



Ana Raquel F. Pereira
Nº 38551

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*



Ana Raquel F. Pereira
Nº 38551

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Catarina Gomes, Investigadora Auxiliar da Unidade de Genómica do Biocant; e da Professora Doutora Sílvia Rocha, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Este trabalho foi desenvolvido e financiado pelo projeto "InovWine", uma iniciativa QREN, do financiamento UE/FEDER, através do COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade, com a referência FCOMP-01-0202-FEDER-011498.

O júri

Presidente

Prof. Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Catarina Batista Gomes

Investigadora Auxiliar da Unidade de Genómica do Biocant

Prof. Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos

Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos aqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada.

Agradeço à doutora Ana Catarina Gomes e à doutora professora Sílvia Rocha pela orientação deste trabalho. Estou grata pela paciência, disponibilidade e transmissão de conhecimentos que contribuíram para este trabalho e para o meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço ao Biocant, especialmente ao laboratório de Genómica, à Universidade de Aveiro e ao QOPNA onde foi possível realizar este trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Vera, à Sara, ao Daniel, ao André, à Marta e ao Paulo, por todas as nossas conversas.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais e ao Tó por todo o incentivo e toda a paciência ao longo deste ano.

Obrigada a todos.

Resumo

As fermentações vínicas são constituídas por consórcios microbianos, com diferentes espécies e estirpes de leveduras, onde a *Saccharomyces cerevisiae* tem um papel fundamental. Assim é importante avaliar a biodiversidade intrínseca das estirpes de *S. cerevisiae*, por forma a explorar o seu potencial biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi estudar a biodiversidade fenotípica e metabólica de *S. cerevisiae*, com especial enfoque no seu potencial enológico. Para tal, isolaram-se leveduras vínicas endógenas de 4 regiões Demarcadas portuguesas: Alentejo, Bairrada, Douro e Dão. Isolaram-se 1260 leveduras, das quais 883 eram *S. cerevisiae*. Relativamente à caracterização fenotípica, avaliou-se a capacidade de crescimento de 313 estirpes de *S. cerevisiae* em 37 condições. As condições de crescimento foram selecionadas por forma a expor a variabilidade intrínseca de *S. cerevisiae*, e incluíram ainda fenótipos relacionados com o potencial enológico, nomeadamente o crescimento a diferentes temperaturas e na presença de etanol, a produção de H₂S, e a tolerância ao cobre e ao dióxido de enxofre. Este estudo evidenciou a existência de 292 fenótipos distintos entre a população estudada. A caracterização metabólica foi focada na análise de metabolitos voláteis produzidos por um conjunto de 4 estirpes de *S. cerevisiae*: 2 isolados vínicos e 2 estirpes comerciais amplamente utilizadas pela indústria. A análise foi realizada por HS-SPME-GC×GC-ToFMS, onde se identificaram um total de 218 metabolitos, pertencentes a 15 famílias, que são diferencialmente produzidos pelas estirpes analisadas. Quer os álcoois quer os ésteres foram as famílias com maior número de compostos identificados, no entanto foram os compostos terpénicos que apresentaram maior variabilidade inter-estirpe.

A análise compreensiva da variabilidade intrínseca de *S. cerevisiae* agora realizada revelou uma elevada biodiversidade. Além disso, identificou-se um metaboloma volátil de *S. cerevisiae* até agora desconhecido e que demonstra a importância da continuidade do seu estudo em maior profundidade.

Keywords

S. cerevisiae, biodiversity, phenotyping, metabolomics, wine

Abstract

Wine fermentation is dependent upon a microbial consortium, with different species and strains of yeasts, which *Saccharomyces cerevisiae* has a fundamental role. Thus, it is important to evaluate the intrinsic biodiversity of these yeasts to explore their biotechnological potential. The aim of this work was to study phenotypic and metabolic biodiversity of *S. cerevisiae*, and its oenological potential. For that, *S. cerevisiae* strains, from Alentejo, Bairrada, Douro and Dão Portuguese Appellations were isolated. A total of 1260 wine yeasts were isolated of which 883 belong to the *S. cerevisiae* specie. For the phenotypic characterization, we assessed the growth capacity of 313 strains of *S. cerevisiae* under 37 different conditions. These growth conditions were selected in order to expose the intrinsic variability of *S. cerevisiae*, and also included phenotypes related to its oenological potential, particularly the growth at different temperatures and in the presence of ethanol, the H₂S production, and the tolerance to copper and sulfur dioxide. This study revealed the existence of 292 distinct phenotypes within the studied population. The metabolic characterization was focused on the analysis of volatile metabolites produced by a set of 4 strains of *S. cerevisiae*: 2 isolates and 2 commercial strains widely used by the industry. The analysis was performed by HS-SPME-GC×GC-TOFMS, where a total of 218 metabolites, belonging to 15 families, were identified and were differentially produced by studied strains. Alcohols and esters were the families with the largest number of identified compounds; whereas the terpenic compounds were those that showed the highest inter-strain variability.

Indeed, the comprehensive analysis of the intrinsic variability of *S. cerevisiae* has unveiled a surprisingly high biodiversity. Moreover, we have identified a yet unknown volatile metabolome of *S. cerevisiae*, which would be of great importance to continue studying.

\u00cdndice

\u00cdndice de figuras	III
\u00cdndice de tabelas	V
Lista de abreviaturas	VI
1. Enquadramento	2
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.1 Biodiversidade de <i>S. cerevisiae</i>	4
2.1.1 Diversidade fenot\u00edpica	5
2.1.2 Diversidade metabol\u00f3mica	9
3. Metodologias para diferenciar e caracterizar <i>S. cerevisiae</i>	13
3.1 Identifica\u00e7\u00e3o de <i>S. cerevisiae</i>	13
3.2 An\u00e1lise de compostos vol\u00e1teis	14
4. Objetivos do trabalho	20
5. Material e M\u00e9todos	22
5.1 Amostras e Material	22
5.2 Isolamento e identifica\u00e7\u00e3o de leveduras v\u00ednicas	23
5.3 Caracteriza\u00e7\u00e3o fenot\u00edpica	26
5.4 Caracteriza\u00e7\u00e3o metabol\u00f3mica	30
6. Resultados e Discuss\u00e3o	36
6.1 Isolamento e identifica\u00e7\u00e3o de leveduras v\u00ednicas	36
6.2 Caracteriza\u00e7\u00e3o fenot\u00edpica de <i>S. cerevisiae</i>	39
6.3 Caracteriza\u00e7\u00e3o metabol\u00f3mica de <i>S. cerevisiae</i>	49
7. Conclus\u00e3o	60
8. Trabalho futuro	62
Bibliografia	64
Anexo	70

\u00cdndice de figuras

Figura 1 – Altera\u00e7\u00f5es nas velocidades m\u00e1ximas de crescimento de esp\u00e9cies n\u00e3o- <i>Saccharomyces</i> (<i>H. uvarum</i> (Hu) <i>C. zempelina</i> (Cz) <i>T. delbrueckii</i> (Td) <i>P. fermentans</i> (Pf) e <i>K. marxianus</i> (Km)) e <i>S. cerevisiae</i> (ScT73) em fun\u00e7\u00e3o da temperatura	8
Figura 2 – Representa\u00e7\u00e3o das vias metab\u00f3licas associadas \u00e0 produ\u00e7\u00e3o de compostos vol\u00e1teis.....	11
Figura 3 – Dispositivo utilizado em SPME.....	14
Figura 4 – Cromat\u00f3grafo bidimensional.....	16
Figura 5 - Regi\u00f5es vitivin\u00edcolas de Portugal.	22
Figura 6 – Resultados do PCR para o gene MET2 de 4 isolados de leveduras.....	37
Figura 7 – Representa\u00e7\u00e3o gr\u00e1fica dos resultados obtidos por amplifica\u00e7\u00e3o do gene Met2.	37
Figura 8 – Resultados da restri\u00e7\u00e3o do gene MET2 com a enzima EcoRI de isolados de <i>Saccharomyces</i>	38
Figura 9 – Representa\u00e7\u00e3o gr\u00e1fica dos resultados da restri\u00e7\u00e3o com EcoRI.....	38
Figura 10 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras na presen\u00e7a de amino\u00e1cidos e fontes de azoto	41
Figura 11 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras na presen\u00e7a de fontes de carbono.....	42
Figura 12 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras em YPD suplementado com i\u00f5es.....	43
Figura 13 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras na presen\u00e7a de drogas	44
Figura 14 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras a diferentes temperaturas e na presen\u00e7a de per\u00f3xido de hidrog\u00e9nio	45
Figura 15 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras na sua produ\u00e7\u00e3o de sulfureto de hidrog\u00e9nio, atividade proteinase, toler\u00e2ncia ao di\u00f3xido de enxofre e na presen\u00e7a de etanol.....	46
Figura 16 – Leveduras com potencial enol\u00f3gico e suas caracter\u00edsticas fenot\u00edpicas.....	47
Figura 17 - Cromatograma de GCxGC-ToFMS da estirpe EC1118	49

Figura 18 - Cromatograma de GCxGC das estirpes BT2453, BT2652, EC1118 e QA23 ..	50
Figura 19 – Heatmap dos metabolitos identificados e respectivas fam\u00edlias.....	51
Figura 20 – \u00c1rea total de compostos e indica\u00e7\u00e3o do seu n\u00famero total determinados para cada estirpe	52
Figura 21 – Gr\u00e1fico de PCA das fam\u00edlias de compostos das estirpes de <i>S. cerevisiae</i> estudadas.....	55
Figura 22 – Gr\u00e1fico de PCA dos compostos terp\u00e9nicos das estirpes de <i>S. cerevisiae</i> estudadas.....	57

\u00cdndice de tabelas

Tabela I – Caracter\u00edsticas tecnol\u00f3gicas a ser consideradas na sele\u00e7\u00e3o de estirpes v\u00ednicas ...	6
Tabela II – Compostos contribuintes para o aroma final do vinho produzidos pela <i>S. cerevisiae</i>	12
Tabela III – Reagentes utilizados na prepara\u00e7\u00e3o da mistura de PCR	25
Tabela IV – Ciclo da rea\u00e7\u00e3o PCR MET2	26
Tabela V – Classifica\u00e7\u00e3o do crescimento das leveduras	30
Tabela VI – Amostras de finais de fermenta\u00e7\u00e3o provenientes das adegas de Portugal.....	36
Tabela VII – Amostras de fermenta\u00e7\u00f5es decorridas no laborat\u00f3rio provenientes da Bairrada36	
Tabela VIII – N\u00famero de leveduras existentes em cada casta	39
Tabela IX – Compostos terp\u00e9nicos identificados e respetivos aromas	56
Tabela A1 – Compostos vol\u00e1teis identificados por HS-SPME-GCxGC-ToFMS nas estirpes de <i>S. cerevisiae</i> estudadas.....	70

Lista de abreviaturas

Sigla	Designação em inglês	Designação em português
ATP	<i>Adenosine 5-triphosphate</i>	Adenosina-5-trifosfato
DNA	<i>Deoxyribose nucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>	Análise de variância
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GC-FID	<i>Gas chromatography - flame ionization detector</i>	Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama
GCMS	<i>Gas chromatography - mass spectrometry</i>	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria massa
GCxGC	<i>Comprehensive two-dimensional gas chromatography</i>	Cromatografia abrangente bidimensional em fase gasosa
HSSE	<i>Headspace sortive extraction</i>	Extração sortiva no espaço de cabeça
HSSPME	<i>Headspace solid-phase micro-extraction</i>	Microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça
<i>m/z</i>	<i>Mass to charge ratio</i>	Razão massa carga
PCA	<i>Principal component analysis</i>	Análise de componentes principais
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>	Reação em cadeia da polimerase
QDA	<i>Quantitative descriptive analysis</i>	Análise descritiva quantitativa
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
ToFMS	<i>Time of flight mass spectrometry</i>	Espectrómetro de massa por tempo de voo

1. Enquadramento

Tradicionalmente, a fermentação vínica é levada a cabo de forma espontânea por leveduras endógenas presentes nas uvas no momento da colheita, ou por leveduras comerciais adicionadas durante o processo de vinificação [1].

Existem estudos que demonstram que as espécies predominantes que se encontram em uvas saudáveis são leveduras do género *Hanseniaspora uvarum* (e a sua forma anamorfa *Kloeckera apiculata*) e espécies oxidativas pertencentes aos géneros *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Rhodotorula* [2]. Contudo, são as espécies fermentativas do género *Saccharomyces*, em particular as *S. cerevisiae* que são responsáveis pela fermentação de mostos vínicos, estando presentes quer na vinha, que no lagar.

A flora de leveduras presentes nas uvas depende de um vasto conjunto de fatores tais como as condições climáticas, localização geográfica, aplicações antifúngicas, variedade das uvas, idade da vinha e o tipo de solo.

Diversos estudos ecológicos, usando métodos moleculares de identificação, demonstram uma larga diversidade de padrões genéticos entre a flora fermentativa, sendo que as estirpes de *S. cerevisiae* são predominantes na flora fermentativa e estão bastante distribuídas nas regiões vitícolas, podendo ser encontradas em anos consecutivos [3, 4].

Hoje em dia, também é muito comum a adição de leveduras comerciais nas fermentações vínicas pois estas possuem muito boas capacidades fermentativas e enológicas, contribuindo tanto para a padronização do processo fermentativo como para a qualidade final do vinho.

Nos anos que se seguiram à publicação da sequência do genoma de *S. cerevisiae* [5] foi demonstrado que existem muitas diferenças entre as estirpes de leveduras vínicas. Deste modo, a exploração da biodiversidade das estirpes fermentativas endógenas pode ser uma importante contribuição para o conhecimento e para a seleção de estirpes com fenótipos específicos.

Schuller [1] no seu trabalho nas Regiões do Vinho Verde do norte de Portugal conseguiu obter 1620 isolados de uvas colhidas entre os anos de 2001 e 2003, todos pertencentes à espécie *S. cerevisiae*. Estes resultados foram conseguidos utilizando técnicas de PCR e RFLP, que permitiram concluir que a *S. cerevisiae* pertence ao

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

ecossistema da Região do Vinho Verde em número tão elevado sendo o suficiente para conduzir fermentações espontâneas.

Assim, torna-se importante o estudo da biodiversidade associada à *S. cerevisiae*, tanto a nível de fenotipagem como de metabolómica, pois a qualidade do vinho depende da flora microbiana que se desenvolve durante a fermentação, e no final desta, *S. cerevisiae* são as leveduras predominantes [6].

2. *Saccharomyces cerevisiae*

Existem dois tipos de *S. cerevisiae*: o tipo selvagem e o tipo domesticado, sendo que o processo de domesticação dura à aproximadamente 2700 anos [7]. Este longo processo evolucionário fez com que a fisiologia e o genoma desta levedura vínica pudessem sofrer modificações levando à alteração das condições de fermentação. Vários estudos demonstraram que o sucesso desta levedura deve-se maioritariamente à sua grande propensão para sofrer alterações genómicas/genéticas num curto espaço de tempo [8].

Deste modo, a utilização de isolados de estirpes de *S. cerevisiae* é uma estratégia importante para manter e assegurar a qualidade e reprodutibilidade das características do vinho. A utilização de isolados de regiões específicas é bastante interessante devido à sua elevada adaptação quer às condições climáticas quer às uvas, e devido ao facto de estas estirpes estarem usualmente associadas a características vínicas que identificam vinhos e regiões específicas [9].

As leveduras vínicas são seleccionadas para cumprir determinados requisitos dos produtores de vinho como a sua performance na fermentação, resistência ao *stress*, perfil de aroma (que tem origem nos compostos que produzem), capacidade para libertar enzimas ou manoproteínas de relevância enológica, entre outros. Assim, mais de 200 estirpes de leveduras diferentes, quase exclusivamente *S. cerevisiae* são produzidas e vendidas na indústria.

Na literatura existem vários estudos onde se recorre ao uso da *S. cerevisiae*, evidenciando a sua importância. Goddard [10] procedeu à quantificação dos efeitos do ecossistema da *S. cerevisiae* na fermentação natural para estudar a interação entre os seus processos ecológicos e evolucionários. No seu estudo a temperatura desempenhou um papel importante na atividade metabolómica da *S. cerevisiae*, fazendo com que esta

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

dominasse todo o processo fermentativo em relação a outras espécies de leveduras. Por outro lado, Barrajon [11] caracterizou através de microssatélites 22 estirpes de *S. cerevisiae*, selecionando 6 delas para formar uma cultura mista. . Neste trabalho, Barrajon, estudou o potencial efeito benéfico do uso de culturas mistas de *S. cerevisiae* na qualidade de aroma do vinho, tendo concluído que uma dada mistura de estirpes liberta diferentes concentrações dos compostos voláteis mais comuns (álcoois superiores e acetaldeídos) relativamente a estirpes individuais. Concluiu ainda que a composição final do vinho pode ser melhorada usando esta combinação de culturas mistas de *S. cerevisiae*.

2.1 Biodiversidade de *S. cerevisiae*

As leveduras fazem parte das comunidades naturais microbiológicas das uvas, e geralmente pensa-se que a população de leveduras está associada a uma determinada variedade de uva e uma localização geográfica específica, sendo introduzido um carácter regional. Assim, com o interesse de preservar a biodiversidade e a influência geográfica do vinho, as uvas de regiões específicas representam uma fonte importante de leveduras para o desenvolvimento de novas culturas [12]. Assim, normalmente são selecionadas e isoladas leveduras de diferentes regiões vitivinícolas e de diversas estirpes de *S. cerevisiae*. Estas seleções baseiam-se em características fenotípicas como: tolerância ao etanol (11-14%), baixa concentração de açúcares residuais (2-5g/L), baixa produção de ácidos voláteis, elevadas velocidades de fermentação e capacidade para dominar as mais diversas condições de fermentação [12]. Outros aspetos muito importantes e bastante comuns nestas estirpes são: características de crescimento robustas no mosto de uva, capacidade de produzir compostos *killer* que desencadeiam a morte celular de estirpes não-*Saccharomyces* e produção de diferentes compostos que interferem no aroma, em concentrações que variam em função das condições de fermentação e do tratamento dos mostos, incluindo a temperatura, casta de uva, micronutrientes, vitaminas e composição de azoto dos mostos [13, 14].

A biodiversidade da *S. cerevisiae* tem vindo a ser amplamente estudada. Por exemplo, Franco-Duarte [15] relacionou as características genéticas e fenotípicas da *S. cerevisiae*, através do estudo da resposta a 24 testes fenotípicos que incluíram testes com critérios taxonómicos, resposta a elevadas temperaturas e testes com relevância

Estudo da biodiversidade de estirpes v\u00ednicas de *S. cerevisiae*

biotecnol\u00f3gica numa popula\u00e7\u00e3o de 103 leveduras v\u00ednicas oriundas da regi\u00e3o do Minho. Neste estudo, apesar das leveduras derivarem de uma regi\u00e3o geogr\u00e1fica restrita, elas demonstraram uma elevada variabilidade fenot\u00edpica. Num outro estudo, Carrau [13] inoculou diferentes estirpes comerciais de *S. cerevisiae* durante o processo de vinifica\u00e7\u00e3o para estabelecer uma popula\u00e7\u00e3o dominante. Neste trabalho encontrou efeitos significativos nas concentra\u00e7\u00f5es de \u00e1lcoois superiores, \u00e9steres, \u00e1cidos gordos, alguns monoterpenos e lactonas, sendo que os compostos de aroma desejados se encontravam mais concentrados (\u00e9steres, lactonas e monoterpenos), e os compostos indesejados possu\u00edam concentra\u00e7\u00f5es diminu\u00eddas (\u00e1lcoois superiores e \u00e1cidos gordos de cadeia m\u00e9dia).

2.1.1 Diversidade fenot\u00edpica

Durante a fermenta\u00e7\u00e3o, as leveduras produzem etanol, di\u00f3xido de carbono e outros produtos secund\u00e1rios importantes para o sabor e qualidade do vinho, os quais servem de refer\u00eancia para o isolamento das estirpes de *S. cerevisiae*. Deste modo, os testes fenot\u00edpicos s\u00e3o importantes pois servem para complementar a informa\u00e7\u00e3o j\u00e1 obtida sobre estas estirpes, indicando-nos se os isolados v\u00e3o ser ou n\u00e3o adequados \u00e0 produ\u00e7\u00e3o de vinhos de alta qualidade [9].

Carreto [16] estudou a variabilidade de express\u00e3o de diferentes estirpes de *S. cerevisiae*, tendo verificado que durante a fermenta\u00e7\u00e3o de glucose as estirpes selvagens de leveduras respondem de modo diferente ao *stress* imposto pela deple\u00e7\u00e3o de nutrientes, acumula\u00e7\u00e3o de etanol e aumento de densidade celular. Neste trabalho, s\u00e3o comparados perfis do transcriptoma de 5 isolados ambientais, estirpes cl\u00ednicas e estirpes laboratoriais em diferentes pontos da fermenta\u00e7\u00e3o (durante a fase exponencial e estacion\u00e1ria). Este estudo revelou diversidade na express\u00e3o g\u00eanica, onde os genes envolvidos no metabolismo da glucose e na resposta ao *stress* s\u00e3o os mais vari\u00e1veis durante a fermenta\u00e7\u00e3o, concluindo que a express\u00e3o de variabilidade gen\u00e9tica \u00e9 a fonte para a diversidade fenot\u00edpica entre as estirpes das leveduras. Deste modo, a caracteriza\u00e7\u00e3o fenot\u00edpica \u00e9 importante no processo de sele\u00e7\u00e3o de leveduras pois indica-nos como \u00e9 que a levedura se vai comportar durante o processo de fermenta\u00e7\u00e3o. Os par\u00e2metros fenot\u00edpicos que s\u00e3o testados, mais frequentemente, encontram-se listados na tabela I.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Tabela I – Características tecnológicas a ser consideradas na seleção de estirpes vínicas

Tolerância a etanol
Resistência a SO ₂
Produção de H ₂ S
Presença de fatores <i>killer</i>
Crescimento a diversas temperaturas
Crescimento na presença de íões metálicos
Crescimento na presença de drogas
Avaliação da atividade proteinase

(adaptado de [17])

Estes testes podem ser avaliados através da monitorização da progressão da fermentação em laboratório, onde as leveduras crescem em meios de cultura com as devidas modificações adequadas a cada teste fenotípico [17, 18].

A tolerância ao etanol é provavelmente uma das condições mais importantes a ter em consideração devido à elevada quantidade desta substância durante o processo de fermentação do mosto. Algumas estirpes de *S. cerevisiae* são mais resistentes ao etanol que outras, no entanto todas as estirpes individuais de *S. cerevisiae* exibem uma resposta adaptativa ao etanol [19, 20]. Esta levedura exerce uma grande pressão seletiva nos outros microrganismos, tais como as bactérias, devido à sua rápida conversão dos açúcares disponíveis em etanol, um composto tóxico, que pode ser depois aproveitado pela *S. cerevisiae* na respiração. Esta hipótese suporta o facto de a maioria das não-*Saccharomyces* produzirem baixas quantidades de etanol, e da clara correlação entre elevadas concentrações de etanol reduzirem a população de não-*Saccharomyces*. Salvado [21] mostrou que a elevada tolerância ao etanol pelas *Saccharomyces* pode ser um dos fatores para a sua hegemonia nos fins de fermentação, quando a concentração de etanol excede os 9-10%.

A variedade do vinho e das espécies de leveduras que estão envolvidas no processo de fermentação contribuem bastante para as suas características finais. Está provado que quando a fermentação ocorre com a adição de dióxido de enxofre (SO₂) à amostra, o número de espécies de leveduras que conduzem o processo é quase exclusivamente *S. cerevisiae* resistente ao composto [22]. Estirpes diferentes da mesma espécie de leveduras podem apresentar grandes diferenças nas suas tolerâncias ao dióxido de enxofre pois este tem uma importante função antisséptica e a *S. cerevisiae* possui uma elevada resistência,

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

sobrevivendo a concentrações de SO₂ acima de 1200 mg/L [23]. Além disso, o SO₂ exibe uma importante função antioxidante que ajuda a reduzir os efeitos do oxigénio dissolvido e inibe as enzimas tirosinase e peroxidase, que são endógenas nas uvas [24]. Finalmente, o SO₂ melhora a libertação de compostos fenólicos da pele das uvas durante a maceração, e a estabilidade da cor do vinho durante o envelhecimento, no entanto, este pode produzir efeitos sensoriais negativos, originando sulfureto de hidrogénio durante o metabolismo das leveduras [25, 26].

A formação de sulfureto de hidrogénio (H₂S) é um dos problemas mais comuns no processo de vinificação pois as leveduras, nomeadamente a *S. cerevisiae*, podem produzi-lo durante a fermentação. Este metabolito confere um aroma comumente designado de “ovos podres” a concentrações extremamente baixas no vinho (cerca de 1 µg/L) sendo ainda precursor de outros compostos voláteis de enxofre responsáveis por aromas desagradáveis (ranço, cebola, entre outros) difíceis de remover uma vez presentes no vinho [27]. Os fatores que afetam a formação de H₂S nas fermentações vínicas incluem os tratamentos efetuados às vinhas que contêm resíduos de enxofre; as estirpes de leveduras; deficiências de azoto nos mostos; condições de fermentação; micronutrientes; e tratamentos pós-fermentativos [28].

Por outro lado, as toxinas *killer*, que são proteínas produzidas por algumas leveduras são letais para as estirpes de leveduras vínicas mais sensíveis. Algumas leveduras *killer* têm potencial para retardar o início da fermentação, causar fermentações lentas, parar fermentações e produzir vinhos com elevados níveis de acetaldeído, ácido láctico, ácido acético e outras qualidades sensoriais indesejáveis [24]. No entanto, a presença deste tipo de leveduras pode ser bastante importante em fermentações vínicas pois as leveduras *killer* quando inoculadas podem ser eficientes em suprimir leveduras não desejadas, aumentando assim a qualidade do vinho [29]. Deste modo, o estudo da atividade *killer* pelas leveduras torna-se importante devido à sua influência na qualidade do vinho.

Outra característica de interesse biotecnológico é a temperatura pois esta afeta a cinética da fermentação e o metabolismo das leveduras, o que define a composição química do vinho e, conseqüentemente, a sua qualidade. As leveduras têm uma temperatura ótima situada entre os 31 e 33°C, e a esta temperatura as leveduras completam uma geração num tempo mínimo. Em termos tecnológicos, a temperatura ideal pode afastar-se bastante deste valor, daí a necessidade de um estudo do comportamento das

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

leveduras a várias temperaturas [30]. A temperatura desempenha um papel importante na atividade metabólica da *S. cerevisiae* durante a fermentação pois esta apresenta melhor desempenho a elevadas temperaturas (30°C) relativamente às não-*Saccharomyces*. O uso de baixas temperaturas (10-15°C) no processo de vinificação pode realçar a produção e retenção de compostos de aroma voláteis, no entanto, tal como demonstrado na figura 1, esta redução da temperatura afeta severamente a performance de crescimento das leveduras [31, 32].

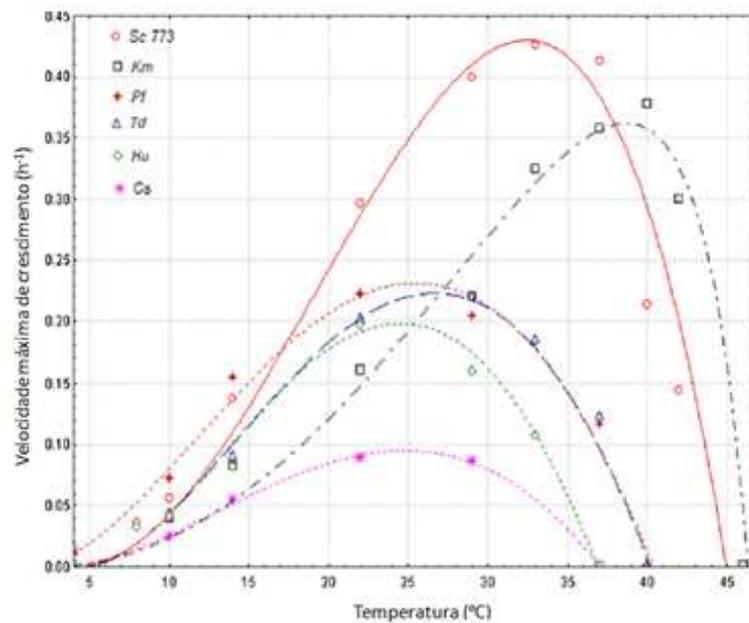


Figura 1 – Alterações nas velocidades máximas de crescimento de espécies não-*Saccharomyces* (*H. uvarum* (Hu) *C. zemplina* (Cz) *T. delbrueckii* (Td) *P. fermentans* (Pf) e *K. marxianus* (Km)) e *S. cerevisiae* (ScT73) em função da temperatura (adaptado de [21]).

Alguns metais servem como micronutrientes e são usados em processos redox para estabilizar moléculas, como componentes de enzimas, e para regulação da pressão osmótica. No entanto, a maior parte dos metais não são essenciais, não têm valor nutricional, e são potencialmente tóxicos para os microrganismos. Estes metais tóxicos interagem com componentes celulares, podendo danificar membranas e criar resistências a diversos mecanismos. Deste modo, os iões metálicos são essenciais para as funções estruturais e fisiológicas das células, mas em excesso podem inibir o seu crescimento fazendo com que as leveduras não levem a fermentação até ao fim [33].

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Apesar das drogas não estarem presentes durante a fermentação, a sua ação nas leveduras pode desencadear diferentes respostas fisiológicas baseadas em diferentes alvos celulares como, por exemplo, defeitos nas vias de transporte e transdução de sinal. Assim, o conhecimento sobre os efeitos das drogas é essencial, pois diferentes reações permitem diferenciar estirpes. A cafeína, hidroxíureia, canavanina e a cicloheximida são exemplos de compostos que demonstram ter elevado poder discriminatório entre estirpes de *S. cerevisiae* [34].

A atividade proteínase das leveduras, isto é, a capacidade para clivar ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, é estimulada no mosto pela deficiência de azoto, causando a libertação de aminoácidos com enxofre para que os possam utilizar como nutrientes para o seu crescimento [35]. Deste modo é necessário ter um conhecimento sobre quais as estirpes que produzem esta enzima para que num futuro próximo possam ser utilizadas no processo de produção de vinho [36].

2.1.2 Diversidade metabolómica

A metabolómica é definida como a análise das alterações numa vasta gama de metabolitos, ou seja, pequenas moléculas orgânicas cujo peso molecular é inferior a 1000 [37]. O termo metabolómica foi utilizado pela primeira vez em 1998 em analogia à genómica, transcriptómica e proteómica, e é a ciência “ómica” cujas técnicas mais comuns são a cromatografia em fase gasosa, a cromatografia em fase líquida e a ressonância magnética nuclear.

Os metabolitos foram recentemente identificados como tendo um papel essencial nos sistemas biológicos, sendo portanto importante a sua identificação e quantificação. A combinação da metabolómica com a genómica, transcriptómica e proteómica, pode fornecer uma visão global e uma melhor compreensão dos sistemas regulatórios, das alterações dinâmicas e do controlo das vias metabólicas [38].

O aroma é um componente muito importante nas qualidades organolépticas do vinho. A composição volátil total do vinho é de 0,8-1,2 g/L, e a maioria dos compostos são produzidos durante a fermentação do mosto. O ácido acético, o acetaldeído, o acetato de etilo, o propanol, o isobutanol e o 2- e 3-metil-butanol fazem parte de mais de metade da componente volátil, sendo que a outra metade está distribuída em cerca de 600-800

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

compostos voláteis presentes em quantidades muito baixas (acetais, ácidos orgânicos, álcoois, compostos fenólicos e heterocíclicos, ésteres, lactonas, terpenos e compostos que contêm enxofre). A análise da contribuição do aroma destes compostos minoritários é complicada devido às suas baixas concentrações e interações.

A quantidade e qualidade dos aromas e sabores originados na fermentação do mosto depende das condições ambientais, do processo de vinificação e da participação das leveduras. Por estas razões é essencial que se escolha a estirpe de levedura vínica adequada para se conseguir produzir um vinho com as características sensoriais pretendidas [39].

O acetato de etilo é produzido pela esterificação enzimática do ácido acético e do etanol. Quando a fermentação do mosto se dá em condições anaeróbias a concentração deste composto é de cerca de 30-50 mg/L, o que aumenta para 60-110 mg/L em condições aeróbias. Depois do ácido acético, o acetato de etilo é o componente mais importante na acidez volátil dos vinhos, sendo que concentrações inferiores a 70 mg/L são consideradas positivas para o aroma do vinho, contudo, a *S. cerevisiae* é conhecida como uma baixa produtora de acetato de etilo [40].

O 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, *n*-propanol, tirosol, hexanol e o 2-fenil-etanol são os álcoois mais produzidos durante a fermentação dos mostos. Eles são formados pela transaminação dos correspondentes aminoácidos de acordo com a via de Ehrlich. Os ácidos resultantes são descarboxilados a aldeídos, que finalmente são reduzidos a álcoois. Alguns álcoois não têm aminoácidos precursores logo são formados a partir do ácido. Nos vinhos de mesa, o ideal é encontrar estes compostos em concentrações inferiores a 350 mg/L para que seja beneficiado o aroma do vinho. A produção de álcoois pelas leveduras depende então da sua capacidade de produção de aminoácidos e varia de acordo com o género, espécie e até estirpe, sendo que a *S. cerevisiae* é uma levedura que produz elevados números de álcoois [2, 41].

Deste modo, as vias metabólicas responsáveis pela produção destes compostos são suscetíveis a vários fatores, incluído a disponibilidade de precursores, diferentes tipos de *stress*, potencial redox das células e ao estado energético das células. Estas vias metabólicas não são lineares, mas formam uma rede de reações interligadas que convergem e divergem de intermediários comuns (figura 2). Além disso, os intermediários não são só comuns entre as diferentes vias responsáveis pela produção de compostos de

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

aroma, mas também com outras vias relacionadas com o metabolismo dos ácidos gordos, glicólise, tolerância ao *stress*, entre outros.

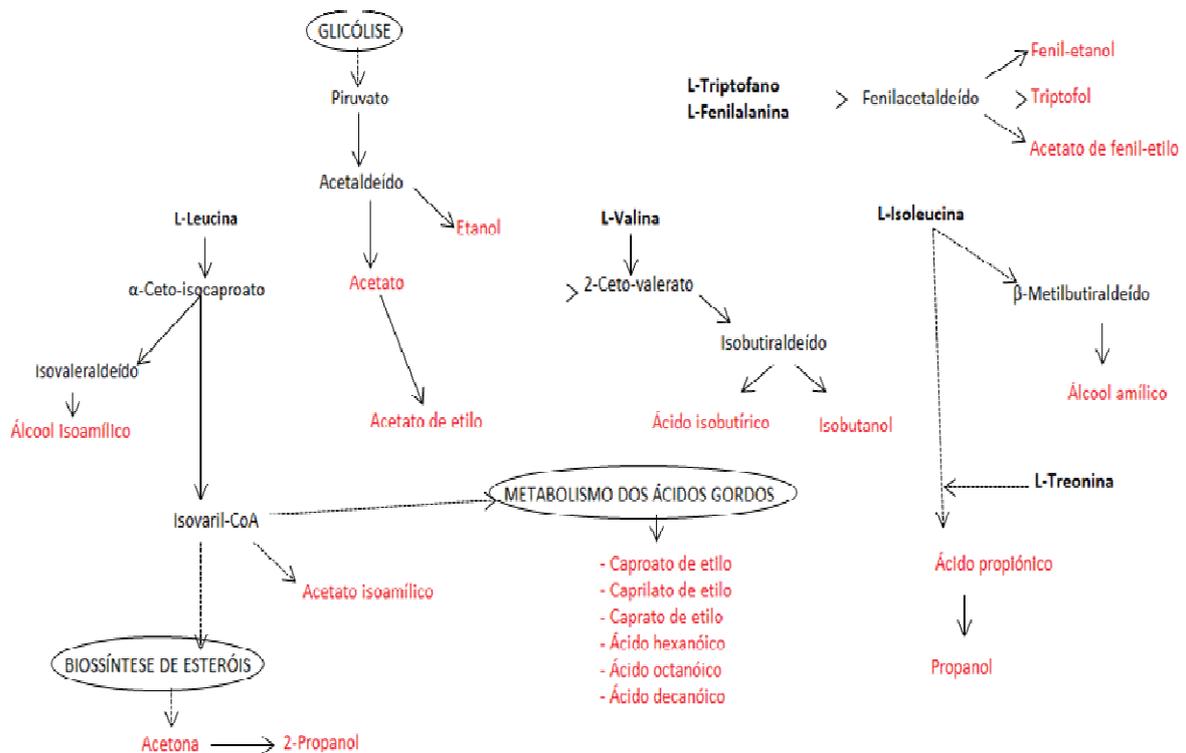


Figura 2 – Representação das vias metabólicas associadas à produção de compostos voláteis (adaptado de [42]) As linhas a tracejado indicam que um ou mais intermediários estão omissos, e a vermelho estão os compostos que conferem aroma com relevância

Mateos [43] demonstrou que a *S. cerevisiae* produz acetaldéido, acetato de etilo e álcoois que correspondem aos compostos voláteis maioritários das fermentações dos mostos. A produção destes compostos é variável e depende muito das condições de fermentação e da própria estirpe de levedura, concluindo que o metabolismo da *S. cerevisiae* é muito complexo pois na mesma condição de fermentação diferentes estirpes podem seguir vias metabólicas diferentes na produção dos seus compostos.

Na tabela seguinte (tabela II) estão representados os compostos que mais contribuem para o aroma final do vinho produzidos em vinhos inoculados com *S. cerevisiae* durante a fermentação de mostos vínicos.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Tabela II – Compostos contribuintes para o aroma final do vinho produzidos pela *S. cerevisiae*

Grupo químico	Composto	Via de formação
Ésteres	Acetato de etilo	Esterificação
	Propionato de etilo	
	Isobutirato de etilo	
	2-Metilbutirato de etilo	
	Isovalerato de etilo	
	Acetato isoamílico	
	Hexanoato de etilo	
	Octanoato de etilo	
	Decanoato de etilo	
	Succinato de dietilo	
	Acetato de 2-feniletilo	
	Butirato de etilo	
	Lactato de etilo	
Fenilacetato de etilo		
Álcoois	1-Octanol	Reação de Ehrlich
	2-Fenil-etanol	
	Álcool isoamílico	
	1-Butanol	
	2-Hexen-1-ol	
	3-Hexen-1-ol	
	Metionol	
	Isobutanol	
	1-Hexanol	
	Álcool benzílico	
	β -Feniletanol	
	Propanol	
	3-Metilbutanol	
2-Metilbutanol		
Terpenos	Linalol	Biossíntese a partir do acetil-CoA
	α -Terpineol	
	β -Citronelol	
	Geraniol	
	Farnesol	
	Terpinen-4-ol	
2,6-Dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol		
Ácidos	Ácido butírico	Biossíntese dos ácidos gordos
	Ácido isovalérico	
	Ácido hexanóico	
	Ácido octanóico	
	Ácido decanóico	

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

	Ácido acético
	Ácido isobutírico
	Ácido fenilacético
Outros	Acetaldeído
	Acetoina
	2,6-Dimetoxifenol
	Vanilina
	(adaptado de [39, 44, 45])

3. Metodologias para diferenciar e caracterizar *S. cerevisiae*

As leveduras produzem inúmeros compostos voláteis que desempenham uma função importante nas características sensoriais do vinho. Assim, após a identificação das leveduras surge a necessidade de encontrar técnicas que permitam diferenciar as estirpes e extrair, caracterizar os compostos que produzem de forma simples e eficiente.

3.1 Identificação de *S. cerevisiae*

Os progressos recentes da biologia molecular têm permitido o desenvolvimento de novas técnicas para identificação e caracterização de leveduras.

O género *Saccharomyces* tem sofrido muitas alterações taxonómicas ao longo dos anos e atualmente está dividido em três grupos estabelecidos por Van der Walt. A *S. cerevisiae* pertence ao grupo *Saccharomyces sensu strictu*, formado pelas espécies *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus* e *S. pastorianus* [46]. A distinção entre estas espécies é muito complicada devido à sua elevada proximidade genética, no entanto este problema pode ser resolvido através das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) do gene MET2. Através do PCR, o gene MET2 é amplificado com dois *primers*, MET2_F e MET2_R com 21pb cada um e posteriormente, através do RFLP, este sofre uma digestão enzimática. Para distinguir *S. cerevisiae* utiliza-se a endonuclease *EcoRI* que cliva o gene MET2 em dois fragmentos mais pequenos de 369pb e 211pb. A endonuclease *PstI* cliva o gene MET2 de *S. bayanus* em dois fragmentos de 365pb e 211pb, e nem a *EcoRI* nem a *PstI* cliva o gene MET2 de *S. paradoxus* [24, 47].

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Mercado [48] explorou a biodiversidade da *S. cerevisiae* na região vitivinícola mais importante da Argentina. Neste trabalho, Mercado considerou *Saccharomyces* todas as leveduras que não foram capazes de crescer num meio com L-lisina como única fonte de azoto, e discriminou as *S. cerevisiae* pela técnica PCR-RFLP da região do rDNA 5,8S-ITS. Através do uso de marcadores moleculares (análise dos elementos de PCR dos interdelta e RFLP do DNA mitocondrial) conseguiu diferenciar estirpes e encontrou 190 padrões moleculares entre 590 isolados de *S. cerevisiae*, observando que existiam vinhas com elevados e baixos polimorfismos de populações de *S. cerevisiae* que derivam de uma população geral.

3.2 Análise de compostos voláteis

3.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)

A técnica de microextração em fase sólida (SPME) surgiu no final dos anos 80, tendo sido desenvolvida pelo grupo de Janusz Pawliszyn. Esta técnica de extração e concentração de analitos tem por base a sorção, isto é, a absorção e/ou adsorção, dependendo da fase estacionária da fibra. Esta extração pode ser realizada pela imersão da fibra na amostra em fase líquida, ou por exposição à fase gasosa [49].

A seringa de SPME é utilizada na exposição das fases estacionárias e é constituída por dois componentes básicos, o suporte e a agulha. O suporte permite guiar a fibra dentro e fora da agulha. A agulha serve para proteger a fibra e perfurar os septos. A fibra, constituída por sílica fundida e revestida por um filme polimérico, está incluída na agulha (figura 3) [50].



Figura 3 – Dispositivo utilizado em SPME (adaptado de [81])

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

A SPME foi primeiramente aplicada na avaliação de poluentes da água [51]. Desde então, a SPME começou a ser utilizada numa grande quantidade de amostras, incluindo estudos de aromas, especialmente para uma análise rápida da composição volátil de uma vasta gama de produtos, tais como, frutos, café, vinho, cerveja, carne, etc.

A SPME é, nos dias de hoje, bastante utilizada devido às suas inúmeras vantagens em relação a outros métodos tradicionais de extração, nomeadamente devido ao facto de ser uma técnica simples de usar, rápida (demora menos de 1 hora a completar), sensível, não requer solventes de extração e é possível aplicar a diferentes classes de compostos usando diferentes fases estacionárias [52]. Nesta técnica, a extração dos compostos não é exaustiva pois o sistema tende para um equilíbrio onde os analitos se distribuem pelas diferentes fases do sistema [53].

A quantidade de analito retido na fibra de SPME e a sensibilidade resultante são determinadas pelas cinéticas de sorção e pelos coeficientes de distribuição dos compostos entre a superfície da fibra e a amostra, o que torna esta técnica mais sensível às condições experimentais. Qualquer alteração nos parâmetros experimentais que afetam o coeficiente de distribuição e a velocidade de sorção poderá influenciar a quantidade retida na fibra de SPME, e conseqüentemente a reprodutibilidade e a sensibilidade [54]. Existem vários tipos de fases estacionárias, e a sua escolha depende quer das condições experimentais quer da composição volátil da amostra que se quer analisar. Neste trabalho utilizou-se uma fibra DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxeno/polimetilsiloxano), com as seguintes características:

- Filme de 30 ou 50 μm ;
- Temperatura ótima no injetor do GC: 320°C;
- Interação mista, ou seja tem propriedades de absorção e adsorção, daí ser muito utilizada na extração de compostos voláteis e semi-voláteis [53].

As condições experimentais são um parâmetro muito importante a controlar para que sejam minimizadas as variações nos resultados:

- **Tempo de extração** - é muito importante para manter uma boa reprodutibilidade, devendo ser escolhido de acordo com o limite de deteção do analito;

- **Meio de crescimento das células** - deve ser simples de modo a evitar o *background* nos resultados;

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

- **Volume da amostra** - deve ser sempre igual de modo a não variar a cinética da extração;

- **Agitação da amostra** - promove o rápido equilíbrio da solução;

- **Adição de Sais (*salting-out*)** - a adição de NaCl (*salting-out*) diminui a solubilidade dos compostos hidrofóbicos da fase aquosa, promovendo uma melhor extração dos compostos de interesse;

- **Temperatura** – aumenta o coeficiente de difusão dos analitos, e o congelamento das amostras serve para travar o crescimento celular [53].

Após a exposição da amostra à fibra de SPME, os analitos podem ser termicamente desorbidos num injetor de GCxGC,

3.2.2 Cromatografia abrangente bidimensional em fase gasosa

A análise de compostos voláteis responsáveis pelo aroma do vinho tem vindo a sofrer grandes progressos devido aos últimos desenvolvimentos em cromatografia em fase gasosa e desenvolvimento de novos e melhores detetores [55].

Os processos cromatográficos de uma dimensão são bastante aplicados à análise de produtos alimentares. Embora estes métodos forneçam resultados analíticos bastante satisfatórios, a complexidade de muitas matrizes naturais excede a capacidade de qualquer sistema de separação simples. Como consequência, nos últimos anos tem sido reforçada a pesquisa na combinação de técnicas independentes com o objetivo de reforçar o poder de resolução [56]. Um cromatógrafo bidimensional (figura 4) possui dois mecanismos ortogonais para separar os constituintes da amostra com apenas uma análise.



Figura 4 – Cromatógrafo bidimensional

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

A técnica da cromatografia abrangente bidimensional em fase gasosa (GCxGC) é baseada na aplicação de duas colunas de GC revestidas com diferentes fases estacionárias, conectadas em série através de uma interface (modulador). A interface separa pequenas porções do eluato da primeira dimensão e reinjeta-o para a segunda coluna. Cada pico da primeira dimensão é modulado diversas vezes, o que permite a preservação da separação da primeira dimensão. A segunda coluna é muito curta e estreita, e conseqüentemente cada porção é modulada e separada rapidamente, antes da modulação seguinte começar. Deste modo, a separação é realizada por volatilidade na primeira dimensão, e polaridade na segunda. Usando esta abordagem instrumental, os compostos que são co-eluídos na primeira coluna, sofrem uma separação adicional na segunda. Portanto, esta técnica oferece tempo de corrida mais rápido, aumento na capacidade dos picos, melhoria na resolução, aumento na seletividade de massa, boa linearidade na calibração, mais sensibilidade e os limites de detecção são melhorados quando comparado com o GC monodimensional [57].

No analisador de massa, do tipo tempo de voo (ToF), os iões são acelerados através de um campo magnético de força conhecida. Esta aceleração resulta num ião que contém a mesma energia cinética de qualquer outro ião que tem a mesma carga. A velocidade do ião depende da sua razão massa-carga (m/z), e o tempo que este demora a chegar ao detetor é medido. Deste modo, iões mais pesados atingem velocidades mais baixas, logo demoram mais tempo a chegar ao detetor.

Após obtenção dos cromatogramas estruturados consegue obter-se informação qualitativa relacionada com os tempos de retenção característicos de cada analito, e informação quantitativa através das áreas cromatográficas dos picos. A cada pico do cromatograma está associado um espectro de massa, no qual é estabelecida uma relação entre a razão massa-carga (m/z) dos iões detetados e a abundância (intensidade relativa) de cada espécie iónica [58].

Rocha [59] estabeleceu o perfil monoterpenóide de uva branca Fernão Pires de *Vitis vinífera* através de HS-SPME acoplado a GCxGC-ToFMS, identificando 56 monoterpenóides, sendo que 20 deles foram identificados pela primeira vez. Estes compostos possuem interessantes propriedades de aroma, assim como atividade biológica. Esta metodologia pode ser aplicada para determinar o perfil monoterpenóide das uvas, podendo ser aplicado também em mostos e vinhos.

Estudo da biodiversidade de estirpes v\u00ednicas de *S. cerevisiae*

Em estudos anteriores, realizados no laborat\u00f3rio de gen\u00f3mica do Biocant, foi utilizada a t\u00e9cnica HS-SPME-GCxGC-ToFMS para determinar quais os compostos vol\u00e1teis produzidos por diferentes estirpes de leveduras de *S. cerevisiae* onde se verificou que os metabolitos respons\u00e1veis pelo aroma do vinho pertencem \u00e0s fam\u00edlias dos \u00e1lcoois superiores, \u00e1cidos, acetatos, \u00e9steres e terpenos, sendo que estes contribuem com aromas a rosas, queijo, florais e frutados caracter\u00edsticos.

Objetivos

4. Objetivos do trabalho

O conhecimento das leveduras e da sua evolução ao longo do processo de fermentação permite selecionar as estirpes com as características desejadas para a produção de vinhos diversificados.

Como foi referido anteriormente, a *S. cerevisiae* é a levedura responsável pelo processo de fermentação, sendo portanto importante realizar um estudo aprofundado sobre a sua biodiversidade, de forma a determinar qual ou quais as leveduras mais adequadas à fermentação de diversos tipos de vinhos, potenciando assim a capacidade de produção de vinhos de excelência.

Neste estudo pretendeu-se isolar estirpes vínicas de *S. cerevisiae*, e caracterizar fenotipicamente e metabolicamente diferentes estirpes de *S. cerevisiae*. Para tal, isolaram-se leveduras provenientes dos finais de fermentação de mostos vínicos das regiões do Alentejo, Bairrada, Douro e Dão. Caracterizaram-se, fenotipicamente: 313 estirpes de *S. cerevisiae* pelo seu crescimento em diferentes meios de cultura; e foi analisado o perfil metabólico de 2 estirpes comerciais de *S. cerevisiae*, e 2 estirpes endógenas da Bairrada com características de: resistência ao cobre; tolerância a elevadas temperaturas e a dióxido de enxofre; baixa produção de sulfureto de hidrogénio; atividade *killer* e fermentação rápida. As estirpes anteriores foram analisadas por HS-SPME-GCxGC-ToFMS de modo a identificar quais os compostos voláteis por si produzidos.

Material e M\u00e9todos

5. Material e M\u00e9todos

5.1 Amostras e Material

Neste trabalho, para o isolamento e identifica\u00e7\u00e3o de *S. cerevisiae*, as leveduras foram obtidas a partir da colheita de uvas de diferentes regi\u00f5es vitivin\u00edcolas de Portugal no ano de 2011 (figura 5), nomeadamente, Bairrada, D\u00e3o, Douro e Alentejo. Em todas as regi\u00f5es, foi feita a recolha dos fins de fermenta\u00e7\u00e3o provenientes das respetivas adegas; e na Bairrada ainda foi feita a recolha de 1kg de uvas das vinhas para que a fermenta\u00e7\u00e3o decorresse no laborat\u00f3rio.

Para a caracteriza\u00e7\u00e3o fenot\u00edpica foram utilizadas 313 estirpes de *S. cerevisiae* obtidas nas colheitas de 2009 e 2010 e duas leveduras comerciais: QA23 e EC1118.

Para a caracteriza\u00e7\u00e3o metabol\u00f3mica, foram utilizadas duas estirpes de *S. cerevisiae* anteriormente isoladas e caracterizadas, e duas leveduras comerciais: QA23 e EC1118.

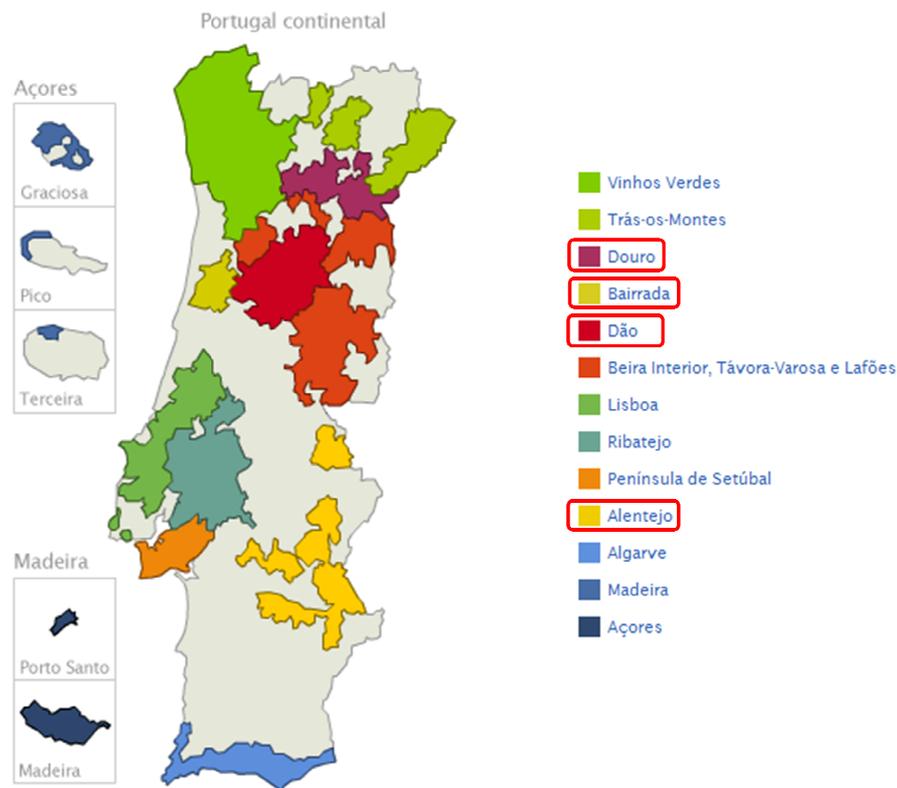


Figura 5 - Regi\u00f5es vitivin\u00edcolas de Portugal. A vermelho encontram-se assinaladas as regi\u00f5es onde as amostras de uvas foram obtidas para a realiza\u00e7\u00e3o deste trabalho

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Em relação ao material utilizado neste trabalho, o extrato de levedura, a glucose, a peptona, o agar, a galactose, a rafinose, o YNB, o YNB sem sulfato de amónio, a prolina, a arginina e o glutamato foram fornecidos pela FormediumTM. A frutose, a maltose, a sucrose, o cloreto de cálcio, o cloreto de lítio, o cloreto de cádmio, a cicloheximida, o azul de metileno, o ácido sulfuroso, o cloreto de cálcio, o cloreto de zinco, o cloreto de sódio, o ácido cítrico e o Biggy agar foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. O sulfato de cobre e o ácido málico foram fornecidos por Riedel-deHaën. A acetona, o peróxido de hidrogénio, o isopropanol e o etanol foram fornecidos por Merck. A paromomicina foi fornecida pela AppliChem. A 4-nitroquinolina foi fornecida pela After Aesar. A cafeína foi fornecida pela VWR. O leite magro em pó foi fornecido pela Nestlé. As placas de petri, *multi well*, *single well* e *deep well* foram fornecidas por Nunc Thermo Scientific. Para a quantificação do DNA foi utilizado o Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Para a análise dos produtos de PCR foi utilizado o Labchip 90 Caliper Life Sciences. A fibra de SPME DVB/CAR/PDMS foi fornecida pela Supelco (Aldrich, Bellefonte, PA, USA). Os *vials* foram fornecidos por GLP. O cromatógrafo utilizado foi o GCxGC-ToFMS LECO Pegasus 4D (LECO, St. Joseph, MI, USA).

5.2 Isolamento e identificação de leveduras vínicas

Para os mostos cuja fermentação ocorreu no laboratório, foi necessário proceder ao esmagamento das uvas até obter o mosto, o qual fermentou em *erlenmeyers*, a 30°C. Após a amostra chegar ao fim de fermentação, ou seja, quando ocorreu uma perda de 70g/L, isolaram-se as leveduras, nomeadamente a *S. cerevisiae*, objeto deste estudo.

5.2.1 Isolamento

Para isolar as leveduras, após obter o fim de fermentação, filtrou-se 1mL em cada um de dois eppendorfs (diluição 10⁰). De seguida, preparou-se diluições da amostra (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵), e plaquearam-se as diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵: plaquearam-se então 150µL de cada amostra em cinco placas com meio YPD sólido. Os isolados foram incubados durante dois dias a 30°C.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Após dois dias, contaram-se as colónias que cresceram nas placas. Destas repicaram-se e guardaram-se 30 colónias para novas placas. Estas colónias foram posteriormente criopreservadas a -80°C em YPD líquido e glicerol 80% (1:1).

5.2.2 Extração de DNA de leveduras vínicas

A extração do DNA das leveduras isoladas foi realizado de acordo com o protocolo de Lopez [60], com ligeiras alterações.

Resumidamente, às células adicionou-se 100µL da solução I (sorbitol 1M, EDTA-Na₂ 0,1M, pH 7,5) e ressuspendeu-se. Adicionou-se 5µL de Lyticase 5U/µL (esta enzima lisa a parede celular das leveduras). Incubou-se durante 1h a 37°C para se obter esferoblastos. Adicionou-se 100µL da solução II (Tris-HCl 50mM, EDTA-Na₂ 20mM, pH 7,4), e 5µL de SDS 20% (m/V) para emulsionar os lípidos, e ressuspendeu-se. Incubou-se a mistura, no mínimo 10min, a 65°C. Adicionou-se 100µL de acetato de potássio 5M para degradar as proteínas e colocou-se em gelo durante 5min no mínimo. De seguida centrifugou-se durante 25min, a 1600 rpm, numa centrífuga refrigerada a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo e precipitou-se o DNA adicionando o mesmo volume de isopropanol (300µL de isopropanol). Inverteram-se os tubos 2 ou 3 vezes e incubou-se no mínimo 10min à temperatura ambiente. Centrifugou-se 5min à velocidade máxima, desprezou-se o sobrenadante e lavou-se o DNA com 250µL de etanol 70% (V/V). Incubou-se 5min à temperatura ambiente. Centrifugou-se 3min à velocidade máxima e desprezou-se o etanol de cada amostra. Com uma pipeta retirou-se o excesso de etanol e secou-se o pellet durante 2min no *speedvac*. O pellet foi ressuspendido em 50µL de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA-Na₂ 1mM, pH 7,5), deixou-se durante a noite a 4°C, e guardou-se a -20°C.

O grau de pureza do DNA e a sua quantificação foram analisados no Nanodrop. Posteriormente os DNAs foram diluídos para uma concentração de 100ng/µL para posterior uso nas reações de amplificação por PCR.

5.2.3 Identificação de leveduras vínicas

A identificação de leveduras foi realizada através da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Esta técnica permite amplificar sequências específicas de DNA. Para que uma reação de PCR ocorra são necessários *primers* (sequências iniciadoras constituídas por cerca de 20 nucleótidos cada que hibridam em cadeias opostas e cercam a região alvo de DNA); Taq DNA polimerase e respetivo tampão; nucleótidos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e magnésio [61].

A identificação dos isolados pertencentes à espécie *S. cerevisiae* foi feita recorrendo à amplificação do gene MET2 com os *primers* MET2_F e MET2_R, específicos para o género da levedura *Saccharomyces*, e posterior análise de RFLP desse gene com a enzima de restrição EcoRI. A EcoRI cliva o gene MET2 de *S. cerevisiae* em dois fragmentos conhecidos de 369 e 211pb [47]. O protocolo realizado para esta identificação foi otimizado no Biocant.

Resumidamente, preparou-se a mistura de PCR num volume final de 50µL, de acordo com a tabela III.

Tabela III – Reagentes utilizados na preparação da mistura de PCR

Reagentes	Quantidade
PCR buffer	1 x
MgCl ₂	1,7 mM
dNTPs	0,2 mM
<i>primer</i> MET2_F	0,2 µM
<i>primer</i> MET2_R	0,2 µM
Taq polimerase	5 U
DNA	100 ng

Colocou-se as amostras no termociclador com o programa indicado na tabela IV.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Tabela IV – Ciclo da reação PCR MET2

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclo
94	3	1
94	1	
60	1	35
72	1,5	
72	5	1

Os produtos da amplificação foram analisados por electroforese.

As amostras com amplificação do gene MET2 foram posteriormente digeridas com a enzima EcoRI, de acordo com as instruções do fornecedor (New England Biolabs), a 37°C, durante a noite. De seguida, inativou-se a enzima a 65°C durante 20min, e analisaram-se os fragmentos resultantes da digestão por electroforese.

5.3 Caracterização fenotípica

Para proceder à caracterização fenotípica, foram seleccionadas 38 condições de crescimento, agrupadas da seguinte forma: nutrientes, iões metálicos, drogas, stresses ambientais e parâmetros biotecnológicos.

5.3.1 Condições de crescimento

A caracterização fenotípica foi realizada com 313 isolados de diferentes estirpes de *S. cerevisiae*. Estes isolados foram seleccionados de forma a testar um indivíduo de cada estirpe existente na coleção dos anos 2009 e 2010. A seleção dos indivíduos a testar foi feita com recurso ao software BioNumerics 6.5, onde se analisaram as bandas de fragmentos de DNA resultantes das electroforeses. O protocolo utilizado para o crescimento das leveduras é descrito em seguida.

Plaquarem-se as leveduras criopreservadas em meio YPD sólido (1% (m/V) de extrato de levedura, 2% (m/V) de glucose, 2% (m/V) de peptona e 2% (m/V) de agar), a 30°C, onde ficaram a crescer durante dois dias. De seguida, transferiu-se as leveduras para placas *Deep Well* de 96 poços com capacidade de 2mL, com 750µL de meio YPD líquido (1% (m/V) de extrato de levedura, 2% (m/V) de glucose e 2% (m/V) de peptona) em cada

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

poço, para que o crescimento ocorra durante a noite a 30°C e com agitação de 100rpm. Posteriormente, contaram-se as células (com o contador da BioRad TC10™ Automated Cell Counter) existentes em cada poço, e transferiu-se 1×10^6 células para placas *multi well* com um volume final de 200µL. Nestas placas realizaram-se diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), e transferiu-se através de uma *liquid handling station* (Sciclone ALH 3000 Workstation – Caliper LifeSciences) as amostras para as placas *single well* com os meios descritos em seguida.

5.3.1.1 Nutrientes

O crescimento das diferentes estirpes de *S. cerevisiae* foi avaliado em relação a diferentes fontes de carbono, fontes de azoto e aminoácidos. Em todas as avaliações, as leveduras cresceram durante dois dias, a 30°C.

As leveduras foram inoculadas em meio mínimo, constituído por 0,69% (m/V) de YNB sem aminoácidos e 2% (m/V) de agar, ao qual foi adicionado a respetiva fonte de carbono: 2% (m/V) de frutose, 20% (m/V) de frutose, 2% (m/V) de maltose, 2% (m/V) de sucrose, 2% (m/V) galactose, 2% (m/V) de rafinose, 2% (m/V) de glucose, 20% (m/V) de glucose e 10% (m/V) de glucose + 10% (m/V) de frutose. Foi também testado o glicerol como fonte de carbono através do meio YPG (1% (m/V) de extrato de levedura, 2% (m/V) de peptona, 2% (m/V) de agar e 3%(V/V) de glicerol).

Para a avaliação do crescimento das leveduras em relação às fontes de azoto, estas foram inoculadas em placas contendo 0,69% (m/V) de YNB sem aminoácidos, 2% (m/V) de glucose e 2% (m/V) de agar, e em placas com 0,19% (m/V) de YNB sem aminoácidos nem sulfato de amónio, 2% (m/V) de glucose e 2% (m/V) de agar.

Neste trabalho é avaliado também o crescimento das leveduras relativamente à presença de aminoácidos em meio mínimo, constituído por 0,19% (m/V) de YNB sem aminoácidos nem sulfato de amónio, 2% (m/V) de glucose e 2% (m/V) de agar, o qual foi suplementado com a respetiva concentração de aminoácido: 31% (m/V) de prolina, 50% (m/V) de prolina, 27% (m/V) de arginina, 50% (m/V) de arginina, 13% (m/V) de glutamato e 50% (m/V) de glutamato.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

5.3.1.2 Iões

A escolha dos iões metálicos e respetivas concentrações para avaliar o crescimento das diferentes leveduras foi baseado em estudos anteriores desenvolvidos no Biocant. As soluções *stock* dos iões foram preparadas por filtração estéril com uma membrana porosa de 0,2 μ m. Deste modo, os iões que foram adicionados ao meio YPD depois de este ter sido autoclavado e arrefecido a 55°C foram o sódio, cálcio, zinco, lítio, cobre e cádmio nas seguintes formas e concentrações: cloreto de sódio (NaCl) 1M; cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,5M; cloreto de zinco (ZnCl₂) 10mM; cloreto de lítio (LiCl) 50mM; sulfato de cobre (CuSO₄) 10mM; e cloreto de cádmio (CdCl₂) 500 μ M. Para todos os iões, as leveduras cresceram durante dois dias, a 30°C.

5.3.1.3 Drogas

A escolha das drogas e respetivas concentrações para avaliar o crescimento das diferentes leveduras foi baseado em estudos anteriores desenvolvidos no Biocant. As soluções *stock* das drogas foram preparadas por filtração estéril com uma membrana porosa de 0,2 μ m. Deste modo, as drogas que foram adicionadas ao meio YPD depois de este ter sido autoclavado e arrefecido a 55°C foram as seguintes: 0,2 μ g/mL de cicloheximida (água milliQ como solvente); 0,5 μ g/mL de 4-nitroquinolina (acetona como solvente); 2mg/mL de paromomicina (água milliQ como solvente); e 15mM de cafeína (água milliQ como solvente). Para todas as drogas, as leveduras cresceram durante dois dias, a 30°C.

5.3.1.4 Stresses ambientais

Os stresses ambientais testados nas diferentes estirpes de *S. cerevisiae* foram: temperatura e *stress* oxidativo.

Para a análise da temperatura preparou-se meio YPD, e incubaram-se as leveduras a diferentes temperaturas: 12°C, 30°C e 42°C. Para as temperaturas de 30°C e 42°C o crescimento ocorre durante dois dias, e para a temperatura de 12°C o crescimento ocorre durante uma semana.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

A avaliação do *stress* oxidativo foi realizada através da suplementação do meio YPD com 7mM de peróxido de hidrogénio, que é adicionado ao meio depois de este ser autoclavado e arrefecido a 55°C. De seguida, fez-se a incubação das leveduras durante dois dias, a 30°C.

5.3.1.5 Parâmetros biotecnológicos

Os parâmetros biotecnológicos testados foram: produção de sulfureto de hidrogénio, atividade proteinase, tolerância ao etanol, e tolerância ao dióxido de enxofre.

A capacidade de produção de sulfureto de hidrogénio pelas leveduras foi efetuado em meio Biggy agar, constituído por glucose, bismuto, glicina, extrato de leveduras e agar. Este meio não pode ser autoclavado, logo a sua preparação consiste na agitação da mistura com calor até que comece a ferver. De acordo com Caridi [62], as leveduras são incubadas durante dois dias, a 25°C, e quando há produção de sulfureto de hidrogénio, as colónias ficam escuras devido à precipitação do sulfureto de bismuto. Para testar a capacidade de produção de sulfureto de hidrogénio utilizaram-se apenas as leveduras sem diluição.

Para verificar se as leveduras possuíam atividade proteínase, foi preparado um meio YPD suplementado com 2% (m/V) de leite magro em pó. Seguindo o protocolo de Strauss [36], as leveduras foram incubadas durante cinco dias a 30°C, e caso haja atividade proteinase, verificou-se a formação de um halo transparente. Para avaliar a atividade proteinase utilizaram-se apenas as leveduras sem diluição.

Visto que durante o processo de vinificação existe elevada concentração de etanol, é importante realizar o teste de tolerância ao etanol pelas leveduras. Este teste é realizado em meio YPD suplementado com 12% (V/V) e 15% (V/V) de etanol em que o etanol foi adicionado ao meio depois de este ter sido autoclavado e arrefecido a 55°C. As leveduras cresceram durante dois dias, a 30°C.

Para avaliar a tolerância ao dióxido de enxofre, preparou-se um meio YPD suplementado com 200mg/mL de ácido sulfuroso (H₂SO₃). Este ácido foi adicionado ao meio depois de autoclavado e arrefecido a 55°C. Segundo Caridi [62], para verificar o crescimento das leveduras, as placas devem ser incubadas durante dois dias, a 30°C.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Após o final de cada crescimento, a placa foi fotografada, e o crescimento das colónias foi analisado através do registo do seu grau de crescimento, indicado na tabela V.

Tabela V – Classificação do crescimento das leveduras

Crescimento	Classificação
Não cresce	0
Crescimento fraco sem diluição	1
Crescimento bom sem diluição	2
Crescimento fraco na diluição 10^{-1}	3
Crescimento bom na diluição 10^{-1}	4
Crescimento fraco na diluição 10^{-2}	5
Crescimento bom na diluição 10^{-2}	6
Crescimento fraco na diluição 10^{-3}	7
Crescimento bom na diluição 10^{-3}	8

Para os testes em que não foram avaliados os crescimentos das leveduras com diluição, ou seja, a atividade proteinase e a produção de sulfureto de hidrogénio, a classificação do crescimento é de 0 para o resultado negativo e 1 para o resultado positivo.

Após a atribuição desta classificação, os resultados foram analisados no *software* Mev-4 MultiExperiment Viewer 4.7.4, tendo sido realizados testes estatísticos como a ANOVA e análises de *clustering* (*clusters* hierárquicos).

5.4 Caracterização metabolómica

Para a caracterização metabolómica foram selecionadas duas leveduras de *S. cerevisiae* existentes no laboratório de genómica do Biocant com as seguintes características: elevada resistência ao sulfato de cobre, tolerância a elevadas temperaturas, baixa produção de sulfureto de hidrogénio, atividade *killer*, elevada tolerância ao dióxido de enxofre e fermentação rápida (BT2453 e BT2652); e duas estirpes comerciais de *S. cerevisiae* (QA23 e EC1118).

5.4.1 Condições de crescimento

As leveduras criopreservadas foram plaqueadas em meio YPD sólido e incubadas a 30°C, durante dois dias. De seguida repicou-se uma colónia isolada do meio, e transferiu-se para um falcon de 50mL com 10mL de meio YPD líquido, para que o crescimento ocorresse durante a noite, a 30°C, e com agitação moderada de 100rpm. Posteriormente, inocularam-se 10⁶ células (contadas com o TC10™ Automated Cell Counter) de cada estirpe, transferiu-se essas células para 20mL de meio de cultura líquido SD (0,69% (m/V) de YNB sem aminoácidos e 2% (m/V) de glucose) e colocou-se a 30°C, num agitador orbital a 160rpm, durante 25h. Todas as estirpes foram crescidas em triplicados.

A cultura de células foi transferida para um *vial* de 60mL contendo um magnete e 4g de NaCl 99,5%, que foi encapsulado com um septo de teflon (PTFE) e uma tampa de alumínio. O *vial* foi colocado a -80°C de modo a parar o crescimento celular. Como controlo, realizado em triplicado, utilizou-se 20mL de meio SD, também congelado a -80°C em *vials* de 60mL com magnete e 4g de NaCl 99,5%.

5.4.2 Extração de metabolitos voláteis por microextração em fase sólida (HS-SPME)

Os compostos voláteis das leveduras foram extraídos por HS-SPME. Para tal, o *vial* contendo as células de *S. cerevisiae* foi submerso num banho a 40,0±0,1°C, durante 15min, e com agitação de 400rpm. Após os 15min, introduziu-se a fibra de SPME (DVD/CAR/PDMS) no espaço cabeça durante 45min, de forma a promover a extração dos compostos voláteis das leveduras.

Após os 45min, recolheu-se a fibra para o interior do suporte e injetou-se no GCxGC-ToFMS. Este procedimento foi efetuado para cada uma das 3 réplicas, incluindo o controlo.

5.4.3 Análise por cromatografia bidimensional em fase gasosa acoplada a um espectrómetro de massa por tempo de voo (GCxGC-ToFMS)

Após o passo de extração/concentração, a fibra de SPME foi introduzida manualmente no injetor (250°C) do GCxGC-ToFMS LECO Pegasus 4D, onde foi mantida

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

durante 3min para desorção. O injetor estava equipado com um *splitless* linear de vidro de 0,75mm de diâmetro interno (I.D.), sendo que as injeções ocorreram em modo *splitless* (30s). O sistema LECO Pegasus 4D GCxGC-ToFMS consiste num cromatógrafo de gás Agilent GC 7890A, com duas colunas, e com um detetor de alta velocidade: espectrómetro de massa ToF. A coluna Equity-5 (30m×0,32mm I.D., filme de espessura 0,25µm, J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) foi usada como coluna de primeira dimensão, e a DB-FFAP (0,79m×0,25mm I.D., filme de espessura 0,25µm, J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) foi usada como coluna de segunda dimensão. O gás de arraste foi hélio, a uma velocidade de fluxo constante de 2,50mL/min. O forno primário estava programado para uma temperatura inicial de 40°C (1min), aquecendo até 230°C (2min) a 10°C/min. O forno secundário estava programado para 70°C (1min), aquecendo até 250°C (3min) a 10°C/min. A temperatura da linha de transferência para o MS foi de 250°C, e a temperatura da fonte de MS é de 250°C. O tempo de modulação é de 5s; a temperatura do modulador foi mantida a 20°C (acima do forno primário). O ToFMS operou a uma taxa de armazenamento de 125 espectros/s. O espectrómetro de massa operou a 70eV, usando um intervalo de 33-350m/z, e a voltagem do detetor foi de -1786V.

Os cromatogramas de iões totais (TIC) foram processados usando o software ChromaTOF (LECO) de processamento de dados automático, com um ruído de 100. Os gráficos de contorno foram usados para avaliar a qualidade geral de separação e para a identificação manual dos picos, e possuem um ruído de 50.

5.4.4 Identificação dos metabolitos voláteis

Os compostos voláteis foram identificados através da análise de espectros de massa e pela sua comparação com espectros existentes nas bibliotecas de bases de dados comerciais disponíveis no *software* do GCxGC-ToFMS: *Wiley*, *US National Institute of Science and Technology* (NIST), *Mainlib* e *Replib*; e com os padrões existentes no laboratório. O critério selecionado para determinar se os compostos estavam bem identificados foi a identificação de espectros de massa e sua comparação com os espectros das bases de dados; e a comparação de índices de *kovats*, ou seja, por comparação entre os índices de retenção determinados experimentalmente e aqueles que estão descritos na literatura para a mesma coluna ou semelhante. Os índices de retenção são obtidos

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

utilizando a série de alcanos C₈-C₂₀. Outro parâmetro tido em conta na identificação dos compostos foi a sua comparação com padrões puros, existentes no laboratório.

5.4.5 Análise estatística dos metabolitos identificados

Para avaliar as diferenças entre estirpes em relação à produção dos compostos voláteis produzidos foi realizado uma análise de componentes principais aplicado às áreas dos compostos identificados por HS-SPME-GCxGC-ToFMS nas 4 estirpes de *S. cerevisiae*, cada uma com 3 réplicas; e à família dos compostos terpénicos. A normalização foi feita subtraindo a média e dividindo pelo desvio padrão com o objetivo de conseguir extrair a maior variabilidade.

Estudo da biodiversidade de estirpes v\u00ednicas de *S. cerevisiae*

Resultados e Discuss\u00e3o

6. Resultados e Discussão

6.1 Isolamento e identificação de leveduras vínicas

Para a identificação de leveduras vínicas temos amostras provenientes de diversas adegas de diferentes regiões vitivinícolas de Portugal (tabela VI) e amostras cuja fermentação ocorreu no laboratório do Biocant, provenientes da Bairrada (tabela VII).

Tabela VI – Amostras de finais de fermentação provenientes das adegas de Portugal

Região Vitivinícola de Portugal	Casta	Código da amostra	Número de isolados
Dão	Touriga Nacional	DT0106	30
	Alfrocheiro	DAx0106	30
	Jaen	DJ0106	30
Douro	Tinta Roriz	DrTR0106	30
	Touriga Franca	DrTF0106	30
	Touriga Nacional	DrT0106	30
Alentejo	Tinta Roriz	AITR0106	30
	Touriga Nacional	AIT0106	30
	Trincadeira	AITi0106	30
Bairrada	Baga	BB1006	30
	Mª Gomes	BM1006	30
	Bical	BBi1006	30

Tabela VII – Amostras de fermentações decorridas no laboratório provenientes da Bairrada

Região Vitivinícola de Portugal	Casta	Código da amostra	Número de isolados
Bairrada	Mª Gomes	BM1219	450
	Bical	BBi0819	450

Após o esmagamento das uvas, as amostras foram pesadas diariamente. Considerámos que os mostos tinham entrado em fermentação quando se registou uma perda de peso de 2g/L, e a fermentação foi considerada terminada quando se registou uma perda de peso de 70g/L. Normalmente, o fim de fermentação é considerado quando ocorre uma perda de 100g/L onde existe quase exclusivamente a levedura que realizou toda a

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

fermentação, no entanto foi escolhido um valor inferior para se encontrar maior variabilidade de leveduras.

Terminada a fermentação, foram isoladas as leveduras presentes no mosto, e posteriormente foram identificadas molecularmente. No total, foram isoladas 1260 leveduras, às quais se analisou o gene MET2, específico do género *Saccharomyces*. Assim, em caso de amplificação, é possível identificar o isolado como pertencente ao género *Saccharomyces*. As amplificações de PCR foram analisadas por electroforese (figura 6).

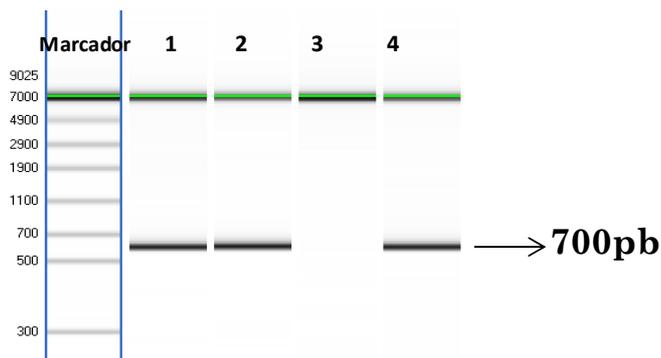


Figura 6 – Resultados do PCR para o gene MET2 de 4 isolados de leveduras

Dos 1260 isolados, houve uma amplificação positiva do gene MET2 de 1011 (80%), indicando que estes isolados são do género *Saccharomyces*. Estes resultados estão representados graficamente na figura 7. Os isolados cujo gene MET2 não foi amplificado serão analisados fora do âmbito deste trabalho.

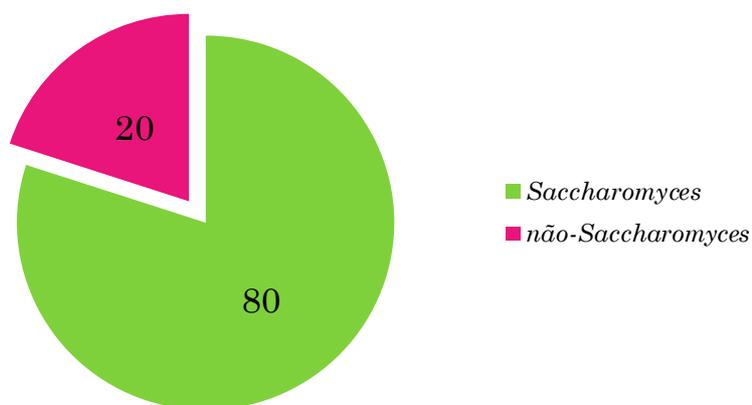


Figura 7 – Representação gráfica dos resultados obtidos por amplificação do gene Met2, em percentagem

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Assim, das 1011 *Saccharomyces*, é importante saber quais são do tipo *S. cerevisiae*. Para tal recorreu-se à técnica de RFLP com a enzima de restrição EcoRI. Esta enzima corta o fragmento obtido pela amplificação do gene MET2 em dois fragmentos mais pequenos. Quando o tamanho desses dois fragmentos é de 211pb e 369pb, significa que estamos na presença de *S. cerevisiae* [24]. A figura 8 demonstra alguns dos resultados obtidos por electroforese após a restrição com EcoRI.

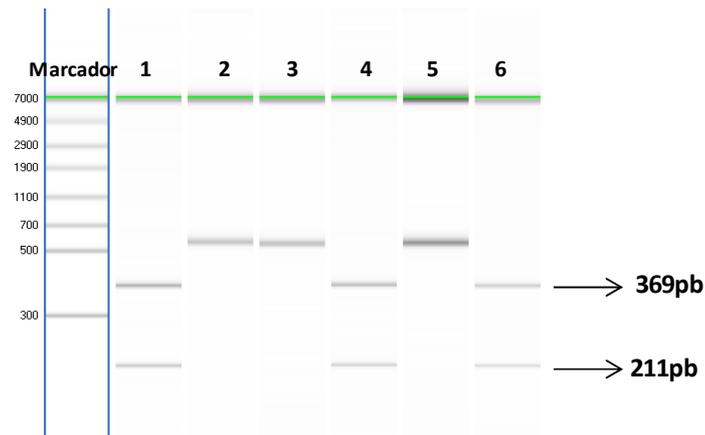


Figura 8 – Resultados da restrição do gene MET2 com a enzima EcoRI de 6 isolados de *Saccharomyces*

Dos 1011 isolados de *Saccharomyces*, houve restrição do gene MET2 de 883 (88%), indicando que estes isolados pertencem à espécie *S. cerevisiae*. Então, dos 1260 isolados, 70% pertencem a *S. cerevisiae* (figura 9). Os isolados onde não houve restrição do gene MET2 serão analisados fora do âmbito deste trabalho.

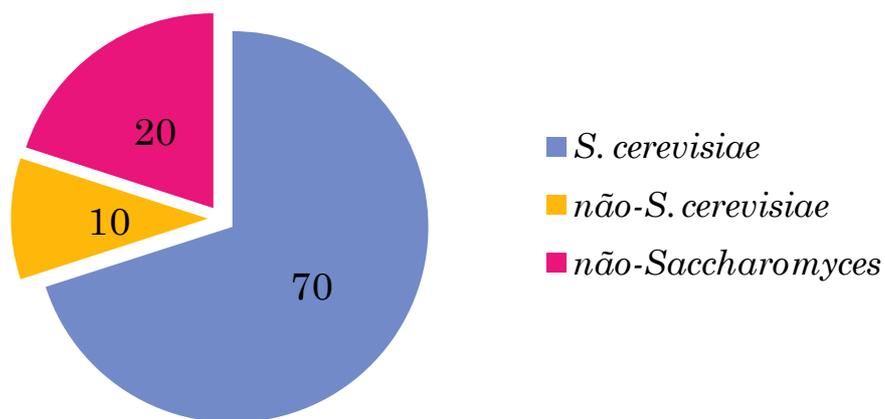


Figura 9 – Representação gráfica dos resultados da restrição com EcoRI, em percentagem

Estudo da biodiversidade de estirpes v\u00ednicas de *S. cerevisiae*

Estes resultados est\u00e3o de acordo com a bibliografia, pois v\u00e1rios autores demonstraram que a *S. cerevisiae* \u00e9 a levedura predominante nos finais de fermenta\u00e7\u00e3o [9-11, 48]. Deste modo, o estudo da variabilidade gen\u00e9tica \u00e9 importante para saber quais as leveduras que fermentam os vinhos em regi\u00f5es espec\u00edficas.

Ap\u00f3s a identifica\u00e7\u00e3o da levedura predominante nos finais da fermenta\u00e7\u00e3o procedeu-se \u00e0 identifica\u00e7\u00e3o das estirpes existentes nos isolados de *S. cerevisiae*. Para tal, efectuaram-se testes fen\u00f3tipicos e metabol\u00f3micos de modo a saber quais as caracter\u00edsticas e qual a influ\u00eancia dessas estirpes na qualidade final do vinho. Os procedimentos foram realizados em leveduras existentes no laborat\u00f3rio e isoladas em anos anteriores.

6.2 Caracteriza\u00e7\u00e3o fen\u00f3tipica de *S. cerevisiae*

Para proceder \u00e0 caracteriza\u00e7\u00e3o fen\u00f3tipica seleccionou-se um total de 1496 leveduras agrupadas em 313 estirpes de acordo com os seus perfis interdelta (gen\u00f3tipo). Estas estirpes j\u00e1 existiam no laborat\u00f3rio, e resultaram de um processo de isolamento semelhante ao descrito anteriormente. Na tabela VIII est\u00e3o representadas as castas das quais surgiram as diferentes estirpes para an\u00e1lise.

Tabela VIII – N\u00famero de leveduras existentes em cada casta

Regi\u00e3o	Castas	N\u00famero de estirpes de leveduras	Ano de isolamento
A\u00e7ores	Arinto	16	2010
A\u00e7ores	Verdelho	2	2010
Alentejo	Trincadeira	20	2010
Alentejo	Touriga Nacional	18	2010
Alentejo	Tinta Roriz	10	2010
Bairrada	Baga	52	2009
Bairrada	Baga	10	2010
Bairrada	Touriga Nacional	4	2010
Bairrada	Tinta Roriz	2	2010
D\u00e3o	Touriga Nacional	5	2009
D\u00e3o	Touriga Nacional	10	2010
D\u00e3o	Alfrocheiro	18	2009
D\u00e3o	Alfrocheiro	13	2010
D\u00e3o	Jaen	16	2009
D\u00e3o	Jaen	13	2010
Douro	Touriga Nacional	10	2009
Douro	Touriga Nacional	7	2010

Estudo da biodiversidade de estirpes v\u00ednicas de *S. cerevisiae*

Douro	Touriga Franca	12	2009
Douro	Touriga Franca	5	2010
Douro	Tinta Roriz	10	2009
Douro	Tinta Roriz	10	2010
Estremadura	Piriquita	3	2010
Estremadura	Touriga Nacional	15	2010
Estremadura	Tinta Roriz	8	2010
Madeira	Malvazia	20	2010
M\u00ednho	Alvarinho	1	2010
M\u00ednho	Loureiro	2	2010
7 Regi\u00f5es	13 Castas	313 Estirpes	

As 313 estirpes de *S. cerevisiae* selecionadas foram ent\u00e3o sujeitas a 38 testes de crescimento em triplicado, descritos em seguida.

Nutrientes

Para a fermenta\u00e7\u00e3o, as leveduras, necessitam de v\u00e1rios nutrientes, dos quais se destacam o azoto e o carbono.

Por vezes as leveduras n\u00e3o encontram diretamente azoto no meio, logo t\u00eam de recorrer a diversas vias para a sua obten\u00e7\u00e3o. A forma mais comum para a obten\u00e7\u00e3o de azoto \u00e9 atrav\u00e9s dos amino\u00e1cidos e da am\u00f3nia. Neste trabalho foram testados meios com os amino\u00e1cidos mais utilizados pelas leveduras (prolina, arginina e glutamato) nas concentra\u00e7\u00f5es em que se encontravam no mosto e em concentra\u00e7\u00f5es em excesso, num meio com sulfato de am\u00f3nio, e para ambos os casos se verificou as leveduras crescerem entre os graus 5 e 8 (tabela V), representado na figura 10.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

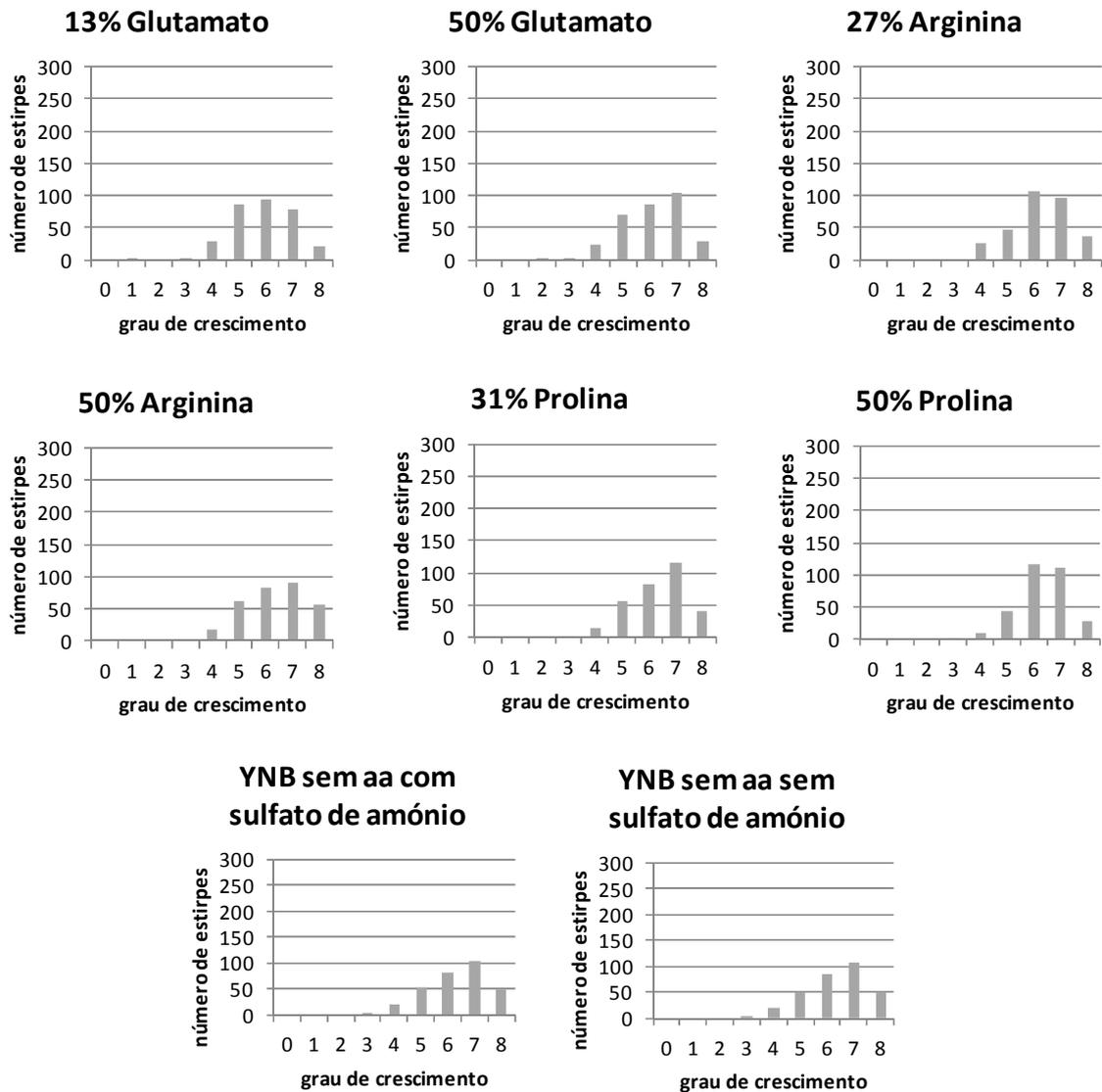


Figura 10 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras na presença de aminoácidos e fontes de azoto

Apesar da glucose ser o açúcar preferencialmente metabolizado pela *S. cerevisiae*, esta também é capaz de fermentar outras hexoses como fontes de carbono. De todos os meios com fontes de carbono testados neste trabalho, verificou-se um crescimento entre os graus 5 e 8 em todos, exceto para a maltose e galactose, onde houve leveduras que não conseguiram usar nem a galactose nem a maltose como fonte de carbono (figura 11).

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

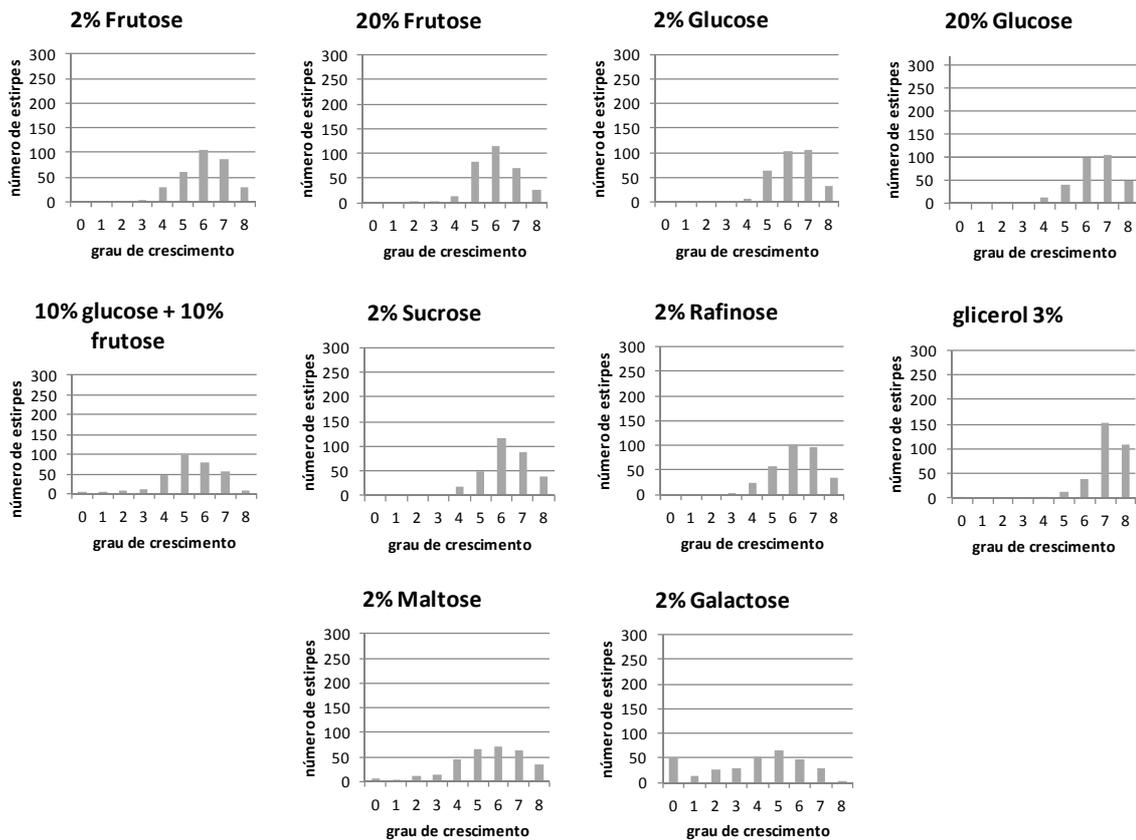


Figura 11 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras na presença de fontes de carbono

Iões

Bruins [33] defendeu que os metais são essenciais para as leveduras desempenhando diversas funções nos seus processos celulares, no entanto em quantidades elevadas tornam-se tóxicos. O estudo do crescimento de leveduras em meios com iões torna-se importante para verificar qual o seu comportamento na sua presença, e deste modo a possibilidade de distinção de estirpes.

Neste trabalho verificou-se que na presença de cálcio 156 (50%) leveduras cresceram até aos graus 5 e 6, e 118 (38%) até aos graus 7 e 8. Na presença de zinco verifica-se o contrário, isto é, grande parte das leveduras (92%) não crescem na presença deste ião. Para os iões cádmio, lítio, cobre e sódio, verificou-se uma grande variação no crescimento. O sódio foi utilizado numa concentração de 1M (no dobro da osmolaridade do mosto) provocando uma situação de stress nas leveduras, o que levou a que 27% das leveduras não crescessem na presença deste ião. Para o lítio verificou-se que 73 (23%)

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

leveduras não cresceram na presença deste; e em relação ao cobre, apenas 69 (22%) leveduras apresentaram resistência máxima a este ião (figura 12).

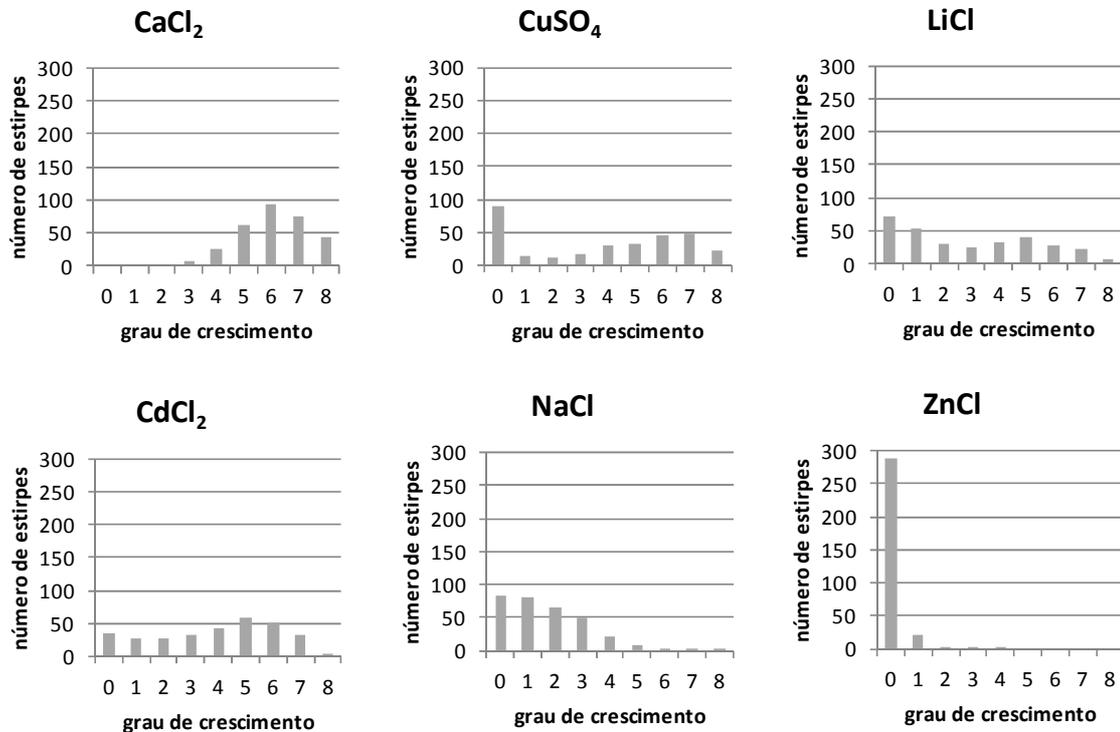


Figura 12 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras em YPD suplementado com iões

Drogas

O principal objetivo com o uso de drogas neste trabalho, além da distinção de estirpes, é a sua ação sobre os diferentes alvos celulares, desencadeando diferentes respostas fisiológicas nas leveduras [34]. A paromomicina e a cicloheximida atuam a nível da síntese proteica, e a 4-nitroquinolina atua a nível do DNA (danifica a cadeia de DNA levando à remoção de nucleótidos), e para os meios com estas drogas as leveduras cresceram entre os graus 5 e 8. A cafeína atua a nível da transdução de sinais, e neste verificou-se grande variabilidade na resposta das leveduras, pois estas tanto cresceram até ao grau 8 como não cresceram (grau 0) na presença desta droga (figura 13).

Estudo da biodiversidade de estirpes v\u00ednicas de *S. cerevisiae*

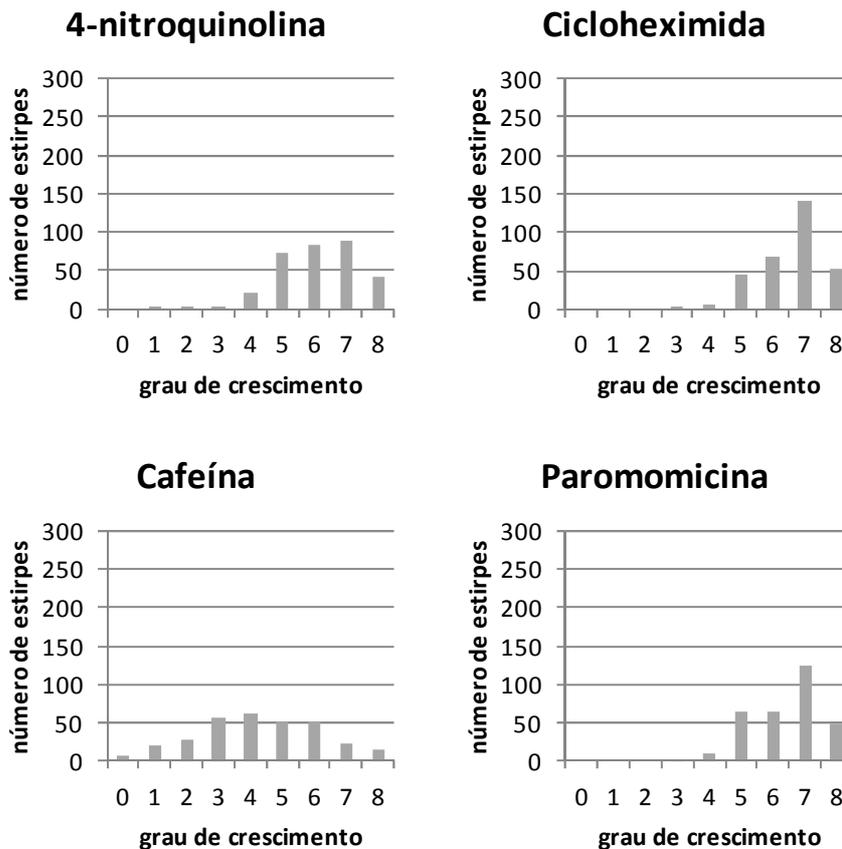


Figura 13 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras na presen\u00e7a de drogas

Stresses ambientais

Durante o ano verificam-se grandes oscila\u00e7\u00f5es de temperatura: temperaturas baixas no Inverno, e temperaturas elevadas no Ver\u00e3o. As adegas est\u00e3o tamb\u00e9m sujeitas a oscila\u00e7\u00f5es de temperatura pois estas ainda n\u00e3o possuem sistemas de controlo de temperatura.

Como a temperatura \u00e9 um par\u00e2metro que influencia as capacidades fermentativas das leveduras, \u00e9 importante que as leveduras possuam n\u00e3o s\u00f3 resist\u00eancia a elevadas temperaturas para que consigam fermentar o vinho ao final de fermenta\u00e7\u00e3o, mas tamb\u00e9m resist\u00eancia a baixas temperaturas pois, por vezes, estas s\u00e3o utilizadas para aumentar as propriedades organol\u00e9ticas do produto final [2]. Assim, como os fatores bi\u00f3ticos e abi\u00f3ticos s\u00e3o determinantes na qualidade final do vinho, neste trabalho estudou-se a influ\u00eancia do *stress* oxidativo e o efeito das varia\u00e7\u00f5es de temperatura.

Para verificar a resposta ao *stress* oxidativo foi adicionado ao meio YPD 7mM de per\u00f3xido de hidrog\u00e9nio. Neste meio verificou-se que 186 (59%) leveduras cresceram at\u00e9

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

aos graus 7 e 8. À temperatura de 30°C, todas as *S. cerevisiae* estudadas neste trabalho cresceram até aos graus 7 e 8, tal como esperado visto que é a sua temperatura ótima de atuação. A 12°C verificou-se que 206 (66%) das leveduras cresceram até aos graus 7 e 8 e que as restantes cresceram até aos graus 5 e 6. Por fim, a 42°C verificou-se uma maior variação nos graus de crescimento, sendo que 184 (59%) leveduras não cresceram a esta temperatura (figura 14).

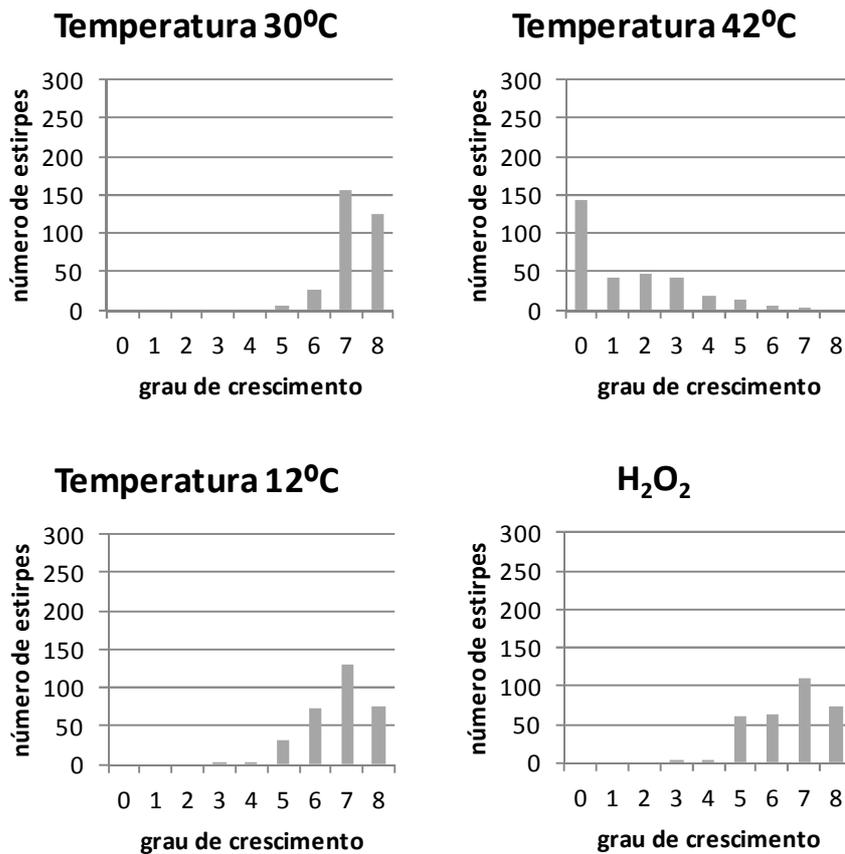


Figura 14 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras a diferentes temperaturas e na presença de peróxido de hidrogénio

Parâmetros biotecnológicos

Os parâmetros biotecnológicos escolhidos neste trabalho foram a tolerância ao etanol, tolerância ao dióxido de enxofre, produção de sulfureto de hidrogénio e atividade proteinase, representados em seguida (figura 15).

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

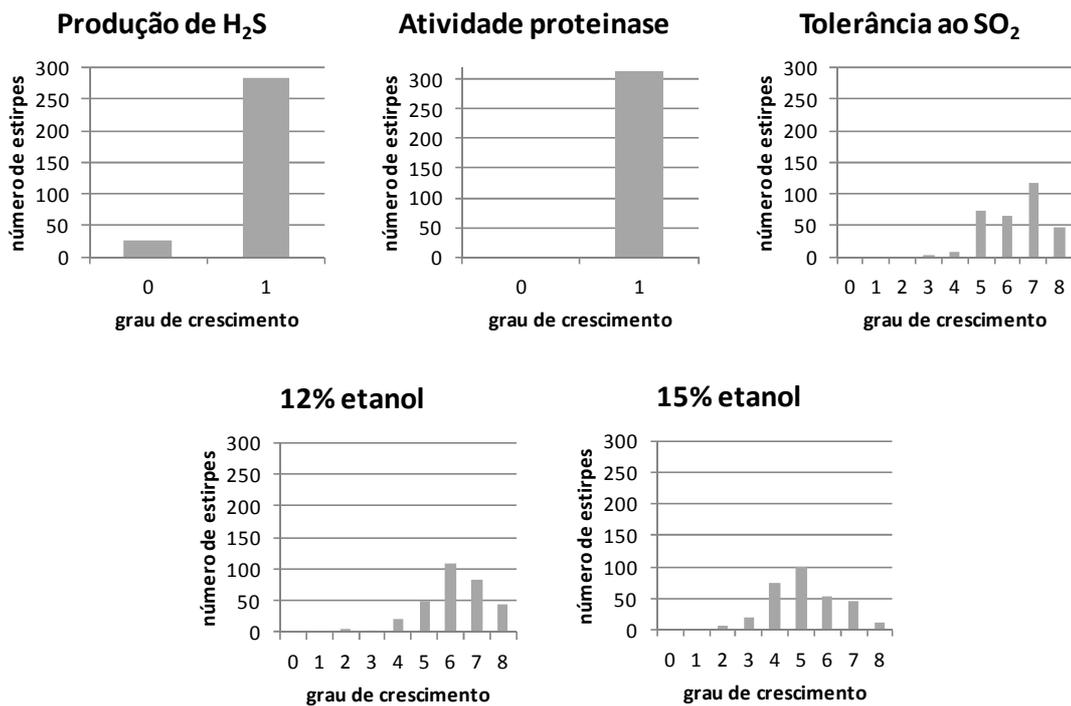


Figura 15 – Grau de crescimento de diferentes estirpes de leveduras na sua produção de sulfureto de hidrogénio, atividade proteinase, tolerância ao dióxido de enxofre e na presença de etanol

Visto que durante o processo fermentativo existe elevada quantidade de etanol no mosto [19] e que as leveduras são as grandes produtoras deste composto, neste trabalho estudou-se o crescimento das leveduras num meio com 12 e 15% de etanol. Com 12 % de etanol verificou-se que 286 (92%) leveduras cresceram entre os graus 5 e 8, e com 15% de etanol verificou-se que apenas 19% das leveduras atingiram os graus superiores de crescimento.

O dióxido de enxofre é um agente antimicrobiano e antioxidante que é adicionado ao mosto em várias fases do processo de fermentação, daí a importância do seu estudo. Deste modo, é importante que as leveduras possuam tolerância a este composto, ou seja, as leveduras deveriam crescer até ao último grau. De acordo com a figura 15 verificou-se que 165 (53%) leveduras cresceram até aos graus 7 e 8, e 137 (44%) até aos graus 5 e 6.

Strauss [36] defendeu que as leveduras podem produzir enzimas importantes, tais como pectinase, protease, glucanase, β -glucosidase, celulase, xilanase e amílase, que podem vir a ser utilizadas na produção de vinho. Neste trabalho foi analisada a capacidade que a *S. cerevisiae* possui na produção de atividade proteinase, tendo-se verificado que nenhuma das leveduras apresentou esta capacidade. Este resultado está de acordo com o

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

esperado, pois segundo Esteve-Zarzoso [63] a *S. cerevisiae* não produz quantidades significativas de enzimas extracelulares.

Relativamente à produção de sulfureto de hidrogénio, segundo os resultados obtidos apenas 9% das estirpes não produziram este composto. Este, sulfureto de hidrogénio, é responsável pelos odores desagradáveis do vinho, nomeadamente o odor a ovos podres [64], sendo produzido pelas leveduras devido aos níveis de enxofre existentes nas uvas e aos tratamentos efetuados nas vinhas.

Integração dos dados de fenotipagem

Com os resultados obtidos na caracterização fenotípica foi efetuado um *cluster* hierárquico de todas as leveduras (através do software Mev-4) agrupadas com base no seu perfil fenotípico, tendo-se verificado um elevado número de grupos. Este, corresponde ao resultado esperado visto que inicialmente o critério de seleção dessas estirpes foi a diversidade genética e a diversidade de regiões. Realizou-se também uma ANOVA a todas as estirpes onde se verificou que 292 (93%) leveduras apresentavam um comportamento estatisticamente significativo ($p < 0,01$), ou seja, nas 313 estirpes existem 292 fenótipos diferentes. A partir desses dados foram utilizados os critérios de seleção, mais comumente utilizados em leveduras, para determinar aquelas que possuíam potencial enológico, como: tolerância a etanol; tolerância a diversas temperaturas; resistência ao cobre; tolerância ao dióxido de enxofre e baixa produção de sulfitos. Tais leveduras estão representadas na figura seguinte (figura 16).

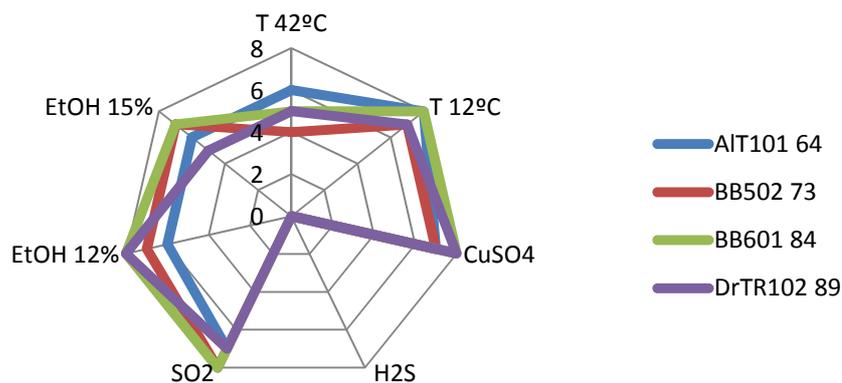


Figura 16 – Leveduras com potencial enológico e suas características fenotípicas

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Considerando as condições que são utilizadas na seleção de leveduras vínicas, isto é, resistência ao cobre, resistência ao dióxido de enxofre, a não produção de sulfureto de hidrogénio, tolerância a elevadas e baixas temperaturas e resistência ao etanol, foi possível encontrar quatro leveduras com potencial enológico: AIT101 64, BB502 73, BB601 84 e DrTR102 89 provenientes de três regiões vitivinícolas de Portugal – Alentejo, Bairrada e Douro.

Assim, tal como em outros estudos, verificou-se que o método de fenotipagem é importante pois permite pré-selecionar as leveduras com as características desejadas para inocular no vinho. Esteve-Zarzoso [63] no seu trabalho estudou a fermentação natural da área de “El Penedès” (Espanha) para isolar e selecionar as estirpes que levavam a fermentação até ao fim. Para tal, analisou a flora microbiana presente nas fermentações naturais dos vinhos produzidos por 5 variedades de uvas, tendo realizado uma caracterização molecular das leveduras do género *Saccharomyces*, e testado vários parâmetros enológicos (composição volátil; açúcares residuais; dióxido de enxofre; sulfureto de hidrogénio; grau alcoólico, entre outros). Neste trabalho, Esteve-Zarzoso verificou uma grande diferença fenotípica entre estirpes de leveduras, podendo essa diferença ser utilizada para selecionar estirpes de interesse para fermentar os vinhos. As características mais interessantes que Esteve-Zarzoso encontrou foram: resistência ao cobre, resistência ao dióxido de enxofre, baixa produção de sulfureto de hidrogénio, tolerância a elevadas temperaturas e produção de compostos voláteis de interesse (ésteres, terpenos, álcoois e ácidos).

Noutro estudo, Camarasa [18] investigou a adaptação de 72 leveduras a várias condições de fermentação com o intuito de gerar fenótipos específicos. Os resultados obtidos sugerem que a *S. cerevisiae* emprega diversas estratégias metabólicas para enfrentar as restrições ambientais, e que as suas estirpes podem ser distinguidas com base em características específicas como a presença de açúcares no meio, a produção de acetato, entre outros. Deste modo, Camarasa conclui que a evolução das características fenotípicas das leveduras é impulsionada pelas restrições ambientais e /ou pela seleção humana.

Após a fenotipagem efectuou-se o estudo do exo-metaboloma das leveduras, isto é, o estudo dos metabolitos que são libertados pela *S. cerevisiae*. Muitos destes metabolitos são voláteis e alguns deles são responsáveis pelo aroma do vinho, tendo impacto na sua qualidade final.

6.3 Caracterização metabolômica de *S. cerevisiae*

Neste trabalho, a caracterização metabolômica foi efetuada em duas leveduras provenientes da Bairrada, com características de elevada resistência ao sulfato de cobre, tolerância a elevadas temperaturas, baixa produção de sulfureto de hidrogénio, atividade *killer*, elevada tolerância ao dióxido de enxofre e fermentação rápida: BT2453 e BT2652; e em duas leveduras comerciais muito utilizadas na fermentação de vinhos: QA23 e EC1118.

Na figura seguinte (figura 17) está representado o cromatograma estruturado da estirpe comercial de *S. cerevisiae* EC1118.

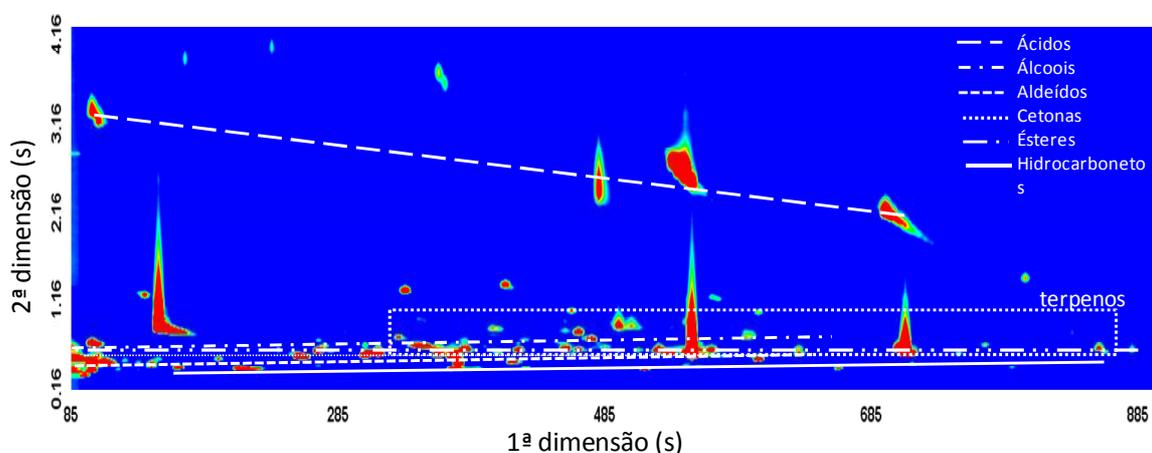


Figura 17 - Cromatograma de GCxGC-ToFMS da estirpe EC1118, onde está representada a localização das famílias dos ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres hidrocarbonetos e terpenos

A figura 17 representa um cromatograma obtido através do GCxGC para a estirpe EC1118, onde estão representadas as famílias maioritárias dos compostos identificados: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, hidrocarbonetos e terpenos. Verifica-se que há uma dispersão dos vários metabolitos ao longo da primeira dimensão de acordo com a sua volatilidade e ao longo da segunda dimensão de acordo com a sua polaridade. Assim, os compostos estruturalmente relacionados, i.e. da mesma família química, ocupam o mesmo espaço cromatográfico. Por exemplo, os ácidos apresentam os tempos de retenção mais elevados da segunda dimensão, pois são muito polares. Por outro lado, os hidrocarbonetos apresentam os menores tempos de retenção da segunda dimensão pois são compostos apolares. Esta característica única da estruturação do cromatograma é particularmente importante para a análise de matrizes complexas, como o caso em estudo, pois é auxiliar

fundamental na tentativa de identificação de compostos, mesmo nos casos em que não existem padrões disponíveis.

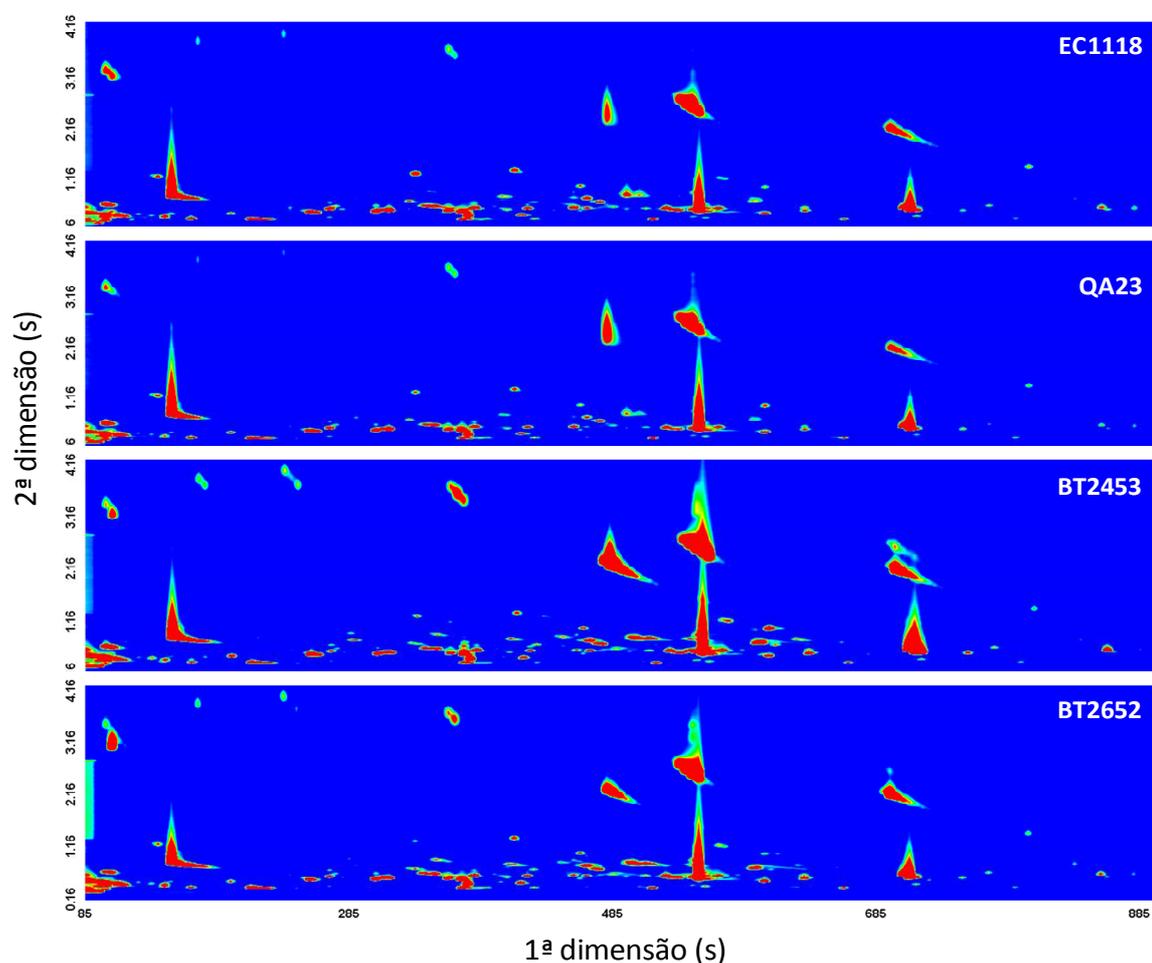


Figura 18 - Cromatograma de GCxGC das estirpes BT2453, BT2652, EC1118 e QA23

Na figura 18 encontram-se os cromatogramas obtidos para as 4 estirpes. Cada um destes cromatogramas funciona como uma impressão digital da amostra. Uma breve análise visual permite realçar que há um padrão global comum a todas as estirpes, e uma análise mais detalhada permite inferir que a estirpe BT2453 é aquela que produz um maior número de compostos e em maior quantidade. Por outro lado, a estirpe QA23 é aquela que produz menor número de compostos.

O processamento destes cromatogramas permitiu a identificação de 218 metabolitos cujos resultados estão reportados na tabela A1 em anexo. Esta tabela inclui também as áreas cromatográficas obtidas para as diferentes estirpes e parâmetros cromatográficos que permitiram confirmar a identificação dos metabolitos.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Uma forma simplificada de exposição dos resultados da tabela A1 é apresentada na figura 19. Os compostos estão organizados por famílias químicas e observa-se uma grande variabilidade entre as 4 estirpes estudadas, com exceção dos ácidos, aldeídos e hidrocarbonetos. A estirpe BT2453 apresenta-se bastante diferente das restantes e exibe um maior número de compostos, tal como confirmado na figura 20. O número de metabolitos identificados por estirpe variou entre 155 e 218, sendo que a estirpe BT2453 foi a que apresentou um maior número de compostos.

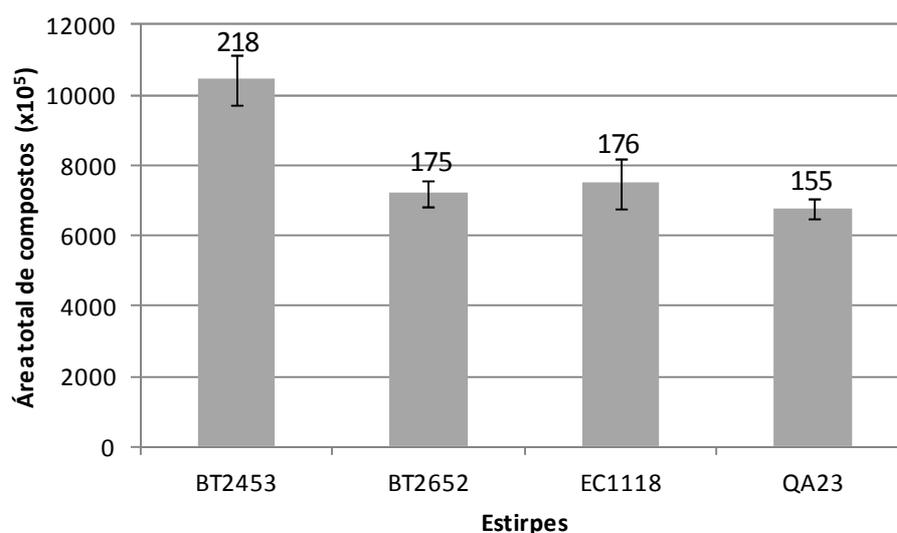


Figura 20 – Área total de compostos e indicação do número total de compostos determinados para cada estirpe

Para confirmar a identificação dos compostos produzidos pelas quatro estirpes de *S. cerevisiae* estudadas neste trabalho (tabela X), comparou-se o índice de retenção determinado experimentalmente com o índice de retenção da literatura para cada composto. Compararam-se também os espectros de massa obtidos experimentalmente com os que constam nas bases de dados do GCxGC, e ainda com os padrões existentes no laboratório.

Identificaram-se no total 11 ácidos nas estirpes de *S. cerevisiae* estudadas, sendo que 7 deles se encontraram em todas as estirpes. Os ácidos octanóico e iso-valérico foram os maioritários, sendo conhecidos pelo seu aroma a vinagre, daí influenciarem negativamente o perfil sensorial dos vinhos [65]. As estirpes BT2453 e BT2653 produziram todos os ácidos identificados.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Em relação aos álcoois, foram identificados 61 álcoois nas 4 estirpes, sendo que 16 deles foram produzidos por todas as estirpes. Tal como já foi referido anteriormente, os álcoois derivam dos aminoácidos (via de Ehrlich), glicólise, biossíntese de esteróis (figura 2). Os álcoois com 6 carbonos são aqueles que conferem um aroma herbáceo aos vinhos, sendo que nestas estirpes foram produzidos em pequenas quantidades. As estirpes BT2453 e EC1118 foram as que produziram mais álcoois, com um total de 40 identificados em cada uma.

Os aldeídos são compostos que derivam da descarboxilação dos ácidos, e que posteriormente vão originar álcoois (figura 2). Neste trabalho foram identificados 10 aldeídos, sendo que 4 deles são comuns às 4 estirpes de *S. cerevisiae*, no entanto são produzidos em baixas quantidades. A estirpe BT2453 foi aquela que produziu mais aldeídos.

As cetonas são resultantes da oxidação direta dos álcoois e ácidos correspondentes [66]. Identificaram-se no total 49 cetonas, sendo que 22 delas são comuns às 4 estirpes. Mais uma vez, a estirpe BT2453 foi aquela que produziu mais cetonas.

Os compostos terpénicos são conhecidos por serem responsáveis pelo carácter varietal dos vinhos, e neste estudo foram identificados 18 terpenos diferentes, sendo que 9 deles são comuns às 4 estirpes. Destes, o linalol foi aquele que foi produzido em maior quantidade por todas as estirpes, devendo ser-lhe dada atenção especial pois é um monoterpenol que realça as características florais e frutadas dos vinhos, apenas em baixas concentrações [67]. A estirpe BT2453 foi aquela que produziu mais compostos terpénicos, e a que produziu linalol em maior quantidade.

Identificaram-se no total 56 ésteres neste trabalho, sendo que 18 deles são comuns às 4 estirpes. Os ésteres derivam do metabolismo dos ácidos gordos e da glicólise (figura 2). O acetato de etilo é o componente mais importante da volatilidade dos vinhos [39] e é sintetizado pelas acetiltransferases da *S. cerevisiae*, melhorando os aromas florais e frutados dos vinhos [45]. Mais uma vez, a estirpe BT2453 foi aquela que produziu mais ésteres.

Neste estudo foram identificados 27 hidrocarbonetos, sendo que 8 deles são comuns às 4 estirpes. A origem dos hidrocarbonetos deve-se, provavelmente, do ar do laboratório, do branco e do método de preparação da amostra [42]. A estirpe QA23 foi aquela onde se

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

identificaram mais hidrocarbonetos, e a estirpe BT2453 foi a que produziu menos hidrocarbonetos.

Observando a tabela X e o heatmap da figura 19 foi possível concluir que as famílias dos álcoois e dos ésteres são as famílias maioritárias, tal como nos vinhos, e que existe variabilidade na produção de metabolitos nas quatro estirpes estudadas.

A análise de componentes principais foi usada para estudar as maiores fontes de variabilidade das estirpes. A figura 21A representa o gráfico das duas componentes principais das 4 estirpes de *S. cerevisiae* estudadas: BT2453, BT2652, EC1118 e QA23, e explica 95% de variabilidade. Na figura 21B estão representadas as contribuições fatoriais das famílias de compostos para essas estirpes. O PC1 explica 86% de variabilidade: no eixo positivo encontra-se isolada a estirpe BT2453, caracterizada pelas famílias dos ácidos, álcoois e terpenos; e no eixo negativo encontram-se as estirpes BT2652, EC1118 e QA23. O PC2 explica 9% de variabilidade: no eixo negativo encontra-se isolada a estirpe EC1118, caracterizada pelas famílias dos álcoois e ésteres. No eixo positivo encontram-se as restantes estirpes.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

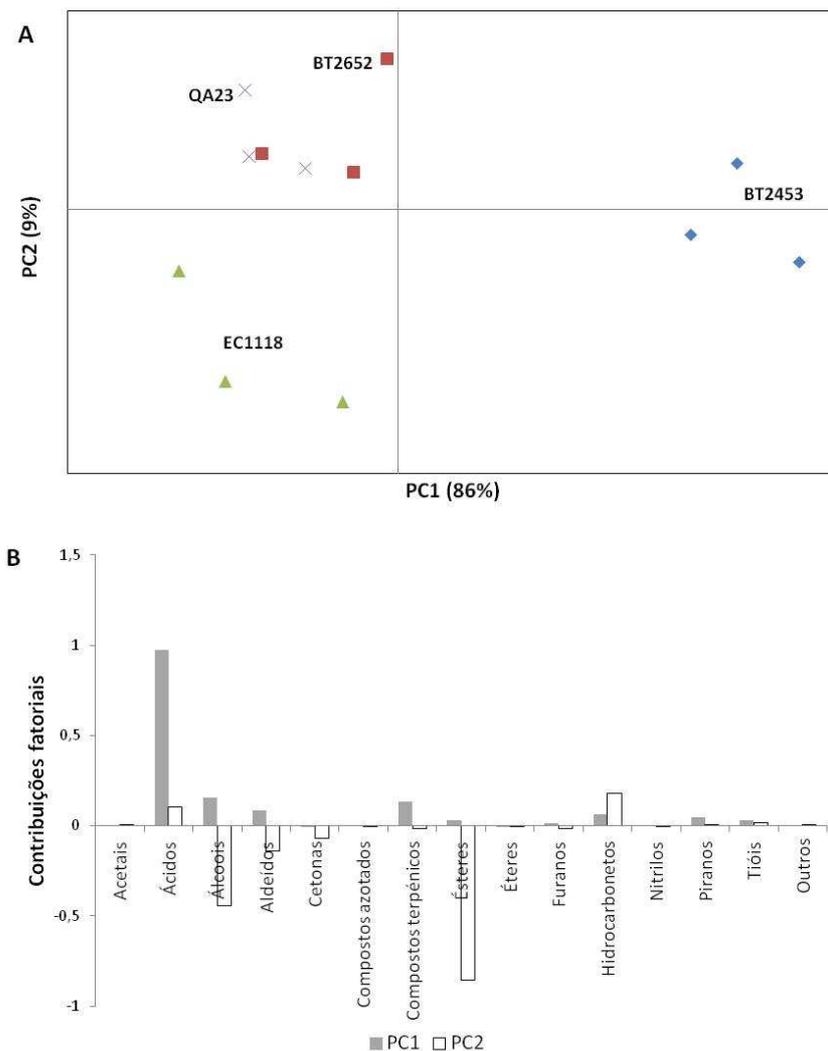


Figura 21 – Gráfico de PCA das famílias de compostos das estirpes de *S. cerevisiae* estudadas. A) Distinção entre as 4 estirpes. B) Contribuições fatoriais

Carrau [68] demonstrou pela primeira vez a produção de monoterpenos pela levedura *S. cerevisiae*. Estes compostos são biosintetizados a partir de acetil-coenzima A, os que mais contribuem para o aroma do vinho (geralmente um aroma floral e moscatel) são os seus derivados monoterpenóis, como o linalol, o geraniol, o nerol e o citronelol. Assim, como os terpenos são responsáveis pelo caráter varietal dos vinhos, foi efetuada uma análise a esta família. Na tabela IX estão representados os compostos terpénicos identificados neste trabalho e o seu respetivo aroma.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Tabela IX – Compostos terpénicos identificados e respetivos aromas

Composto terpénico	Aroma característico ⁽¹⁾
α -Mirceno	Doce, frutado, limão
α -Terpineno	Frutado, limão
Limoneno	Cítrico, laranja
β -Ocimeno	Cítrico
Dihidromircenol	Cítrico, lima
γ -Terpineno	Cítrico, frutado, doce
Tetrahidromircenol	Cítrico, lima, floral
α -Terpinoleno	Frutado, doce
Linalol	Moscatel, doce, frutado, floral, limão
α -Terpineol	Pêssego, frutado, floral, anis
Nerol	Floral, rosas, cítrico, marinho
Iso-geraniol	Floral
Geraniol	Rosas, floral, frutado, cítrico
Citral	Cítrico, limão
β -Farneseno	Frutado, cítrico
α -Bergamoteno	Arborizado
α -Farneseno	Arborizado
Nerolidol	Floral

⁽¹⁾ De acordo com [69]

Observando a tabela X e a figura 19 foi possível verificar que a família dos compostos terpénicos apresenta variabilidade entre estirpes, e que 9 dos metabolitos produzidos são comuns às 4 estirpes: α -mirceno, limoneno, β -ocimeno, tetrahidromircenol, linalol, α -terpineol, geraniol, β -farneseno e nerolidol. Estes dados sugerem que estes 4 metabolitos são característicos da *S. cerevisiae*. Por outro lado, os compostos α -terpineno, γ -terpineno, iso-geraniol e α -bergamoteno são produzidos apenas pela estirpe BT2453, ou seja, são característicos desta estirpe de *S. cerevisiae*.

Mais uma vez foi efetuada uma análise de componentes principais para estudar as maiores fontes de variabilidade das estirpes em relação à sua produção de compostos terpénicos.

A figura 22A representa o gráfico das duas componentes principais das 4 estirpes de *S. cerevisiae* estudadas: BT2453, BT2652, EC1118 e QA23, e explica 99% de variabilidade. A figura 22B representa as contribuições fatoriais dos compostos terpénicos para essas estirpes. O PC1 explica 96% de variabilidade: no eixo positivo encontra-se isolada a estirpe BT2453, caracterizada pelo linalol, geraniol e iso-geraniol. No eixo negativo encontram-se as estirpes BT2652, EC1118 e QA23. O PC2 explica 3% de

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

variabilidade. No eixo positivo encontra-se isolada a estirpe BT2652, caracterizada pelo α -terpinoleno, geraniol e nerolidol, no eixo negativo encontram-se as restantes estirpes.

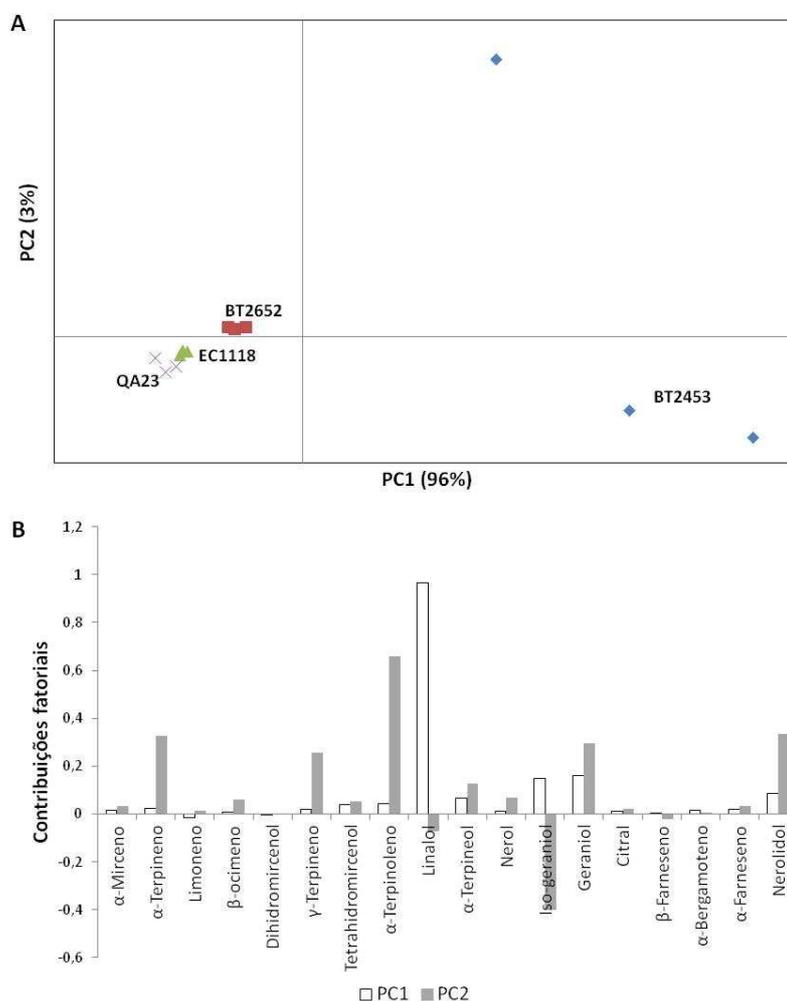


Figura 22 – Gráfico de PCA dos compostos terpênicos das estirpes de *S. cerevisiae* estudadas. A) Distinção entre as 4 estirpes. B) Contribuições fatoriais

Deste modo, a caracterização metabólica das leveduras é importante pois permite estudar as propriedades sensoriais das leveduras, onde cada uma delas contribui de forma individual para o aroma final do vinho.

Callejon [70] estudou 5 estirpes de *S. cerevisiae* e determinou a sua composição volátil e características organolépticas através da análise sensorial (QDA; GC-FID para compostos em grandes concentrações; e HSSE-GC-MS para os compostos mais pequenos). Neste estudo quantificou 51 compostos voláteis e verificou que as concentrações com influência mais significativa no aroma são influenciadas pela estirpe de levedura, sendo esta a responsável pelo perfil volátil do vinho. Neste trabalho, Callejon demonstrou ainda que

Estudo da biodiversidade de estirpes v\u00ednicas de *S. cerevisiae*

as leveduras aut\u00f3ctones produzem vinhos com elevadas qualidades organol\u00e9ticas, e que estas deveriam ser utilizadas em vez das leveduras comerciais, aumentando deste modo a biodiversidade. As estirpes de leveduras aut\u00f3ctones demonstraram tamb\u00e9m ser capazes de produzir vinhos com diferentes perfis vol\u00e1teis, sendo que alguns deles s\u00e3o bastante ricos em \u00e1lcoois, \u00e9steres frutados e acetatos.

Assim, em trabalhos futuros, esta abordagem metodol\u00f3gica \u00e9 uma boa forma de se analisarem as leveduras selecionadas para verificar qual ser\u00e1 a contribui\u00e7\u00e3o dos seus compostos no perfil de aroma dos vinhos.

Conclus\u00e3o

7. Conclusão

Neste trabalho foram recolhidas leveduras de mostos de 4 regiões vitivinícolas de Portugal, nomeadamente, Alentejo, Bairrada, Douro e Dão. Após a sua caracterização molecular foi possível concluir que a *S. cerevisiae* é a espécie de leveduras predominante no final da fermentação de mostos vínicos dos 1260 isolados de leveduras estudados, 70% eram *S. cerevisiae*.

Foi efetuada uma caracterização fenotípica a 313 estirpes de *S. cerevisiae* existentes na coleção do laboratório do Biocant, cujas diferenças se situam nos seus perfis interdelta, ou seja, no seu genótipo. Esta caracterização foi realizada então em larga escala, onde se testou a sensibilidade de crescimento dessas estirpes em meios suplementados com nutrientes, iões metálicos, drogas, stresses ambientais e parâmetros biotecnológicos, num total de 38 condições distintas. Daqui, foi possível verificar um elevado número de grupos hierárquicos, concluindo-se que existe variabilidade fenotípica entre estirpes. Foi ainda possível selecionar 4 estirpes de *S. cerevisiae* (AIT101 64, BB502 73, BB601 84 e DrTR102 89) com potencial enológico devido às suas características de resistência ao cobre, tolerância ao dióxido de enxofre, tolerância ao etanol, resistência a baixas e elevadas temperaturas, e à não produção de sulfureto de hidrogénio.

Neste estudo realizou-se ainda uma caracterização metabolómica de 2 estirpes comerciais (EC1118 e QA23) e de 2 estirpes endógenas da Bairrada (BT2453 e BT2652) com características de elevada resistência ao sulfato de cobre, tolerância a elevadas temperaturas, baixa produção de sulfureto de hidrogénio, atividade *killer*, elevada tolerância ao dióxido de enxofre e fermentação rápida. Esta caracterização do exometaboloma da *S. cerevisiae* permitiu distinguir as estirpes através da análise dos seus metabolitos produzidos, sendo possível concluir que a estirpe BT2453 é aquela que produz mais compostos voláteis (218 identificados) distribuídos por 15 famílias químicas: acetais, ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, compostos azotados, compostos terpénicos, ésteres, éteres, furanos, hidrocarbonetos, nitrilos, piranos, tióis e outras.

Deste modo, é possível concluir que diferentes estirpes geram diferentes vinhos.

Trabalho futuro

8. Trabalho futuro

O estudo das caracter\u00edsticas fenot\u00edpicas das estirpes de *S. cerevisiae* abordadas neste trabalho permitiu observar que existem muitas diferen\u00e7as entre elas. Tal como j\u00e1 foi referido anteriormente, a comunidade microbiol\u00f3gica das uvas e as suas caracter\u00edsticas depende de v\u00e1rios fatores, como o clima, o solo, a localiza\u00e7\u00e3o da vinha, os tratamentos efetuados \u00e0s vinhas, entre outros. Deste modo, seria importante o estudo do comportamento das leveduras na presen\u00e7a de todos os fungicidas e pesticidas utilizados durante todo o ano no tratamento das vinhas para melhor compreender a resist\u00eancia (adquirida ou n\u00e3o) das leveduras a estes. N\u00e3o menos importante, seria efectuar o estudo da quantidade de enxofre existente nas vinhas e a sua rela\u00e7\u00e3o com a quantidade de sulfureto de hidrog\u00e9nio produzido pelas leveduras bem como o estudo dos solos e clima durante o ano e na altura de recolha das uvas das vinhas. Neste trabalho foi ainda estudada a produ\u00e7\u00e3o de compostos vol\u00e1teis de *S. cerevisiae* na fase estacion\u00e1ria do seu crescimento, logo, para melhor compreens\u00e3o desta levedura poderia ser efetuado um estudo do exo-metaboloma das leveduras durante v\u00e1rias fases do seu crescimento para verificar se existem ou n\u00e3o altera\u00e7\u00f5es na produ\u00e7\u00e3o dos seus compostos vol\u00e1teis. Estas, s\u00e3o sugest\u00f5es de trabalhos que poderiam ser desenvolvidos no futuro.

Bibliografia

Bibliografia

1. Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., and Casal, M., *Ecological survey of Saccharomyces cerevisiae strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal*. FEMS Microbiol Ecol, 2005. **51**(2): p. 167-77.
2. Fleet, G.H. and G, H., *Wine Microbiology and Biotechnology*. 1993, Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.
3. Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., and Hallet, J.N., *Genetic diversity and geographical distribution of wild Saccharomyces cerevisiae strains from the wine-producing area of Charentes, France*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(10): p. 3521-9.
4. Lopes, C.A., van Broock, M., Querol, A., and Caballero, A.C., *Saccharomyces cerevisiae wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales*. Journal of Applied Microbiology, 2002. **93**(4): p. 608-15.
5. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G., *Life with 6000 genes*. Science, 1996. **274**(5287): p. 546, 563-7.
6. Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J.M., Rozes, N., and Mas, A., *Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study*. Systematic and Applied Microbiology, 2002. **25**(2): p. 287-93.
7. Fay, J.C. and Benavides, J.A., *Evidence for domesticated and wild populations of Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genetics, 2005. **1**(1): p. 66-71.
8. Sipiczki, M., *Diversity, variability and fast adaptative evolution of the wine yeast (Saccharomyces cerevisiae) genome - a review*. Annals of Microbiology, 2011. **61**: p. 85-93.
9. Guimarães, T.M., Moriel, D.G., Machado, I.P., Picheth, C.M.T.F., and Bonfim, T.M.B., *Isolation and characterization of Saccharomyces cerevisiae strains of winery interest*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **42**: p. 119-126.
10. Goddard, M.R., *Quantifying the complexities of Saccharomyces cerevisiae's ecosystem engineering via fermentation*. Ecology, 2008. **89**(8): p. 2077-2082.
11. Barrajon, N., Capece, A., Arevalo-Villena, M., Briones, A., and Romano, P., *Co-inoculation of different Saccharomyces cerevisiae strains and influence on volatile composition of wines*. Food Microbiology, 2011. **28**(5): p. 1080-6.
12. Fleet, G.H., *Wine yeasts for the future*. FEMS Yeast Research, 2008. **8**(7): p. 979-95.
13. Carrau, F., Medina, K., Farina, L., Boido, E., and Dellacassa, E., *Effect of Saccharomyces cerevisiae inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content*. International Journal of Food Microbiology, 2010. **143**(1-2): p. 81-5.
14. Perez-Navado, F., Albergaria, H., Hogg, T., and Girio, F., *Cellular death of two non-Saccharomyces wine-related yeasts during mixed fermentations with Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 2006. **108**(3): p. 336-345.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

15. Franco-Duarte, R., Umek, L., Zupan, B., and Schuller, D., *Computational approaches for the genetic and phenotypic characterization of a Saccharomyces cerevisiae wine yeast collection*. Yeast, 2009. **26**(12): p. 675-92.
16. Carreto, L., Eiriz, M.F., Domingues, I., Schuller, D., Moura, G.R., and Santos, M.A., *Expression variability of co-regulated genes differentiates Saccharomyces cerevisiae strains*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 201.
17. Rainieri, S. and Pretorius, I.S., *Selection and improvement of wine yeasts*. Annals of Microbiology, 2000. **50**(1): p. 15-31.
18. Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., and Dequin, S., *Phenotypic landscape of Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25147.
19. Chi, Z. and Arneborg, N., *Saccharomyces cerevisiae strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2000. **24**(1): p. 75-78.
20. Loureiro, V. and van Uden, N., *Roles of the specific growth rate and the ethanol concentration in the adaptation of Saccharomyces cerevisiae to ethanol*. Biotechnology and Bioengineering, 1986. **28**(9): p. 1443-5.
21. Salvado, Z., Arroyo-Lopez, F.N., Barrio, E., Querol, A., and Guillamon, J.M., *Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 2011. **28**(6): p. 1155-61.
22. Ubeda, J., Briones, A.I., Izquierdo, P., and Palop, L., *Predominant Saccharomyces cerevisiae strains in the fermentation of Airen grape musts with SO₂*. Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 1995. **28**(6): p. 584-588.
23. Izquierdo-Canas, P.M., Garcia-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., and Gomez-Alonso, S., *Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking*. Food Control, 2012. **23**(1): p. 73-81.
24. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., and Lonvaud, A., *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2 ed. Vol. 1. 2006: John Wiley & Sons, Ltd.
25. Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S.J., Garcia-Viguera, C., Reader, H.P., and Watkins, S.J., *Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998. **78**(3): p. 297-307.
26. Stratford, M. and Rose, A.H., *Hydrogen-Sulfide Production from Sulfite by Saccharomyces-Cerevisiae*. Journal of General Microbiology, 1985. **131**(Jun): p. 1417-1424.
27. Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and Leao, C., *Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts*. Journal of Food Protection, 2002. **65**(6): p. 1033-7.
28. Butzke, C.E. and Park, S.K., *Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011. **21**(5): p. 519-24.
29. Heard, G.M. and Fleet, G.H., *Occurrence and Growth of Killer Yeasts during Wine Fermentation*. Applied and Environmental Microbiology, 1987. **53**(9): p. 2171-4.
30. Cardoso, A.D., Carnevalheira, J., Coimbra, M.A., and Rocha, S., *Tecnologia dos Vinhos Tintos*. 2005: Direcção Regional da Agricultura da Beira Litoral.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

31. Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J.M., and Mas, A., *Effects of fermentation temperature on the strain population of Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **80**(1): p. 47-53.
32. Arroyo-Lopez, F.N., Orlic, S., Querol, A., and Barrio, E., *Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of Saccharomyces cerevisiae, S. kudriavzevii and their interspecific hybrid*. International Journal of Food Microbiology, 2009. **131**(2-3): p. 120-127.
33. Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W., *Microbial resistance to metals in the environment*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2000. **45**(3): p. 198-207.
34. Hampsey, M., *A review of phenotypes in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1997. **13**(12): p. 1099-133.
35. Ribéreau-Gayon, Y., G., A., M., and D., D., *Handbook of enology. The chemistry of wine stabilization and treatments*. 2nd ed. Vol. 2. 2006, Chichester, England: Jon Wiley & Son.
36. Strauss, M.L., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., and van Rensburg, P., *Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts*. Journal of Applied Microbiology, 2001. **91**(1): p. 182-90.
37. Fiehn, O., *Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes*. Plant Molecular Biology, 2002. **48**: p. 155-171.
38. Meyer, H., Liebeke, M., and Lalk, M., *A protocol for the investigation of the intracellular Staphylococcus aureus metabolome*. Analytical Biochemistry, 2010. **401**(2): p. 250-9.
39. Mateos, J.A.R., Pérez-Nevado, F., and Fernández, M.R., *Influence of Saccharomyces cerevisiae yeast strain on the major volatile compounds of wine*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **40**: p. 151-157.
40. Salvadores, M., Díaz, M.E., and Cardell, E., *Levaduras autóctonas aisladas en vinos de Tenerife y su influencia en las concentraciones de acetato de etilo y alcoholes superiores analizados por cromatografía de gases*. International Microbiology, 1993. **9**: p. 107-112.
41. Giucidi, P., Romano, P., and Zambonelli, C., *A biometric study of higher alcohol production in Saccharomyces cerevisiae*. Canadian Journal of Microbiology, 1990. **36**: p. 62-65.
42. Weldegergis, B.T., de Villiers, A., McNeish, C., Seethapathy, S., Mostafa, A., Gorecki, T., and Crouch, A.M., *Characterisation of volatile components of Pinotage wines using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOFMS)*. Food Chemistry, 2011. **129**(1): p. 188-199.
43. Mateos, J.A.R., Perez-Nevado, F., and Fernandez, M.R., *Influence of Saccharomyces cerevisiae yeast strain on the major volatile compounds of wine*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **40**(1): p. 151-157.
44. Barata, A., Campo, E., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., Cacho, J., and Ferreira, V., *Analytical and sensorial characterization of the aroma of wines produced with sour rotten grapes using GC-O and GC-MS: identification of key aroma compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(6): p. 2543-53.
45. Vilela-Moura, A., Schuller, D., Falco, V., Mendes-Faia, A., and Corte-Real, M., *Effect of refermentation conditions and micro-oxygenation on the reduction of volatile acidity by commercial S. cerevisiae strains and their impact on the*

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

- aromatic profile of wines*. International Journal of Food Microbiology, 2010. **141**(3): p. 165-72.
46. Rainieri, S., Zambonelli, C., and Kaneko, Y., *Saccharomyces sensu stricto: systematics, genetic diversity and evolution*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003. **96**(1): p. 1-9.
47. Antunovics, Z., Irinyi, L., and Sipiczki, M., *Combined application of methods to taxonomic identification of Saccharomyces strains in fermenting botrytized grape must*. Journal of Applied Microbiology, 2005. **98**(4): p. 971-9.
48. Mercado, L., Sturm, M.E., Rojo, M.C., Ciklic, I., Martinez, C., and Combina, M., *Biodiversity of Saccharomyces cerevisiae populations in Malbec vineyards from the "Zona Alta del Rio Mendoza" region in Argentina*. International Journal of Food Microbiology, 2011. **151**(3): p. 319-26.
49. Rocha, S.M., Coutinho, P., Barros, A., Delgadillo, I., and Coimbra, M.A., *Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature*. Journal of Chromatography A, 2006. **1114**(2): p. 188-97.
50. Graham, K.N., Sarna, L.P., Webster, G.R.B., Gaynor, J.D., and Ng, H.Y.F., *Solid-phase microextraction of the herbicide metolachlor in runoff and tile-drainage water samples*. Journal of Chromatography A, 1996. **725**(1): p. 129-136.
51. Belardi, P. and Pawliszyn, J., *Water Pollut. Research Journal of Canada*, 1989. **24**: p. 179-191.
52. Parreira, F.V. and Cardeal, Z.d.L., *Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de SPME*. Quimica Nova, 2005. **28**: p. 646-654.
53. Alpendurada, M.D., *Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **889**(1-2): p. 3-14.
54. Yang, X. and Peppard, T., *Solid-phase microextraction for flavor analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**: p. 1925-1930.
55. Munoz-Gonzalez, C., Rodriguez-Bencomo, J.J., Moreno-Arribas, M.V., and Pozo-Bayon, M.A., *Beyond the characterization of wine aroma compounds: looking for analytical approaches in trying to understand aroma perception during wine consumption*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **401**(5): p. 1497-1512.
56. Tranchida, P.Q., Dugo, P., Dugo, G., and Mondello, L., *Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis*. Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1-2): p. 3-16.
57. Perestrelo, R., Barros, A.S., Camara, J.S., and Rocha, S.M., *In-depth search focused on furans, lactones, volatile phenols, and acetals as potential age markers of Madeira wines by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(7): p. 3186-204.
58. Pawliszyn, J., *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice SPME*. 1997, New York: Wiley - VCH.
59. Rocha, S.M., Coelho, E., Zrostlikova, J., Delgadillo, I., and Coimbra, M.A., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability*. Journal of Chromatography A, 2007. **1161**(1-2): p. 292-9.
60. Lopez, V., Querol, A., Ramon, D., and Fernandez-Espinar, M.T., *A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts*. International Journal of Food Microbiology, 2001. **68**(1-2): p. 75-81.

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

61. Glick, B. and Pasternak, J., *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3rd ed. 2003, Washington D.C.: ASM Press.
62. Caridi, A., Cufari, J.A., and Ramondino, D., *Isolation and clonal pre-selection of enological Saccharomyces*. The Journal of General and Applied Microbiology, 2002. **48**(5): p. 261-7.
63. Esteve-Zarzoso, B., Gostíncar, A., Bobet, R., Uruburu, F., and Querol, A., *Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedès' area (Spain)*. FoodMicrobiology, 2000. **17**: p. 553-562.
64. Park, S.K., Boulton, R.B., and Noble, A.C., *Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts*. American Journal of Enology and Viticulture, 2000. **51**(2): p. 91-97.
65. Weldegergis, B.T., Tredoux, A.G., and Crouch, A.M., *Application of a headspace sorptive extraction method for the analysis of volatile components in South African wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(21): p. 8696-702.
66. Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Marques, J.C., and Cacho, J., *Quantitative gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines*. Analytica Chimica Acta, 2006. **563**: p. 180-187.
67. Rocha, S.M., Coutinho, P., Coelho, E., Barros, A.S., Delgadillo, I., and Coimbra, M.A., *Relationships between the varietal volatile composition of the musts and white wine aroma quality. A four year feasibility study*. Lwt-Food Science and Technology, 2010. **43**(10): p. 1508-1516.
68. Carrau, F.M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., and Henschke, P.A., *De novo synthesis of monoterpenes by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts*. FEMS Microbiology Letters, 2005. **243**(1): p. 107-115.
69. www.pherobase.com, acedido em 10-09-2012.
70. Callejon, R.M., Clavijo, A., Ortigueira, P., Troncoso, A.M., Paneque, P., and Morales, M.L., *Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial Saccharomyces cerevisiae strains*. Analytica Chimica Acta, 2010. **660**(1-2): p. 68-75.

Anexo

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Anexo

Tabela A1 – Compostos voláteis identificados por HS-SPME-GCxGC-ToFMS nas estirpes de *S. cerevisiae* estudadas

	t_{R}^1 (s) ^a	t_{R}^2 (s) ^b	Nome	RI calc ^c	RI lit ^d	Média da área com n=3 (x10 ⁵) e RSD ^e (%)								Id. P. ^f
						BT2453		BT2652		EC1118		QA23		
						Área	RSD	Área	RSD	Área	RSD	Área	RSD	
Acetais	145	0,432	1,1-Dietoxi-etano	711	729	13,3	20	16,4	11	13,0	35	10,0	17	
	145	0,456	2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano	711	739	22,6	35	30,4	9	16,6	25	13,1	3	
	290	0,728	2,2,3-Trimetil-oxetano	917	-	2,2	18	-	-	-	-	-	-	
Área total						38,1	28	46,8	4	29,6	27	23,1	8	
Nº total						3		2		2		2		
Ácidos	100	3,336	Ácido acético	636	641	639,3	32	631,0	22	15,0	6	408,4	8	[44]
	135	4,344	Ácido propanóico	699	693	11,7	13	9,0	17	3,1	6	-	-	
	170	3,904	Ácido 2-metil-propanóico	768	793	122,8	11	84,3	15	59,3	8	44,9	15	
	190	4,640	Ácido butanóico	805	834	81,7	4	40,2	8	40,9	18	28,6	8	
	235	4,056	Ácido iso-valérico	858	876	113,6	18	75,9	7	59,3	12	40,8	11	[45]
	245	3,776	Ácido 2-metil-butanóico	869	884	62,7	26	53,3	6	28,2	12	25,0	15	
	365	3,648	Ácido hexanóico	999	1019	379,4	13	90,7	8	194,6	19	183,5	13	[45]
	545	2,616	Ácido octanóico	1197	1179	2149,2	6	1414,1	20	1417,6	17	1316,2	12	[45]
	615	2,448	Ácido nonanóico	1279	1280	93,6	161	3,9	49	-	-	-	-	
	695	2,184	Ácido decanóico	1378	1380	974,6	17	500,6	8	736,5	14	633,3	18	[45]
	695	2,616	Ácido 9-decenóico	1378	1389	139,1	12	120,3	65	-	-	-	-	
Área total						4767,8	4	3023,4	10	2554,5	15	2680,7	6	
Nº total						11		11		9		8		
Alcoois	85	0,648	1-Propanol	591	595	32,9	12	34,5	9	25,1	12	24,1	16	[39]
	105	0,568	2-Metil-2-butanol	631	631	18,7	67	23,6	13	13,8	50	14,9	25	
	105	0,688	2-Metil-1-propanol	621	647	118,8	25	88,4	10	124,1	11	156,1	11	[44]
	130	0,696	3-Metil-2-butanol	681	700	-	-	0,4	19	0,5	13	-	-	
	145	0,640	2-Metil-2-pentanol	721	724	4,7	82	3,6	13	3,5	8	2,6	16	
	150	0,944	3-Metil-1-butanol	722	727	355,5	20	326,1	16	383,2	22	336,8	23	[45]
	155	0,864	2-Metil-1-butanol	732	736	-	-	-	-	165,8	7	169,3	5	[39]
	165	0,720	4-Metil-2-pentanol	751	758	0,8	15	0,6	14	0,9	15	0,8	19	
	175	0,912	1-Pentanol	772	766	4,0	10	-	-	-	-	-	-	
	180	1,184	3-Metil-2-buten-1-ol	782	763	1,7	35	-	-	-	-	-	-	
	185	0,632	2,4-Dimetil-2-pentanol	791	-	1,2	33	1,6	24	1,1	26	1,2	2	
	220	0,672	2-Metil-2-hexanol	836	822	1,0	24	0,9	18	0,8	22	0,8	21	
	225	0,416	5-Metil-2-hexanol	842	-	20,4	15	-	-	-	-	-	-	
	225	0,904	2-Metil-1-pentanol	842	843	5,6	7	-	-	2,9	3	2,8	3	
	230	0,416	3-Metil-2-hexanol	848	849	-	-	-	-	1,3	17	-	-	
	260	0,944	1-Hexanol	883	884	1,0	5	0,8	58	-	-	-	-	[44]
	280	0,792	2-Heptanol	906	900	0,7	25	-	-	0,9	9	1,0	10	
	305	0,664	4-Metil-4-heptanol	932	-	5,3	29	4,5	11	4,8	9	4,5	22	
	305	0,680	2-Metil-2-heptanol	932	-	6,3	31	4,4	12	4,5	18	4,6	20	
	330	0,768	6-Metil-2-heptanol	959	950	45,4	22	39,1	19	34,2	5	31,5	6	
	340	0,728	4-Etil-3-hexanol	969	-	-	-	-	-	-	-	2,8	24	
	350	0,656	2,3-Dimetil-2-hexanol	980	-	62,3	16	56,8	16	63,1	6	62,1	6	
	350	0,928	1-Heptanol	975	969	30,0	42	37,1	9	7,4	13	4,5	8	
	355	0,624	3-Etil-2-metil-3-pentanol	985	-	6,6	20	5,4	16	6,2	7	5,9	13	
	360	0,760	2-Metil-2-octen-4-ol	990	-	3,6	22	-	-	2,9	19	5,7	10	
	365	0,656	2,6-Dimetil-2-heptanol	995	1023	2,7	44	-	-	3,0	15	-	-	
	365	0,688	1-Ciclopentil-1-propanol	995	-	-	-	-	-	1,9	8	-	-	
	380	0,728	3-Metil-2-heptanol	1011	-	7,6	10	7,8	15	6,6	10	6,3	17	
	390	0,424	4-Metil-1-heptanol	1022	-	-	-	3,6	19	2,5	9	3,8	26	
	395	0,656	4-Metil-4-octanol	1027	-	5,7	25	4,3	20	5,4	4	5,0	8	
	395	0,688	4,5-Dimetil-3-heptanol	1027	-	-	-	-	-	4,3	7	3,3	49	
	400	0,624	2-Metil-2-octanol	1032	1033	7,7	11	8,3	15	6,5	20	6,3	11	
	400	0,872	2-Etil-1-hexanol	1033	1029	82,9	20	62,3	19	60,5	2	55,2	12	
	410	0,632	3-Etil-5-metil-1-heptin-3-ol	1043	-	-	-	-	-	5,3	26	-	-	
	430	1,800	2,5-Dimetil-2,5-hexanediol	1065	-	6,6	32	1,1	59	4,0	16	-	-	
	445	0,888	1-Octanol	1075	1076	8,7	18	11,1	15	-	-	-	-	[45]

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

450	0,632	2,4-Dimetil-3-hexanol	1085	-	2,8	40	2,2	5	1,7	5	2,5	5	
455	0,840	2,4-Dimetil-1-heptanol	1090	-	-	-	-	-	18,9	14	46,1	25	
460	0,640	3,7-Dimetil-3-octanol	1095	1130	1,5	47	-	-	-	-	-	-	
460	0,896	2,3,4-Trimetil-5-hexen-3-ol	1090	-	-	-	8,3	12	-	-	-	-	
465	0,768	2-Nonanol	1101	1110	2,2	9	-	-	2,0	14	1,7	6	
465	1,008	2-Nonen-1-ol	1101	1120	14,3	22	-	-	-	-	-	-	
480	0,640	5-Metil-5-nonanol	1118	-	-	-	2,1	17	-	-	-	-	
485	0,648	4-Metil-4-nonanol	1124	-	19,8	19	12,8	15	11,7	7	10,2	10	
495	0,616	2-Metil-2-decanol	1136	-	-	-	-	-	7,0	20	-	-	
525	0,616	3,4-Dietil-3-hexanol	1171	-	70,2	8	67,9	15	55,3	19	61,0	12	
540	0,648	2,6-dimetil-2-octanol	1189	-	-	-	7,2	12	5,5	9	4,6	12	
545	0,832	1-Nonanol	1195	1171	-	-	30,1	21	-	-	-	-	
555	0,680	2-Decanol	1207	1209	31,6	14	23,2	12	39,5	11	14,7	16	
565	0,616	3-Decanol	1218	1197	61,2	21	49,3	32	-	-	53,0	17	
620	0,832	1-Decanol	1283	1272	19,6	16	-	-	-	-	-	-	
650	0,440	2-Butil-1-octanol	1319	1277	4,1	21	-	-	-	-	-	-	
Álcoois aromáticos	450	1,600	2-Fenilisopropanol	1086	1102	-	-	-	1,2	13	-	-	
	480	2,272	2-Feniletanol	1121	1122	785,4	20	304,0	19	585,2	2	452,3	10
Área total						1866,4	16	1235,0	5	1675,1	6	1558,0	3
Nº total						39		33		40		34	
Aldeídos	85	0,408	Butanal	591	596	13,8	85	-	-	21,7	18	17,8	20
	110	0,464	3-Metil-butanal	641	654	66,5	33	65,2	29	74,4	19	56,8	27
	115	0,456	2-Metil-butanal	651	662	39,2	46	31,7	34	43,7	5	40,4	12
	425	0,736	2-Octenal	1059	1056	-	-	26,0	4	7,0	9	8,1	83
	605	0,728	2-Decenal	1266	1252	16,0	12	-	-	-	-	-	-
Aldeídos aromáticos	335	1,288	Benzaldeído	965	961	99,1	62	16,5	19	72,0	20	34,5	15
	410	1,344	2-Fenilacetaldeído	1044	1049	112,5	51	32,2	10	76,1	12	52,8	4
	410	1,528	2-Hidroxi-benzaldeído	1044	1041	0,8	53	-	-	-	-	-	-
	565	1,208	3,5-Dimetil-benzaldeído	1219	-	65,5	15	-	-	-	-	12,7	16
	615	1,312	2-Fenil-2-butenal	1278	1273	1,7	37	-	-	-	-	-	-
Área total						415,0	36	171,6	17	294,9	12	223,2	7
Nº total						9		5		6		7	
Cetona cíclica	270	0,808	Ciclohexanona	895	895	4,1	21	3,1	12	3,6	8	4,0	17
Cetonas	90	0,552	2,3-Butanediona	601	595	-	-	-	-	2,9	12	-	-
	95	0,448	2-Butanona	611	601	-	-	-	-	5,6	13	5,0	3
	125	0,504	2-Pentanona	671	685	10,4	44	9,5	22	10,4	14	9,7	12
	125	0,624	2,3-Pentanediona	671	696	-	-	1,4	54	3,1	15	3,3	45
	140	1,232	3-Hidroxi-2-butanona	702	710	54,3	77	33,4	72	52,9	17	52,4	46
	150	0,512	4-Metil-2-pentanona	721	733	15,0	25	13,6	20	12,6	11	12,7	14
	185	0,576	2-Hexanona	791	789	3,9	26	-	-	3,7	12	3,8	8
	190	0,648	4-Metil-3-penten-2-ona	801	801	8,2	63	-	-	3,7	12	3,7	9
	195	1,216	3-Hidroxi-2-pentanona	807	803	1,3	45	4,9	15	1,4	23	1,1	17
	220	0,616	2,3-heptanediona	836	-	-	-	0,7	15	0,7	15	-	-
	230	0,568	4-Metil-2-hexanona	848	846	3,1	48	2,6	16	2,9	10	2,9	8
	230	1,120	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona	848	839	2,5	135	-	-	-	-	-	-
	240	0,584	5-Metil-2-hexanona	860	862	6,8	30	5,5	16	-	-	-	-
	240	0,640	4-Hidroxi-3-hexanona	860	846	6,9	39	5,8	16	5,8	19	6,1	4
	270	0,600	2-Heptanona	895	888	30,7	37	24,6	52	49,2	10	47,0	20
	280	0,552	3,4-Dimetil-2-hexanona	906	-	2,4	31	1,8	36	2,0	17	2,0	14
	305	0,560	6-Metil-2-heptanona	932	932	-	-	78,4	19	93,6	9	91,7	7
	305	1,368	2,5-Hexanediona	933	933	6,5	29	2,9	18	2,6	10	2,6	18
	315	0,584	4-Metil-2-heptanona	943	936	151,0	15	154,0	9	156,0	10	150,0	9
	320	1,040	2,5-Dimetil-3-hexanona	948	-	-	-	2,2	70	-	-	-	-
	330	0,472	2,3-Octanediona	958	980	-	-	1,3	12	1,1	13	1,0	18
	345	0,568	4-Octanona	974	974	2,4	19	1,6	14	-	-	1,6	20
	350	0,520	2,4-Dimetil-3-heptanona	979	-	-	-	-	-	3,2	8	1,9	25
	355	0,544	4-Metil-3-octanona	985	-	4,9	32	4,8	20	6,5	32	4,8	10
	360	0,664	4-Metil-3-hepten-2-ona	990	-	7,0	17	-	-	6,6	12	5,4	15
	400	0,608	2-Metil-2-octen-4-ona	1032	-	2,8	13	2,6	8	2,4	2	2,3	3
	405	0,592	4,6-Dimetil-2-heptanona	1038	1045	14,9	26	12,8	16	12,6	20	12,7	9
	410	0,704	3,3,6-Trimetil-1,5-heptadien-4-ona	1043	1062	5,4	30	3,7	6	4,0	15	3,9	19
	430	0,696	5-Nonen-2-ona	1064	-	8,7	30	7,0	15	6,3	19	4,6	1
	440	0,576	5-Nonanona	1074	1073	6,0	34	3,4	36	-	-	5,1	19
	450	0,584	3,5-Dimetil-2-octanona	1085	-	1,2	24	1,0	8	1,0	11	0,8	14
	455	0,624	2-Nonanona	1090	1091	39,4	35	30,3	21	61,9	1	45,4	14
	475	0,752	2,6-Dimetil-2,5-heptadien-4-ona	1113	-	75,5	13	63,9	7	60,8	10	56,8	11

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

	480	0,560	4-Decanona	1118	-	6,7	12	5,9	17	5,7	2	6,4	12	
	540	0,608	3-Decanona	1189	1188	23,2	34	1,0	13	1,2	20	1,2	29	
	580	0,640	2-Metil-2-nonen-4-ona	1236	1215	-	-	-	-	4,7	18	4,3	20	
	630	0,640	2-Undecanona	1295	1272	12,0	16	-	-	-	-	-	-	
Cetonas aromáticas	430	1,288	1-Feniletanona	1065	1065	26,4	12	5,7	11	8,6	11	8,0	6	
	490	1,248	1-Fenil-2-propanona	1131	1124	1,5	1	-	-	-	-	-	-	
	495	0,968	1-(2-Metilfenil)-etanona	1136	1139	0,9	21	-	-	-	-	-	-	
	540	1,192	1-(4-Metilfenil)-etanona	1190	1183	0,8	25	0,6	20	-	-	-	-	
	575	1,112	1-Fenil-2-butanona	1231	-	1,0	6	0,5	4	-	-	-	-	
	625	1,352	4-Fenil-3-buten-2-ona	1290	1330	1,0	41	-	-	-	-	-	-	
	650	1,208	1-(3,4-Dimetilfenil)-etanona	1320	-	2,0	21	1,1	30	-	-	-	-	
Área total						624,8	16	565,9	15	675,2	6	663,4	2	
Nº total						36		33		32		32		
Compostos azotados	460	1,000	nitro-ciclohexano	1096	-	1,0	47	1,3	11	1,5	2	1,5	14	
	565	1,016	1-nitro-2-octanona	1219	-	3,3	10	-	-	-	-	-	-	
	690	1,312	2,6-Dimetil-6-nitro-2-hepten-4-ona	1370	-	6,8	17	3,1	12	1,9	0	-	-	
Área total						11,1	12	4,4	9	3,4	1	1,5	14	
Nº total						3		2		2		1		
Compostos terpénicos	365	0,504	α -Mirceno	995	991	5,0	9	2,7	15	2,4	17	2,0	14	
	385	0,504	α -Terpineno	1016	1018	6,8	147	-	-	-	-	-	-	
	400	0,504	Limoneno	1032	1030	2,2	29	9,1	14	4,6	6	3,8	14	
	415	0,528	β -Ocimeno	1048	1050	3,9	40	2,5	16	1,8	11	1,3	23	
	415	0,712	Dihidromircenol	1048	1063	-	-	0,9	37	1,5	13	-	-	
	425	0,520	γ -Terpineno	1058	1059	5,4	145	-	-	-	-	-	-	
	440	0,648	Tetrahidromircenol	1074	-	8,7	14	1,1	18	1,1	15	1,0	4	
	455	0,528	α -Terpinoleno	1090	1084	13,1	155	1,1	17	-	-	-	-	
	465	0,816	Linalol	1101	1101	214,3	25	62,6	6	42,4	4	35,9	12	[45]
	545	0,920	α -Terpineol	1195	1185	21,9	3	17,0	16	8,8	14	6,7	14	[44]
	585	1,016	Nerol	1237	1228	5,5	26	4,8	6	5,0	16	-	-	
	590	1,024	Iso-geraniol	1248	1254	24,4	87	-	-	-	-	-	-	
	605	1,048	Geraniol	1266	1240	40,0	6	12,6	19	9,4	10	6,5	17	[44]
	610	0,848	Citral	1272	1270	2,6	17	2,2	17	-	-	-	-	
	760	0,568	β -Farneseno	1461	1458	4,8	56	4,7	21	4,3	19	3,6	18	
	785	0,592	α -Bergamoteno	1494	1492	3,0	97	-	-	-	-	-	-	
	795	0,608	α -Farneseno	1508	1508	4,6	8	-	-	2,0	16	-	-	
	835	0,840	Nerolidol	1566	1539	34,4	22	23,5	7	16,0	11	13,0	18	
Área total						400,8	5	144,7	5	99,3	5	74,0	8	
Nº total						17		13		12		9		
Ésteres	75	0,648	Formato de propilo	571	-	-	-	-	-	22,9	3	25,9	9	
	100	0,456	Acetato de etilo	621	608	127,2	14	161,1	34	120,3	2	134,3	16	[45]
	135	0,472	Propionato de etilo	691	714	14,6	28	13,6	19	9,1	4	8,4	10	[45]
	140	0,488	Acetato de propilo	701	708	-	-	-	-	1,5	7	1,6	32	
	165	0,464	Isobutirato de etilo	751	762	3,2	70	1,9	24	1,3	16	1,2	14	[45]
	175	0,496	Acetato de isobutilo	771	780	-	-	4,7	45	8,1	9	8,8	20	
	185	0,560	Formato de isopentilo	791	793	2,8	24	2,4	17	2,4	15	2,0	8	
	195	0,520	Butirato de etilo	806	771	36,9	20	31,9	28	22,4	8	24,6	14	[44]
	200	0,472	Acetato de 1,1-dimetilpropilo	812	-	-	-	3,8	20	2,9	29	3,9	6	
	205	1,152	2-Hidroxi-propionato de etilo	819	-	0,4	18	-	-	-	-	-	-	
	230	0,624	2-Butanoato de etilo	848	863	0,9	29	0,6	20	0,6	9	-	-	
	235	0,496	2-Metil-butanoato de etilo	854	846	-	-	1,4	25	-	-	-	-	[45]
	255	0,552	Acetato de 2-metilbutilo	877	876	128,9	5	128,0	50	128,6	10	131,0	18	
	280	0,536	Pentanoato de etilo	906	898	0,6	21	-	-	-	-	-	-	
	290	0,520	Acetato de 2-hexilo	916	937	-	-	-	-	1,1	37	1,1	13	
	325	1,112	2-Hidroxi-4-metilpentanoato de metilo	954	-	-	-	-	-	3,0	7	-	-	
	340	0,536	Propanoato de pentilo	969	968	3,8	17	1,8	37	4,1	33	-	-	
	345	0,664	2,4-Dimetil-3-oxo-pentanoato de metilo	974	-	49,3	19	66,7	10	66,6	10	59,2	6	
	345	2,640	Diacetato de 1,3-propanediol	966	-	5,1	18	10,2	21	-	-	-	-	
	365	0,544	Butirato de butilo	995	994	0,9	28	0,7	17	-	-	-	-	
	370	0,552	Hexanoato de etilo	1001	1001	140,0	3	156,1	10	130,4	3	149,0	5	[45]
	400	0,720	Pivalato de butilo	1032	-	-	-	-	-	-	-	0,8	32	
	425	0,528	Butanoato de 3-metilbutilo	1059	1060	-	-	0,6	47	0,4	22	-	-	
	440	0,920	Formato de octilo	1075	1117	-	-	-	-	12,3	18	15,4	13	
	460	0,560	Heptanoato de etilo	1095	1095	6,3	19	6,1	9	3,7	27	3,9	20	
	475	0,584	Acetato de heptilo	1113	1111	-	-	1,7	41	-	-	-	-	
	510	0,536	Hexanoato de butilo	1154	1148	1,0	31	0,7	2	0,6	28	-	-	

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

	540	0,616	7-Octenoato de etilo	1189	1186	5,9	18	5,4	15	-	-	-	-	
	545	0,640	Octanoato de etilo	1201	1205	542,9	26	666,4	25	616,2	28	51,8	18	[45]
	595	0,552	Hexanoato de isopentilo	1254	1262	9,7	4	5,9	11	6,2	9	6,1	12	
	605	0,944	Heptanoato de 2-penten-1-ilo	1266	-	2,8	14	-	-	-	-	-	-	
	630	0,560	Octanoato de propilo	1295	1290	22,9	34	22,6	4	-	-	-	-	
	630	0,576	Nonanoato de etilo	1295	1297	25,1	13	36,4	20	26,3	20	32,2	17	
	675	0,552	Octanoato de butilo	1351	1345	6,0	26	3,1	31	3,0	20	2,8	26	
	690	0,848	Acetato de butoxi-etanol	1364	1366	2,1	2	-	-	-	-	-	-	
	700	0,704	Acetato de 3,7-dimetil-2,6-octadienilo	1382	1376	2,5	22	-	-	-	-	-	-	
	700	0,832	2-Metil-propanoato de 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentilo	1382	1381	6,4	11	-	-	3,2	19	-	-	
	705	0,632	9-Decenoato de etilo	1388	1387	-	-	-	-	-	-	148,1	7	
	710	0,592	Decanoato de etilo	1395	1397	346,9	15	131,7	24	670,8	14	434,7	20	[45]
	720	0,608	Acetato de decilo	1408	1406	3,2	12	-	-	-	-	-	-	
	750	0,576	Octanoato de isopentilo	1447	1444	34,1	16	21,1	39	20,0	19	19,3	25	
	780	0,608	Decanoato de propilo	1488	1493	5,9	15	-	-	1,5	27	-	-	
	820	0,616	Decanoato de isobutilo	1544	1545	2,9	34	-	-	-	-	-	-	
	855	0,624	Dodecanoato de etilo	1594	1593	79,9	29	38,8	30	38,1	41	26,9	11	
	865	0,704	Acetato de dodecilo	1608	1609	5,6	26	-	-	-	-	-	-	
	890	0,688	Decanoato de isopentilo	1641	1647	-	-	5,9	6	8,1	22	7,2	25	
Ésteres aromáticos	460	1,056	Benzoato de metilo	1096	1091	41,9	9	24,9	2	27,4	16	23,6	11	
	520	1,112	Acetato de benzilo	1166	1162	2,5	23	-	-	-	-	-	-	
	525	0,944	Benzoato de etilo	1172	1170	1,2	2	0,8	20	-	-	-	-	
	590	1,000	Acetato de 4-etilfenilo	1248	1238	2,5	18	-	-	1,2	45	0,7	18	
	600	1,040	Acetato de 2-feniletilo	1260	1265	43,4	3	14,3	15	31,1	40	23,7	32	[45]
	675	0,960	3-Fenilpropionato de etilo	1351	1353	0,6	16	-	-	-	-	-	-	
	675	1,056	3,4-Dimetilbenzoato de metilo	1351	1353	3,7	14	2,4	19	1,9	6	1,6	8	
	680	0,952	Propionato de 2-feniletilo	1357	1353	0,5	41	-	-	-	-	-	-	
	745	0,936	Butanoato de 2-feniletilo	1441	1447	0,6	7	-	-	-	-	-	-	
	Área total						1723,4	10	1573,8	13	1997,5	13	1349,8	12
Nº total						42		33		34		29		
Éteres	100	0,376	2-Etoxi-2-metil-propano	621	620	20,6	5	21,7	12	28,9	44	31,7	32	
	120	0,392	2-Metoxi-2-metil-butano	661	655	2,1	9	3,8	11	3,2	50	3,4	38	
	135	0,392	2-Metil-2-(1-metiletóxi)-propano	691	668	2,4	57	3,1	44	2,6	49	2,8	35	
	305	0,480	1-Butoxi-2-penteno	932	-	1,7	9	-	-	-	-	-	-	
	345	0,464	1-(1-Etoxiétoxi)-pentano	974	977	2,5	46	2,3	38	1,9	24	1,5	21	
	470	0,536	2,5-Dimetoxi-2,5-dimetil-hexano	1107	-	0,6	19	0,7	65	0,3	10	-	-	
	Área total						29,9	9	31,5	10	37,0	42	39,4	32
Nº total						6		5		5		4		
Furanos	165	0,408	Tetrahydro-2,2,5,5-tetrametil-furano	751	-	31,6	39	33,9	19	35,8	33	36,4	11	
	170	0,752	2-Vinilfurano	762	761	0,5	11	-	-	-	-	-	-	
	200	0,920	Dihidro-2-metil-3-furanona	813	808	1,5	48	-	-	-	-	-	-	
	290	1,472	1-(2-Furanil)-etanona	917	910	1,7	50	-	-	-	-	-	-	
	370	0,712	5-Metil-2-furanometanotiol	1001	1016	9,7	37	-	-	-	-	-	-	
	465	0,464	Tetrahydro-2,2,4,4-tetrametil-furano	1101	-	2,2	52	2,0	40	1,5	20	2,1	22	
	575	1,256	3-Fenilfurano	1231	1225	2,6	8	1,4	16	0,6	39	0,7	34	
	580	0,632	2,2,3,3,4,4-Hexametiltetrahydrofurano	1236	-	8,2	4	-	-	-	-	-	-	
	600	1,360	5-Butiltetrahydro-2-furanona	1260	1266	0,8	27	-	-	-	-	-	-	
	655	0,784	5-(2,2-Dimetilpropil)-2,2,4-trimetil-3(2H)-furanona	1326	-	12,0	13	-	-	7,6	12	6,6	15	
Área total						70,8	18	37,2	18	45,6	26	45,7	9	
Nº total						10		3		4		4		
Hidrocarbonetos	170	0,384	2,3-Dimetil-hexano	761	758	-	-	3,7	10	-	-	-	-	
	225	0,408	2,4-Dimetil-1-hepteno	842	842	-	-	11,6	11	4,4	20	3,5	15	
	245	0,384	4-Metil-octano	865	858	-	-	6,5	68	-	-	-	-	
	280	0,400	Nonano	906	900	-	-	0,6	19	1,5	18	1,9	8	
	335	0,408	2-Metil-nonano	964	964	-	-	2,9	15	1,4	12	2,1	8	
	370	0,400	Decano	1000	999	-	-	1,6	20	2,2	9	2,7	36	
	405	0,432	3-Undeceno	1037	-	1,6	15	-	-	1,6	15	1,4	6	
	445	0,424	7-Metil-2-deceno	1079	-	3,7	35	8,8	1	2,3	15	3,1	51	
	455	0,480	3-Decino	1090	-	-	-	-	-	2,1	16	1,4	35	
	465	0,424	Undecano	1101	1100	-	-	-	-	-	-	9,0	13	
	520	0,424	2-Metil-undecano	1165	1165	1,0	7	-	-	1,1	10	1,5	18	
	555	0,432	Dodecano	1206	1200	8,0	25	8,0	44	7,1	4	9,7	13	
	620	0,424	Tridecano	1301	1300	4,3	8	3,2	3	3,5	11	3,9	15	
	790	0,480	Pentadecano	1501	1500	3,9	18	4,3	10	3,7	11	4,0	36	
	860	0,512	Hexadecano	1601	1600	-	-	4,1	5	4,2	5	-	-	

Estudo da biodiversidade de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

Hidrocarbonetos aromáticos	250	0,576	1,3-Dimetil-benzeno	871	866	12,1	8	-	-	11,5	16	12,5	9
	270	0,616	1,2-Dimetil-benzeno	895	896	14,2	6	15,5	17	12,3	12	13,7	12
	270	0,728	Etenilbenzeno	895	890	17,2	20	14,1	31	-	-	-	-
	365	0,624	1,2,3-Trimetil-benzeno	995	998	10,6	9	11,7	23	10,5	11	12,1	15
	450	0,616	2-Etil-1,3-dimetil-benzeno	1085	1100	-	-	0,4	32	-	-	-	-
	455	0,704	1-Metil-4-(1-metiletlenilo)-benzeno	1090	1091	-	-	-	-	-	-	0,8	13
	540	1,104	Naftaleno	1190	1179	5,2	16	5,2	17	8,6	58	5,5	37
	600	0,520	1,3-bis(1,1-dimetiletil)-benzeno	1259	1249	50,0	10	54,1	9	40,6	10	49,0	10
	700	1,136	Bifenil	1383	1385	2,6	12	2,1	19	1,5	18	1,5	14
	Hidrocarbonetos cíclicos	495	0,904	1,2-Dimetil-1-pentil-ciclopropano	1136	-	-	-	-	-	-	-	61,8
500		0,864	1-Metilpentil-ciclopropano	1142	-	206,3	26	205,7	3	-	-	-	-
640		0,448	1-Butil-2-propil-ciclopentano	1307	-	-	-	-	-	0,8	14	-	-
Área total						340,8	13	364,2	4	120,8	4	201,0	3
Nº total						14		19		19		20	
Nitrilos	355	1,544	Benzonitrilo	986	990	1,3	9	-	-	-	-	-	-
	445	0,832	Octanenitrilo	1080	1081	1,1	19	0,9	46	1,5	17	-	-
	500	2,160	Fenilacetoneitrilo	1144	1144	1,7	5	-	-	-	-	-	-
	585	1,344	o-Etilbenzotrilo	1243	-	1,7	12	1,0	19	0,8	6	-	-
Área total						5,9	10	1,9	31	2,2	13	0,0	
Nº total						4		2		2		0	
Piranos	275	0,488	2,2,4,6-Tetrametil-2H-pirano	901	-	-	-	2,1	11	-	-	-	-
	290	0,832	2,5-Dimetil-pirazina	911	911	66,5	19	9,8	20	6,1	15	8,4	34
	295	0,512	2,2,6-Trimetil-4-metileno-2H-pirano	922	-	1,4	17	1,5	3	-	-	-	-
	295	0,824	Etil-pirazina	922	928	1,0	32	-	-	-	-	-	-
	295	0,856	2,3-Dimetil-pirazina	922	917	0,8	28	-	-	-	-	-	-
	340	0,864	2,5-Dimetil-2-hidroxiometiltetrahidropirano	969	-	11,3	13	12,1	5	10,9	5	10,1	15
	370	0,776	2-Etil-5-metil-pirazina	1001	1000	10,5	29	1,3	64	1,1	46	-	-
	375	0,784	Trimetil-pirazina	1006	1007	6,6	17	1,0	38	1,6	31	1,6	16
	390	0,952	2-Etenil-5-metil-pirazina	1022	1025	4,9	9	-	-	-	-	-	-
	420	0,704	2-Metil-3-isopropilpirazina	1053	1056	3,5	20	0,9	27	0,8	36	-	-
	445	0,712	3-Etil-2,5-dimetil-pirazina	1080	1079	13,3	36	-	-	-	-	-	-
	455	0,952	2,2,4,6-Tetrametil-2H-pirano	1091	-	-	-	3,9	13	-	-	-	-
	515	0,672	3,5-Dietil-2-metil-pirazina	1160	1162	2,5	5	-	-	-	-	-	-
555	0,648	2-(2-Metilpropil)-3,6-dimetil-pirazina	1207	-	0,8	30	-	-	-	-	-	-	
600	0,688	2-Butil-3,5-dimetil-pirazina	1260	1254	1,4	16	-	-	-	-	-	-	
Área total						124,3	16	32,4	9	20,5	3	20,0	18
Nº total						13		8		5		3	
Tióis	155	0,600	Dissulfeto de metilo	731	738	1,7	28	0,9	25	0,7	11	-	-
	285	0,952	1,3-Oxatiano	912	-	25,9	18	12,7	14	8,0	14	7,4	16
	360	1,168	Dihidro-2-metil-3(2H)-Tiofenona	991	994	8,7	80	11,9	25	5,3	13	4,6	20
	360	2,200	3-(metiltio)-1-propanol	987	978	53,0	5	23,7	56	-	-	-	-
	385	1,536	2-Acetiliazole	1017	1014	2,7	6	-	-	-	-	-	-
	485	0,968	Acetato de 3-(metiltio)-propilo	1125	1123	1,3	26	-	-	-	-	-	-
	485	1,640	3-Metil-2-tiofenocarboxaldeído	1126	1133	0,8	11	-	-	-	-	-	-
	545	1,256	Benzotiofurano	1196	1172	0,9	18	-	-	-	-	-	-
	575	1,648	Benzotiazole	1231	1230	1,4	14	1,0	34	-	-	-	-
Área total						96,5	8	50,2	30	13,9	4	12,0	15
Nº total						9		5		3		2	
Outros	105	0,416	Pirrolidina	631	660			2,7	30				
	385	1,024	Cloreto de benzilo	1017	1023	1,4	51			0,6	14		
	840	1,112	2-Cloro-1,2-difeniletanona	1573	-	1,3	26						
Área total						2,7	77	2,7	30	0,6	14	0,0	
Nº total						2		1		1		0	
Total Geral						10438,9	7	7210,0	6	7485,4	9	6784,6	5
Nº Compostos Identificados						218		175		176		155	

^a primeiro tempo de retenção; ^b segundo tempo de retenção; ^c índice de retenção calculado pelo GCxGC-ToFMS; ^d índice de retenção da literatura; ^e desvio padrão relativo; ^f Identificação prévia em vinhos inoculados com *S. cerevisiae*