO<sub>2</sub> que origina as bolhas que sobem através do líquido. A efervescência representa um critério de qualidade fundamental, pois também se comporta como um transportador de aromas, porque contém bolhas de CO<sub>2</sub>, bem como alguns compostos aromáticos. Quando a garrafa é aberta, o CO<sub>2</sub> é rapidamente lançado como consequência da diferença de pressão entre a garrafa e o ambiente. Quando o espumante é servido sobre o vidro, o CO<sub>2</sub> dá origem ao *perlage* que são correntes de gás que sobem através do líquido e espuma (Torresi et al., 2011).

### **2.3 Leveduras: *Saccharomyces cerevisiae***

Em 1863, Louis Pasteur revelou pela primeira vez o mundo oculto da atividade microbiana durante a fermentação do vinho. Ele provou conclusivamente que a levedura é o principal catalisador na fermentação do vinho, baseando seu trabalho após a

primeira observação microscópica de Antonie Van Leeuwenhoek's (1680) de células de leveduras e as reivindicações por outros três pioneiros independentes, Cagniard-Latour, Kutzing e Schawann (1830) que essas células eram organismos vivos (Barnett, 1998). Com o conhecimento de que a levedura era a responsável pela biotransformação de açúcares da uva (principalmente glicose e frutose) em etanol e dióxido de carbono, os elaboradores de vinhos puderam controlar o processo desde a vinha até o engarrafamento. Mais tarde, as leveduras com características melhoradas foram selecionadas e, em 1890, Müller-Thurgau da Gesenheim (Alemanha) introduziu o conceito de inoculação de culturas puras nas fermentações (Pretorius, 2000).

Segundo Kurtzamn et al. (1998b) as leveduras são definidas como fungos unicelulares (Ascomicetos ou Basidiomicetos) e se reproduzem por brotamento ou fissão. Atualmente são reconhecidos taxonomicamente 100 gêneros com mais de 700 espécies, dos quais aproximadamente 20 são relevantes para a vinificação. Embora muitos desses gêneros e espécies de leveduras sejam encontrados no mosto de fermentação, o gênero *Saccharomyces*, e principalmente a espécie *S. cerevisiae*, é a principal responsável pela fermentação alcoólica (Querol et al., 2003).

A *S. cerevisiae* é uma levedura aeróbia facultativa capaz de realizar os processos fermentativo e respiratório. Os processos de fermentação e respiração são regulados principalmente por fatores ambientais, sendo essencialmente pela disponibilidade de glicose e oxigênio (Ehsani, 2009).

Durante a fermentação *S. cerevisiae* produz uma vasta gama de metabolitos tanto no metabolismo aeróbio e como anaeróbio, num total de aproximadamente 600 a 800 compostos. A formação desses componentes depende do equilíbrio metabólico global, que pode ser influenciado pelas características genéticas da levedura, pela composição do mosto e muitos fatores ambientais. Conseqüentemente, os teores dos compostos

metabólicos, incluindo aqueles que determinam características organolépticas, são altamente variáveis de um processo de elaboração para outro (Ehsani, 2009).

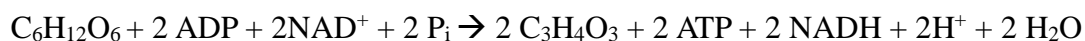
Devido às condições de estresse impostas durante a segunda fermentação de espumantes (elevado teor alcoólico, limitação de nutrientes, aumento de pressão, entre outros), as leveduras utilizadas neste processo devem possuir características peculiares, de tal forma que cepas especialmente selecionadas são adicionadas prévio ao engarrafamento (Torresi et al. 2001).

Segundo seu fabricante Lalvin, a levedura *S. cerevisiae* var. *bayanus* EC 1118 foi isolada em Champagne e seu uso é validado pelo Comité Interprofessionnel du Vin Champagne (CIVC). Essa estirpe é excelente para ser utilizada numa vasta variedade de aplicações, como vinhos espumantes, vinhos e sidras de frutas, pois possuem: (i) alto fator competitivo, (ii) toleram altas concentrações de etanol (acima de 18%), (iii) curta fase lag, (iv) taxa de fermentação rápida em uma ampla faixa de pH, (v) flexibilidade de temperatura de fermentação (ideal entre 15 a 25 °C), (vi) baixa exigência de nitrogênio assimilável, (vii) baixa exigência de O<sub>2</sub> (especialmente em baixas temperaturas), (viii) baixa a média produção de acidez volátil, (ix) produção média de SO<sub>2</sub>, (x) baixa produção de H<sub>2</sub>S e (xi) baixa formação de espuma ([http://www.lalvinyeast.com/images/library/EC1118\\_Yeast.pdf](http://www.lalvinyeast.com/images/library/EC1118_Yeast.pdf), (Acesso: 07 de outubro).

#### **2.4 Fermentação alcoólica do vinho e as biotransformações associadas**

As leveduras, dependendo das condições aeróbicas e outros fatores, podem degradar os açúcares utilizando quatro vias metabólicas: (i) a respiração, (ii) a fermentação alcoólica, (iii) a fermentação glicero-pirúvica, e/ou (iv) a via das pentoses fosfato (Ribéreau-Gayon et al., 2006). As três primeiras vias iniciam-se através de um

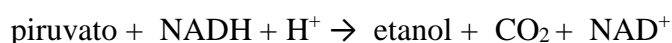
conjunto de reações denominadas de glicólise. Segundo Nelson & Cox (2002), a glicólise ocorre no citosol e leva à formação de piruvato com a geração de ATP:



A via glicolítica, resumidamente, inicia por uma fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato, a isomerização desta para frutose-6-fosfato e uma segunda fosforilação formando frutose 1,6-bifosfato. Estas três reações são catalisadas pelas enzimas hexoquinases, fosfoglicose isomerase e pela fosfofructoquinase, respectivamente (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Na sequência da glicólise, a frutose-1,6-bifosfato é clivada pela enzima aldose formando gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. A triose fosfoisomerase garante o acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato o qual é oxidado a 1,3-bifosfoglicerato com redução de NAD a NADH pela ação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. O 1,3-bifosfoglicerato é desfosforilado pela fosfoglicerato quinase gerando 3-fosfoglicerato e ATP. A continuação a fosfoglicerato mutase e a enolase levam à formação de 2-fosfoglicerato e fosfoenolpiruvato, o qual pela ação da piruvato quinase é desfosforilado em piruvato com geração de ATP (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Segundo Flanzky (2000) em condições de anaerobiose, o piruvato é direcionado para a produção de etanol, durante a qual ocorre regeneração de  $\text{NAD}^+$ . O piruvato é descarboxilado em acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, em seguida, o acetaldeído é reduzido a etanol por meio da enzima álcool desidrogenase. É nessa fase que se produz uma molécula de  $\text{NAD}^+$  seguindo a reação:



Assim sendo, o gás carbônico pode ser considerado o segundo principal produto da fermentação alcoólica (Palácios *et al.*, 2007). Além destes metabólitos, a levedura



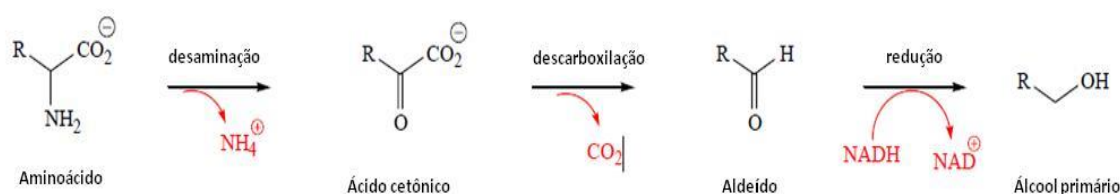
também produz, embora em baixa quantidade, glicerol, álcoois superiores (álcool isoamílico ou 3-metil-1-butanol, n-propanol, 2-feniletanol, entre outros), aldeídos, ésteres e acetatos, que podem ser bastante importantes na medida em que são compostos químicos responsáveis pelo aroma e que poderão influenciar as propriedades organolépticas das bebidas alcoólicas produzidas (Ward, 1991).

Além de energia e carbono, supridos pelo metabolismo de açúcares, a levedura necessita de nitrogênio para a síntese de aminoácidos, bases nitrogenadas e outras moléculas que contêm nitrogênio. O teor desses componentes afeta a cinética de fermentação, pois o mosto deficiente desse nutriente pode causar fermentações lentas e paradas de fermentação. Dessa forma, vários aminoácidos passam por uma série de biotransformações liberando álcoois superiores, aldeídos, ésteres e compostos que contribuem para o aroma do vinho (Garde-Cerdán, 2011).

Os aminoácidos podem ser obtidos diretamente do mosto ou sintetizados pela célula. A síntese de aminoácidos em leveduras processa-se de forma similar a outros organismos, com papel essencial do glutamato e da glutamina. A NADP<sup>+</sup>-glutamato desidrogenase é responsável pela produção de glutamato a partir da amônia e  $\alpha$ -cetoglutarato, um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Por outro lado, a glutamina sintase produz glutamina utilizando glutamato e amônio. Reações de transaminação com a participação de piridoxal fosfato como cofator possibilitam a transferência do grupo amino do glutamato para um conjunto de intermediários da glicólise, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e do ciclo das pentose fosfato gerando os distintos aminoácidos (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

Dependendo da disponibilidade de aminoácidos e amônia no mosto, a levedura passa a utilizar o “pool” de aminoácidos, exceto prolina, como fonte de nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Neste caso,

aminotransferases ou transaminases transferem o grupamento amino dos aminoácidos para o ácido  $\alpha$ -cetoglutarico gerando glutamato. Durante o processo de desaminação são gerados ácidos cetônicos que devem ser descarboxilados nos aldeídos correspondentes e reduzidos a álcoois para serem excretados. Assim através de reações de Ehrlich (Figura 1) são formados diversos álcoois superiores (Ribéreau-Gayon et al., 2006).



**Figura 1.** Produção de álcoois superiores a partir de aminoácidos (Reação de Ehrlich).

Segundo Ribéreau-Gayon et al. (2006) alguns álcoois superiores, como 1-butanol não são derivados do catabolismo de aminoácidos e, que de acordo com dados experimentais, a produção de álcoois superiores não está diretamente relacionada com a concentração de aminoácidos no mosto. Na Tabela 2 estão citados os principais álcoois superiores e seus aminoácidos precursores.

**Tabela 2-** Principais álcoois superiores/derivados e seus aminoácidos precursores (adaptado de Lambrechts & Pretorius, 2000 e Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Álcool superior/derivados	Aminoácido precursor	Concentração em vinhos (mg/L)	Aroma
Álcool isoamílico (3-metil-1-butanol)	Leucina	80-300	Solvente
Álcool amílico (2-metil-2-butanol)	Isoleucina	30-100	Solvente
Álcool isobutírico (2-metil-1-propanol)	Valina	50-150	Alcoólico
Feniletanol	Fenilalanina	10-100	Rosas
Tirosol	Tirosina	20-50	Cera de Abelha
Triptofol	Triptofano	0-1	--
Butirolactona	ácido glutâmico	0-5	--
Metionol	Metionina	0-5	Repolho cozido
1-Propanol	Treonina	10-50	“Stupefying”
1-Butanol	---	1-10	Solvente

Os álcoois superiores quando acetilados através da atividade esterásica das próprias leveduras originam os ésteres. Eles são produzidos por uma reação enzimática dos derivados dos ácidos graxos da Coenzima A e os álcoois livres. A síntese dos ésteres baseia-se principalmente pelas enzimas do tipo álcool acetil coenzima A (Flanzy, 2000).

Os ésteres representam o maior grupo de compostos com impacto organolépticos produzidos durante a fermentação alcoólica conferindo um aroma agradável. O frescor e aroma frutado de vinhos jovens derivam, em grande parte, da presença de uma mistura de ésteres produzidos durante a fermentação como o acetato de isoamila que atribui o aroma de banana ou acetato de feniletila que atribui o aroma de rosas (Lambrechts & Pretorius 2000).

Os compostos voláteis ou aromáticos dos vinhos espumantes, embora representados por um número elevado de compostos, somam apenas 1% da massa do álcool, ou seja, de 0,8 g/L a 1,2 g/L. Além disso, apenas seis compostos representam mais de 50% deste valor, dos quais cinco são álcoois superiores (1-propanol, 2-metil-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e um éster (acetato de etila) (Crouzet, 2000).

Além da energia, carbono e nitrogênio, as leveduras necessitam de compostos de enxofre para a síntese de alguns aminoácidos e outros componentes importantes da estrutura e metabolismo. Esses compostos são geralmente voláteis, muitos reativos e são percebidos em baixas concentrações. A levedura pode metabolizar as fontes de enxofre presentes no mosto (sulfatos, sulfito, enxofre elementar e aminoácidos sulfurados) e podem produzir e liberar ao meio diferentes classes de compostos de enxofre susceptíveis, como por exemplo, sulfitos, mercaptanos, tio ésteres e gás sulfídrico. O sulfito é usualmente adicionado durante a produção de vinhos brancos e tintos como

agente antimicrobiano e antioxidante, sendo em parte metabolizados pela levedura. Já o sulfato e aminoácidos estão presentes na uva e conseqüentemente nos mostos (Flanzy, 2000).

Quimicamente, os fenóis são compostos cíclicos de benzeno possuindo um ou mais grupos de hidroxila ligados diretamente à estrutura do anel (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas que estão contidas nas cascas, sementes e polpa de uvas que são extraídas durante o processo de vinificação, principalmente em vinhos tintos. Os tipos e concentrações desses compostos dependem de inúmeros fatores: casta e a fase de maturação, do solo e das condições climáticas, tipo de cultura da videira e do processo de vinificação (La Torre et al., 2006), podendo estar presentes em níveis baixos em vinho brancos 0,2 g/L, enquanto, em vinhos tintos atingem 1-2,5 g/L (Viñas et al. 2000). Esses compostos são um grande e complexo grupo de particular importância para as características de qualidade, pois podem afetar a aparência, sabor, sensação na boca, aromas e propriedades antimicrobianas e antioxidantes de vinhos (Lambrechts & Pretorius 2000). Eles são responsáveis por grande parte das diferenças entre os vinhos brancos e vinhos tintos (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

## **2.5 Processo de autofagia e autólise de leveduras**

Autofagia é um processo catabólico que permite a reciclagem de componentes citoplasmáticos (incluindo as organelas) em componentes básicos, oferecendo uma alternativa eficiente na geração de bioenergia para novas sínteses. Em leveduras, a principal função da autofagia é o mecanismo de adaptação que permite a sobrevivência na resposta às mudanças de disponibilidade de nutrientes no meio (Kundu & Thompson, 2005).

Segundo Klionsky (2005) há três formas primárias de autofagia: mediada por chaperonas, microautofagia e macroautofagia.

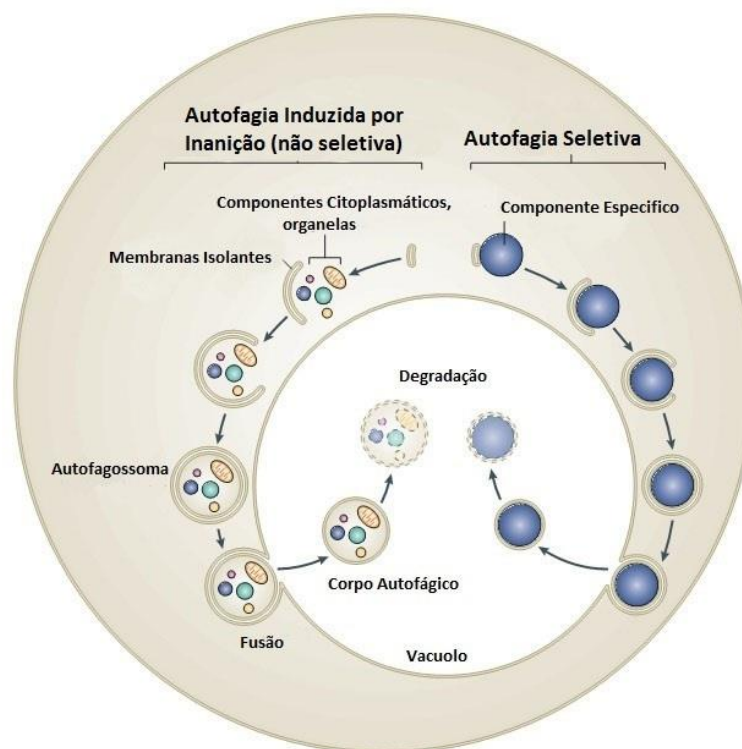
A autofagia mediada por chaperonas corresponde a uma resposta secundária ao estresse nutricional e a diferença dos outros dois processos envolve a translocação direta de proteínas alvo através da membrana lisossomal. Porém, esta forma de autofagia não tem sido observada em leveduras (Massey et al., 2004).

A microautofagia, o processo menos conhecido, é utilizado para sequestrar componentes citoplasmáticos por invaginação da membrana lisossomal/vacuolar. Esse processo se caracteriza pela absorção de uma porção do citoplasma pela invaginação direta da membrana vacuolar (Klionsky, 2005, Song & Kumar, 2012).

Na macroautofagia, o processo é iniciado com a formação de uma membrana dupla em torno de uma porção do citoplasma, resultando na formação de uma estrutura denominada autofagossoma. Após a conclusão, a camada externa do autofagossoma se funde com a membrana vacuolar e ocorre a formação de uma membrana simples, chamado corpo autofágico. Este corpo entra no lúmen vacuolar onde é reciclado em componentes vacuolares hidrolases reutilizáveis. As proteínas envolvidas na micro e macroautofagia são atualmente denominadas de proteínas Atg (Kiel, 2010), mas muitas delas receberam previamente nomes como Apg, Aut ou Cvt.

Na macroautofagia, as vesículas denominadas autofagossomos não derivam da membrana lisossomal/vacuolar. A fusão do autofagossomo com o lisossomo ou vacúolo resulta na liberação de uma vesícula interna (corpo autofágico) no lume do compartimento degradativo. A quebra da membrana vesicular leva a degradação dos componentes no interior do autofagossomo permitindo assim a reciclagem de aminoácidos e outros monômeros (Klionsky, 2005).

Apesar de ser um processo dinâmico, a autofagia e seus processos podem ser separados em um conjunto de eventos diferentes/isolados: (1) indução, (2) seleção e empacotamento, (3) nucleação de vesículas, (4) expansão, (5) recuperação, (6) direcionamento, ancoragem e fusão da vesícula com o lisossomo/vacuólo e (7) quebra da vesícula no lume dos corpos Cvt como dos autofagossomos e o transporte e reciclagem de macromoléculas (Figura 2).



**Figura 2-** Autofagia em leveduras. Na autofagia (não seletiva) induzida pela escassez de nutrientes, as membranas isolantes envolvem principalmente componentes citoplasmáticos e organelas para formar o autofagossoma. A membrana externa do autofagossoma funde-se com a membrana vacuolar liberando o corpo autofágico, e desintegra-se para permitir a degradação pelas enzimas hidrolases. Na autofagia seletiva, específicos componentes (complexos de proteínas e organelas) são envolvidas por uma membrana vesicular que são semelhantes às autofagossomas, e são entregues para ao vacúolo para a degradação (Nakatogaya *et al.*, 2009).

(1) Indução: em leveduras, como em outros organismos, a autofagia ocorre em níveis basais sob condições de crescimento vegetativo. Porém, o mecanismo de monitoramento do meio externo que atua na regulação do processo autofágico ainda não é totalmente conhecido. Um dos elementos regulatórios mais importantes é a proteína quinase Torc1 (target of rapamycin) que inibe a autofagia em meios ricos. A Torc1 atua de duas formas: (1) através da hiperfosforilação da proteína autofágica Atg13, a qual por sua vez, passa a ter baixa afinidade pela proteína Atg1, inibindo assim a autofagia, e (2) através de um processo de “cascata” que controla a fosforilação de vários fatores/elementos/substâncias envolvidos na regulação da transcrição e síntese de um conjunto de proteínas necessárias no processo autofágico. Assim, a inibição de Torc1 por estresse nutricional ou por tratamento com rapamicina resulta na defosforilação parcial de Atg13 e indução da autofagia (Noda et al, 1998).

A quinase Atg1 faz parte de um complexo que inclui outras proteínas que atuam na via Cvt ou na via autofágica, mas não em ambas (Klionsky, 2005).

(2) Seleção e empacotamento: a autofagia é considerada geralmente como um processo não específico no qual porções aleatórias do citoplasma são sequestradas nos autofagossomos. Entretanto, existem evidências de especificidade parcial no processo. Por exemplo, a proteína citoplasmática Ald6 é transferida para o vacúolo numa taxa incompatível com um processo inespecífico e durante a pexofagia, um tipo de autofagia específica que atinge os peroxissomos exclusivamente, poupando outras organelas (Noda et al, 1998).

No caso da via Cvt, o transporte é realizado principalmente com fins biogênicos e não degradativos. Neste sentido, o precursor de Ape1 (prApe1) forma dodecâmeros e estes se combinam para formar um oligômero de ordem maior

denominado de complexo Ape1. Este processo parece ser dependente apenas da conformação de prApe1. A proteína receptora Atg19 liga-se ao domínio propeptídico de prApe1, o qual contém a informação para transferência vacuolar. Este domínio é retirado do restante da proteína após liberação da mesma no lume vacuolar, permitindo assim a ativação de uma aminopeptidase. Um processo semelhante, envolvendo Atg19, ocorre no transporte de Ams1, resultando em atividade manosidásica no interior dos vacúolos (Shintani et al., 2002).

Na sequência a proteína Atg11 liga-se a Atg19 atuando como um adaptador que direciona o complexo Cvt para no PAS (Phagophore Assembly Site – local proposto para a formação de autofagossomo), um sítio que promove a nucleação das vesículas Cvt levando à formação de autofagossomos. Finalmente, a proteína Atg8 conjugada com fosfatidiletanolamina (PE) liga-se a Atg19 permitindo a inclusão do complexo Cvt na vesícula em formação (Klionsky, 2005).

- (3) Nucleação de vesículas: este passo, que corresponde aos estágios iniciais, onde se juntam proteínas e lipídios que irão formar os autofagossomos e as vesículas Cvt, é um dos passos menos conhecidos do processo. Em leveduras, quase todas as proteínas autofágicas localizam-se, pelo menos de forma transitória, no PAS. Portanto, o acoplamento de proteínas Atg ao PAS deve marcar o início do processo de nucleação.

Na maior parte dos casos de tráfego/ transporte endomembrana, uma vesícula se forma por brotamento a partir de uma organela pré-existente. A vesícula resultante mantém a mesma morfologia da organela original. Entretanto, no caso dos processos associados à autofagia, as vesículas são formadas através de uma síntese “do novo”, não sendo formadas por brotamento ou extrusão de uma organela pré-existente. Como resultado, o autofagossomo apresenta dupla



membrana e a morfologia do lume versus citosol de transporte, que é reversa: o interior da vesícula Cvt ou do autofagossomo torna-se equivalente ao lume de uma organela ou do espaço extracelular. Os componentes que participam da nucleação não são completamente esclarecidos, e algumas proteínas devem ter papel tanto na nucleação quanto na expansão. Em leveduras, um conjunto de proteínas que parecem atuar no PAS são as formadoras do complexo PI 3-K. Em *Saccharomyces* existe apenas um PI 3-K formando dois complexos. Estes complexos contêm Vps34 e a proteína regulatória Vps15, juntamente com Atg6 (ou Vps30). Adicionalmente o complexo I inclui Atg14, enquanto o complexo II contém Vps38. O complexo I atua primariamente no PAS, enquanto o complexo II funciona no endossomo. O PtdIns (3)P resultante do complexo I recruta ainda um conjunto de proteínas para o PAS, incluindo: Atg18, Atg20, Atg21, Atg24 e Atg27. Destas, Atg20 e Atg24 fazem parte do complexo Atg1 quinase (Klionsky, 2005).

- (4) Expansão: a maior parte das proteínas das vias Cvt e de autofagia que atuam na formação vesicular, incluem os processos de expansão e acabamento. As proteínas envolvidas nesta etapa têm dois grupos de componentes envolvendo proteínas semelhantes à ubiquitina (Ubl) que participam em novas reações de conjugação (Ohsumi, 2001). Atg8 é uma Ubl que sofre ação proteolítica da protease Atg4, mostrando um resíduo de glicina o qual é então covalentemente ligado à fosfatidiletanolamina, sendo na sequência incluído na membrana (Nakatogaya *et al.*, 2009). Atg8-PE é a única proteína com papel estrutural conhecida dentro do sistema, sendo essencial na formação e expansão correta das vesículas, já que na sua ausência ocorre apenas formação de pequenos autofagossomos aberrantes. Outras proteínas apontadas no processo de expansão

são Atg12, Atg5, Atg16, as quais formam um complexo Atg12-Atg5. A Atg16 de função ainda desconhecida.

- (5) Recuperação: das mais de 20 proteínas conhecidas do processo autofágico e da via Cvt, apenas duas permanecem associadas com os autofagossomos ou as vesículas Cvt: Atg8-PE e Atg19. A maior parte das proteínas Atg é solúvel e podem ser recicladas (aproveitadas/ enviadas) para fora da vesícula durante ou após o acabamento (Klionsky, 2005).
- (6) Direcionamento, ancoragem e fusão: o complexo Atg12-Atg5, Atg16, assim como Atg8-PE devem formar uma capa na superfície das vesículas Cvt e dos autofagossomos impedindo a fusão prematura destes com o lisossomo/vacúolo. Em leveduras, o Atg8-PE é removido previamente à fusão através de uma segunda clivagem mediada pelo Atg4. A expressão de Atg8 $\Delta$ R, é uma forma mutante de Atg8 à qual falta o último resíduo de arginina, permitindo a primeira clivagem e associação a PE, mas impedindo a segunda clivagem resultando num defeito parcial tanto da via autofágica quanto da via Cvt (Klionsky, 2005).
- (7) Abertura das vesículas: a função principal da autofagia em leveduras é degradar componentes citoplasmáticos e reciclar as macromoléculas resultantes para serem utilizadas na síntese de componentes essenciais em situações de estresse nutricional. Assim sendo, deve ocorrer a abertura da membrana simples das vesículas subvacuolares que resultam da fusão das vesículas autofagossomo/Cvt com o vacúolo. A lise das vesículas depende do pH ácido do vacúolo e da atividade da proteinase B (Prb1). Entretanto, alguns resultados mostram que a função de Prb1 deve ser o gatilho para a ativação de outras proteínas vacuolares que atuam diretamente no processo de abertura. Outras proteínas implicadas nesta etapa final são Atg15 e Atg22. Atg15 é liberada no vacúolo através da via

de corpos multivesiculares e tem homologia com uma família de lipases (Klionsky, 2005).

## **2.6 Autólise de leveduras em vinhos e espumantes**

Segundo Alexandre & Guilloux (2006), autólise de leveduras é um processo lento associado a morte celular, e envolve enzimas hidrolíticas que agem para liberar o citoplasma (peptídeos, ácidos graxos, nucleotídeos e aminoácidos) e a parede celular (manoproteínas). Temperatura baixa no envelhecimento provoca uma taxa de mortalidade baixa e uma baixa taxa de reação enzimática, explicando a lentidão do processo. Durante o envelhecimento sobre as borras de leveduras as propriedades organolépticas e de espuma dos espumantes são modificadas refletindo na composição. De um modo geral a autólise em espumantes inicia-se dois a quatro meses após o término da segunda fermentação (Todd et al., 2000).

A autólise pode ocorrer na forma induzida ou natural. A autólise induzida é amplamente utilizada em aplicações industriais, como para a produção de extrato de levedura utilizado como intensificador de sabor ou para a produção de enzimas intracelulares. Este processo pode ser muito rápido, entre 48 e 72 horas. A autólise natural, no entanto, leva muito mais tempo, isto é, especialmente em vinhos e espumantes em que as condições autolíticas são desfavoráveis (pH 3-4, temperatura de envelhecimento de 15 °C e a presença de etanol). Essas diferenças resultam em autolisados diferentes, e têm sido foco de estudos sobre os processos autolíticos em vinhos.

Segundo Babayan et al. (1981), a autólise de leveduras pode ser dividida em quatro estágios: (1) liberação de proteases no citoplasma por degradação de estruturas vacuolares; (2) degradação de inibidores de proteases e ativação das proteases

intracelulares; (3) hidrólise de componentes celulares; e (4) liberação de componentes celulares de baixa massa molecular à partir da parede celular.

As enzimas hidrolíticas desempenham um papel importante no processo de autólise. Alexandre et al. (2003) mostrou que a protease A foi responsável por 60% do nitrogênio liberado durante a autólise no vinho.

Estudos em vinhos mostram que a atividade proteolítica em leveduras aumenta seis vezes após a exaustão do açúcar e decresce rapidamente quando inicia a lise celular (Alexandre et al., 2001). A atividade proteolítica é afetada por diversos fatores, particularmente o pH e a temperatura. Sato et al. (1997) mostraram que em vinho com pH 3 e a 10°C a atividade proteolítica decresce após três meses de envelhecimento, enquanto a 20°C a atividade decresce consideravelmente durante os primeiros dois meses. Leroy et al. (1990) mostraram que a atividade proteolítica varia dependendo da linhagem de levedura utilizada, abrindo a possibilidade para o melhoramento de leveduras com alteração de autólise.

Durante a autólise ocorre a degradação da parede celular da levedura. Como a parede da levedura representa 20 a 30% do peso seco da célula e é constituída fundamentalmente de  $\beta$ -glucanos (85 a 90%) e manoproteínas (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). Segundo Charpentier & Freyssinet (1989) a degradação da parede celular deve seguir três etapas: (1) hidrólise dos glucanos por glucanases com a liberação das manoproteínas; (2) os glucanos são liberados no meio pela ação residual de glucanases; e (3) a fração protéica das manoproteínas é degradada pelas proteases com a liberação dos mananos.

Nunez et al. (2005) confirmou que a capacidade autolítica das leveduras foi importante para a qualidade de vinho espumante. Conforme citado anteriormente, a autólise de leveduras ocorre durante o envelhecimento de espumantes liberando um

conjunto de compostos que modificam as características físicas e organolépticas do produto final. Os principais compostos liberados encontram-se sumarizados no Quadro 1, a seguir:

**Quadro 1-** Degradação de conteúdo celular e o seu impacto no espumante

Origem	Tipo de composto	Impacto no espumante	Referência
Conteúdo celular	Nucleosídeos	Agentes flavorizantes	Leroy et al (1990)
	Nucleotídeos		Charpentier et al (2005)
	Aminoácidos	Precusores de aromas	Feuillart & Charpentier (1982)
	Peptídios	Qualidade da espuma	Polo et al. (1992)
	Proteínas	Gostos adocicados e amargos	Moreno-Arribas et al. (2000)
	Lipídios	Qualidade da espuma	Gallart et al. (2002)
Parede celular	Glucanos	Qualidade da espuma	Moreno-Arribas et al. (2000)
	Manoproteínas	Aumenta a maciez na boca	Bertuccioli & Ferrari (1999)

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Linhagem de levedura**

A levedura utilizada neste trabalho foi a cepa comercial EC1118 “*Prise de mousse*”, *S. cerevisiae* vr. *bayanus*, produzida por Lalvin®.

#### **3.2 Produção experimental de espumantes (Método tradicional)**

A elaboração do vinho base e do espumante foram realizadas na Vinícola Cia Piagentini. Foi utilizado um vinho base branco, safra 2011, elaborado com pelas variedades Pinot Noir, Chardonnay e Riesling Itália oriundas da Serra Gaúcha.

Industrialmente o vinho base branco foi fermentado pela levedura X5, realizada a estabilização tartárica e protéica, decantado e filtrado, mas não realizou a fermentação malolática (realizado na Vinícola).

A segunda fermentação foi realizada no sistema Champenoise. Para a segunda fermentação ou tomada de espuma, o vinho base, foi acrescido de licor de *tirage* contendo sacarose (2%), fosfato de amônio como fonte nitrogenada (300 mg/L) e re-inoculado com EC-1118. A segunda fermentação ocorreu em ambiente climatizado, onde foi controlada a temperatura dentro do intervalo de 12°C a 14°C, protegida da luz e calor.

Para a adição da levedura foi preparado um pé de cuba. A levedura foi reidratada em solução de ativador Superstart® (Laffort) 0,3 g/L por 4 horas. A inoculação da levedura no vinho foi realizada seguindo os processos enológicos tradicionais, com inóculos entre 2 a 9 x 10<sup>6</sup> cel/ml determinada por contagem microscópica em Câmara de Neubauer.

### 3.3 Análises do Vinho Espumante

As amostras foram coletadas nos tempos 0, 7, 15, 30, 60, 90, 135, 180, 270 e 360 dias de fermentação. Os vinhos espumantes foram homogeneizados, abertos e realizados os testes de número de células. Em seguida, foram centrifugadas a 3200 xg, à 4°C durante 15 minutos e os *pellets* foram mantidos a -80°C até o momento da análise de expressão gênica. O sobrenadante foi armazenado em temperatura de refrigeração e realizadas as análises clássicas, índice de compostos fenólicos, compostos voláteis e proteínas. Para cada tempo testado foram utilizadas 3 garrafas distintas.

#### *3.3.1 Análises de Acompanhamento da Segunda Fermentação: Análises Clássicas ou Bromatológicas*

As análises clássicas, como acidez total, acidez volátil, açúcares redutores, SO<sub>2</sub> total, densidade relativa a 20°C, extrato seco, grau alcoólico e pH foram realizadas no vinho espumante através de métodos físico-químicos segundo a legislação brasileira vigente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA (Brasil, 2005) no Laboratório de Referência em Enologia - LAREN.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### *3.3.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais*

Os Compostos fenólicos foram determinados utilizando dois métodos que estão descritos abaixo:

##### *3.3.2.1 Índice de Compostos Fenólicos Totais (Método OIV)*

Os compostos fenólicos totais foram determinados pela metodologia de Folin-Ciocalteu Index proposta pelo Compêndio de Métodos Internacionais de Análises –

OIV. Para tanto, misturou-se 200 µL de amostra, 10 mL de água destilada, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, 4 mL de solução de carbonato de sódio e o volume foi completado para 20 mL de água destilada em um frasco de 100 mL. Os frascos foram homogeneizados e deixados em descanso por 30 minutos para que a reação estabilize. Após, as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro Libra S12 (Biochrom), no comprimento de onda de 750 nm com a tara de um branco preparado com água destilada no lugar da amostra de espumante. O cálculo é expresso sob a forma de um índice obtido multiplicando a absorvância por 20. As análises foram realizadas em triplicata. Todos os volumes utilizados foram reduzidos em 5 vezes ao proposto pela metodologia.

#### *3.3.2.2 Índice de Compostos Fenólicos Totais (Método Folin-Ciocalteu)*

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), utilizando ácido gálico como padrão de referência para a calibração da curva ( $y = 0,1717x - 0,1096$ ;  $R^2=0,9921$ ). Resumidamente, foi adicionada 100µL de amostra, acrescidos de 500µL reagente de Folin-Ciocalteu a 10% e 400µL de carbonato de sódio a 7.5%. Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 min a 50°C em banho-maria e resfriadas a temperatura ambiente. A absorvância da fração líquida foi determinada a 760 nm em espectrofotômetro Libra S12 (Biochrom). Uma curva de calibração de ácido gálico foi utilizada para quantificação dos fenóis totais. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mgEqAG/mL).



### *3.3.3 Determinação dos Compostos Voláteis*

As análises dos compostos voláteis, como ésteres e álcoois superiores, foram realizadas em cromatógrafo gasoso HP 6890 da Agilent Technologies, conforme metodologias descritas a seguir. Os compostos foram identificados através da comparação com padrões autênticos da Sigma-Aldrich. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Referência em Enologia - LAREN.

#### *3.3.3.1 Determinação de álcoois superiores*

As determinações do conteúdo de etanal, acetato de etila, metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol foram realizadas simultaneamente por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC), conforme procedimentos adaptados de Bertrand (1981). A análise partiu do destilado de 100 mL da amostra, sendo que sobre uma alíquota de 5 mL foi adicionado 70 µL de uma solução 5 g/L de 4-metil-2-pentanol (padrão interno).

Para esta análise, 1,0 µL da amostra foi injetado no cromatógrafo no modo “split” com divisão 60 mL/min à 220 °C. Foi utilizada uma coluna capilar CPWax 57CB de 60 m de comprimento, 250 µm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. O gás vetor foi hidrogênio 5.0 em fluxo de 2,0 mL/min e nitrogênio, como gás auxiliar, a 37 mL/min. As condições de temperatura do forno foram: 40 °C por 5 min; 40 a 90 °C a 3 °C/min ; 90 a 200 °C a 10 °C/min; 200 °C por 5 min. A combustão foi mantida com fluxo de ar sintético em 350 mL/min e hidrogênio 5.0 em 35 mL/min. A temperatura do detector foi 230 °C.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.3.3.2 *Determinação de acetatos, ésteres e ácidos graxos*

As determinações do conteúdo de acetatos, ésteres e ácidos graxos foram realizadas por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC), conforme metodologia de Bertrand (1981). A 50 mL da amostra foram adicionados 2 mL de 3-octanol (40 mg/L), 2 mL de ácido heptanóico (50 mg/L), como padrões internos, e 0,3 mL de ácido fosfórico 1:3 para acidificar o meio. Nestas condições, a amostra foi submetida a três extrações líquido/líquido sucessivas na ordem volumétrica 4:2:2 de uma mistura dos solventes orgânicos éter di-etílico/n-hexano (1:1) (Merck).

Para esta análise, 2,0 µL da amostra foram injetados no cromatógrafo no modo "splitless" com divisão 60 mL/min a 240 °C. Foi utilizada uma coluna capilar CP Inowax de 30 m de comprimento, 250 µm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. O gás vetor foi hidrogênio 5.0 em fluxo de 2,0 mL/min e nitrogênio, como gás auxiliar, a 37 mL/min. As condições de temperatura do forno foram: 40 °C por 5 min; de 40 a 230 °C a uma taxa de 3 °C/min; 230 °C por 20 min. A combustão foi mantida com fluxo de ar sintético em 350 mL/min e hidrogênio 5.0 em 35 mL/min. A temperatura do detector foi 230 °C.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.3.4 *Avaliação da população de leveduras (UFC) e número de células*

O número de leveduras foi determinado pela diluição e plaqueamento de 1 mL das amostras em meio YEPD (2% de dextrose, 1% peptona, 1% extrato de levedura e 1,8% ágar), e posterior contagem das colônias (UFC) após incubação de 48 horas a 30 °C.

A contagem microscópica de células foi realizada em câmara de Neubauer A observação microscópica foi realizada em microscópio óptico com lente objetiva de 40X. Para a contagem de células na amostra, contou-se o número total de células na diagonal principal (5 quadrantes). O resultado foi obtido pelo cálculo:

$$\text{Número de células} = \frac{\text{Média aritmética dos quadrantes}}{0,000004}$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.3.5 Avaliação de Proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), a leitura desse experimente foi realizado em um leitor de microplacas de Elisa da marca Asys Expert Plus (Biochorm) em um comprimento de onda de 595 nm. A quantificação de proteínas foi realizada comparando os valores com uma curva padrão de albumina bovina.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.3.6 Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR

Visando o estudo do efeito da autofagia e autólise de leveduras foi avaliada a expressão gênica através de qRT-PCR de um conjunto de genes representativos das principais vias associadas ao metabolismo básico, resposta a estresse, autofagia e autólise em *S. cerevisiae* (Quadro 2).

Os primers específicos para o gene TEF1 (Nardi et al., 2010) e um conjunto de 10 genes envolvidos nos processos de micro e macroautofagia, utilizados neste trabalho encontram-se descritos no Quadro 2. Estes primers foram desenhados com base nas

sequências depositadas no GenBank utilizando a ferramenta Primer-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Quadro 2.** Primers utilizados para avaliação de expressão gênica.

Gene	Função	Sequencia
TEF 1	Fator 1 de elongação ( <i>Housekeeping</i> )	TEF1 F- GGTTACTCTCCAGTTTTGGATTGTC TEF1 R- ACGAACTTGACCAAAGCAGC
ATG 1	Ser/Thr quinase (autofagia)	ATG1 F- GGAATCTCTGGCCGCAAAGGCA ATG1 R- TGCGCCTGTTCTCAAAGTTAGCCA
ATG 4	Cisteína protease (autofagia)	ATG4 F- AGGCTCGTCCGAAGAACCGG ATG4 R- CCGCTTCACCGCGATATCGACA
ATG5	Formação de autofagossomos	ATG5 F- TGCCTAGCCGGAAAAAGCGCT ATG5 R- TGGTGGCAACGAATCGCCCA
ATG 8	Componente de fagossomos e vesículas CVT	ATG8 F- GAAGGCGGAGTCGGAGAGG ATG8 R- GGCAGACATCAACGCCGC
ATG9	Formação de vesículas CVT	ATG9 F- GCCAGGTCAAAGCCGGAGC ATG9 R- CCCAGTTCTTGCCGGGATTCT
ATG 11	Envolvida no carregamento para vesículas CVT	ATG11 F- CACTGCACCTACCCAGCAAGAA ATG11 R- AGCAGCTGATCGGGAGGAATCT
ATG19	Carrega a aminopeptidase e manosidase para os fagóforos	ATG19 F- CTGGCGATAAGCCAACCACGC ATG19 R- CTCGATAGTGGAGCCGGCCTC
VPS 34	Fosfatidilinositol-3-quinase (autofagia)	VPS34 F- GCTGGCTATTGTGTTATTACATACATC VPS34 R- ATGGCGGAAAAGTTTTGGGG
APE 1	Aminopeptidase 1	APE1 F- AGCACGCCGCAATGGAGACA APE1 R- TGCTGTGCATGGACAACTGTGCA
AMS 1	Alfa manosidase 1	AMS1 F- ACCAAAGGCTCCGGATGCGC AMS1 R- TGAGCGAGCTTAACAGTGTCGCT

As amostras testadas foram as do tempo inicial (zero), 7, 30, 60 e 90 dias, pois nesse período ainda há alguma atividade vital.

O RNA total foi extraído utilizando o método extração utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen™). Antes de iniciar a extração de RNA total os *pellets* armazenados a -80°C de cada tempo (resultado de 3 garrafas) foram descongelados a temperatura ambiente e homogeneizadas usando 750 µL de salina 0,9%.Brevemente, 200 µL desta cultura foram centrifugados a 16500 x g por 10 min descartando o sobrenadante e preservando o *pellet* de células. Em seguida adicionou-se 1,5 mL de

TRIzol® ao *pellet* e o mesmo foi ressuspensionado vigorosamente. O homogeneizado foi então incubado por 10 minutos a temperatura ambiente e após adicionou-se 300 µl de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados por vortex durante 5 minutos e, em seguida, incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período as amostras foram centrifugadas a 32800 xg por 15 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi retirada e a ela adicionou-se 750 µl de álcool isopropílico gelado. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O *pellet* obtido foi então lavado 1 vez com 1,5 mL de etanol 75%, homogeneizado em vortex, centrifugado a 16.700 xg em temperatura ambiente e o *pellet* foi seco em capela de exaustão. RNA total obtido foi ressuspensionado em 80 µl de água e quantificado em espectrofotômetro Libra S12 (Biochrom), a um comprimento de onda de 260 nm. A avaliação do grau de pureza do RNA extraído foi realizada utilizando a relação Abs260/Abs280nm e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e a amostra corada com GelRed™. Todas as amostras foram padronizadas para uma concentração final de 1 µg/µl. Todas as amostras foram tratadas com TURBO™ DNase (Life Technologies™), conforme metodologia descrita pelo fabricante para evitar contaminações por DNA. Para verificar a eficiência do tratamento utilizando TURBO™ DNase, um PCR foi realizado utilizando RNA como molde e um controle positivo empregando DNA da EC1118. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e a amostra corada com GelRed™, onde foi confirmado a presença de amplificado apenas no controle positivo, evidenciando que as amostras tratadas com TURBO™ DNase continham apenas RNA.

A partir do RNA total extraído, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), utilizando M-MLV Reverse

Transcriptase (Invitrogen™). As reações envolvendo a síntese de cDNA foram realizadas em um volume final de 20 µl. Cada reação foi constituída por 1µl de Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500 µg/mL), 1 µl de dNTPs (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 2 µl de RNA total (500 ng/mL) e 8µl com água DEPC para completar o volume da reação em 12 µl. Esta reação foi homogeneizada e incubada a 65°C por 5 minutos e imediatamente mantida em gelo. Em seguida, adicionou-se a reação 4 µl de 5x *First-Strand Buffer*, 2 µl de DTT (0,1M) e 1 µl de água DEPC. A reação foi então misturada gentilmente e incubada a 37°C por 2 minutos. Logo, 1µl (200U) de M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) foi adicionado a reação e incubada a 37°C por 50 minutos. Após este período a reação foi inativada por incubação de 15 minutos a 70°C. O cDNA obtido foi então diluído na proporção de 1:50 e um RT-PCR foi realizado para a confirmação de sua síntese.

A expressão gênica foi avaliada através de qRT-PCR utilizando Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen™) em volume total de 20 µl. Brevemente, a reação de qRT-PCR foi composta de 4 µl de cDNA diluídos 1:50, 1µl de primers, 10 µl Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG e 5 µl de água DEPC. Todas as amplificações foram realizadas em Real-Time PCR System Applied Biosystems StepOne™ programado para os seguintes ciclos: temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, 95 °C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C ( temperatura de anelamento) por 1 minuto, 95°C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

O CT (*Cycle Threshold*) foi determinado automaticamente pelo aparelho. A partir dos valores de CT foram calculados os  $\Delta$ CT utilizando como referência (*housekeeping*) o gene TEF1. Este gene foi escolhido dentre ACT1, TEF1 e GDH1 em ensaio prévio, com base na sua maior uniformidade de expressão em distintos tempos

durante a segunda fermentação. O gene TEF1 tem sido utilizado como referência em outros estudos em vinhos (Nardi et al., 2010). A expressão relativa foi calculada utilizando  $2^{-\Delta\Delta CT}$  empregando como controle ou padrão as amostras de 7 dias de fermentação.

### 3.3.7 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico através do programa SPSS 20.0 for Windows. Após a constatação da distribuição normal dos resultados, os dados foram analisados pelo teste paramétrico ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 0,05 de significância. Além destes, foi realizada a análise de Componentes Principais (CP) que consiste em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante. Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras pois, embora a informação estatística presente nas n-variáveis originais seja a mesma dos n-componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais que 90% desta informação. O gráfico da componente principal 1 *versus* a componente principal 2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para observação dos pontos no espaço n-dimensional (Neto & Moita, 1998).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

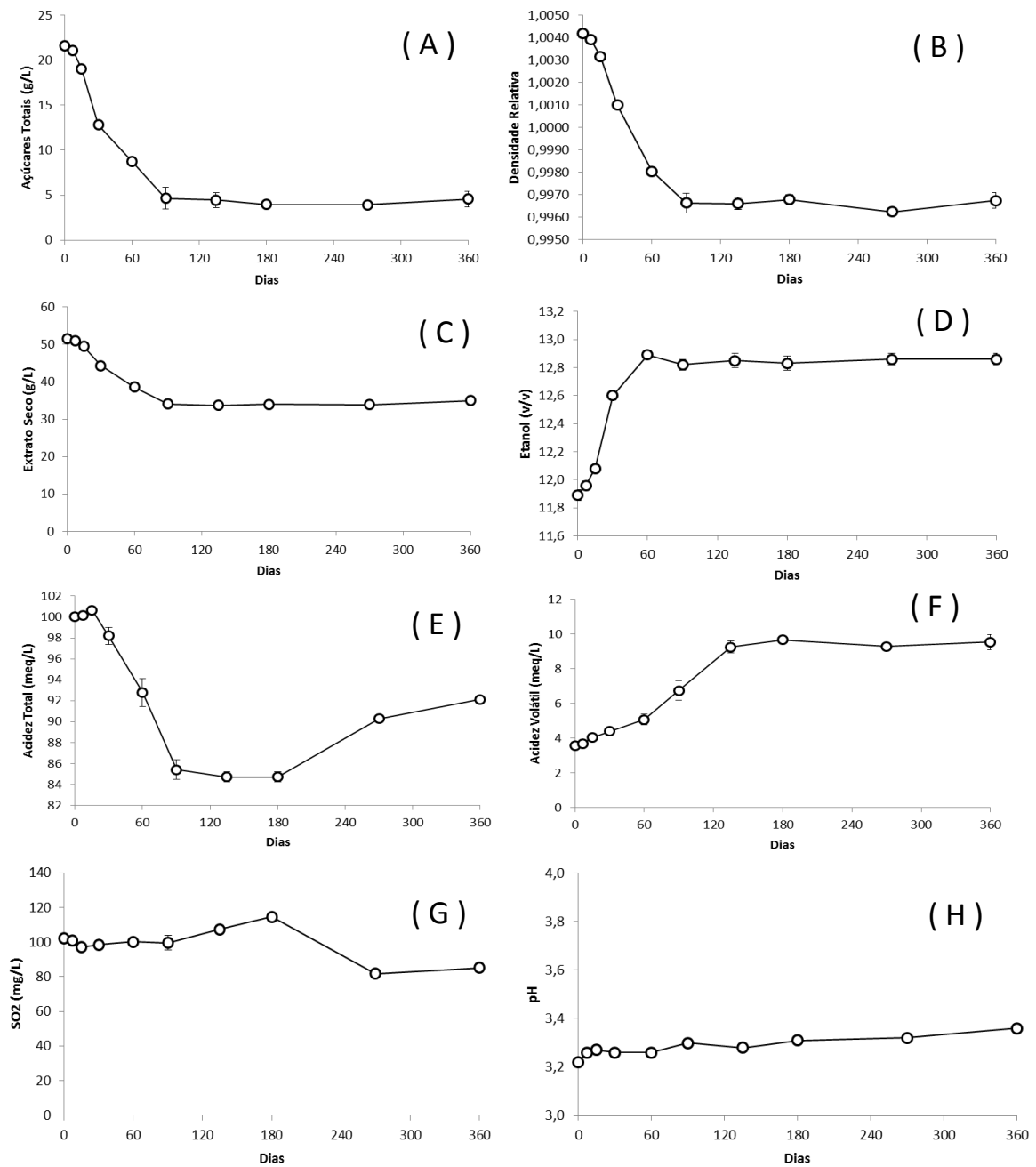
### 4.1 Características básicas, componentes aromáticos e compostos fenólicos durante a segunda fermentação e maturação de espumantes.

#### 4.1.1. Características básicas

O perfil químico do vinho é um dos mais importantes fatores de influência sobre a percepção sensorial. Este perfil é uma mistura complexa de compostos que são o resultado da conversão microbiológica de açúcares e outros componentes em etanol, dióxido de carbono, e diversos produtos secundários (Saber, 2012).

Para iniciar a segunda fermentação ou tomada de espuma (tempo 0), o vinho base foi adicionado de açúcar, leveduras e coadjuvantes que resultou em 21,59 g/L de açúcares totais (Figura 3A), 1,00418 de densidade relativa (Figura 3B), extrato seco de 51,57 g/L (Figura 3C) e 11,89% (v/v) etanol (Figura 3D). De acordo com as curvas da Figura 3 (A a D) a segunda fermentação chegou ao seu término aos 90 dias. A partir deste período, os açúcares totais mantiveram-se constantes em aproximadamente 4,6 g/L, o extrato seco em 34,1 g/L, a densidade relativa em 0,99662 e o etanol atingiu 12,82 % (v/v). Segundo a legislação brasileira a concentração de etanol deve estar entre 10 e 13 % (v/v) e este vinho espumante pode ser classificado como espumante extra brut devido a sua concentração de açúcares totais serem menores que 6 g/L (Brasil 1990). Para os outros parâmetros extrato seco e densidade relativa a legislação brasileira não estabelece limites mínimos e máximos.





**Figura 3-** Análises básicas em vinhos espumantes ao longo de 360 dias. Concentração de açúcares totais (A), densidade relativa (B), extrato seco (C), etanol (D), acidez total (E), acidez volátil (F), SO<sub>2</sub> total (G) e pH (H) em vinhos espumantes ao longo de 360 dias. Os valores são resultado da média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos.

Quanto à acidez do vinho espumante, a avaliação é efetuada através da acidez total, acidez volátil e pH. Em relação à acidez total pode-se observar (Figura 3E) que houve uma redução iniciando com 100,05 meq/L e finalizando com 92,12 meq/L. Esse teor é considerado normal, pois segundo Rizzon et al. (2000) os teores podem situar-se entre 55 a 130 meq/L.

Como representado na (Figura 3F) a concentração de ácidos voláteis elevou-se ao longo do tempo estudado iniciando com 3,58 meq/L e, no final do 360º dia de fermentação apresentou 9,53 meq/L. Esse aumento da acidez volátil pode estar relacionado com a produção de ácido acético pela levedura ou pelo processo de hidrólise dos ésteres ao longo do envelhecimento do vinho espumante (Ribéreau-Gayon et al., 2006). De modo geral, observou-se um nível baixo de acidez volátil no vinho espumante elaborado, provavelmente em decorrência do grau de sanidade das uvas e das boas práticas durante o processo. Segundo citado por Rizzon et al. (2000) a legislação brasileira permite no máximo 20 meq/L de acidez volátil e os teores médios encontrados na Serra Gaúcha são de 7,1 meq/L. No que se diz a respeito do pH, podemos observar (Figura 3H) que ao longo dos 360 dias houve um aumento em sua concentração mantendo-se dentro dos padrões observados por Rizzon et al. (2000) entre 3,1 e 3,4 de pH.

A concentração de dióxido de enxofre total ( $\text{SO}_2$ ) no vinho espumante pode ser observada que permaneceu constante até o tempo 180, em seguida houve uma redução em sua concentração (Figura 3G). Isto pode ser atribuído à conjugação do  $\text{SO}_2$  com diversos compostos, principalmente fenólicos, nas condições de baixo pH, alta concentração de etanol e relação redox encontrada durante a segunda fermentação e envelhecimento dos espumantes (Ribéreau-Gayon et al. 2006). A utilização de baixos

teores de dióxido de enxofre no vinho base é recomendada para a produção de menor quantidade de aldeído acético e, conseqüentemente para reduzir o efeito de solubilização dos compostos fenólicos da uva. Quantidades reduzidas de SO<sub>2</sub> representam menor possibilidade de formação de ácido sulfúrico e de mercaptano. O teor médio encontrado em vinhos espumantes brasileiros é de 137,7 mg/L de SO<sub>2</sub> total (Rizzon et al., 2000).

#### *4.1.2. Evolução de compostos aromáticos.*

Um total de 27 compostos voláteis incluindo compostos leves, álcoois superiores, ácidos e ésteres foram avaliados ao longo do processo de fermentação e envelhecimento dos espumantes. A Tabela 3 relata a concentração desses compostos em vinhos espumantes ao longo de 360 dias de acompanhamento.

Os compostos voláteis 2-metil-1-butanol, hexanol, cis-3-hexen-1-ol, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico e 2-fenil-etanol não apresentaram diferenças significativas em suas concentrações durante os 360 dias de acompanhamento. De um modo geral, a concentração destes compostos foi inferior aos limiares de percepção, com exceção do 2-fenil-etanol que apresenta aroma floral ou de rosas e limiar de 7,5 mg/L (Lambrechts & Pretorius, 2000).

**Tabela 3.** Compostos voláteis (mg/L) do vinho espumante durante 360 dias de acompanhamento.

Tempo	Etanal	Acetato de etila	Metanol	1-propanol	2-metil-1-propanol	2-metilbutanol	3-metilbutanol	Butirato de etila	Acetato de isoamila
0	89,43 ± 10,45 <sup>AB</sup>	22,51 ± 3,72 <sup>ABC</sup>	49,12 ± 1,28 <sup>A</sup>	67,48 ± 0,75 <sup>AB</sup>	16,88 ± 0,22 <sup>AB</sup>	14,54 ± 0,66 <sup>A</sup>	133,98 ± 1,09 <sup>C</sup>	0,40 ± 0,00 <sup>A</sup>	2,64 ± 0,05 <sup>A</sup>
7	85,62 ± 3,69 <sup>BC</sup>	20,92 ± 1,74 <sup>BC</sup>	49,39 ± 1,95 <sup>A</sup>	68,68 ± 1,67 <sup>AB</sup>	19,00 ± 1,15 <sup>A</sup>	14,70 ± 0,71 <sup>A</sup>	138,83 ± 0,40 <sup>BC</sup>	0,35 ± 0,05 <sup>AB</sup>	2,20 ± 0,38 <sup>B</sup>
15	94,89 ± 4,71 <sup>A</sup>	23,50 ± 2,54 <sup>AB</sup>	49,76 ± 2,35 <sup>A</sup>	69,04 ± 4,08 <sup>AB</sup>	17,28 ± 2,83 <sup>AB</sup>	14,08 ± 0,95 <sup>A</sup>	136,67 ± 3,38 <sup>C</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>A</sup>	2,50 ± 0,05 <sup>AB</sup>
60	72,88 ± 6,70 <sup>BCD</sup>	20,13 ± 5,74 <sup>BC</sup>	41,29 ± 3,04 <sup>B</sup>	74,84 ± 1,81 <sup>A</sup>	15,93 ± 0,29 <sup>AB</sup>	16,28 ± 0,51 <sup>A</sup>	145,00 ± 1,69 <sup>AB</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>AB</sup>	2,44 ± 0,10 <sup>AB</sup>
90	78,87 ± 6,22 <sup>ABCD</sup>	18,79 ± 0,95 <sup>BC</sup>	40,04 ± 6,00 <sup>BC</sup>	68,24 ± 4,78 <sup>AB</sup>	17,52 ± 2,22 <sup>AB</sup>	14,76 ± 1,40 <sup>A</sup>	150,23 ± 2,64 <sup>A</sup>	0,33 ± 0,05 <sup>AB</sup>	1,69 ± 0,17 <sup>C</sup>
135	67,92 ± 4,28 <sup>D</sup>	30,48 ± 3,36 <sup>A</sup>	32,62 ± 3,16 <sup>CD</sup>	67,00 ± 0,56 <sup>AB</sup>	15,67 ± 1,20 <sup>AB</sup>	14,59 ± 5,08 <sup>A</sup>	146,70 ± 2,69 <sup>A</sup>	0,34 ± 0,04 <sup>AB</sup>	1,55 ± 0,01 <sup>C</sup>
180	67,86 ± 5,18 <sup>D</sup>	25,28 ± 4,19 <sup>AB</sup>	30,04 ± 1,75 <sup>D</sup>	68,95 ± 3,14 <sup>AB</sup>	16,45 ± 1,34 <sup>AB</sup>	15,49 ± 0,29 <sup>A</sup>	146,79 ± 2,60 <sup>A</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>AB</sup>	1,32 ± 0,02 <sup>C</sup>
270	71,87 ± 2,59 <sup>CD</sup>	13,61 ± 0,59 <sup>C</sup>	39,50 ± 0,53 <sup>BC</sup>	64,33 ± 5,10 <sup>B</sup>	14,64 ± 0,58 <sup>B</sup>	12,55 ± 0,96 <sup>A</sup>	115,39 ± 0,81 <sup>D</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,61 ± 0,05 <sup>D</sup>
360	70,07 ± 3,04 <sup>CD</sup>	16,57 ± 1,82 <sup>BC</sup>	45,31 ± 1,61 <sup>AB</sup>	61,34 ± 2,89 <sup>B</sup>	14,72 ± 0,78 <sup>AB</sup>	11,38 ± 0,35 <sup>A</sup>	107,01 ± 5,96 <sup>E</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,53 ± 0,06 <sup>D</sup>

Tempo	Hexanoato de etila	Acetato de hexila	Hexanol	Cis-3-hexen-1-ol	Trans-3-hexen-1-ol	Octanoato de etila	Ácido isobutírico	Ácido butírico	Decanoato de etila
0	1,07 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,20 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,96 ± 0,04 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,92 ± 0,04 <sup>B</sup>	1,01 ± 0,14 <sup>A</sup>	1,79 ± 0,39 <sup>A</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>C</sup>
7	0,89 ± 0,15 <sup>A</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,96 ± 0,07 <sup>A</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,80 ± 0,19 <sup>B</sup>	1,15 ± 0,13 <sup>A</sup>	2,25 ± 0,26 <sup>A</sup>	0,24 ± 0,05 <sup>C</sup>
15	1,02 ± 0,05 <sup>A</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>AB</sup>	0,99 ± 0,07 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>B</sup>	1,01 ± 0,06 <sup>B</sup>	1,21 ± 0,20 <sup>A</sup>	2,27 ± 0,35 <sup>A</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>C</sup>
60	0,85 ± 0,27 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>C</sup>	1,05 ± 0,05 <sup>A</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>A</sup>	1,38 ± 0,13 <sup>A</sup>	1,22 ± 0,09 <sup>A</sup>	2,05 ± 0,19 <sup>A</sup>	0,55 ± 0,03 <sup>A</sup>
90	0,86 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,05 ± 0,02 <sup>D</sup>	1,06 ± 0,04 <sup>A</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>A</sup>	1,27 ± 0,03 <sup>A</sup>	1,18 ± 0,06 <sup>A</sup>	1,87 ± 0,22 <sup>A</sup>	0,22 ± 0,05 <sup>C</sup>
135	0,86 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>D</sup>	1,11 ± 0,12 <sup>A</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>A</sup>	1,39 ± 0,04 <sup>A</sup>	1,41 ± 0,30 <sup>A</sup>	2,17 ± 0,72 <sup>A</sup>	0,40 ± 0,02 <sup>B</sup>
180	0,92 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>D</sup>	1,11 ± 0,17 <sup>A</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>A</sup>	1,39 ± 0,04 <sup>A</sup>	1,33 ± 0,34 <sup>A</sup>	2,25 ± 0,63 <sup>A</sup>	0,40 ± 0,02 <sup>B</sup>
270	0,46 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>C</sup>	1,14 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,12 <sup>B</sup>	0,83 ± 0,04 <sup>B</sup>	1,18 ± 0,10 <sup>A</sup>	2,22 ± 0,10 <sup>A</sup>	0,29 ± 0,00 <sup>C</sup>
360	0,50 ± 0,11 <sup>B</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>C</sup>	1,19 ± 0,09 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,12 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,89 ± 0,12 <sup>B</sup>	1,28 ± 0,19 <sup>A</sup>	2,48 ± 0,31 <sup>A</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>C</sup>

Tempo	Ácido isoaléico	Dietil succinato	Acetato de feniletila	Dodecanoato de etila	Ácido hexanóico	2-fenil etanol	Ácido octanóico	Ácido decanóico	Ácido dodecanóico
0	0,78 ± 0,09 <sup>A</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>F</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>B</sup>	5,37 ± 0,91 <sup>AB</sup>	12,50 ± 1,02 <sup>A</sup>	5,90 ± 1,24 <sup>BC</sup>	1,17 ± 0,26 <sup>B</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>C</sup>
7	0,89 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>F</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>B</sup>	6,63 ± 0,17 <sup>A</sup>	13,58 ± 1,36 <sup>A</sup>	7,61 ± 0,34 <sup>ABC</sup>	1,45 ± 0,06 <sup>B</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>C</sup>
15	0,93 ± 0,10 <sup>A</sup>	0,41 ± 0,03 <sup>F</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>B</sup>	7,04 ± 0,37 <sup>A</sup>	13,93 ± 1,80 <sup>A</sup>	8,15 ± 0,75 <sup>ABC</sup>	1,42 ± 0,56 <sup>B</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>C</sup>
60	1,06 ± 0,06 <sup>A</sup>	0,65 ± 0,04 <sup>EF</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>C</sup>	6,33 ± 0,19 <sup>AB</sup>	11,84 ± 1,15 <sup>A</sup>	9,40 ± 0,74 <sup>A</sup>	2,34 ± 0,30 <sup>A</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>A</sup>
90	0,99 ± 0,08 <sup>A</sup>	0,93 ± 0,05 <sup>E</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>C</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>C</sup>	4,46 ± 0,95 <sup>B</sup>	12,32 ± 1,16 <sup>A</sup>	5,35 ± 2,07 <sup>C</sup>	1,49 ± 0,40 <sup>B</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>A</sup>
135	1,08 ± 0,22 <sup>A</sup>	1,32 ± 0,14 <sup>D</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>D</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>C</sup>	5,50 ± 1,20 <sup>AB</sup>	12,39 ± 2,52 <sup>A</sup>	7,02 ± 1,19 <sup>ABC</sup>	1,54 ± 0,29 <sup>B</sup>	0,30 ± 0,00 <sup>B</sup>
180	1,09 ± 0,18 <sup>A</sup>	1,66 ± 0,23 <sup>C</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>D</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>C</sup>	5,96 ± 0,78 <sup>AB</sup>	12,38 ± 2,81 <sup>A</sup>	8,35 ± 0,56 <sup>AB</sup>	1,58 ± 0,13 <sup>B</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>B</sup>
270	0,89 ± 0,02 <sup>A</sup>	2,88 ± 0,04 <sup>B</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>D</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>A</sup>	6,60 ± 0,14 <sup>A</sup>	13,16 ± 0,11 <sup>A</sup>	7,89 ± 0,05 <sup>ABC</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>D</sup>
360	0,98 ± 0,08 <sup>A</sup>	3,29 ± 0,21 <sup>A</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>D</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>A</sup>	7,05 ± 0,35 <sup>A</sup>	14,38 ± 1,35 <sup>A</sup>	8,39 ± 0,20 <sup>AB</sup>	0,91 ± 0,10 <sup>B</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>D</sup>

\* Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

O vinho espumante deste estudo apresentou um aumento na concentração de etanal, (acetaldeído) no tempo de 15 dias e, em seguida voltou a diminuir. Segundo Regodón Mateos et al. (2006) os valores iniciais tendem a diminuir ao longo do tempo, pois o acetaldeído combina-se com polifenóis e outros compostos do vinho, sendo os precursores dos acetatos e do próprio etanol. O acetaldeído em baixas concentrações é considerado um componente aromático favorável, porém, em altas concentrações pode contribuir negativamente para as características aromáticas do vinho (Lambrechts & Pretorius 2000). Os vinhos apresentam geralmente concentrações de 75 mg/L (Regodón Mateos et al., 2006).

Em relação ao éster acetato de etila podemos observar que houve um aumento em sua concentração no tempo de 135 dias e, em seguida ele reduziu consideravelmente. Esta redução coincide com o aumento da acidez volátil (Figura 3). Segundo Regodón Mateos et al. (2006) o acetato de etila é produzido enzimaticamente por esterificação do ácido acético com o etanol. O acetato de etila é o segundo componente mais importante (depois do ácido acético) de vinhos com acidez volátil. Concentrações inferiores a 70 mg/L são consideradas positivas para o aroma do vinho, mas superiores a 150-200 mg/L são consideradas negativas.

De um modo geral a concentração de metanol foi inferior aquela evidenciada por Louw et al. (2010) em vinhos Chardonnay. Este composto exibiu aumento durante a fermentação, redução significativa e progressiva até os 180 dias e aumento nos meses finais. Esta variação pode estar associada à formação de ésteres metílicos e sua posterior dissociação durante o envelhecimento sobre as borras. O metanol nas concentrações observadas não apresenta efeito nocivo ou interferência nas características organolépticas.

As concentrações de 1-propanol, 2-metil-1-propanol apresentaram poucas variações durante o tempo estudado. As concentrações observadas foram menores do que aquelas citadas por Meneguzzo (2010). O 1-propanol e o 2-metil-1-propanol são produzidos pela reação de Ehrlich a partir da treonina e da valina, respectivamente. Conforme pode ser observado na Tabela 3, e segundo Regodón Mateos et al. (2006), estes representam, junto com o 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, os principais álcoois superiores produzidos durante a fermentação. O 2-metil-1-butanol (álcool amílico), apesar de não apresentar diferenças significativas, e 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) exibiram aumento de suas concentrações até os 180 dias, com redução posterior. As concentrações destes compostos nos espumantes avaliados encontram-se dentro dos limites inferiores para vinhos (Ribereau-Gayon et al., 2006). O 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol são oriundos do catabolismo da isoleucina e leucina, respectivamente, e se acumulam durante a fermentação alcoólica. O 2-metil e o 3-metil-1-butanol apresentam aroma de marzipan, porém as concentrações detectadas nos espumantes encontram-se abaixo dos limiares de percepção de 65 e 300 mg/L, respectivamente (Lambrechts & Pretorius, 2000).

O perfil do hexanoato de etila ao longo dos 180 dias de acompanhamento permaneceu constante e, em seguida houve uma redução em sua concentração. O precursor do hexanoato de etila é o ácido hexanóico que neste estudo apresentou uma redução no tempo 60 e, em seguida tornou a subir até uma concentração de 7,05 mg/L. Segundo Louw et al. (2010), em vinho Chardonnay, as concentrações de hexanoato de etila e ácido hexanóico são de 0,95 mg/L e 4,97 mg/L, respectivamente. O hexanoato de etila e ácido hexanóico com descritores “maça verde” e “queijo, ranço” apresentaram concentrações superiores aos seus limiares de percepção de 0,005 mg/L e 3mg/L, respectivamente (Jiang e Zhang, 2010).

Os compostos decanoato de etila e ácido decanóico apresentaram elevação na sua concentração durante a segunda fermentação (até tempo 60 dias), reduzindo drasticamente a partir dos 90 dias. Segundo Torrens et al. (2008) a concentração média de decanoato de etila encontrada em vinhos base foi de 0,454 mg/L e segundo Louw (2010) o teor médio encontrado para o ácido decanóico foi 1,07 mg/L e, eles conferem ao vinho um aroma de agradável de uva e odor de ranço, respectivamente, mas apenas o decanoato de etila apresentou concentrações próximas ao seu limiar (Jiang e Zhang, 2010).

O comportamento do dodecanoato de etila e ácido dodecanóico foi inversamente proporcional, o que é esperado já que a formação do dodecanoato de etila é acompanhada por uma redução na concentração do respectivo ácido. A concentração de ácido dodecanóico encontrada neste estudo foi 30% da encontrada por González-Marco et al. (2010). Por outro lado, as concentrações de ácido octanóico e octanoato de etila encontraram-se dentro daquelas comumente observadas em vinhos de acordo com Lambrechts & Pretorius (2000), em ambos os casos superiores aos respectivos limiares de percepção (Jiang e Zhang, 2010) contribuindo, portanto, com as características organolépticas do produto final.

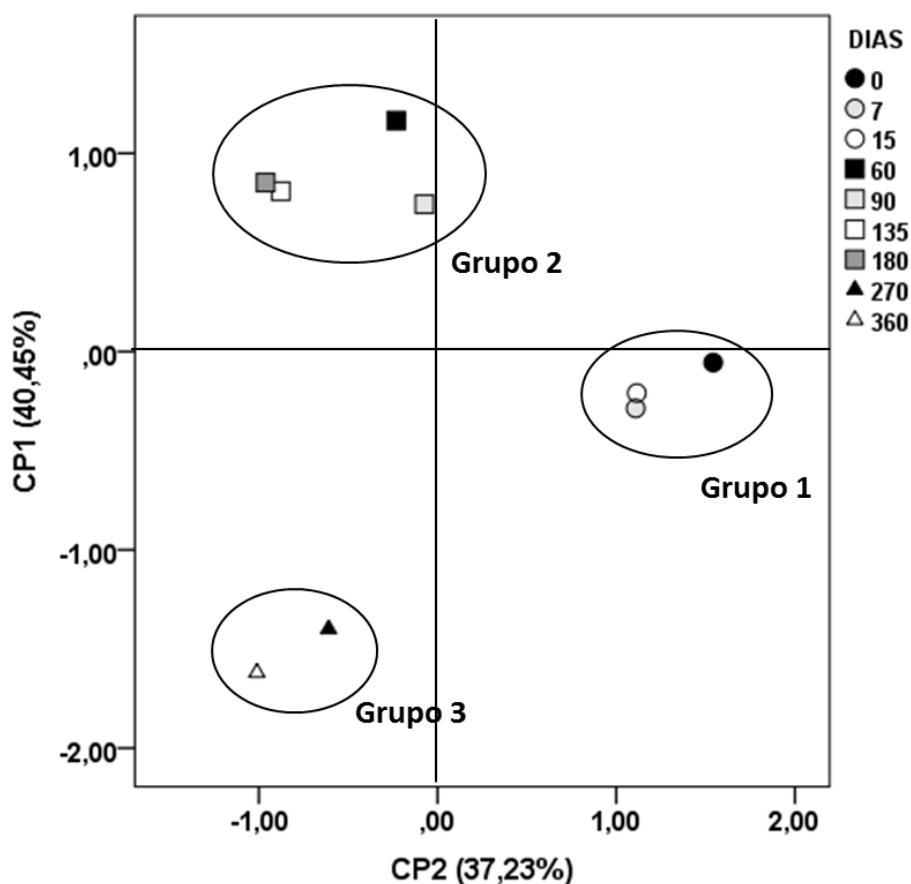
O acetato de isoamila, associado a aromas frutados (banana, pera), apresentou redução significativa ao longo dos 360 dias. Mesmo assim, as concentrações finais foram superiores ao limiar de percepção (0,26 mg/L) com valor olfativo ativo (OAV) entre 2,3 e 3,5. Da mesma forma, foi detectada redução significativa na concentração dos ésteres butirato de etila (maçã e frutas), acetato de hexila (pêra e frutas) e acetato de feniletila (rosas, mel, tabaco). Em conjunto, estas reduções podem ser responsáveis pela diminuição das notas florais e frutadas nos vinhos espumantes.

O dietil succinato apresentou aumento constante durante os 360 dias de acompanhamento. O dietil succinato é produzido por uma reação de esterificação espontânea entre o ácido succínico e o etanol a qual é dependente da concentração destes dois compostos e das condições físico-químicas do sistema (temperatura, pH, oxigênio, etc.). Esse composto volátil é pós-fermentativo sendo formado durante o envelhecimento em contato com as borras da segunda fermentação e pode ser considerado um marcador de envelhecimento (Bosch-Fusté et al., (2007). Esse aumento durante a segunda fermentação também foi constatado por Rui-Aumatell et al. (2006) e por Bosch-Fusté et al. (2007). Segundo Louw et al. (2010) o dietil succinato é considerado um constituinte frutado que lembra melão e seu limiar de percepção é de 200 mg/L. Entretanto, as maiores concentrações observadas neste trabalho estão abaixo desse limiar de percepção.

O cis e trans-3-hexen-1-ol apresentaram concentrações inferiores aos seus limiares de percepção (0,4 mg/L) ao longo de todo o processo de fermentação e maturação dos espumantes, tendo portanto baixa influência nas características aromáticas do produto final.

Para auxiliar na avaliação dos resultados dos compostos voláteis ao longo dos 360 dias de acompanhamento, realizou-se uma análise multivariada. Conforme pode ser apreciado na Figura 4, a análise através de componentes principais permitiu a separação dos espumantes em três grupos, formados por: Grupo 1 – 0, 7 e 15 dias; Grupo 2 – 60, 90, 135 e 180 dias e Grupo 3 – 270 e 360 dias.





**Figura 4-** Análise dos componentes principais com base nos compostos voláteis ao longo dos 360 dias de acompanhamento de vinhos espumantes.

O Grupo 1 formado pelo vinho base e os espumantes durante os primeiros 15 dias de tomada de espuma separou-se claramente através do componente principal 2 e caracterizou-se por maior conteúdo de metanol (média=  $49,42 \pm 0,31$  mg/L), 2-metil-1-propanol (média=  $17,72 \pm 1,12$  mg/L), butirato de etila (média=  $0,33 \pm 0,02$  mg/L), acetato de isoamila (média=  $2,45 \pm 0,22$  mg/L), hexanoato de etila (média=  $0,99 \pm 0,09$  mg/L), acetato de hexila (média=  $0,19 \pm 0,02$  mg/L) e acetato de feniletila (média=  $0,16 \pm 0,00$  mg/L) e menores concentrações de hexanol (média=  $0,97 \pm 0,02$  mg/L), ácido isobutírico (média=  $1,12 \pm 0,10$  mg/L), ácido isovalérico (média=  $0,87 \pm 0,08$  mg/L), dietil succinato (média=  $0,38 \pm 0,02$  mg/L), quando comparado com os outros dois

grupos. Estes resultados confirmam a perda gradativa de ésteres, particularmente acetatos, durante o período de maturação de espumantes (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Já os Grupos 2 e 3, representados pelos períodos de 60 a 180 dias e 270 e 360 dias, respectivamente, apresentaram clara separação pelo componente 1. Os compostos que determinaram a separação dos Grupos 2 e 3 foram principalmente: 1-propanol (médias de 69,76 e 62,83 mg/L); 2-metil-1-butanol (médias de 15,28 e 11,96 mg/L); 3-metil-1-butanol (médias de 147,18 e 111,2 mg/L); octanoato de etila (médias de 1,36 e 0,86 mg/L); dietil succinato (médias de 1,14 e 3,08 mg/L); dodecanoato de etila (médias de 0,01 e 0,14 mg/L); feniletanol (médias de 12,23 e 13,77 mg/L); ácido decanóico (médias de 1,74 e 0,85 mg/L) e ácido dodecanóico (médias de 0,31 e 0,16 mg/L).

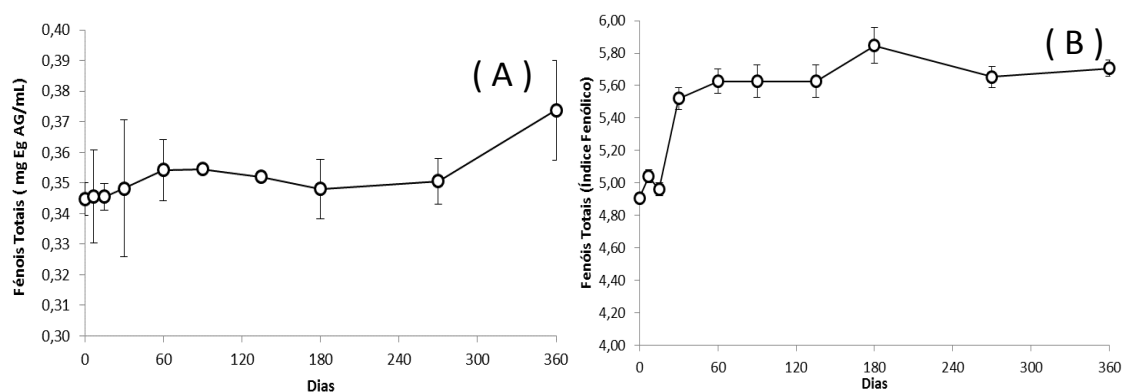
Em conjunto, os resultados indicam que diferenças na composição de constituintes voláteis ocorrem fundamentalmente durante a segunda fermentação e após 9 meses de envelhecimento, tempo mínimo necessário para a obtenção de espumantes “maduros”.

#### *4.1.3- Concentração de compostos fenólicos.*

Além dos componentes voláteis, os compostos fenólicos são de grande importância nas características organolépticas dos vinhos e espumantes devido aos seus papéis direto ou indireto na cor, adstringência, entre outros fatores. Além disso, dependendo da sua natureza, podem ter interesse nutricional e farmacológico (Flanzy, 2000). As técnicas de vinificação desempenham um papel importante nos níveis de compostos fenólicos, bem como a técnica de elaboração de espumantes (Stefenon et al., 2009).

Os teores de compostos fenólicos totais obtidos nos vinhos espumantes durante os 360 dias de acompanhamento nos dois métodos testados estão apresentados na

Figura 5. Como pode ser observado em ambos os métodos houve um aumento em sua concentração quando comparados o tempo inicial (tempo 0) e final (tempo 360), mas esse incremento não foi expressivo. Esse pequeno aumento também foi observado por Serra-Cayuela et al. (2013) ao analisar os fenóis totais em garrafas durante o envelhecimento com a presença de leveduras durante 21 meses, apresentando inicialmente teores médios de 0,159 mg EqAG/mL e após transcorrido o tempo apresentou 0,164 mg EqAG/mL. Os valores apresentados na Figura 5A são superiores ao encontrado por Serra-Cayuela et al. (2013) e esta diferença deve estar relacionada com as variedades utilizadas, a safra da uva e os processos de vinificação e tratamentos pós-fermentativos utilizados na produção do vinho base já que os teores observados no vinho base são semelhantes aos encontrados nos vinhos espumantes.



**Figura 5.** Concentração de fenóis totais durante 360 dias de acompanhamento em vinhos espumantes. (A) fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu; (B) fenóis totais pelo Índice Fenólico. Os valores são resultado da média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos.

Por outro lado, o estudo realizado por Chircu Brad et al. (2012) confirma que o *blende* das variedades Chardonnay, Pinot Noir e Royal Maiden safra 2010 apresentaram valores aproximados ao vinho espumante elaborado com o mesmo *blende* como vinho base (0,445 mg EqAG/mL e 0,462 mg EqAG/mL) respectivamente, valores são um pouco superiores aos encontrados por esse estudo. Não foram encontrados estudos que utilizassem o método de determinação do Índice de Compostos Fenólicos.

Segundo Ibérn-Gómez et al. (2000) o aumento dos teores de compostos fenólicos pode estar relacionado ao processo de autólise da levedura. Durante o envelhecimento e armazenamento são observadas alterações significativas como a oxidação de compostos fenólicos. Nesta oxidação ocorre o escurecimento que resulta na formação de pigmentos castanhos de elevada massa molecular.

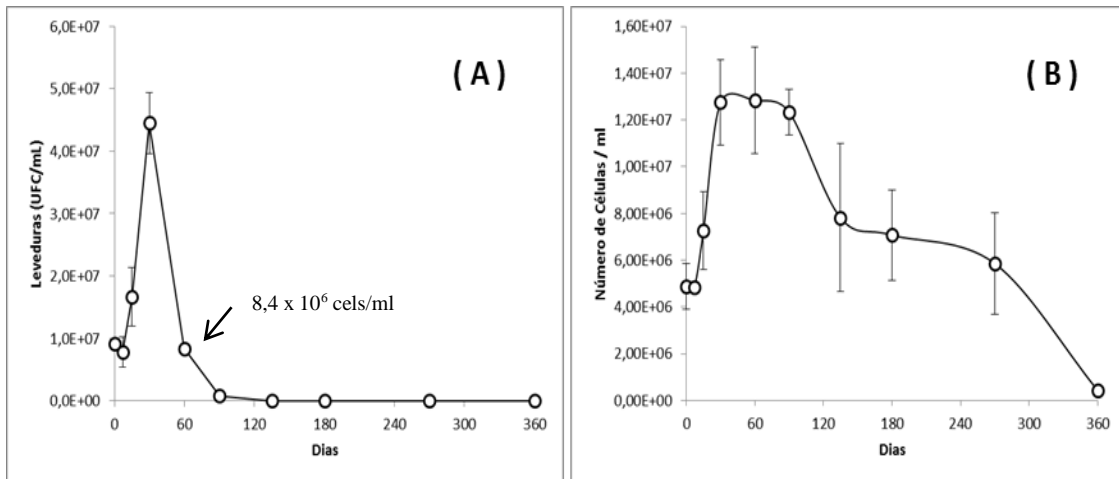
## **4.2 População de leveduras, liberação de proteínas/peptídeos e expressão de genes relacionados com autofagia durante a segunda fermentação e maturação de espumante**

### *4.2.1. Dinâmica da população de leveduras e liberação de proteínas/peptídeos.*

A segunda fermentação de espumantes apresenta uma série de características que tem exigido a seleção de cepas específicas de leveduras (*S. cerevisiae*) capazes de sobreviver e fermentar em condições de estresse (elevado conteúdo de etanol, pH baixo, limitação de nitrogênio e outros nutrientes, aumento progressivo de pressão, entre outras) (Torresi et al., 2011). Porém, mesmo cepas selecionadas tem a sua viabilidade reduzida e sofrem processo autolítico ao longo da segunda fermentação e principalmente, durante o período dito de maturação ou envelhecimento de espumantes (Ribereau-Gayon et al., 2006). A autólise de leveduras está associada a um processo autofágico que, através do reciclo inicial e posterior degradação de componentes

celulares essenciais, leva à lise celular (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). O processo autofágico/autolítico é considerado de grande importância na produção de espumantes, pois os constituintes celulares liberados contribuem de forma positiva para as características organolépticas do produto final (Nunez et al., 2005; Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006; Ribereau-Gayon et al., 2006).

No presente estudo foram utilizadas as leveduras presentes no vinho espumante, que foram quantificadas por plaqueamento (UFC/mL) e contagem microscópica (n° células/mL). Conforme pode ser apreciado na Figura 6A, as células de leveduras foram adicionadas ao vinho base na população de  $9,0 \times 10^6$  UFC/mL, passando por uma fase lag de 7 dias a partir da qual ocorreu uma fase de crescimento mais intenso atingindo o máximo de  $4,5 \times 10^7$  UFC/mL aos 30 dias. Na sequência, observou-se um rápido decréscimo do número de UFC (81,4% aos 60 dias e 99% aos 90 dias). A curva de crescimento (Figura 6A) coincide com as curvas de açúcares totais e etanol (Figura 3 A e D), porém o número de UFC/mL decresce rapidamente antes mesmo do esgotamento do açúcar, indicando que o término da fermentação ocorre por ação de uma pequena quantidade de leveduras viáveis remanescentes.



**Figura 6-** Dinâmica da população de leveduras durante a segunda fermentação e maturação/envelhecimento de espumantes. (A) Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml) e (B) quantificação microscópica de leveduras.

Quando avaliada a população através de contagem microscópica observou-se fase lag de 7 dias e rápido crescimento até os 30 dias (Figura 6B), corroborando os dados obtidos pela contagem de UFC/ml (Figura 6A). Fase exponencial de aumento populacional até aproximadamente 30 dias na segunda fermentação de espumantes tem sido constatada em trabalhos prévios (Penacho et al., 2012). O número de células manteve-se constante até os 90 dias apesar do decréscimo evidenciado no número de UFC/mL, indicando que neste período ocorre importante redução da viabilidade celular. Amostras retiradas após a fermentação (135 a 360 dias) exibiram diminuição do número de células evidenciáveis microscopicamente, o que em princípio indica lise celular.

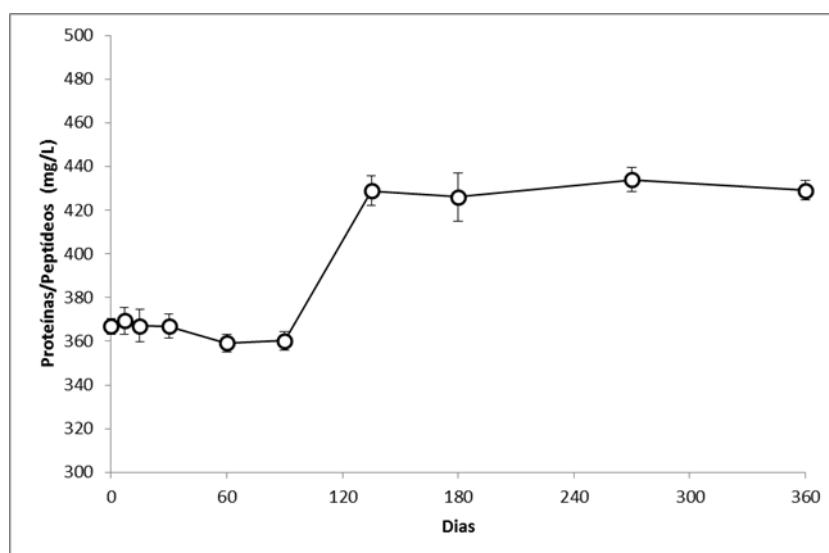
O processo de autólise ocorre durante a produção de vinhos espumantes normalmente pelo método tradicional. No entanto, segundo diversos autores clássicos (Ribereau-Gayon et al., 2006), é um processo lento e somente tem início quando os açúcares e outros nutrientes são consumidos. Devido a isso, as células de leveduras esgotam suas reservas internas de energia, uma vez que estas já estão esgotadas, a

degeneração das células e o processo de autólise iniciam (Torresi et al., 2011). Muitos estudos realizados em vinhos espumantes têm focado a análise de compostos liberados pelas leveduras durante o processo de hidrólise. Entre eles, os peptídeos e aminoácidos livres têm sido considerados os melhores marcadores de atividade proteolítica em leveduras (Martínez-Rodríguez et al. 2002).

As proteínas e as manoproteínas estão presentes em pequenas quantidades no vinho, mas contribuem para a sua qualidade, pois elas são parcialmente responsáveis pela sensação de “corpo” e podem ligar-se com os compostos voláteis retendo o aroma em vinhos. Em vinhos espumantes as proteínas e manoproteínas tem efeito sobre a estabilidade e qualidade da espuma (Luguera et al., 1998; Moreno-Arribas et al., 2002, Moreno-Arribas et al., 2000).

Visando acompanhar o sistema autolítico, foi avaliada a quantidade de proteínas/peptídeos acumulados no espumante ao longo do processo fermentativo e maturação/envelhecimento através do método de Bradford. Conforme pode ser observado na Figura 7, o vinho base apresentou uma concentração inicial de proteína/peptídeos da ordem de 360 mg/L, a qual pode ser considerada normal para vinhos não clarificados com bentonite (Vicenzi et al., 2005). Durante a fermentação houve uma pequena redução da quantidade de proteínas no vinho, geralmente atribuída à atividade proteolítica, mesmo que reduzida, da levedura no período. Porém, um aumento importante da concentração de proteínas/peptídeos foi detectada entre os 90 e 135 dias, mantendo-se praticamente constante após este período (Figura 7). O aumento da quantidade de proteínas/peptídeos no vinho corresponde ao período de redução do número de leveduras (Figura 5B), indicando que o mesmo deve estar relacionado com a autofagia/autólise do microrganismo. A relação direta entre autólise e liberação de

peptídeos/aminoácidos em vinhos tem sido contatada por diversos autores, como García Martín et al. (2013).



**Figura 7-** Teor de proteínas/peptídeos durante 360 dias de acompanhamento em vinhos espumantes.

Durante o envelhecimento do vinho espumante sobre as borras, Martínez-Rodríguez et al. (2002) evidenciou que a estirpe da levedura utilizada na refermentação influencia no teor de aminoácidos livres e peptídeos. Também foram detectadas três etapas no envelhecimento de vinhos com leveduras: na primeira, os aminoácidos e as proteínas diminuem e os peptídeos são liberados, na segunda fase, há uma liberação de compostos nitrogenados utilizados como nutrientes para as células viáveis e nesta fase podem existir células mortas. Nesta fase também é detectada uma atividade de protease intracelular e as proteínas são degradadas em peptídeos que são hidrolisados em aminoácidos. Na terceira fase, não estão presentes células viáveis e as proteínas e peptídeos são liberados devido a atividade enzimática ainda presente.

Segundo Zhao & Fleet (2003), a autólise das células de leveduras ocorre depois de terem finalizado seu ciclo de vida e entrarem na fase de morte, sendo caracterizada



pelo aumento de permeabilidade da parede celular, alteração da porosidade de membrana, hidrólise enzimática de macromoléculas e, conseqüentemente extravasamento dos produtos da degradação para o meio exógeno.

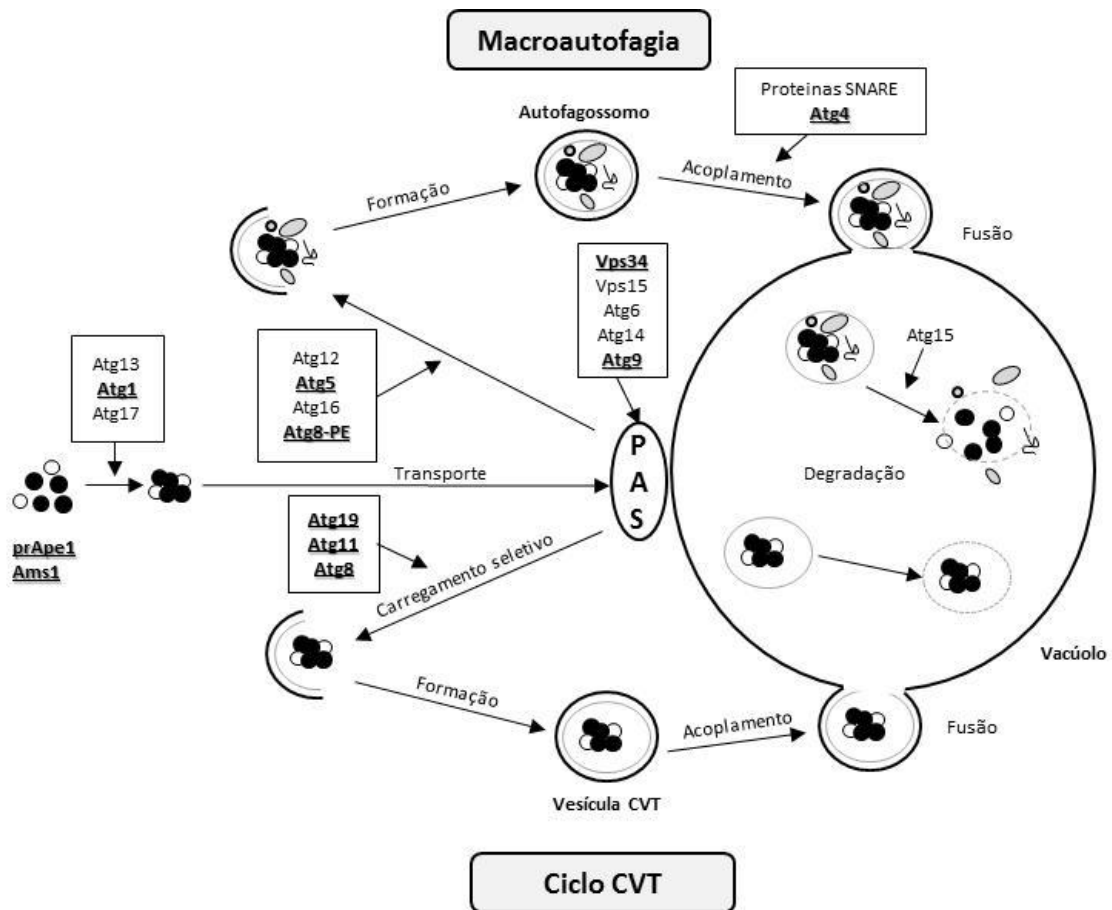
#### *4.2.2. Expressão de genes envolvidos no processo autofágico.*

As leveduras que participam na segunda fermentação da elaboração de espumantes contribuem com as propriedades organolépticas do produto final de duas maneiras ao longo do processo. Inicialmente, as leveduras contribuem através da transformação do açúcar em etanol e gás carbônico (tomada de espuma), assim como na produção de diversos metabólitos oriundos da fermentação e biotransformação de precursores ainda presentes no vinho base. Após a segunda fermentação, durante a maturação ou envelhecimento sobre as borras (*sur lie*), as células de levedura liberam manoproteínas e outras moléculas, incluindo precursores aromáticos, através da sua autofagia/autólise. Muitos destes compostos contribuem positivamente para o aroma, paladar e característica da espuma (Charpentier & Feuillat, 1993; Martinez-Rodriguez et al., 2001; Alexandre & Guilloux, 2006), o que torna importante a maturação ou envelhecimento de espumantes, seja no sistema tradicional (champenoise) ou no sistema Charmat, por períodos que variam de 9 meses a mais de um ano (Cebollero & Gonzalez, 2006).

A autofagia é um processo complexo de passos múltiplos, que envolve um amplo conjunto de genes (>20 genes *ATG*) que mediam passos chaves da indução autofágica à fusão vesicular e degradação de autofagossomos (Nakatogawa et al., 2009). Os níveis de autofagia são limitados em condições que satisfazem os requerimentos nutricionais da célula, mas podem ser induzidos frente a distintos estímulos como estresse de nitrogênio, de carbono, desidratação, entre outros (Takeshige et al., 1992;

Singh et al., 2005; Nakatogawa et al., 2009), encontrados individualmente ou em conjunto durante a segunda fermentação de espumantes.

Neste contexto, visando avaliar a autofagia durante a segunda fermentação de espumantes foi analisada, através de qRT-PCR, a expressão relativa de um conjunto de 10 genes chave do processo de micro e macroautofagia (Figura 8). Para tanto, foram escolhidos quatro momentos durante a fermentação de acordo com os resultados das análises básicas (Figura 3) e número de leveduras (Figura 6), quais sejam, período lag (7 dias), meio da fermentação (30 dias), final da fermentação (60 dias) e início do envelhecimento (90 dias).



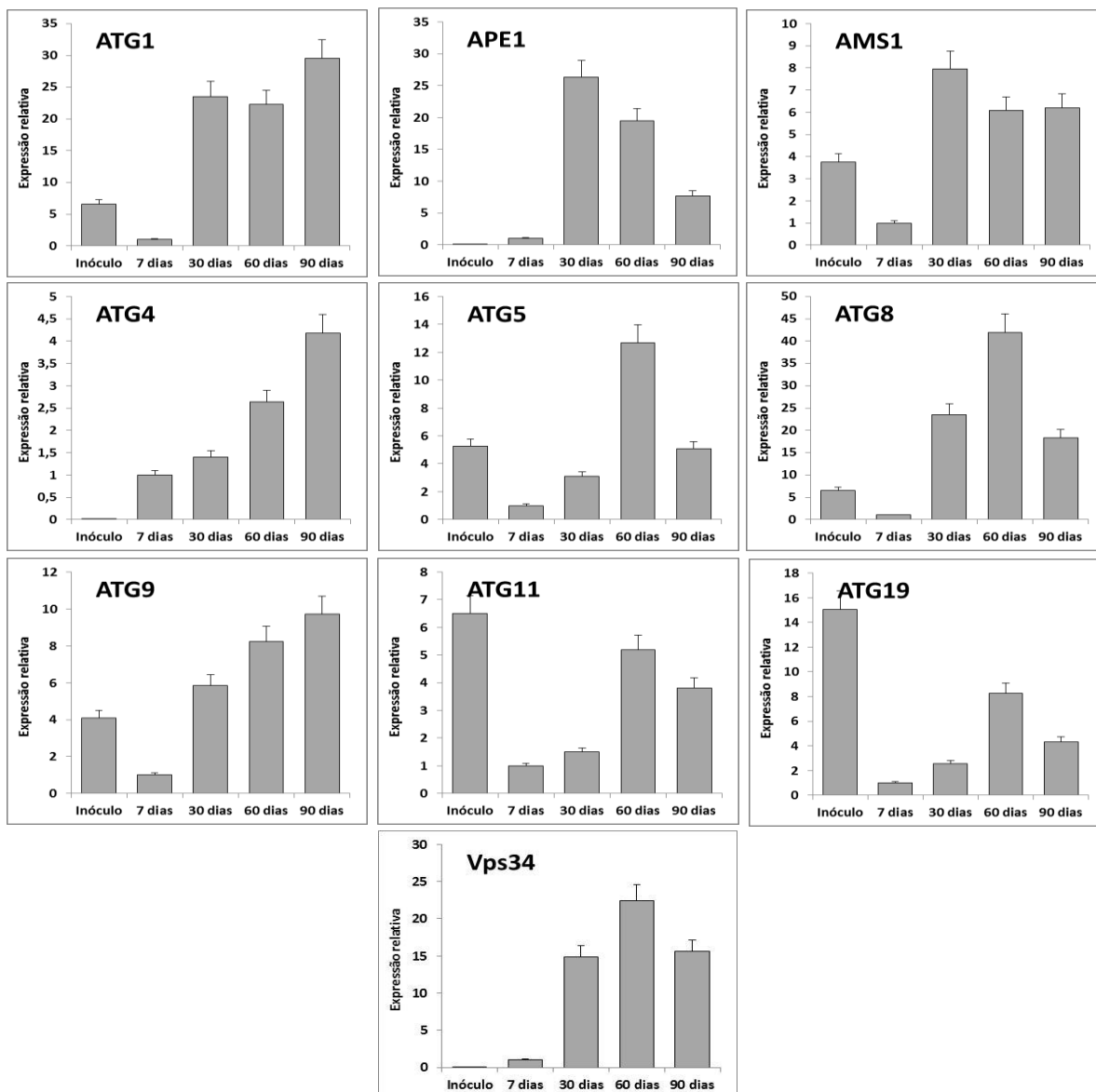
**Figura 8**– Passos básicos dos processos de micro (CVT) e macroautofagia em *S. cerevisiae*. As proteínas correspondentes aos genes avaliados encontram-se destacadas (adaptado de Song & Kumar, 2012).

Os resultados de expressão relativa, utilizando como referência o início da fermentação (7 dia) são apresentados na Figura 9. A escolha do tempo 7 como controle está associada ao fato de que no intervalo de 0 a 7 dias as leveduras adaptaram-se ao estresse imposto pela elevada concentração de etanol (10°GL) e apenas iniciaram o crescimento populacional, não sofrendo ainda os efeitos de estresse fermentativo e de limitação na disponibilidade de nutrientes. Por outro lado, as amostras de “Tempo 0” correspondem a levedura seca comercial reidratada ainda com efeito do estresse imposto pelas condições de desidratação e reidratação, que de acordo com estudo

realizado por Singh et al. (2005) estimulam a transcrição de genes relacionados com a autofagia. Neste sentido, os resultados apresentados na Figura 9, mostram que 7 dos 10 genes avaliados apresentam expressão aumentada nas leveduras reidratadas (inóculo) em relação com as leveduras da fase lag (7 dias), corroborando os dados de Singh et al. (2005).

Conforme pode ser observado na Figura 9, o gene *ATG1* apresentou importante aumento de expressão aos 30 dias e 60 dias e novo aumento aos 90 dias. O gene *ATG1* codifica uma Ser/Thr quinase (Atg1 quinase) que junto com os Atg13 e Atg17 forma um complexo Atg1-Atg13-Atg17 (Figura 8) que atua no passo inicial da formação de autofagossomos através do direcionamento de outras proteínas importantes para a formação do complexo PAS. O complexo Atg1-Atg13-Atg17 é induzido pelo inibidor de Ser/Thr proteína quinases Torc1 (Target Of Rapamycin) que responde direta ou indiretamente a diversas condições de estresse nutricional, como a deficiência de nitrogênio (Nakatogawa et al., 2009).

O complexo Atg1-Atg13-Atg17 atua tanto no ciclo Cvt, dita microautofagia ou autofagia seletiva, como na macroautofagia (Huang & Klionsky, 2002; Mizushima, 2007). O aumento da expressão de *ATG1* aos 30 dias é acompanhado pelo aumento da expressão de *APE1* e *AMS1* (Figura 9), genes que codificam o precursor da aminopeptidase 1 e da alfa manosidase 1, ambas transferidas para os vacúolos através do sistema PAS e responsáveis pela degradação de proteínas e oligossacarídeos, respectivamente (Thumm, 2002).



**Figura 9**– Expressão de genes associados ao processo autofágico de *S. cerevisiae* durante a segunda fermentação de espumantes. Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) utilizando 7 dias como padrão ou controle.

O aumento de expressão de *ATG1*, *APE1* e *AMS1* aos 30 dias indica que apesar da presença de açúcar (Figura 3) e do elevado número de leveduras viáveis (Figura 6), as leveduras já começam a induzir um processo autofágico, possivelmente decorrente de efeitos de estresse impostos pela limitação na disponibilidade de nitrogênio assimilável,

entre outros. De maneira semelhante, os genes *ATG4*, *ATG5*, *ATG8*, *ATG9*, *ATG11*, *ATG19* e *VPS34* exibem aumento de expressão a partir dos 30 dias atingindo o máximo sobre o final da fermentação ou no início do envelhecimento (90 dias) quando o número de células viáveis já apresenta importante redução (Figura 6) e a disponibilidade de nutrientes diminui e outros efeitos de estresse aumentam.

O gene *ATG8* codifica uma proteína semelhante a ubiquitina envolvida na formação vesicular na microautofagia e formação de autofagossomos na macroautofagia, e o gene *ATG5* codifica uma enzima de conjugação implicada na formação dos autofagossomos. O processo de formação e expansão dos autofagossomos (macroautofagia) requer dois sistemas semelhantes a ubiquitina, o complexo Atg12-Atg5-Atg16 e Atg8-PE (fosfatidiletanolamina), ambos ativados por Atg7 (Song & Kumar, 2012). Atg4 remove a arginina carboxi-terminal (Arg117) de Atg8 para a sua maturação, além de participar na clivagem da ligação Atg8 e PE após o acoplamento nas vesículas (Huang & Klionsky, 2002; Chem & Klionsky, 2011).

As proteínas codificadas pelos genes *ATG9* (proteína integral de membrana) e *VPS34* (fosfatidilinositol-3 quinase) estão envolvidas na formação do complexo PAS. De acordo com o modelo proposto por Kovacs et al. (2007), a proteína Atg9 participa no transporte de lipídios para a síntese “do novo” de membranas (fagóforo) que compõem o autofagossomo. Enquanto a fosfatidilinositol-3 quinase tem papel essencial na nucleação vesicular durante a autofagia (Chem & Klionsky, 2011). A Atg9 é carregada por Atg11 para o complexo PAS, sendo necessário para tanto o citoesqueleto de actina (Nagakawa et al., 2009).

Atg19 atua como receptor de Ape1 e de Ams1 no citosol para formação do complexo Cvt que na sequência se associa com as membranas vesiculares para finalmente ser transferido ao sistema vacuolar (Baxter et al., 2005).

Como um todo, os dados obtidos corroboram com os resultados de Cebollero et al. (2005) e Cebollero & Gonzalez (2006) que através do uso de mutantes em genes chave do sistema autofágico, análises de microscopia eletrônica e identificação de vacúolos, e uso do marcador Ald9, mostraram que o processo autofágico das leveduras durante a segunda fermentação de espumantes inicia-se mesmo antes do esgotamento do açúcar. Da mesma forma, utilizando microarray e qRT-PCR do gene *ATG8*, Penacho et al. (2012) evidenciaram aumento da expressão de alguns genes do sistema autofágico com hiperexpressão de *ATG8* (~28x) já no meio da segunda fermentação. Comparando as respostas com aquelas obtidas em experimentos de primeira fermentação vínica (Alexandre et al., 2001; Tai et al., 2007), propuseram que a indução precoce da autofagia está principalmente associada ao efeito estressante produzido pela elevada concentração de etanol e baixa temperatura características da segunda fermentação de espumantes.

A expressão de vários genes relacionados com a autofagia evidenciada no presente trabalho (Figura 9) indicam que tanto a micro quanto a macroautofagia são induzidas ainda na fase fermentativa com aumento da macroautofagia sobre o final da segunda fermentação (Figura 3) acompanhando a redução de viabilidade (Figura 6), iniciando-se a partir do terceiro mês um rápido processo de autólise que se estabiliza entre o quarto e quinto mês (Figura 6B e 7).

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais obtidos no presente trabalho é possível concluir que :

- 1- A segunda fermentação de espumantes apresenta uma fase inicial de adaptação de 7 dias seguida por importante incremento do teor alcoólico até os 30 dias. Durante a fermentação e maturação ocorre redução da acidez total e aumento da acidez volátil que se refletem em aumento do pH no produto final, atingindo pH de 3,36 aos 360 dias.
- 2- Variação significativa na concentração de distintos compostos aromáticos foi observada ao longo da segunda fermentação e maturação de espumantes, com exceção dos compostos voláteis 2-metil-1-butanol, hexanol, cis-3-hexen-1-ol, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico e 2-fenil-etanol. De um modo geral, observou-se redução de ésteres ao longo da maturação, especialmente a partir dos 90 dias, o que deve se refletir em perda de frescor e aromas frutais/florais.
- 3- Análise multivariada com base na concentração de compostos aromáticos mostra que o espumante apresenta mudanças importantes durante a fermentação e após os 270 dias, estas últimas caracterizadas por redução no conteúdo de 1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, octanoato de etila, ácido decanóico e ácido dodecanóico, e aumento de dietil succinato, dodecanoato de etila e feniletanol.
- 4- O dietil succinato aumenta de forma linear durante a segunda fermentação e maturação (até 360 dias) e pode ser um importante marcador para avaliação de tempo de maturação em espumantes.



- 5- De um modo geral, o conteúdo de compostos fenólicos totais no espumante aumenta durante a segunda fermentação e maturação/envelhecimento, podendo acarretar alteração indesejável da cor.
- 6- A população de leveduras (UFC/ml) exhibe importante aumento durante o período fermentativo com redução abrupta (~80%) nos 30 dias seguintes. Por outro lado, o número de células se mantém constante dos 30 aos 90 dias, com redução posterior indicativa de autólise. A redução no número de células integras é acompanhada por aumento na concentração de proteínas/peptídeos no vinho.
- 7- A avaliação da expressão de um conjunto de genes relacionados com a autofagia indica que tanto a micro quanto a macroautofagia são induzidas ainda na fase fermentativa com aumento da macroautofagia sobre o final da segunda fermentação, acompanhando a redução de viabilidade.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Chassagne, D., Charpentier, C. and Feuillat, M. (2003) Les peptides du vin: origine et impact. In: Lonvaud-Funel, A., de Revel, G., Darriet, P. OEnologie 2003. Tec & Doc. Lavoisier Ed., Paris, pp. 512–514.
- Alexandre, H., Heintz, D., Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M, Charpentier, C. and Feuillat, M. (2001) Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. **J. Ind. Microbiol. Biot.** **26:** 235–240.
- Alexandre, H. & Guilloux-Benatier M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wines – a review. **Aust. J. Grape Wine R.** **12:** 119-127
- Azevedo, A.; Velloso, G. (2006). Chandon: a crença no espumante brasileiro de qualidade. **Wine Style** **6:** 7-11.
- Babayán, T.L., Bezrukov, M.G., Latov, V., Belikov, V.M., Belatseva, E.M. and Titova, E.F. (1981) Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. Morphological effects, rheological effects and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. **Curr. Microbiol** **5:** 163–168.
- Barcenilla, J.M.; Martín-Álvarez P.J.; Vian A.; Gonzalez R. (2003). Characterization of Yeast Strains on the Basis of Autolytic Activity and Volatile Compounds. **Food Sci. Techn. Int.** **9:** 95-99.
- Barnett JA. (1998). A history of research on yeasts: work by chemists and biologists, 1789-1850. **Yeast** **14:** 1439-1451.

- Baxter, B.K., Abeliovich, H., Zhang, X., Stirling, A.G., Burlingame, A.L., Goldfarb, D.S. J. (2005) Atg19p ubiquitination and the cytoplasm to vacuole trafficking pathway in yeast. **Biol. Chem.** **280**: 39067-39076.
- Bertrand, A.. (1981). Formation des substances volatiles au tours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualite des vins. Colloque . **Soc. Fr. Microbiol.. Reims**, 251-267
- Bertuccioli, M. & Ferrari, S. (1999). Laboratory experience on the influence of yeast in mouthfeel. **Proceedings, Les entretiens scientifiques de Lallemand**. Montreal, Canada.
- Bosch-Fusté, J., Riu-Aumatell, M., Gadayol, J.M., Caixach, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2007) Volatile profiles of sparkling wine obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. **Food Chem.** **105**: 428-435.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**: 248–254.
- BRASIL. Presidência da Republica. Instrução Normativa nº 24, de 8 de setembro de 2005. Dispõe sobre Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <  
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> . Acesso em: 20 maio 2013.
- BRASIL. Presidência da Republica. Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Receita Federal. Disponível em:

<<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/Leis/2004/lei10970.htm>> . Acesso em: 08 maio 2011.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 99.066, de 08 de março de 1990. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 10 de maio de 2013.

Cebollero, E., A. V. Carrascosa, R. Gonzalez. 2005. Evidence for yeast autophagy during simulation for sparkling wine aging: a reappraisal of the mechanism of yeast autolysis in wine. **Biotechnol. Progr.** **21**:614–616.

Cebollero, E. & Gonzalez, R. 2006. Induction of autophagy by second-fermentation during elaboration of sparkling wines. **Appl. Environ. Microbiol.** **72**: 4121-4127.

Charpentier, C. Aussenac, J., Charpentier, M. Prome, J.C., Duteurtre, B., Feuillat, M. (2005) Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. **J. Agr. Food Chem.** **53**: 3000-3007.

Chen, Y., Klionsky, D.J. 2011. The regulation of autophagy – unanswered questions. **J. Cell Sci.** **124**: 161-170.

Chircu Brad, C., Muste, S., Mudura, E. Bobis, O. (2012). The Content of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of Three Monovarietal Wines and their Blending, used Sparkling Wine Production. **Bull. UASVM** **69**: 1843-5386.

Crouzet, J. (2000). Compostos Voláteis. In: Meneguzzo, J. (2010). Caracterização Físico-Química e Sensorial dos Vinhos Espumantes da Serra Gaúcha. Tese de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 89 p.

- Ehsani, M. (2009). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced ethanol yield: control of acetoin formation in glycerol overproducing wine yeast strains. **Doctoral Thesis**. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier. Montpellier, France.
- Feuillat, M. & Charpentier, C. (1982) Autolysis of yeast in Champagne. **Am. J. Enol. Vitic. 33**: 6-13.
- Flanzy, C. **Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos**. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 2000.
- Gallart, M. Lopez-Tamames, E., Suberbiola, G. and Buxaderas, S. (2002). Influence of fatty acids on wine foaming. **J. Agricult. Food Chem. 50**: 7042-7045.
- García Martín, J.F., Guillemet, L., Feng, C., Sun, D.W. (2013) Cell viability and proteins release during ultrasound-assisted yeast lysis of light lees in model wine. **Food Chem. 141**: 934-939.
- Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A. Lorenzo, C., Lara, J. F., Pardo, F. Salinas, M. R. (2011). Implications of nitrogen compounds during alcoholic fermentation from some grape varieties at different maturation stages and cultivation systems. **Food Chem. 124**: 106-116.
- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, Ancín-Azpilicueta, C. (2010) Influence of nutrients addition to -nonlimited-in-nitrogen must on wine volatile composition. **J. Food Sci. 75**: 206-211.
- Huang, W.P. & Klionsky, D.J. (2002) Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. **Cell Struct. Funct. 27**: 309-420.
- Johnson, H. **A História do Vinho**. Ed. Companhia das Letras, São Paulo, 1999.
- Kiel, J.A.K.W. (2010). Autophagy in unicellular eukaryotes. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 365**: 819-830.

- Klionsky D.J. (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **J. Cell Sci.** **118**: 7-18
- Kovács A.L., Palfia Z., Rez G., Vellai T., Kovács J. (2007). Sequestration revisited: integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. **Autophagy** **3**: 655-662.
- Kundu, M. & Thompson, C.B. (2005). Macroautophagy *versus* mitochondrial autophagy: a question of fate? **Cell Death Differ.** **12**: 1484–1489.
- Kurtzman C.P., Fell J. W. (1998b). Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th ed. Kurtzman CP, Fell JW (ed). Elsevier Science: Amsterdam; 3-5.
- Ibérn-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., Singleton, V.L., Torre-Boronat, A.C. (2000). Browning of Cava (sparkling Wine) during aging in contato with lees due to the phenolic composition. **Am. J. Enol. Vitic.** **51**: 29-36.
- Ichimura Y., Kirisako, T., Takaos, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., Ohsumi, Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** **408**: 488–492
- La Torre, G. L., Saitta, M., Vilasi, F., Pellicanò T., Dugo, G. (2006). Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. **Food Chem.** **94**: 640-650.
- Lambrechts, M.G.& Pretorius, I.S. Yeast its Importance to Wine Aroma – A Review (2000). **S. Afr. J. Enol. Vitic.** **21**: 97-129.
- Lepe, J.A.S.; Leal, I.B. (2004) **Microbiología enológica: Fundamentos de vinificación**. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 761 p.

- Leroy, M.J., Charpentier, M., Duteurtre, B., Feuillat, M. And Charpentier, C. (1990) Yeast autolysis during Champagne aging. **Am. J. Enol. Vitic. 41:** 21–28.
- Louw, L, Tredoux, A.G.J., Van Rensburg, P., Kidd, M., Naes, T. Nieuweoudt, H.H. (2010) Fermentation-derived Aroma Compounds in Varietal Young Wines. **S. Afr. J. Enol. Vitic. 31:** 213-225.
- Luguera, C., Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Batolomé, B., Polo, M.C. (1998). Fractionation and partial characterization of protein fraction present at different stages of the production of sparkling wines. **Food Chem. 68:** 465-471.
- Massey, A., Kiffin, R. and Cuervo, A. M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. **Int. J. Biochem. Cell Biol. 36:** 2420-2434.
- Martinez-Rodriguez, A.J., Carrascosa, A.V., Polo, M.C. (2001) Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. **Int. J. Food Microbiol. 68:** 155-160.
- Martínez-Rodríguez, A. J., Carrascosa, A. V., Martín-Àlvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (2002). Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. **J. Ind. Microbiol. Biot., 29,** 314–322.
- Meneguzzo, J. (2010). Caracterização Físico-Química e Sensorial dos Vinhos Espumantes da Serra Gaúcha. Tese de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 89 p.
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. **Genes Dev. 21:** 2861-2873
- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F.J., Martín-Alvarez, P.J. e Polo, M.C. (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. **Food Chem. 70:** 309-317.

- Moreno-Arribas, M.V., Pueyo, E., Polo, M.C. (2002). Analytical methods for the characterizations of proteins and peptides in wines. **Anal. Chim. Acta** **458**: 63-75.
- Nakatogawa, H.; Suzuki, K.; Kamada, Y.; Ohsumi, Y. (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** **10**: 458-467.
- Nardi, T., Remize, F., Alexandre, H. 2010. Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress gene expression. **Appl. Microbiol. Biot.** **88**: 925-937.
- Nelson, D. L. & Cox, M.M. **Lehninger Princípio de Bioquímica**. Ed. Worth Publishers, Inc. Terceira Edição, 2002.
- Neto, J. M .M. & Moita, G. C. (1998). Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Quím. Nova** **21**: 4.
- Noda T.; Ohsumi, Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. **J. Biol Chem.** **273**: 3963-3966.
- Nunez, Y.P., Carrascosa, A.V., Gonzalez, R., Polo, M.C. and Martinez- Rodriguez, A.J. (2005) Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. **J. Agr. Food Chem.** **53**: 7232–7237.
- Ohsumi, Y. (2001). Dissecção molecular da autofagia: dois sistemas de ubiquitina-like. **Nat. Rev. Mol. Biol. Celular** **2**: 211-216.
- Palacios, A. et al. (2007) Diferencias en el grado alcohólico según la cepa empleada. **Revista Internet de Viticultura y Enología** **7/3**: 1-3.
- Penacho, V., Valero, E., Gonzalez, R. (2012) Transcription profiling of sparkling wine second fermentation. **Int. J. Food Microbiol.** **153**: 176-182.



- Polo, M.C., Gonzalez de Llano, M.D. and Ramos, M. (1992). Derivatizations and liquid chromatographic separation of peptides. In: **Food Analysis by HPLC**. Ed. M.L. Nollet, (Dekker: New York), 117-140.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast** 16: 675-729.
- Querol, A.; Fernández-Espinar, M. T.; Olmo, M.; Barrio, E. (2003) Adaptive evolution of wine yeast. **Int. J. Food Microbiol.** 86: 3-10.
- Regodón Mateos, J.A., Pérez-Nevado, F., Ramírez Fernández, M. (2006) Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. **Enz. Microb. Tech.** 40: 151-157.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. **Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications**. John Wiley & Sons: 2nd Edition, England, 2006.
- Riu-Aumatell, M.; Bosch-Fuste, J.; Lopez-Tamames, E.; Buxaderas, S. (2006) Development of volatile compounds of cava (spanish sparkling wine) during long aging time in contact with lees. **Food Chem.** 95: 237–242.
- Rizzon, L.; Meneguzzo, J.; Abarzua, C. E. (2000) Elaboração de vinho espumante na propriedade vitícola. **Embrapa Uva e Vinho**: Bento Gonçalves, Documentos 29, 24 p.
- Saberi, S., Cliff, M.A., van Vuuren, H.J.J. (2012). Impact of mixed *S. cerevisiae* strain on the production of volatiles and estimated sensory profiles of Chardonnay wines. **Food Res. Int.** 48: 725-735.
- Serra-Cayuela, A., Aguilera-Curiel, M.A., Riu-Aumatell, M., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2013). Browning during biological aging and commercial storage of Cava sparkling wine and the use of 5-HMF as a quality marker. **Food Res. Int.** 53: 226-231.

- Shintani, T., Huang, W.-P., Stromhaug, P. E., and Klionsky, D. J. (2002). Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. **Ann. Rev. Cell Develop. Biol.** **3**: 825–837.
- Singh, J., Kumar, D., Ramakrishnan, N., Singhal, V., Jervis, J., Garst, J.F., Slaughter, S.M., DeSantis, A.M., Potts, M., Helm, R.F. (2005) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. **Appl. Environ. Microbiol.** **71**: 8752-8763.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. **Am. J. Enol. Vitic.** **16**: 144.
- Stefenon, C.A.; Colombo, M.; Bonesi, C de M.; Marzarotto, V.; Vanderlinde, R.; Salvador, M.; Henriques, J.A.P. (2009). Red Antioxidant activity of sparkling wines produced by Champenoise and Charmat methods. **Food Chem.** **119**: 12-18
- Song, Q. & Kumar, A. (2012). An Overview of Autophagy and Yeast Pseudohyphal Growth: Integration of Signaling Pathways during Nitrogen Stress. **Cells** **1**: 263-283.
- Tai, S.L, Daran-Lapujade, P., Walsh, M.C., Pronk, J.T., Daran, J.M. (2007) Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature: a chemostat-based transcriptome analysis. **Biol. Cell** **18**: 5100-5112.
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., Ohsumo, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J. Cell Biol.** **119**: 301-311.
- Thumm, M. (2002) Hitchhikers guide to the vacuole-mechanisms of cargo sequestration in the Cvt and autophagic pathways. **Mol. Cell** **10**: 1257-1258.

- Todd, B.E.N., Fleet, G.H., and Henschke, P.A. (2000). Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. **Am. J. Enol. Vitic.** **51**, 65–72
- Tonietto, J. (2007) **Existe “o espumante brasileiro”?** Bon Vivant, Flores da Cunha, v. 8: 04. Artigo de mídia publicado no Jornal Bon Vivant e disponibilizado no site da Embrapa Uva e Vinho (<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos>) em 11/06/13.
- Torresi, S., Frangipane, M.T. and Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: **Food Chem.** **129**: 1232-1241.
- Torrens, J., Urpi, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2008). Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. **Int. J. Food Microbiol.** **124**: 48-57.
- UVIBRA (2012). Relatório de comercialização de vinhos e derivados da uva e do vinho do Estado do Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves, 58p
- Vicenzi, S., Polesani, M., Curioni, A. (2005) Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in a white wine. **Am. J. Enol. Vitic.** **56**: 246-254.
- Viñas, P., López-Erroz, C., Marín-Hernández, J., Hernández-Córdoba, M. (2000). Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection: **J. Chromatogr. A** **871**: 85-93.
- Ward, O. (1991) P. Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos. Zaragoza (España). Ed. Acribia, S. A:155
- Zhao, J., Fleet & G.H. (2003) Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biot.** **30**:175–182